

3/81

CMCRCZ 10 (3), 205-290 (1981)

ΧΗΜΙΚΑ ΧΡΟΝΙΚΑ

ΝΕΑ ΣΕΙΡΑ

CHIMIKA CHRONIKA

NEW SERIES

**AN INTERNATIONAL EDITION
OF THE GREEK CHEMISTS ASSOCIATION**

MANAGING COMMITTEE

Irene DILARIS, Yannis GAGLIAS, Vassilios M. KAPOULAS, Vassilios LAMBROPOULOS,
Georgia MARGOMENOU - LEONIDOPOULOU, Panayotis PROUNTZOS, George SKALOS

Ex-officio Members: Panayotis PAPAPOPOULOS (Asst. Gen. Secretary of G.C.S.),
Stelios CHATZIYANNAKOS (Treasurer of G.C.S.)

EDITORS - IN - CHIEF

V.M. KAPOULAS

G. SKALOS

G. MARGOMENOU - LEONIDOPOULOU

EDITORIAL ADVISORY BOARD

N. ALEXANDROU

Org. Chem., Univ. Salonica

A. ANAGNOSTOPOULOS

Inorg. Chem., Tech. Univ. Salonica

P. CATSOULACOS

Pharm. Chem., Univ. Patras

G.D. COUMOULOS

Physical Chemistry Athens

C.A. DEMOPOULOS

Biochemistry, Univ. Athens

C.E. EFSTATHIOU

Anal. Chem., Univ. Athens

A.E. EVANGELOPOULOS

Biochemistry, N.H.R.F., Athens

S. FILIANOS

Pharmacognosy, Univ. Athens

D.S. GALANOS

Food Chem., Univ. Athens

Α.Γ. GALINOS

Inorg. Chem. Univ. Patras

P. GEORGAKOPOULOS

Pharm. Techn., Univ. Salonica

I. GEORGATSOS

Biochemistry, Univ. Salonica

M.P. GEORGIAIDIS

Org./Med. Chem., Agr. Univ. Athens

N. HADJICHRISTIDIS

Polymer Chem., Univ. Athens

T.P. HADJIOANNOU

Anal. Chem., Univ. Athens

E. HADJOURDIS

Photochem., N.R.C. "D", Athens

H. CHJA

Food Technol., Univ. Salonica

D. JANNAKOUDAKIS

Phys. Chem., Univ. Salonica

N.K. KALFOGLOU

Polymer Sci., Univ. Patras

E. KAMPOURIS

Polymer. Chem., Tech. Univ. Athens

M.I. KARAYANNIS

Anal. Chem., Univ. Ioannina

N. KATSANOS

Phys. Chem., Univ. Patras

D. KIOUSSIS

Petrochemistry, Univ. Athens

A. KOSMATOS

Org. Chem., Univ. Ioannina

P. KOUROUNAKIS

Pharm. Chem., Univ. Salonica

G.P. KYRIAKAKOU

Org./Phys. Chem., Univ. Ioannina

S.B. LITSAS

Bioorg. Chem., Arch. Museum, Athens

G. MANOUSSAKIS

Inorg. Chem., Univ. Salonica

I. MARANGOSIS

Chem. Mech., Tech. Univ. Athens

I. NIKOKAVOURAS

Photochem., N.R.C. "D", Athens

D.N. NICOLAIDES

Org. Chem., Univ. Salonica

C.M. PALEOS

N.R.C. "Democritus", Athens

V. PAPAPOPOULOS

N.R.C. "Democritus" Athens

G. PAPAGEORGIOU

Biophysics, N.R.C. "D", Athens

V.P. PAPAGEORGIOU

Nat. Products, Tech. Univ. Salonica

S. PARASKEVAS

Org. Chem., Univ. Athens

G. PHOKAS

Pharmacognosy, Univ. Salonica

S. PHILIPAKIS

N.R.C. "Democritus", Athens

G. PNEUMATIKAKIS

Inorg. Chem., Univ. Athens

C.N. POLYDOROPOULOS

Phys./Quantum Chem., Univ. Ioannina

K. SANDRIS

Organic Chem., Tech. Univ. Athens

M.J. SCOULLOS

Env./Mar. Chem., Univ. Athens

C.E. SEKERIS

Mol. Biology, N.H.R.F., Athens

G.A. STALIDIS

Phys. Chem., Univ. Salonica

C.I. STASSINOPOULOU

N.R.C. "Democritus", Athens

A. STASSINOPOULOS

N.R.C. "Democritus", Athens

A. STAVROPOULOS

Ind. Technol., G.S.I.S., Piraeus

I.M. TSANGARIS

Inorg. Chem., Univ. Ioannina

G. TSATSARONIS

Food Technol., Univ. Salonica

G.A. TSATSAS

Pharm. Chem., Univ. Athens

A.K. TSOLIS

Chem. Technol., Univ. Patras

G. VALCANAS

Org. Chem., Tech. Univ. Athens

A.G. VARVOGLIS

Org. Chem., Univ. Salonica

G.S. VASSILIKIOTIS

Anal. Chem., Univ. Salonica

S. VOLIOTIS

Instrum. Analysis, Univ. Patras

E.K. VOUDOURIS

Food Chem., Univ. Ioannina

I. VOURVIDOU - FOTAKI

Org. Chem., Univ. Athens

I.V. YANNAS

Mech. Eng., M.T.I., U.S.A.

Correspondence, submission of papers, subscriptions, renewals and changes of address should be sent to Chimika Chronika, New Series, 27 Kaningos street, Athens, Greece. The Guide to Authors is published in the first issue of each volume, or sent by request. Subscriptions are taken by volume at 500, drachmas for members and 1.000 drachmas for Corporations in Greece and 28U.S. dollars to all other countries except Cyprus, where subscriptions are made on request.

Printed in Greece by FOTOKIMENO E.P.E.

Υπεύθυνος σύμφωνα με τό νόμο: Παναγιώτης Ευβάλης Κάννιγγος 27, Αθήνα (147)

CONTENTS

Gangliosides: Chemistry and Biochemistry (<i>in Greek</i>) by V.M. Kapoulas and E. Tsaberis	207
Synthesis and biological activity of new dimethyl-carbamates of the dihydric phenols (<i>in English</i>) by A. Vavayannis and G. Tsatsas	231
Novel Mannich bases derived from certain tetracyclines (<i>in French</i>) by G. Papaioannou	243
Hydrogen ion reaction at the mercury electrode (<i>in English</i>). by A. Medved	253
Isolation and purification of a gentamicin-acetyl-transferase and a gentamicin-adenyltransferase coded by the plasmid PK 237 (<i>in English</i>) by F. Angelatou, S.B. Litsas and P. Kontomichalou	263
Study of physical adsorption using the hole theory. II. Multilayer adsorption on homogeneous surfaces (<i>in English</i>) by D.A. Jannakoudakis, P.J. Nikitas and A.K. Pappa-Louisi	273
SHORT PAPERS	
Preparation of ¹³¹ I-aminoglutethimide (<i>in English</i>) by A. Varvarigou and M. Villa	287

REVIEW

Chimika Chronica, New Series, 10, 207-230 (1981)

ΓΑΓΓΛΙΟΖΙΤΕΣ: ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

B.M. ΚΑΠΟΥΛΑ καί E. ΤΣΑΜΠΕΡΗ

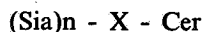
Έργαστήριο Βιοχημείας, Φυσιολογική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ίωαννίνων, Ίωάννινα.

(Έλήφθη 10 Αύγουστου 1978, Συμπληρώθηκε τήν 30 Μαρτίου 1981)

Είσαγωγή

Τό όνομα *γαγγλιοζίτης* έκφράζει άφ' ενός τό γεγονός ότι πρόκειται για ένώσεις πού είναι συστατικά τών γαγγλιακών κυττάρων του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) — άπ' όπου άπομονώθηκαν για πρώτη φορά— καί άφ' έτέρου τό γεγονός ότι πρόκειται για γλυκοζιτικά παράγωγα.

Οί γαγγλιοζίτες είναι *σιαλογλυκοσφιγγολιποειδή*, είναι δηλαδή γλυκοσφιγγολιποειδή, πού περιέχουν στό μόριό τους ένα ή περισσότερα *σιαλικά όξέα* (Sia) ένωμένα μέ έναν ουδέτερο όλιγοσακχαρίτη (-X-), πού κι αυτός είναι ένωμένος μέ μία Ν-άκυλο-σφιγγοσίνη ή *κηραμίδιο* (Cer):



Σιαλικά όξέα είναι τό κοινόχρηστο όνομα τών Ν-άκετύλο- καί Ν-γλυκολύλο-νευραμινικών όξέων, καθώς καί τών έστέρων τους ή άλλων παραγών τών ύδροξυλομάδων του μορίου του νευραμινικού όξέος (π.χ. Ν,Ο-διακετυλο-νευραμινικό όξύ). Τό Ν-άκετυλο-νευραμινικό όξύ συμβολίζεται μέ NANA ή AcNeu ή NeuAc (ή NeuNAc), ένώ τό Ν-γλυκολύλο-νευραμινικό όξύ συμβολίζεται άντίστοιχα μέ NGNA ή GcNeu ή NeuGc (ή NeuNGI).

Ο ουδέτερος όλιγοσακχαρίτης X περιέχει συνήθως Ν-άκετυλεξοζαμίνη (Ν-άκετυλογαλακτοζαμίνη, GalNAc). "Όταν δέν τήν περιέχει, τά άντίστοιχα μόρια γαγγλιοζιτών είναι αίματοζίτες. Έξ άλλου, μόρια πού περιέχουν μέν GalNAc, άλλα δέν περιέχουν Sia είχαν όνομασθει άρχικά *γλοβοζίτες*. Παρ' όλο ότι δέν είναι σιαλο-παράγωγα, οί γλοβοζίτες υπάγονται συνήθως στην τάξη τών γαγγλιοζιτών καί σήμερα θεωρείται ότι ή πιο χαρακτηριστική διαφορά τους από τους υπόλοιπους γαγγλιοζίτες είναι ότι περιέχουν α-γλυκοζιτικούς δεσμούς, σέ άντίθεση μέ τους γαγγλιοζίτες καί αίματοζίτες, πού περιέχουν μόνον β-

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι: Δομή και συμβολισμός γαγγλιοζιτών εγκεφάλου θηλαστικών

Δ Ο Η Η	Σ Υ Μ Β Ο Λ Ι Σ Μ Ο Σ*			
	Svennerholm	Kuhn Wiegandt	Wiegandt	Korey Gonatas
NANA(2-3)Gal(1-1)Cer	—	G _{Gal}	G _{Gal} 1NeuAc	(G ₁)
NANA(2-3)Gal(1-4)Glc(1-1)Cer	G _{M3}	G _{Lac} 1	G _{Lac} 1NeuAc	G ₆
NANA(2-8)NANA(2-3)Gal(1-4)Glc(1-1)Cer	G _{D3}	G _{Lac} 2	G _{Lac} 2NeuAc	G _{3A}
GalNAc(1-4)Gal(1-4)Glc(1-1)Cer $\begin{matrix} (3) \\ (2) \\ \text{NANA} \end{matrix}$	G _{M2}	G _{NTr11} 1 (G ₀)	G _{Otri} 1NeuAc	G ₅
GalNAc(1-4)Gal(1-4)Glc(1-1)Cer $\begin{matrix} (3) \\ (2) \\ \text{NANA}(\beta-2)\text{NANA} \end{matrix}$	G _{D2}	G _{NTr11} 2	G _{Otri} 2NeuAc	G _{2A}
Gal(1-3)GalNAc(1-4)Gal(1-4)Glc(1-1)Cer $\begin{matrix} (3) \\ (2) \\ \text{NANA} \end{matrix}$	G _{M1}	G _{NTr} 1 (G _I)	G _{Intet} 1NeuAc	G ₄
GalNAc(1-4)Gal(1-4)Glc(1-1)Cer $\begin{matrix} (3) \\ (2) \\ \text{NANA}(\beta-2)\text{NANA} \end{matrix}$	G _{D1a}	G _{NTr} 2a (G _{II})	G _{Otet} 2aNeuAc	G ₃
NANA(2-3)Gal(1-3)GalNAc(1-4)Gal(1-4)Glc(1-1)Cer $\begin{matrix} (3) \\ (2) \\ \text{NANA} \end{matrix}$	G _{D1b}	G _{NTr} 2b (G _{III})	G _{Otet} 2bNeuAc	G ₂
NANA(2-8)NANA(2-3)Gal(1-3)GalNAc(1-4)Gal(1-4)Glc(1-1)Cer $\begin{matrix} (3) \\ (2) \\ \text{NANA} \end{matrix}$	G _{T1a}	—	G _{Otet} 3aNeuAc	—
NANA(2-3)Gal(1-3)GalNAc(1-4)Gal(1-4)Glc(1-1)Cer $\begin{matrix} (3) \\ (2) \\ \text{NANA}(\beta-2)\text{NANA} \end{matrix}$	G _{T1b}	G _{NTr} 3a (G _{IV})	G _{Otet} 3bNeuAc	G ₁
NANA(2-8)NANA(2-3)Gal(1-3)GalNAc(1-4)Gal(1-4)Glc(1-1)Cer $\begin{matrix} (3) \\ (2) \\ \text{NANA}(\beta-2)\text{NANA} \end{matrix}$	G _{Q1}	G _{NTr} 9 (G _V)	G _{Otet} 4NeuAc	(G ₀)
NANA(2-8)NANA(2-3)Gal(1-3)GalNAc(1-4)Gal(1-4)Glc(1-1)Cer $\begin{matrix} (3) \\ (2) \\ \text{NANA}(\beta-2)\text{NANA} \end{matrix}$			G _{Otet} 5NeuAc	

* Στις συντημήσεις των χημικών τύπων των γαγγλιοζιτών που καθόρισε η IUPAC οι δλιγοσακχαρίτες γαγγλιο-τριαόζη, γαγγλιο-τετραόζη συμβολίζονται με G₃Ose₃, G₄Ose₄ αντίστοιχα (βλ. Πίν. II), ενώ τό άκετυλονευραμινικό όξύ (NANA) συμβολίζεται με NeuAc και τό γλυκολονευραμινικό όξύ με NeuGc. Ο άριθμός μορίων νευραμινικού στό μόριο του γαγγλιοζίτη συμβολίζεται με έναν άριθμητικό δείκτη (π.χ. NeuAc)₂. Η θέση σύνδεσης του NeuAc στην δλιγοσακχαρική άλυσίδα συμβολίζεται με τούς ρωμαϊκούς άριθμούς, I, II, III, IV,..... (άρχίζοντας από τό άκρο που συνδέεται με τό Cer), ενώ ή θέση του δεσμού του NeuAc με τό αντίστοιχο σάκχαρο συμβολίζεται με έναν άριθμητικό εκθέτη, π.χ. IV³ για νά δείξη ότι τό NeuAc συνδέεται με τόν άνθρακα 3 της άκράιας όμάδας γαλακτόζης, που έχει τόν άριθμό IV. Έτσι οι γαγγλιοζίτες Cml, Gd1a και D1b συμβολίζονται αντίστοιχα με II³NeuAc-G₃Ose₄-Cer, II³(NeuAc)₂-G₃Ose₄-Cer και VI³NeuAc, II³NeuAc-G₃Ose₄-Cer.

** Στή βιβλιογραφία αναφέρονται και άλλα μόρια γαγγλιοζιτών, όπως π.χ.:

II ³ NeuGc-Lac-Cer	ή G _{Lac} INGI	(κατά Wiegandt), αντίστοιχος του G _{M1}
II ³ NeuAc/NeuGc-Lac-Cer	ή G _{Lac} 2NeuAc/NeuNGI	(« »), « » G _{D3}
II ³ (NeuGc) ₂ -Lac-Cer	ή G _{Lac} 2NeuNGI	(« »), « » »
IV ³ NeuAc-nLcOse ₄ -Cer	ή G _{I nter} 1aNeuAc	(« »), « » G _{M1}
IV ⁶ NeuAc-nLcOse ₄ -Cer	ή G _{I nter} 1bNeuAc	(« »), ———
IV ² Fuc.II ³ NeuAc-G ₃ Ose ₄ -Cer	ή G _{Otri} 1NeuAc	(« »), ———
IV ³ NeuAc-nLcOse ₄ -Cer	—————	—————

γλυκοζιτικούς δεσμούς.

Γαγγλιοζίτες έχουν βρεθεί στον εγκέφαλο (1) και σε άλλα όργανα του ανθρώπου, καθώς και σε πλήθος άλλων οργανισμών. Η γνώση μας πάντως για την φυσιολογία τους έχει ακόμα σημαντικές ελλείψεις. Μεταξύ των άλλων λέγεται ότι μετέχουν στον σχηματισμό των νευρικών μεμβρανών και των συναπτικών επαφών (2) και ότι συσχετίζονται με την μεταφορά της νευρικής ώσης (3). Άκόμα, όπως όλες οι ενώσεις που στο μόριό τους περιέχουν σάκχαρά και που βρίσκονται στην κυτταρική επιφάνεια, παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της αντίγονικής δράσης (4) και της κυτταρικής διαίρεσης (5).

Η ύπαρξη γαγγλιοζιτών στη φύση ανακαλύφθηκε κατά τη βιοχημική έρευνα μερικών από τις παθολογικές καταστάσεις, που χαρακτηρίζονται σαν «ιδιότυπες νευρολιπιδώσεις», όπως οι άμαυρωτικές ιδιωτίες και οι ασθένειες Niemann-Pick και Tay-Sachs. Όπως δηλώνει και τό όνομά τους, στίς παθολογικές αυτές καταστάσεις είχε διαπιστωθή από τούς νευροπαθολόγους ότι στά γαγγλιανά κύτταρα συσσωρευόνταν μεγάλες ποσότητες λιποειδών. Ο Klenk (6,7) βρήκε ότι στη Niemann-Pick γίνεται συσσώρευση σφιγγομυελίνης, ενώ την Tay-Sachs χαρακτήριζε ένα νέο άγνωστο σφιγγολιποειδές (8,9,10,11). Ανάμεσα στά προϊόντα της υδρόλυσης του σφιγγολιποειδούς αυτού ο Klenk ανίχνευσε λιπαρά οξέα, σφιγγοσίνη, εξόζες (κυρίως γαλακτόζη) και μεθοξυ-νευραμινικό οξύ. Λιποειδή του ίδιου τύπου είχαν ήδη συναντήσει οι Levene και Landsteiner (12) σε νεφρό αλόγου και ο Walz (6) σε σπλήνα και εγκέφαλο του ίδιου ζώου. Έξ άλλου, τό 1938, ο Blix (13) βρήκε 9% εξοζαμίνη σε λιποειδές επεξεργασμένο όμοια με εκείνο του Klenk. Δέκα χρόνια αργότερα βρέθηκε ότι ή εξοζαμίνη ήταν D-γαλακτοζαμίνη (14).

ΠΙΝΑΚΑΣ II: Όνόματα και συντμήσεις Όλιγοσακχαρικών αλκιδών, που άπαντούν σε μόρια γαγγλιοζιτών ή άλλων γλυκολιποειδών.

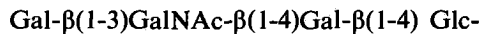
Δομή	Κοινόχρηστη Όνομασία	Σύντμηση	Σύντμηση (μικρή)
Gal (α1-4) Gal (β1-4) Glc	Γλοβοτριάοζη	GbOse ₃	Gb ₃
GalNAc (β1-3) Gal (α1-4) Gal (β1-4) Glc	Γλοβοτετραοζη	GbOse ₄	Gb ₄
Gal (α1-3) Gal (β1-4) Glc	Ίσογλοβοτριάοζη	iGbOse ₃	iGb ₃
GalNAc (β1-1) Gal (α1-3) Gal (β1-4) Glc	Ίσογλοβοτετραοζη	iGbOse ₄	iGb ₄
Gal (β1-4) Gal (β1-4) Glc	Μυκοτριάοζη	McOse ₃	Mc ₃
Gal (β1-3) Gal (β1-4) Gal (β1-4) Glc	Μυκοτετραοζη	McOse ₄	Mc ₄
GlcNAc(β1-3) Gal (β1-4) Glc	Λακτοτριάοζη	LcOse ₃	Lc ₃
Gal (β1-3) GlcNAc(β1-3) Gal (β1-4) Glc	Λακτοτετραοζη	LcOse ₄	Lc ₄
Gal (β1-4) GlcNAc(β1-3) Gal (β1-4) Glc	Νεολακτοτετραοζη	nLcOse ₄	nLc ₄
GlcNAc (β1-4) Gal (β1-4) Glc	Γαγγλιοτριάοζη	GgOse ₃	Gg ₃
Gal (β1-3) GlcNAc(β1-4) Gal (β1-4) Glc	Γαγγλιοτετραοζη	GgOse ₄	Gg ₄
Gal (α1-4) Gal	Γαλαβιδόζη	GaOse ₂	Ga ₂
Gal (1-4) Gal (α1-4) Gac	Γαλατριάοζη	GaOse ₃	Ga ₃
GalNAc (1-3) Gal (1-4) Gal (α1-4) Gal	N-Άκετυλογαλακτοζαμινύλοτριάοζη	GalNAc(1-3) GaOse ₃	---

Έτσι, μέ τά παραπάνω δεδομένα πού επιβεβαιώθηκαν καί συμπληρώθηκαν αργότερα από διάφορους έρευνητές, οί γαγγλιοζίτες καθορίστηκαν πió λεπτομερειακά σάν «γλυκοσφιγγολιποειδή, πού περιέχουν στό μόριο τους έξόξες, σιαλικά όξέα καί Ν-άκετυλοεξοζαμίνη». Παρ' όλα αυτά, στήν οίκογένεια τών γαγγλιοζιτών έχει επικρατήσει νά υπάγονται επίσης καί όρισμένα συγγενή μόρια λιποειδών, πού δέν περιέχουν έξοζαμίνη, οί *αιματοζίτες*.

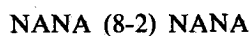
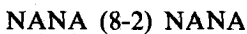
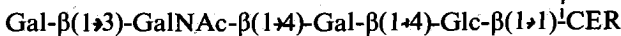
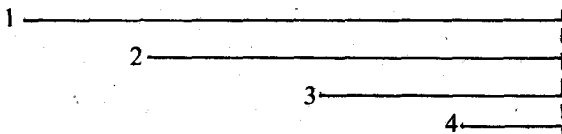
Χαρακτηριστικά τής Χημικής Δομής καί Συστήματα Όνοματολογίας τών Γαγγλιοζιτών

Οί γαγγλιοζίτες πού προέρχονται από διάφορες πηγές διαφέρουν μεταξύ τους ώς πρός τούς τύπους τών λιπαρών όξέων, καθώς καί τών λιπαρών άμινο-αλκοολών (σφιγγοσίνης καί παραγώνων ή άναλόγων της), δηλαδή ώς πρός τούς τύπους τών κηραμιδυλομάδων τού μορίου τους. Οί κυριότερες όμως διαφορές τους αναφέρονται στόν αριθμό καί τό είδος τών ύδατανθρακικών μονάδων, πού άπαρτίζουν τό όλιγοσακχαρικό τμήμα τού μορίου τους καί πού χρησιμοποιούνται σάν βάση γιά τόν χαρακτηρισμό τους.

Οί κυριότεροι —ποσοτικά— γαγγλιοζίτες τού ΚΝΣ καί τών περισσοτέρων άλλων ιστών περιέχουν συνήθως ένα ούδέτερο ύδατανθρακικό κομμάτι, τόν τετρασακχαρίτη:



πού είναι ένωμένος στό α- ύδροξύλιο τής Ν-άκυλο-σφιγγοσίνης (κηραμιδίου) μέ β-γλυκοζιτικό δεσμό (σχήμα 1). Όμάδες σιαλικού όξέος είναι ένωμένες μέ κετοζιτικό δεσμό είτε στή θέση 3 τής μιās ή καί τών δύο γαλακτοζυλομάδων τής παραπάνω άλυσσίδας, είτε στή θέση 8 μιās άλλης σιαλυλομάδας, ένωμένης μέ γαλακτόζη. Έτσι, τό μεγαλύτερο γαγγλιοζιτικό μόριο, στό όποιο καλύπτονται όλες οί παραπάνω δυνατότητες, είναι ένας τετρασιαλο-γαγγλιοζίτης.



τετρασιαλο — γαγγλιοζίτης

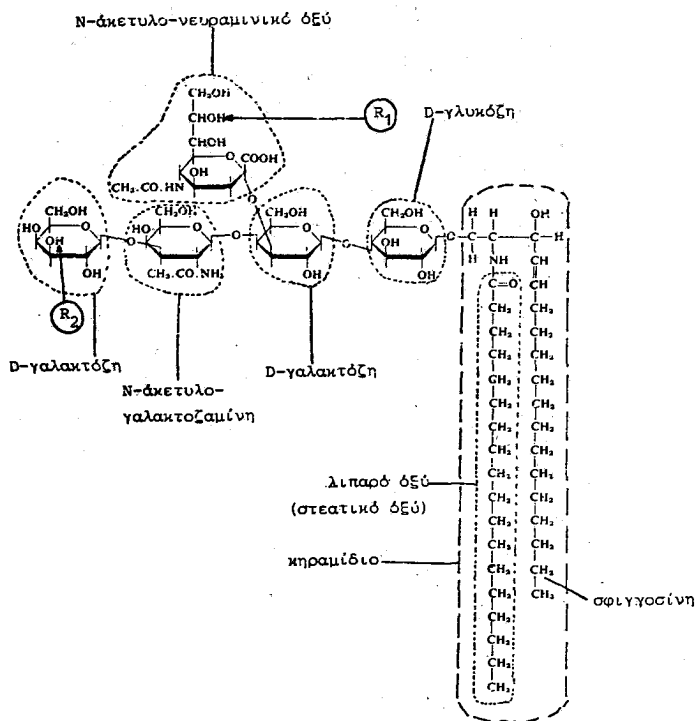
Όλα τά υπόλοιπα μόρια τών γαγγλιοζιτών μπορούν νά θεωρηθούν σάν προϊόντα σταδιακής άποικοδόμησης τού πió πάνω μορίου (Πίνακας Ι).

Όσον άφορā τήν όνοματολογία, γιά τούς γαγγλιοζίτες έχουν περιγραφηί έπτά συστήματα όνοματολογίας. Από αυτά, τά τέσσερα πού έχουν επικρατήσει συνοψίζονται στόν πίνακα Ι καί περιγράφονται παρακάτω. Άκόμα, ό πίνακας Ι

δείχνει τήν δομή καί τήν κωδικοποιημένη όνομασία τών γαγγλιοζιτών στά τέσσερα αυτά συστήματα.

α) *Συμβολισμός κατά Svennerholm (15)*: Μέ τό γράμμα G συμβολίζεται γενικά ό γαγγλιοζίτης. Τά γράμματα M,D,T,Q (άπό τό Μοπο-, Di- κ.λ.π.) δείχνουν τόν άριθμό τών σιαλικών όξέων στό μόριο τοῦ γαγγλιοζίτη. Άκολουθεί ένας άπό τούς άραβικούς άριθμούς 1,2 ή 3 πού συμβολίζουν: τό 1 τόν βασικό τετρασακχαρίτη, τό 2 τόν τρισακχαρίτη, πού προκύπτει άπ' αὐτόν μέ άπόσπαση τής άκρικής γαλακτόζης καί τό 3 τόν δισακχαρίτη, πού προκύπτει άπό τήν ίδια άλυσσίδα χωρίς τήν άκρική γαλακτόζη καί τήν N-άκετυλο-γαλακτοζαμίνη (βλέπε παραπάνω τύπο τετρασιαλο-γαγγλιοζίτη). Γιά τούς γαγγλιοζίτες εκείνους πού περιέχουν δύο ή τρία σιαλικά όξέα, ακολουθεί ένας άκόμα δείκτης, a ή b, πού χαρακτηρίζει —αὐθαίρετα— τό ένα ή τό άλλο άπό τά δύο ίσομερή μόρια γαγγλιοζίτη, πού είναι δυνατά στήν κάθε μία άπό τίς περιπτώσεις αυτές.

β) *Συμβολισμός κατά Kuhn καί Wiegandt (16)*: Μέ τό γράμμα G συμβολίζεται γενικά ό γαγγλιοζίτης. Ο δείκτης (λατινικός άριθμός I,II,III κ.λ.π.) δείχνει τήν θέση τοῦ γαγγλιοζίτη σέ χρωματογραφία λεπτής στιβάδας άπό πάνω πρós τά κάτω. Άργότερα οί ίδιοι έρευνητές, άναθεωρώντας τό σύστημα αὐτό, πρότειναν (17) γιά τήν όλιγοσακχαρική άλυσσίδα τών γαγγλιοζιτών (τήν έλεύθερη άπό σιαλικά όξέα) ένα συμβολισμό μέ συντμήσεις, πού μπαίνουν σάν δείκτες στό



Σχήμα 1. Στεροχημικός τύπος τοῦ μονοσιαλο-γαγγλιοζίτη GM₁ (όπου R₁=H, R₂=H) καί τών άλλων γαγγλιοζιτών (όπου R₁=H ή NANA καί R₂=H ή NANA ή NANA-NANA).

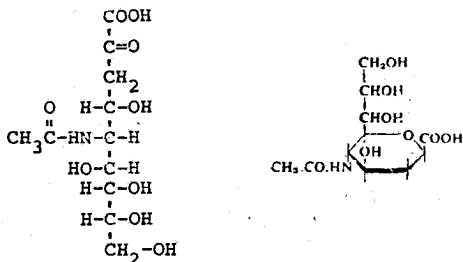
γράμμα G. Ακολουθεί ένας αριθμός που αναφέρεται στα σιαλικά όξέα και ένας δείκτης a ή b που προσδιορίζει την θέση του σιαλικού όξέος στο μόριο του γαγγλιοζίτη.

γ) *Συμβολισμός κατά Wiegandt*: Ο συμβολισμός αυτός είναι τροποποίηση του προηγούμενου που πρότεινε ο ίδιος ο Wiegandt (18,19,20) προσαρμόζοντας τον στην ονοματολογία της IUPAC-IUB (21,22). Συγκεκριμένα, ανάλογα με το αν το σιαλικό όξύ είναι N-άκετυλο-νευραμινικό ή N-γλυκοσυλο-νευραμινικό, προστέθηκε ή ένδειξη NeuNAc και NeuNGI αντίστοιχα.

δ) *Συμβολισμός κατά Korey και Gonatas (23)*: Με το γράμμα G συμβολίζεται γενικά ο γαγγλιοζίτης. Ο δείκτης που ακολουθεί (0,1,2,3,4, κ.λπ.) δείχνει τη θέση του γαγγλιοζίτη στη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Οι διάφορες θέσεις των σιαλικών όξεων συμβολίζονται με A ή B.

Συστατικά των γαγγλιοζιτών

Σιαλικά όξέα: Οι Blix, Gottschalk και Klenk (29), πρότειναν τον όρο νευραμινικό όξύ για την δομή $C_9H_{17}O_8N$. Όλα τα σιαλικά όξέα που υπάρχουν στη φύση είναι N-άκυλωμένα και μερικά απ' αυτά είναι επίσης υποκατεστημένα στην α-υδροξυλομάδα (8-0-υποκατεστημένα). Τα παράγωγα αυτά του νευραμινικού όξέος χαρακτηρίζονται με βάση τη φύση και τον δεσμό του ή των υποκαταστατών (π.χ. N-άκετυλο-νευραμινικό όξύ, N-γλυκοσυλο-νευραμινικό όξύ, 8-0-N άκετυλο-νευραμινικό όξύ κ.λπ.), ενώ ο όρος σιαλικό όξύ είναι γενικός για κάθε άκυλωμένο νευραμινικό όξύ. Σήμερα, όλοι έχουν δεχθεί την παραπάνω ονοματολογία εκτός από το εργαστήριο του Kuhn, που χρησιμοποιεί τον όρο λακταμινικό όξύ αντί για το N-άκετυλο-νευραμινικό όξύ. Στους γαγγλιοζίτες του ανθρώπινου εγκεφάλου δεν έχει βρεθεί μέχρι σήμερα παρά μόνο N-άκετυλο-νευραμινικό όξύ (30, 31, 32, 33), ενώ στον εγκέφαλο ψαριών έχει βρεθεί και N,Ο-διακετυλο-νευραμινικό όξύ. Στο στρώμα των ερυθροκυττάρων του αλόγου έχει βρεθεί μόνο ο γλυκολικός τύπος (32). Το N-γλυκοσυλο-νευραμινικό όξύ έχει απομονωθεί και από τον σπλήνα του βοδιού (34).

