

Inventario Nr. 3089

ANNO 1° - Vol. 1

1946

IL FARMACO

SCIENZA E TECNICA

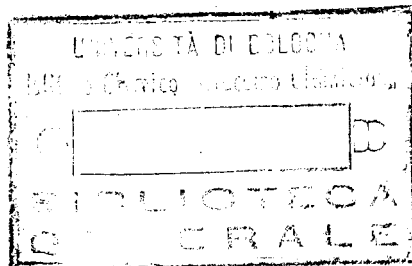


Fondatori-Redattori:

RAFFAELE CIFERRI - LUIGI DE CARO
PIETRO PRATESI - ALBERTO SOLDI

Consiglio Direttivo:

G. B. BONINO per la Chimica generale e Chimica fisica
R. CIFERRI per la Botanica e Biologia vegetale
L. DE CARO per la Fisiologia e Biologia animale
M. DECHIGI per l'Igiene e Microbiologia
P. MASCHERPA per la Farmacologia e Farmacognosia
P. PRATESI per la Chimica Farmaceutica
A. ROSSI FANELLI per la Chimica biologica
A. SOLDI per la Tecnica e Legislazione farmaceutica



DIREZIONE e REDAZIONE: Istituto di Chimica Farmaceutica
dell'Università di Pavia - Via Taramelli, 2 - Tel. 8.62 - 33.84
AMMINISTRAZIONE: Cas. post. 102 - Pavia - Tel. 30.69 - 24.07

Produzione di alcaloidi della "segale cornuta", nelle colture in agar

Nota II. - Caratteri farmacologici

E. Baldacci

LABORATORIO CRITTOGAMICO ITALIANO - UNIVERSITÀ DI PAVIA

Nella nota precedente abbiamo illustrato il metodo da noi seguito per l'allestimento delle colture in agar di *Claviceps purpurea* (*Sphacelia segetum*) e abbiamo riferito sui risultati ottenuti. In questa nota diamo conto dei caratteri farmacologici della droga ottenuta in coltura (1).

Preparazione dell'estratto fluido alcoolico dagli sclerozi naturali.

Per la preparazione dell'estratto fluido di Segale Cornuta, ci siamo attenuti al metodo dalla Farmacopea inglese, la quale parte dalla droga sgrassata ed invece di usare acido acetico ed alcole come l'italiana, usa acido tartarico ed alcole.

Abbiamo polverizzato in mortaio gr. 400 di sclerozi raccolti nell'annata 1939 ed il prodotto della polverizzazione l'abbiamo posto in un grande percolatore, aggiungendo una sufficiente quantità di etere di petrolio (p. e. 40°-50°) per saturare la droga, formando sopra di questa uno strato di liquido di almeno un centimetro di altezza. Quando il liquido è incominciato a gocciolare dal percolatore, chiuso il rubinetto, si è lasciato macerare per 24 ore. Trascorso tale termine si è aperto il percolatore e si è lasciato procedere la percolazione, continuando ad aggiungere etere di petrolio, sino a quando il liquido raccolto sopra un vetrino di orologio ed evaporato al calore ambiente, non lasciava più alcun residuo biancastro (grassi). Giunti a questo punto, rimosso il residuo dal percolatore lo si è esposto all'aria per disseccarlo eliminando l'etere, e di nuovo si è ridotto in polvere e pesata la massa per constatare la diminuzione del peso durante la percolazione. Fra grassi eliminati e materiale perduto durante i diversi travasi e triturazione, la droga si è ridotta a gr. 270. Si ripone la droga in percolatore e la si bagna con una quantità di acido tartarico all'1% e di alcole a 95° in modo da avere una pasta con un'umidità del 30% circa. Per gr. 270 di droga si sono adoperati:

