

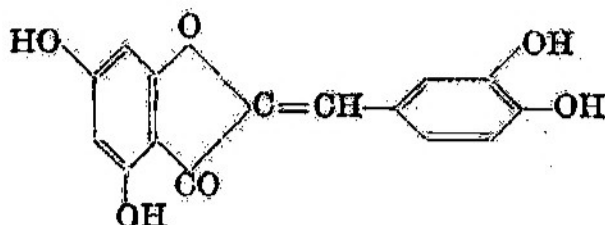
27. Alessandro BALLIO, Simon DITTRICH e G. B. MARINI-BETTÒLO. —
La costituzione dell'aglicone del cernuoside, il pigmento giallo
dei fiori di « *Oxalis cernua* Thumb ».

Riassunto. — L'aglicone che si ottiene per idrolisi del cernuoside — il glucoside giallo dei fiori di *Oxalis cernua* Thumb. — è identico al 3'-4'-4'-6-tetraossi-benzalcumarone (aureusidina), che era già stato ritrovato sotto forma di glucoside (aureusina) nei fiori di *Anthirinum majus* da Seikel e Geissman. Il cernuoside, invece, risulta essere diverso dall'aureusina e rappresenta pertanto il terzo caso in cui viene riscontrata in natura la presenza di glucosidi di polioSSI-benzalcumaroni.

In un lavoro precedente ⁽¹⁾ erano stati descritti l'isolamento e le caratteristiche di un nuovo glucoside cristallino presente nei fiori di *Oxalis cernua* Thumb., una ossalidacea particolarmente diffusa nel bacino del Mediterraneo.

Da questo glucoside, che è stato indicato col nome di *cernuoside*, si era ottenuta per idrolisi una molecola di glucosio ed una di aglicone, la *cernuina*.

In questo lavoro si dimostra che a questo aglicone va attribuita la costituzione di 3'-4'-4'-6-tetraossi-benzalcumarone:



La cernuina è una sostanza di natura fenolica, come è indicato, oltre che dalla reazione con cloruro ferrico, dal fatto che viene facilmente acetylata con anidride acetica ed acetato sodico e alchilata con solfati alchilici.


I valori percentuali del carbonio e dell'idrogeno, ottenuti da un campione più volte purificato, come pure determinazioni indirette del peso molecolare, portarono ad ammettere che si trattasse di una sostanza a 15 atomi di carbonio.

La non facile purificazione di questo prodotto ed il suo punto di fusione poco netto indussero però a scegliere, per uno studio più appro-

(1) R. LAMONICA e G. B. MARINI-BETTÒLO, Ann. Chim., 42, 496 (1952).

fondito, anzichè l'aglicone alcuni suoi derivati funzionali. In particolare ci si soffermò sull'etere metilico che si può ottenere facilmente allo stato di assoluta purezza.

La determinazione delle percentuali di carbonio e di idrogeno e quelle del peso molecolare effettuate su questa sostanza permisero di attribuirle inequivocabilmente la formula grezza $C_{15}H_{12}O_6$; il dosaggio dei metossili secondo Zeisel dimostrò la presenza di quattro gruppi metossilici. Si ebbe perciò per l'etere metilico la formula parziale $C_{15}H_8O_2(OCH_3)_4$.

L'ossidazione permanganica della tetrametil-cernuina dette acido vetratico e quella della tetraetil-cernuina acido 3-4-dietossi-benzoico, il che stava a dimostrare la presenza di un gruppo  nella molecola dell'aglicone.

Queste osservazioni, ed in particolare la presenza di 15 atomi di carbonio in un pigmento giallo, fece logicamente ritenere che il composto in esame fosse un derivato del gruppo delle antoxantine: flavone, calcone o benzalcumaranone.

Il fatto che la cernuina e i suoi derivati dessero un precipitato rosso con pentacloruro di antimonio (2) e non la reazione della cianina con magnesio ed acido cloridrico (3), e l'osservazione che la demolizione alcalina della tetrametil-cernuina portasse soltanto alla formazione di prodotti amorfi, fecero supporre assai poco probabile per il composto una natura flavonica, ma non esclusero una struttura di calcone; quest'ultima, però, non si conciliava con il troppo basso contenuto di idrogeno del prodotto e con la presenza di due ossigeni non ossidrilici, che fanno presumere l'esistenza di un anello eterociclico.

