

Sui chinoni sesquiterpenici della *Mansonia altissima* Chev. (*)

G. B. MARINI-BETTÒLO, CARLO G. CASINOVI, CORRADO GALEFFI
e FRANCO DELLE MONACHE (**)

Laboratori di Chimica Biologica

Riassunto. — La presenza nel legno di *Mansonia altissima* Chev. di sostanze irritanti e di composti cardiocinetici ha indotto ad approfondire lo studio di questo legno largamente usato per la fabbricazione dei mobili. Estraeendo con cloroformio si ottiene un estratto dal quale sono stati separati per via cromatografica sei chinoni. La struttura di questi chinoni è stata determinata per via chimica e via chimico-fisica. Tutti possiedono uno scheletro a C_{15} e si possono considerare dei naftochinoni sesquiterpenici a vario grado di saturazione in stretta relazione tra loro. Due di essi contengono altresì il sistema dell'oxafenalene, riscontrato la prima volta tra le sostanze naturali nella biflorina.

Summary. (*Sesquiterpenoid quinones of Mansonia altissima Chev.*). — The presence in the *Mansonia altissima* Chev. wood of irritating and cardiocinetic substances led us to reinvestigate all the chemistry of this wood so largely used for furniture making.

By means of column chromatography on suitable supports, the crude chloroform extract of *Mansonia* wood was fractionated into six new quinones: Mansonone A ($C_{15}H_{20}O_2$), red crystals from cyclohexane, m.p. 117-118°C; Mansonone B ($C_{15}H_{20}O_3$), gold-yellow crystals from hexane, m.p. 68-69°C; Mansonone C ($C_{15}H_{16}O_2$), orange crystals from hexane, m.p. 134-138°C; Mansonone D ($C_{15}H_{14}O_3$), orange crystals from cyclohexane, m.p. 173-175°C; Mansonone E ($C_{15}H_{14}O_3$), orange-yellow crystals from cyclohexane, m.p. 148-149°C; and Mansonone F ($C_{15}H_{12}O_3$), violet crystals from benzene, m.p. 214-215°C. Their structures have been partially elucidated by means of chemical and spectroscopical analysis. A C_{15} skeleton which appears

(*) Una comunicazione preliminare è stata letta da G. B. Marini-Bettòlo nel giugno 1965 all'*American Society of Pharmacognosy*, a Kingston (U.S.A.). (MARINI-BETTÒLO, CASINOVI & GALEFFI, 1965 a; b).

(**) Centro Nazionale Chimica del Farmaco del C.N.R. presso Istituto Chimico dell'Università Cattolica, Roma.

to be the common feature for these compounds suggests a terpenic origin. Furthermore two of them have the structure of oxaphenalen found the first time in biflorin.

È noto che il legno di *Mansonia*, largamente usato per la fabbricazione dei mobili, provoca una serie di disturbi alle persone impegnate nella sua lavorazione. Questi disturbi, dovuti principalmente alla inalazione della polvere di segatura, sono di natura sia irritativa (eczemi ed epistassi), che tossica (disturbi cardiaci). È sembrato pertanto interessante poter stabilire quali sostanze provocassero queste reazioni ed intraprendere uno studio chimico e farmacologico sul legno di *Mansonia* per isolare i vari componenti e possibilmente determinarne la costituzione.

La *Mansonia* era stata precedentemente oggetto di ricerche chimiche, dal momento che nell'Africa tropicale occidentale era noto l'uso della corteccia come ingrediente per la preparazione di veleno di frecce (PORTÈRES, 1935). Una rassegna completa al proposito è stata pubblicata da UFFER (1952) che, lavorando su estratti di corteccia, aveva messo in evidenza la presenza di vari glucosidi cardiaci di probabile tipo steroidico. La loro presenza nel legno fu confermata da SANDERMANN & DIETRICH (1959), i quali isolarono oltre la glicin-βetaina un composto a formula $C_{15}H_{12}O_3$ al quale attribuirono una struttura azulenica, e un chinone $C_{15}H_{20}O_2$ la cui struttura fu messa in relazione con quella del perezone, l'unico chinone sesquiterpenico fino a quel momento noto. (Ci sembra opportuno notare comunque che anche la struttura del gossipolo (ADAMS, GEISSMAN & MORRIS, 1938) sia con ogni probabilità da considerare sesquiterpenica).

Data l'incompletezza delle ricerche citate e visto l'interesse farmacologico cui sopra si è accennato, il legno di *Mansonia* è stato da noi sottoposto ad una serie di estrazioni sistematiche con differenti solventi con l'intento di separare l'attività irritante da quella cardiocinetica, seguendo l'andamento dell'estrazione mediante opportuni saggi farmacologici. Si è potuto stabilire che le sostanze dotate di azione irritante venivano estratte principalmente dal cloroformio, mentre i principi ad attività cardiocinetica venivano estratti soprattutto dall'etanolo o dal metanolo.

In questo primo lavoro riferiremo sull'isolamento e la caratterizzazione chimica di sei chinoni separati finora dall'estratto cloroformico, mentre in altra nota saranno descritti i glucosidi ottenuti dall'estratto alcoolico.

La segatura di legno di *Mansonia* viene trattata in estrattore continuo con cloroformio fino a completo esaurimento. L'estratto cloroformico viene concentrato a bassa pressione e quindi cromatografato su colonna di gel di silice e di allumina disattivata, adoperando come eluenti: il benzene,

il cloroformio e l'acetato di etile, a gradiente di concentrazione, e, infine metanolo come schematizzato in Fig. 1.

I composti così ottenuti vengono frazionati ulteriormente per cromatografia su colonna ed infine purificati per cristallizzazione.

