

Effetto dell'atrattiloside e dell'insulina sul metabolismo del glucosio nel muscolo diaframma di ratto *in vitro*

FRANCESCO POCCHIARI, VITTORIO SILANO (*) e RENATO SANTI (**)

Laboratori di Chimica Biologica

Riassunto. — È stato studiato il metabolismo del glucosio uniformemente marcato ^{14}C nel diaframma isolato di ratto in presenza o in assenza di atrattiloside e di insulina.

L'atrattiloside fa diminuire significativamente il consumo di O_2 e la incorporazione della radioattività del substrato nell'acido fosfoglicerico mentre fa aumentare la produzione di CO_2 e di acido lattico radioattivi. L'insulina sia in assenza che in presenza di atrattiloside non provoca alcun effetto nei suddetti metaboliti, nè influenza il consumo di O_2 .

Per azione dell'atrattiloside la trasformazione del glucosio in glicogeno, sia solubile che insolubile e in oligosaccaridi viene ridotta di circa il 30 %; l'insulina aggiunta al mezzo di incubazione stimola la incorporazione della radioattività nel glicogeno e negli oligosaccaridi anche in presenza del glucoside, eliminando completamente il blocco della sintesi di glicogeno provocata dall'atrattiloside.

Summary. (*The effect of atractyloside and insulin on glucose metabolism in rat diaphragm muscle in vitro*). — A quantitative study has been carried out on the effects of atractyloside on aerobic glucose metabolism in rat diaphragm muscle both in the presence and absence of insulin. It was confirmed (Tables 1-3) that in presence of atractyloside the synthesis of glycogen as well as the oxygen uptake is decreased (BRUNI *et al.*, 1964); it was also found that the lactate and CO_2 production were increased (Tables 1,2) and that phosphoglyceric acid production was decreased by a factor five (Table 2). The specific activity of lactate does not change (Table 2), while that of CO_2 almost duplicates (Table 1). The inhibition of glycogen synthesis (Table 3) by atractyloside was completely removed by the addition of insulin to the incubation medium (Table 3), whereas the effects of the inhibitor on O_2

(*) Borsista dei Laboratori di Chimica Biologica.

(**) Direttore Istituto di Farmacologia dell'Università di Padova.

uptake, CO_2 , phosphoglyceric acid and lactic acid production were unaffected (Tables 1,2).

È stato dimostrato, nei Laboratori di Biochimica dell'Istituto di Sanità (BELOFF-CHAIN *et al.*, 1955), che nel muscolo diaframma isolato di ratto il glucosio è metabolizzato in glicogeno, oligosaccaridi, acido lattico e CO_2 e che l'insulina stimola la sintesi degli oligo e polisaccaridi mentre non ha alcun effetto sulla produzione di CO_2 e di acido lattico.

BRUNI, RAUSA & PATANIA (1958) hanno dimostrato che nel muscolo diaframma di ratto in presenza di attrattiloside vengono ridotti la sintesi di glicogeno ed il consumo di ossigeno, e che l'insulina rimuove il blocco della glicogenosintesi causato dall'attrattiloside. Le proprietà di questo glucoside (cfr. SANTI, 1964), emerse da successivi studi su mitocondri isolati, hanno messo in luce che esso inibisce i processi di trasferimento di energia (SANTI, 1958) influenzando alcune reazioni che coinvolgono gli adenin-nucleotidi (BRUNI, CONTESSA & LUCIANI, 1962; VIGNAIS, VIGNAIS & STANISLAS, 1962; BRUNI *et al.*, 1964; KEMP & SLATER, 1964; CHAPPEL & CROFTS, 1965; BRIERLEY & O'BRIEN, 1965), pertanto in funzione di quanto è noto sul meccanismo di sintesi di glicogeno nel tessuto muscolare (BELOFF-CHAIN *et al.*, 1964) è sembrato interessante estendere le ricerche di BRUNI, RAUSA & PATANIA (1958) allo studio dell'effetto dell'attrattiloside sul quadro completo del metabolismo del glucosio nel muscolo diaframma di ratto, usando il substrato marcato ^{14}C e la tecnica di radiocromatografia su carta, come descritta da BELOFF-CHAIN *et al.* (1955).

MATERIALI E METODI

Materiali

Il glucosio uniformemente marcato ^{14}C è stato ottenuto dal Radiochemical Centre, Amersham (Gran Bretagna) ed è stato utilizzato dopo diluizione con soluzione di glucosio non radioattivo in modo da avere un'attività specifica di 16,6 mc/mg. L'insulina, esente da glucagone, è stata ottenuta dai Lilly Laboratories, Indianapolis (U.S.A.).

Metodi

Preparazione ed incubazione del tessuto. — Il muscolo diaframma è stato prelevato da ratti Wistar maschi del peso di 150-200 g ed incubato in tampone di fosfato (STADIE & ZAPP, 1947) a pH 6,8 secondo la tecnica descritta in un precedente lavoro (BELOFF-CHAIN *et al.*, 1955). Il mezzo di incubazione conteneva glucosio 5,5 mM e, quando presenti, attrattiloside e insulina rispettivamente alla concentrazione 1,2 mM e 0,1 unità per ml.

Separazione e determinazione dei metaboliti radioattivi. — Alla fine dell'incubazione il tessuto veniva omogenato in alcool etilico al 60 % ed aliquote dell'estratto venivano cromatografate su carta usando gli stessi solventi descritti da BELOFF-CHAIN *et al.* (1955); aliquote del mezzo di incubazione erano anch'esse cromatografate su carta.

La radioattività incorporata nella $^{14}\text{CO}_2$ e nel residuo insolubile dell'estratto del tessuto, nonché quella presente nei metaboliti separati nei cromatogrammi su carta, venivano determinate come descritto da BELOFF-CHAIN *et al.* (1955) e FRANK *et al.* (1959).

Determinazione enzimatica dell'acido lattico. — L'acido lattico totale è stato determinato sia nel mezzo che nell'estratto con il metodo enzimatico descritto da SCHOLTZ *et al.*, (1959) usando i reattivi della Boehringer, Mannheim (Germania).

Identificazione dell'acido fosfoglicerico. — BELOFF-CHAIN *et al.* (1955), cromatografando i mezzi di incubazione su carta con il solvente alcool butilico terziario acqua (80 : 20) contenente 4 % di acido picrico, avevano notata la presenza di un metabolita radioattivo avente Rf 0,56 e si era suggerito che esso potesse essere un trioso fosfato. Tale composto è stato ora identificato come acido fosfoglicerico nel seguente modo: aliquote dei mezzi di incubazione sono state cromatografate a banda nel suddetto solvente; la striscia di carta corrispondente alla banda radioattiva avente Rf 0,56, individuata per mezzo della autoradiografia, è stata tagliata e lavata con una miscela anidra di acetone ed alcool etilico (1 : 1) fino a scomparsa della colorazione gialla dovuta all'acido picrico; dalla carta così lavata è stato eluito con acqua il metabolita radioattivo. L'analisi del fosfato solubile eseguita con il metodo di BERENBLUM & CHAIN (1938), ed il saggio con l'acido cromotropico (BARTLETT, 1959) hanno messo in evidenza che il composto conteneva una molecola di fosfato per una molecola di acido glicerico; cromatografando il prodotto con acido 2-fosfoglicerico ed acido 3-fosfoglicerico nei solventi impiegati da BELOFF-CHAIN *et al.* (1955) ed inoltre nel solvente indicato da COWGILL (1955), si è osservato che il metabolita radioattivo ha Rf identico a quello dell'acido 3-fosfoglicerico, anche se non si può escludere in modo definitivo la presenza dell'acido 2-fosfoglicerico.