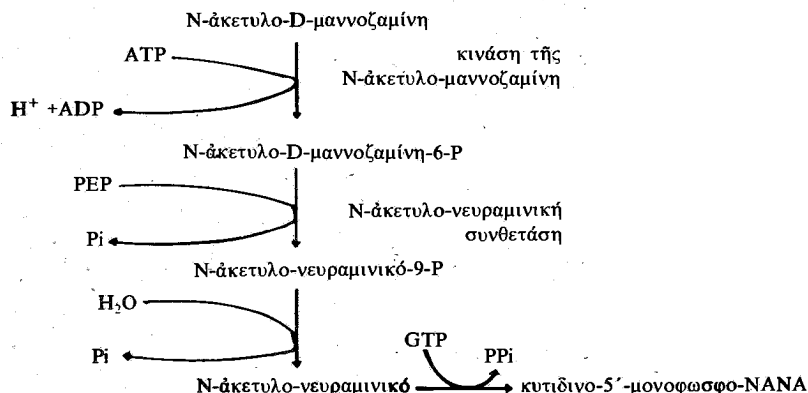


N-άκετυλο-νευραμινικό όξύ

Αδολική συμπύκνωση μεταξύ N-άκετυλο-μαννοζαμίνης και πυροσταφυλικού όξέος μας δίνει το πιο χαρακτηριστικό συστατικό των γαγγλιοζιτών, το NANA. Στη γνωστή χημεία των σιαλικών όξεων (24), το μόνο σκοτεινό σημείο υπήρξε η στερεοχημική διαμόρφωση στη θέση C_4 . Ο Kuhn και οι συνεργάτες

του (25, 26) έδειξαν ότι η υδροξυλομάδα του C₄ είναι δεξιά στο προβολικό μοντέλλο του Fischer και όχι αριστερά όπως είχε προταθή νωρίτερα. Αυτό επιβεβαιώθηκε επίσης και από μελέτες σχετικές με τη βιοσύνθεση του NANA. Έτσι, στους ιστούς των θηλαστικών, οι πλησιέστερες πρόδρομες ενώσεις των σιαλικών οξέων είναι το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό οξύ και η N-άκετυλο-μαννοζαμίνη (27,28).

Η αντίστοιχη βιοσυνθετική πορεία καταλύεται από τρία ένζυμα: Μιά κινάση, ένα συμπυκνωτικό και ένα άποφωσφορλιωτικό ένζυμο:

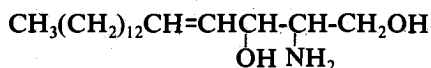


Για τη σύνδεση του στά μόρια των γαγγλιοζιτών, το σιαλικό οξύ πρέπει να είναι ενεργοποιημένο μετά από την συμπύκνωση με κυτιδινο-τριφωσφορικό οξύ (CTP) προς κυτιδινο-5'-μονοφωφο-NANA (35, 36). Η ένωση αυτή έχει απομονωθεί από την *Escherichia coli* K235 (37), αλλά δεν έχει απομονωθεί από θηλαστικά (36). Έχει ωστόσο, απομονωθεί ένα ένζυμο από τους υπογνάθιους αδένες προβάτων, από συκώτι χοίρου και από θηλαστικούς αδένες ποντικών, που καταλύει την παραπάνω συμπύκνωση (36).

Έξοξες-Έξοζαμίνη: Πρώτος ο Klenk ανίχνευσε σάκχαρα σε κλάσματα γαγγλιοζιτών. Από αυτά, η D-γαλακτόζη ήταν σε μεγαλύτερη ποσότητα σε σύγκριση με την D-γλυκόζη. Τα σάκχαρα που βρίσκονται στα γλυκοσφιγγολιποειδή είναι αλδόζες ενώ σπάνια απαντούν κετόζες όπως η L-φουκόζη (38, 39). Η D-γαλακτόζη ανιχνεύθηκε πρώτη (40) με την μορφή της μεθυλο-φαινυλο-υδραζόνης, ενώ η D-γλυκόζη ταυτοποιήθηκε με τις μεθόδους της χαρτοχρωματογραφίας και της οπτικής στροφικής ικανότητας.

Ένα ακόμα δομικό μόριο των γαγγλιοζιτών, η D-γαλακτοζαμίνη, ανιχνεύθηκε από τον Blix(13) και ταυτοποιήθηκε αργότερα από τον ίδιο και τους συνεργάτες του (14). Η έξοζαμίνη αυτή αποτελεί τό μοναδικό άκετυλιωμένο παράγωγο των γαγγλιοζιτών του εγκεφάλου (14, 41).

Σφιγγοσίνη: Η σφιγγοσίνη είναι μία ακόρεστη αμινοδιόλη με 18 άτομα άνθρακα, που ο Klenk απομόνωσε από τους γαγγλιοζίτες του ανθρώπινου εγκεφάλου (40).



Εκτός από την σφιγγοσίνη, τὰ φυσικά σφιγγολιποειδή περιέχουν καί άλλες ανάλογες βάσεις με περισσότερα ή λιγότερα άτομα άνθρακα (C_{16} , C_{20} -σφιγγοσίνη κ.λπ.) ή καί παράγωγα τής κανονικής C_{18} -σφιγγοσίνης, όπως ή διυδρο- καί ή δευδροφυτοσφιγγοσίνη. Ένα όμολογο τής σφιγγοσίνης, ή ισοσφιγγοσίνη, με 20 άτομα άνθρακα (42), βρέθηκε στό κλάσμα τών σφιγγολιποειδών του άλόγου καί του βοδιού, άποτελεί δέ ή μορφή αυτή τό 50% περίπου τής συνολικής σφιγγοσίνης που περιέχεται στους γαγγλιοζίτες του έγκεφάλου του βοδιού (43). Τό όμολογο αυτό δέν άνιχνεύθηκε στόν άνθρωπινο έγκεφαλο: Παράλληλα οί Stanacev καί Ghargaff σε πειράματά τους καί πάλι σε έγκεφαλο βοδιού, βρήκαν ότι ή συνολική σφιγγοσίνη άποτελείται από 50,0% σφιγγοσίνη, 3,4% διυδροσφιγγοσίνη καί 46,5% C_{20} -σφιγγοσίνη. Τέλος, παρατηρήθηκε καί μικρή ποσότητα C_{20} -διυδροσφιγγοσίνης.

Στό μόριο τής σφιγγοσίνης, ένωμένο με την α-άμινομάδα βρίσκεται τό μόριο του λιπαρού όξέος που περιέχουν οί γαγγλιοζίτες. Η ένωση αυτή όνομάζεται κηραμίδιο (Σχ. 1).

Λιπαρά όξέα: Τό λιπαρό όξύ που βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα στό κλάσμα τών γαγγλιοζιτών του άνθρῶπινου έγκεφάλου είναι τό στεατικό όξύ (40). Αναλύσεις με την τεχνική τής άέριας χρωματογραφίας έδειξαν ότι, πράγματι, άποτελεί τά 80 μέχρι 90% τών όλικῶν λιπαρῶν όξέων τών γαγγλιοζιτών του έγκεφάλου (43,44,45,46), καί μάλιστα όχι μόνο τών θηλαστικῶν αλλά καί άλλων σπονδυλωτῶν (46). Ο Grams καί οί συνεργάτες του δίνουν τον παρακάτω πίνακα λιπαρῶν όξέων τών γαγγλιοζιτών έγκεφάλου (43):

ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙΙ. Λιπαρά όξέα γαγγλιοζιτών έγκεφάλου διαφόρων όργανισμῶν

έγκεφαλος	14:0	16:0	18:0	22:0	22:1	22:2	24:2	24:1	24:0
βοδιού	—	3	82	4	—	2	2	3	4
πιθήκου	—	2	89	7	—	2	1	—	—
άνθρῶπου	—	—	86	10	—	3	—	—	—
χοίρου	—	4	82	7	—	2	1	2	3
γαλοπούλας	—	—	96	2	—	2	—	—	—
καρχαρία	—	5	72	1	4	5	—	13	—
άλιγάτορα	1	7	79	4	—	2	—	7	—

Αναλύσεις με την ίδια τεχνική τών γαγγλιοζιτών τών έρυθροκυττάρων του σκύλου καί του άλόγου έδειξαν ότι τό λιγνοκηρικό όξύ άποτελεί τά 75% τών όλικῶν λιπαρῶν όξέων τών γαγγλιοζιτών του άλόγου, ένῶ στό σκύλο ύπερισχύει τό νευρικό που μαζί με τό ληγνοκηρικό, άποτελοϋν τό 80% τών όλικῶν λιπαρῶν όξέων (47, 48). Καί στίς δύο περιπτώσεις βρέθηκαν σημαντικές ποσότητες βεγενικού όξέος.

Ανάλογη είναι ή παρουσία τών λιπαρῶν όξέων καί στους ύπόλοιπους ιστούς.

Μονοσιαλο-γαγγλιοζίτης G_{MI}

Ο Svennerholm (49), μετά από ήπια δξινη υδρόλυση του G_{MI} , βρήκε δύο δισακχαρίτες που περιείχαν γαλακτοζαμίνη. Ταυτόχρονα και άλλα εργαστήρια (16, 53) απομόνωσαν και βρήκαν ότι ο ένας απ' αυτούς, που είχε αναγωγικές ιδιότητες, έχει την εξής δομή: O-β-D-γαλακτοπυρανοζυλο(1-3)-2-άκεταμιδο-2-δεοξυ-D-γαλακτόζη. Η δομή αυτή ήταν ίδια με ενός δισακχαρίτη, που είχε βρεθεί στο αίμα (54). Από τους δισακχαρίτες αυτούς ο Svennerholm, αφού πρώτα απομάκρυνε το NANA, βρήκε την ακόλουθη αλληλουχία της σακχαρικής αλυσίδας του G_{MI} : Gal-GalNAc-Gal-Glc-Sph, που είναι κοινή για όλους τους γαγγλιοζίτες.

Αρκετά όμως δεδομένα που προηγήθηκαν βοήθησαν ή μεταγενέστερα επιβεβαίωσαν τη δομή αυτή. Ο Bogoch (50) μετά από άσθενή δξινη υδρόλυση του G_{MI} παρατήρησε ότι απελευθερώνεται περισσότερη γαλακτοζαμίνη από γαλακτόζη. Οι Klenk και Gielen (51) απομόνωσαν ένα δισακχαρίτη που περιείχε εξοζαμίνη και τον ταύτισαν με τον GalNAc(1-3) Gal, που είχε νωρίτερα απομονωθεί από τους Cote και Morgan (52).

Οι Kuhn και Wiegandt εργαζόμενοι πάνω στο ίδιο θέμα, μετά από ακετόλυση του G_{MI} με μίγμα οξικού οξέος-οξικού ανυδρίτη και μικρής ποσότητας θεικού οξέος (16), διαχώρισαν τους ολιγοσακχαρίτες που περιείχαν NANA. Απ' αυτούς το NANA αποσπάστηκε με ήπια δξινη υδρόλυση και απομονώθηκαν έτσι οι ολιγοσακχαρίτες του πίνακα IV. Με χαρτοχρωματαγραφική μελέτη των προϊόντων αυτών της υδρόλυσης, βρέθηκε ότι το NANA είναι ενωμένο με ένα τετρασακχαρίτη (γαγγλιο-N-τετραόζη), δύο τρισακχαρίτες (γαγγλιο-N-τριαόζες I και II), δύο δισακχαρίτες (γαγγλιο-N-βιόζες I και II), λακτόζη και ένα μονοσακχαρίτη, που βρέθηκε επίσης μετά από ακετόλυση σιαλυλο-λακτόζης που απομονώθηκε από πρωτόγαλα αγελάδας και ανθρώπινο γάλα (55, 56). Το NANA στο σιαλυλο-μονοσακχαρίτη αυτόν ήταν ενωμένο στο C_3 της γαλακτόζης.

ΠΙΝΑΚΑΣ IV. Ολιγοσακχαρίτες που απομονώθηκαν μετά από υδρόλυση του G_{MI}

όνομα	δομή
γαγγλιο-N-τετραόζη	Gal (1-3) GalNAc (1-4)Gal (1-4) Glc
γαγγλιο-N-τριαόζη I	Gal (1-3) GalNAc (1-4)Gal
γαγγλιο-N-τριαόζη II	GalNAc (1-4)Gal (1-4) Glc
γαγγλιο-N-βιόζη I	Gal (1-3) GalNAc
γαγγλιο-N-βιόζη II	GalNAc (1-4)Gal
λακτόζη	Gal (1-4) Glc

Στή συνέχεια, παρατηρήθηκε ότι ενώ το NANA μπορούσε εύκολα να αποσπαστεί από τη σιαλυλο-λακτόζη με τη βοήθεια του ένζυμου σιαλιδάση, από βακτήριο *Vibrio Cholera*, η απόσπασση γινόταν δύσκολα από τη σιαλυλο-γαγγλιο-βιόζη II, τις σιαλυλο-γαγγλιο-τριαόζες I και II και τη σιαλυλο-γαγγλιο-τετραόζη. Με κατεργασία του G_{MI} και της γαγγλιο-N-τετραόζης με υπερωδικό

όξύ, ή άκραιο γαλακτόζη καταστράφηκε γρήγορα, ένώ ή γλυκόζη πολύ άργά. Άκόμα ή δεύτερη γαλακτόζη παρέμεινε άθικτη. Μέ αυτά τά δεδομένα, βγήκε σάν συμπέρασμα ότι οι ύδροξυλομάδες τής γλυκόζης στά C_2 καί C_3 δέν ήταν ύποκατεστημένες καί ότι ή κοινή γαλακτόζη τών γαγγλιο-N-τριζών I καί II, είναι ένωμένη στό C_4 . Μετά από ανάλογη όξειδωση τής άκυλο-σφιγγοσυλο-N-τετραόζης(15), πού είχε άπομονωθή μετά από όξινη ύδρόλυση τού G_{M1} , παρατηρήθηκε ότι όλη ή γαλακτόζη είχε καταστραφή καί μόνο ή γαλακτοζαμίνη έμενε άθικτη. Τό άποτέλεσμα αυτό ήταν μία παραπάνω άπόδειξη ότι τό NANA τού G_{M1} είναι ένωμένο στό γαλακτοζιτικό τμήμα τής λακτόζης. Έτσι, προτάθηκε τό μοντέλο για τό δεσμό μεταξύ λακτόζης καί γαγγλιο-N-βιόζης I χρησιμοποιώντας τά άποτελέσματα τής ύπεριωδικής όξειδωσης καί άναγωγής τής γαγγλιο-N-τετραόζης μέ βοριοϋδρίδιο τού καλίου. Στά πειράματα αυτά άνιχνεύτηκαν χρωματογραφικά έρυθριτόλη, γλυκερίνη καί θρεϊτόλη. Είχε προηγουμένως δειχτή ότι ή έρυθριτόλη είναι παράγωγο τής γλυκόζης, ή γλυκερίνη τής άκραιο γαλακτόζης τής σακχαρικής άλυσσίδας καί ή θρεϊτόλη τής δεύτερης γαλακτόζης τής ίδιας άλυσσίδας. Μετά από όμοια κατεργασία γαγγλιο-N-τετραόζης I καί γαγγλιο-N-βιόζης II άνιχνεύτηκαν θρεϊτόλη καί γλυκερίνη. Αυτό ήταν ένδειξη ότι ή γαγγλιο-N-βιόζη I είναι ένωμένη (μέ β-γλυκοζιτικό δεσμό) στό C_4 τής γαλακτόζης τού μορίου τής λακτόζης. Η τελική άπόδειξη ήρθε μετά τήν άπομόνωση καί τόν καθορισμό τής δομής τής γαγγλιο-N-βιόζης II, πού άπομονώνεται κατά προτίμηση από τόν G_{M2} , άφού είναι ή μόνη δισακχαρική ομάδα τού G_{M2} πού περιέχει έξοζαμίνη.

Η άπομόνωση τών σακχάρων πού περιέχουν NANA καί ή ύπεριωδική όξειδωση τους έδειξαν ότι στους κύριους γαγγλιοζίτες τού ανθρώπινου καί τού βοδινοϋ έγκέφαλου τό NANA είναι ένωμένο στό C_3 τής γαλακτόζης τού λακτοζιτικού κοματιοϋ τής τετρασακχαρικής άλυσσίδας. Έτσι, στή γαγγλιο-N-βιόζη I τό NANA είναι ένωμένο στό C_4 τής ίδιας γαλακτόζης, σέ θέση cis. Η στερεοχημική αυτή διαμόρφωση έμποδίζει τή σιαλιδάση νά έλευθερώσει τό NANA. Αυτή ή ένδειξη ύποστηρίζεται καί από τό γεγονός ότι οι όχι μόνο οι γαγγλιοζίτες, αλλά καί όλοι οι σακχαρίτες πού έχουν ύποκαταστάτες στό C_4 αυτής τής γαλακτόζης δέν προσβάλλονται από τή σιαλιδάση, ένώ ό G_{M3} (57), ή σιαλυλο(2-3) γαλακτόζη καί ή σιαλυλο(2-3) λακτόζη, πού δέν έχουν ύποκαταστάτες στό C_4 ύδρολύονται εύκολα από τό ένζυμο.

Τέλος, τό σακχαρικό τμήμα είναι ένωμένο στό α-ύδροξύλιο τής σφιγγοσίνης (16, 43). Σ' αυτό κατέληξαν οι Kleink καί Gielen (51) μετά από ύπεριωδική όξειδωση τής μεθυλο-σφιγγοσίνης πού πήραν μετά από έξαντλητική μεθυλίωση τών γαγγλιοζιτών.

Έκτός τού G_{M1} έχουν άνιχνευτή καί άλλοι μονοσιαλο-γαγγλιοζίτες, δύο από τους όποιους αναφέρονται παρακάτω.

Στό φυσιολογικό ανθρώπινο έγκέφαλο ύπάρχει σέ ποσοστό 3-5% τού συνόλου τών γαγγλιοζιτών ό G_{M2} , πού διαφέρει από τους ύπόλοιπους μονοσιαλο-γαγγλιοζίτες στό ότι δέν έχει τήν άκραιο γαλακτόζη (16, 49). Η δομή του προσδιορίστηκε μετά από ποσοτική άνάλυση καί χρειάστηκε όξινη ύδρόλυση για τον προσδιορισμό τών έλευθερων σακχάρων τής άκυλο-σφιγγοσίνης (15,49). Η άσθενής όξινη ύδρόλυση έδωσε άκυλο-σφιγγοσινο-N-τριαόζη, άκυλο-

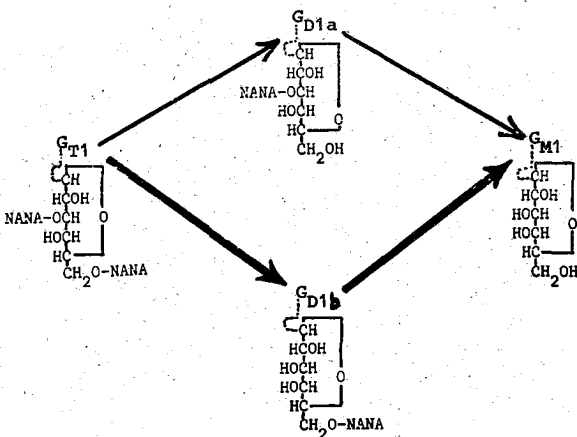
σφιγγοσινο-λακτόζη, και άκυλο-σφιγγοσινο-γλυκόζη, των οποίων οι τιμές R ήταν ίδιες με πρότυπων ενώσεων, που προήλθαν από τον G_{M1} (15,49). Στην ανάλυση δεν βρέθηκε άκυλο-σφιγγοσινο-N-τετραόζη, γεγονός που συμφωνεί με το τύπο G_{M2}

Από το στρώμα των ερυθροκυττάρων του αλόγου απομονώθηκε (47,48,59) ένας γαγγλιοζίτης, ο αιματοζίτης, που περιέχει λιπαρό δξύ, σφιγγοσίνη, εξόζη και NANA σε αναλογία 1:1:2:1. Ένας γαγγλιοζίτης με την ίδια σύσταση βρέθηκε στον σπλήνα (57), το συκώτι και τον εγκέφαλο ανθρώπου (15).

Δι- και Τριασιαλο-γαγγλιοζίτες

Σε κλάσμα που περιείχε τους G_{D1a}, G_{D1b} και G_{T1} μετά από επίδραση σιαλιδάσης από βακτήριο *Vibrio Cholera*, οι παραπάνω γαγγλιοζίτες μετατράπηκαν ποσοτικά στον G_{M1} (15,16,49). Από τα πειράματα φάνηκε ότι ο G_{D1a} υδρολύεται πολύ γρηγορότερα από τον G_{D1b} και ακόμα ότι ο G_{T1} υδρολύεται πρώτα σε G_{D1b} και μετά σε G_{M1} (15,16), ενώ μικρές ποσότητες του G_{T1} μετατρέπονται σε G_{D1a} (15) (Σχήμα 2). Υδρολύση του G_{T1} με ασθενή δξύ (0,01N υδροχλωρικό δξύ, βρασμός για 10 min) έδωσε ίσες περίπου ποσότητες G_{D1a} και G_{D1b}.

Τά αποτελέσματα των πειραμάτων υδρολύσης του G_{T1} ήταν σύμφωνα με την υπόθεση ότι τά δύο επί πλέον μόρια NANA (από τον G_{M1}) είναι ενωμένα με τέτοιο τρόπο που προσβάλλονται εύκολα από τά ιόντα H₃O⁺. Σκέφτηκαν λοιπόν ότι πρέπει να είναι ενωμένα σε διαφορετικά άτομα άνθρακα της εξόζης για να εξηγηθί ή μεγάλη διαφορά ταχύτητας στην απόσπασή τους. Ο Gauhe και οι συνεργάτες του (58) απομόνωσαν σιαλυλο-(2-6) λακτόζη και έδειξαν ότι με την ίδια σιαλιδάση ή ταχύτητα απόσπασης του NANA είναι μικρότερη απ' ότι στή σιαλυλο-(2-3) λακτόζη. Έτσι, υποτέθηκε ότι στον G_{D1a} το δεύτερο NANA πρέπει να είναι ενωμένο με τό C₃ της άκρικής γαλακτόζης, στον G_{D1b} στο C₆ και



Σχήμα 2. Επίδραση σιαλιδάσης από το βακτήριο *Vibrio Cholera* στον G_{T1}

στόν G_{T1} στους C_3 και C_6 της γαλακτόζης σύμφωνα με τό σχήμα 2 (15): Μερικά από τά συμπεράσματα τών πειραμάτων αυτών άναθεωρήθηκαν. Τά σημερινά δεδομένα για τίς θέσεις σύνδεσης τών μορίων του NANA στόν τετρασακχαριτή τών γαγγλιοζιτών παρουσιάζονται στό πίνακα 1.

Ίδιότητες τών γαγγλιοζιτών (60,61)

Οί σπουδαιότερες από τίς φυσικές και χημικές ιδιότητες τών γαγγλιοζιτών συνοψίζονται παρακάτω:

1. Μέ τό νερό σχηματίζουν κολλοειδή διαλύματα, σέ συγκεντρώσεις μέχρι και 10%. "Όταν είναι διαλυμένοι στό νερό δέν περνούν από ήμιπερατή μεμβράνη.
2. Διαλύονται εύκολα σέ μίγματα χλωροφορμίου-μεθανόλης και βενζολίου-μεθανόλης, λίγο στην άλκοολη, είναι σχεδόν άδιάλυτοι στην άκετόνη και άδιάλυτοι στόν αϊθέρα και τόν όξικό αϊθυλεστέρα.
3. Δέν άνάγουν τό φελλίγγειο ύγρό.
4. Άπανθρακώνονται εύκολα μέ άραιά άνόργανα όξέα.
5. Δίνουν θετική τήν αντίδραση Ehrlich.
6. Μέ τό αντίδραστήριο Bial δίνουν χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα.
7. Είναι ένώσεις άριστερόστροφες.

Άπομόνωση και καθαρισμός του κλάσματος τών γαγγλιοζιτών. Διαχωρισμός τών γαγγλιοζιτών μεταξύ τους

"Ένα από τά μεγαλύτερα έμπόδια στην μελέτη τών γαγγλιοζιτών είναι ότι δέν ύπάρχει μιá εύκολη και σίγουρη μέθοδος για τήν άπομόνωση καθαρού ύλικού μετά από εκχύλιση ιστών.

"Έκτός από τό μίγμα χλωροφορμίου-μεθανόλης που χρησιμοποιείται περισσότερο για τήν εκχύλιση τών γαγγλιοζιτών από τούς ιστούς, τελευταία χρησιμοποιήθηκαν σαν διαλύτες τό τετραύδροφουράνιο (33) και ή φαινόλη (16). Σ' όλες όμως τίς περιπτώσεις τό κλάσμα τών γαγγλιοζιτών μολύνεται από άλλα πολικά λιποειδή, καθώς και από μη λιποειδικές ούσιες.

"Ο Folch και οι συνεργάτες του (62) εκχύλισαν όλα τά λιποειδή του ιστού μέ μίγμα χλωροφορμίου-μεθανόλης 2:1 (v/v). "Απ' αυτό οι γαγγλιοζίτες άπομονώθηκαν μετά από διαπίδυση μέ νερό, ένω τά άλλα λιποειδή παρέμειναν στό χλωροφόρμιο. Και έδώ όμως ή φάση του νερού, εκτός από γαγγλιοζίτες, περιέχει και άλλα πολικά λιποειδή (σουλφατίδια ή φωσφατιδυλο-σερίνη) και μη λιποειδικές ούσιες, όπως άμινοξέα, πολυπεπίδια και σάκχαρα που δύσκολα άπομακρύνονται (63,64). "Η τεχνική αυτή πάντως βελτιώθηκε (65) ως προς τή ποσοτική παραλαβή τών γαγγλιοζιτών, μέ μόνο μειονέκτημα μιá κάποια άπώλεια τών μονοσιαλο-γαγγλιοζιτών (15). Παρ' όλα αυτά ή μέθοδος Folch είναι ή περισσότερο διαδεδομένη.

"Η μέθοδος του Svennerholm (66) δίνει τή δυνατότητα ποσοτικής παραλαβής

των γαγγλιοζιτών. Σ' αυτή, τό όλικό έκχύλισμα των λιποειδών τοποθετείται σέ στήλη κυτταρίνης, άπ' όπου τό μεγαλύτερο μέρος των άλλων λιποειδών έκλούεται μέ μίγμα χλωροφορμίου-αιθανόλης-νερού, ένώ οί γαγγλιοζίτες παραμένουν στή στήλη και μπορούν νά έκλουστούν μέ διάφορους διαλύτες εμπλουτισμένους σέ αιθανόλη και νερό. Μέ τή μέθοδο αυτή γίνεται και ένας μερικός διαχωρισμός των γαγγλιοζιτών σέ κλάσμα πλούσιο σέ NANA και σέ κλάσμα φτωχό σ' αυτό. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε επανειλημμένα μέ καλά άποτελέσματα (48,67).

Άρκετά καλός διαχωρισμός σέ μονο-, δι- και τρισιαλο-γαγγλιοζίτες έγινε μέ παρασκευαστική χαρτοχρωματογραφία (paper toll column), και μέ διαλύματα ανάπτυξης μίγματα προπανόλης-νερού (15).

Η χρωματογραφία σέ στήλη πυριτικού όξεός και μέ διαλύτες μίγματα χλωροφορμίου-μεθανόλης είναι ακόμα καλύτερη, αλλά μόνο για τήν άπομόνωση και τό καθαρισμό μονο- και δισιαλο-γαγγλιοζιτών (68).

Τέλος συνηθέστατη μέθοδος διαχωρισμού και στή συνέχεια ποσοτικής και ποιοτικής άνάλυσης άμιγών γαγγλιοζιτών είναι ή T.L.C., όπου διαχωρίζονται 5 ή και 6 ένώσεις, των όποιων οί τιμές R_f έχουν βρεθῆ για μερικούς από τούς περισσότερο κοινούς διαλύτες (15). Σάν συστήματα ανάπτυξης χρησιμοποιούνται συνήθως μίγματα:

α) Χλωροφορμίου-μεθανόλης-νερού σέ αναλογίες 60:35:8 (v/v/v) ή 50:50:8 (v/v/v) για τούς μονοσιαλο-γαγγλιοζίτες.

β) Προπανόλης-νερού σέ αναλογίες 7:3(v/v) ή 3:1(v/v).

γ) Χλωροφορμίου-μεθανόλης-7% άμμωνίας ή 2,5% ύδροξειδίου του άμμωνίου, σέ διάφορες αναλογίες.

Συνήθως όμως για τόν πλήρη διαχωρισμό των γαγγλιοζιτών χρησιμοποιούνται περισσότερα από ένα συστήματα ανάπτυξης.

Ειδικά αντιδραστήρια για τήν εμφάνιση των κηλίδων των γαγγλιοζιτών είναι ή όρκινόλη (51), ή ρεσορκινόλη (15) και ή π-διμεθυλαμινοβενζαλδεϋδη (16). Οί πλάκες μπορούν ακόμα νά ψεκαστούν μέ τά γενικά αντιδραστήρια των λιποειδών πριν ή μετά τό ψέκασμα μέ τό ειδικό για τό NANA αντιδραστήριο.

Οί παραπάνω μέθοδοι είναι αυτές που χρησιμοποιούνται συνήθως για τήν άπομόνωση και τό καθαρισμό των γαγγλιοζιτών. Φυσικά ή έρευνα πάνω στα θέματα αυτά συνεχίζεται και πολλές καινούργιες ή παλιές μέθοδοι που έχουν βελτιωθῆ, χρησιμοποιούνται, όπως:

— Καθαρισμός σέ στήλη Sephadex G-100 (69).

— Καθαρισμός και διαχωρισμός σέ στήλη DEAE-κυτταρίνης, μέ διαλύματα όξικού άμμωνίου σέ μεθανόλη (70) ή όξικό όξύ (71).

— Διαχωρισμός μέ χαρτοχρωματογραφία και μέ διαλύματα ανάπτυξης μίγματα πυριδίνης-όξικού αιθυλεστέρα-όξικού όξεός-νερού σέ αναλογίες όγκων 5:5:1:3 ή 5:5:1:4 (72).

— Διαχωρισμός σέ στήλη μίγματος πυριτικού όξεός και κυτταρίνης, κ.λπ.

Ανάλυση

Στήν ανάλυση τῶν γαγγλιοζιτῶν ἡ ἴδια τους ἡ δομή (ὕδροφιλο σακχαρικό κομάτι καί ὕδροφόβο λιποειδικῆς φύσης κομάτι) ἀποτελεῖ ἐμπόδιο καί δέν ἐπιτρέπει τόν εὐκολο καθαρισμό τοῦ κλάσματος τους, μιά καί κάτω ἀπό ὀρισμένες συνθήκες σχηματίζουν μηκύλια (33,64), πού παίζουν ἕνα εἶδος προστατευτικοῦ ρόλου γιά ἄλλα λιποειδῆ ἢ ἄλλες ὕδατοδιαλυτές ἐνώσεις, ὅπως ἀμινοξέα, πεπτίδια, σάκχαρα κ.λπ. ἐμποδίζοντας τα νά ἀπομακρυνθοῦν. Αὐτός θεωρεῖται σάν ἕνας λόγος πού παλιότερα εἶχε ὑποτεθῆ λανθασμένα ὅτι οἱ γαγγλιοζίτες περιέχουν συγκεκριμένα πεπτίδια πού ἀποτελοῦν μέρος τοῦ μορίου τους (62,73).

Γιά τή μελέτη τῆς ὁμοιογένειας τῶν κλάσμάτων τῶν γαγγλιοζιτῶν χρησιμοποιοῦνται καί φυσικοχημικές μέθοδοι ὅπως ἡ ὑπερφυγοκέντρωση καί ἡ ἠλεκτροφόρηση, χωρίς ὅμως ἱκανοποιητικά ἀποτελέσματα, λόγω καί πάλι τῶν μηκυλίων πού σχηματίζονται.