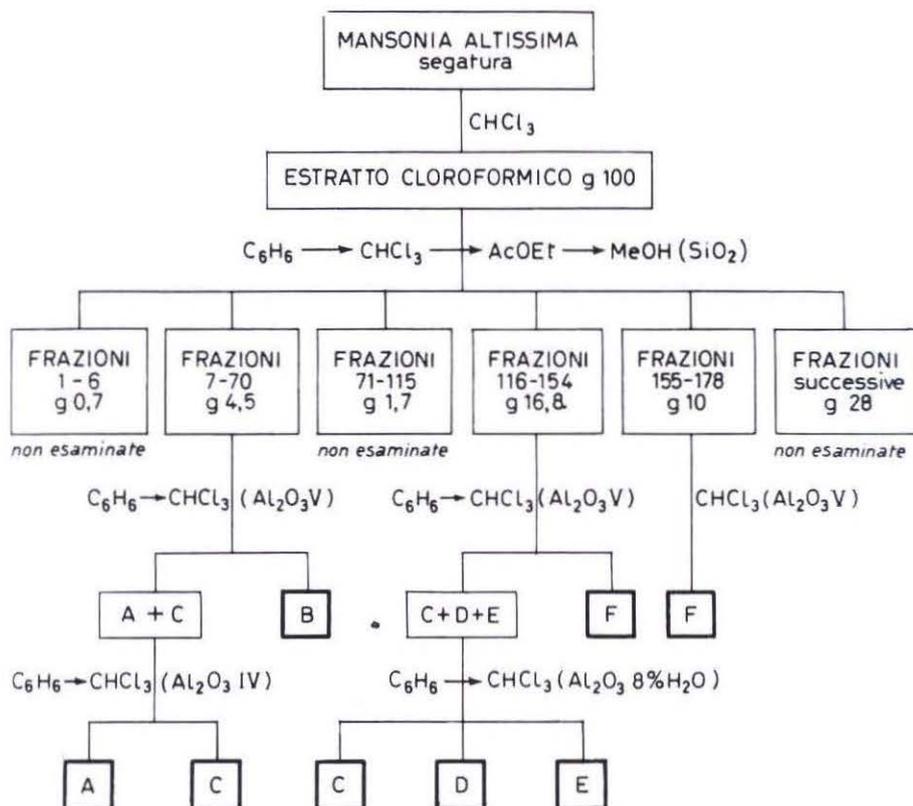


Fig. 1. — Schema di separazione dei Mansononi. I numeri romani indicano il grado di attività (secondo Brockmann) dell'allumina adoperata. Le lettere maiuscole da A ad F nelle caselle indicano i diversi Mansononi.

In queste condizioni sono stati ottenuti sei diversi composti colorati, cui è stato dato il nome di « Mansononi » ed ai quali, in base ai risultati dell'analisi elementare, sono state attribuite le seguenti formule grezze:

Mansonone A	p.f. 117 - 118°	$C_{15}H_{20}O_2$
Mansonone B	p.f. 68 - 69°	$C_{15}H_{20}O_3$
Mansonone C	p.f. 134 - 138°	$C_{15}H_{16}O_2$
Mansonone D	p.f. 173 - 175°	$C_{15}H_{14}O_3$
Mansonone E	p.f. 148 - 149°	$C_{15}H_{14}O_3$
Mansonone F	p.f. 214 - 216°	$C_{15}H_{12}O_3$

In primo luogo tutte le sei sostanze presentano una formula a C_{15} . Questo fatto fa supporre una comune struttura, come è stato successivamente confermato, ed anche una comune biogenesi. In secondo luogo tutte queste sostanze presentano una struttura chinonica, come è stato stabilito per via chimica, in base alla loro facile riducibilità e riossidabilità, alla loro sensibilità in ambiente alcalino, e per via chimico-fisica, in base agli spettri elettronici (due bande intense nell'U. V. ed una nel visibile: Tab. 1) ed I. R.

TABELLA I.

Dati di assorbimento nel U. V. e nel visibile, relativi ai sei chinoni della « Mansonia ». *

Mansonone	λ_{max} (tra parentesi log ϵ)
A	209(4,32); 430(2,93)
B	226(3,68); 272(3,69); 408(2,41) (ambiente neutro) 232(3,7); 283(3,56); 525(2,65) (ambiente alcalino)
C	206(4,14); 258(4,24); 432(3,39)
D	219(4,3); 243(4,1); 278(4,11); 405(3,88)
E	219(4,25); 264(4,31); 370(3,2); 445(3,38)
F	234; 555

* Gli spettri sono stati eseguiti in EtOH.

(banda del carbonile intorno a 1650 cm^{-1}). Pertanto due atomi di ossigeno in questi composti devono essere considerati come facenti parte di un sistema chinonico.

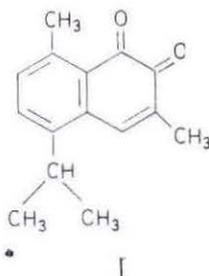
Dei sei chinoni in esame quattro e precisamente i Mansononi B, D, E ed F contengono un terzo ossigeno: solo nel Mansonone B è possibile dimostrare, preparando un monoacetilderivato, la presenza di un gruppo OH, mentre nei Mansononi D, E ed F la non reagibilità dell'ossigeno fa supporre che esso sia di natura eterea.

A questo punto si può fare un'ulteriore considerazione sul contenuto di idrogeno di questi chinoni. Infatti mentre i Mansononi A e B contengono 20 atomi di idrogeno attestanti la presenza, accanto ad un anello chinonico, di un anello aliciclico o di un doppio legame, si deve ammettere nel Mansonone C (16 atomi di idrogeno) l'esistenza di un anello aromatico

mentre nei Mansononi D, E ed F (che hanno 14 e 12 atomi di idrogeno) deve esistere anche un anello eterociclico ossigenato.

La facile reagibilità e la formazione di derivati chinossalinici dei Mansononi C, D, E ed F sta ad indicare che si tratta di 1-2 chinoni e probabilmente di naftochinoni. Inoltre la presenza, come si è detto, del sistema a C_{15} e in alcuni di essi di quattro metili fa supporre che si tratti di derivati con uno scheletro sesquiterpenico.

Una immediata conferma di questa ipotesi si ha dal fatto che la formula stabilita per il Mansonone C, in base a considerazioni chimiche ed agli spettri di RMN, viene a corrispondere a quello del cadalen-7,8-chinone, noto in letteratura (LINDHAL, 1953) per essere stato preparato a partire dalla cadalina. Le caratteristiche chimico-fisiche di questa sostanza e del suo derivato chinossalinico sono infatti identiche a quelle del Mansonone C, per cui si può ritenere che quest'ultimo si possa considerare eguale al cadalen-7,8-chinone (1)



Gli spettri di RMN consentono inoltre di avanzare fondate ipotesi sulle strutture degli altri chinoni, completando i dati già acquisiti per via chimica.

Il Mansonone F, che è il composto più deidrogenato della serie, presenta una intensa colorazione violetta e un massimo di assorbimento nel visibile a $555 m\mu$; dato che reagisce con *o*-fenilendiammina deve possedere una struttura *o*-chinonica.

Lo spettro di risonanza magnetica nucleare (Tab. 2) rende conto di tutti i dodici atomi di idrogeno del Mansonone F.

Degli atomi di ossigeno presenti due appartengono al sistema chinonico: il terzo deve formare parte di un anello, dato che il Mansonone F non mostra all'I.R. la banda dell'OH e non reagisce con anidride acetica. Si può così avere una conferma della sua struttura 1,2 naftochinonica: infatti, dato l'elevato valore di δ (7,05 p.p.m.) del protone che si trova in accoppiamento allilico con il gruppo CH_3 a 2,10 p.p.m. si può ammettere la presenza dell'aggruppamento $-C = CH-O-$ e pertanto supporre che l'anello



ossigenato debba contenere questo aggruppamento.

Dato che due posizioni sull'anello aromatico sono occupate da due protoni, in *orto* tra loro, che una terza è occupata da un gruppo metilico in *peri* ad un C = O (2,70 p.p.m.) ed inoltre che una delle posizioni del nucleo chinonico è occupata dal gruppo CH₃ (1,94 p.p.m.), la chiusura di questo anello può avvenire solo utilizzando le restanti posizioni *peri*.

TABELLA 2.