L'esame degli spettri di assorbimento dell'aglicone e dei suoi derivati permise di escludere definitivamente tali strutture. Infatti i derivati flavonici, come è stato messo in evidenza prima da Shibata e coll. (4) e successivamente da Skarzynsky (5), posseggono dei massimi caratteristici nelle regioni da 240 a 290 m μ con bande piuttosto strette, mentre la cernuina e i suoi derivati mostrano dei massimi nettamente spostati verso le maggiori lunghezze d'onda. Questi spettri, pur riavvicinandosi a quelli dei calconi, ne differiscono alquanto perchè i massimi osservati cadono a lunghezze d'onda lievemente maggiori di quelle di norma riscon-

(2) G. B. MARINI-BERTOLO e A. BALLIO, questa Gazzetta, 76, 410 (1946).

(3) R. WILLSTÄTTER, Sitz. Preuss. Akad. Wiss., 29, 775 (1914); J. SHINODA, J. pharm. Soc. Japan, 48, 35 (1928).

(4) Acta phytochimica, 1, 92 (1923).

(5) Biochem. Z., 301, 150 (1939).

trate per i calconi (⁶); la differenza è particolarmente evidente nel caso dell'acetato dell'aglicone che presenta due massimi nella zona tra 300 e 400 m μ , mentre gli acetati dei polioossicalconi ne mostrano uno soltanto (⁷). Le curve di assorbimento della cernuina e dei suoi derivati funzionali sono in ottimo accordo, invece, con quelle di alcuni poliossi-benzalcumaranoni recentemente studiati da Geissman e coll. (⁸).

In base a queste considerazioni le proprietà fisiche della cernuina e dei suoi derivati furono confrontate con quelle dei benzalcumaranoni fino ad oggi conosciuti, e si trovò così che la cernuina corrisponde al 3'-4'-4-6-tetraossi-benzalcumaranone. Questo composto, già noto col nome di *aureusidina*, costituisce l'aglicone del pigmento di *Antirrhinum majus* (bocca di leone) studiato da N. K. Seikel e T. A. Geissman (⁹); questi Autori ne avevano preparato anche il tetracetato ed il tetrametiletere, risultati ora identici ai rispettivi derivati della cernuina, e ne avevano dimostrato la costituzione per identificazione della tetrametil-aureusidina col 3'-4'-4-6-tetrametossi-benzalcumaranone, che era già noto in letteratura (¹⁰).

Nella tabella I sono riportati di confronto i punti di fusione delle due serie di composti e nella tabella II le caratteristiche spettroscopiche.

L'identità tra aureusidina e cernuina fu confermata effettuando un punto di fusione misto, che non mostrò depressione, tra l'etere tetrametilico della aureusidina e quello della cernuina; il nome di cernuina va quindi abbandonato.

Non fu invece possibile stabilire l'identità tra il cernuoside dell'*Oxalis cernua* Thumb. e l'aureusina (glucoside dell'aureusidina) dell'*Antirrhinum majus*; quest'ultima, infatti, non è stata isolata allo stato di purezza, nè se ne conoscono le proprietà chimiche e fisiche, cosicchè le due sostanze non sono direttamente paragonabili. Un confronto, però, fra i rispettivi epta-acetati, i cui punti di fusione differiscono fra loro di 100°, porta ad escludere l'identità dei due glucosidi.

Il cernuoside costituisce il terzo caso in cui viene accertata in natura la presenza di glucosidi di poliossi-benzalcumaranoni; la costituzione di

(⁶) Y. SHIRATA e W. NAGAI, J. Chem. Soc. Japan, 43, 101 (1923); A. RUSSEL, J. TODD e C. L. WILSON, J. Chem. Soc., 1940 (1934); H. H. SZMANT e A. J. BASSO, J. Am. Chem. Soc., 74, 4397 (1952).