Ἐνα ἀκόμα λεπτό σημεῖο τῆς ἀνάλυσης εἶναι ὅτι σέ κλάσματα, πού δέν ἔχουν προηγουμένως καθαριστῆ, πρέπει νά γίνεται προσδιορισμός φωσφόρου γιά νά ἀναγνωριστῆ ὁ βαθμός καθαρότητας τοῦ κλάσματος σέ φωσφολιποειδικές προσμίξεις.

Στήν ἐρευνα τῆς χημικῆς δομῆς τῶν γαγγλιοζιτῶν, οἱ ποσοτικές ἀναλύσεις τῆς γλυκόζης, τῆς γαλακτοζαμίνης, τῆς γαλακτόζης, τῆς σφιγγοσίνης καί τοῦ NANA, μᾶς δίνουν ἀξιόπιστα ἀποτελέσματα μέ τή βοήθεια προτύπων οὐσιῶν.

Δομικές πληροφορίες ἔχουν ἀποκτηθῆ μέ ποιοτικό καί ποσοτικό προσδιορισμό τῶν προϊόντων τῆς ὀξίνης καί ἐνζυματικῆς διάσπασης, τῆς ἐξαντλητικῆς μεθυλίωσης καί τῆς ὑπεριωδικῆς ὀξειδωσης κλασμάτων γαγγλιοζιτῶν. Ἐτσι, μετά ἀπό ὀξίνη ὕδρόλυση κλάσματος ὀλικῶν λιποειδῶν μελετήθηκε (50) ἡ σειρά πού ἀποδεσμεύονται τά μόρια τῆς σακχαρικῆς ἄλυσσίδας.

Τά τελευταῖα χρόνια ἡ G.L.C. χρησιμοποιεῖται ὄλο καί περισσότερο στήν ἀνάλυση τῶν γαγγλιοζιτῶν (74,75), ὅπως καί ἡ φασματοφωτομετρία μάζας (76).

Κατανόμη τῶν γαγγλιοζιτῶν σέ ὄργανα διαφόρων ὀργανισμῶν.

Οἱ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γαγγλιοζιτῶν ἀπαντοῦν στό νευρικό σύστημα τῶν θηλαστικῶν καί τῶν πουλιῶν, ἐνῶ οἱ μικρότερες στά ἐρπετά, τά ἀμφίβια καί τά ψάρια. Μελέτες σέ μερικά ἀσπόνδυλα, ὅπως τό χταπόδι καί ὁ ἀστακός, δέν ἔδειξαν ἀνιχνεύσιμη ποσότητα γαγγλιοζιτῶν στά νεῦρα καί τά γάγγλια, ἐνῶ μικρή ποσότητα ἀπομονώθηκε ἀπό τά μάτια τοῦ κάβουρα (18). Τελευταῖα, ἀνιχνεύθηκαν γιά πρώτη φορά γαγγλιοζίτες σέ ὀργανισμούς πού στεροῦνται νευρικοῦ συστήματος, ὅπως τά πρωτόζωα *Tetrahymena pyriformis* καί *Crithidia fasciculata* (77,78).

Ἀπό τό νευρικό σύστημα τῶν διαφόρων ὀργανισμῶν, στόν ἐγκέφαλο ὑπάρχει τό σύνολο σχεδόν τῶν γαγγλιοζιτῶν (Πίν. V, Va). Στή φαῖα οὐσία τοῦ ἀνθρώπινου ἐγκεφάλου ἡ συγκέντρωση τῶν γαγγλιοζιτῶν ἀντιπροσωπεύει περίπου τό 6% τῶν συνολικῶν λιποειδῶν, ἐνῶ στή λευκή οὐσία περιορίζεται στό

ΠΙΝΑΚΑΣ V. Ποσότητες γαγγλιοζιτών στον εγκέφαλο διαφόρων οργανισμών.

οργανισμός	mg/g	νωπού ιστού	(βιβλ.)
άνθρωπος: φλοιός έγκεφ. νεογέννητου		400	(98)
» » » ένήλικα		1002	(99)
λευκή ουσία νεογέννητου		400	(98)
» » » ένήλικα		156	(99)
άρουραϊος (ένήλικας)		1047	
κουνέλι		497	(18)
κοτόπουλο		660	
χελώνα		220	
φίδι		320	
βάτραχος		220	
ψάρι		370	

ΠΙΝΑΚΑΣ Va. Συγκεντρώσεις όλικο NANA και γαγγλιοζιτών στον φλοιό και την λευκή ουσία του εγκεφάλου ανθρώπου ανάλογα με την ηλικία.

		όλικο NANA (mg/g νωπού ιστού)	% τών όλικών							
			G _{Q1}	G _{M3}	G _{T1}	G _{M2}	G _{M1}	G _{D1a}	G _{D1b}	G _{D2}
φλοιός	νεογέννητο	400	—	1	7,3	3,6	14,6	71,6	1,8	1,1
	8 χρονών	797	2,9	—	15,9	3,6	17,4	39,4	19,8	—
	73 χρονών	796	5,1	—	31,2	1,7	12,8	22,8	25,5	—
λευκή ουσία	νεογέννητο	400	—	1	3,4	6,9	19,1	57,8	2,1	1,4
	8 χρονών	73	5,9	—	16	1,7	20,4	42,9	12,5	—
	73 χρονών	191	7,9	—	27,9	1,9	12,6	18,4	30,4	—

0,6%. Σέ σύγκριση μέ τόν εγκέφαλο, ή συγκέντρωση είναι μικρότερη στό νωτιαίο μυελό καί άκόμα μικρότερη στό περιφερειακό νευρικό σύστημα (79).

Γαγγλιοζίτες έχουν βρεθή άκόμα καί sé όργανα εκτός του νευρικού συστήματος όπως τά επινεφρίδια (81), τόν σπλήνα (81), τόν πλακούντα (82), τά έρυθρά αίμοσφαίρια (83), τό συκώτι του ποντικού (84), τίς έντερικές λάχνες (85), τούς νεφρούς του πιθήκου καί του βοδιού (86), sé ήπατώματα (87), κ.λπ.

Σέ όλα τά ύποκυτταρικά κλάσματα του νευρικού συστήματος έχουν έντοπιστή γαγγλιοζίτες. Οί μεγαλύτερες όμως συγκεντρώσεις έχουν παρατηρηθή στό μικροσωματιακό, τό μιτοχονδριακό καί τό συναπτοσωματιακό κλάσμα. Η συγκέντρωση του μιτοχονδριακού κλάσματος κυμαίνεται μεταξύ 1-26% εκείνης του μικροσωματιακού. Έτσι, μπορούμε νά πούμε ότι μάλλον φταίει ό κακός διαχωρισμός τών δύο κλασμάτων, μία καί οί συγκεντρώσεις στηρίζουν αυτή τήν άποψη. Ένδιαφέρον παρουσιάζει καί ή διπλάσια συγκέντρωση του μικροσωματιακού κλάσματος sé γαγγλιοζίτες, sé σύγκριση μέ τό συναπτοσωματιακό (88).

Αυτό εξηγήθηκε τελευταία με τον έντροπισμό των περισσότερων βιοσυνθετικών ενζύμων στο σύστημα Golgi (89).

Φυσιολογική δράση των γαγγλιοζιτών

Μέ σκοπό την αποκάλυψη του ρόλου των γαγγλιοζιτών έχουν προταθῆ δύο μοντέλα-θεωρίες (90). Το πρώτο δέχεται ότι οι γαγγλιοζιτες ίσως παίζουν τό ρόλο των επιφανειακῶν δεκτῶν τῆς κυτταρικής μεμβράνης γιά τά διάφορα μόρια πού ἐπιδρῶν στό κύτταρο ἢ συμμετέχουν σ' αὐτό. Τό δεύτερο δέχεται ότι οἱ γαγγλιοζιτες παίζουν κάποιο ρόλο στη μορφολογία καί τή διαφοροποίηση τοῦ κυττάρου.

Μέ τήν ἀποδοχή τοῦ πρώτου μοντέλου ἐξηγεῖται ἡ δράση τῆς τοξίνης τῆς χολέρας. Ἡ τοξίνη αὐτή ἐξασκεῖ τή βιολογική τῆς δράση μέ τή δέσμευσή τῆς στίς πλάσματικές μεμβράνες τῶν κυττάρων, ἐνεργοποιώντας ἔτσι τήν ἀδενυλοκυκλάση καί αὐξάνοντας τό ποσό τοῦ AMP (91,92). Ὁ γαγγλιοζιτης G_{mi} δέσμευει τή τοξίνη στίς μεμβράνες πνήντα φορές ἀποτελεσματικότερα ἀπό τοῦς ἄλλους γαγγλιοζιτες. Ἐνσωμάτωση τοῦ G_{mi} στίς μεμβράνες αὐξάνει τήν ἔκταση τῆς δέσμευσης καί τή βιολογική δράση τῆς τοξίνης τῆς χολέρας (92). Τά παραπάνω καταλήγουν στό συμπέρασμα ὅτι ὁ G_{mi} εἶναι ὁ ἐπιφανειακός δέκτης τῆς τοξίνης αὐτῆς. Γιὰ νά πιστοποιηθῆ καλλίτερα ἡ δράση τῆς ἴδιας τοξίνης ἔγιναν πειράματα σέ κύτταρα ποντικῶν, πού εἶχε μεταβληθῆ ἡ σύσταση τῶν γαγγλιοζιτῶν τοῦς (93), καί κατέληξαν' στό ἴδιο ἀποτέλεσμα. Ἀνάλογα πειράματα ἐδείξαν ὅτι καί ἄλλοι γαγγλιοζιτες φαίνεται νά εἶναι δέκτες γιά διαφορετικές βακτηριακές τοξίνες (94,95).

Ἡ δεύτερη θεωρία βασίστηκε στήν ἐπίδραση πού ἔχουν ὀρισμένα λιπαρά ὀξέα στη μορφολογία τῶν κυττάρων HeLa.

Ἐκθεση τῶν κυττάρων αὐτῶν στό βουτυρικό ὀξύ ἔχει σάν ἀποτέλεσμα τήν αὔξηση τοῦ ποσοῦ τοῦ G_{ms} (96), πού μπορεί νά φεῖται σέ αὔξηση τῆς δραστηριότητας τοῦ ενζύμου N-ἀκετυλο-νευραμινυλο-τρανσφεράση CMP-NANA: λαιτροξύλο-κηραμιδίου, ἐνῶ οἱ δραστηριότητες ἄλλων γλυκοζυλοτρανσφερασῶν δέν ἐμφανίζουν ἀντιστοιχες ἀλλαγές. Ἡ δραστηριότητα τῆς σιαλλοτρανσφεράσης ἀρχίζει νά αὐξάνει τρεῖς ἡμέρες μετά τήν ἐκθεση τῶν κυττάρων HeLa στό βουτυρικό ὀξύ καί φτάνει στό μέγιστο σέ 12-16 ἡμέρες. Μορφολογικές διαφορές ἀρχίζουν νά ἐμφανίζονται μετά ἀπό 6-8 ἡμέρες καί ὀλοκληρώνονται στίς 20 ἡμέρες. Μέ τήν ἀφαίρεση τοῦ βουτυρικοῦ ὀξέος ἀπό τό θρεπτικό μέσο τῆς ἴδιας καλλιέργειας παρατηρεῖται μιά γρήγορη καί ἀπότομη πτώση τῆς δραστηριότητας τοῦ ενζύμου καί παίρνουν πάλι τό ἀρχικό φυσιολογικό σχῆμα τοῦς. Ἐκτός ἀπό ἐνῶ τά ἄλλα λιπαρά ὀξέα δέν ἔχουν παρόμοια δράση.

Μέ λίγα λόγια, σύμφωνα μέ τή θεωρία αὐτή, οἱ γαγγλιοζιτες παίζουν σίγουρα σπουδαῖο, ἀλλά ἀκαθόριστο ἄκομα ρόλο στη μορφολογία καί τή διαφοροποίηση τοῦ κυττάρου.

Μεταβολισμός των γαγγλιοζιτών

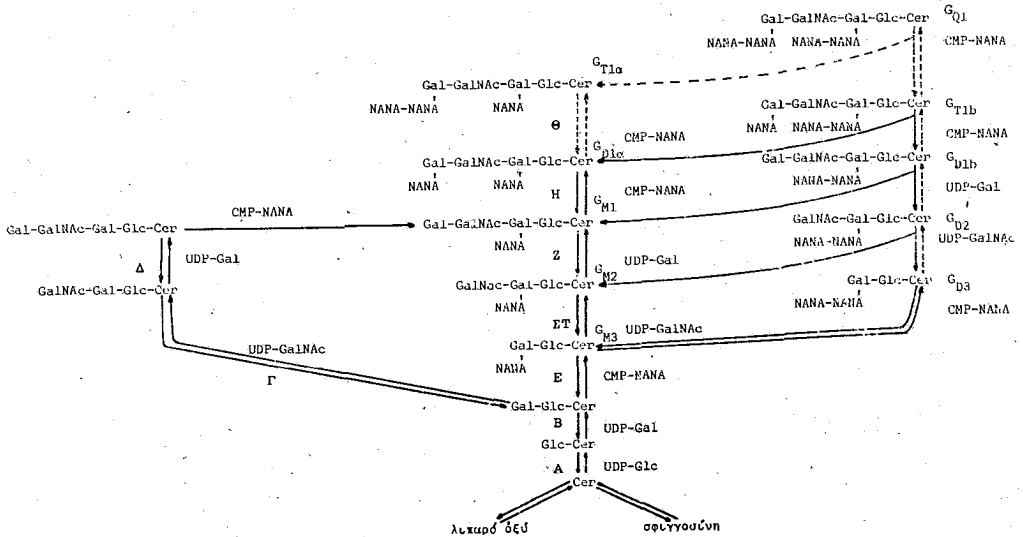
A. Βιοσύνθεση

Από έρευνες σέ έγκέφαλο άρουραίων βρέθηκε ότι κατά τήν έμβρυϊκή ήλικία καί τίς πρώτες 20 μέρες μετά τή γέννησή τους, τό ποσό των γαγγλιοζιτών συνεχώς μεγαλώνει καί στή συνέχεια ή μένει σταθερό ή μικραίνει (97). Παράλληλα οί Svennerholm (98) καί Suzuki (99) παρατήρησαν ότι σέ άνθρωπινο έγκέφαλο ύπάρχει αύξηση NANA άπό τή γέννηση μέχρι τά 8 πρώτα χρόνια τής ζωής καί στή συνέχεια τό ποσό του NANA μένει σταθερό. Μελετώντας όμως τίς συγκεντρώσεις των γαγγλιοζιτών ξεχωριστά, βρήκαν άρκετές διαφορές πού συνοψίζονται στό πίνακα Va. Παρατηρούμε ότι ένώ στήν άρχή υπερισχύουν οί συγκεντρώσεις των G_{Dib} καί G_{MI} , τελικά εκείνοι πού επικρατούν είναι οί G_{Dib} καί G_{TI} .

Αν καί έχουν γίνει μεγάλες προσπάθειες πάνω στήν έρευνα τής βιοσύνθεσης των γαγγλιοζιτών, τό κεφάλαιο αυτό έχει άκόμα πολλές έλλείψεις. Τό βιοσυνθετικό μονοπάτι πού έχει ξεκαθαριστή μέχρι σήμερα (100) καί τά ένζυμα πού καταλύουν τίς αντίδράσεις βιοσύνθεσης συνοψίζονται στό σχήμα 3 καί τόν πίνακα VI.

ΠΙΝΑΚΑΣ VI. Ένζυμα βιοσύνθεσης των γαγγλιοζιτών.

βλέπε σχήμα 3	ένζυμα	όποκυτταρική κατανομή	βιβλ.
A	Γλυκοζυλοτρανσφεράση UDP-γλυκόζης: κηραμιδίου		114
B	Γαλακτοζυλοτρανσφεράση UDP-γαλακτόζης: γλυκοζυλο-κηραμιδίου	συναπτοσώματα μικροσώματα μιτοχόνδρια	115
Γ	N-άκετυλο-γαλακτοζαμινοτρανσφεράση UDP-N-άκετυλο-γαλακτοζαμίνης: γαλακτοζυλο-γλυκοζυλο-κηραμιδίου		116
Δ	Γαλακτοζυλοτρανσφεράση UDP-γαλακτόζης: N-άκετυλο-γαλακτοζυλο-γλυκοζυλο-κηραμιδίου		
E	N-άκετυλο-νευραμινοτρανσφεράση CMP-N-άκετυλο-νευραμινοκιδόξέος: γαλακτοζυλο-γλυκοζυλο-κηραμιδίου		117
ΣΤ	N-άκετυλο-γαλακτοζαμινοτρανσφεράση UDP-N-άκετυλο-γαλακτοζαμίνης: (N-άκετυλο-νευραμινολο)-γαλακτοζυλο-γλυκοζυλο-κηραμιδίου	μικροσώματα συναπτικές μεμβράνες	118
Z	Γαλακτοζυλοτρανσφεράση UDP-γαλακτόζης: N-άκετυλο-γαλακτοζαμινολο-(N-άκετυλο-νευραμινολο)γαλακτοζυλο-γλυκοζυλο-κηραμιδίου	μικροσώματα άκατέργαστο κλάσμα μιτοχονδρίων	119
H	N-άκετυλο-νευραμινοτρανσφεράση CMP-N-άκετυλο-νευραμινοκιδόξέος: γαλακτοζυλο-N-άκετυλο-γαλακτοζαμινολο-(N-άκετυλο-νευραμινολο)γαλακτοζυλο-κηραμιδίου	» »	120
Θ	N-άκετυλο-νευραμινοτρανσφεράση CMP-N-άκετυλο-νευραμινοκιδόξέος: N-άκετυλο-νευραμινολο-γαλακτοζυλο-N-άκετυλο-γαλακτοζαμινολο-(N-άκετυλο-νευραμινολο)-γαλακτοζυλο-γλυκοζυλο-κηραμιδίου	» »	120

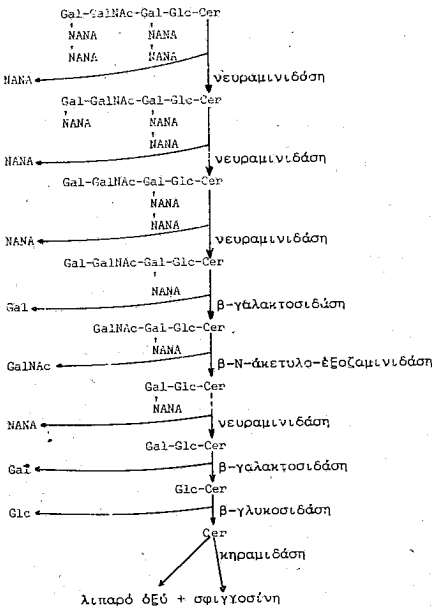


Σχήμα 3. Βιοσυνθετική πορεία των γαγγλιοζιτών εγκεφάλου. Οι συνεχείς γραμμές δείχνουν την εξακριβωμένη πορεία, οι διακεκομμένες διάφορες υποθετικές πορείες. Τα κεφαλαία γράμματα παραπέμπουν στον πίνακα VI για περισσότερες λεπτομέρειες γύρω από την ονοματολογία των ενζύμων βιοσύνθεσης. (Ο πίνακας δείχνει και την καταβολική πορεία).

B. Αποικοδόμηση

Πριν μερικά χρόνια προσδιόρισαν ότι ο χρόνος από τη βιοσύνθεση μέχρι το καταβολισμό ενός γαγγλιοζίτη, σ' έναν εγκέφαλο που αναπτύσσεται, είναι 20-25 μέρες (101,102).

Η μεγαλύτερη προσπάθεια μελέτης των μεμονωμένων ενζύμων, που παίζουν κάποιο ρόλο στο καταβολισμό των γαγγλιοζιτών, έγινε σε σχέση με τη μελέτη των διαφόρων γενετικών λιπιδώσεων (βλ. κεφ. Γαγγλιοζίτες και ασθένειες). Το κυριότερο στάδιο του καταβολισμού είναι η αποκοπή από το μόριο του γαγγλιοζίτη των μορίων NANA (Σχήμα 4). Το ένζυμο που καταλύει τη διεργασία αυτή ονομάζεται νευραμινιδάση ή σιαλιδάση (neuraminidase ή sialidase) και φαίνεται να είναι εξειδικευμένο για αυτή τη δράση (103). Πειράματα όμως άλλων ερευνητών (104,105), στο αντίστοιχο ενζυμικό κλάσμα του χοίρου και του βοδιού, έδειξαν ότι υπάρχει ένζυμο που υδρολύει τα μόρια του NANA τόσο από τους γαγγλιοζίτες, όσο και από άλλες ενώσεις που περιέχουν NANA χωρίς να είναι γαγγλιοζίτες. Έχει ακόμα δείχτη ότι ο G_{D1b} υδρολύεται με περισσότερο αργό ρυθμό από τους άλλους φυσικούς γαγγλιοζίτες (104) και αυτό γιατί το NANA, που είναι ενωμένο με 2-8 γλυκοσιδικό δεσμό είναι περισσότερο σταθερό από το NANA, το ενωμένο με 2-3 δεσμό όπως στον G_{D1a} . Το ένζυμο αυτό βρέθηκε στο κλάσμα των συναπτοσωμάτων (106,107), στο ερώτημα όμως αν το ένζυμο ήταν πράγματι συναπτοσωματικό ή μήπως λυσοσωματικό είναι δύσκολο να απαντήσουμε με βεβαιότητα, γιατί υπάρχει η περίπτωση μόλυνσης του ενός κλάσματος από το άλλο.



Σχήμα 4. Καταβολική πορεία των γαγγλιοζιτών.

Έχουν βρεθῆ σημαντικές διαφορές στή δράση τοῦ ἐνζύμου νευραμινιδάση σέ ἐγκεφάλους διαφόρους ἡλικιῶν. Ὁ Ohman (108) βρῆκε ὅτι ἡ δραστικότητα τοῦ ἐνζύμου στόν ἐγκεφαλικό φλοιό εἶναι 10-25 φορές μεγαλύτερη ἀπό ἐκείνη τῆς λευκῆς οὐσίας καί ὅτι ὁ φλοιός τῆς παρεγκεφαλίδας ἔχει ἀκόμα μεγαλύτερη δραστικότητα καί ἀπό ἐκείνη τοῦ φλοιοῦ τοῦ ἐγκεφαλοῦ. Οἱ Ohman καί Svennerholm (109) ἔδειξαν ὅτι δραστικότητα νευραμινιδάσης ὑπάρχει στόν ἐγκέφαλο τοῦ ἀνθρώπου ἀπό τήν ἐμβρυϊκή ἡλικία τῶν 15-20 ἑβδομάδων. Ἀπό τήν ἡλικία αὐτή ἡ δραστικότητα τοῦ ἐνζύμου αὐξάνει καί γίνεται μέγιστη στόν ἐγκέφαλο τοῦ ἐνήλικα. Παρόμοια περιγραφή ἔχει γίνη καί γιά τόν ἐγκέφαλο τῶν νεοσσῶν (110), ἐνῶ στόν ἐγκέφαλο τῶν ἀρouraίων ἡ δραστικότητα τῆς νευραμινιδάσης αὐξάνει συνεχῶς μέ τήν ἡλικία.

Σ' ὁποιαδήποτε περίπτωση πάντως εἶναι γεγονός ὅτι ἕνα ἐνζυμο μόνο ἀρκεῖ γιά τήν ἀπόσπαση τοῦ NANA ἀπό τά μόρια τῶν γαγγλιοζιτῶν, ἐνῶ γιά τήν ἀπόσπαση τῶν σακχαρικών μορίων χρειάζονται περισσότερες ἀπό μία γλυκοσιδάσες. Σύμφωνα μέ μία παλιά ὑπόθεση πάνω σ' αὐτό, μία μόνο γλυκοσιδάση εἶναι ἐκείνη πού καταλύει τήν ὑδρόλυση τῆς γλυκόζης καί τῆς γαλακτόζης. Ἀντίθετα μέ τήν ὑπόθεση αὐτή, ὁ Gatt (111,112) πέτυχε νά διαχωρίση ἕνα κλάσμα β-γλυκοσιδάσης καί ἕνα β-γαλακτοσιδάσης, πού πετυχαίνουν τήν ἀπόσπαση τῆς γλυκόζης καί τῆς γαλακτόζης ἀντίστοιχα, ἀπό τό μόριο τοῦ γαγγλιοζιτη.

Σέ ἀντίθεση μέ τή νευραμινιδάση, πού βρίσκεται κυρίως στά συναπτοσώματα, ἡ β-γλυκοσιδάση, ἡ β-γαλακτοσιδάση καί ἡ β-N-άκετυλο-έξοζαμινιδάση (τό ἐνζυμο πού καταλύει τήν ἀπόσπαση τῆς N-άκετυλο-γαλακτοζαμίνης), βρίσκονται στό λυσοσωματικό κλάσμα (126). Ὑπάρχει ὅμως μία διαφορά

μεταξύ των δύο κατηγοριών ενζύμων: 'Ενώ η δραστηριότητα της νευραμινιδάσης αυξάνει με τό χρόνο και φτάνει στο μέγιστο της στο τελειοποιημένο εγκέφαλο, η δραστηριότητα των γλυκοσιδασών είναι ίδια σ' όλες τις ηλικίες των ζώων που εξετάστηκαν (109).

Τό τελευταίο στάδιο του καταβολισμού, ή διάσπαση του κηραμιδίου με σφιγγοσίνη και λιπαρό όξύ, καταλύεται από τό ένζυμο κηραμιδάση (Σχήμα 4). 'Η δραστηριότητα του ένζυμου αυτού αυξάνει με τήν ηλικία όπως και της νευραμινιδάσης (113), μέχρι τώρα όμως δέν βρέθηκε ή ύποκυτταρική τοπολογία του.

Γαγγλιοζίτες και άσθένειες (λιπιδώσεις)

Αίτια των ανθρώπινων σφιγγολιπιδώσεων είναι ή συσσώρευση γαγγλιοζιτών, κυρίως στον εγκέφαλο, λόγω της άπουσίας κάποιου καταβολικού ένζυμου. 'Η έλλειψη αυτή έχει γενετική προέλευση και οδηγεί σε βαρεία νοσήματα, που εκδηλώνονται στους πρώτους μήνες της ζωής.

Οί λιπιδώσεις χωρίζονται σε τρεις τύπους, ανάλογα με τον γαγγλιοζίτη που συσσωρεύεται και που συνήθως είναι ό G_{M1} , ό G_{M2} , και ό G_{M3} .

'Η γαγγλιοζίτωση του G_{M1} , μπορεί να χωριστή σε δύο επί μέρους γαγγλιοζιτώσεις (121), τή γενικευμένη (generalized) και τή παιδική (juvenile) G_{M1} -γαγγλιοζίτωση. Πρόσφατα καθιερώθηκαν τρία βιοχημικά κριτήρια για τό διαχωρισμό των G_{M1} γαγγλιοζιτώσεων (121). Αυτά είναι, ή συσσώρευση του G_{M1} στον εγκέφαλο και τά σπλάχνα, ή συσσώρευση ενός βλεννοπολυσακχαρίτη, που μοιάζει με θειική κερατίνη και ή έλλειψη β-γαλακτοσιδάσης.

'Η γενικευμένη γαγγλιοζίτωση ήταν ή πρώτη που παρατηρήθηκε (122). 'Η εμφάνιση των συμπτωμάτων αρχίζει από τή νηπιακή ηλικία, πριν από τήν ηλικία των έξη μηνών, με μεταβολές στο σκελετό, τό πρόσωπο και τό μέγεθος των σπλάχνων (123). 'Η ποσότητα του G_{M1} και του βλεννοπολυσακχαρίτη (G_{A1}) (124) στις περιπτώσεις αυτές είναι 10πλάσια της φυσιολογικής (125) και όφείλεται κυρίως στην άπουσία του καταβολικού ένζυμου β-γαλακτοσιδάση (126). 'Εγινε μία προσπάθεια να βρεθ ή ένζυματική διαφορά των δύο γαγγλιοζιτώσεων χωρίζοντας τό ένζυμο β-γαλακτοσιδάση στα τρία δομικά συστατικά του, που χαρακτηρίζονται με τά γράμματα Α, Β και C (127).

'Η παιδική G_{M1} γαγγλιοζίτωση διακρίνεται από τή γενική στο ότι τά συμπτώματα παρουσιάζονται σιγά-σιγά, στο τέλος της νηπιακής περιόδου (127). Οί ποσότητες των G_{M1} και G_{A1} είναι περίπου ίσες και στις δύο μορφές (127), αλλά ό G_{M1} δέν έχει άκόμα βρεθ ή στα σπλάχνα (121), όπως συμβαίνει στη γενική γαγγλιοζίτωση.

Οί G_{M2} -γαγγλιοζιτώσεις περιλαμβάνουν τρεις νόσους: Τήν νόσο Tay-Sachs, τήν νόσο του Sandhoff και τήν παιδική G_{M2} -γαγγλιοζίτωση.

'Η νόσος Tay-Sachs περιγράφηκε πρώτα από τον Klenk τό 1942 (128) γενικά σαν συσσώρευση γαγγλιοζιτών και από τον Svennerholm τό 1962 (129) σαν συσσώρευση του G_{M2} . Τό ποσό του G_{M2} στον εγκέφαλο στη περίπτωση αυτή είναι 100-300 φορές μεγαλύτερο από τό φυσιολογικό. 'Ακόμα ό G_{A2} (ανάλογος του G_{A1}) βρίσκεται σε 20πλάσια ποσότητα σε σχέση με τό φυσιολογικό (129). Τό

ενδυμικό πρόβλημα έδω είναι η έλθεινη εξοζαμινιδωση, που μπορεί και άντη να
 χωριστη στα δύο δραστηκά συστατικά της, Α και Β. Στη νόσο Tay-Sachs η
 εξοζαμινιδωση Α δέν υπάρχει, ενώ η Β είναι αυξημένη (130).
 Στη νόσο του Sandhoff το ποσό του G_{M2} στο ΚΝΣ είναι ίδιο με εκείνο της
 Tay-Sachs, αλλά το ποσό του G_{A2} είναι 100-πλάσιο (130). Το ένδυματικό
 πρόβλημα έδω είναι η ανεπάρκεια και των δύο συστατικών της εξοζαμινιδωσης,
 Α και Β, στον ίδιο περίπου βαθμό (130,131).
 Στη παιδική G_{M2}-γαγγλιωσίωση, το ποσό του G_{M2} στον έγκεφαλο είναι 40-
 90 φορές μεγαλύτερο από το φυσικόλογικό και το G_{A2} 5-10πλάσιο (125). Η
 λιπίδωση άντη όφεται στη ήπικη έλθεινη εξοζαμινιδωση Α (132).
 Ο Pilz(133) άνφερε και μια πρόθετη, την G_{M3}-γαγγλιωσίωση, που
 όφεται σε συσώρευση του άντιστοιχου γαγγλιώτη.
 Έκτος από τις παραπάνω λιπίδωσης, υπάρχουν και άλλες που χαρακτηρί-
 ζονται από διαφορικές αιτίες.
 Έτσι στη νόσο Niemann-Pick, οι G_{M2} και G_{M3} βρίσκονται σε άνωμαλες
 συγκεντρώσεις (134), με άλλαγήμενες τις σχετικές ποσότητες τους, αλλά όχι και
 τη σύθεση τους (135).
 Στη νόσο του Kufs, η σύθεση των γαγγλιωσίτων μπορεί να αλλάξη, ενώ
 συγχρόνως συσώρευονται μεγάλες ποσότητες C¹⁸-διεικτικό δέτος (136).
 Στη νόσο του Alexander παρουσιάζεται σηματοειστη αυξηση του G_{M2} (137),
 διαφορικής όμως αιτίας από εκείνες των G_{M2}-γαγγλιωσίωσεων.
 Στην τετατομορφισμό (gargylism), τα άλλα λιπίδια που περιέχουν NANA
 αυξάνουν (138).
 Στην ύποξεια σκληροποιητική λευκοεγκεφαλίδα (subacute sclerosing
 leukoencephalitis) του ΚΝΣ παρατηρήθηκαν άνωμαλες μόνο στη λευκή όσια,
 με αυξηση των «έλασσόνων» γαγγλιωσίτων G_{D2}, G_{D3}, G_{M1} και G_{M3} (139)
 (Πίνακας 1). Στην ίδια όσια άσθνεια, άλλοι έρευνητές βρήκαν άνωμαλία έκτος
 από τη λευκή όσια και στη φαιά (140), ενώ η έρευνητική όμάδα του Ledeen
 βρήκε αυξημένα ποσα G_{D2}, G_{D3}, G_{M2} και G_{M3}, που περιέχουν σε μεγάλη

Βιβλιογραφία

1. Spence M.W., Wolfe J., *Canad. J. Biochem.* 45, (1967) 671.
2. Wolfe L.S., Lowden J.A., Spence M.W.: "First Panamerican Congress of Neurology" p. 100 (1963).
3. Wiegandt H.: *Angew. Chem.* 7 (1968) 87.
4. Koscielak J., Hakomori S., Jeanloz R.W.: *Immunochimistry*, 5, (1968) 441.
5. Hakomori S.: *Biochem. Biophys. Acta* 417 (1975) 55.
6. Walz E.: *Z. Physiol. Chem.* 235 (1926) 210.
7. Klenk E.: *Z. Physiol. Chem.* 229 (1934) 151.
8. Klenk E.: *Z. Physiol. Chem.* 268 (1941) 50.
9. Klenk E.: *Ber. Physiol.* 96 (1937) 659.
10. Klenk E.: *Z. Physiol. Chem.* 262 (1939) 128.
11. Klenk E.: *Z. Physiol. Chem.* 267 (1940) 128.
12. Landsteiner K., Levene P.A.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 23 (1925) 343.
13. Blix G.: *Skand. Arch. Physiol.* 80 (1938) 46.
14. Blix G., Svennerholm L., Werner I.: *Acta Chem. Scand.* 4, (1950) 717, 6 (1952) 358.