RISULTATI

Dai valori riportati nella Tabella 1 risulta che l'attrattiloside causa una diminuzione del consumo di O_2 da parte del muscolo diaframma di ratto incubato con glucosio ed un aumento nella incorporazione di radioattività nella CO_2 ; pertanto l'attività specifica della $^{14}\text{CO}_2$ calcolata risulta aumentata per azione del glucoside. L'insulina non provoca nessuna variazione nei va-

TABELLA 1

Influenza dell'attrattiloside e dell'insulina sul consumo di O₂ e sulla produzione di CO₂ da glucosio nel muscolo diaframma di ratto.

Condizioni di incubazione *	Consumo di O ₂ (μ moli/g di tessuto, peso umido/90')	Produzione di ¹⁴ CO ₂ (μ moli/g di tessuto, peso umido/90')	Attività specifica calcolata della ¹⁴ CO ₂ **
Controllo	99 \pm 4	7,3 \pm 0,8	0,07
Con attrattiloside (1,2 · 10 ⁻³ M) . .	76 \pm 5	9,3 \pm 0,8	0,12
Con insulina (0,1 unità/ml) . . .	100 \pm 4	8,3 \pm 0,7	0,08
Con attrattiloside (1,2 · 10 ⁻³ M) e insulina (0,1 unità/ml)	78 \pm 5	10,0 \pm 1,0	0,12

* 100 mg di tessuto incubato a 37° C in O₂ per 90 min' in 1,2 ml di tampone fosfato a pH 6,8, contenente glucosio-(U)-¹⁴C allo 0,1 %. Valori medi di 10 esperienze \pm errore standard.

** Rapporto tra il ¹⁴CO₂ formato ed il consumo di O₂.

lori del consumo di O₂ e della produzione di ¹⁴CO₂ ottenuti sia in assenza che in presenza di attrattiloside. Inoltre l'attrattiloside stimola in modo significativo la produzione di acido lattico radioattivo e riduce a circa un quinto l'incorporazione della radioattività del glucosio nell'acido fosfoglicerico. L'attività specifica dell'acido lattico, relativa a quella del glucosio posta uguale a 1, è 0,46 e non è influenzata dalla presenza del glucoside. L'insulina non provoca alcuna variazione significativa nè sulla produzione di acido lattico nè su quella di acido fosfoglicerico sia in assenza che in presenza di attrattiloside (Tabella 2).

TABELLA 2

Influenza dell'attrattiloside e dell'insulina sulla trasformazione del glucosio in acido lattico ed in acido fosfoglicerico nel muscolo diaframma di ratto.

Condizioni di incubazione *	Glucosio trasformato (γ /100mg di tessuto, peso umido/90')		Attività specifica relativa dell'acido lattico **
	in acido fosfoglicerico	in acido lattico	
Controllo	64 \pm 12	188 \pm 24	0,46
Con attrattiloside (1,2 · 10 ⁻³ M) .	12 \pm 3	268 \pm 59	0,47
Con insulina (0,1 unità/ml) . . .	69 \pm 14	215 \pm 36	0,43
Con attrattiloside (1,2 · 10 ⁻³ M) e insulina (0,1 unità/ml)	13 \pm 2	304 \pm 50	0,48

* Condizioni sperimentali come in Tabella 1. Valori medi relativi a 10 esperienze \pm errore standard.

** Rapporto tra la quantità di glucosio radioattivo trasformato in acido lattico e la quantità totale di acido lattico.

Come chiaramente appare nella Tabella 3, il glucoside provoca una diminuzione della incorporazione della radioattività sia nel glicogeno e negli oligosaccaridi presenti nell'estratto del tessuto che nel glicogeno presente

TABELLA 3

Influenza dell'attrattiloside e dell'insulina sulla trasformazione del glucosio in glicogeno ed oligosaccaridi nel muscolo diaframma di ratto.

Condizioni di incubazione *	Glucosio trasformato (γ /100mg di tessuto, peso umido/90')	
	in glicogeno ed oligosaccaridi	in glicogeno del residuo insolubile
Controllo	24 \pm 5	16 \pm 4
Con attrattiloside ($1,2 \cdot 10^{-3}M$)	18 \pm 3	9 \pm 2
Con insulina (0,1 unità/ml)	64 \pm 10	24 \pm 6
Con attrattiloside ($1,2 \cdot 10^{-3}M$) e insulina (0,1 unità/ml)	65 \pm 10	22 \pm 5

* Condizioni sperimentali come in Tabella 1. Valori medi relativi a 10 esperienze \pm errore standard.

nel residuo insolubile, riducendoli rispettivamente del 25 % e del 40 %. L'insulina, come già trovato da BELOFF-CHAIN *et al.* (1955 ; 1964), stimola l'incorporazione della radioattività del glucosio nel glicogeno solubile ed insolubile e negli oligosaccaridi. Tale effetto non appare rimosso dall'aggiunta di attrattiloside al mezzo di incubazione.

Discussione. — I risultati riportati in questo lavoro, confermano, per quel che riguarda l'azione dell'insulina sul metabolismo del glucosio nel muscolo diaframma di ratto, quanto precedentemente trovato (BELOFF-CHAIN *et al.*, 1955 ; 1959 ; 1964), che cioè l'insulina stimola le reazioni di sintesi mentre lascia inalterate quelle cataboliche.

In presenza di attrattiloside si è osservata, in accordo con i risultati di BRUNI *et al.* (1958), una riduzione nell'incorporazione della radioattività del glucosio nel glicogeno ed uno stimolo nella produzione di acido lattico. Tale stimolo è verosimilmente da interpretarsi come dovuto ad una accelerazione di una delle reazioni a valle, e forse anche a monte, dell'acido fosfoglicerico, la cui concentrazione, infatti, diminuisce proporzionalmente all'aumento di acido lattico in presenza di attrattiloside.

Inoltre l'attrattiloside riduce la fase ossidativa del metabolismo del glucosio; l'aumento nella produzione di anidride carbonica radioattiva è probabilmente dovuto ad un effetto secondario ora in corso di studio.

È interessante notare che tale effetto dell'attrattoside non è modificato dalla aggiunta di insulina al mezzo di incubazione, mentre l'insulina rimuove completamente la inibizione della sintesi di glicogeno.

Gli Autori desiderano esprimere il loro ringraziamento ai Sig.ri Graziano Cervelli e Remo Gabriele per l'apprezzata assistenza tecnica.

7 giugno 1966.