gr. 300 di alcole a 95°; cc. 300 di H₂O bidistillata; gr. 6 di acido tartarico; si è lasciato macerare il tutto per 6-8 ore. Secondo la Farmacopea già nominata e per gr. 1000 di droga proveniente da sclerozi naturali, si devono raccogliere 8 porzioni di percolato di cc. 500 ciascuna, per gr. 400 di sclerozi da noi usati, si raccolgono 8 porzioni di liquido da cc. 200 ciascuna. Quindi in conformità alla soluzione sopra fatta si è stabilita la proporzione:

$$600 : 6 = 1600 : x \quad \text{dove} \quad x = 16.$$

Si pesò perciò una quantità di acido tartarico pari a gr. 16 poichè tale è la quantità di detto acido che si deve sciogliere in cc. 800 di H₂O per avere, con l'aggiunta ancora di gr. 800 di alcole a 95°, un liquido all'1% di acido ed al 50% di alcole. Con detta miscela di cc. 1600 circa si iniziò una nuova percolazione della droga, sino a raccogliere tutto il liquido impiegato dopo però aver macerato la stessa per 40-48 ore. Il liquido di color rosso-bruno caratteristico, di sapore amarognolo, venne raccolto in otto porzioni distinte da cc. 200 ciascuna e conservato in ghiacciaia. Dopo qualche giorno, eliminato il deposito di tartrato fermatosi in fondo ai recipienti, si mescolarono completamente le otto porzioni di estratto e se ne sottopose la metà circa all'evaporazione dell'alcole, a temperatura inferiore

(1) Siamo particolarmente grati al Prof. L. DE CARO, Direttore dell'Istituto di Fisiologia dell'Università di Pavia, per l'aiuto datoci in queste prove.

ai 60° C. giovandoci di una pompa a vuoto d'aria. In tal modo si ottenne circa cc. 400 di estratto fluido non più alcoolico, pronto per essere adoperato e titolato nei principi attivi col successivo saggio biologico.

Titolazione dell'estratto fluido degli sclerozi naturali con il metodo biologico di Broom e Clark

Preparato dunque l'estratto naturale secondo il metodo riferito, abbiamo proceduto alla esecuzione della prova biologica mediante il metodo di Broom e Clark adottato dalla Farmacopea spagnola. Gli alcaloidi della Segale cornuta, sull'utero umano e degli animali agiscono con due azioni principali: una di queste è comune a tutti, salvo dettagli di intensità o di tempo, si tratta dell'azione costrittrice sull'utero e su tutti gli organi a muscolatura liscia. L'altra azione, posseduta solo dagli alcaloidi insolubili in acqua, è quella paralizzante sulle funzioni simpatiche del sistema vegetativo.

L'inversione adrenalina della prova di Broom e Clark è in relazione diretta con questa azione paralizzante.

Il fenomeno consiste in questo: fissata una determinata azione su un determinato organo (utero) *in vitro*, se, all'applicazione dell'adrenalina, si fa precedere una applicazione di uno o più alcaloidi della Segale cornuta, aventi azione simpaticolitica, l'azione dell'adrenalina viene inibita (annullamento) o addirittura cambiata di segno (inversione). Si sa che l'adrenalina produce contrazioni persistenti sull'utero, contrazioni che nei miogrammi si rilevano sotto forma di aumento del tono e rafforzamento del ritmo; l'aggiunta dell'adrenalina al liquido nutritizio, in cui è immerso il segmento di utero in esame e sul quale precedentemente si era fatta agire, ad esempio dell'ergotamina, produce caduta del tono e cessazione del ritmo.

Veniamo ora agli esperimenti: In un bagno a 37° si pone un recipiente contenente liquido di Ringer; nel liquido nutritizio viene immerso un frammento di utero di coniglia vergine uccisa al momento dell'esame, una estremità del quale viene fissata a mezzo di apposito uncino al fondo del recipiente su apposito supporto, mentre l'estremità superiore viene collegata ad una leva scrivente sopra un cilindro affumicato. Il tutto completato da un termometro e da un sistema di tubi per l'entrata nel bagno di ossigeno e per il lavaggio del preparato.