(⁷) M. K. SEIKEL e T. A. GEISSMAN, J. Am. Chem. Soc., 72, 5720 (1950).

(⁸) Loc. cit., J. Am. Chem. Soc., 65, 672 (1943); 66, 486 (1944); 72, 5725 (1950); 73, 5765 (1951).

(⁹) J. Am. Chem. Soc., 72, 5725 (1950).

(¹⁰) H. DUMONT e J. TAMBOR, Ber., 43, 1971 (1910); W. H. PERKIN, J. N. RAY e R. ROBINSON, J. Chem. Soc., 951 (1926); T. A. GEISSMAN e D. K. FUKUSHIMA, J. Am. Chem. Soc., 70, 1688 (1948).

TABELLA I.

Sostanza	Cristallizzata da	P. F.	Reazioni cromatiche	Sostanza (*)	Cristallizzata da	P. F.	Reazioni cromatiche
Cernuside	C_9H_6OH 30 %	250-58°	+ $FeCl_3$ col. verde nera + $NaOH$ » arancione + H_2SO_4 » rossa + $Pb(CH_3COO)_2$ prec. rosso	Aurensina	non isolata		+ $FeCl_3$ col. nero-verdastra + $NaOH$ col. arancione + $Pb(CH_3COO)_2$ prec. rosso
Eptaacetilcerunside .	$C_{21}H_{12}OH$ ass.	169°-170°	+ $NaOH$ col. rossa	Eptaacetilaurensina .	$CH_3COOC_2H_5$	260°	+ $NaOH$ col. rossa + H_2SO_4 col. arancione
Cernuna	CH_3COOH $CH_2OH + H_2O$	280°-285°	+ $FeCl_3$ col. bruno nero + H_2SO_4 col. arancione + $NaOH$ col. rossa	Aurensina	$CH_2OH + H_2O$	265-273°	+ $FeCl_3$ col. bruna + H_2SO_4 col. arancione + $NaOH$ col. arancione
Tetraacetilcerunna .	$CH_3COOC_2H_5$	188-9°	+ H_2SO_4 col. rossa	Tetraacetilaurensina .	CH_2OH $CH_3COOC_2H_5$ + et. petr.	184-5°	+ $NaOH$ col. rosso-bruno + H_2SO_4 col. rosso-bruno.
Tetrametilcerunna .	C_9H_6OH	173°	+ $SbCl_5$ fiocchi rosso-violetti (***)	Tetrametilaurensina	C_9H_6OH	169-172°	+ H_2SO_4 col. rossa
Tetraetilcerunna . .	C_9H_6OH	144°	+ H_2SO_4 col. rossa				

(*) I dati dei prodotti qui riportati sono tratti dalla pubblicazione di M. K. SERKEZ e T. A. GROSSMAN di cui alla nota (7).

(**) Saggi eseguiti su un estratto parzialmente purificato di fiori in alcool metilico.

(***) La reazione con $SbCl_5$ era stata data (2) come distintiva tra calcioni e α -derivati divonici. Il risultato ottenuto con la tetrametilcerunna indica che la reazione è positiva anche per questa classe di composti i quali come i calcioni contengono un gruppo chetonico attivato da un doppio legame non facente parte di un anello.

TABELLA II.

SPETTRI DI ASSORBIMENTO (*)

S o s t a n z a	B a n d a I		B a n d a I I		log _e
	λ max mμ	λ min mμ	λ max mμ	λ min mμ	
Cernoside	407,7	290	255	250	3,98
Eptacetil-cernoside (1)	377	345		245	4,09
	310	275			
	375	343			
» (2)	310	275	244	239	4,11
	368	353			
	326	276			
Cernuina	403	290	255 †	267 †	3,89
	398,5	288	269	263	3,89
Aureusidina (3)			254 †		3,95
Tetrametil-cernuina	400	287,5	255	245	4,03
	397	288	254	243	4,01
Tetrametil-aureusidina (3)					
Tetraacetil-cernuina (1)	375	347	255		4,31
	320	285			
» (2)	375	340			
	320	317			
Tetraacetil-aureusidina (2)	310	278	251	237,5	4,05
	374,5	346,5			
	317	279,5			