15. Svennerholm L.: *J. Neurochem.* **10** (1963) 613.
16. Kuhn R., Wiegandt H.: *Chem. Ber.* **96** (1963) 866.
17. Wiegandt H.: *Angew. Chem.* **7** (1968) 296.
18. Wiegandt H.: *Ergeb. Physiol. Biol. Chem. Exptl. Pharmacol.* **58** (1966) 190.
19. Wiegandt H.: *Angew. Chem.* **80** (1968) 89.
20. Wiegandt H.: *Advances in Lipid Res.* **9** (1971) 249.
21. *Eur. J. Biochem.* **2** (1967) 127.
22. *Eur. J. Biochem.* **12** (1270) 1.
23. Korey S.R., Gonatas J.: *Life Science* **61** (1963) 296.
24. Gottschalk A.: "*The Chemistry and Biology of Sialic Acids and Related Substances*", Cambridge Univ. Press (1960).
25. Kuhn R., Brossmer R.: *Angew. Chem.* **74** (1962) 252.
26. Kuhn R., Baschang G.: *Chem. Ber.* **95** (1962) 2384.
27. Roseman S.G., Jourdain W., Watson D. and Rood: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47** (1961) 958.
28. Warren L., Felsenfeld H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **5** (1961) 185.
29. Blix F., Gottschalk A., Klenk E.: *Nature* **179** (1957) 1088.
30. Svennerholm L.: *Acta Chem. Scand.* **9** (1955) 1033.
31. Blix G., Odin L.: *Acta Chem. Scand.* **9** (1955) 1541.
32. Klenk E., Unlenbruck G.: *Z. Physiol. Chem.* **311** (1962) 227.
33. Trams E.G., Lanter G.J.: *Biochem. Biophys. Acta* **60** (1962) 350.
34. Klenk E.: "*The Amino Sugars: The Chemistry and Biology Compounds Containing Amino Sugars*" RW. Jeanloz, E.A. Balars (eds), Academic Press, N. York.
35. Roseman S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48** (1962) 437.
36. Roseman S.: *Federation Proc.*, **21** (1962) 1075.
37. Comb D.G., Schimizu F., Roseman S.: *J. Am. Chem. Soc.* **81** (1960) 5513.
38. Steillner K., Watanabe K., Hakomori S.: *Biochemistry* **12** (1973) 656.
39. Hakomori S.: *Advances in Cancer Research* **18** (1973) 265.
40. Klenk E.: *Z. Physiol. Chem.* **273** (1942) 76.
41. Svennerholm L.: *Acta Soc. Med. Upsalien* **61** (1956) 287.
42. Prostenik M., Majohfer-Orescauin: *Naturwissen-Schaften* **47** (1960) 399.
43. Klenk E., Gielen W.: *Z. Physiol. Chem.* **326** (1961) 158.
44. Kuhn R., Wiegandt H., Egge H.: *Angew. Chem.* **73** (1961) 580.
45. Svennerholm L., Raal A.: *Biochem. Biophys. Acta* **53** (1961) 422.
46. Trams E.G., Giuffrida E.L., Karmen A.: *Nature* **193** (1962) 680.
47. Klenk E., Padberg G.: *Z. Physiol. Chem.* **327** (1962) 249.
48. Klenk E., Henderent K.: *Verdaungs Stoffwechsel Krankh* **20** (1960) 180.
49. Svennerholm L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9** (1962) 436.
50. Bogoch S.: *Biochem. J.* **68** (1958) 319.
51. Klenk E., Gielen W.: *Z. Physiol. Chem.* **326** (1962) 144.
52. Cote R.H., Morgan W.T.J.: *Nature* **178** (1956) 1171.
53. Klenk E., Hendricks U.W., Geilen W.: *Z. Physiol. Chem.* **330** (1962) 140.
54. Painter T.J., Choese I.A.F.L., Morgan W.T.J.: *Chem. Ind. (London)* (1962) 1535.
55. Kuhn R., Brossmer R.: *Chem. Ber.* **89** (1956) 2013.
56. Kuhn R., Brossmer R.: *Chem. Ber.* **92** (1959) 1667.
57. Svennerholm L.: *Acta Chem. Scand.* **17** (1963) 860.
58. Kuhn R., Egge H., Brossmer R., Ganhe A., Klesse P., Lochinger W., Rohm E., Trischmann H., Tschampel D.: *Angew. Chem.* **72** (1960) 805.
59. Yamakawa T., Suzuki S.: *J. Biochem. (Tokyo)* **38** (1951) 199.
60. Deuel H.J.: "*The Lipids, Their Chemistry and Biochemistry*" Interscience Publisherw, inc., N. York, Vol. I, p. 503. (1951).
61. Galanos, D.S. & Kapoulas, V.M.: *Chim. Chron.* **25A** (1960) 97.
62. Folch J., Arsove S., Meath J.A.: *J. Biol. Chem.* **191** (1951) 819.
63. Daun H.: Dissertation, Cologne, Germany (1952).
64. Svennerholm L.: *Acta Chem. Scand.* **10** (1956) 694.

65. Folch J., Lees E.H., Sloane-Stanley G.H.: *Federation Proc.* **13** (1954) 209, *J. Biol. Chem.* **226** (1957) 497.
66. Svennerholm L.: *Nature* **177** (1956) 524.
67. Rouser G., O'Brien J., Heller D.: *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **38** (1961) 14.
68. Svennerholm L.: *Acta Chem. Scand.* **17** (1963) 239.
69. De Raveglia I.R., Ghittoni N.E.: *J. Chromatogr.* **58** (1971) 288.
70. Winterbourn C.C.: *J. Neurochem.* **18** (1971) 1153.
71. Rouser G., Kitchovsky G., Heller D., Lirmrt L.: *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **40** (1963) 425.
72. Wiegandt H.: *Eur. J. Biochem.* **45** (1974) 367.
73. Rosenber A., Chargaft E.: *J. Biol. Chem.* **232** (1958) 1031.
74. Wherrett J.: *Biochem. Biophys. Acta* **326** (1973) 63.
75. Rauvala H.: *Biochem. Biophys. Acta* **424** (1976) 284.
76. Karlson K-A.: *Biochemistry* **13**, **18** (1974) 3643.
77. Kapoulas, V.M. & Tsamperis, E.: In the press.
78. Kapoulas, V.M., Tsamperis E., & Fakiris G.: In the press.
79. Svennerholm L.: "Inborn Disorders of Sphingolipids Metabolism", S.A. Aronson and B.W. Volk (eds), Pergamon, Oxford, p. 169, (1967).
80. Ledeen R., Salsman K., Carbera M.: *Biochemistry* **7** (1968) 2287.
81. Svennerholm L.: *Acta Chem. Scand.* **17** (1963) 866.
82. Svennerholm L.: *Acta Chem. Scand.* **19** (1965) 1506.
83. Maddy A.H.: *Int. Rev. Cytol.*, **20** (1966) 1.
84. Dod B.J., Gray G.M.: *Biochem. Biophys. Acta* **150** (1968) 397.
85. Forstener G.G., Wherret J.R.: *Biochem. Biophys. Acta* **306** (1973) 446.
86. Klenk E., Choppin P.W.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **66** (1970) 57.
87. Van Hoeven R.P., Emmelot P.: *J. Membr. Biol.* **9** (1972) 105.
88. Caputto R., Maccioni H.J., Arce A.: *Molecular and Cellular Biochem.* **4**, **2** (1974) 97.
89. Keenav T.W., Morre D.J. Basu S.: *J. Biol. Chem.* **249** **1** (1974) 310.
90. Fishman P.: *Chem. Phys. of Lipids* **13** (1974) 305.
91. Fenkelstein R.A. *CRC Critical Rev. Microbiology* **2** (1973) 553.
92. Cudrecases P.: *Biochemistry* **12** (1973) 3547 3558.
93. Hollenberg M.D., Fishman P.H., Bennet V., Cuatrecases P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71** (1974) 4224.
94. Simpson L.L., Rapport M.: *J. Neurochem.* **18** (1971) 1341, 1751.
95. Van Heyningen W.H.: *Nature* **249** (1974) 415.
96. Fishman P.H., Simmons J.L., Brady R.O., Freese E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **59** (1974) 292.
97. Tettamanti G.: *Advan. Exp. Med. Biol.* **13** (1971) 75.
98. Svennerholm L.: *J. Neurochem.* **11** (1964) 839.
99. Suzuki K.: *J. Neurochem.* **12** (1965) 969.
100. Svennerholm L.: in "Comprehensive Biochemistry", M. Florkin E. Stotz (eds), Elsevier publ. Company, Amsterdam, Vol. 18 p. 201 (1970).
101. Burton R.M.: in "Lipids and Lipidoses", E.G. Schettered (ed), Springer-Verlag, Berlin, p. 122, (1967).
102. Suzuki K.: *J. Neurochem.* **14** (1967) 917.
103. Leibovitz Z., Gatt.: *Biochem. Biophys. Acta* **152** (1968) 136.
104. Ohman R., Rosenberg A., Svennerholm L.: *Biochemistry* (1970) 3774.
105. Tettamanti G., Zambotti V.: *Enzymologia* **31** (1968) 61.
106. Ohman R.: *J. Neurochem.* **18** (1971) 89.
107. Schengrurd C.L., Rosenberg A.: *J. Biol. Chem.* **245** (1970) 6196.
108. Ohman R.: *J. Neurochem.* **18** (1971) 571.
109. Ohman R., Svennerholm L.: *J. Neurochem.* **18** (1971) 79.
110. Schengrurd C.L., Rosenberg A.: *Biochemistry* **10** (1971) 2424.
111. Gatt G., Rapport M.M.: *Biochem. Biophys. Acta* **113** (1966) 567.
112. Gatt G.: *Inborn Sphingolipid Metab. Proc. Int. Symp. Cereb. Sphingolipidoses*, 3rd, ed., N. York, p. 261, (1965).

113. Bowen D.M., Radin N.S.: *J. Neurochem.* **16** (1969) 457.
114. Basu S.: *Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol.* **27** (1968) 346.
115. Hildebrand J., Stoffyn P., Hanser G.: *J. Neurochem.* **17** (1970) 403.
116. Handa S., Burton R.M.: *Lipids* **4** (1969) 589.
117. Kaufman B., Basu S., Roseman S.: *Inborn Disord. Sphingolipid Metab. Proc. Int. Symp. Cereb. Sphingolipidoses, 3ed ed.*, N. York, p. 193. (1965).
118. Dicesare J.L., Dain J.A.: *Biochem. Biophys. Acta* **231** (1971) 385.
119. Yip G.B., Dain J.A.: *Biochem. Biophys. Acta* **206** (1970) 252.
120. Kaufman B., Basu S., Roseman S.: *J. Biol. Chem.* **243** (1968) 5804.
121. Derry D.M., Fawcett J., Andermann F., Wolte L.S.: *Neurology* **18** (1968) 340.
122. Landing B.H., Silverman F.N., Craigi M., Lahex M.E., Jacoby M.D., Chadwick D.L.: *Amer. J. Dis. Child.* **108** (1964) 503.
123. Suzuki Y., Crocker A.C., Suzuki K.: *Arch. Neurol.* **24** (1971) 58.
124. Wenger A.D., Wardell S.: *J. Neurochem.* **20** (1973) 609.
125. Suzuki K., Suzuki K., Kamoshita S.: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **28** (1969) 25.
126. Van Hoof F., Hevs H.G.: *Eur. J. Biochem.* **7** (1968) 34.
127. O'Brien J.S. *J. Pediat.* **75** (1969) 167.
128. Klenk E.: *Ber. Deut. Chem. Ges., B.* **75** (1942) 1632.
129. Svennerholm L.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9** (1962) 436.
130. Sandhoff K., Andreae K., Jatzkewitz H.J.: *Life Sci.* **7** (1968) 283.
131. Suzuki Y., Jacob J.C., Suzuki K., Kutty K.M., Suzuki K.: *Neurology* **21** (1971) 313.
132. Suzuki K., Suzuki Y.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **66** (1970) 302.
133. Pilz H., Sandhoff K., Jatzkewitz H.: *J. Neurochem.* **13** (1966) 1273.
134. Kamoshita S., Aron A.M., Suzuki K., Suzuki K.: *Amer. J. Dis. Child.* **117** (1969) 379.
135. Seiter C.W., McCluer R.H.: *J. Neurochem.* **17** (1970) 1525.
136. Bezza B., Galli C.: *Life Sci.* **10** (1971) 213.
137. Peiffer J.: *Pathol. Eur.* **3** (1968) 305.
138. Borri P.F., Hooghwinkel G.J.M.: *Pathol. Eur.* **3** (1968) 416.
139. Norton N.T., Poduslo S.E., Suzuki K.: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **25** (1966) 582.
140. Ledeen R., Salsman K., Cabrena M.: *J. Lirid. Res.* **9** (1968) 129.

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF NEW DIMETHYLCARBAMATES OF THE DIHYDRIC PHENOLS.

A. VAVAYANNIS and G. TSATSAS

Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, University of Athens, Athens (Greece).

(Received January 1, 1980; Revised November 11, 1980).

Summary

On the phenolic hydroxyl of the three isomeric hydroxyphenyl dimethylcarbamates were introduced side chains bearing basic groups that solubilize the molecules. A number of the compounds described were evaluated for anticholinesterase activity and revealed a variability of action.

Key words: Dimethylcarbamates of the Dihydric Phenols.

Introduction

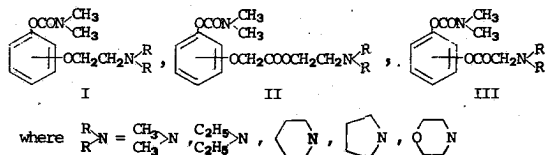
The study of aromatic carbamates acting as acetylcholinesterase (AChE) inhibitors has led to the following conclusions:^{1,2}

a) Compounds with a mono- or dimethylcarbamate group directly attached to an aromatic nucleus have shown high anticholinesterase activity.

b) Aromatic dimethylcarbamates are much more resistant to hydrolysis than monomethylcarbamates.

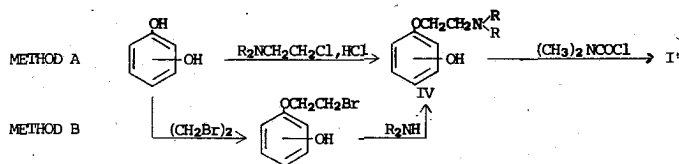
c) The presence of a positively charged nitrogen atom in the molecule is most significant for the inhibition of the enzyme.

We focused our interest on aromatic dimethylcarbamates bearing on the nucleus a second oxygen atom, either alkylated or acylated by a group containing a cationic nitrogen atom, since similar compounds have been previously reported as AChE inhibitors.^{3,3a} In this communication we describe the synthesis of three new series of compounds of the general formulae I, II and III, together with some preliminary tests on the activity of their salts.



Chemistry

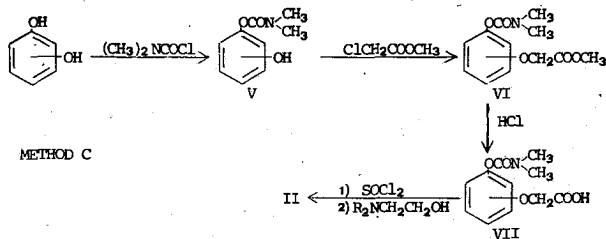
The preparation of I was carried out through the intermediate β -dialkylaminoethoxy phenols (IV) which were prepared by known methods^{4, 5, 6} outlined in scheme 1 (Methods A and B).



Pyrocatechol derivatives were prepared using exclusively Method A, since reaction of pyrocatechol with 1,2-dibromoethane in alkaline media leads predominantly to 1,4-benzodioxane⁷.

In the final stage the phenols IV reacted with dimethylcarbamyl chloride in the presence of K_2CO_3 to yield I which were purified by distillation in vacuo. The properties and elemental analyses of I are summarized in Table I.

The compounds of the general formula II were synthesized in four steps (Method C, scheme 2). The dihydric phenols reacted initially with dimethylcarbamyl chloride in the presence of sodium ethylate or pyridine. The obtained carbamates V were allowed to react with methyl chloroacetate in the presence of K_2CO_3 and KI⁸ affording the methyl dimethylcarbamoxymethyl phenoxycetates (VI), which were subsequently hydrolyzed by excess concentrated HCl to yield the corresponding acids (VII).



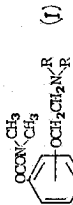


TABLE I. Dimethylcarbamatoxyphenyl- β -dialkylaminoethyl ethers.

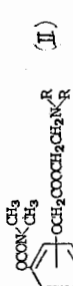
R ¹ -N R ² -N	Meth. Yield %	M.P. °C	B.P. °C/mmHg	Salt	N ^o	Molecular Formula	M.P. °C	Analysis				Found %						
								C	H	N	X	C	H	N	X			
(CH ₃) ₂ N	A	80	48	150/2	Acid Fumarate	1	C ₁₇ H ₂₄ N ₂ O ₇	129	55.4	6.5	7.6	55.5	6.4	7.7				
(C ₂ H ₅) ₂ N	A,B	47	175/2	Acid Fumarate	2	C ₁₅ H ₂₅ N ₂ O ₃	118	44.1	6.1	6.9	31.1	43.8	6.4	6.6	31.2			
(C ₂ H ₅) ₂ N	B	91	38	165/2	Acid Fumarate	3	C ₁₉ H ₂₈ N ₂ O ₇	110	57.6	7.1	7.1	58.0	7.0	7.0				
				Acid Fumarate	4	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₇	141	58.8	6.9	6.9		58.5	6.6	6.6				
				CH ₃ I	5	C ₁₇ H ₂₇ N ₂ O ₃	138	47.0	6.2	6.4	29.2	46.9	6.4	6.3	29.0			
	A,B	67	35	155/3	Acid Fumarate	6	C ₁₉ H ₂₆ N ₂ O ₇	136	57.9	6.6	7.1	58.0	6.6	7.0				
				C ₂ H ₅ I	7	C ₁₇ H ₂₇ N ₂ O ₃	120	47.0	6.2	6.4	29.2	46.9	6.4	5.3	29.0			
	B	96	71	165/3	Acid Fumarate	8	C ₁₉ H ₂₆ N ₂ O ₈	157	55.6	6.3	6.8	55.7	6.4	6.9				
(CH ₃) ₂ N	A	51	140/2	Acid Fumarate	9	C ₁₇ H ₂₄ N ₂ O ₇	121	55.4	6.5	7.6		55.5	6.3	7.6				
(C ₂ H ₅) ₂ N	A,B	75	145/2	Acid Fumarate	10	C ₁₉ H ₂₈ N ₂ O ₇	117	57.6	7.1	7.1		57.5	6.8	7.2				
	A,B	65	155/3	Acid Fumarate	11	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₇	134	58.8	6.9	6.8		59.1	6.8	6.7				
	A,B	60	165/3	Acid Fumarate	12	C ₁₉ H ₂₆ N ₂ O ₇	105	57.9	6.5	7.1		57.6	6.6	7.0				
	A	64	200/4	Acid Fumarate	13	C ₁₉ H ₂₆ N ₂ O ₈	152	55.6	6.3	6.8		55.5	6.5	6.6				
(CH ₃) ₂ N	A	60	144/2	C ₂ H ₅ I	14	C ₁₅ H ₂₅ N ₂ O ₃	153	44.1	6.1	6.9	31.1	44.5	5.0	6.9	31.1			
(C ₂ H ₅) ₂ N	A	77	168/3	C ₂ H ₅ Br	15	C ₁₇ H ₂₉ BrN ₂ O ₃	170	52.5	7.4	7.2	20.5	52.5	7.8	7.1	20.1			
	A	66	170/3	C ₂ H ₅ I	16	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₃	154	48.2	6.5	6.2	28.3	48.5	6.6	6.2	28.7			
	A	40	164/4	C ₂ H ₅ I	17	C ₁₇ H ₂₇ N ₂ O ₃	165	47.0	6.2	6.4	29.2	47.0	6.1	6.4	29.0			
	A	65	220/3	C ₂ H ₅ I	18	C ₁₇ H ₂₇ N ₂ O ₄	189	45.4	6.0	6.2	28.2	45.1	6.0	6.1	28.2			

para

meta

ortho

The target compounds II were prepared by reaction of the appropriate β -dialkylaminoethanols with the chlorides of the acids VII. The obtained bases were purified by means of their salts, since most of them decompose during distillation in vacuo. The properties and elemental analyses of compounds II and their salts are summarized in Table II.



 (II)

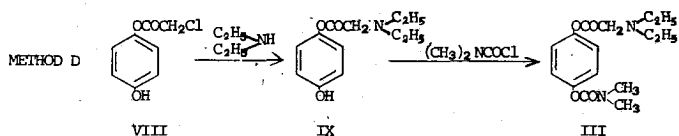
TABLE II. β -Dialkylaminoethyl dimethylcarbamoyloxyacetates.

R	Yield %	B.P. °C/mmHg	Salt	N°	Molecular Formula	M.P., °C	A n a l y s e s								
							Calc. %	Found %			X				
							C	H	N	X	C	H	N	X	
para	(CH ₃) ₂ N	38	165/2	HCl	1	C ₁₅ H ₂₃ ClN ₂ O ₅	147	52.0	6.6	8.1	10.2	52.3	7.1	8.0	10.4
	(C ₂ H ₅) ₂ N	31	175/2	HCl	2	C ₁₇ H ₂₇ ClN ₂ O ₅	107	54.5	7.2	7.5	9.5	54.9	7.2	7.4	9.2
		48	182/3	Acid Tartrate	3	C ₂₂ H ₃₂ N ₂ O ₁₁	144	52.8	6.4	5.4		52.8	6.2	5.8	
		48	195/2	HCl	4	C ₁₇ H ₂₅ ClN ₂ O ₅	111	54.8	6.7	7.5	9.5	54.9	6.8	7.4	9.6
		39		Acid Oxalate	5	C ₁₉ H ₂₆ N ₂ O ₁₀	154	48.8	6.2	6.7		48.7	6.0	6.4	
meta	(CH ₃) ₂ N	27		HCl	6	C ₁₅ H ₂₃ ClN ₂ O ₅	146	52.0	6.6	8.1	10.2	52.1	6.3	8.3	10.4
	(C ₂ H ₅) ₂ N	39		Acid Oxalate	7	C ₁₉ H ₂₈ N ₂ O ₉	136	53.3	6.5	6.5		53.0	6.7	5.4	
		40		"	8	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₉	158	54.6	6.4	6.4		54.8	6.4	6.3	
		30		"	9	C ₁₉ H ₂₆ N ₂ O ₉	115	53.5	6.1	6.6		53.8	5.8	6.4	
		38		"	10	C ₁₉ H ₂₆ N ₂ O ₁₀	157	48.8	6.2	6.7		48.7	6.0	6.8	
ortho	(CH ₃) ₂ N	54		"	11	C ₁₇ H ₂₄ N ₂ O ₉	168	51.0	6.0	7.0		50.8	6.5	6.6	
	(C ₂ H ₅) ₂ N	37		"	12	C ₁₉ H ₂₈ N ₂ O ₉	119	53.3	6.5	6.5		53.5	6.4	6.5	
		39		"	13	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₉	170	54.6	6.4	6.4		54.4	6.2	6.1	
		38		"	14	C ₁₉ H ₂₅ N ₂ O ₉	153	53.5	6.1	6.6		53.4	6.0	6.2	
		20		"	15	C ₁₉ H ₂₆ N ₂ O ₁₀	138	48.8	6.2	6.7		48.4	6.1	6.4	

(*) Yield of crude product based on VII.

The synthesis of compounds III was attempted via three different pathways (Methods D, E and F, schemes 3 and 4).

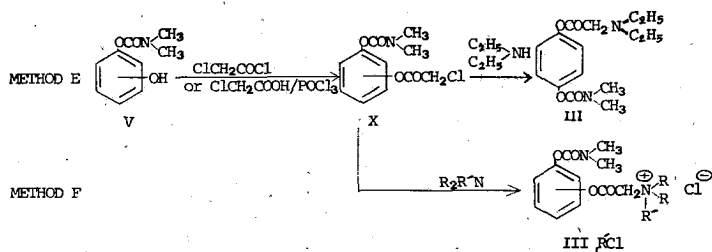
Following Method D, which is valid for para derivatives only,



Scheme 3.

p-hydroxyphenyl chloroacetate⁹ (VIII) was treated with secondary amines, which as a rule caused aminolysis of VIII^{10, 11, 13} to regenerate hydroquinone. However reaction with diethylamine afforded p-hydroxyphenyl diethylaminoacetate (IX, R=C₂H₅), which in turn reacted with dimethylcarbamyl chloride to yield III_{para} (R=C₂H₅).

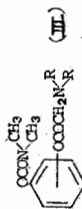
Method E involved chloroacetylation of V with either chloroacetyl chloride¹¹ or chloroacetic acid and POCl₃¹³, in the presence of pyridine. As in the case of Method D, treatment of the obtained dimethylcarbamoxylphenyl chloroacetates (X) with secondary amines caused hydrolysis of the chloroacetates to regenerate V except diethylamine which gave only the final product III_{para} (R=C₂H₅), as above.



Scheme 4.

Finally Method F was applied, by treating X with tertiary amines and thus three more products of the general formula III were obtained in the form of quaternary ammonium salts, listed in Table III.

TABLE III. Dimethylcarbamoxypheyl dialkylaminoacetates.



R ₁ N R ₂	Method	Yield %	B.P. °C/mmHg	Salt	N ^o	Molecular Formula	M.P. °C	A n a l y s e s							
								Calc. %			Found %				
								C	H	N	X	C	H	N	X
(CH ₃) ₂ N	F	42		CH ₃ Cl	1	C ₁₄ H ₂₁ ClN ₂ O ₄	199	53.1	6.6	8.8	11.2	52.8	6.7	9.0	11.2
(C ₂ H ₅) ₂ N	D(E)	39(23)	180/2	Picrate	2	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₁₁	146	48.2	4.8	13.4		47.9	5.1	13.2	
	F	20		C ₂ H ₅ Cl	3	C ₁₈ H ₂₇ ClN ₂ O ₄	188	58.3	7.3	7.5	9.6	56.6	7.1	7.4	9.2
(CH ₃) ₂ N [*]	F	61		CH ₃ Cl	4	C ₁₄ H ₂₁ ClN ₂ O ₄	179	53.1	6.6	8.8	11.2	53.0	6.7	8.9	11.2

(*) .Ref. 3a. Data unpublished.

Experimental

Melting points are uncorrected. The IR spectra were taken in Nujol on a Perkin-Elmer 521 apparatus.

Dimethylcarbamoxyphenyl β -dialkylaminoethyl ethers (I)

To a solution of a hydroxyphenyl β -dialkylaminoethyl ether (0.019 mol) in acetone was added K_2CO_3 (0.019 mol), followed by dropwise addition of dimethylcarbonyl chloride (0.028 mol) under stirring. The mixture was gently warmed and stirred for 14 hr. The inorganic salts were filtered, the solvent was distilled off, the residue was rendered alkaline with 15 % NaOH and it was extracted with ether. The organic layer was dried ($MgSO_4$), the solvent was distilled off and the oily residue was fractionally distilled under reduced pressure.

p-Hydroxyphenyl dimethylcarbamate (V_{para})

To a freshly prepared solution of Na (0.25 mol) in 250 ml absolute ethanol under N_2 was dissolved hydroquinone (0.25 mol), followed by dropwise addition of dimethylcarbonyl chloride (0.1 mol) under stirring, in a period of 30 min. The mixture was refluxed for 8 hr. cooled, the precipitate was filtered off and the solvent was evaporated in vacuo. The residue was triturated with 15 % NaOH, extracted with benzene, the aqueous layer was acidified with conc. HCl and the precipitate was recrystallized from H_2O -ethanol to give off-white crystals, m.p. $185^\circ C$ (77% yield).

Analysis calcd. for $C_9H_{11}NO_3$:	C,59.7 H,6.0 N,7.7
Found :	C,59.3 H,6.1 N,7.4

m-Hydroxyphenyl dimethylcarbamate (V_{meta}) was similarly prepared in 70% yield as a white solid, m.p. $98^\circ C$, from benzene-ligroin.

Analysis calcd. for $C_9H_{11}NO_3$:	C,59.7 H,6.0 N,7.7
Found :	C,59.8 H,6.1 N,7.6

o-Hydroxyphenyl dimethylcarbamate (V_{ortho})

A mixture of pyrocatechol (0.18 mol), pyridine (0.36 mol) and dimethylcarbonylchloride (0.18 mol) in benzene was refluxed for 5 hr. After cooling the solution was washed with 10% HCl to remove the excess pyridine and extracted with 15% NaOH. The aqueous layer was acidified with conc. HCl and the precipitate was recrystallized from benzene-ligroin to give white crystals m.p. $118^\circ C$ (24% yield).

Analysis calcd. for $C_9H_{11}NO_3$:	C,59.7 H,6.0 N,7.7
Found :	C,59.7 H,6.2 N,7.8

Methyl p-dimethylcarbamoxyphenoxyacetate (VI_{para})

To a solution of p-hydroxyphenyl dimethylcarbamate (0.053 mol) in 150 ml

ethyl methyl ketone was added anhydrous K_2CO_3 (0.053 mol). A mixture of methyl chloroacetate (0.79 mol) and KI (0.5 g) in 20 ml ethyl methyl ketone, which had remained overnight at room temperature, was added under stirring over a period of 90 min. The mixture was then refluxed for 10 hr. The solid was removed by filtration and the solvent was evaporated in vacuo. The residue was dissolved in benzene, washed with 10% Na_2CO_3 (2×50 ml) and then with water until neutral. The solution was dried over $MgSO_4$, ligroin was added and the precipitate was recrystallized from benzene-ligroin to give white leaflets m.p. $78^{\circ}C$ (80% yield).

Analysis calcd. for $C_{12}H_{15}NO_5$	C,56.9 H,5.9 N,5.5
Found	C,57.1 H,6.0 N,5.8

Methyl m-dimethylcarbamoxyphenoxyacetate (VI_{meta}) was prepared similarly in 90% yield as white needles m.p. $78^{\circ}C$ from benzene-ligroin.

Analysis calcd. for $C_{12}H_{15}NO_5$	C,56.9 H,5.9 N,5.5
Found	C,57.1 H,6.0 N,5.8

Methyl o-dimethylcarbamoxyphenoxyacetate (VI_{ortho}) was obtained as colourless viscous oil b.p. $100^{\circ}/2$ mm Hg, in 80% yield.

Analysis calcd. for $C_{12}H_{15}NO_5$	C,56.9 H,5.9 N,5.5
Found	C,56.7 H,5.9 N,5.2

p-Dimethylcarbamoxyphenoxyacetic (VII_{para})

Methyl *p*-dimethylcarbamoxyphenoxyacetate (0.039 mol) was warmed with 50-80 ml conc. HCl on a steam-bath for ca. 20 min. The resulting solution was poured in 100 ml cold water and it was kept at $0^{\circ}C$ for 3 hr. The crude solid was dissolved in 10% $NaHCO_3$, shaken with 2×100 ml benzene and finally the solution was acidified with conc. HCl. The acid was filtered, dried and recrystallized from dry toluene to give white crystals m.p. $135^{\circ}C$ (83% yield).