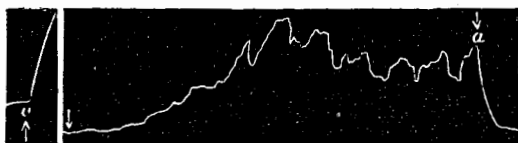


Fig. 9 — Miogramma ottenuto con 0,5 gr. di droga naturale.
L'inversione dell'effetto dell'adrenalina è evidente in a.

Dimostrata l'azione dell'adrenalina sul frammento di utero, si lava il preparato con soluzione fisiologica e si mette nel recipiente interno cc. 1 di estratto fluido pari a 1 gr. di droga naturale; la leva scrivente registra le contrazioni toniche e ritmiche del grafico (fig. 9). L'azione nel primo tratto saliente della curva è dovuta alle amine. L'azione amonica non è del tutto da scartare in sinergismo con gli alcaloidi.

Rileviamo che nel nostro estratto naturale le amine sono presenti e attive e continuando l'esame della curva del grafico si constata che dopo l'azione amonica di breve durata, appare una curva che rappresentava le contrazioni toniche e ritmiche degli alcaloidi della Segale cornuta. A questo punto se si aggiunge ancora al preparato alcune gocce di adrenalina

senza lavare, le contrazioni cessano con una caduta del tono (inversione). Prevale quindi l'azione paralizzante degli alcaloidi sul simpatico-motore, e l'adrenalina agisce come inibitore dando il rilasciamento e l'inversione. Se ne ricava che in 1 grammo della nostra droga, pari a cc. 1 di estratto fluido, era contenuto tanto di alcaloide da provocare contrazioni toniche sopra l'utero di coniglia ed invertire l'azione adrenalina e si può stabilire che in 1 grammo della nostra droga erano contenuti almeno 50 γ di alcaloide, come tartrato di ergatamina e come risulta da ulteriori prove fatte nelle stesse condizioni adoperando come alcaloide una soluzione standardizzata di tartrato di ergotamina. Operando come in precedenza ma con soli cc. 0,5 di estratto si potè precisare che i 50 γ erano presenti anche in mezzo grammo di droga naturale. Con un quarto di cc. di estratto non si osservò contrazioni del tipo precedente e si potè escludere che vi fossero contenuti 50 γ di alcaloide come tartrato.

Preparazione dell'estratto e titolazione da colture di 9 mesi di età.

L'estratto è stato preparato con gli stessi metodi e modalità del precedente, solamente si è avuto la cura di eliminare l'agar e di essiccare le colture in un essiccatore a CaCl₂. Alle prove biologiche dell'estratto artificiale ottenuto dalle nostre colture, abbiamo ritenuto opportuno far precedere alcuni saggi sopra un estratto del materiale di vecchie colture. Le colture durante nove mesi erano giunte alla fase microscleroziale. Dopo alcuni saggi di orientamento con 1 e 2,0 cc., pari a gr. 0,5 e 1,0 di droga secca da coltura, che dettero esito negativo, si usarono cc. 4 di estratto pari a gr. 2 di droga. Ma anche in questo saggio il grafico presenta andamento quasi uniforme e all'aggiunta dell'adrenalina non si ha l'inversione.

Saggi chimici e fisici sull'estratto di colture di 9 mesi di età.

La presenza di alcaloidi in tracce è dimostrata da prove chimico-fisiche, aventi risultato positivo con le reazioni di Tanret e quella di Keller.