(*) Determinati con lo spettrofotometro Beckman DU, con lettura ogni 2 mμ e ogni 0,5 mμ ai massimi. Le sostanze sono state esaminate in soluzione alcoolica, tranne l'eptacetato del cernoside e il tetraacetato della cernuina che sono state esaminate in soluzione di alcool assoluto (1) e di acetato di etile (2); le soluzioni nel primo solvente sono sempre colorate in giallo intenso probabilmente a seguito di un'alterazione dei prodotti.

(3) I dati riferentisi a questo prodotto sono tratti dal lavoro di SEIKEL e GRISMAN citato in (1).

questo glucoside rappresenta il soggetto di esperienze in corso, sulle quali ci si propone di riferire in seguito.

PARTE SPERIMENTALE

Cernuoside (glucoside del 3'4'-4-6-tetraossi-benzalcumaranone). — Si isola dai fiori di *Oxalis cernua* Thumb. come descritto in un precedente lavoro [v. (1)]; l'analisi allora riportata, non essendo d'accordo per i valori del solo idrogeno con la struttura ricavata in base ai dati analitici dei derivati, è stata ripetuta su un campione purificato più volte per cristallizzazione dall'alcool etilico al 30% e seccato nel vuoto a 80°. Si ottiene così in cristalli aghiformi. All'analisi ha dato:

trov. % : C 54,98-53,98; H 4,73-4,60;
per $C_{21}H_{20}O_{11} \cdot H_2O$ calc. : 54,06 ; 4,75.

Il glucoside associa stabilmente una molecola di acqua che perde per riscaldamento a 140°; la perdita in peso di un campione puro è stata del 3,71% (calc. per $C_{21}H_{20}O_{11} \cdot H_2O$: 3,86%).

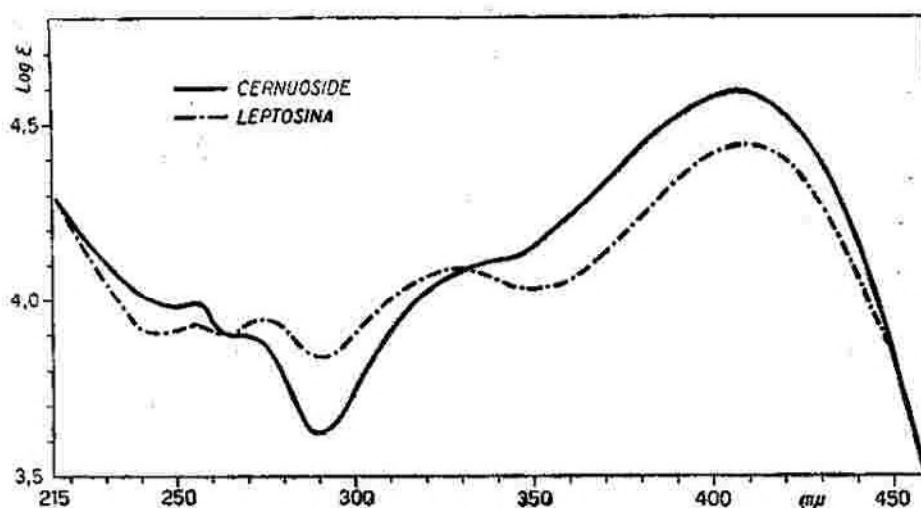


FIGURA 1. — Spettri di assorbimento del cernuoside e della leptosina.

Nelle tabelle I e II sono riportate le reazioni caratteristiche e i dati spettroscopici della sostanza, e nella fig. 1 il suo spettro di assorbimento confrontato con quello della leptosina, l'unico altro glucoside naturale del gruppo dei polioossi-benzalcumaranoni isolato allo stato cristallino (11) e di cui sia noto lo spettro di assorbimento [v. (9)].