Analysis calcd. for $C_{11}H_{13}NO_5$	C,55.2 H,5.4 N,5.8
Found	C,55.7 H,5.7 N,5.4

m-Dimethylcarbamoxyphenoxyacetic acid (VII_{meta}) was obtained as a white solid m.p. $95^{\circ}C$ from ethyl ether (72% yield).

Analysis calcd. for $C_{11}H_{13}NO_5$	C,55.2 H,5.4 N,5.8
Found	C,55.4 H,5.4 N,5.9

o-Dimethylcarbamoxyphenoxyacetic (VII_{ortho}) was similarly prepared as a crystalline solid m.p. $105^{\circ}C$ from toluene. Yield 64%.

Analysis calcd. for $C_{11}H_{13}NO_5$	C,55.2 H,5.4 N,5.8
Found	C,55.3 H,5.8 N,5.8

β-Dialkylaminoethyl dimethylcarbamoxyphenoxyacetates (II)

0.016 mol of an acid VII was refluxed with excess $SOCl_2$ for 30 min. The excess $SOCl_2$ was removed in vacuo and the residue was dissolved in dry benzene. After cooling in ice-bath, a β -dialkylaminoethanol (0.032 mol) was added dropwise and the reaction mixture was refluxed for 2 hr. The precipitate was then filtered off, the remaining solution was washed with water until neutral, dried over $MgSO_4$ and the

solvent was removed in vacuo. The oily residue was fractionally distilled under reduced pressure to yield II. Note: Since the majority of products II decompose upon distillation, the purification of the crude bases was made by means of their salts.

p-Hydroxyphenyl diethylaminoacetate (IX, $R=C_2H_5$)

A solution of 0.02 mol *p*-hydroxyphenyl chloroacetate (VIII) and 0.04 mol diethylamine in 50 ml dry benzene was gently warmed on a steam-bath for 1 hr and then it was allowed to stand at room temperature overnight. After filtration the solution was washed with ice-cold 10% HCl and the aqueous layer was made alkaline (pH=10) with cold 10% NaOH, while the temperature was maintained at 0° C. The resulting suspension was shaken with 2×50 ml ether, the organic layer was dried, the solvent distilled off and the product was collected as a viscous oil at 185° C/3 mm Hg in 48% yield.

HCl salt: m.p. 186° C from methanol.

Analysis calcd. for $C_{12}H_{18}ClNO_2$:

C,55.2 H,6.9 N,5.4 Cl,13.7

Found

C,55.2 H,7.0 N,5.3 Cl,13.3

p-Dimethylcarbamoxyphenyl chloroacetate (X_{para})

To a solution of 0.024 mol V_{para} and 0.48 mol pyridine in 100 ml dry acetone which was cooled in NaCl-ice, was added 0.048 mol chloroacetyl chloride under stirring. The temperature of the reaction mixture was maintained between 5° and 10° C during the addition procedure. The stirring was continued for 2 hr at the same temperature and for another 8 hr at room temperature. The mixture was kept overnight at room temperature, the precipitate was filtered off, the acetone was removed in vacuo and the residue was triturated with ice-cold 10% HCl. The resulting mixture was extracted with ether, the ethereal solution was washed with 2×50 ml ice-cold 10% NaOH, then with cold water until neutral and it was dried over $MgSO_4$. After evaporation of the solvent the solid residue was crystallized from dry ether (or benzene-ligroin) to give white leaflets m.p. 98° C (79% yield).

The same product and yield resulted when the reaction was carried out employing chloroacetic acid and $POCl_3$, instead of $ClCH_2COCl$, as described by N.H. EINHORN¹³.

Analysis calcd. for $C_{11}H_{12}ClNO_4$:

C,51.3 H,4.6 N,5.4

Found

C,51.5 H,4.7 N,5.3

m-Dimethylcarbamoxyphenyl chloroacetate (X_{meta}) was similarly prepared as an amorphous white solid after distillation in vacuo at 163° C/2 mm Hg or as white crystals after recryst from benzene-ligroin, m.p. 69° C. Yield 60%.

Anal. calcd. for $C_{11}H_{12}ClNO_4$:

C,51.3 H,4.6 N,5.4

Found

C,51.5 H,4.7 N,5.0

o-Dimethylcarbamoxyphenyl chloroacetate (X_{ortho}) was prepared as a colourless viscous oil in 42% yield. B.p. 130° C/2 mm Hg.

Anal. calcd. for $C_{11}H_{12}ClNO_4$:

C, 51.3 H, 4.6 N, 5.4

Found

C, 50.9 H, 4.4 N, 5.7

p-Dimethylcarbamoxyphenyl dimethylaminoacetate (III_{para}, R=C₂H₅)

a) Method D

A solution of 0.04 mol IX (R=C₂H₅), 0.012 mol pyridine and 0.013 mol dimethylcarbonyl chloride in 50 ml dry acetone was gently warmed on a steam-bath for 2 hr. The solvent was then removed in vacuo, the oily residue was made alkaline with 10% Na₂CO₃ and it was extracted with ether. The organic layer was dried, the ether distilled off and the product was collected by distillation at 180°/2 mm Hg in 38% yield. The structure of the product was confirmed by elemental analysis of its picric salt (III-2)

b) Method E

A solution of X_{para} (0.019 mol) and diethylamine (0.039 mol) in dry benzene was gently warmed on a steam-bath for 2 hr and then remained overnight at room temperature. The precipitate was filtered off, the filtrate was shaken with cold 10% HCl and the aq. layer was made alkaline with cold 10% Na₂CO₃. After extraction with ether the product was isolated as in Method D.

p-Dimethylcarbamoxyphenyl trimethylammonium acetate chloride (III-1). Method F.

In a 50 ml round-bottomed flask with ground stopper was placed a solution of 0.011 mol X_{para} in dry acetone. The solution was chilled with CO₂-acetone and 0.017 mol trimethylamine was added. The flask was topped with dry cold acetone and was firmly sealed. The mixture remained at room temperature until the formation of crystalline product had practically ceased (ca. 8 days). The crystals were filtered off and recrystallized from abs. ethanol.

p-Dimethylcarbamoxyphenyl ethylpiperidinium acetate chloride (III-3). Method F.

A solution of 0.019 mol X_{para} and 0.028 mol N-ethylpiperidine in dry acetone (or dry benzene) was slightly warmed for 30 min and allowed to stand at room temperature for 24 hr. The crystalline precipitate was filtered off and recrystallized from dry acetone.

o-Dimethylcarbamoxyphenyl trimethylammonium acetate chloride (III-4) was prepared as III-1.

Spectral analysis

The infrared spectra of the final products I, II and III, in the form of their salts, showed characteristic urethane C=O absorption bands between 1720 and 1700 cm⁻¹.

Additional bands were recorded for compounds II and III between 1770 and 1750 cm⁻¹, assigned to ester C=O absorption.

Pharmacology

The initial investigation of the pharmacological activity of the compounds described above, was performed *in vitro* by observing their effects on the contraction provoked by acetylcholine on rabbit ileum. The bioassay was carried out by superfusing the ileum in Tyrode's solution using a standard solution (0.01 γ /ml) of acetylcholine bromide¹⁴. From the compounds so far tested, *m*-dimethylcarbamoxyphenyl β -dimethylaminoacetate (II-6) gave strong evidence for anticholinesterase activity since it increased the ileum contraction. This is probably due to the similarity of its structure to that of acetylcholine.

The mean lethal dose of a number of compounds was estimated *grosso modo* by endoperitoneal injection in albino mice. The results of the pharmacological activity and toxicity tests are summarized in table IV.

TABLE IV.

Compound	LD ₅₀ (gr/kg)*	Effect on ileum contraction	Dose (γ /ml)
I-5	0.05	Decrease	5,10 and 20
I-10	0.05	Inactive	20 and 40
I-13	0.25	Inactive	20 and 40
I-11	0.2	---	---
I-16	0.2	Decrease	20 and 40
I-18	0.25	Decrease	10,20 and 40
II-2	> 0.5	Inactive	20 and 40
II-3	> 0.5	---	---
II-6	> 0.5	Slight increase	20
		Large increase	20
III-3	---	Decrease	20 and 40

Aknowledgments

The authors wish to thank Prof. D. Varonos for the facilities offered for the pharmacological tests, and the Greek Commission of Nuclear Energy for the laboratory equipment and chemicals offered.

Περίληψη

Στήν έργασία αυτή περιγράφεται ή σύνθεση τών τριών ίσομερών διμεθυλοκαρβαμϊδικών ύδροξυφαινυλεστέρων, στο έλεύθερο φαινολικό ύδροξύλιο τών

όποιων εισάγονται πλευρικές αλυσίδες πού περιέχουν αμινομάδα.

Τά προϊόντα μέ τή μορφή αλάτων τους έδειξαν, μετά από προκαταρκτική δοκιμασία για άντιχολινεστερασική ένέργεια, ποικιλία στή δραστικότητα τους. Ο μ-διμεθυλοκαρβαμουόλοξυφαινοξοξικός β-διμεθυλαμινοαιθυλεστήρ έδωσε σαφείς ένδείξεις για άντιχολινεστερασική δράση, πιθανώτατα έπειδή ή δομή τής πλευρικής αλυσίδας του έχει όμοιότητες μέ αυτήν τής άκετυλοχολίνης.

References and Notes.

1. O' Brien, R.D. "The Design of Organophosphate & Carbamate Inhibitors of Cholinesterases" in Ariens, E.J.: *Drug Design*, vol. II, p. 196, Academic Press, New York (1971).
2. Burger, A.: *Medicinal Chemistry*, (2d edition), p. 421, Interscience, New York (1960).
3. Stempel, A. & Aeschlimann, J.A.: "Synthetic Analogs of Physostigmine" in Blicke, F.F. & Cox, R.H.: *Medicinal Chemistry*, vol. III, p. 264, Wiley & Sons, New York (1956).
- 3a. Stempel, A. & Aeschlimann, J.A.: "Synthetic Analogs of Physostigmine" in Blicke, F.F. & Cox, R.H.: *Medicinal Chemistry*, vol. III, p. 293, Wiley & Sons, New York (1956).
4. Drain, D.J. Peak, D.A. & Whitmont, F.F.: *J. Chem. Soc.* 2680 (1949).
5. Gautier, J. Renault, J. & Rabiant, J.: *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1014 (1957)
6. Cowan, J. & Marvel, C.S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **58**, 2277 (1936).
7. Ziegler, K. Lüttringhaus, A. & Wohlgemuth, K.: *Ann. Chem.*, **528**, 162, 177 (1937).
8. Hurd, C. & Perletz, P.: *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 38 (1946).
9. Ebine, S.: *Sci. Repts., Saitama University*, ser. A2, 105 (1956).
10. Arnett, E. McC., Miller, J.G. & Day, A.R.: *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 5393 (1951).
11. Brancaccio, G. & Larizza, A.: *Il Farmaco, Ed. Sci.*, **19**, 986 (1964).
12. Guioca-Dedopoulou, V., Tsatsas, G. & Papaioannou, G.: *Ann. Pharm. Fr.*, **28**, 707 (1970).
13. Einhorn, N.H.: *Chem. Zentr.*, (1), 270 (1900).
14. Pharmacological Experiments on Isolated Preparations, p. 58, E.S. Livingstone, Edinburgh-London (1968).

NOUVELLES BASES DE MANNICH DERIVEES DE CERTAINS TETRACYCLINES

G. PAPAIOANNOU

Laboratoire de Pharmacie Chimique de l'Université d'Athènes, Athènes (Grèce).

(Reçu le 18 Mai, 1979).

Résumé

L'auteur prépare de nouveaux dérivés des tétracycline, chlorotétracycline, oxytétracycline et méthacycline en faisant réagir leur fonction amide selon Mannich. Certains de ces dérivés ont été soumis à une étude pharmacologique préliminaire afin d'examiner leur toxicité et leur activité anti-microbienne. Les résultats ont montré que ces dérivés ont une activité antimicrobienne comparable à celle de la tétracycline et sont bien supportés par les animaux.

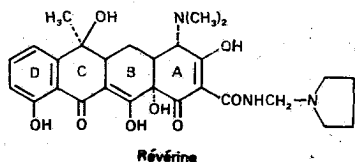
Terminologie: Dérivés des tetracyclines.

Partie Théorique.

La grande valeur thérapeutique des tétracyclines a poussé les chercheurs à porter des transformations chimiques^{1,2} dans leurs molécules; ceci a conduit à l'obtention d'un grand nombre d'antibiotiques hémisynthétiques.

Le but de ces transformations est l'amélioration de l'activité antimicrobienne, l'augmentation de leur solubilité dans l'eau pour favoriser l'administration parentérale, l'augmentation de la résistance chimique ainsi que les changements d'absorption et d'élimination.

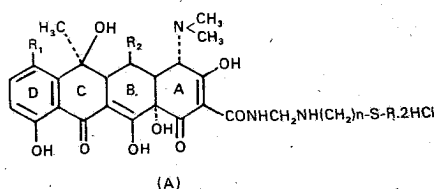
L'application de la réaction de Mannich sur la fonction amidique des tétracyclines a fourni des dérivés qui sont doués d'une solubilité dans l'eau remarquable et dont le plus intéressant est la Révérine^{3,4,5}.



Cette dernière conserve l'activité antimicrobienne de la substance mère et en même temps, en raison de sa solubilité dans l'eau, elle est particulièrement convenable pour une administration parentérale sans qu'il soit nécessaire d'être transformée en sel. Ses solutions aqueuses sont presque neutres et très peu irritantes pour les tissus par rapport aux sels des tétracyclines naturelles.

Le but du présent travail est la synthèse de nouvelles bases de Mannich dérivées des tétracyclines, qui, mis à part les avantages cités précédemment, présentent, peut-être, une plus forte activité antimicrobienne à cause de l'incorporation dans la chaîne latérale de la fonction R-S (R=alcoyles inférieurs et supérieurs).

Les produits ainsi obtenus qui se forment en faisant réagir les tétracycline, chlorotétracycline, oxytétracycline et méthacycline avec le paraformaldéhyde et une variété des S-alcoyl cystéamines et homocystéamines, repondent aux formules générales:



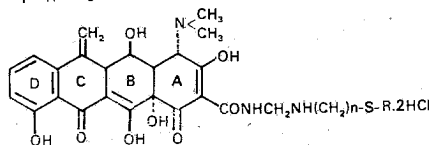
$n = 2, 3$

$R = CH_3, C_2H_5, C_3H_7, CH(CH_3)_2, (CH_2)_3CH_3, (CH_2)_4CH_3, (CH_2)_6CH_3, C(CH_3)_3, CH(CH_3)CH_2CH_3$

$R_1 = R_2 = H$ Série I.

$R_1 = Cl$ $R_2 = H$ Série II.

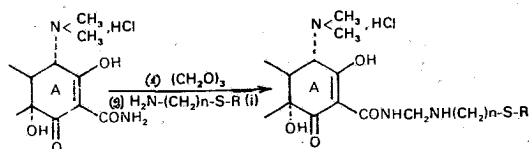
$R_1 = H$ $R_2 = OH$ Série III.



où n et R sont les mêmes que précédemment, série IV.

La synthèse des ces dérivés a été effectuée selon le schéma:

Les S-alcoyl cystéamines I, $n = 2$ et S-alcoyl homocystéamines I, $n = 3$ que nous avons utilisées comme matières premières, ont été obtenues comme suit: les S-



alcoylcystéamines par ouverture du cycle de l'éthylène-imine par un mercaptan⁽⁶⁾; les S-alcoylhomocystéamines par action de l'acrylonitrile sur un mercaptan approprié en présence d'éthylate de sodium, puis réduction de l'alcoyl-3 thiopropanenitrile⁽⁷⁾ (II) avec le LiAlH.

Pour la réaction de Mannich nous avons suivi d'une manière générale la méthode de L. Cheney et coll.⁽⁸⁾ en utilisant l'éthanol absolu comme solvant; toutefois, nous en avons apporté quelques modifications afin de transformer les produits définitifs en dichlorhydrates qui cristallisent mieux en augmentant à la fois le rendement.

Partie Experimentale.

S-alcoylcystéamines: I, $n=2$, $R=CH_3$ ⁽⁶⁾, C_2H_5 ⁽⁶⁾, $(CH_3)_2CH$ ⁽⁹⁾, $CH_3(CH_2)_3$ ⁽⁶⁾, $CH_3(CH_2)_4$ ⁽¹⁰⁾, $CH_3(CH_2)_5$ ⁽¹⁰⁾.

Nous les avons préparées selon T. Wieland et coll. et les rendements varient entre 48-69%.

S-alcoyl thiopropanenitriles⁽⁷⁾: II, $R=CH_3$, C_2H_5 , $(CH_3)_2CH$, $CH_3(CH_2)_2$, $CH_3(CH_2)_3$, $CH_3CH_2CHCH_3$, $(CH_3)_3C$, $CH_3(CH_2)_4$, $CH_3(CH_2)_5$.

Nous les avons préparés selon C. Hurd et coll.⁷ et les rendements varient entre 91-96%. Parmi les produits synthétisés les suivants n'avaient pas encore été signalés dans la littérature chimique:

n-propylthio-3 propanenitrile ($R=CH_3(CH_2)_2$)

$Eb_{20}=123-125^\circ C$.

Analyse: Calc. % pour $C_6H_{11}NS$, N:10,84

Tr. % 10,63.

n-pentylthio-3 propanenitrile ($R=CH_3(CH_2)_4$)

$Eb_{20}=143-145^\circ C$.

Analyse: Calc. % pour $C_8H_{15}NS$, N:8,91

Tr. % 9,10.

n-héxylthio-3 propanenitrile ($R=CH_3(CH_2)_5$)

$Eb_{20}=159-161^\circ C$.

Analyse: Calc. % pour $C_9H_{17}NS$, N:8,18

Tr. % 8,32.

S-alcoyl homocystéamines: I, $n=3$, $R=CH_3$ ^(11,12), C_2H_5 ^(10,13), $CH_3(CH_2)_2$, $(CH_3)_2CH$ ⁽¹¹⁾, $CH_3(CH_2)_3$ ⁽¹⁰⁾, $CH_3CH_2CH-CH_3$, $(CH_3)_3C$, $CH_3(CH_2)_4$ ⁽¹⁰⁾, $CH_3(CH_2)_5$ ⁽¹⁰⁾.

Nous les avons obtenues à partir des nitriles correspondants par action de LiAlH₄. Les rendements varient de 50 à 81%. Parmi les produits synthétisés les suivants sont obtenus pour la première fois:

S-n-propyl homocystéamine ($R=CH_3(CH_2)_2$) $Eb_{20}=100-2^\circ C$

Analyse: Calc.% pour C₆H₁₅NS N:10,51
Tr.% 10,32

S-isobutyl homocystéamine (R=CH₃CH₂CHCH₃) Eb₂₀=119-20°C

Analyse: Calc % pour C₇H₁₇NS N:9,51
Tr.% 9,68

S-tertbutyl homocystéamine (R=(CH₃)₃C) Eb₂₀=114-5°C

Analyse: Calc.% pour C₇H₁₇NS N:9,51
Tr.% 9,35

N-(méthylthio éthylaminométhyl) tétracycline: A, R₁=R₂=H, n=2, R=CH₃.

On chauffe à reflux dans une atmosphère d'azote durant 2h un mélange de 2,5g (0,0052 mole) de chlorhydrate de tétracycline, 0,23g de paraformaldéhyde (soit 0,00775 mole de formaldéhyde), 0,52g (0,0057 mole) de S-méthyl cystéamine et 65 ml d'éthanol absolu. Après avoir ajouté 0,23g de paraformaldéhyde on chauffe de nouveau pendant 2h. Puis on acidifie avec une solution éthanolique d'acide.

TABLEAU I: N-(alcoylthio alcoylaminométhyl)-tétracyclines

(I)

R	n x	Rd. ^(a) %	N° du produit	Formule brute	F ^o C ^(b)	Analyse					
						Calc. %			Tr. %		
						C	H	N	C	H	N
CH ₃	2 1	86	T.4504	C ₂₆ H ₃₄ ClN ₂ O ₆ S	220-222	53,47	5,87	7,19	53,19	5,57	7,08
C ₂ H ₅	2 1	79	T.4505	C ₂₇ H ₃₄ ClN ₂ O ₆ S	250-252	54,22	6,07	7,03	53,96	6,30	7,31
CH(CH ₃) ₂	2 1	76	T.4506	C ₂₈ H ₃₄ ClN ₂ O ₆ S	235-237	54,94	6,26	6,86	54,54	6,04	6,98
(CH ₂) ₂ CH ₃	2 1	77	T.4507	C ₂₉ H ₄₀ ClN ₂ O ₆ S	219-221	55,63	6,44	6,71	55,32	6,38	6,48
(CH ₂) ₄ CH ₃	2 2	81	T.4499	C ₃₀ H ₄₃ Cl ₂ N ₂ O ₆ S	238-240	53,25	6,41	6,21	53,06	6,30	5,98
(CH ₂) ₆ CH ₃	2 2	82	T.4500	C ₃₁ H ₄₈ Cl ₂ N ₂ O ₆ S	225-227	53,91	6,57	6,08	54,11	6,30	5,88
CH ₃	3 1	74	T.4508	C ₂₇ H ₃₆ ClN ₂ O ₆ S	230-232	54,22	6,07	7,03	54,50	5,80	6,75
C ₂ H ₅	3 2	65	T.4488	C ₂₈ H ₃₈ Cl ₂ N ₂ O ₆ S	223-225	51,85	6,06	6,48	52,35	6,49	6,20
(CH ₂) ₂ CH ₃	3 2	69	T.4489	C ₂₉ H ₄₁ Cl ₂ N ₂ O ₆ S	240-242	52,57	6,24	6,34	52,72	6,01	6,12
CH(CH ₃) ₂	3 1	71	T.4509	C ₂₉ H ₄₀ ClN ₂ O ₆ S	224-226	55,63	6,44	6,71	55,60	6,15	6,88
(CH ₂) ₃ CH ₃	3 2	63	T.4494	C ₃₀ H ₄₃ Cl ₂ N ₂ O ₆ S	232-235	53,25	6,41	6,21	53,20	6,21	5,98
CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	3 2	75	T.4495	C ₃₀ H ₄₃ Cl ₂ N ₂ O ₆ S	230-233	53,25	6,41	6,21	53,03	6,19	6,02
Cl(CH ₂) ₃	3 2	73	T.4496	C ₃₀ H ₄₃ Cl ₂ N ₂ O ₆ S	233-236	53,25	6,41	6,21	52,98	6,29	5,97
(CH ₂) ₄ CH ₃	3 2	77	T.4497	C ₃₁ H ₄₈ Cl ₂ N ₂ O ₆ S	224-226	53,91	6,57	6,08	54,31	6,67	6,12
(CH ₂) ₆ CH ₃	3 2	78	T.4498	C ₃₂ H ₄₇ Cl ₂ N ₂ O ₆ S	235-237	54,54	6,72	5,96	54,58	6,43	5,82

(a) Rendement en dichlorhydrate.

(b) Les points de fusion ont été pris dans un appareil de Buchi et ne sont pas corrigés (recristallisation dans un mélange éthanol abs.-éther abs.).

chlorhydrique et filtre. Le filtrat est dilué avec deux volumes d'éther et le précipité qui se forme est filtré et recristallisé dans un mélange d'éthanol-éther. Nous avons obtenu 2,6g de dichlorhydrate de la base formée soit un rendement de 85%. F. 223-5°C.

En utilisant la même méthode nous avons obtenu tous les produits dont les analyses élémentaires et les constantes physiques sont indiquées dans les tableaux I, II, III et IV.

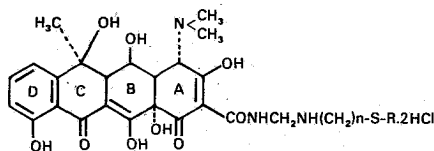
TABLEAU II: *N*-(alcoylthio alcoylaminométhyl)-chlorotétracyclines.

(III)

R	n	Rd. %	(a) N° du produit	Formule brute	F ^o C (b)	Analyse					
						Calc %			Tr. %		
						C	H	N	C	H	N
CH ₃	2	80	T.4519	C ₂₆ H ₃₄ Cl ₂ N ₃ O ₈ S	201-203	47,68	5,23	6,42	47,37	5,52	6,18
C ₂ H ₅	2	74	T.4520	C ₂₇ H ₃₆ Cl ₂ N ₃ O ₈ S	202-205	48,47	5,42	6,28	47,99	5,41	6,04
(CH ₂) ₃ CH ₃	2	64	T.4521	C ₂₉ H ₄₀ Cl ₂ N ₃ O ₈ S	216-218	49,97	5,78	6,03	49,98	6,03	5,92
(CH ₂) ₄ CH ₃	2	77	T.4522	C ₃₀ H ₄₂ Cl ₂ N ₃ O ₈ S	208-210	50,67	5,95	5,91	50,50	6,02	6,14
(CH ₂) ₅ CH ₃	2	68	T.4523	C ₃₁ H ₄₄ Cl ₂ N ₃ O ₈ S	214-217	51,35	6,12	5,80	50,99	5,74	5,68
CH ₃	3	74	T.4510	C ₂₇ H ₃₆ Cl ₂ N ₃ O ₈ S	219-221	48,47	5,42	6,28	49,00	5,78	6,03
C ₂ H ₅	3	76	T.4511	C ₂₈ H ₃₈ Cl ₂ N ₃ O ₈ S	212-214	49,24	5,61	6,15	48,91	6,02	5,86
(CH ₂) ₂ CH ₃	3	78	T.4512	C ₂₉ H ₄₀ Cl ₂ N ₃ O ₈ S	234-236	49,97	5,78	6,03	49,93	5,64	5,79
CH(CH ₃) ₂	3	71	T.4513	C ₂₉ H ₄₀ Cl ₂ N ₃ O ₈ S	226-228	49,97	5,78	6,03	49,62	6,03	5,82
(CH ₂) ₃ CH ₃	3	52	T.4514	C ₃₀ H ₄₂ Cl ₂ N ₃ O ₈ S	242-244	50,67	5,95	5,91	50,35	5,75	5,98
(CH ₂) ₄ CH ₃	3	68	T.4517	C ₃₁ H ₄₄ Cl ₂ N ₃ O ₈ S	229-231	51,35	6,12	5,80	50,97	5,68	5,64
(CH ₂) ₅ CH ₃	3	45	T.4518	C ₃₂ H ₄₆ Cl ₂ N ₃ O ₈ S	244-246	52,00	6,27	5,69	51,57	5,93	5,72

(a) Rendement en dichlorhydrate.

(b) Les points de fusion ont été pris dans un appareil de Buchi et ne sont pas corrigés (recristallisation dans un mélange éthanol abs. - éther abs.).

TABLEAU III: *N*-(alcoylthio alcoylaminométhyl)-oxytétracyclines

(iii)

R	n	Rd. ^(a) %	N ^o du produit	Formule brute	F ^o C ^(b)	Analyse					
						Calc. %			Tr. %		
						C	H	N	C	H	N
CH ₃	2	83	T.4531	C ₂₈ H ₃₈ Cl ₂ N ₃ O ₉ S	220-222	49,06	5,54	6,60	49,41	5,99	6,40
C ₂ H ₅	2	91	T.4532	C ₂₇ H ₃₇ Cl ₂ N ₃ O ₉ S	224-226	49,85	5,73	6,46	50,13	5,68	6,30
(CH ₂) ₃ CH ₃	2	81	T.4533	C ₂₉ H ₄₁ Cl ₂ N ₃ O ₉ S	228-230	51,33	6,09	6,19	51,40	6,15	6,28
(CH ₂) ₄ CH ₃	2	80	T.4534	C ₃₀ H ₄₃ Cl ₂ N ₃ O ₉ S	232-234	52,02	6,26	6,07	52,27	6,26	5,82
(CH ₂) ₅ CH ₃	2	74	T.4535	C ₃₁ H ₄₅ Cl ₂ N ₃ O ₉ S	225-227	52,69	6,42	5,95	53,08	6,30	6,32
CH ₃	3	73	T.4536	C ₂₇ H ₃₇ Cl ₂ N ₃ O ₉ S	223-225	49,85	5,73	6,46	50,30	5,27	6,22
C ₂ H ₅	3	79	T.4537	C ₂₈ H ₃₈ Cl ₂ N ₃ O ₉ S	229-231	50,60	5,92	6,32	50,60	5,81	6,16
(CH ₂) ₂ CH ₃	3	79	T.4538	C ₂₈ H ₄₁ Cl ₂ N ₃ O ₉ S	236-238	51,33	6,09	6,19	51,83	5,72	5,98
CH(CH ₃) ₂	3	81	T.4539	C ₂₈ H ₄₁ Cl ₂ N ₃ O ₉ S	235-237	51,33	6,09	6,19	51,45	5,71	5,84
(CH ₂) ₃ CH ₃	3	83	T.4540	C ₃₀ H ₄₃ Cl ₂ N ₃ O ₉ S	227-229	52,02	6,26	6,07	51,57	5,93	5,70

(a) Rendement en dichlorhydrate.

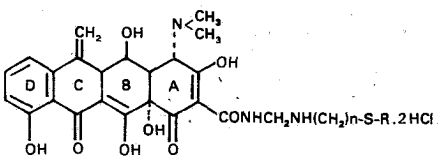
(b) Les poids de fusion ont été pris dans un appareil de Buchi et ne sont pas corrigés (recristallisation dans un mélange éthanol abs. - éther abs.).

Spectres

Les spectres IR ont été faits soit en dispersant les composés dans le Nujol soit sous forme de pastille dans le KBr. Les spectres obtenus ont été comparés à celui de la morpholine-méthyl-tétracycline qui a été étudiée par W. Gottstein et coll.⁽³⁾

Les spectres des composés obtenus donnent, d'une manière semblable, une double bande vers 6,53 μ et 6,58 μ qui est caractéristique de l'amide monosubstitué. Par ailleurs, on n'observe pas de différence entre les tétracyclines et nos produits en ce qui concerne les bandes OH et NH qui apparaissent vers 3 μ .

TABLEAU IV: *N*-(alcoylthio alcoylaminométhyl)-méthacyclines.



(vi)

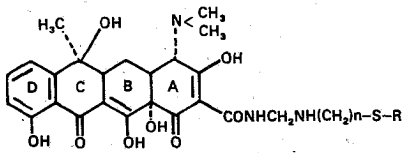
R	n	Rd. %	N° du produit	Formule brute	F ^o C ^(b)	Analyse					
						Calc. %			Tr. %		
						C	H	N	C	H	N
CH ₃	2	63	T.4598	C ₂₈ H ₃₃ Cl ₂ N ₅ O ₈ S	238-240	50,49	5,38	6,79	51,00	5,34	6,88
C ₂ H ₅	2	93	T.4599	C ₂₇ H ₃₂ Cl ₂ N ₅ O ₈ S	244-246	51,27	5,58	6,64	51,48	6,00	6,51
(CH ₂) ₂ CH ₃	2	51	T.4600	C ₂₈ H ₃₃ Cl ₂ N ₅ O ₈ S	241-243	52,73	5,95	6,36	53,18	5,63	6,21
(CH ₂) ₄ CH ₃	2	63	T.4601	C ₃₀ H ₄₁ Cl ₂ N ₅ O ₈ S	249-251	53,41	6,13	6,23	52,99	5,79	6,12
(CH ₂) ₆ CH ₃	2	58	T.4602	C ₃₁ H ₄₃ Cl ₂ N ₅ O ₈ S	256-258	54,07	6,29	6,10	54,53	6,04	5,83
CH ₃	3	68	T.4603	C ₂₇ H ₃₀ Cl ₂ N ₅ O ₈ S	235-237	51,27	5,58	6,64	50,91	5,36	6,49
C ₂ H ₅	3	56	T.4604	C ₂₈ H ₃₁ Cl ₂ N ₅ O ₈ S	238-240	52,01	5,77	6,50	52,42	5,42	6,38
(CH ₂) ₂ CH ₃	3	78	T.4605	C ₂₈ H ₃₃ Cl ₂ N ₅ O ₈ S	244-246	52,73	5,95	6,36	53,10	6,04	6,01
CH(CH ₃) ₂	3	69	T.4606	C ₂₈ H ₃₃ Cl ₂ N ₅ O ₈ S	241-243	52,73	5,95	6,36	52,48	6,00	6,24
(CH ₂) ₃ CH ₃	3	70	T.4607	C ₃₀ H ₄₁ Cl ₂ N ₅ O ₈ S	245-247	53,41	6,13	6,23	53,84	5,77	6,12

(a) Rendement en dichlorhydrate.