L'estratto dava precipitato coi reattivi generali per gli alcaloidi (es. Mayer, acido picrico in mezzo cloridrico ecc.). Si è applicata l'analisi cromatografica alla luce ultravioletta, approfittando del fatto che i vari alcaloidi della Segale cornuta hanno una diversa fluorescenza alla luce ultravioletta, fluorescenza che è molto forte e che varia dal blu al blu verde. Sia macroscopicamente che microscopicamente il metodo ha dato risultati positivi. Macroscopicamente: (Apparecchio di Wood). Fu esaminato per trasparenza in provetta l'estratto naturale e quello artificiale, ed ambedue diedero netta fluorescenza verde caratteristica, solo più marcata nel primo caso. L'estratto alcoolico non evaporato presentava fluorescenza blu violetta. I liquidi *in toto* provenienti dalle reazioni di Tanret e di Keller confermarono quanto sopra. Microscopicamente: È il metodo che nelle analisi vegetali viene sfruttato per ricercare direttamente i principi attivi nelle piante (ad es. la berberina nel *Berberis vulgaris* appare alla prova microscopica alla luce di Wood, con una colorazione verde azzurra fluorescente, che circonda la zona del libro compenetrandone la lignina circostante). Sulla scorta di questo metodo furono esaminati vari preparati e strisci su vetrini e precisamente:

1) Il precipitato ottenuto col reattivo di Meyer in ambedue gli estratti, naturale ed artificiale: esito positivo.

2) Direttamente gli estratti naturali ed artificiale: esiti positivi.

3) Sezioni di sclerozi naturali e di tessuto microscleroziale di coltura: esito positivo.

Preparazione dell'estratto e titolazione da colture di 3 mesi di età.

Abbiamo preparato con gli stessi metodi riportati in precedenza due estratti: uno ricavato dalle colture coloratesi in violetto (forma microscleroziale e pseudoscleroziale), l'altro delle colture rimaste bianche (forma cotonosa).

I saggi biologici sull'estratto di colture violette, operando come per i saggi sull'estratto naturale dettero i seguenti risultati:

1°) Saggio. Grammi 0,5 di droga artificiale corrispondono a cc. 1,5 di liquido.

Aggiunta l'adrenalina al bagno di Ringer e ottenuta la curva corrispondente alla sua azione sull'utero, si lavò il preparato e vi si aggiunsero cc. 1,5 di estratto fluido non più alcolico. Il grafico non rilevò la presenza di amine; il frammento di utero invece incominciò a contrarsi poco dopo ed in modo uniforme. Tali contrazioni rispecchiarono l'azione evidente degli alcaloidi della Segale; motilità ritmica dell'utero; la frequenza delle contrazioni aumentò gradatamente e si mantenne per oltre 20 minuti. All'aggiunta dell'adrenalina non si ottenne inversione, e ciò fa supporre la presenza di alcaloidi solo in minime tracce (meno di 50 gamma).

2°) Saggio. Grammi 1 di droga artificiale corrispondono a cc. 3 di liquido.

Presenza di amine in minima quantità; successivamente la motilità ritmica procedette con la stessa intensità propria dell'alcaloide. Annullamento dell'azione adrenalinica, ma si ha ragione di supporre che l'adrenalina usata fosse poca attiva.

3°) Saggio. 1 grammo di droga corrisponde a cc. 2 di liquido (fig. 10). La prova ha luogo alla distanza di 8 giorni dalla precedente, l'estratto è stato conservato in ghiacciaia e concentrato. Si ebbe cura di adoperare adrenalina di fabbricazione diversa da quella precedente e sicuramente molto attiva; si usarono frammenti di utero di coniglia molto consistenti. Operando nel modo noto, all'aggiunta della droga si manifestò immediatamente un effetto aminico molto considerevole.

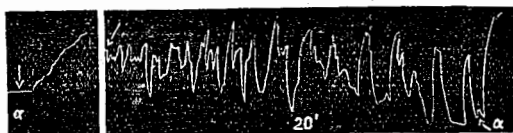


Fig. 10 — Miogramma ottenuto con gr. 1,0 di droga da colture. Manca l'inversione dell'effetto adrenalinico (α). Evidenti le contrazioni determinate dalla presenza di alcaloidi uterotonici ($t = 20'$).