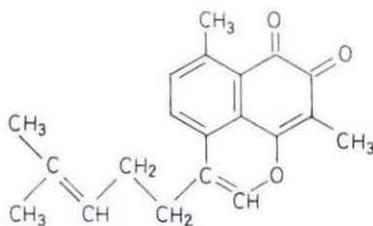
Valori significativi ed interpretazione dello spettro RMN del Mansonone F

Segnale δ (p.p.m.)	T i p o	Costante d'accoppiamento J (c.p.s.)	Attribuzione
7,31	Quartetto AB	8	2 H aromatici in orto fra loro
7,05	Quartetto mal risolto . .	1	1 H olefinico adiacente ad un ossigeno etero
2,70	Singoletto	—	3 H appartenenti ad un CH ₃ in <i>peri</i> ad un — C = O
2,10	Doppietto	1	3 H di un CH ₃ allilico
1,94	Singoletto	—	3 H di un CH ₃ allilico

Se si scartano soluzioni in contrasto con la regola isoprenica si deduce per il composto in discussione la struttura oxafenalenica (II), la quale suggerirebbe inoltre una possibile derivazione dal Mansonone C (I).



II



III

Il Mansonone F sarebbe pertanto il secondo composto naturale che contiene il sistema oxafenalenico trovato la prima volta nella biflorina (III) (COMIN *et al.*, 1963).

Gli spettri U. V. del Mansonone F e della diidrobiflorina sono infatti praticamente identici (λ_{\max} del Mansonone F: 555 e 234 m μ ; diidrobiflorina: 555 e 235 m μ); inoltre i valori degli spostamenti dei corrispondenti

protoni più caratteristici del Mansonone F sono molto vicini a quelli della biflorina. Sebbene non sia stato possibile effettuare un confronto diretto è da supporre che il Mansonone F sia il composto $C_{15}H_{12}O_3$ al quale SANDERMANN & DIETRICH (1959) hanno attribuito una struttura azulenica.

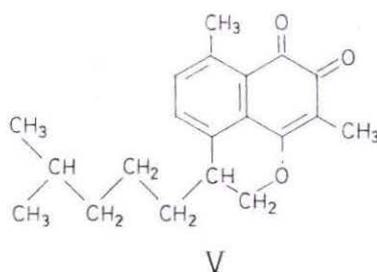
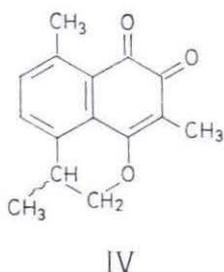
Il Mansonone E si può considerare identico al precedente ma con l'anello eterociclico idrogenato. Infatti dalle attribuzioni dello spettro di RMN (Tab. 3) si deduce la presenza di un sistema $-CH_2-O-$ unito ad un sistema benzilico accoppiato con un gruppo CH_3 secondario.

TABELLA 3.

Valori significativi ed interpretazione dello spettro RMN del Mansonone E

Segnale δ (p.p.m.)	T i p o	Costante d'accoppiamento J (c.p.s.)	Attribuzione
7,20	Quartetto	8	2 H aromatici in <i>orto</i> tra loro
4,27	Multipletto (parte AB di un sistema ABX)	—	2 H adiacenti a ossigeno eterico
2,58	Singoletto	—	3 H di un CH_3 aromatico in <i>peri</i> ad un $C=O$
3,05	Multipletto (parte X di un sistema ABX ulteriormente accoppiato)	—	1 H benzilico
1,89	Singoletto	—	3 H di un CH_3 sull'anello chinonico
1,35	Singoletto	7	3 H di un CH_3 secondario

In base alle stesse considerazioni espresse al riguardo del Mansonone F, al Mansonone E si può attribuire la struttura (IV)



Una conferma di questa struttura sta nel fatto che lo spettro U.V. del Mansonone E è molto simile a quello della tetraidrobiflorina (V) (COMIN *et al.*, 1963) dalla quale differirebbe solo per la presenza di una unità isoprenica.

La struttura del Mansonone C, come si è visto corrisponde a quella del cadalen-7, 8-chinone. Essa è stata dedotta in base alle seguenti considerazioni. Il composto reagisce con *o*-fenilendiammina per dare il corrispondente derivato chinossalinico e pertanto è un *o*-chinone.

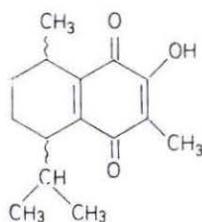
Le attribuzioni degli spettri di RMN (Tab. 4) permettono di stabilire la presenza degli aggruppamenti che concordano con quanto è già stato stabilito per confronto con le proprietà chimiche del composto di sintesi.

TABELLA 4.

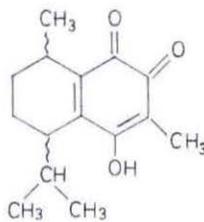
Valori significativi ed interpretazione dello spettro RMN del Mansonone C

Segnale δ (p.p.m.)	T i p o	Costante d'accoppiamento J (c.p.s.)	Attribuzione
7,67	Multipletto	1	1 H etilenico
7,31	Quartetto AB	8	2 H aromatici in <i>orto</i> tra loro
3,40	Multipletto	7	1 H benzilico
2,62	Singoletto	—	3 H di un CH ₃ aromatico in <i>peri</i> ad un C = O
2,08	Doppietto	1	3 H di un CH ₃ allilico
1,30	Doppietto	7	6 H di due CH ₃ isopropilici

Al Mansonone B in base alle proprietà chimiche ed ai valori degli spettri di RMN si possono attribuire le due formule tautomere possibili (VI e VII)



VI



VII

Nella Tabella 5 vengono riportate le attribuzioni per i vari protoni come dedotti dallo spettro di RMN

TABELLA 5.

Valori significativi ed interpretazione della spettro RMN del Mansonone B

Segnale δ (p.p.m.)	T i p o	Costante d'accoppia- mento J (c.p.s.)	Attribuzione
7,11	Singoletto	—	1 H di un ossidrilico fenolico
1,95	Singoletto	—	3 H di un CH ₃ sull'anello chinonico
1,12	Doppietto	7	3 H di un CH ₃ secondario
0,90	Doppietto	7	3 H di un CH ₃ isopropilico
0,87	Doppietto	7	3 H di un CH ₃ isopropilico

Il composto si riduce con idrosolfito di sodio in soluzione acquosa e si riossida all'aria, mentre con anidride acetica ed acetato sodico dà un acetil derivato.

La presenza dell'ossidrilico è inoltre confermata dal fatto che il segnale a $\delta = 7,11$ scompare per deuteroazione. L'esame dello spettro di RMN indica l'assenza di protoni sul nucleo chinonico dove si trovano invece l'OH e il gruppo CH₃; la posizione del gruppo isopropilico è stata assegnata in base a considerazioni biogenetiche, analogamente a quanto è stato fatto per gli altri chinoni.

Il Mansonone A non possiede natura aromatica, come risulta dagli spettri di RMN (vedi Tab. 6).

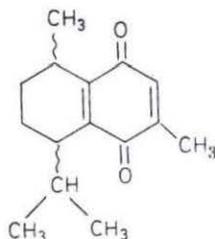
TABELLA 6.