Eptacetato del cernuoside. — Grammi 0,3 di cernuoside vengono riscaldati per 3 ore all'ebollizione con g 0,6 di acetato sodico fuso e cm³ 5 di anidride acetica. La miscela si lascia raffreddare, quindi si versa

(11) T. A. GEISSMAN e C. D. HEATON, J. Am. Chem. Soc., 65, 677 (1943).

agitando in cm^3 100 di acqua: il prodotto si separa sotto forma di una massa resinosa che solidifica dopo qualche tempo.

Il prodotto cristallizza da benzolo-etero di petrolio o meglio da alcool etilico assoluto. Si ottiene così in aghetti bianchi che fondono a $169-170^\circ$, insolubili in etero di petrolio, solubilissimi in acetato di etile, in acetone e in alcool a caldo.

Il composto seccato nel vuoto a 30° ha dato all'analisi:

trov. % : C 56,55-56,68; H 4,63-4,97;
per $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$ calc. : 56,59 ; 4,61.

Nelle tabelle I e II sono riportate le reazioni caratteristiche e i dati spettroscopici della sostanza.

Lo stesso prodotto si ottiene effettuando l'acetilazione secondo Seikel e Geissman [v. (9)] i quali riportano per due campioni dell'epta-acetato dell'aureusina punti di fusione di $264,5-265,5^\circ$ e $260-260,5^\circ$.

3'-4'-4-6-tetraossi-benzalcumaranone. — Si ottiene per idrolisi acida del cernuoside con acido solforico dil. al 3% secondo quanto riportato in precedenza. Grammi 0,250 di cernuoside hanno dato g 0,155 di cernuina (calc. per $\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$: g 0,163). Il prodotto viene purificato per cristallizzazione dall'acido acetico diluito oppure meglio disciogliendolo nella quantità necessaria di alcool metilico e aggiungendo 5 volumi di acqua calda; ripetendo più volte questo secondo procedimento si ottiene in ciuffi di microcristalli aghiformi di color arancio.

Il prodotto seccato nel vuoto a 80° , fonde a $280-285^\circ$ e all'analisi ha dato:

trov. % : C 58,95-59,10; H 4,10-4,10;
per $\text{C}_{18}\text{H}_{10}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ calc. : 59,21 ; 3,98 .

Nelle tabelle I e II sono riportate le reazioni caratteristiche e i dati spettroscopici della sostanza.

3'-4'-4-6-tetracetossi-benzalcumaranone. — Si riscaldano a ricadere per 3 ore g 0,3 di aglicone con g 0,6 di acetato sodico fuso e cm^3 5 di anidride acetica.

La soluzione dà per diluizione con acqua un prodotto giallastro che, dopo ripetute cristallizzazioni dall'acetato di etile o dall'alcool, si presenta in cristalli aghiformi bianchi che fondono a $188-189^\circ$ anche in miscela con un campione di tetracetato di aureusidina. Il composto ha dato all'analisi:

trov. % : C 60,74-60,50; H 4,05-4,10;
per $\text{C}_{29}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$ calc. : 60,79 ; 3,99 .

Nelle tabelle I e II sono riportate le reazioni caratteristiche e i dati spettroscopici della sostanza.

3'-4'-4-6-tetrametossi-benzalcumaranone. — Grammi 1 di aglicone sospesi in cm³ 200 di acetone secco si scaldano a ricadere 14 ore assieme a g 20 di carbonato potassico anidro e cm³ 4 di solfato dimetilico secco. Terminato il riscaldamento si separa per filtrazione la soluzione acetonica dai sali inorganici, si evapora a b. m. ed il residuo si riprende con cm³ 30 di idrato sodico al 3%. La sospensione si agita meccanicamente per un'ora, poi si raccoglie il precipitato, lo si lava ripetutamente con acqua e dopo essiccamento, si cristallizza da alcool etilico.

Si ottiene così in aghetti giallo-verdastri fondenti a 173° anche in miscela con un campione di tetrametil-aureusidina. Il composto ha dato all'analisi:

	trov. % :	C 66,66-66,81-66,65 ;	H 5,12-5,20-5,08 ;
per C ₁₅ H ₁₈ O ₆	calc. % :	66,66	5,30.
	trov. % :	OCH ₃ 35,4 ;	
per C ₁₅ H ₈ O ₂ (OCH ₃) ₃	calc. :	36	.