BIBLIOGRAFIA

- BARTLETT, G. R., 1959. *J. Biol. Chem.*, **234**, 469.
- BELOFF-CHAIN, A., P. BETTO, R. CATANZARO, E. B. CHAIN, L. LONGINOTTI & F. POCCHIARI, 1963. *Biochem. J.*, **91**, 620.
- BELOFF-CHAIN, A., R. CATANZARO, E. B. CHAIN, L. LONGINOTTI, I. MASI & F. POCCHIARI, 1959. *Selected Sci. Papers Ist. Super. Sanità*, **2**, 139.
- BELOFF-CHAIN, A., R. CATANZARO, E. B. CHAIN, I. MASI, F. POCCHIARI & C. ROSSI, 1955. *Proc. Roy. Soc. B.*, **143**, 481.
- BERENBLUM, I. & E. B. CHAIN, 1938. *Biochem. J.*, **32**, 295.
- BRIERLEY, G. & R. L. O'BRIEN, 1965. *J. Biol. Chem.*, **240**, 4532.
- BRUNI, A., A. R. CONTESSA & S. LUCIANI, 1962. *Biochim. Biophys. Acta*, **60**, 301.
- BRUNI, A., S. LUCIANI, A. R. CONTESSA & G. F. AZZONE, 1964. *Biochim. Biophys. Acta*, **82**, 630.
- BRUNI, A., L. RAUSA & S. PATANIA, 1958. *Arch. Ital. Sci. Farmacol.*, **8**, 46.
- CHAPPELL, J. B. & A. R. CROFTS, 1965. *Biochem. J.*, **95**, 707.
- COWGILL, R. W., 1955. *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 614.
- FRANK, M., E. B. CHAIN, F. POCCHIARI & C. ROSSI, 1959. *Selected Sci. Papers Ist. Super. Sanità*, **2**, 75.
- KEMP, A. JR. & E. C. SLATER, 1964. *Biochim. Biophys. Acta*, **92**, 178.
- SANTI, R., 1958. *Nature*, **182**, 257.
- SANTI, R., 1964. *J. Pharm. Pharmacol.*, **16**, 437.
- SCHOLZ, R., H. SCHMITZ, T. BUCHER & J. O. LAMPEN, 1959. *Biochem. Z.*, **331**, 71.
- STADIE, W. C. & J. A. ZAPP JR., 1947. *J. Biol. Chem.*, **170**, 55.
- VIGNAIS, P. V., P. M. VIGNAIS & E. STANISLAS, 1962. *Biochim. Biophys. Acta*, **60**, 284.

Effetto dell'atrattiloside sul metabolismo del glucosio e del glutammato nella corteccia cerebrale di ratto *in vitro*

MARTA BALLIANO (*), INES MASI e FRANCESCO POCCHIARI

Laboratori di Chimica Biologica

Riassunto. — È stato studiato il metabolismo del glucosio e del glutammato nella corteccia cerebrale di ratto incubando il tessuto in presenza di atrattiloside.

Il glucoside provoca una diminuzione nel consumo di O_2 e nella produzione di CO_2 che è del 25 % circa per il glucosio e del 10 % circa per il glutammato.

L'incorporazione della radioattività dei substrati nei vari metaboliti ha mostrato per alcuni di essi delle significative variazioni dai valori normali. In particolare è stato messo in evidenza che l'atrattiloside provoca nel tessuto una inibizione quasi totale della sintesi di glutamina; tale effetto invece non si manifesta quando il glutammato è incubato con glutammin-sintetasi estratta dalla corteccia cerebrale.

Summary. (*The effect of atractyloside on glucose and glutamate metabolism in rat brain cortex in vitro*). — Results of experiments on the effect of atractyloside on glucose and glutamate metabolism in rat cerebral cortex slices *in vitro* are given.

It was found that in the presence of atractyloside the O_2 uptake as well as the CO_2 production is reduced by 25 % when the substrate is glucose and by 10 % when the substrate is glutamate.

Significant variations from the control were found in the radioactivity incorporated into phosphoglycerate, alanine and glutamate from glucose and into aspartate from glutamate.

The most impressive effect of atractyloside was on the synthesis of glutamine (Tabs. 2, 3, 4), which disappeared almost completely when the glucoside was present; this happened also in a condition which would permit a very high production of glutamine, as when tissue slices were incubated with glutamate in the presence of glucose.

(*) Borsista dei Laboratori di Chimica Biologica.

It was found that atractyloside does not affect the synthesis of glutamine when glutamate is incubated with glutamine-synthetase extracted from cerebral cortex.

In recent investigations on mitochondria evidence is given that atractyloside exerts a control over the passage of adenine nucleotides across the mitochondrial membrane, disrupting the channels of communication (for references see BRIERLEY & O'BRIEN, 1965). On the basis of these results and taking into account the intracellular distribution of glutamine-synthetase in cerebral cortex (WAELSCH, 1959; SELLINGER *et al.*, 1962), it seems that atractyloside may be responsible of a lack for adenine nucleotides at the site where ATP is needed for the synthesis of glutamine.

In precedenti ricerche concernenti l'effetto dell'attrattiloside sul metabolismo intermedio del glucosio nel muscolo diaframma di ratto (POCCHIARI, SILANO & SANTI, 1966), è stata messa in evidenza una alterazione quantitativa del quadro metabolico quando l'incubazione del tessuto con il substrato avveniva in presenza del glucoside. In seguito a tali risultati si è ritenuto opportuno estendere le ricerche anche ad altri tessuti ed a tale scopo è stato studiato l'effetto dell'attrattiloside sul metabolismo del glucosio e del glutammato nella corteccia cerebrale di ratto *in vitro*.

PARTE SPERIMENTALE

Materiali.

Il glucosio e l'acido L-glutammico, entrambi uniformemente marcati ^{14}C , sono stati ottenuti dal *Radiochemical Centre, Amersham* (Gran Bretagna). Essi venivano diluiti con substrato non radioattivo in modo da avere un'attività specifica di 16,6 $\mu\text{c}/\text{mg}$.

L'attrattiloside è stata gentilmente fornita dal Prof. R. Santi.

Metodi.

Preparazione ed incubazione del tessuto. — Per la preparazione e l'incubazione del tessuto è stata seguita la tecnica precedentemente descritta (SELLINGER *et al.*, 1962); 100 mg di corteccia cerebrale venivano prelevati da ratti aventi peso oscillante fra 150 e 200 mg ed incubati per 1 h in 1,2 ml di tampone di fosfato a pH 7,4 (ELLIOTT & HENDERSON, 1948) in cui erano disciolti il glucosio o l'acido glutammico o entrambi, sempre alla concentrazione dello 0,1 %, e, quando presente, attrattiloside 1,2 mM. Al termine dell'incubazione si procedeva alla preparazione dell'estratto (BELOFF-CHAIN *et al.*, 1955) che veniva poi portato a secco sotto vuoto a 30 - 35°, disciolto in 0,5 ml di H_2O e centrifugato.

Separazione e determinazione dei metaboliti radioattivi. — La separazione dei metaboliti era eseguita su appropriate aliquote di mezzo di incubazione e di estratto del tessuto, mediante cromatografia discendente su carta Whatman n. 1:

— per la separazione dell'acido lattico il solvente era costituito da alcool butilico normale; acido acetico: acqua (40:11:25); il cromatogramma appena tolto dal solvente era immerso in atmosfera di ammoniaca per fissare l'acido lattico come sale ed eliminare quindi le perdite per evaporazione;

— per la separazione degli amminoacidi e dell'acido fosfoglicerico, che era eseguita in due direzioni, il primo solvente era costituito da alcool butilico secondario: acido formico 85 %: acqua (75:15:10) ed il secondo solvente era costituito da fenolo: acqua: idrato di ammonio $d = 0,886$ (80:20:1).

Una aliquota di miscela tampone-substrato, incubata in assenza di tessuto, veniva cromatografata nello stesso solvente usato per la separazione dell'acido lattico. La radioattività presente nei radiocromatogrammi era determinata con l'apparecchiatura automatica precedentemente descritta (FRANK *et al.*, 1959): La CO_2 era raccolta e determinata nel modo precedentemente descritto (BELOFF-CHAIN *et al.*, 1955).