Valori significativi ed interpretazione dello spettro RMN del Mansonone A

Segnale δ (p.p.m.)	T i p o	Costante d'accoppia- mento J (c.p.s.)	Attribuzione
6,67	Multipletto	1	1 H su anello <i>para</i> -chinonico (adiacente ad un metile)
1,92	Doppietto	1	3 H di un CH ₃ sull'anello chinonico
1,08	Doppietto	6,5	6 H di due CH ₃ del gruppo isopropilico
0,87	Doppietto	6,5	3 H di un CH ₃ secondario

Il composto è di natura chinonica, si riduce con idrosolfito di sodio in soluzione acquosa, e per riduzione acetilante dà un diacetil derivato.

Il metile secondario e il gruppo isopropilico, per ragioni di spostamento chimico, non possono essere legati all'anello chinonico e pertanto ad essi viene attribuita rispettivamente la posizione 8 e 5 in accordo con gli altri composti sinora descritti e con la regola isoprenica. Al Mansonone A si può pertanto attribuire la formula (VIII)



VIII

Il Mansonone D, dalla formula $C_{15}H_{14}O_3$, ottenuto in quantità molto ridotta, dà con *o*-fenilendiammina la chinossalina corrispondente ed è quindi un *o*-chinone; il terzo ossigeno è probabilmente di tipo etero sia perchè è assente la banda I.R. dell'ossidrilico, sia perchè esso non è acilabile.

Lo spettro U.V. (Tab. 1) è del tipo naftochinonico.

In base agli spettri RMN si possono fare le attribuzioni riportate nella Tab. 7.

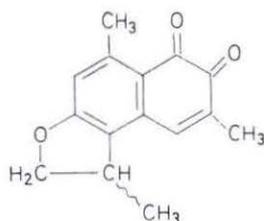
TABELLA 7.

Valori significativi ed interpretazione dello spettro RMN del Mansonone D

Segnale δ (p.p.m.)	T i p o	Costante d'accoppiamento J (c.p.s.)	Attribuzione
7,22	Quartetto	2	1 H chinonico
6,60	Singoletto allargato . . .	—	1 H aromatico allargato per accoppiamento benzilico
4,52	Multipletto (parte AB di un sistema ABX)	—	2 H eteri
3,58	Multipletto mal risolto (parte X di un sistema ABX con ulteriore accoppiamento)	—	1 H benzilico
2,65	Singoletto allargato . . .	—	3 H di CH_3 in <i>peri</i> a $C=O$
2,06	Doppietto	2	3 H di CH_3 allilico
1,38	Doppietto	8	3 H di CH_3 secondario

Il metile a 2,65 p.p.m. in *peri* al carbonile è accoppiato al protone aromatico a 6,60 p.p.m. ($J < 1$ c.p.s.) mentre il metile chinonico a 2,1 p.p.m. è accoppiato allilicamente ($J = 2$ c.p.s.) al protone a 7,22 p.p.m. dell'anello chinonico: data l'assenza di altri protoni chinonici o aromatici le posizioni 5 e 6 sono occupate nella formazione di un ciclo etero diidrofuranico con 2 protoni in α (4,52 p.p.m.) ed un metile in β (1,38 p.p.m.).

Compatibilmente alla regola isoprenica la struttura più probabile per il Mansonone D è la seguente



IX

PARTE SPERIMENTALE

(in collaborazione con E. MIRANDA DELLE MONACHE e G. DEL GUERCIO)

Pianta. — Sono stati utilizzati per le ricerche 40 kg di legno di *Mansonia altissima* Chev. proveniente dall'Africa occidentale. Tale legno viene importato comunemente per la fabbricazione di mobili.

Estrazione. — Il legno di *Mansonia* è stato opportunamente ridotto in segatura.

La segatura di legno viene estratta in un grande estrattore continuo con cloroformio contenente l'1% di alcool, durante circa 40 ore fino a che cioè il solvente non diventi quasi incolore. L'estratto viene concentrato prima a pressione ordinaria e quindi a bassa pressione fino ad ottenere come residuo una massa bruno scura (g. 1630 equivalenti al 4% del legno). La cromatografia di questo estratto effettuata su strato sottile di silice impiegando come solvente cloroformio-acetato di etile (96:4) rivela la presenza di varie macchie colorate dal rosso al viola.

L'estratto cloroformico viene sottoposto a cromatografia su una colonna di gel di silice e dato che i diversi composti da separare posseggono delle caratteristiche cromatografiche molto simili, il potere eluente del solvente viene aumentato progressivamente con un gradiente continuo da benzolo a cloroformio ad acetato di etile fino ad eluire con metanolo puro.

100 g di estratto sciolti a b. m. in 200 ml di cloroformio sono caricati in colonna di silice 50-100 mesh, alta 50 cm e del diametro di 5,6 cm.

Le frazioni del volume di 180 ml vengono raccolte in collettore di frazioni automatico, seguendo la composizione mediante cromatografia su strato sottile usando Kieselgel G e come solvente una miscela di cloroformio-acetato di etile (96:4).

Le prime sei frazioni vengono scartate (g 0,7), mentre le frazioni da 7 a 70, che risultano formate da tre composti colorati, vengono riunite e portate a secco a bassa pressione (g 4,5) quindi ricromatografate su gel di silice usando benzolo-cloroformio 1:9 oppure allumina neutra Merck contenente il 10 % di acqua (attività IV) e come eluente benzolo per separare il Mansonone A dal C e poi cloroformio per eluire il Mansonone B. Le frazioni da 71 a 115 (g 1,7) risultano costituite da una miscela molto complessa che è stata scartata. Le frazioni da 116 a 154 (g 16,8) contengono tre componenti di cui uno viola molto labile. Lo si può separare dagli altri due componenti colorati in colonna di allumina ad attività V: dopo l'eluizione con benzolo che trascina i due Mansononi D e E non separati l'uno dall'altro, si eluisce con cloroformio il Mansonone F.

I Mansononi D ed E si separano l'uno dall'altro con allumina contenente 8 % di acqua, usando come eluente benzolo; si ottiene nella separazione anche un po' di Mansonone C.

Il Mansonone F è contenuto in quantità più abbondante nella frazione 155-170 che ammonta a 10 g.

Mansonone A. — Il prodotto viene ottenuto dalle frazioni 7-70 come sopra riportato. Si purifica per cristallizzazione dal cicloesano. Si ottiene in aghi rossi p.f. 117 - 118° $[\alpha]_D^{20} = + 680$ (conc. 0,2 % in CHCl_3)

Il composto ha dato all'analisi:

	trov. %	: C	77,90;	H	8,64
per $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$	calc.	:	77,76;	8,64	

Il composto si riduce facilmente in soluzione acquosa con idrosolfito di sodio e si riossida all'aria. Per riduzione con zinco in presenza di anidride acetica e piridina dà un diacetilderivato p.f. 158-160° già descritto da SANDERMANN & DIETRICH (1959) come oleoso.

I massimi di assorbimento dello spettro U. V. sono riportati nella Tab. 1 e gli spostamenti chimici dei protoni in Tab. 6.