(b) Les poids de fusion ont été pris dans un appareil de Buchi et ne sont pas corrigés. (recristallisation dans un mélange éthanol abs. - éther abs.).

Partie Pharmacologique.

Parmi les produits obtenus les six suivants ont été soumis à une étude préliminaire afin d'en révéler leur action anti-microbienne et leur toxicité:



(i)

N°	n	R
T. 4504	2	CH ₃
T. 4505	2	C ₂ H ₅
T. 4506	2	CH(CH ₃) ₂
T. 4507	2	nC ₄ H ₉
T. 4508	3	CH ₃
T. 4509	3	CH(CH ₃) ₂

b) Examen de toxicité

Technique

Pour chaque substance étudiée on a utilisé cinq (5) petites souris blanches d'un poids qui varie de 18 à 25g. On leur administre par voie intraveineuse 1 mg de substance (soit 0,5 ml de solution dans l'eau contenant 2 mg/ml) et par la suite on les met sous surveillance.

Résultats.

Tous les animaux ont bien supporté la dose administrée des produits à étudier. L'étude pharmacologique se poursuit.

Remerciements

Nous remercions vivement le docteur Monsieur N. Tzamouranis de l'Institut Pasteur d'Athènes, qui a bien voulu effectuer pour nous l'étude préliminaire microbiologique de la 1ère série des produits préparés. Nos remerciements vont aussi à Mlle Carmen Nieto pour l'aide technique apportée à une partie de ce travail.

Abstract

Novel Mannich bases derived from certain tetracyclines

The author report the synthesis of new Mannich bases of tetracycline, chlorotetracycline, oxytetracycline and methacycline. These products are prepared from suitable tetracycline, formaldehyde and different cysteamines and homocysteamines. Some of these products were submitted to pharmacological evaluation for their antimicrobial action and toxicity.

Compared with tetracycline they showed a significant antimicrobial action and low toxicity.

The pharmacological student is continued.

Περίληψη

Παρασκευή μερικῶν νέων παραγῶγων τετρακυκλίνης με τήν αντίδραση Mannich.

Εἰς τήν ἐργασίαν αὐτήν παρασκευάζονται νέα προϊόντα δι' ἐφαρμογῆς τῆς ἀντιδράσεως Mannich ἐπὶ τῆς ἀμιδικῆς ὁμάδος τῆς τετρακυκλίνης, χλωροτετρακυκλίνης, ὀξυτετρακυκλίνης καὶ μεθακυκλίνης. Ἐπὶ τῶν ἀνωτέρω τετρακυκλινῶν, ἐπιδρῶμεν μέ διαφόρους κυστεαμίνας καὶ ὁμοκυστεαμίνας παρουσία φορμαλδεϋδης, ὅτε λαμβάνονται αἱ ἀντίστοιχοι βάσεις τοῦ Mannich. Προϊόντα τῆς σειρᾶς τῆς τετρακυκλίνης ὑπεβλήθησαν εἰς φαρμακολογικὴν μελέτην, πρὸς ἔλεγχον τῆς τοξικότητός των, ὡς καὶ τυχόν ἀντιμικροβιακῆς δράσεως, ἐν συγκρίσει πρὸς ὑδροχλωρικὴν τετρακυκλίνην.

Τά ἀποτελέσματα ἔδειξαν ὅτι τά παράγωγα ταῦτα εἶχον ἀντιμικροβιακὴν

δράσιν ἐφάμιλλον τῆς ὕδροχλωρικής τετρακυκλίνης καὶ συγχρόνως ἦσαν καλῶς ἀνεκτά ὑπὸ τῶν πειραματοζώων. Ὁ φαρμακολογικός ἔλεγχος συνεχίζεται.

Bibliographie.

1. Barret, G.: *J. Pharm. Sci.*, **52**, 309, (1963).
2. Booth, J.H.: *Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 1962. Am. Soc. for Microbiol. Ann Arbor, 1963, p.213.*
3. Siedel, W. Söder, A., Lindner, F.: *Münch.Med.Wochschr.* **100**, 661, (1958).
4. Lindner, F., Siedel, W., Söder, A.: *Union of South Africa pat.* 3169 (1967).
5. Gottstein, W., Minor, W., Cheney, L.: *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 1198 (1959).
6. Wieland, T., Moëller, E., Dieckelmann, G.: *Chem. Ber.*, **85**, 1035, (1952).
7. Hurd, G., Gershheim, L.: *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2328, (1947).
8. Cheney, L., Risser, W., Gottstein, W.: *U.S.Pat.* 3,104, 240, *Chem. Abstr.*, **60**, 5425d (1964).
9. Tsatsas, G., Sandris, C., Kontonassios, D.: *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1964 p. 3100.
10. Lambrou, D., Tsatsas, G.: *Ann. Pharm. Franç.*, **32**, 295, (1974).
11. Tsatsas, G., Sandris, C., Kontonassios, D.: *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1963, p. 2160.
12. Kjaer, A., Marcus, F., Conti, J.: *Acta Chem. Scand.* **7**, 1370 (1953).
13. Lambrou, D.: Thèse des sciences (section Pharmacie); Université d' Athènes, p. 27, 1967.

HYDROGEN ION REACTION AT THE MERCURY-ELECTRODE

ANA MEDVED

Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Technology, University of Zagreb, Yugoslavia.

(Received March 3, 1980; Revised November 20, 1980).

Summary

A new theory of the hydrogen ion reduction is introduced, based upon the principle of electrochemical reactions of the second order². Such a principle has proved applicable for other electrochemical systems as well, and has enabled the interpretation of the course of polyelectronic processes otherwise noninterpretable by the usual stepwise mechanisms¹.

Key words: "Electrode Reaction Kinetics of Hydrogen".

Introduction

The problem of the electrochemical hydrogen evolution, is a problem of paramount importance for many practical systems. It was the object of numerous investigations and much work has been expended for the establishment of an accurate theory describing the kinetics of the electrode reaction. Of the numerous theories which have been proposed to explain the overtension of hydrogen, there are three theories contained in the textbooks at this moment³.



a) The catalytical theory developed by Tafel, presumes reaction (2) as rate determining.

b) According to the slow electron transfer theory, the rate determining step is

the first reaction; This theory was particularly determined by Erdey-Gruz and Volmer, and further developed by Frumkin.

c) The electrochemical theory, is due principally to Volmer and Heyrovsky. It presumes the discharge of hydrogen through an intermediary ion-molecule, i.e. reaction (4) and (5) as rate determining.

The equations describing the kinetics of the hydrogen electrode process in the literature are also consistent with such reaction courses. Except the known Tafel equation, the relevant mathematical formulae contain parameters such as the transfer coefficient α , the ψ -potential concerning the structure of the double layer i.e. the value of the potential at a distance of the ionic radius from the electrode, or the function $F(X)$ in the equation derived by Koutecky⁸, and several other variations of the mathematical modes concerned with the relation between the velocity of the electrochemical reaction and the activation energy. Several of such equations make use of certain approximations leading to satisfactory results for certain systems and electrodes, but they are not showing agreement in the results when applied with data obtained under different experimental conditions. This fact and other parts of evidence suggest that the reduction of hydrogen may occur in a different way.

The setting up of the theory was not arbitrary. The presumption that the rate determining step was a reaction of the second order resulted from experimental observations of a second hydrogen wave, and the corresponding calculations of the free energy change. Since the whole process of the hydrogen evolution must obey the law of the lowest energy consumption, the hydrogen ion, on receiving the first electron and lacking the possibility of stabilization with neighboring atoms, will take up a second electron, forming thereby a hydride ion:



with the E^0 values expressed v.s S.C.E. The hydride ion or the alkaline hydride formed at the surface of the electrode, may react subsequently by a spontaneous proportionation reaction with neighboring hydrogen ions. The reaction being spontaneous, energy is set free, and a prewave is formed:



By such a course of the electrode reaction, the overall reaction energy is lowest, particularly for mercury electrodes, because of their structure. Mercury, being a liquid, does not contain holes at the surface, as other metals in their crystal lattice, wherein the ions can be incorporated with a lowering of the activation energy. On mercury the atomic hydrogen takes up a second electron, lowering thus the activation energy for half of the H^+ ions reacting at the surface.

The corresponding expression describing the kinetic was derived previously⁶. The following text contains a presentation of its application on the experimental results obtained in this work.

Experimental

The measurements were performed with a polarograph PO 4 "Radiometer" Copenhagen. The investigation being concerned with a process on the surface of

the electrode, a scrupulously clean mercury was a prerequisite, and according the purification was done with great care.

The Hg was purified firstly in a "Mercury oxidizer" by bubbling air trough it and then followed a chemical purification. It consisted in boiling small portions of Hg with 25% NaOH, washing with water, whereupon the Hg was dispersed trough a 2m column filled with hot 10% HNO₃, collected again and washed thoroughly with water. The principal purification was the thrice repeated distillation of Hg. The threeply distilled mercury had a bright surface and did not form ring sediments on glass containers.

The Hg-electrode had the following characteristics: $m = 1.59 \text{ mg s}^{-1}$, $t = 5.37 \text{ s}$, in 10^{-1} M KCl , at a potential of 0 V vs. S.C.E. The temperature was $25 \pm 0.2^\circ \text{ C}$.

The water used for the preparation of the solutions was threeply distilled. LiCl and N(CH₃)₄-salts were used as supporting electrolytes, because of their very negative reduction potential (-3.20 V vs. S.C.E.), which enabled the observation of the hydrogen wave. All chemicals were of reagent grade purity.

Results

Figures 1 and 2 show the results from solutions of HCl, without and with a supporting electrolyte. Polarograms of the supporting electrolyte are shown for comparison in Fig. 3.

There are two reduction waves of the H⁺ ion formed during the electrode reaction. In pure solutions of the acid, the separate waves are slightly indicated, forming a merging wave at very negative potentials. By the addition of the supporting electrolyte both waves become visible. The first wave in such solutions is observed at -1.6 V and the second at -2.5 V . Fig. 4. shows that the height of the

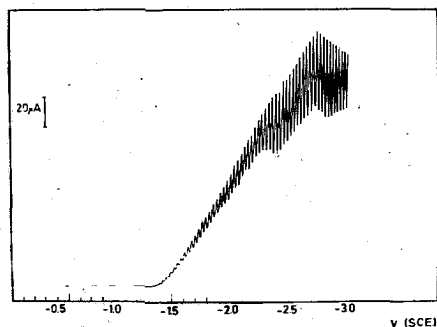


FIG. 1. A polarographic wave of 10^{-3} M HCl .

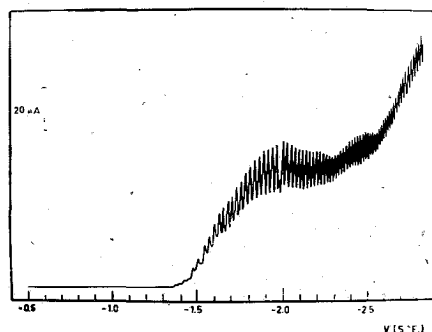


FIG. 2. A polarographic wave of 4.10^{-3} M HCl in 10^{-2} M LiCl .

waves is not parallel to the number of electrons corresponding to the reaction, but depends upon the ratio of the HCl-LiCl concentrations. From Figure 7 it can be discerned the instantaneous current-time dependance. For the small wave:

$$i = \text{const. } t^{2/3} \text{ (kinetically controlled)}$$

The surface active ions in the solution exert a great influence upon the current. A wave recorded with HClO_4 instead of HCl does show a current almost 50 % greater than the current recorded in the solution containing the surface active Cl^- ions. (Fig. 4. e) and d.). However, each difference in the current intensity is paralleled by a shift of the $E_{1/2}$, with a compensating effect for the rate constant calculations.

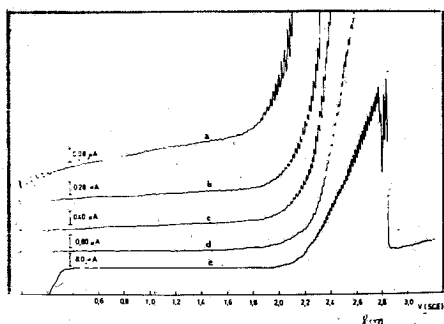


FIG. 3. Polarographic waves of:

- a) 10^{-2} M LiCl
- b) " "
- c) " "
- d) " "
- e) 10^{-3} M LiCl + 0.3 M $\text{N}(\text{CH}_3)_4\text{J}$

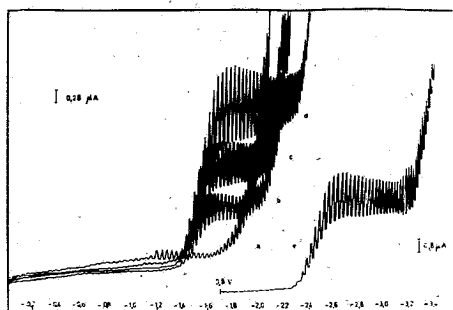


FIG. 4. A polarographic wave of

- a) $4 \cdot 10^{-4}$ M HCl + 1 M LiCl
- b) " " + 10^{-1} M LiCl
- c) " " + 10^{-2} M LiCl
- d) " " + 10^{-3} M LiCl
- e) $4 \cdot 10^{-4}$ M HCl 0_3 + 10^{-2} M LiCl

The tetramethylammonium iodide as supporting electrolyte enabled the formation of a more distinct second wave of the hydrogen ion reaction, visible on Figure 5.

Numerous scientific works have mentioned the first hydrogen wave, whereas the second wave was not previously observed, either because the investigators worked with too small or too great concentrations, or because of the sluggishness of the penrecording polarographs used for measurements⁵.

Preceding electrode reactions can also alter the height of the first wave by increasing or decreasing it, e.g. when the solution contained the TI^+ ions of a sufficient concentration, the first hydrogen wave disappeared. With increased

concentrations of the H^+ ions, the hydrogen wave became visible again.

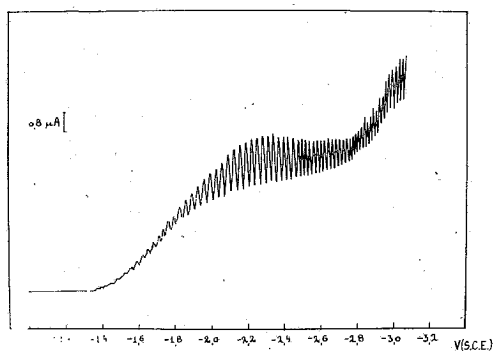


FIG. 5. A polarographic wave of $4 \cdot 10^{-3}$ M HCl in 10^{-3} M $N(CH_3)_3$.

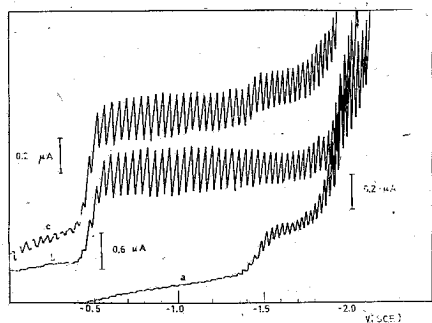


FIG. 6. Polarographic waves of:

- 10^{-4} M HCl
- 10^{-4} M HCl + $4 \cdot 10^{-4}$ M $TiNO_3$
- 10^{-4} M HCl + 10^{-4} M $TiNO_3$

The solutions contained 10^{-1} M LiCl as supporting electrolyte.

Similar effects are mentioned in the literature⁵, whereby the opposite effect was also observed, i.e. a facilitation of the H^+ reduction by preceding electrode reactions.

The results of measurements with the D.C. polarographic technique have indicated doubtlessly a reaction at the surface of the electrode as rate determining. For a distinction of the separate steps of such a reaction, the measurements of the time dependence of the instantaneous current seemed promising.

Therefore such measurements were carried out with a Hewlett-Packard x-t recorder Model 680. The current-time diagrams shown on Figure 7, were recorded at different potentials corresponding the polarogram on Figure 2.

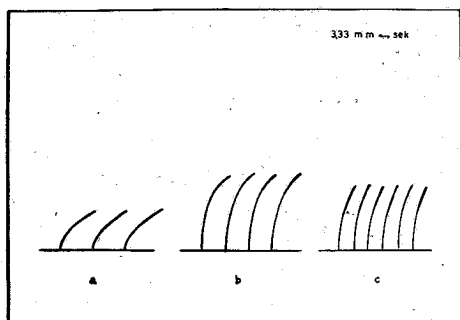


FIG. 7. *i-t* diagrams corresponding the polarographic wave on Figure 2.

- a) Recorded at $-1,50$ V vs S.C.E.
 b) Recorded at $-2,00$ V vs S.C.E.
 c) Recorded at $-2,30$ V vs S.C.E.

- a) A potential at the rise of the first hydrogen wave ($-1,5$ V).
 b) A potential corresponding the limiting current of the first hydrogen wave ($-2,0$ V).
 c) A potential corresponding the small second hydrogen wave at ($-2,3$ V).

The evaluation of the instantaneous current-time dependance gave the following results:

- a) $i = k \cdot t^{3/5}$ (diffusion-kinetic wave)
 b) $i = k \cdot t^{2/5}$ (diffusion-kinetic wave)
 c) $i = k \cdot t^{2/3}$ (kinetic wave)

The exponents are indicating a diffusion-kinetically controlled current. The difference of the exponents at the rise and the plateau of the first wave is reflecting a different occupancy of the sites upon the surface of the electrode (other factors influencing the current being constant). The exponents are indicating that $3/5$ of the sites are occupied by Li^+ ions, and $2/5$ of the sites by H^+ ions. Accordingly the following array of ions upon the electrode can be postulated:



The transfer of electrons, concerning the optimal energy effect may occur either by a **successive** transfer of two electrons from the electrode surface upon the H^+ ions, or by a tangential, **simultaneous** transfer of electrons by the aid of the neighboring Li^+ ion. The corresponding free energy changes are:

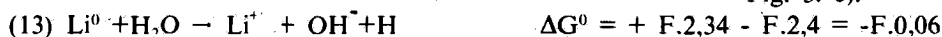
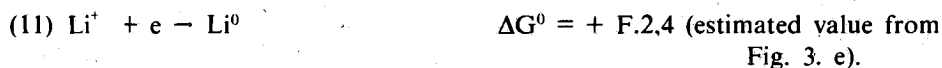
- (9) $\text{H}^+ + 2 e \rightarrow \text{H}^-$ $\Delta G^0 = + F.2,34 + F. 3,17 = + 2.F.2,75$
 (6) $\text{H}^+ + e \rightarrow \text{H}$ $\Delta G^0 = + F.2,34$
 (10) $\text{H}^+ + e \rightarrow 1/2 \text{H}_2$ $\Delta G^0 = + F.1,50$
 (11) $\text{Li}^+ + e \rightarrow \text{Li}^0$ $\Delta G^0 = + F.2,32^{11}$ (approximate value)
 (12) $\text{Li}^0 + \text{H} \rightarrow \text{Li}^+ + 1/2\text{H}_2$ $\Delta G^0 = + F.1,50 - F.2,32 = -F.0,82$

When the transfer of electrons occurs by the mediation of Li^+ ions, the energy gain $\Delta G^0 = -F.0,82$ enables the reduction of the H^+ ions already at a potential of:

$$-2,34 \text{ V} + 0,82 \text{ V} = -1,52 \text{ V}$$

for half of the H^+ ions present upon the surface of the electrode. The other half of the H^+ ions would cause a wave at a potential of $-2,34 \text{ V}$, if the wave of Li^+ would not overlap it. However with smaller concentrations of Li^+ ions in the solution, the wave at $-2,34 \text{ V}$ does begin to appear (see small prewave, Fig. 4, d and e), indicating a transfer of the electrons not from the Li^+ , but from the electrode onto the H^+ ions. Thereby the previously described overall reaction 8 is enabled.

The polarographic wave of the carrier electrolyte LiCl (Fig. 3. a,b,c,d,) is showing that no wave preceding the Li^+ wave is formed when the H^+ ions are not present in the solution. The LiCl wave recorded with $(\text{N}(\text{CH}_3)_4)_2\text{J}$ as supporting electrolyte does show a maximum ceasing at a potential of $-2,75 \text{ V}$. Such experimental evidence is indicating the following mechanism of the Li^+ reduction:



Reaction (13) occurs spontaneously, giving as products atomic hydrogen, Li^+ and OH^- ions. Such ions alternatively arrayed upon the surface of the electrode are causing an increase of the surface tension resulting in the polarographic maximum¹⁰. At a potential of $-2,75 \text{ V}$, reaction (9) sets in, and the disproportionation reaction of Li^0 ceases.

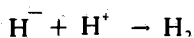
The described reduction of Li^+ ions is accordingly a reduction of H^+ ions from water molecules until the potential of the direct hydrogen reduction is reached.

Kinetics

The reaction velocity law, consistent with the course of the electrochemical reaction described above, was derived previously:⁶

$$I^{1/2} = n.F.C.K_s.10^{-nF/2,3 R.T.2 (E_s - E + 0,0592 \log c_{\text{H}^+})}$$

The equation is corresponding the rate determining, second order reaction of proportionation:



The notation has the following significance:

I = the current density

n = the effective number of electrons (1 electron $\cdot 2/5$ of the sites upon the surface of the electrode = 0,4 electrons effectively.

C = the concentration of the H^+ ions in the bulk of the solution.

K_s = the standard rate constant, corresponding the E_s potential, i.e. the $E_{1/2}$ of the prewave at $-2,34 \text{ V}$, formed without the mediation of the Li^+ ions.

E_s = the potential of the small prewave $-2,34 \text{ V}$.

$E =$ The half-wave potential of the hydrogen evolution, with different concentrations of Li^+ ions in the solution, or with different concentrations of the H^+ ions in the solution.

$c_{\text{Li}^+} =$ the concentration of the supporting electrolyte LiCl , influencing the energy of activation.

The standard velocity constants have been calculated from experimental data inserted in the next table.

c M HCl	c M LiCl	$E_{1/2}$ V	I μA	I $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$	K_s $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$
$4\cdot 10^{-3}$	10^{-2}	-1.56	3.72	112.8	$6.0\cdot 10^{-3}$
$4\cdot 10^{-3}$	10^{-1}	-1.50	1.20	36.4	$3.4\cdot 10^{-3}$
$4\cdot 10^{-3}$	10^{-1}	-1.51	2.07	62.8	$4.8\cdot 10^{-3}$
$4\cdot 10^{-3}$	1				no wave
$4\cdot 10^{-3}$	1	-1.46	34.00	1030.0	$2.1\cdot 10^{-3}$
$8\cdot 10^{-3}$	$1.6\cdot 10^{-1}$	-1.56	7.20	218.2	$7.4\cdot 10^{-3}$
$2\cdot 10^{-3}$	10^{-2}	-1.53	2.10	63.7	$7.4\cdot 10^{-3}$
$4\cdot 10^{-3}$	10^{-2}	-1.55	6.00	181.9	$7.0\cdot 10^{-3}$
$6\cdot 10^{-3}$	10^{-2}	-1.64	5.79	175.4	$9.2\cdot 10^{-3}$

The values of the velocity constants are concurring, although the half-wave potentials and the limiting currents vary considerably with different concentrations of either H^+ ions or Li^+ ions.

Discussion

The systematic study of the electrochemical reaction of hydrogen upon the Hg-electrode, described in this work, did bring about the clarification of its course and did enable the calculation of kinetical parameters, indicating thereby the causal connection between the overpotential, the composition of the solution and the structure of the electrode.

The kinetical expression derived from the knowledge of the reaction course, has the advantage over other theories, by establishing the proper physical significance for every kinetical parameter. When inserting the E_0 value instead of E , the expression is of the type:

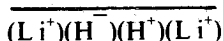
$$n = \text{const.} + b \log / I - /$$

where b is $-2.3 RT/0.4 F$. The value 0,4 does not represent a thermodynamically nondefined transfer coefficient, as with other theories, but is clearly defined as the number of electrons transferred effectively per each hydrogen ion reacting at the electrode.

The value of the coefficient b , calculated with $n = 0,4$ electrons, is 0,147. Such a

value is in excellent agreement with the value of the coefficient b for Hg-electrodes, as cited by J. O'M. Bockris⁷. The resulting equilibrium current I_0 is of the order of value $10^{-6} - 10^{-9}$ A.cm⁻², in accordance with the values resulting from the electrochemical theory³.

However, the electrode reaction steps proposed by other scientists can not produce the effects distinguished by the instantaneous current-time measurements. They are showing a significant, abrupt decrease of the drop size at potentials corresponding the second hydrogen wave (Figure 7.c). The negative polarization of the Hg-electrode does cause a small continual decrease of the drop size, however a discontinuous decrease of the drop size is indicative of a new step in the reaction course. For the investigated system it means a cessation of the alternating array of (+) and (-) particles adhering the surface of the electrode after the reaction (8):



leaving the particles of the same charge influencing the surface tension, decreasing thereby the drops. Such effects can not be produced by a simple reduction of Li^+ ions or by adsorption (the exponent of the $i-t$ diagram did not indicate adsorption). Such effects, along with the concurring values of the velocity constants, are proving the assumed reaction course.

Consequently, by the introduction of the proportionation principle in the electrochemical kinetics, the differences between the various approaches might be solved, and a generally valid theory obtained, applicable when the overpotential of the system is caused either by the structure of the electrode, or by complex formation in the solution.

Περίληψη

Αντίδραση Ιόντος υδρογόνου σέ ηλεκτρόδιο υδραργύρου

Εισάγεται μιά καινούργια θεωρία για τήν αναγωγή του ιόντος υδρογόνου, βασισμένη στην αρχή των ηλεκτροχημικών αντιδράσεων δευτέρας τάξεως. Μιά τέτοια αρχή αποδείχθηκε εφαρμόσιμη για άλλα ηλεκτροχημικά συστήματα και μπορεί νά ερμηνεύσει τήν πορεία πολυηλεκτρονικών διαδικασιών πού δέν ερμηνεύονται μέ τούς συνηθισμένους διαδοχικούς μηχανισμούς.

References

1. Heyrovský, J. & Kuta, J.: "Principles of Polarography", Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, Prague and the Academic Press, New York, 1966.
2. Medved, A.: *Monatsh. Chem.*, **109**, 263 (1978).
3. Milazzo, G.: "Electrochemistry", Elsevier Publishing Co., New York, 1963.
4. Latimer, W. M.: "Oxidation Potentials", Prentice-Hall Inc., New York, 1953.
5. Brezina - Zuman: "Die Polarographie in der Medizin, Biochemie und Pharmazie", Akademische Ver-

- lagsgesellschaft, Leipzig, 1956.
6. Medved, A.: Extended Abstracts of the 29th Meeting of I S E, Budapest, 1978.
 7. O'M. Bockris, J.: *Trans. Faraday Soc.*, **43**, 417 (1947).
 8. Koutecký, J.: *Coll. Czech. Chem. Commun.* **18**, 311, (1953).
 9. Milazzo, G. & Caroli, S.: "*Tables of Standard Electrode Potentials*", J. Willey & Sons, London 1978.
 10. Medved, A.: *Monatsh. Chem.*, **111**, 423 (1980).
 11. Kolthoff, I.M. & Lingane, J.J.: "*Polarography*", Interscience Publishers Inc., New York, 1952.

ISOLATION AND PURIFICATION OF A GENTAMICIN-ACETYTRANSFERASE AND A GENTAMICIN-ADENYLYLTRANSFERASE CODED BY THE PLASMID PK 237

FEVRONIA ANGELATOU*, SPYRIDON B. LITSAS and POLYXENI KONTOMICHALOU
University of Athens, School of Medicine, Department of Clinical Therapeutics, Alexandra Hospital, Athens (Greece).

Revised October 8, 1981. (Received December 29, 1980):

Summary

Gentamicin-acetyltransferase and gentamicin-adenylyltransferase were obtained by sonication of *E. coli* K12 cells carrying the plasmid PK 237 originating from a gentamicin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. A 126 fold purification was achieved for the gentamicin-acetylating enzyme by using ammonium sulfate fractional precipitation, ion-exchange chromatography and affinity chromatography. The gentamicin-adenylylating enzyme was purified by affinity chromatography after ammonium sulfate fractionation. Evidence for the purity of the two enzymes was provided by disc electrophoresis. Substrate profiles of both enzymes indicated the gentamicin-acetylating enzyme as AAC(3)I and the gentamicin-adenylylating as AAD(2''). The aminoacid composition of the gentamicin-acetyltransferase is different from that of AAC(3)I purified by other workers.

The gentamicin-adenylylating enzyme is also different from the AAD (2') purified by others, with respect to its high instability in purified form and its dependance on Mg^{++}

Key words: Enzyme purification, Plasmids, Resistance to Gentamicin

Introduction

Since 1965, when the aminoglycoside modifying enzymes were described for the first time (1) in R^+ bacterial strains extracts, the number of this group of enzymes, which have been detected in bacteria resistant to the aminoglycosides, has

* Present address: University of Patras, Department of Physiology, Medical School, Patras Greece.

increased tremendously.

The interest in aminoglycoside modifying enzymes has become greater since their stable preparations can be used in the clinical laboratories for rapid, specific assays of aminoglycosides in body fluids. The study of the properties of such enzymes can be instrumental towards our understanding of the inhibitory mechanisms against these enzymes.

In 1973, at our hospital, high level gentamicin resistant *Pseudomonas* strains from urine isolates appeared, carrying multiresistant plasmids (2). We have shown that plasmid PK 237 codes for two gentamicin-modifying enzymes, gentamicin-acetyltransferase and gentamicin-adenylyltransferase. Since few of these enzymes have been purified to homogeneity (3) we tried to purify the two enzymes and study their properties.

Experimental

Plasmid and host: Plasmid PK 237 originating from a *Pseudomonas aeruginosa* urine isolate was studied in K_{12} host RC85 F⁻ (2).

Antibiotics: Gentamicin C, C₁, C_{1a}, C₂, A, sulfate salts were obtained from Schering Co, Tobramycin from Elli Lilly, Kanamycin A and Dideoxy Kanamycin from Bristol, Neomycin from Upjohn Company, Sisomicin, Butyrocin A and B, and Lividomycin were kindly offered by Prof. S. Mitsuhashi, Gunma University, Tokyo, Japan.

Bacterial cells: they were incubated in Trypticase soya broth (BBL) at 37°C. Cells of overnight cultures were obtained by centrifugation at 7,000g for 15 min at 4° C.

Purification of the enzymes: the cells (1g) were suspended in 5ml of Tris-HCl buffer 10mM pH 7.6 (standard buffer), sonicated for 4' at 1.5mA and centrifuged at 23,000g for 1/2 h.

All purification steps after sonication were performed at +4°C.

The supernatant crude enzyme preparation was fractionated by (NH₄)₂SO₄ precipitation.

Anion exchange chromatography was performed on a DEAE cellulose column 2.1cm X 9cm DE 5.2 (Whatman) equilibrated with standard buffer.

Affinity chromatography was performed on a CH-Sepharose 4B column (Pharmacia) 1cm X 6 cm. 150mg of gentamicin C_{1a} was coupled to 2g of activated CH-Sepharose 4B in the presence of carbodiimide (EDC) (4).

Disc-electrophoresis was conducted in a Canalco electrophoresis apparatus according to the procedure described by Gabriel (5). 7.5% polyacrylamide was used and the glass tubes were 0.5cm X 6cm. The electrophoresis was run in 0.2 M Trisglycine buffer pH 8.3 for 2.5 hours and 3mA per tube.

Enzymatic radioassay was performed according to the technique of Benveniste and Davies (6), slightly modified. For the acetylating enzymatic activity, [1-¹⁴C] acetylcoenzyme A, 60μci / μmole (Amersham) was used, and for the adenylylating enzymatic activity [8-¹⁴C] ATP. 60μci / μmole (Amersham). The assay technique was as follows: For the acetylating enzyme: 2 nmoles of substrate.