Sintesi di glutamina da acido glutammico ad opera della glutammin-sintetasi. — La glutammin-sintetasi veniva preparata dalla corteccia cerebrale di ratto secondo il metodo descritto da ELLIOTT (1951); dalla polvere acetonica corrispondente ad 1 g di tessuto si ottenevano 1,3 ml di estratto di enzima parzialmente purificato. 0,2 ml di tale estratto che, tenendo presente la resa del metodo di preparazione, conteneva glutammin-sintetasi in quantità corrispondente a quella presente in circa 100 mg di tessuto, venivano diluiti a 1,2 ml in una miscela di reazione contenente tampone di imidazolo 0,1 M, $MgSO_4$ $4 \times 10^{-2}M$, cisteina cloridrato $4 \times 10^{-2}M$, NH_4Cl $4 \times 10^{-3}M$, $20\mu C$ di acido glutammico- $U-^{14}C$ $10^{-2}M$, ATP sodico $1,6 \times 10^{-4}M$ oppure $10^{-3}M$ e infine, quando presente, attrattiloside $1,2 \times 10^{-3}M$; tutti i componenti erano utilizzati in soluzioni aventi pH 7,2.

La miscela veniva incubata per 1 h a $37^\circ C$, raffreddata in ghiaccio e liberata dalla maggior parte delle proteine per trattamento con egual volume di cloroformio; infine, dopo centrifugazione a $4^\circ C$ e a 20.000 g per 15 min. 30 μl erano cromatografati, per separare gli amminoacidi come descritto sopra.

RISULTATI

Il quadro metabolico del glucosio e del glutammato nelle fettine di corteccia cerebrale di ratto incubate per 1 h in tampone di fosfato non viene qualitativamente alterato dalla presenza di attrattiloside.

I dati riportati nelle Tabelle 1 e 2 mostrano invece che dal punto di vista quantitativo il glucoside interferisce nella incorporazione della radioattività nei vari metaboliti.

TABELLA 1.

Effetto dell'attrattiloside sul metabolismo del glucosio
nella corteccia cerebrale di ratto

Prodotti di trasformazione del glucosio	Glucosio trasformato*	
	senza attrattiloside ($\mu\text{g}/100 \text{ mg/h}$)	con attrattiloside ($1,2 \times 10^{-3}\text{M}$) ($\mu\text{g}/100 \text{ mg/h}$)
Acido fosfoglicerico	8,3 \pm 1,0	1,8 \pm 0,1**
Acido lattico	521,2 \pm 32,0	497,2 \pm 26,9
Alanina	6,8 \pm 0,5	8,5 \pm 0,6**
Acido glutammico	70,7 \pm 4,7	79,2 \pm 3,2**
Acido γ -ammino butirrico	13,3 \pm 1,2	11,0 \pm 0,6**
Glutamina	3,3 \pm 0,5	tracce**
Acido aspartico	8,7 \pm 1,0	11,7 \pm 0,7
CO ₂	227,6 \pm 15,6	163,1 \pm 9,9**

* Risultati espressi in μg di glucosio trasformato per 100 mg di corteccia cerebrale, peso umido, dopo 1 h di incubazione in O₂, a 37° C, in 1,2 ml di tampone di fosfati a pH 7,4 contenente 0,1 % e 20 μc di glucosio-U-¹⁴C. Valori medi di 6 ratti \pm errore standard.

** $p < 0,05$.

Metabolismo del glucosio. — In presenza di attrattiloside il consumo di O₂, che nelle esperienze di controllo era $130 \pm 4 \mu\text{moli/g}$ di tessuto, peso umido/h, scendeva a $102 \pm 3 \mu\text{moli/g/h}$, risultando ridotto di circa il 25 % analogamente a quanto avveniva per la incorporazione della radioattività del glucosio nella CO₂ che passava da 228 a 163 $\mu\text{g}/100 \text{ mg/h}$ (Tab. 1). L'attrattiloside non aveva alcun effetto sulla produzione complessiva di acido lattico da glucosio, mentre ne influenzava la ripartizione tra il mezzo di incubazione ed il tessuto; infatti mentre nel mezzo di incubazione l'acido lattico proveniente da glucosio scendeva da 481 ± 32 a $448 \pm 28 \mu\text{g}/100 \text{ mg/h}$, nell'estratto esso aumentava significativamente da 40 ± 2 a $50 \pm 3 \mu\text{g}/100 \text{ mg/h}$.

La formazione di acido fosfoglicerico radioattivo, che risultava costituito per la massima parte da acido 3-fosfoglicerico e che era determinabile soltanto nel mezzo di incubazione, diminuiva notevolmente in presenza del glucoside riducendosi a circa il 20 % del valore di controllo. La produzione di acido glutammico, che era presente nel rapporto 1:10 sia nel mezzo di incubazione sia nell'estratto, e quella di acido γ -ammino butirrico, che

era determinabile soltanto nell'estratto, non venivano influenzate dalla presenza di attrattiloside; la formazione di acido aspartico, presente solo nell'estratto, e quella di alanina, presente sia nel mezzo di incubazione che nell'estratto, nel rapporto 1:1, risultavano invece superiori di circa il 25 % rispetto ai valori di controllo.

Il risultato sul quale appare più evidente l'effetto dell'attrattiloside è quello concernente la sintesi di glutammina, che passava da 3,3 $\mu\text{g}/100$ mg/h ad un livello non misurabile, sicuramente inferiore a 0,5 $\mu\text{g}/100$ mg/h.

TABELLA 2.

**Effetto dell'attrattiloside sul metabolismo dell'acido glutammico
nella corteccia cerebrale del ratto**

Prodotti di trasformazione dell'acido glutammico	Acido glutammico trasformato*	
	senza attrattiloside ($\mu\text{g}/100$ mg/h)	con attrattiloside ($1,2 \times 10^{-3}\text{M}$) ($\mu\text{g}/100$ mg/h)
Acido glutammico	63,7 \pm 2,4	71,4 \pm 2,1**
Acido γ -ammino butirrico	6,7 \pm 0,2	5,9 \pm 0,2**
Glutammina	20,6 \pm 1,9	tracce**
Acido malico	8,2 \pm 0,4	9,2 \pm 0,5
Acido aspartico ^a	145,3 \pm 6,6	143,1 \pm 5,7
Acido aspartico ^b	44,9 \pm 2,2	33,2 \pm 1,4**
Acido citrico	4,5 \pm 0,5	3,7 \pm 0,5
CO ₂	148,0 \pm 4,7	136,7 \pm 7,0

* Risultati espressi in μg di acido glutammico trasformato (o rimasto inalterato) per 100 mg di corteccia cerebrale, peso umido, dopo 1 h di incubazione in O₂ a 37°C in 1,2 ml di tampone di fosfati a pH 7,4 contenente 0,1 % e 20 μc di acido L-glutammico U-¹⁴C. Valori medi \pm errore standard.

** $p \geq 0,05$.

^a presente nel mezzo di incubazione.

^b presente nell'estratto del tessuto.

Metabolismo del glutammato. — In presenza di attrattiloside il consumo di O₂ passava da 90 \pm 2 a 81 \pm 2 $\mu\text{moli/g}$ di tessuto peso umido/h, risultando così ridotto del 10 %; analogamente l'incorporazione della radioattività del glutammato nella CO₂ scendeva da 148 a 137 $\mu\text{g}/100$ mg/h (Tab. 2).