Le proprietà chimico-fisiche di questo chinone (punto di fusione, spettro I. R.) come i dati analitici sono eguali a quelli riportati da SANDERMANN & DIETRICH (1959), per il chinone da essi isolato dalla corteccia del legno di *Mansonia*, e fanno ritenere che si tratti della medesima sostanza.

Mansonone B. — Il composto viene ottenuto dalle frazioni 7-70 come sopra riportato e viene purificato prima per distillazione in corrente di va-

pore ed estrazione con benzolo e quindi per distillazione a 0,02 mmHg e 120° e successiva cristallizzazione dall'esano a -20°. Si ottiene in cristalli giallo oro fondenti a 68-69°.

Il composto ha dato all'analisi:

	trov. %	: C	72,62;	H	7,92
per C ₁₅ H ₂₀ O ₃	calc.	:	72,55;	8,12	

Il composto si riduce con idrosolfito di sodio e si ossida poi nuovamente all'aria.

Con acetato sodico ed anidride acetica dà un monoacetato oleoso giallo che distilla a 0,02 mm Hg a 120°C. Il composto ha dato all'analisi:

	trov. %	: C	70,61;	H	7,20
per C ₁₇ H ₂₂ O ₄	calc.	:	70,32;	7,64	

Nelle Tabelle 1 e 5 sono riportati gli spettri U. V. ed RMN del composto che sono in accordo con le formule proposte (VI e VII).

Il potere rotatorio sarà riportato in altro lavoro dato che, come per i Mansononi D ed E, non è effettuabile con i normali apparecchi per il forte assorbimento nel visibile.

Mansonone C. — Il composto viene ottenuto per separazione cromatografica delle frazioni 7-70 come sopra riportato. Il prodotto cristallizza dall'esano in aghi giallo arancio fondenti a 134-138°.

Il composto ha dato all'analisi:

	trov. %	: C	78,83;	H	6,93
per C ₁₅ H ₁₆ O ₂	calc.	:	78,92;	7,06	

Il composto si riduce con idrosolfito di sodio in soluzione acquosa e poi si riossida nuovamente all'aria. Con piridina, anidride acetica e zinco in polvere dà un diacetilderivato che cristallizza da cicloesano e fonde a 156-158°. Il composto ha dato all'analisi:

	trov. %	: C	72,58;	H	6,95
per C ₁₉ H ₂₂ O ₄	calc.	:	72,59;	7,05	

Per ebollizione con una soluzione acetica di *o*-fenilendiammina dà un derivato chinossalinico giallo dorato dalla formula C₂₁H₂₀N₂ che cristallizzato da esano fonde a 103-104°.

	trov. %	: N	9,18;
	calc.	:	9,33;

Gli spettri U. V. (Tab. 1), I. R. e RMN (Tab. 4) sono in accordo con la formula (I) che risulta essere quella del cadalen-7, 8-chinone, per il quale la letteratura riporta p.f. 134° e per il cui derivato chinossalinico p.f. 104° (LINDHAL, 1953).

Sebbene non sia stato effettuato il confronto diretto tra due campioni delle suddette sostanze si può ritenere che esse siano identiche.

Mansonone D. — Il composto viene ottenuto per separazione cromatografica della frazione 116-154 come sopra riportato e purificato per cristallizzazione da cicloesano e benzene. Si ottiene in cristalli di colore rosso-arancio fondenti a 173-175°.

Il composto ha dato all'analisi:

	trov. %	: C 74,22;	H 5,64
per $C_{15}H_{14}O_3$	calc.	: 74,36;	5,83

Il composto si riduce con idrosolfito in soluzione acquosa e si riossida all'aria. Con una soluzione acetica di *o*-fenilendiammina dà un derivato chinossalinico per ora identificato solo cromatograficamente data l'esigua quantità di sostanza isolata.

Non reagisce con acetato sodico ed anidride acetica. Con zinco ed anidride acetica e piridina dà un diacetilderivato pur esso riconosciuto solo cromatograficamente.

Gli spettri U. V. e I.R. confermano una struttura chinonica. I dati dello spettro RMN sono riportati nella Tab. n. 7.

Mansonone E. — Il composto viene ottenuto separando per cromatografia su colonna di gel di silice la frazione 116-154 come sopra riportato. Il prodotto viene purificato per cristallizzazione da cicloesano, cristalli rosso aranciati p.f. 148°.

Il composto ha dato all'analisi i seguenti risultati:

	trov. %	: C 74,11;	H 5,57
per $C_{15}H_{14}O_3$	calc.	: 74,36;	5,83

Il Mansonone E si riduce con idrosolfito di sodio in soluzione acquosa e si riossida quindi all'aria.

Con una soluzione acetica di *o*-fenilendiammina dà un derivato chinossalinico. Prismi giallo oro da benzene-cicloesano 1:4 p.f. 148-150° dalla formula $C_{21}H_{18}ON_2$. Analisi:

	trov. %	: N 9,09
	calc.	: 8,91

Con zinco, anidride acetica e piridina dà un diacetilderivato che cristallizzato da cicloesano fonde a 110°. Analisi:

	trov. %	: C 69,57;	H 6,03
per $C_{15}H_{20}O_5$	calc.	: 69,50;	6,14

Nelle Tab. 1 e 3 sono riportati rispettivamente i dati relativi agli spettri U.V. e RMN del composto che sono in accordo con la formula proposta.

Mansonone F. — Il composto viene come il precedente ottenuto per separazione cromatografica della frazione 116-154 come anche dalla frazione 155-170.

Il prodotto viene purificato per cristallizzazione dal benzolo. Si ottiene in aghi viola scuro p.f. 214°.

All'analisi ha dato i seguenti risultati:

	trov. %	: C	74,60;	H	4,75
per $C_{15}H_{12}O_3$	calc.	:	74,90;	5,12	

Il composto è molto sensibile alla luce, e si altera con il tempo, specialmente in soluzione.

Nelle Tab. 1 e 2 sono riportati rispettivamente i dati relativi agli spettri U. V. e RMN della sostanza.

Per questo composto ritenuto un azulene, SANDERMANN & DIETRICH (1959), riportavano un punto di fusione di 203-204°.

26 marzo 1966.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, R., T. A. GEISSMAN & R. C. MORRIS, 1938. Structure of Gossypol. *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 2967.
- COMIN, J. O., GONCALVES DA LIMA, H. N. GRANT, L. M. JACKMAN, W. KELLER-SCHIERLEIN & V. PRELOG, 1963. Über die Konstitution des Biflorins, eines o-Chinons der Diterpen-Reihe. *Helv. Chim. Acta*, **46**, 409.
- LINDHAL, R. G., 1953. Cadalene, hydroxy-cadalenes and a naphtholic compound $C_{15}H_{18}O$ from cadalene. *Ann. Acad. Sci. Fennicae, Ser. A II* **48**, 7.
- MARINI-BETTÒLO, G. B., C. G. CASINOVI & C. GALEFFI, 1965a. The quinones of *Mansonia* wood. *Lloydia*, **28**, 258.
- MARINI-BETTÒLO, G. B., C. G. CASINOVI & C. GALEFFI, 1965b. A new class of quinones: sesquiterpenoid quinones of *Mansonia altissima* Chev. *Tetrahedron Letters*, **52**, 4847.
- PORTÈRES, R., 1935. *Bull. Etudes hist. et scient. de l'Afrique Orientale Française*, **18**, 133.
- SANDERMANN, W. & H. H. DIETRICH, 1959. Über die Inhaltstoffe von *Mansonia altissima*, und ihre gesundheitschädigende Wirkung. *Holz Roh-Werkstoff*, **3**, 88.
- UFFER, A., 1952. Über die Inhaltstoffe von *Mansonia altissima* Chev. *Helv. Chim. Acta*, **35**, 528.