2 nmoles of 1^{-14}C -acetyl coenzyme A, 1.2 μmoles of Tris HCl pH 7.8, 0.18 μmoles of MgCl_2 , 50 nmoles of dithiothreitol, and 40 μl of enzyme containing 0.03-0.12 enzymatic units. Total volume was 120 μl and incubation at 37°C. For the adenylylating enzyme: 2 nmoles of substrate, 2 nmoles of 8^{-14}C -ATP, 2 μmoles of Tris HCl pH 7, 0.24 μmoles of MgCl_2 , 50 nmoles of dithiothreitol, and 40 μl of enzyme containing 0.03-0.12 enzymatic units. Total volume was 120 μl and incubation at 37°C. 1 unit of enzyme is the amount of enzyme which modifies 1 μmole of substrate in 1 hour (15).

Aminoacid analysis: the purified enzyme was dialyzed against distilled water, concentrated by lyophilisation and hydrolysed in 6N HCl at 105°C for 24 hours in evacuated glass tubes (7). The analysis of the sample was conducted using a Beckman aminoacid-analyser.

Protein determinations were made by absorption at 280 nm or by the method of Lowry (8).

Results and Discussion

The two gentamicin-modifying enzymes, an acetyltransferase and an adenylyltransferase, coded by the single plasmid PK 237 and detected in the crude enzyme preparation (9) were studied for substrate profile using fourteen aminoglycosides. Comparison with the substrate profile of the gentamicin-acetyltransferase characterized by Smith et al (10) and Brzezinska et al (11) allow us to assign our own enzyme to gentamicin-acetyltransferases AA(3)I (Table I). The substrate profile using the same aminoglycosides for the gentamicin-adenylylating enzyme, again in comparison with data from gentamicin adenylyltransferases, characterized by Kabins et al (12), and Benveniste and Davies (13) allow us to assign our enzyme to gentamicin adenylyltransferases AAD (2') (Table II).

Purification of the enzymes: The first step of purification uses $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractional protein precipitation of the crude enzyme preparation. The acetylating and most of the adenylylating activity were in the 25%-50% fraction. This fraction was redissolved in the minimum amount of standard buffer and dialysed against the same buffer for 24 hours. Small aliquots of the dialysate were stored at -20°C and used in the next step.

In the second step of purification a good separation of the two enzymes was achieved by elution from a DEAE-cellulose column with a NH_4Cl gradient from 0-0.6 M NH_4Cl in standard buffer. The acetylating enzyme was eluted at 0.15-0.2 NH_4Cl while the adenylylating enzyme at 0.35 M NH_4Cl (Fig. 1).

After the DEAE-chromatography experiment the adenylylating enzyme lost its activity in contrast to the results of Goldman and Northrop (14) for the gentamicin-adenylyltransferase 2' coded by plasmid JR 76.2 that became more stable after purification on DEAE-agarose than in crude preparation.

On the other hand the acetylating enzyme coded by pPK 237, which showed after DEAE-chromatography a 5-fold purification remained stable for many months at -20°C.

TABLE I. Substrate profile of gentamicin acetyltransferases

Substrates		Acetylation relative to gentamicin C _{1a} (%)		
		Crude preparation of <i>E. coli</i> K12+pPK237	Acetyltransferase of <i>Ps. aeruginosa</i> strain 130*	Acetyltransferase of <i>Ps. aeruginosa</i> strain GRJ**
Gentamicin	C _{1a}	100	107	100
»	C	120		
»	C ₁	100	100	
»	C ₂	96	110	
»	A	4,5	9	
Tobramycin		7,2	14	30
Sisomicin		68	128	175
Kanamycin	A	8	0	2
3',4' Dideoxy-Kanamycin	B	39	18	52
Amikacin		1		0
Neomycin		1		0
Lividomycin	A	1		0
Butyrosin	A	1		0
»	B	1		0

* Reference: Brzezinska et al (11)

** » : Smith et al (10)

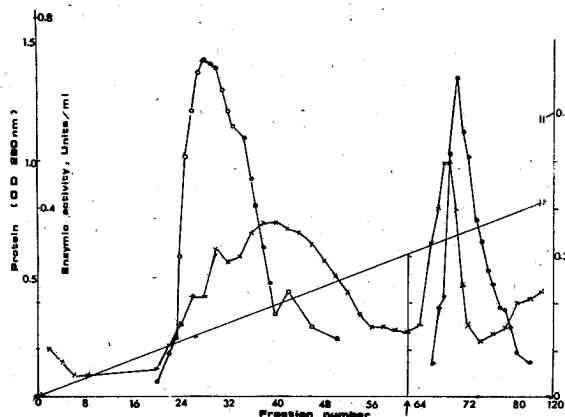


FIG. 1. Chromatography of DEAE cellulose-column (2.1×9 cm). The redissolved 25-50% fraction of ammonium sulfate precipitate, 3.5 ml (100 mg protein) was added on the column. The enzymes were eluted with a linear gradient of ammonium sulfate 0-0.6M in standard buffer. The flow rate was 0.4 ml per minute and the fractions of 5ml volume. The plots represent: (x) = protein (o) = gentamicin-acetylating enzymic activity (●) = gentamicin-adenylating enzymic activity

TABLE II. *Substrate profile of gentamicin adenylyltransferases.*

Substrates		Adenylylation relative to gentamicin C _{1a} (%)		
		Crude preparation of <i>E. coli</i> K12+pPK237	Adenylyltransferase of <i>Ps. aeruginosa</i> strain POW*	Adenylyltransferase of <i>Klebsiella pneumoniae</i> strain 3033* •
Gentamicin	C _{1a}	100	100	107
»	C	39	26	40
»	C ₁	57	30	37
»	C ₂	60		
»	A	86		131
Tobramycin		46	40	
Sisomicin		76	72	
Kanamycin	A	50	33	80
3',4' Dideoxy-Kanamycin	B	33	35	
Amikacin		2.6		
Neomycin		0		
Lividomycin	A	1.4		
Butyrosin	A	1.1		
»	B	1.7		

• Reference: Kabins et al (12)

* * : Benveniste and Davies (13)

The final step for the acetylating enzyme purification was affinity chromatography. The DEAE-chromatography fractions containing the acetylating activity were used after dialysis against standard buffer; a sample of 13ml (2.6mg protein) of the dialysate was applied on a gentamicin C_{1a} CH-sepharose 4B column. Attempts to elute the enzyme from the column by a salt gradient produced a broad peak with the enzyme eluted at a lower salt concentration than most of the inactive proteins. Therefore the elution conditions described by Williams and Northrop (15) were used. First, standard buffer containing 1mM EDTA and 20mM (NH₄)₂SO₄ was used for the elution of the inactive proteins. The acetylating enzyme was eluted as a single sharp peak by lowering the pH of the eluant using potassium acetate buffer 0.1 M pH 4.6 containing 0.1 M (NH₄)₂SO₄. The purification achieved at this step for the acetylating enzyme, was about 10-fold, so that after this step the overall purification was 126 fold with a recovery of 31% (Fig. 2) (Table III).

Disc-electrophoresis of a lyophilised sample of the purified enzyme gave a single band of protein corresponding to the acetylating activity, which was used for aminoacid analysis. The results are shown in Table IV in comparison with the aminoacid analysis of the gentamicin-acetyltransferase I coded by plasmid JR88 purified by Williams and Northrop (15). The differences in the aminoacid

TABLE III. Purification of gentamicin acetyltransferase [AAC(3)] coded by pPK237

Purification step	Total volume (ml)	Protein (mg)	Enzyme activity (total units)	Special activity (units/mg protein)	Purification	Recovery (%)
Crude preparation	200	2200	600	0.272		100
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	20	600	500	0.833	3	83
DEAE-cellulose chromatography	360	67	270	4.029	14	45
Affinity chromatography	62	5.4	186	34	126	31

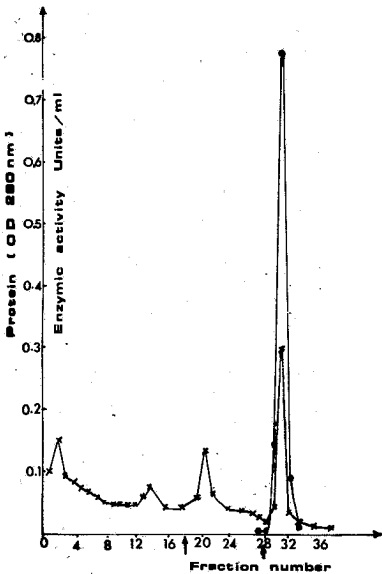


FIG. 2. Affinity chromatography of the gentamicin-acetylating enzyme AAC(3) coded by pPK237 on gentamicin C_{1a}CH - Sepharose 4B column 1×6cm. 13 ml (2.6 mg protein) obtained by the DEAE chromatography step were added on the column. Fractions 1-18 were eluted with standard buffer containing 0.1 mM EDTA, fractions 19-28 with the same buffer containing 20mM (NH₄)₂SO₄ and fractions 29-38 with 0.1 M potassium acetate buffer pH 4.6 containing 0.1 M (NH₄)₂SO₄. The flow rate was 0.4 ml per minute and the volume of the fractions was 2.3 ml. The pH of the samples was immediately corrected to 7-8 with 2M Tris-HCl buffer.

The plots represent:

(x) = protein

(●) = gentamicin-acetylating activity

composition of the two enzymes and especially the absence of proline in our sample shows that the two enzymes are quite different proteins (Table IV).

TABLE IV: Aminoacid composition of gentamicin-acetyltransferase AAC(3)I, coded by plasmid PK 237, in comparison with the aminoacid composition of gentamicin-acetyltransferase I, coded by plasmid JR88 (15).

Aminoacid	Residues per histidine in gentamicin-acetyltransferases coded by.	
	pPK 237	JR 88
Aspartic acid	5.5	6.3
Threonine	7.5	2.8
Serine	11.1	4.3
Glutamic acid	6.7	6.8
Proline	0.0	4.3
Glycine	8.9	5.1
Alanine	4.7	8.0
Valine	3.4	3.0
Isoleucine	2.7	2.6
Leucine	3.9	6.4
Tyrosine	1.1	3.1
Phenylalanine	1.2	2.0
Lysine	5.8	2.4
Histidine	1.0	1.0
Arginine	2.6	3.3
Cysteine	---	3.8
Tryptophane	---	0.1

The properties of the purified acetylating enzyme were: a pH optimum at 7-7.6 and an enhancement of the enzymic activity by 100% in the presence of Ca^{++} or Mg^{++} at a concentration of 1mM. A K_m value of 0.066 mM was determined using gentamicin C_1 as substrate. The purified enzyme is temperature sensitive being drastically inactivated above 40°C. On the other hand it remained stable for many months at -20°C after the DEAE-chromatography step. Therefore it was used in our clinical laboratory for aminoglycosides assays in body fluids (16).

In order to achieve a sufficient purification of the adenylylating enzyme, affinity chromatography on gentamicin C_1 a CH-sepharose 4B was used directly after the ammonium sulfate fractionation. Purification by affinity chromatography of the adenylylating enzyme AAD (2') has not been reported yet. It seems that this enzyme binds very tightly on the gentamicin C_1 a CH-sepharose 4B and is not eluted by high concentrations of salts (14).

In order to purify this enzyme 1ml (24 mg of protein) of the 25-50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction was applied on the affinity column and elution was performed with a KCl 0-0.8 M gradient in standard buffer which elutes the acetylating activity and the bulk of inactive proteins (Fig. 3). The elution of the adenylyltransferase was achieved by lowering the pH of the eluant buffer using potassium acetate pH 4.6 + 0.1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The pH of the samples was immediately corrected to 7-8 by 2 M. Tris HCl buffer. The adenylylating enzyme was eluted free of inactive proteins in a sharp peak, followed by a shoulder of two other peaks (Fig. 3). This elution pattern

was reproducible in repeated experiments indicating that the enzyme is not homogenous. Disc electrophoresis of the purified enzyme (fractions 42-44) after lyophilisation showed a single main band of protein with a slight non banding

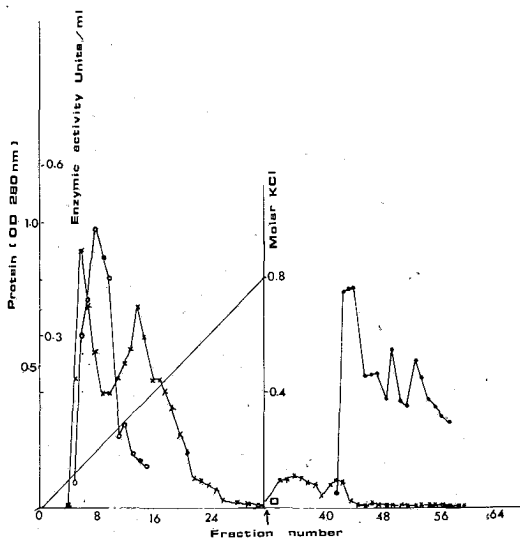


FIG. 3. Affinity chromatography of gentamicin adenylyltransferase AAD(2'') coded by pPK 237 on gentamicin C_1aCH - Sepharose 4B column 1×6 cm. 1 ml (24 mg/protein) of redissolved 25-50% fraction of ammonium sulfate precipitation were added to the column. Fractions 1-32 were eluted with gradient KCl 0.-0.8M in standard buffer and fractions 33-60 with potassium acetate buffer 0.1M pH 4.6 containing 0.1M $(NH_4)_2SO_4$. The flow rate was 0.5ml per minute and the volume of the fractions 1-32 was 5ml and 33-60 1ml. The plots represent:

(x) = protein

(o) = gentamicin-acetylation activity

(●) = gentamicin-adenylation activity

smearing. The adenylylating enzymatic activity corresponded to the main protein band indicating that considerable purification has been achieved. The enzyme was highly unstable at this stage so that the degree of purification and the recovery of the enzyme was not possible to be calculated. Its activity was lost either if it was kept at $4^\circ C$ or at $-20^\circ C$. Because of its instability the tests for determining its properties had to be done within a few hours after the affinity chromatography experiment. Characteristic for the purified enzyme was that its activity could be detected only in the presence of Mg^{++} at 2mM. However Mg^{++} didn't seem to stabilize the enzyme in the purified preparation. It appears that contaminant proteins exert a stabilizing effect on the adenylyltransferase. The substrate profiles of the two purified enzymes were basically the same as in the crude preparation, with differences of the order of $\pm 15-30\%$ as follows; for the acetylation enzyme lower rate of inactivation of gentamicins C_1 and 3',4' Dideoxy-Kanamycin B, for the adenylylating enzyme enhancement of activity for gentamicin C_1^a and 3,4 Dideoxy-Kanamycin B and lower activity for Kanamycin A.

Acknowledgements

This work was supported by Grants from the Hellenic National Research Foundation (E.I.E. 1976-77) and from the Greek Ministry of Social Services (Y.K.Y. 1977-80).

Περίληψη

Απομόνωση και καθαρισμός μιᾶς ἀκετυλοτρανσφεράσης και μιᾶς ἀδενυλοτρανσφεράσης τῆς γενταμικίνης, πού κωδικοποιῶνται ἀπό τό πλασμίδιο PK 237.

Δύο ἔνζυμα, μία ἀκετυλο- και μία ἀδενυλο-τρανσφεράση τῆς γενταμικίνης, ἀπομονώθηκαν ἀπό κύτταρα στελέχους τῆς *E. coli* K 12, πού ἔφερε τό πλασμίδιο PK 237, τό ὁποῖο εἶχε προέλθει ἀπό στέλεχος Ψευδομονάδας, ἀνθεκτικό στή γενταμικίνη. Γιά τό ἀκετυλιωτικό ἔνζυμο ἐπιτεύχθηκε καθαρισμός 126 φορές, μέ κλασματική κατακρήμνιση μέ θειικό ἀμμώνιο, ἰοντοανταλλακτική χρωματογραφία και χρωματογραφία συγγένειας. Τό ἀδενυλιωτικό ἔνζυμο καθαρίστηκε μέ χρωματογραφία συγγένειας, μετά ἀπό κλασματική κατακρήμνιση μέ θειικό ἀμμώνιο. Ἡ καθαρότητα τῶν δύο ἔνζυμων δείχθηκε μέ disc - ἠλεκτροφόρηση. Τό ἀκετυλιωτικό και τό ἀδενυλιωτικό ἔνζυμο χαρακτηρίστηκαν, ἀντίστοιχα, ὡς AAC(3)I και AAD (2'') ἀπό τό φάσμα τῶν ὑποστρωμάτων πού ἀδρανοποιῶν. Τό ἀκετυλιωτικό ἔνζυμο πού ἀπομονώθηκε στήν παρούσα ἐργασία ἔδωσε διαφορετικά ἀποτελέσματα στήν ἀνάλυση ἀμινοξέων ἀπό τό AAC(3)I, πού καθαρίστηκε ἀπό ἄλλους ἐρευνητές. Τό ἀδενυλιωτικό ἐπίσης ἔνζυμο ἦταν διαφορετικό ἀπ' τήν AAD (2'') πού καθαρίστηκε ἀπό ἄλλους, γιατί μετά τόν καθορισμό ἦταν ἐξαιρετικά ἀσταθές και δραστικό μόνο παρουσία Mg⁺⁺.

References

1. Okamoto S., & Suzuki Y.: *Nature* **208**, 1301-1303 (1965).
2. Kontomichalou P., Papachristou E., & Angelatou F.: *Antimicrob. Agents Chemother* **9**, 866-873 (1976).
3. Davies J., & Smith D.: *Ann. Rev. Microbiol.* **32**, 469-518 (1978).
4. Affinity Chromatography. Principles and Methods. Pharmacia, Sweden (1974).
5. Gabriel O.: *Methods Enzymol.* **22**, 565 (1971).
6. Benveniste R., & Davies J.: *Biochemistry* **10**, 1787-1795 (1971).
7. Tsiganos C.P., & Muir Helen.: *Biochem J.*, **113**, 885-894 (1969).
8. Tjelepi E., Bomvogianni B., & Kontomichalou P.: *Proceedings Fourth International Symposium on Antibiotic Resistance, Avicenum, Prague in Press* (1979).
9. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr L. & Randall R.J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
10. Smith D., Comez Lus. R., Colvo R., Datta N., Jacob A., & Hedges R.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **8**, 227-230 (1975).
11. Brzezinska M., Benveniste R., Davies J., Davies P.J.L. & Weinstein J.: *Biochemistry* **11**, 761-765

- (1972).
12. Kabins S., Nathan C., & Cohen S.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **5**, 565-570 (1974).
 13. Benveniste R., & Davies J.: *Febs. Letters*, **14**, 293-296 (1971).
 14. Goldman P., & Northrop D.: *Biochem. and Biophys. Research Commun.* **66**, 1408-1413 (1975).
 15. Williams J., & Northrop D.: *Biochemistry* **15**, 125-131 (1976).
 16. Eliopoulou A.: *Thesis Athens University* (1979).

STUDY OF PHYSICAL ADSORPTION USING THE HOLE THEORY II. MULTILAYER ADSORPTION ON HOMOGENEOUS SURFACES

D.A. JANNAKOUDAKIS, P.J. NIKITAS, A.K. PAPPA-LOUISI

Laboratory of Physical Chemistry Fac. of Physics & Mathematics, University of Thessaloniki, Greece

(Received June 25, 1980).

Summary

An extension of a previous hole theory for monolayer adsorption is made to multilayer physical adsorption of noble gases on homogeneous surfaces. Two statistical models are constructed and analysed for the evaluation of the partition function of the adsorbed phase.

In the first model, a mobile first layer is introduced into the B.E.T. model. The resulting adsorption isotherm is similar in shape to that of the B.E.T. model and gives a qualitative description of the phenomenon.

In the second model, the multilayer phase is regarded as a system of two-dimensional liquid-like layers. The distribution of adsorbed molecules in any layer is considered to be completely random. The predicted isotherm is in quite good agreement with the experimental data of the adsorption of Argon on graphite and boron nitride at different temperatures.

Key words: Argon, Hole Theory, Physical Adsorption.

I. Introduction

In a previous paper¹, which is referred to as I, the hole theory of the liquid state was extended to describe the monolayer physical adsorption of inert gases on homogeneous surfaces. The agreement between experimental data and theoretical calculations was found to be very good. This was attributed to the behavior of the adsorbed phase as a two-dimensional liquid-like layer and to the hole theory which provides a very illuminating semi-quantitative picture of the liquid state.

The multilayer adsorption is a more general phenomenon because the adsorption is never confined in the formation of a monolayer. In fact, the formation of multilayers, which are essentially liquid by nature, is extremely common. The problem of treating rigorously a liquid film in the potential field of a

solid adsorbent has not been solved, and simplifications must be introduced. Hitherto, the theoretical approach to the problem was mainly advanced by studying "physical models"^{2,3,4}. The construction of a certain model with a structure defined a priori is required for the description of a system by a "physical method" in statistical thermodynamic terms. Having this model as basis, the partition function of the system is determined and from this all the thermodynamic quantities.

The B.E.T. theory^{2,5} was the first attempt to a mathematical approach of the multilayer adsorption. Although the B.E.T. model is capable of describing many gas-solid systems, the description is qualitative rather than quantitative, especially at low temperatures. The poor agreement is due to a phase transition which is experimentally observed at relatively low temperatures but not predicted by the B.E.T. theory.

The description of multilayer adsorption using a statistical mechanical lattice vacancy model was first attempted by Pace³. In his approach, Pace had as basis Ono's theory⁶ of the liquid state. The calculated isosteric heats of adsorption for the system Ar - graphon was in good agreement with the experimental data. In contrast, the theoretical adsorption isotherm for the same system was not in good agreement with the experiment⁷. Among the lattice models only the significant structure theory⁴ gave relatively good results.

The hole theory of the liquid state belongs to the "physical theories"^{8,9}. Consequently, the statistical thermodynamic description of the multilayer adsorption by the hole theory requires the construction and analysis of a certain model.

In this paper two different models for multilayer adsorption of inert gases onto homogeneous surfaces are studied having as basis the hole theory of the liquid state. The first model is based on the B.E.T. model and has a mobile first adsorbed layer. In the second model, which is a mobile model, Pace's general approach is used having as basis the hole theory, as it was extended in part I for the study of the monolayer adsorption.

The proposed models are tested against the experimental data of the adsorption of Ar on highly graphitized carbon blacks (P-33) and on boron nitride (BN).

II. A Modification on the B.E.T. model - model A

The systematic experimental study³ of the physical adsorption of inert gases on homogeneous solid surfaces showed that the adsorbed molecules exhibit a behavior which can best be described as liquid like. Theoretical studies³ reached the same conclusion. For example, the calculated surface barriers, for Ar adsorbed on graphon are 100 cal.mol^{-1} . This value is small in comparison with kT , even at $T=66^\circ \text{ K}$, and suggests that the adsorbed Ar molecules should have a high degree of mobility over the surface.

Since mobile physical adsorption is really extremely common, it would seem worth-while to derive a multilayer adsorption isotherm on the assumption of a mobile first layer.

We consider that the adsorbed phase comprises N molecules of which N_1 constitute the first layer of adsorbate and the remaining $(N-N_1)$ are in subsequent layers. The partition function for the first layer molecules forming a two-dimensional liquid like phase is given by¹.

$$Z_1 = \lambda^{N_1} \frac{q_{vib}^{N_1}}{N_1!} \cdot \exp\left(\frac{N_1 V_1}{kT}\right) \cdot \frac{N_0!}{(N_0 - N_1)!} \cdot [a_f(\bar{y}_1)]^{N_1} \cdot \exp\left[-\bar{y}_1 N_1 \Psi_1(0) / 2kT\right], \quad (1)$$

where $\bar{y}_1 = N_1/N_0$ and N_0 is the maximum number of molecules that can be accommodated in the monolayer. All the other symbols are the same as in part I.

The molecules in the second and higher layers are adsorbed on the N_1 molecules of the first layer as in the B.E.T. model². Thus, the partition function for the $(N-N_1)$ molecules is given by²

$$Z_2 = \frac{(N-1)!}{(N-N_1)! (N_1-1)!} \cdot [j_2 \cdot \exp\frac{U_2}{kT}]^{(N-N_1)} \quad (2)$$

where j_2 is the internal partition function of an adsorbed molecule in a higher layer and U_2 the potential energy of this molecule due to interactions between the molecule and the surface.

The complete partition function for the system is

$$Z = \sum_{N_1=1}^n Z_1 \cdot Z_2 \quad (3)$$

where $n = N$ if N is less than N_0 and $n = N_0$ if the total number of molecules exceeds the number N_0 .

It is a sufficiently good approximation to set $\ln Z$ equal to the logarithm of the largest term in the sum. The value of N_1 which corresponds to the maximum term is obtained from

$$\frac{\partial \ln(Z_1 Z_2)}{\partial N_1} = 0 \quad (4)$$

From Eq. (4) it can be shown that

$$\ln\left(\frac{\lambda q_{vib} \omega}{j_2}\right) + \frac{U_1 - U_2}{kT} + \ln\left[\frac{(N_0 - N_1)^2 (N - N_1)}{N_0 N_1^2}\right] - \frac{N_1}{N_0 - N_1} - \frac{N_1 \Psi_1(0)}{N_0 kT} = 0 \quad (5)$$

where N_1 is related to N by the equation¹⁰.

$$N_1 = N(1-x) \quad (6)$$

and x is the relative pressure (P/P_0).

The equation for the adsorption isotherm obtained by substituting Eq. (6) into Eq. (5).

$$\ln\left(\frac{j_2}{\lambda q_{vib} \omega}\right) + \frac{U_2 - U_1}{kT} + \ln\left\{\frac{\theta(1-x)^2}{x[1-\theta(1-x)]^2}\right\} + \frac{\theta(1-x)}{1-\theta(1-x)} + \frac{\theta(1-x)\Psi_1(0)}{kT} = 0 \quad (7)$$

where θ is the surface coverage (N/N_0).

TABLE I. Molecular properties and parameters for Ar adsorption on graphite and BN.

System	Ar-P33				Ar-BN				Approximation
Property	U_1	U_2	$-\Psi_1/k$	c	U_1	U_2	$-\Psi_1/k$	c	
	cal/mol				cal/mol				
Eq. (7)	2150 ^a	1000 ^b	568,0 ^c	—	1894 ^a	1000 ^b	568,0 ^c	—	$j_2=j_1=\lambda\omega\cdot q_{vib}$
B.E.T.	2150 ^a	1000 ^b	—	3425.4 (71.11K)	1894 ^a	1000 ^b	—	375.4 (75.9K)	$c=\exp\frac{U_1-U_2}{RT}$

- a. See Ref. (1) in text.
 b. Determined for the best fit of data.
 c. Mean value from Ref. (1).

Figures 1 and 2 compare the theoretical isotherms resulting from Eq.(7) with the ordinary B.E.T. isotherms². The values of the molecular parameters used are given in Table I. It is noticeable that the two isotherms have similar plots. Since the only difference between the two models is in the first layer, the form of the isotherms should be mainly defined by the model of the higher layers.

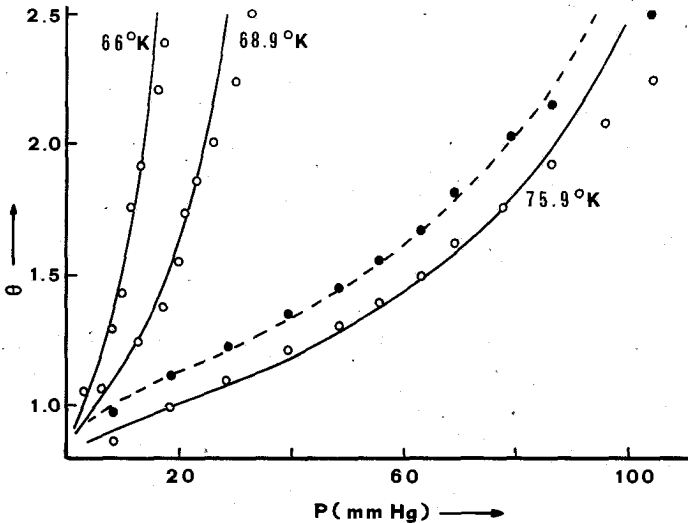


FIG. 1. Calculated and experimental isotherms of Argon on BN. The solid lines represent the calculated isotherms using Eq. (7) while the dotted line gives the results of the B.E.T. model. The open circles and filled circles represent experimental data with $V_m, ml(STP)/g = 5.69, 5.10$, respectively, from ref. (11).

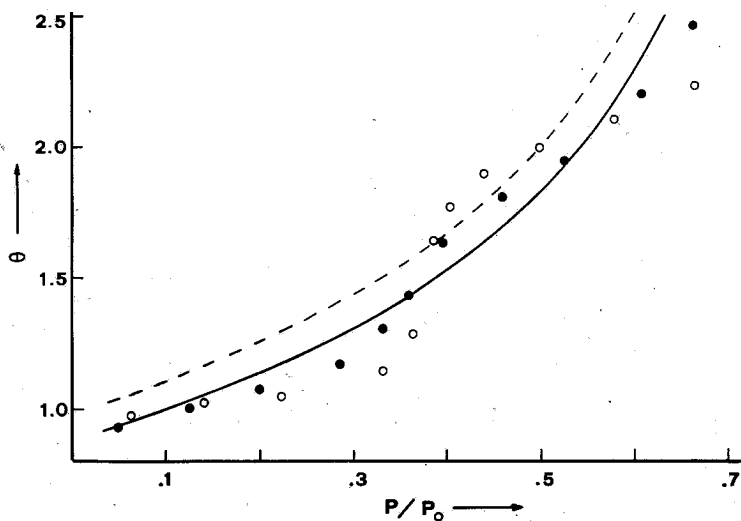


FIG. 2. Calculated and experimental isotherms of Argon on P-33. The solid line gives theoretical calculations using Eq. (7) at $T = 71.11^{\circ}\text{K}$, while the dotted line gives the results of the B.E.T. model. The open circles and filled circles represent experimental data at $T = 71.11^{\circ}\text{K}$, 78.47°K , respectively, from ref. (12).

The similar plots of the two isotherms lead to the conclusion that both of them will be applicable or not for the same experimental systems. Figure 1 shows the experimental data obtained by R.A. Pierotti¹¹ for the adsorption of Ar on BN and the theoretical isotherms obtained from Eq.(7) and B.E.T. model. If the volume of gas needed to completely fill the first layer, V_m , is adjusted for best fit of data, both Eq. (7) and B.E.T. model give satisfactory results. However, this agreement is qualitative rather than quantitative. Both, B.E.T. isotherm and Eq. (7) do not show the existence of a phase transition in the higher layers. This is due to the fact that in both models interactions between the adsorbed molecules in the upper layers are not taken into account.

In figure 2 the theoretical isotherms resulting from Eq. (7) and B.E.T. model are compared with the experimental results for the adsorption of Ar on P-33 obtained by C.F. Prenzlow and G.D. Halsey¹². In this case, there is a deviation of the theoretical isotherms from the experimental results in contrast to the adsorption of Ar on BN. The main cause of the disagreement is the existence of a clear step in the isotherm of $T = 71.11^{\circ}\text{K}$ at $\theta = 1.5$. On increasing the temperature ($T = 78.47^{\circ}\text{K}$) the step becomes weaker and the experimental results appear to be closer to the isotherm obtained from Eq. (7).

In general, we can say that the applicability of the B.E.T. and modified B.E.T. models is confined in multilayer systems which do not show a clear step in the higher layers. The isotherm obtained from Eq. (7) gives a better picture of the first adsorbed layer but not of the subsequent layers, which in fact determine the total

adsorption isotherm.

III. A mobile model - model B

A more realistic model, which will be capable of describing the experimental results even at very low temperatures should take into account interactions between the adsorbed molecules. This is easily done if we consider that the multilayer consists of j adsorbed layers. Then, the total partition function Z of the adsorbed phase, can be written (see Appendix).

$$Z_{\text{ads}} = \prod_i^j Z_i \quad (8)$$

where Z_i is the partition function of the i adsorbed layer. The interactions between the N_i molecules of the i layer can be incorporated in Z_i by introducing the following term

$$\exp\left(-\frac{N_i \theta_i \Psi_i(O)}{2kT}\right) \quad (9)$$

where $\theta_i = N_i/N_{i-1}$ the degree of coverage of the i layer and $\Psi_i(O)$ the energy of interactions between the molecules of the i layer.

The statistical solution of such a general model is obviously dependent on the evaluation of Z_i , that is on the evaluation of a special model for the i adsorbed layer and on the physical approximations needed for the model.