In presenza di attrattiloside la quantità di glutammato radioattivo presente nel tessuto aumentava, mentre l'incorporazione della radioattività del substrato nell'aspartato e nell'acido γ -ammino-butirrico presenti nell'estratto diminuiva; la notevole quantità di aspartato proveniente da

glutammato rimaneva invece inalterata nel mezzo di incubazione. L'incorporazione di radioattività negli acidi citrico e malico da glutammato non era influenzata dalla presenza del glucoside. La sintesi di glutammina, infine, risentiva della presenza dell'attrattoside in maniera molto evidente, essendo ridotta da 20,6 $\mu\text{g}/100 \text{ mg/h}$ a tracce (Tab. 2).

Metabolismo del glutammato in presenza di glucosio. — I risultati ottenuti incubando il tessuto con acido glutammico radioattivo in presenza di glucosio non radioattivo, entrambi alla concentrazione dello 0,1 %, mostrano che l'attrattoside riduceva il consumo di O_2 da 136 ± 16 a 105 ± 6 $\mu\text{moli/g}$ di tessuto peso $\mu\text{mido/h}$ e la incorporazione della radioattività del glutammato nella CO_2 da 208 a 135 $\mu\text{g}/100 \text{ mg/h}$ (Tab. 3).

TABELLA 3.

Effetto dell'attrattoside sul metabolismo dell'acido glutammico nella corteccia cerebrale di ratto in presenza di glucosio.

Prodotti di trasformazione dell'acido glutammico	Acido glutammico trasformato*	
	senza attrattoside ($\mu\text{g}/100 \text{ mg/h}$)	con attrattoside ($1,2 \times 10^{-3}\text{M}$) ($\mu\text{g}/100 \text{ mg/h}$)
Acido glutammico	231,8 \pm 17,0	316,0 \pm 15,8**
Acido γ -ammino-butirrico	19,7 \pm 2,0	15,9 \pm 0,8
Glutammina	83,1 \pm 0,3	4,4 \pm 0,3**
Acido aspartico ^a	21,5 \pm 0,2	17,1 \pm 0,3**
Acido aspartico ^b	35,1 \pm 0,8	32,9 \pm 3,1
CO_2	207,8 \pm 24,3	135,1 \pm 13,3**

* Risultati e condizioni sperimentali come nella Tabella 2; concentrazioni del glucosio 0,1 %. Valori medi \pm errore standard.

** $p \geq 0,05$

^a presente nel mezzo di incubazione.

^b presente nell'estratto del tessuto.

Inoltre, sulla quantità di glutammato presente nel tessuto, sulla formazione di acido γ -ammino-butirrico e soprattutto sulla sintesi di glutammina l'attrattoside aveva un effetto analogo, anche se più accentuato, a quello trovato quando il substrato era costituito soltanto da glutammato; sulla formazione di aspartato da glutammato nell'estratto non si aveva invece alcun effetto del glucoside.

Sintesi di glutammina da glutammato ad opera della glutammin-sintetasi. — L'attrattoside non aveva alcun effetto sulla sintesi di glutammina

da glutammato quando essa avveniva ad opera dell'enzima estratto dalla corteccia cerebrale di ratto (Tab. 4).

TABELLA 4.

Effetto della attrattiloside sulla sintesi di glutammina da glutammato ad opera di glutammin-sintetasi estratta dalla corteccia cerebrale di ratto.

Concentrazione dell'ATP	Acido glutammico trasformato in glutammina*	
	senza attrattiloside ($\mu\text{g}/100 \text{ mg/h}$)	con attrattiloside ($1,2 \times 10^{-3}\text{M}$) ($\mu\text{g}/100 \text{ mg/h}$)
$1,6 \times 10^{-4}\text{M}$	14,9	15,9
$1,0 \times 10^{-3}\text{M}$	92,4	97,4

* Condizioni sperimentali: 1,2 ml di miscela di reazione contenente tampone di imidazolo 0,1 M, MgSO_4 4×10^{-2} M, cisteina cloridrato 4×10^{-2} M, NH_4Cl 4×10^{-3} M, glutammin-sintetasi in quantità corrispondente a quella presente in circa 100 mg di tessuto, 20 μC di acido L-glutammico- $\text{U-}^{14}\text{C}$ 10^{-2}M e ATP alla concentrazione indicata, venivano incubati per 1 h a 37°C .

DISCUSSIONE

I dati relativi al consumo di O_2 ed alla produzione di $^{14}\text{CO}_2$ indicano che l'attrattiloside nelle fettine di corteccia cerebrale di ratto riduce l'ossidazione del glucosio e in minor quantità anche quella del glutammato. Il fatto che tale riduzione sia maggiore quando il tessuto è incubato con glucosio potrebbe indicare una interferenza dell'attrattiloside sulla disponibilità del piruvato per l'ossidazione, con conseguente aumento dell'incorporazione della radioattività del glucosio nell'alanina e nell'aspartato, come in effetti è stato trovato.

Le esperienze eseguite con glucosio hanno mostrato che, in accordo con quanto osservato nel diaframma di ratto da POCCHIARI, SILANO & SANTI (1966), la presenza del glucosio provoca una notevole riduzione nell'incorporazione della radioattività nell'acido fosfoglicerico. Non è stato possibile però mettere in evidenza se a tale riduzione corrispondesse un aumento nell'acido lattico, come osservato nel diaframma di ratto, dato il basso livello della radioattività incorporata nell'acido fosfoglicerico rispetto a quella dell'acido lattico.

Nelle esperienze eseguite con glutammato il fatto che l'attrattiloside riduca in modo significativo l'incorporazione della radioattività del substrato nell'aspartato presente nel tessuto, mentre l'aspartato che si ritrova nel mezzo rimane inalterato, non trova al momento una plausibile interpretazione.

L'effetto dell'attrattiloside che senza dubbio appare maggiormente significativo riguarda la sintesi di glutammina che risulta quasi completa-

mente inibita anche quando la natura del substrato è tale da consentire al tessuto di formare glutammina in notevole quantità, come è nel caso del tessuto incubato con glutammato in presenza di glucosio.

Nell'interpretazione di tali risultati è da tener presente che l'ossidazione del substrato è soltanto parzialmente ridotta e quindi nel tessuto c'è disponibilità di ATP; d'altra parte l'ipotesi, del resto poco plausibile, di una inibizione di sintesi a livello enzimatico è stata sperimentalmente esclusa dato che la formazione della glutammina da glutammato ad opera della glutamin-sintetasi estratta dalla corteccia cerebrale di ratto non appare influenzata dal glucoside (Tab. 4). Deve trattarsi quindi di un effetto collegato alla struttura subcellulare del tessuto; a tale riguardo è interessante ricordare che, sulla base dei risultati di esperienze eseguite sui mitocondri, vari autori ritengono che l'attrattiloside provochi una interruzione nei canali di comunicazione degli adenin-nucleotidi (per referenze vedi BRIERLY & O'BRIEN, 1965). In considerazione di queste osservazioni e di quanto riportato da Waelsch (1959) e da SELLINGER & DE BALBIAN VERSTER (1962) sulla distribuzione intracellulare della glutamin-sintetasi nella corteccia cerebrale, si è portati ad attribuire l'azione dell'attrattiloside sul tessuto intatto ad un meccanismo simile a quello mediante il quale il glucoside agisce nei mitocondri. Si ritiene cioè che l'attrattiloside potrebbe inibire la formazione di glutammina impedendo all'ATP, che pure è presente nel tessuto, di essere disponibile nel luogo specifico in cui l'enzima ne richiede la presenza per poter svolgere la sua attività di sintesi.