Una determinazione del peso molecolare con il micro-metodo di Rast ha dato un p. m. di 320: per C₁₅H₁₈O₆ si calcola 342.

Nelle tabelle I e II sono riportate le reazioni caratteristiche e i dati spettroscopici della sostanza.

3'-4'-4-6-tetraetossi-benzalcumaranone. — L'etilazione dell'aglicone è stata effettuata con solfato dietilico e con le stesse modalità eseguite per la metilazione. Il prodotto si cristallizza dall'alcool etilico e si ottiene in aghetti gialli che fondono a 144°.

	trov. % :	C 69,30 ;	H 6,44 ;
per C ₂₃ H ₂₆ O ₈	calc. :	69,33 ;	6,58.

Ossidazione permanganica della tetrametil-ceruvina. — Milligrammi 200 di tetrametil-aglicone si scaldano un'ora a b. m. bollente con cm³ 20 di una soluzione acquosa al 5% di permanganato potassico. La soluzione che si ottiene dopo aver allontanato per filtrazione il biossido di manganese, si acidifica cautamente con acido cloridrico (sviluppo di CO₂) e si raffredda energicamente. Il precipitato bianco voluminoso separatosi viene raccolto, lavato con acqua fredda e seccato; fonde così a 178° e dopo una cristallizzazione dall'acqua a 179°, anche in miscela con un campione di acido veratrico.

Ossidazione permanganica della tetraetil-ceruvina. — E' stata effettuata con le stesse modalità seguite per la tetrametil-ceruvina. Il precipitato ottenuto dopo acidificazione si cristallizza dall'acqua. Fonde così a 169-170°, sia da solo che in miscela con un campione di acido 3-4-dietossi-benzoico.

Comportamento cromatografico. — È stato studiato il comportamento del cernuoside, della cernuina e della tetrametil-cernuina nella cromatografia unidimensionale su carta.

Si è impiegata carta Whatman n. 1 e come solvente la miscela butanolo-acido acetico-acqua (4-1-5) alla temperatura di 18-19°. Sia il glucoside che l'aglicone possono essere visualizzati con soluzione alcoolica di cloruro ferrico al 2%; il glucoside, inoltre, e la tetrametil-cernuina sono fortemente fluorescenti e si possono visualizzare alla luce di Wood.

Nelle condizioni indicate si sono ottenuti i seguenti R_F : cernuoside 0,42 (*), cernuina 0,48, tetrametil-cernuina 0,80. In presenza di vapori di acido cloridrico gli R_F sono più alti; rispettivamente 0,56 per il cernuoside, 0,58 per la cernuina e 0,84 per la tetrametil-cernuina.

I risultati ottenuti confermano la regola di Bate-Smith⁽¹²⁾ per i composti naturali a 15 atomi di carbonio, per i quali era stato osservato che nel passare da un poliossiderivato all'etere metilico i valori dell' R_F aumentano.

Siamo grati al prof. G. Bargellini per il suo interessamento e per i suggerimenti che ci ha date nel corso di questo lavoro ed al prof. T. A. Geissman, dell'Università di California (Los Angeles), per il gentile invio di un campione puro di aureusidina.

Uno di noi (S. D.) ringrazia la Facultad de Química y Farmacia di Montevideo per una borsa di perfezionamento presso l'Istituto Superiore di Sanità.

Roma. — Istituto di Chimica organica dell'Università. Istituto Superiore di Sanità. Laboratorio di Chimica terapeutica - 4 marzo 1953.

(*) Il valore di 0,64 riportato precedentemente [v. (1)] era stato determinato alla temperatura di 30° anziché di 18-19°.

(12) E. C. BATE SMITH, *Biochemical Soc. Symposium on Partition Chromatography*, Cambridge, pag. 66 (1949), E. C. BATE SMITH e R. G. WESTALL, *Biochimica Biophysica Acta*, 4, 427 (1950).