Theoretically and experimentally the formation of a mobile first layer with the molecules arranged in the hexagonal close packed layer is favored. The formation of second and higher layers with the same type of packing appears reasonable although such layers would not be as well defined as the first layer.

These data can be described by the following model of multilayer adsorption. The adsorbed phase consists of j liquid like layers adsorbed on an energetically homogeneous surface. As in the case of monolayer adsorption (part I) the molecules of each layer interact (1) with the surface and (2) between themselves. The adsorbate-adsorbate interaction, in any layer is assumed to follow a Lennard-Jones potential function (see part I) and is assumed to be pairwise additive. The adsorbed molecules vibrate normal to the adsorbing surface and each of them is free to move in the cell which is formed by the neighbouring molecules. The number of cells of the i layer is equal to the number N_{i-1} of the adsorbed molecules in the $(i-1)$ layer. We have $N_i \leq N_{i-1}$.

The partition function Z_i for the i th adsorbed layer will be

$$Z_i = \alpha_i^{N_i} \alpha_{\text{vib}(i)}^{N_i} \exp\left(\frac{N_i U_i}{kT}\right) \frac{N_{i-1}!}{N_i! (N_{i-1} - N_i)!} \cdot a_{fi}^{N_i} \cdot \exp\left[\frac{-N_i^2 \Psi_i(O)}{N_{i-1} \cdot 2kT}\right] \quad (10)$$

where α_i is the free area of an adsorbed molecule. The meaning of the other symbols is given in part I of this series.

In the case of monolayer adsorption (part I) the free area was considered to be

a linear function of the surface coverage. As it can be seen from Fig. 3, for values of the reduced cell area predicted by the hole theory¹ ($\omega^* \approx 1.1$), this linear approximation is only good for small values of θ . Figure 3 shows the variation of the free area of an adsorbed

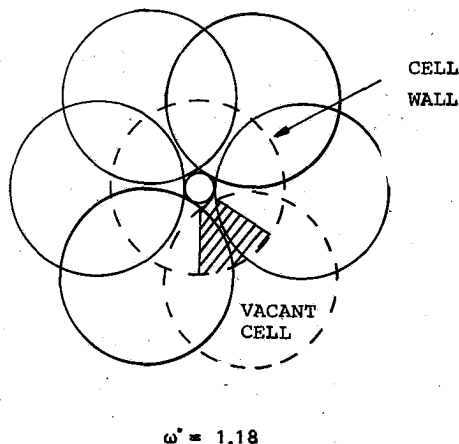


FIG. 3. Linear variation of free area in a two-dimensional hexagonal close packed lattice. The shaded area represents the increase in free area due to the linear approximation.

molecule; when a neighbouring hole is formed. The shaded area indicates the added free area given by the linear approximation. It is obvious that for large θ ($\theta > 0.6$) the linear approximation gives much greater free area than the real one. We reach the same conclusion comparing the theoretical isotherms with the experimental data in part I, which showed a satisfactory agreement for $\theta < 0.55$ and systematic deviations for $\theta > 0.55$.

A number of theoretical and experimental data support the view that the linear dependence of the free area of the adsorbed molecules on the surface coverage is not a satisfactory approximation for the multilayer adsorption. These are:

I. The total statistical coverage, θ , is given by

$$\theta = \frac{1}{N_0} \sum_{i=1} N_i = \theta_1 + \theta_1 \theta_2 + \theta_1 \theta_2 \theta_3 + \dots \quad (11)$$

and is the same with the experimental surface coverage θ which is usually defined as

$$\theta = \frac{V_{\text{ads}}}{V_m} \quad (12)$$

where V_{ads} is the volume of gas adsorbed and V_m is the volume of gas needed to

completely fill the first layer.

When θ becomes greater than 1.5 the values of θ_i increase in particular those of the first layer. So θ_1 approaches 1, while θ_2 exceeds the value of 0.6. Since the linear approximation is not valid for values of θ_i greater than 0.6, the quantitative theoretical description of the multilayer phase for values of $\theta > 1.5$ becomes impossible using this approximation.

2. The distance between the adsorbed layers³ (2.9\AA) is very small in comparison with the distance of the adsorbed molecules in the same layer³ ($\sim 4\text{\AA}$). Visualizing Fig. 3 in space we will understand that the presence of molecules of neighbouring layers in such a close distance has a negative effect in the linear variation of ar with θ_i , even for very small values of θ_i .

3. The experimental isotherms for the adsorption of Ar on BN and P-33, Fig. 4 and 5, show the existence of a well-defined

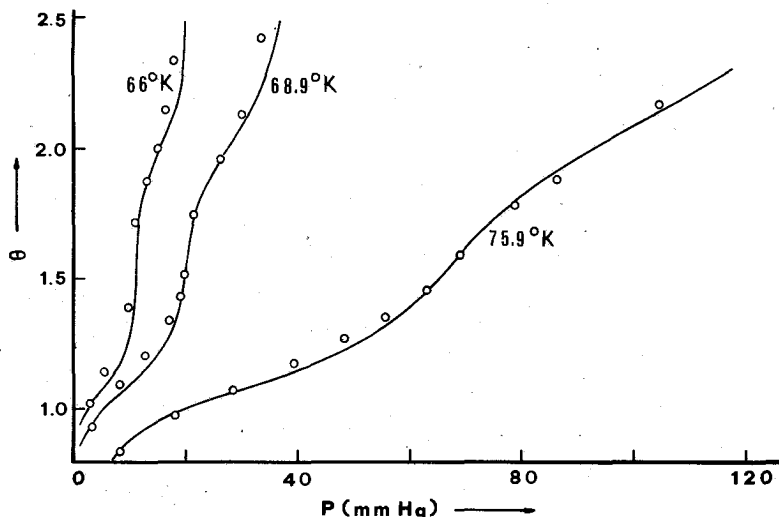


FIG. 4. Theoretical and experimental isotherms of Argon on BN. The solid lines give theoretical calculations. Circles are data from ref. (11).

step in the second adsorbed layer. This abrupt jump in the values of θ is observed at low temperatures and has the features of a phase transition with $\theta_c = 1.5$. If this step is attributed to a phase transition which occurs in the second layer, we should conclude from Eq. (11) that the critical experimental value of θ_2 lies between 0.5 and 0.6. This value is far from the value of 0.31, which is the critical theoretical value of θ_2 , when ar is linearly dependent on the number of neighbouring holes.

Therefore, the equation¹

$$ar(\theta) = \theta ar(o) + (1-\theta)\omega \quad (13)$$

which gives the linear dependence of the free area of an adsorbed molecule on the

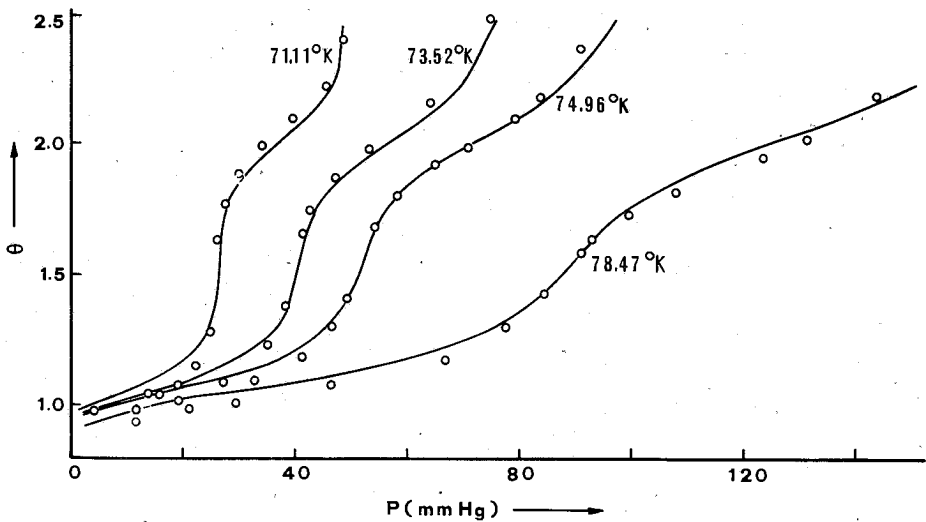


FIG. 5. Theoretical and experimental isotherms of Argon on P-33. The solid lines give theoretical calculations. Circles are experimental data from ref. (12).

surface coverage, can not be an acceptable approximation for the multilayer adsorption. The free area should be dependent on the surface coverage θ , but this dependence should be weaker than the linear and should result in value of θ_{ci} around 0.5.

The general dependence of a_r on θ can be written

$$a_f^0(\omega, T, \theta) = a_f^0 \cdot e^{\gamma(1-\theta)} \tag{14}$$

The various approximations which have been introduced hitherto for the dependence of a_r on θ can be expressed in the form of assumptions for the values of a_f^0 and γ . So the linear approximation is taken when

$$a_f^0 = a_f(0) \quad \text{and} \quad \gamma = \ln \left[\theta + (1-\theta) \frac{\omega}{a_f(0)} \right] \tag{15}$$

The de Boer's approximation¹³

$$a_f^0 = a_f(0) \quad \text{and} \quad \gamma - \left(\frac{\partial \ln a_f}{\partial \theta} \right)_{\theta=1} = 1 \tag{16}$$

has the main features that we are looking for; that is the weak dependence of a_r on θ and $\theta_c = 0.5$.

Introducing the de Boer's approximation in Eq. (10) we have

$$\ln Z_i = N_i \ln(\lambda q_{\text{vib}(i)} a_i^0 e) + \frac{N_i U_i}{kT} + N_{i-1} \ln\left(\frac{N_i - 1}{N_{i-1} - N_i}\right) - N_i \ln\left(\frac{N_i}{N_{i-1} - N_i}\right) - \frac{N_i^2}{N_{i-1}} \frac{N_i \psi_i(0)}{N_{i-1} 2kT} \quad (17)$$

For the total partition function Z for all j adsorbed layers we have

$$\ln Z = \sum_i \ln Z_i \quad (18)$$

The theoretical adsorption isotherms are determined by finding the chemical potential for the adsorbed molecules in each layer and equating these to each other and to the chemical potential of the gas phase.

The chemical potential μ_i of the i layer is given by

$$\frac{\mu_i}{kT} = - \left(\frac{\partial \ln Z}{\partial N_i} \right)_{N_k \neq i, T} \quad (19)$$

and therefore

$$\frac{\mu_i}{kT} = - \ln(\lambda q_{\text{vib}(i)} a_i^0 e) - \frac{U_i}{kT} + \frac{\theta_i \psi_i(0)}{kT} - \frac{\theta_{i+1}^2 \psi_{i+1}(0)}{2kT} + \ln \left[\frac{\theta_i (1 - \theta_{i+1})}{1 - \theta_i} \right] + 2\theta_i - \theta_{i+1}^2 \quad (20)$$

Assuming that the gas phase behaves like an ideal monatomic gas, the chemical potential μ_g of the gas phase is given by

$$\frac{\mu_{\text{gas}}}{kT} = - \ln(\lambda^{3/2} kT) + \ln P, \quad (21)$$

where P is the gas phase equilibrium pressure.

Equating the chemical potentials yields j equations with j unknowns, that is the θ_i ($i = 1, \dots, j$). Therefore, for every value of the pressure P we will have j different values of θ_i and from these values we can calculate the total θ .

In the present treatment the number of adsorbed layers was restricted in three. The resulting equations are

$$\left. \begin{aligned} \ln\left(\frac{q_{\text{vib}(1)}}{q_{\text{vib}(2)}}\right) + \frac{U_1 - U_2}{kT} - \theta_1 \frac{\psi_1(0)}{kT} + \theta_2 \frac{\psi_2(0)}{kT} + \theta_2^2 \frac{\psi_2(0)}{2kT} - \theta_3^2 \frac{\psi_3(0)}{2kT} \\ - 2(\theta_1 - \theta_2) + \theta_2^2 - \theta_3^2 + \ln\left[\frac{\theta_2(1-\theta_1)(1-\theta_3)}{\theta_1(1-\theta_2)^2}\right] = 0 \end{aligned} \right\} \quad (22)$$

$$\left. \begin{aligned} & \ln \left(\frac{q_{\text{vib}}(2)}{q_{\text{vib}}(3)} \right) + \frac{U_2 - U_3}{kT} - \theta_2 \frac{\Psi_2(0)}{kT} + \theta_3 \frac{\Psi_3(0)}{kT} + \theta_3^2 \frac{\Psi_3(0)}{2kT} - 2(\theta_2 - \theta_3) + \theta_3^2 \\ & + \ln \frac{(1 - \theta_2)\theta_3}{\theta_2(1 - \theta_3)^2} = 0 \end{aligned} \right\} \quad (23)$$

$$\ln P = \ln \left(\frac{\lambda^{1/2} kT}{q_{\text{vib}}(3) a_f v_e} \right) - \frac{U_3}{kT} + \theta_3 \frac{\Psi_3(0)}{kT} + 2\theta_3 + \ln \left(\frac{\theta_3}{1 - \theta_3} \right) \quad (24)$$

IV. COMPARISON WITH EXPERIMENT

The theoretical adsorption isotherms for the adsorption of Argon on P-33 and BN were based on values resulting from Eq. (22), (23), (24) and (11). Table II gives the molecular parameters used in these calculations. All molecular parameters, except U_i , are taken from bibliography.

TABLE II. Molecular properties and parameters for Ar adsorption on graphite and BN.

Property	Ar-P33	Ar-BN
$10^{-12} v, \text{sec}^{-1}$	4 ^a	4 ^a
$U_1, \text{cal/mol}$	2150 ^b	1900 ^c
$U_2, \text{cal/mol}$	1464 ^d	1476 ^d
$U_3, \text{cal/mol}$	1395 ^d	1417 ^d
$(\epsilon/k)_1, \text{ } ^\circ\text{K}$	108 ^e	108 ^e
$(\epsilon/k)_2, (\epsilon/k)_3, \text{ } ^\circ\text{K}$	122 ^e	112 ^e
$V_m, \text{ml (STP) /g}$	3.563 ^f	5.823 ^f
$\sigma, \text{ \AA}$	3.46 ^g	3.46 ^g

a. See in text.

b. See ref. (1) in text.

c. See ref. (1) in text.

d. Determined for the best fit of data.

e. Experimental estimates range from 96 to 122: See ref. (14), (15).

f. Adjusted value for best fit of data.

g. See ref. (15) in text.

The energy of interaction between the adsorbed molecules of the i layer, $\Psi_i(0)$, was calculated from¹

$$\frac{\Psi_i(0)}{k} = \frac{18\sqrt{3}\epsilon}{16k} \cdot \left(\frac{3\sqrt{3}}{\omega^{\pi/6}} - \frac{8}{\omega^{\pi/3}} \right) \quad (25)$$

where ϵ/k is the potential minimum and ω^* the reduced cell area for an adsorbed molecule.

The calculation of $\Psi_i(0)$ was based on the approximate value $\omega^* = 1.55$. This value was chosen because de Boer's theory for the liquid state gave satisfactory results for values of ω^* around 1.6.

The frequency of vibration of an adsorbed molecule was considered, in first approximation, to be the same for all layers. This approximation has been used by other workers too in the study of the multilayer adsorption⁴. The value of $\nu = 4 \cdot 10^{12} \text{sec}^{-1}$ used in the present work is slightly higher than the frequency used for the monolayer adsorption¹. Although there are no experimental data for the frequency of vibration, we would expect an increase in its value for multilayer adsorption due to the field effect of the molecules of the various layers.

Figures 4 and 5 compare the theoretical with the experimental data for the adsorption of Ar on BN and P-33 respectively. For both systems the agreement between theory and experiment is excellent. Also the isotherm temperature dependence is considerably good. At low temperatures, both theory and experiment show a clear step in the adsorption isotherm for the second as well as for the third layer. These steps become weaker as the temperature increases.

In Fig. 6 the theoretical partial (for the first, second and third layer) and total adsorption isotherm for the system Ar - P33 at $T = 71.11^\circ\text{K}$ are given. We observe that the steps in the total adsorption isotherm are due to steps in the partial isotherms. The value of $(\epsilon/k)_i$ determines the critical temperature in each layer and U_i determines the position of the step on the pressure axis.

In conclusion, the proposed mobile model describes very satisfactory the

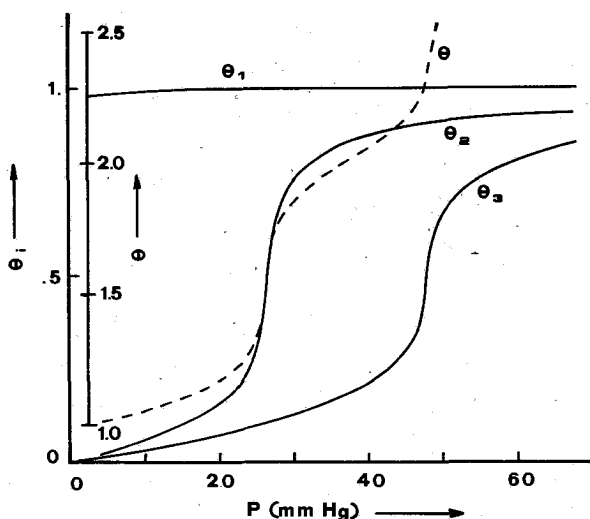


FIG. 6. Theoretical isotherms of Argon on P-33 at $T = 71.11^\circ\text{K}$. Solid lines represent the partial isotherms while dotted line gives the total isotherm.

phenomenon of multilayer adsorption. It is noticeable that the predicted isotherms describe well the second as well as the third adsorbed layer ($\theta \approx 2.5$) although there is a restriction of the adsorption to only three adsorbed layers.

APPENDIX

In the mobile model, the statistical thermodynamic description of the multilayer physical adsorption was based on the assumption that the multilayer consists of j adsorbed layers. This assumption (or better this approximation) was expressed in Eq.(8). Equation (8) is strictly valid only when the adsorbed layers can be considered as independent subsystems of the adsorbed phase. In the statistical treatment of the mobile model we accepted the existence of interactions between the adsorbed layers. Therefore, the question is, whether we can accept the validity of Eq. (8) having accepted the existence of interactions between the layers.

The interactions between the adsorbed layers of the multilayer phase were introduced in the mobile model in two basic approximations: 1. The molar site energy U_i for an isolated molecule in the i th layer was considered to be constant, independent from the surface coverage, and 2. The de Boer's approximation was used to express the variation of the free area with the fraction of vacant sites.

Introducing the interactions between the various layers in this way, the total energy of the adsorbed phase is given by

$$E = \sum_i \{ \epsilon_{\text{vib}(i)} + \epsilon_{\text{trans}(i)} + \frac{1}{2} N_i \theta_i \Psi_i(0) - N_i U_i \} = \sum_i \epsilon_i \quad (A1)$$

where $\epsilon_{\text{vib}(i)}$, $\epsilon_{\text{trans}(i)}$ are the energies of vibration and translation respectively of the i layer.

The canonical ensemble partition function Z of the whole multilayer phase becomes

$$Z = \sum_i \{ \exp(-\epsilon_i/kT) \} = \left(\sum_i \{ \exp(-\epsilon_{1i}/kT) \} \right) \cdot \left(\sum_i \{ \exp(-\epsilon_{2i}/kT) \} \right) \cdots \quad (A2)$$

or

$$Z = \prod_i Z_i \quad (8)$$

Περίληψη

Μελέτη τής φυσικής προσρόφησης με τή θεωρία όπών.

II. Πολυμοριακή προσρόφηση πάνω σε όμογενείς επιφάνειες.

Στήν εργασία αὐτή μελετᾶται με βάση τή θεωρία όπών τής ύγρης καταστάσεως ή πολυμοριακή προσρόφηση αδρανών αερίων πάνω σε όμογενείς

επιφάνειες στερεών.

Η συνάρτηση κατανομής του πολυμοριακού στρώματος προσροφήσεως προσδιορίζεται με τη θεώρηση και τη στατιστική θερμοδυναμική ανάλυση δύο πρότυπων (μοντέλων) προσροφήσεως.

Στό πρώτο πρότυπο ή πολυμοριακή φάση έχει χαρακτηριστικά ενός πρότυπου B.E.T., εκτός από την πρώτη στιβάδα που θεωρείται σαν ύγρη. Η ισόθερμη προσροφήσεως που προκύπτει έχει την ίδια μορφή με την ισόθερμη B.E.T. και ακολουθεί μόνο ποιοτικά τα πειραματικά δεδομένα των συστημάτων εκείνων, για τα όποια ισχύει και η ισόθερμη B.E.T.

Στό δεύτερο πρότυπο ή πολυμοριακή φάση θεωρείται σαν ένα σύστημα τριών διδιάστατων υγρών φάσεων. Οι άλληλεπιδράσεις μεταξύ των προσροφημένων στιβάδων του πολυμοριακού στρώματος λαμβάνονται υπόψη με δύο βασικές προσεγγίσεις: α) με την αλλαγή της σχέσεως της ελεύθερης επιφάνειας κινήσεως των προσροφημένων μορίων από γραμμική σε έκθετική μορφή, και β) με την εισαγωγή των ενεργειακών όρων U_i για την περιγραφή των άλληλεπιδράσεων της i στιβάδας τόσο με τις $(i-1)$ στιβάδες που βρίσκονται κάτω από αυτή, όσο και με τό υπόστρωμα.

Η ισόθερμη προσροφήσεως που τελικά προκύπτει χρησιμοποιείται για την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων της προσροφήσεως του αδρανούς αερίου Ar πάνω σε P-33 και BN. Η παρατηρούμενη συμφωνία μεταξύ πειραματικών και θεωρητικών δεδομένων θεωρείται σαν πολύ ικανοποιητική.

Για την προσαρμογή των θεωρητικών με τα πειραματικά δεδομένα όλες οι μοριακές παράμετροι πάρθηκαν από τη βιβλιογραφία, εκτός από την ενέργεια άλληλεπιδράσεως μεταξύ προσροφημένων μορίων της δεύτερης και τρίτης στιβάδας με τό στερεό υπόβαθρο, ή όποια υπολογίσθηκε θεωρητικά.

References and Notes

1. Jannakoudakis, D.A. & Nikitas, P.J.: *Chimika Chronika*, New Series, **10**, 23 (1981).
2. Hill, T.L.: *J. Chem. Phys.* **14**, 263 (1946).
3. Pace, E.L.: *J. Chem. Phys.* **27**, 1341 (1957).
4. Newsome, D.S.: *J. Phys. Chem.* **78**, 2600 (1974).
5. Brunauer, S., Emmett, P.H. & Teller, E.: *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 309 (1938).
6. Rowlinson, J.A. & Curtiss, C.F.: *J. Chem. Phys.* **19**, 1519 (1951).
7. Pierotti, R.A. & Thomas, H.E.: *Surface and Colloid Science*, Vol. IV, Wiley-Interscience, New York, N.Y. 1971, pp. 93-259.
8. Hill, T.L.: *Statistical Mechanics*, Mc Graw-Hill Book company, New York, 1956.
9. Henderson, D.: *J. Chem. Phys.* **37**, 631 (1962).
10. Hill, T.L.: *J. Chem. Phys.* **14**, 441 (1946).
11. Pierotti, R.A.: *J. Phys. Chem.* **66**, 1810 (1962).
12. Prenzlow, C.F. & Halsey, G.D.: *J. Phys. Chem.* **61**, 1158 (1957).
13. de Boër, J.: *Proc. Roy. Soc. (London)* A 215, 4 (1952).
14. Sams, J.R., Constabaris, G. & Halsey, G.P.: *J. Chem. Phys.* **36**, 1334 (1962).
15. Wolfe, R. & Sams, J.R.: *J. Chem. Phys.* **44**, 2181 (1966).

PREPARATION OF ^{131}I -AMINOGLUTETHIMIDE

A. VARVARIGOU and M. VILLA

Radiopharmaceutical Lab., N.R.C. "Democritos", Athens (Greece)

Laboratory of Clinical Physiology, N.R.C. Pisa and Sorin Biomedica, Saluggia (Italy).

(Received July 23, 1979)

In 1970 first Goldman¹ referred to the uptake and release of ^{14}C -isoxasole, an enzyme inhibitor, in the adrenals. Later on, Beierwalter et al² have studied the adrenal accumulation of a series of tritiated and iodinated enzyme inhibitors and among them of aminoglutethimide. The last presents a satisfactory adrenal uptake soon after the injection.

The data reported by the above investigators have prompted us to a detailed study of the labelling of Aminoglutethimide with the γ -emitting ^{131}I , in order to be examined as a possible radiodiagnostic for adrenals. The procedures used for labelling, purification and quality control as well as data on the stability of the labelled compound are reported.

Aminoglutethimide was obtained by the Ciba-Geigy Pharmaceutical Co. Carrier free ^{131}I Na was supplied by CEA-IRE-SORIN. The other used solvents were of analytical grade purity. For the labelling of Aminoglutethimide two methods have been followed.

A) Chloramine T Method: According to Greenwood³ to 1 ml of an ethanolic solution of Aminoglutethimide 0.7 ml of a NaI solution in phosphate buffer (pH: 7.6) was added. The reaction was started by the addition of 0.15 ml of a freshly prepared Chloramine T solution (1 mgr/ml) and in predesigned time it was interrupted by adding 0.05 ml of a sodium metabisulfide solution (2.5 mgr/ml).

B) Iodine Monochloride Method: According to Helmkamp⁴, to 1 ml of an ethanol solution of Aminoglutethimide 0.3 ml of a pH: 8.4 borate buffer solution, containing the required ^{131}I Na amount was added. Under gentle agitation the iodination was achieved by the addition of an iodine monochloride solution (0.081 mgr/ml).

Since Aminoglutethimide has a rather low solubility in water (1 mgr in 10 ml) the purification of the final solution from anionic iodine was achieved by

precipitation of the labelled compound with water and extraction with ethyl ether. The ether layer was repeatedly washed with water and the solvent was expelled by slight heating. The remaining crystals were dissolved in ethanol.

The final yield of labelling and the radiochemical purity after the ether extraction was determined by paper electrophoresis and thinlayer chromatography (TLC). Electrophoresis was carried out using Whatman No 1 paper, in Veronal buffer, pH: 8.5, for 45 min. at 250 volts. TLC was run on fluorescent silica gel G plates 0.25 mm thick (Merck, Germany). Among the solvent systems referred in literature⁵ we have chosen the 5% Methanol in Benzene for routine use. The presence and localization of ¹³¹I-Aminoglutethimide on the plate was demonstrated by exposing it to iodine vapours or by using a U.V. lamp, wavelength 254 nm. The distribution of the radioactivity was determined by an Actigraph III (Nuclear Chicago, USA) chromatographic scanner or by autoradiography.

After the purification, the alcoholic solution of ¹³¹I-Aminoglutethimide was diluted to a 10% solution with physiological saline and 1% Tween 80. One ml aliquots of the above final solution were dispensed into 10 ml siliconized penicillin vials. The vials were capped with red butyl rubber stoppers. One vial was immediately tested for the radiochemical purity. Groups of six vials were stored at -20°C, 2-8°C, 18-25°C and 35-39°C. One vial from each storage was periodically examined for radiochemical purity by electrophoresis or by TLC.

Results of labelling are reported in Table I.

TABLE I. Labelling results by the chloramine-T and ICl methods under different conditions. Yields of labelling are the average of five determinations and represent the percent of labelled compound.

METHOD	REAGENT CONCENTRATION (mg)	REACTION TIME (MIN)	YIELD %	SPECIFIC ACTIVITY (mCi/mg)
Chl. T	Chl T=0.15 A=3.0	5	39.20 ± 5.30	5.0
		30	80.20 ± 9.20	
		60	75.20 ± 4.80	
ICl	ICl:3.2×10 ⁻² ICl:6.4×10 ⁻²		67.30 ± 11.20	
		1	90.10 ± 2.80	

The influence of the reagent concentration and the reaction time on the final yield has been studied. For the ICl method the amount of the reagent was determinative for the tagging. For the Chloramine T method the reaction time was important; maximum yield was obtained in thirty minutes, while for the ICl method one minute was sufficient for a good tagging. In reference to the aniline

group iodine must be inserted to the ortho-position. The TLC mono- and bi-dimensional, has proved the existence of a unique labelled compound.

Electrophoretic data on the amount of inorganic iodine, present after labelling, are in good agreement with the TLC results. The R_f of the radioiodinated compound is very similar to that of the inactive one, as determined by spraying or by U.V. Reproduction of a characteristic TLC scan is presented in Fig. 1.

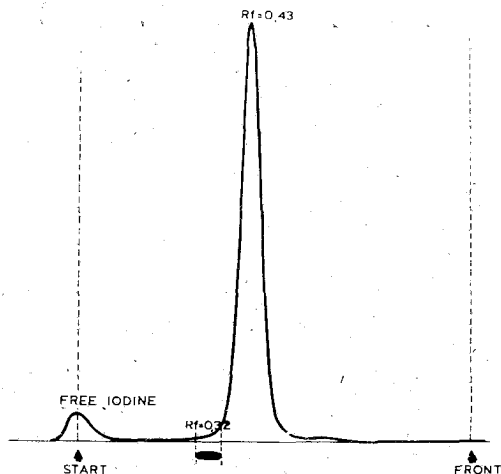


FIG. 1: Radioactivity distribution of TLC of unpurified ^{131}I -Aminogluthethimide. R_f of the inactive substance is also indicated (black spot). Unbound ^{131}I remains at the starting point.

The purification method described before allows one to obtain a final solution of ^{131}I -Aminogluthethimide containing less than 2% of unbound ^{131}I .

Table II reports the results of the stability study of labelled Aminogluthethimide.

TABLE II.: Stability of ^{131}I -Aminogluthethimide stored at different temperatures: the averages of five determinations of the free iodine content (as percent) are given.

TIME days	-20°C	2-8°C	18-25°C	35-39°C
0	—	—	0	—
4	2.10	3.50	3.50	4.70
8	2.20	3.80	3.85	6.50
15	2.30	3.85	5.20	7.20
21	2.60	3.90	6.10	15.10

All data have been normalized to a free iodine standard content of 0% at zero time. The storage temperature seems to be important for the stability particularly

for long periods. Keeping of the labelled compound in a freezer would be advisable.

In conclusion, radioiodination of aminoglutethimide can be achieved in high yield by both the Chloramine T and the Iodine Monochloride method. Direct iodination of the benzenic group at position 2 occurs. Unreacted inorganic iodine is easily removed by water extraction. The radioiodinated Aminoglutethimide remains practically stable up to three weeks when kept in refrigerator.

Summary

¹³¹I-Aminoglutethimide, a radiopharmaceutical proposed for adrenal scanning, was prepared by two different methods. Yields up to 90% were obtained within some minutes. The stability of the labeled product has been studied under different conditions of storage.

Περίληψη

Παρασκευή ¹³¹I-Αμινογλουτεθιμίδης

Η έπισημανση της Αμινογλουτεθιμίδης με I-131 μελετάται με δύο διαφορετικές μεθόδους, με τις οποίες λαμβάνεται ύψηλή απόδοση σε έπισημασμένο προϊόν. Για κάθε μία μέθοδο έρευνάται ή επίδραση του χρόνου αντίδρασης και της συγκεντρώσεως των αντιδραστηρίων στην τελική απόδοση. Τό τελικό προϊόν άπαλάσσεται από την παρουσία άνόργανου ιωδίου με έκχύλιση. Η απόδοση της έπισημάνσεως και ή ραδιοχημική καθαρότητα προσδιορίζονται με τις τεχνικές της ήλεκτροφορήσεως και της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας. Πρόκειμένου νά δοκιμαστέι ή νέα ραδιοϊωδιωμένη ένωση στην άκτινοδιαγνωστική έπιπεφριδικών παθήσεων μελετάται ή σταθερότητά της επί 21 ήμέρες σε θερμοκρασίες από -20 ως +37°C.

References

1. Goldman, A.S.: *Endocrinology* **86**, 678 (1970).
2. Beierwaltes, W.H., Wieland, D.M., Ice, R.D., Seabold, J.E., Sarkar, S.D., Gill, S.P., & Mosley, S.T.: *J. Nucl. Med.* **17**, 998 (1976).
3. Greenwood, F.C., Hunter, W.M. & Glover, J.S.: *Biochem. J.*, **84**, 114 (1963).
4. Helmkamp, R.W., Contreras, M.A. & Bale, W.F.: *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, **18**, 737 (1967).
5. Stahl, E. & Schorn, R.J.: *Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook*. (E. Stahl, Editor), p.p. 500-502, 1963.