Gli autori desiderano esprimere il loro ringraziamento ai Sigg.ri Carlo Cantello e Franco Gramenzi per l'apprezzata assistenza tecnica.

7 giugno 1966

BIBLIOGRAFIA

- BELOFF-CHAIN, A., R. CATANZARO, E. B. CHAIN, I. MASI & F. POCCHIARI, 1955. *Proc. Roy. Soc. B*, **143**, 481.
- BRIERLEY, G. & R. L. O'BRIEN, 1965 *J. Biol. Chem.*, **240**, 4532.
- ELLIOTT, K. A. C. & N. HENDERSON, 1948. *J. Neurophysiol.*, **11**, 473.
- ELLIOTT, W. H., 1951, *Biochem. J.*, **49**, 106.
- FRANK, M., E. B. CHAIN, F. POCCHIARI & C. ROSSI, 1959. *Selected Sci. Papers Ist. Super. Sanità*, **2**, 75.
- POCCHIARI, F., V. SILANO & R. SANTI, 1966. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **2**, 304.
- SELLINGER, O. Z., R. CATANZARO, E. B. CHAIN & F. POCCHIARI, 1962. *Proc. Roy. Soc. B*, **156**, 148.
- SELLINGER, O. Z. & F. DE BALBIAN VERSTER, 1962 *J. Biol. Chem.*, **237**, 2836.
- WAELSCH, H., 1959. *Proc. IV Intern. Congr. Biochemistry*, Vol. **3**, Pergamon Press, New York, p. 36.

Sulla costituzione di una nuova leucoantocianidina : lo pseudopeltoginolo

ANNA M. VACCARO TORRACCA (*), CORRADO GALEFFI,
IVAN L. DE ALBUQUERQUE (**), CARLO G. CASINOVI e G. B. MARINI-BETTÒLO.

Laboratori di Chimica Biologica
Centro Nazionale della Chimica del Farmaco del C.N.R.

Riassunto. — Dal legno di *Peltogyne recifensis* è stata estratta una leucoantocianidina di cui sono stati preparati l'etere metilico e l'acetilderivato. Lo studio di questi composti ha permesso stabilire che la leucoantocianidina è un isomero del peltoginolo — isolato da ROBINSON & ROBINSON (1935) dal *Peltogyne porphyrocardia* — che è stato denominato pseudopeltoginolo.

Summary. (*A new leucoanthocyanidin: pseudopeltogynol*). — The extraction of *Peltogyne recifensis* heart wood yields a leucoanthocyanidin. The structure of methyl and acetyl derivatives of this substance were determined (Tab. 1) and it was proved both by chemical methods and NMR spectroscopy, that the leucoanthocyanidin is an isomer of the peltogynol (II) — isolated from *Peltogyne porphyrocardia* by ROBINSON & ROBINSON (1935) — that we have called pseudopeltogynol (VIII).

In uno studio sistematico sulle sostanze batteriostatiche delle piante superiori, GONÇALVES DA LIMA, DE ALBUQUERQUE & DALIA MAIA (1959) avevano descritto l'attività batteriostatica dell'estratto di legno di *Peltogyne recifensis* noto localmente con il nome di Barabú.

Il legno polverizzato di *Peltogyne* dà per estrazione con acetone una polvere amorfa rossa che si purifica per ripartizione tra acqua ed acetato di etile. Si ottiene così un prodotto igroscopico colorato debolmente in rosa.

(*) Borsista dei Laboratori di Chimica Biologica.

(**) Professore dell'*Instituto de Antibioticos* dell'Università di Recife, ospite presso il Centro Nazionale della Chimica del Farmaco e delle Sostanze biologicamente attive del C.N.R. - Istituto di Chimica dell'Università Cattolica del Sacro Cuore. Roma.

TABELLA I

Confronto tra peltoginolo, pseudopeltoginolo e loro derivati

Sostanza	Potere rotatorio	Punto di fusione (p.f.)	λ max EtOH (m μ)	Rf *
Pseudopeltoginolo	$[\alpha]_D^{20} = + 259$ (0,7 % ac. et.) . . .		225 (log $\epsilon = 4,01$) 281 (log $\epsilon = 3,61$) 286 (log $\epsilon = 3,61$)	
Peltoginolo	$[\alpha]_D^{20} = + 273$ (0,6 % ac. et.) . . .		226 282 284	
Trimetilpseudopeltoginolo	$[\alpha]_D^{20} = + 240$ (0,22 % CHCl ₃) . . .	194,5°	225 (log $\epsilon = 4,18$) 280 (log $\epsilon = 3,62$) 286 (log $\epsilon = 3,56$)	0,6
Trimetilpeltoginolo **	$[\alpha]_D^{20} = + 250$ (1,4 % CHCl ₃) . . .	203-5°	280 (log $\epsilon = 3,84$) 286 (log $\epsilon = 3,87$)	0,52
Trimetilpseudopeltoginone	•	207°	217 (log $\epsilon = 4,37$) 230 (log $\epsilon = 4,22$) 275 (log $\epsilon = 4,12$) 310 (log $\epsilon = 3,78$)	0,9
Trimetilpeltoginone	$[\alpha]_D^{20} = + 279$ (1,2 % CHCl ₃) . . .	211-3°	230 (log $\epsilon = 4,30$) 276 (log $\epsilon = 4,23$) 306 (log $\epsilon = 3,87$)	
Tetraacetilpseudopeltoginolo	$[\alpha]_D^{20} = + 125$ (0,24 % CHCl ₃) . . .	214°		
Tetraacetilpeltoginolo	$[\alpha]_D^{20} = + 125$ (0,4 % CHCl ₃) . . .	173°	275 283	0,7

* Cromatografia su strato sottile di silice - Eluente : CHCl₃ - acetato di etile = 70 : 30.

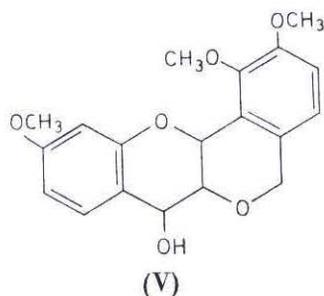
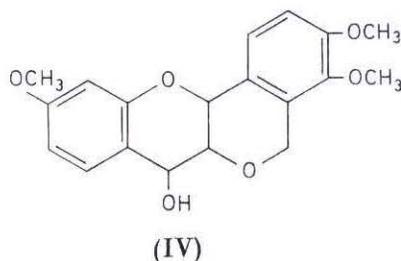
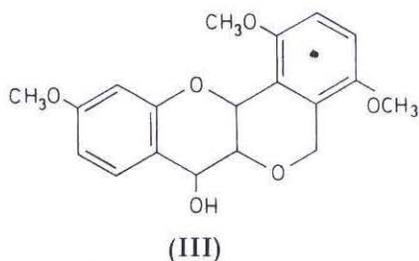
** Campione gentilmente forniti dal prof. C. H. Hassall che desideriamo ringraziare.