Nuove sostanze ad azione radio-sensibilizzante sulle emazie di coniglio irradiate *in vitro*

MARIA R. BIANCHI (*) e ENRICA STROM (*)

Laboratori di Chimica Biologica

Riassunto. — Gli acidi cloro- e fluoroacetico, il cloroformio, l'acido tricloroacetico, il metansulfonato di etile e il metansulfonato di sodio potenziano notevolmente gli effetti dei raggi X su sospensioni di emazie di coniglio irradiate *in vitro*. L'effetto sensibilizzante si verifica, solo se le sostanze sono presenti nel mezzo di sospensione durante l'irraggiamento, verosimilmente attraverso i prodotti di radiolisi delle sostanze.

Summary. (*New radio-sensitizing compounds acting on rabbit erythrocytes irradiated in vitro*). — Chloro- and fluoroacetic acid, chloroform, trichloroacetic acid and ethyl and sodium methanesulfonates enhance the response of rabbit erythrocytes irradiated *in vitro* with X rays (Fig. 1, Tab. 1). The radiation effects studied were the potassium loss from the cells immediately after the irradiation and the hemolysis 22 hours later.

The sensitizing effect is absent when the substances are added to the red cell suspensions just after the irradiation, or when they are washed out before irradiation (Fig. 2).

The results are in agreement with the hypothesis that sensitization is the result of damage to the red cells by the products of radiolysis of sensitizing compounds.

In due precedenti pubblicazioni, provenienti da questo stesso laboratorio (QUINTILIANI *et al.*, 1962; BIANCHI *et al.*, 1964), è stato ampiamente riferito sull'effetto sensibilizzante all'azione dei raggi X che si manifesta in sospensioni di globuli rossi di coniglio irradiati *in vitro* quando nel mezzo di sospensione siano contenute certe sostanze quali gli acidi bromo- e iodoacetico, la iodoacetammide, l'acido iodopropionico, gli ioduri alcalini, lo iodio molecolare e la N-etilmaleimmide. Il suddetto effetto consiste in uno spiccato incremento della perdita del potassio intracellulare e dell'emolisi indotte da una data dose di raggi X.

(*) Borsista dei Laboratori di Chimica Biologica.

Nella presente nota sono riferiti i risultati di esperienze eseguite con altri composti alcuni dei quali correlati chimicamente con i precedenti ed altri no. Tali esperienze sono state suggerite da osservazioni di altri Autori su differenti sistemi biologici.

È stato infatti riportato da CERVIGNI & SCARASCIA (1961) che nei semi di *Nicotiana tabacum* trattati con metansulfonato di etile e poi con raggi X, l'inibizione della germinazione è di gran lunga maggiore della somma degli effetti indotti da ciascuno dei due trattamenti isolatamente. Più recentemente COTTON & LOCKINGEN (1963) hanno osservato un notevole effetto di sensibilizzazione indotto dal cloroformio sull'inattivazione di colture di batteriofago irradiate con raggi X.

MATERIALI E METODI SPERIMENTALI

La tecnica sperimentale impiegata è la stessa che è stata già descritta in dettaglio nei precedenti lavori (QUINTILIANI *et al.*, 1962; BIANCHI *et al.*, 1964).

Essa consisteva essenzialmente nel preparare delle sospensioni di globuli rossi di coniglio, contenenti 2×10^9 cellule per ml, in una soluzione di NaCl 0,12 M tamponata a pH 7,2 con fosfato di sodio 0,033 M. Aliquote di queste sospensioni erano addizionate o no delle sostanze in esame ed irradiate con raggi X a 200 Kv e 15 mA, con una intensità di dose di 7.200 r misurata con dosimetro al solfato ferroso. Usualmente era somministrata una dose totale di 144 Kr. Subito dopo l'irradiazione si procedeva alla determinazione del potassio ceduto dagli eritrociti al mezzo di sospensione mediante fotometria a fiamma, mentre una seconda serie di campioni trattati nello stesso modo era conservata a 4° C per 22 ore, dopo le quali si procedeva alla determinazione del grado di emolisi misurando per via colorimetrica la quantità di emoglobina presente nel mezzo di sospensione.

Sono stati impiegati generalmente prodotti puri per analisi senza ulteriori purificazioni. Il metansulfonato di etile ci è stato gentilmente fornito dal Prof. G. T. Cervigni, del Laboratorio di Genetica Vegetale del C.N.E.N., al quale esprimiamo vivi ringraziamenti. Il metansulfonato di sodio è stato preparato per idrolisi a caldo dell'estere etilico in presenza della quantità stechiometrica di idrossido di sodio. Il cloroformio è stato usato preparandone una soluzione satura nella stessa soluzione salina tamponata usata per alire le sospensioni di eritrociti. Dai dati sulla solubilità della sostanza è stato dedotto che tale soluzione fosse circa 4×10^{-2} M e pertanto aggiungendone 0,1 ml a 1,5 ml di sospensione di globuli rossi si otteneva una concentrazione finale stimata di circa $2,5 \times 10^{-3}$ M. La stessa soluzione salina tamponata è stata usata per preparare le soluzioni di tutte le sostanze esaminate, avendo cura di aggiustare eventualmente il pH al valore di 7,2.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Ciascuna serie sperimentale comprendeva aliquote della stessa sospensione eritrocitaria trattate come segue :

- 1) campioni di controllo non trattati ;
- 2) campioni ai quali erano soltanto aggiunte le sostanze in esame ;
- 3) campioni irradiati con 158 Kr di raggi X ;
- 4) campioni ai quali erano aggiunte le sostanze in esame e poi, dopo 30 minuti di contatto a temperatura ambiente, irradiati con 158 Kr di raggi X.

Tutte le sostanze usate nel corso delle presenti esperienze sono risultate, per sé e alle concentrazioni usate, prive di potere emolitico e della capacità di indurre perdita del potassio intracellulare.

I risultati complessivi del gruppo di esperienze eseguite con il metansulfonato di etile alla concentrazione $6,1 \times 10^{-2}$ M sono rappresentati nella Fig. 1.