Dopo qualche minuto le contrazioni registrate cambiarono di ritmo e di ampiezza, assumendo un andamento molto regolare continuamente in aumento. L'effetto aminico dopo i primi 5 minuti si poté escludere. Dopo oltre 20 minuti il miogramma continuò sempre registrando delle contrazioni toniche di ampiezza e durata considerevole, ciò che fece pensare alla presenza nella droga di alcaloidi uterotonici in notevole quantità. Mancò l'inversione adrenalinica (mancanza di alcaloidi simpaticolitici).

4°) Saggio. Grammi 1,5 della droga precedente (fig. 11).

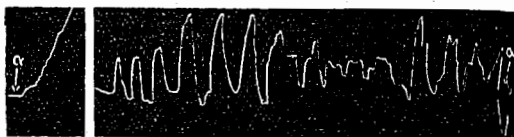


Fig. 11 — Miogramma ottenuto con gr. 1,5 di droga da coltura. Manca l'inversione dell'effetto adrenalinico (α).

Il miogramma molto evidente e regolare confermò quanto trovato nel saggio precedente; le contrazioni toniche dell'utero durano molto a lungo dimodochè possiamo escludere che

siano stati di natura aminica. Il grafico è somigliantissimo a quello ottenuto sopra una porzione del medesimo utero con l'aggiunta al preparato di Ginergen Sandoz (non si riporta il grafico).

Il saggio biologico sull'estratto di colture alla forma calcinosa, operando come per i saggi sull'estratto naturale, dette il seguente risultato: Grammi 1 di droga artificiale corrispondono a cc. 1 di estratto. Aggiunta la droga al bagno di Ringer il grafico rilevò subito la presenza di amine, mentre successivamente le contrazioni si fecero più regolari, più ritmiche e si mantennero tali per oltre 20 minuti. All'aggiunta di adrenalina non si ebbe l'inversione. Possiamo supporre perciò che siano presenti alcaloidi uterotonici.

Saggi chimici e fisici sugli estratti di colture di 3 mesi di età.

I saggi chimici e fisici sono quegli stessi effettuati per l'estratto di colture di 9 mesi di età e risultano positivi.

Conclusioni.

I nostri risultati stabiliscono la presenza di alcaloidi nelle colture in agar di *Sphacelia* e si accordano con quelli recenti di SCHWEIZER (1941) e di DE TEMPE (1945) i quali studiosi hanno maggiormente lavorato in argomento. Il primo ha eseguito le colture procedendo con un diverso metodo, e cioè utilizzando una pasta di semi di segale sterilizzata con sostanze chimiche fatte poi evaporare nel vuoto. DE TEMPE, che ha ripetuto le ricerche anche con il metodo di SCHWEIZER e con quello delle colture in agar, ha saggiato, come l'altro studioso, il contenuto totale in alcaloidi.

Secondo il SCHWEIZER il contenuto totale di alcaloidi nelle colture oscilla da un minimo di 0,25 % ad un massimo di 0,32 % e sarebbe superiore a quello ottenuto per gli sclerozi naturali (0,08-0,27 %). Secondo il DE TEMPE si ha invece lo 0,003 % di alcaloidi nelle colture in agar e valori minori per alcaloidi solubili in acqua e quelli presenti nei filtrati di colture liquide.

Studiosi meno recenti davano valori diversi. Il BEKESY (1938) dava lo 0,014 % di alcaloidi da colture in agar e il MARTIN (1934) lo 0,059 % di alcaloidi pure da colture in agar.