TABELLA 2

Dati relativi allo spettro RMN del trimetilpseudopeltoginolo

Segnale (δ) (p.p.m.)	T i p o	Costante di accoppia- mento (J) (c.p.s.)	Attribuzione
2,8	doppietto	3	1H di HO-in 4 (scompare con D ₂ O)
3,55	quartetto	8	1H in 3
3,75-3,85	3 singoletti	10	9H di 3 CH ₃ O-in 7,3' e 4'
4,85	doppietto	—	1H in 2
4,9	quartetto	8	1H in 2
4,95	quartetto	10	1H in 4
6,48	doppietto	3	1H in 8
6,55	quartetto	3	1H in 6
6,9	doppietto	9	1H in 6
7,35	doppietto	8	1H in 5'
7,4	doppietto	8	1H in 6'
		9	1H in 5

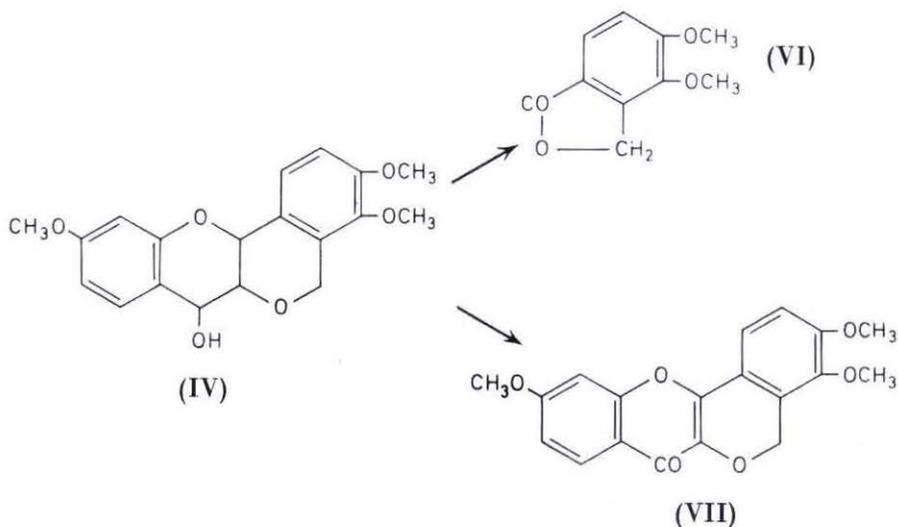
singoletti (posizione *para*). Considerando in *orto* i due idrogeni dell'anello C restano tre alternative (III, IV, V) per la posizione dei metossili :



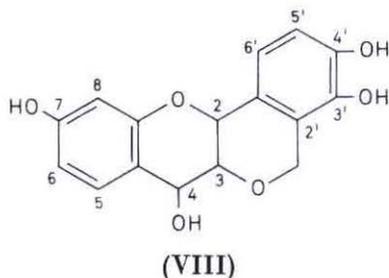
Per ossidazione prolungata con biossido di manganese del composto in esame si è ottenuta la 3,4-dimetossi-ftalide (VI) la cui formazione non

lascia alcun dubbio sulla posizione dei due metossili nell'anello C, che corrisponde a quello della struttura (IV).

Come prodotto secondario si isola un composto (VII) la cui strut-



tura dimostra definitivamente che allo pseudopeltoginolo spetta la formula (VIII).



Lo spettro RMN di (VII) (Tab. 3) consta di una zona aromatica, in tutto simile a quella del trimetilpseudopeltoginone (Tab. 4), e facilmente interpretabile come dovuta alla sovrapposizione di un sistema A B X (protoni in 5, 6 ed 8) ad un sistema A B (protoni in posizione 5', 6'), e di un singoletto la cui posizione ($\delta = 5,3$) non è in contrasto con quella attesa per i protoni in 2''. Inoltre, il suo spettro U.V. è in perfetto accordo con i dati della letteratura su identici sistemi policiclici (WAISS & CORSE, 1965).

È possibile come per il peltoginolo anche per lo pseudopeltoginolo l'esistenza di due epimeri dovuta alla configurazione del carbonio in 4.

TABELLA 3

Dati relativi allo spettro RMN della sostanza VII

Segnale (δ) (p.p.m.)	T i p o	Costante di accoppia- mento (J) (c.p.s.)	Attribuzione
3,85-3,95	3 singoletti	—	9H di 3CH ₃ O—in 7,3' e 4'
5,3	singoletto	—	2H in 2''
6,9	doppietto	8	1H in 5'
6,9	doppietto	3	1H in 8
6,95	quartetto	3	1H in 6
		9	
7,5	doppietto	8	1H in 6'
8,16	doppietto	9	1H in 5

I due idrogeni sugli atomi di carbonio 2 e 3 sono trans diassiali come risulta dalla costante di accoppiamento che è $J = 12$ c.p.s. nel trimetilpseudopeltoginone e $J = 10$ c.p.s. nel tetraacetilpseudopeltoginolo. I due idrogeni sui carboni 3 e 4 sono pure trans diassiali in quanto la costante di accoppiamento reciproca è nel trimetilpseudopeltoginolo $J = 10$ c.p.s.

TABELLA 4

Dati relativi allo spettro RMN del trimetilpseudopeltoginone

Segnale (δ) (p.p.m.)	T i p o	Costante di accoppia- mento (J) (c.p.s.)	Attribuzione
3,85-3,9	3 singoletti		9H di 3 CH ₃ O—in 7,3' e 4'
4,3	doppietto	12	1H in 3
5,05	quartetto	15	2H in 2''
5,3	doppietto	12	1H in 2
6,6	doppietto	3	1H in 8
6,68	quartetto	8	1H in 6
		3	
6,98	doppietto	9	1H in 5'
7,45	doppietto	9	1H in 6'
7,96	doppietto	8	1H in 5

PARTE SPERIMENTALE

Estrazione e purificazione dello pseudopeltoginolo. — Un kg di durame di *Peltogyne recifensis* è esaurito in tre successive estrazioni con acetone a bagnomaria per un totale di trenta litri. L'estratto acetoneo è concentrato a mezzo litro e diluito con 2,5 litri di acqua. Dopo filtrazione si estrae la soluzione acquosa con acetato di etile ripetutamente. Gli estratti riuniti e concentrati fino a consistenza sciropposa furono versati lentamente sotto agitazione su etere di petrolio; si forma un precipitato fioccoso che si separa e si filtra. Si ottengono alla fine 4 g di polvere appena rosata che cristallizza con difficoltà da acqua e carbonizza senza fondere.

$$\left[\alpha \right]_{\text{D}}^{20} = + 259 \text{ (0,7 \% etile acetato)}$$

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} = 286 \text{ (log } \epsilon = 3,61) \text{ 281 (log } \epsilon = 3,61) \text{ e } 225 \text{ m}\mu \text{ (log } \epsilon = 4,01)$$

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH} + \text{NaOH}} = 292 \text{ (log } \epsilon = 3,66) \text{ e } 246 \text{ m}\mu \text{ (log } \epsilon = 4,03)$$

Analisi :

	Trov. % :	C 63,53 ;	H 4,73 ;	OCH ₃ O ;	CH ₃ CO 2
per C ₁₆ H ₁₄ O ₆	Calc. :	63,57 ;	4,67 ;	*	

La sostanza non risulta cromatograficamente pura (cromatografia su carta Whatman : eluente n-butanolo—acido acetico—acqua = 4 : 1 : 5 ; rivelatore FeCl₃ : colore verde).