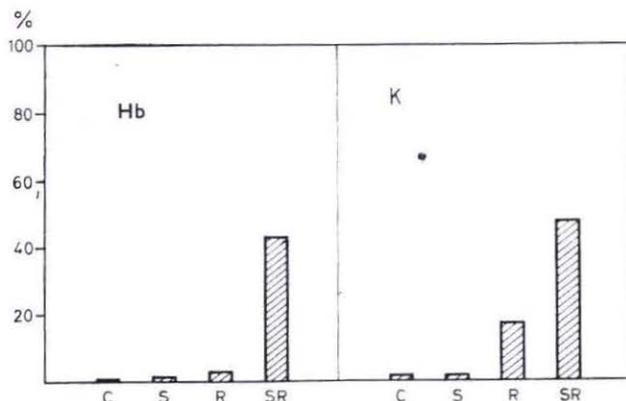


Fig. 1. — Effetto del metansulfonato di etile (MSE) $6,2 \times 10^{-2}$ M sulla emolisi (Hb) e sulla perdita del potassio intracellulare (K) in globuli rossi di coniglio irradiati con 158 Kr di raggi X.

(I Valori di Hb e K indicano rispettivamente le percentuali del contenuto totale di emoglobina e di potassio, presenti negli eritrociti della sospensione in esame, che si ritrovano nel mezzo di sospensione).

- C = campioni di controllo non trattati.
 S = campioni contenenti MSE e non irradiati.
 R = campioni irradiati con raggi X.
 SR = campioni contenenti MSE e irradiati.

Come si vede dalla figura, tanto la perdita del potassio intracellulare che l'emolisi provocate dall'irradiazione sono notevolmente più intense in presenza di tale sostanza. Le differenze tra la risposta all'irradiazione in presenza e in assenza del metansulfonato di etile sono in entrambi casi altamente significative.

I risultati relativi a tutte le altre sostanze esaminate nel corso delle presenti esperienze sono presentati in forma riassuntiva nella Tabella 1.

TABELLA I.

Effetto di vari composti sulla radio-sensibilità « in vitro » di globuli rossi di coniglio

C O M P O S T O	Concentrazione molare	N° di prove	Indice di sensibilità $\left(\frac{SR - R}{R}\right)^*$	
			Hb	K
acido iodacetico	$1,3 \times 10^{-4}$	7	4,6	1,0
» »	$6,5 \times 10^{-4}$	12	17,3	3,6
acido cloracetico	$1,3 \times 10^{-3}$	2	0,1	0,1
» »	$1,3 \times 10^{-2}$	3	5,2	1,9
acido fluoroacetico	$1,7 \times 10^{-2}$	2	1,3	0,6
acido acetico	$6,0 \times 10^{-2}$	2	0,0	0,0
metansulfonato di etile	$1,6 \times 10^{-2}$	3	8,3	1,6
» » »	$6,1 \times 10^{-2}$	7	10,1	1,5
metansulfonato di sodio	$4,7 \times 10^{-2}$	3	8,8	1,0
» » »	$6,1 \times 10^{-2}$	3	9,8	1,4
cloroformio	$2,5 \times 10^{-3}$	3	40,3	4,3
acido tricloroacetico	$2,5 \times 10^{-3}$	3	8,4	1,3

* SR = risposta all'irradiazione in presenza del composto in esame. R = risposta all'irradiazione in assenza del composto in esame.

I valori di Hb e K indicano rispettivamente le percentuali del contenuto totale di emoglobina e di potassio, presenti negli eritrociti della sospensione in esame, che si ritrovano nel mezzo di sospensione.

Essi sono espressi per mezzo di un indice di sensibilizzazione, — lo stesso già usato per esprimere i corrispondenti risultati dei nostri lavori precedenti, — calcolato nel modo seguente: $I = \frac{SR - R}{R}$; ove SR = risposta alle radiazioni in presenza della sostanza in esame e R = risposta alle sole radiazioni.

Nelle prime righe della tabella sono riportati i valori dell'indice di sensibilizzazione ottenuti precedentemente per l'acido iodoacetico (BIANCHI *et al.*, 1964), la cui attività sensibilizzatrice abbiamo costantemente usato come termine di confronto.

L'esame della tabella mostra che gli analoghi dell'acido iodoacetico, contenenti il cloro e il fluoro al posto dello iodio, mostrano anch'essi una certa attività sensibilizzatrice, che è assai meno spiccata di quella dell'acido iodoacetico e più intensa per il prodotto clorurato che per quello fluorurato. In mancanza dell'atomo di alogeno, il potere sensibilizzante è del tutto assente. L'acido acetico infatti è risultato completamente inattivo.

I risultati ottenuti complessivamente con gli alogeno-acetati mostrano dunque che il potere sensibilizzante è in relazione inversa con l'energia del legame alogeno-carbonio. Essi sembrano anche confermare le conclusioni alle quali eravamo pervenuti in base ai risultati delle nostre precedenti osservazioni, e cioè, che non è dimostrabile, nel caso dei globuli rossi, una relazione tra potere alchilante e attività sensibilizzatrice. Infatti l'acido fluoracetico appare circa 3 volte meno attivo dell'acido cloroacetico come sensibilizzante, mentre la sua velocità di reazione come alchilante è da ritenere praticamente nulla (DICKENS, 1933).

L'indipendenza della sensibilizzazione dal potere alchilante ha trovato inoltre una chiara conferma nei risultati ottenuti con metansulfonato di etile e di sodio. Come si vede dalla Tabella 1, entrambe le sostanze mostrano potere sensibilizzante, modicamente più intenso, a parità di concentrazione, quello dell'estere etilico. Solo quest'ultimo è però dotato di funzione alchilante, mentre ne è del tutto sprovvisto il metansulfonato di sodio.

Per spiegare il meccanismo della sensibilizzazione alle radiazioni nel nostro sistema, abbiamo ritenuto accettabile, perché meglio aderente ai fatti sperimentali, l'ipotesi che le sostanze sensibilizzatrici agiscano per mezzo dei loro prodotti di radiolisi, probabilmente sotto forma di radicali, l'attacco dei quali è da ritenere maggiormente lesivo per le strutture della membrana eritrocitaria che non quello dei prodotti della radiolisi dell'acqua, ai quali è dovuto l'effetto delle radiazioni in assenza di tali sostanze.

Anche i risultati ottenuti con il cloroformio sono in accordo con l'ipotesi ora formulata. Come risulta sempre dalla Tabella 1, tale sostanza è risultata la più attiva tra quelle saggiate, e ciò è verosimilmente da mettere in relazione con la elevata radiolabilità di essa. È ben noto infatti che il cloroformio è degradato dalle radiazioni ionizzanti con un rendimento assai elevato, tanto che ne è stato suggerito l'impiego come dosimetro chimico per bassi livelli di radiazioni. I prodotti terminali della radiolisi del cloroformio in soluzione acquosa aerata sono essenzialmente HCl, H₂O₂ e CO₂. Il rendimento globale della radiolisi in soluzione satura corrisponde ad un G (-CHCl₃) di circa 37 (TEPLY, 1960). La formazione dei suddetti prodotti terminali sembra avvenire attraverso una serie di reazioni intermedie che coinvolgono probabilmente vari tipi di radicali e che non sono state ancora sicuramente dimostrate. Anche l'acido tricloroacetico si è dimostrato un energico sensibilizzante, ed è interessante notare, tenendo sempre presente l'ipotesi da noi formulata, come, in rapporto all'acido cloroacetico, la presenza di tre atomi di cloro invece che di uno, esalti notevolmente l'attività sensibilizzatrice.