Le nostre ricerche sono state volte a determinare una delle azioni farmacologiche della droga e cioè l'azione simpaticolitica che si sa essere posseduta solo da una parte degli alcaloidi in essa contenuti e cioè dagli alcaloidi del tipo ergotamina. In una recente rassegna STOLL (1945) ha riepilogato le conoscenze attuali sugli alcaloidi della Segale cornuta. L'attività degli alcaloidi del tipo ergotamina è di natura complessa, e vi si suole distinguere una azione sulla muscolatura liscia (utero, vasi, stomaco, intestino, ecc.) e una azione inibitrice sulle funzioni simpatiche del sistema vegetativo. La catena polipeptidica degli alcaloidi del tipo dell'ergotamina è ritenuta responsabile dell'azione simpaticolitica. Questa ipotesi è stata confermata mediante l'idrogenazione parziale con la quale si satura il doppio legame facilmente riducibile del radicale lisergico, essendo l'acido lisergico, secondo JACOBS, il principale e caratteristico costituente di tutti gli alcaloidi della Segale cornuta.

È evidente l'interesse di conoscere il meccanismo d'azione farmacologico degli estratti fluidi ricavati dalle colture, piuttosto che la titolazione quantitativa, ai fini di una utilizzazione industriale della coltura artificiale della *Sphacelia*. Quanto abbiamo esposto ci fa considerare opportune le ricerche compiute per giungere alla preparazione di estratti attivi con il metodo della coltura in agar.

BIBLIOGRAFIA

- BEKESY N. Von (1938) - Centralblatt Bakt. II Abt. 99, 321.
DE TEMPE S. (1945) - Dissertazione di Laurea. Baarn.
JARETZKY R. (1935) - Arch. d. Pharm. u. Berlin. 273, 348.
MC. CREA A. (1931) - Am. Journ. of Bot. 18, 50.
KIRCHOFF H. (1929) - Centralblatt Bakt. Abt. 77, 310-367.
MARTIN N. J. (1934) - Dissertazione di Laurea. Baarn.
ROTHLIN (1931) - Pharm. Weekbl. 68, 668.
SCHWEIZER G. (1941) - Phytoph. Zeitschr. 13, 317.
STERNON R. (1936) - Bull. Acc. Roy. Méd. Belg. 463.
STOLL A. (1945) - Experientia 1, 250.

Riassunto

L'A. illustra i risultati ottenuti con il metodo biologico di Broom e Clark nella titolazione dell'estratto fluido di colture di Claviceps purpurea in agar, rilevandone l'assenza di alcaloidi simpaticolitici; presenti gli uterotonici.

Summary

With Brooms and Clark's biological method, the fluid extract of cultivated Claviceps purpurea has been titrated. Sympaticolytic alkaloids are absent; uterotonics are present.

Diabete sperimentale da acido dialurico

A. Rossi Fanelli e N. Siliprandi

ISTITUTO DI CHIMICA BIOLOGICA DELL'UNIVERSITÀ DI PAVIA

Come è noto recentemente in America è stata molto studiata una nuova forma di diabete sperimentale: il diabete da allossana. JACOBS (1) per il primo nel 1937 osservò che iniettando per via endovenosa in animali da esperimento l'allossana, ureide dell'acido mesossalico, si provoca iperglicemia e diabete. Intorno a questa prima osservazione fiorirono ben presto numerosissime ricerche (2) soprattutto ad opera di autori nordamericani e l'argomento è tuttora all'ordine del giorno.

Questa nuova forma di diabete è assai interessante sia perchè riproduce negli animali da esperimento un quadro morboso assai più vicino al diabete umano che non lo sia il diabete chirurgico, sia perchè rende possibile la riproduzione su larga scala del diabete in animali da laboratorio di piccola taglia in cui il trattamento chirurgico è assai indaginoso o addirittura impossibile. Queste esperienze aprono poi nuove vie alle ricerche sulla patogenesi ed il trattamento del diabete stesso. Anche noi (3) recentemente (1945) abbiamo eseguite in questo campo ricerche i cui risultati si possono così brevemente riassumere: iniettando, per via intraperitoneale, a ratti normali del peso medio di 190 g. e tenuti a dieta mista, 150-200 mg. pro Kg. di peso di allossana disciolta in acqua, si manifesta un quadro assai simile al diabete umano con iperglicemia, (che può raggiungere fino il 6‰), glicosuria, (che va fino