Metilazione dello pseudopeltoginolo. — A 0,1 g di pseudopeltoginolo sciolti in 10 ml di metanolo si aggiungono 40 ml di soluzione eterea di diazometano a 0° C. In un primo momento sparisce il colore verde con FeCl₃, ma la metilazione non è completa che dopo due giorni a 3°C, quando un prelievo non dà più colorazione con ferricianuro ferrico. Il decorso della reazione si controlla anche cromatograficamente su lastra di SiO₂ (solvente CHCl₃ : etile acetato = 70 : 30 ; rivelatore acido fosfomolibdico). Si hanno due macchie ad Rf = 0,60 e 0,55 ; quella ad Rf = 0,60 costituisce la maggior parte del materiale e cristallizza facilmente da alcool. Il prodotto avente Rf = 0,55 rimane nelle acque madri e non è stato preso in esame.

Si ottengono 60 mg di prodotto che fonde a 194-194,5°C. Il trimetiltoginolo fonde invece a 203-5°.

$$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} = 286 \text{ (log } \epsilon = 3,56), \text{ 280 (log } \epsilon = 3,62) \text{ e } 225 \text{ m}\mu \text{ (log } \epsilon = 4,18)$$

$$\left[\alpha \right]_{\text{D}}^{20} = + 240^{\circ} \text{ (0,22 \% in CHCl}_3)$$

Analisi :

	Trov. % :	C 66,31 ;	H 5,62 ;	OCH ₃ 27,3
per C ₁₆ H ₁₁ O ₂ (OCH ₃) ₃	Calc. :	66,27 ;	5,85 ;	27,1

Acetilazione dello pseudopeltoginolo. — Grammi 0,15 di pseudopeltoginolo sciolti in 0,3 g di piridina anidra sono addizionati a freddo con 5 ml di anidride acetica. Dopo un giorno di riposo a temperatura ambiente si versa in ghiaccio, si filtra il solido separatosi e lo si lava con acqua. Dopo essiccazione all'aria lo si cristallizza due volte da benzolo, p.f. = 214° [ROBINSON & ROBINSON (1935) danno per il punto di fusione del tetraacetilpeltoginolo 173°].

$$\left[\alpha \right]_D^{20} = + 125 (0,24 \% \text{ CHCl}_3); \quad \lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}} = 275 \text{ e } 283 \text{ m}\mu$$

Analisi :

	Trov. % :	C 62,02 ;	H 4,60 ;	O 33,51
per C ₂₄ H ₂₂ O ₁₀	Calc. :	61,27 ;	4,72 ;	34,01

Lo spettro RMN è riportato in Tab. 5.

TABELLA 5

Dati relativi allo spettro RMN del tetraacetilpseudopeltoginolo

Segnale (δ) (p.p.m.)	T i p o	Costante di accoppia- mento (J) (c.p.s.)	Attribuzione
2,2	singoletto		3H di CH ₃ COO-in 4
2,26	3 singoletti sovrapposti		9H di 3CH ₃ COO-in 7,3' e 4'
3,85	quartetto	8 10	1H in 3
4,8	singoletto		2H in 2''
5,0	doppietto	10	1H in 2
6,3	doppietto	8	1H in 4
6,7	quartetto	3 8	1H in 6
6,75	doppietto	3	1H in 8
7,15	doppietto	9	1H in 5'
7,15	doppietto	9	1H in 6'
7,6	doppietto	8	1H in 5

Ossidazione dello pseudopeltoginolo.

a) *trimetilpseudopeltoginone.* — A 0,1 g del trimetil-etero del pseudopeltoginolo sciolti in 20 ml di cloroformio si aggiungono 2 g di biossido di manganese preparato di fresco che viene poi mantenuto in sospensione con agitazione per un giorno. Si controlla l'andamento dell'ossidazione per cromatografia su strato di silice con solvente CHCl₃: etile acetato = 70 : 30. Il prodotto di partenza rivelabile con acido fosfomolibdico ha R_f = 0,6, mentre il prodotto finale ha R_f = 0,9 rivelato con 2,4-dinitrofenilidrazina. Si filtra alla fine il biossido di manganese che si lava ripetutamente con CHCl₃. Per

evaporazione dei filtrati riuniti si ottiene un residuo semicristallino che si purifica per colonna di silice usando come eluente CHCl_3 -acetato di etile = 95 : 5.

Il prodotto si cristallizza da etanolo : p.f. = 207°

EtOH
 λ = 310 (log ϵ = 3,78), 275 (log ϵ = 4,12), 230 (log ϵ = 4,22) e 217 m μ (log ϵ = 4,37)
 max

Analisi :

	Trov. % :	C 66,47 :	H 5,12
per $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_6$	Calc. :	66,66 :	5,3

b) *3,4-dimetossifalide*. — 0,14 g di trimetilpseudopeltoginolo sono sciolti in 10 ml di cloroformio ed agitati per 7 giorni con 2 g di biossido di manganese preparato di fresco e secco ; alla fine si filtra il biossido di manganese e lo si lava a fondo con CHCl_3 -acetato di etile. Si evaporano a secco nel vuoto i filtrati riuniti e si cristallizza il residuo da alcool ; per primi cristallizzano 20 mg di un prodotto di colore giallo paglierino in aghi setosi. Si purifica per colonna (1,2 cm di \varnothing , 30 cm di lunghezza) di SiO_2 attivata a 200°, eluendo con CHCl_3 -acetato di etile = 80 : 20. Si raccolgono frazioni da 15 ml (le frazioni si esaminano in cromatografia su strato sottile di silice, eluente CHCl_3 acetato di etile = 70 : 30, rivelatore acido solforico).

I e II frazione : Rf = 0,9 macchie nere su piastra con acido solforico (non esaminato)

V, VI e VII frazione : Rf = 0,6 fluorescenza viola debole ; su piastra macchie gialle con acido solforico a freddo ed a caldo

Le frazioni con Rf = 0,6 cristallizzano da alcool dando 8 mg di aghi giallini, p.f. = 190-190,5°. Per queste sostanze, di cui non si è fatta l'analisi per la scarsità di prodotto, si suppone, in base agli spettri RMN, la struttura (VII).

Per concentrazione delle acque madri della sostanza precedente precipitano 23 mg di un prodotto leggermente giallo che si purifica per ripetute sublimazioni a 115-120° e 0,01 mm Hg. Si ottiene un prodotto bianco, p.f. = 120-121° (dopo sublimazione), che non dà abbassamento del punto di fusione in miscela con 3,4 dimetossifalide.

23 febbraio 1966.

BIBLIOGRAFIA

- CHAN, W. R., W. G. C. FORSYTHE & C. H. HASSALL, 1958. The constitution of the leucoanthocyanidin, Peltogynol. *J. Chem. Soc.*, 3174.
- GONÇALVES DA LIMA, O., M. M. DE ALBUQUERQUE & M. H. DALIA MAIA, 1959. Substancias antimicrobianas de plantas superiores. *Rev. Inst. Antibiot. Univ. Recife*, 2, 19.
- ROBINSON, G. M. & R. ROBINSON, 1935. Leuco-anthocyanins and leuco-anthocyanidins - Part I - The isolation of Peltogynol and its molecular structure. *J. Chem. Soc.*, 744.
- WAISS, A. C., Jr. & J. CORSE, 1965. Photoxydative cyclization of quercetin pentamethyl ether. *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 2068.