Ulteriori elementi a conforto del meccanismo d'azione da noi proposto possono derivare dall'esame dei risultati ottenuti aggiungendo le sostanze in esame alle sospensioni eritrocitarie subito dopo l'irraggiamento di queste ultime, oppure allontanando la frazione di esse ancora libera dopo 30 mi-

nuti di contatto con i globuli rossi, mediante centrifugazione e risospensione delle emazie in sola soluzione salina tamponata, subito prima dell'irraggiamento medesimo. Come risulta dalla Fig. 2 e dalla Tab. 2, in entrambi i casi l'effetto sensibilizzante indotto dall'acido cloroacetico, dall'acido tri-

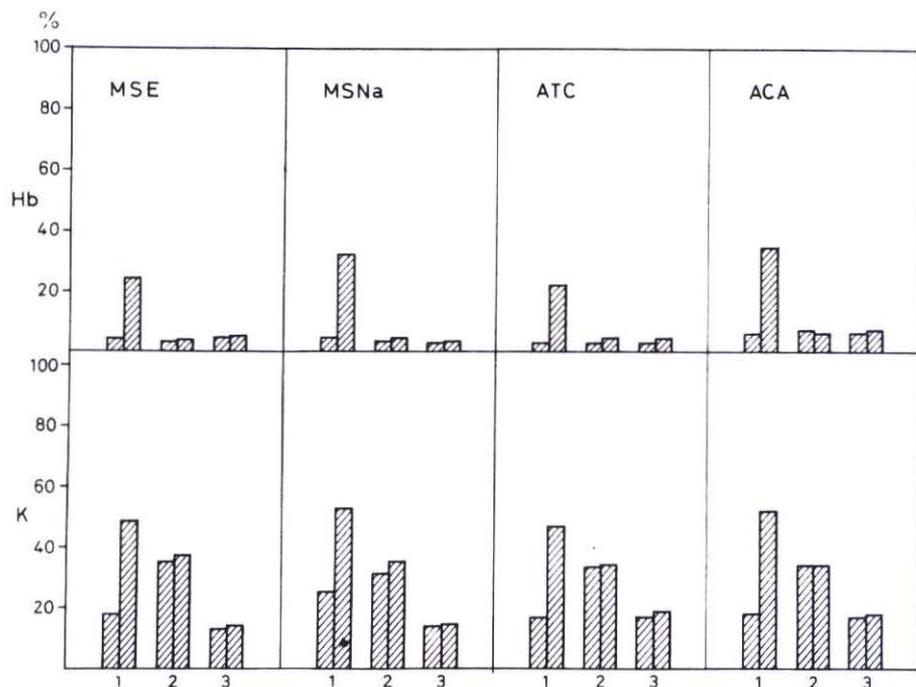


Fig. 2. — Potere radio-sensibilizzante di metansulfonato di etile (MSE), metansulfonato di sodio (MSNa), acido tricloroacetico (ATC) e acido cloroacetico (ACA) a seconda che le sostanze siano aggiunte 30 min. prima dell'irradiazione (¹), subito dopo (²) o che siano rimosse dal sistema prima dell'irradiazione (³). (I valori di Hb e K riportati nel grafico hanno lo stesso significato che in Fig. 1. La prima colonna in ciascuna condizione si riferisce all'effetto dell'irradiazione in assenza della sostanza). Dati tabulati in Tab. 2.

cloroacetico, dal metansulfonato di etile e dal metansulfonato di sodio scomparire completamente.

Il fatto di maggiore interesse che, a nostro avviso, è emerso dalle presenti ricerche, è l'identificazione di una nuova categoria di composti che agiscono nel sistema da noi studiato come radio-sensibilizzanti, e cioè i metansulfonati. Si tratta di sostanze strutturalmente diverse dai composti alogenati, ma il cui comportamento presenta tali analogie con quello di questi ultimi da far ritenere verosimile l'ipotesi che in entrambi i casi l'effetto radio-sensibilizzante sia mediato attraverso i prodotti della loro radiolisi.

Tale proprietà risulterebbe quindi non esclusiva dei composti alogenati ma comune anche all'acido metansolfonico, dato che sono risultati ugualmente attivi tanto l'estere etilico di esso che il suo sale sodico.

TABELLA 2.

Potere radio-sensibilizzante di metansulfonato di etile (MSE), metansulfonato di sodio (MSNa), acido tricloroacetico (ATC) e acido cloroacetico (ACA) a seconda che i composti siano aggiunti 30 min' prima dell'irradiazione, subito dopo o siano rimossi dal sistema prima dell'irradiazione.

COMPOSTO AGGIUNTO	PARAMETRO MISURATO *	AGGIUNTA ALLA SOSPENSIONE ERITROCITARIA					
		30 minuti prima dell'irradiazione		subito dopo irradiazione		rimosso prima dell'irradiazione	
		controllo	aggiunta composto	controllo	aggiunta composto	controllo	aggiunta composto
MSE	Hb	2,9	22,9	2,5	2,6	3,4	3,8
	K	17,7	47,8	36,9	38,2	13,1	14,7
MSNa	Hb	3,3	31,9	2,6	3,4	1,5	1,9
	K	26,1	52,4	33,5	35,2	13,3	13,4
ATC	Kb	2,3	21,7	2,7	3,4	2,9	3,6
	K	18,2	47,0	33,4	33,9	16,9	18,8
ACA	Hb	4,6	38,5	5,9	5,3	5,3	5,6
	K	19,6	51,9	33,7	33,7	16,5	17,1

* I valori di Hb e K indicano rispettivamente le percentuali del contenuto totale di emoglobina e di potassio, presenti negli eritrociti della sospensione in esame, che si ritrovano nel mezzo di sospensione.

Gli AA. ringraziano vivamente il Sig. L. Bernardini per la preziosa collaborazione tecnica. È stata anche apprezzata l'assistenza del Sig. V. Puccio.

6 aprile 1966.

BIBLIOGRAFIA

- BIANCHI, M. R., M. BOCCACCI, P. MISITI-DORELLO & M. QUINTILIANI, 1964. *Intern. J. Rad. Biol.*, **8**, 329.
- CERVIGNI, T. & G. T. SCARASCIA, 1961. *Atti Ass. Gen. Ital.*, **6**, 343.
- COTTON, I. M. & L. S. LOCKINGEN, 1963. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 363.
- DICKENS, F., 1933. *Biochem. J.*, **27**, 1141.
- QUINTILIANI, M., E. STROM, M. R. BIANCHI & M. BOCCACCI, 1962. *Symposium on biological effects of ionizing radiation at the molecular level*, I.A.E.A., Vienna, p. 295.
- TEPLY, J., 1960. *Collection Czech. Chem. Commun.*, **25**, 24.