

12. Guido CAVINA. — Studio spettrofotometrico di un equilibrio calcione - flavanone.

**Riassunto.** — Nel presente lavoro è stato eseguito lo studio spettrofotometrico dell'equilibrio tra il 2'-ossi-4',5'-dimetossi-3,4 diossimetilen-calcione ed il suo isomero 6,7-dimetossi-3',4'-diossimetilen-flavanone. Si è potuto osservare che tanto la trasformazione calcione  $\rightarrow$  flavanone, quanto la trasformazione opposta, si svolgono secondo una reazione di primo ordine, a pH e temperatura costanti. La trasformazione calcione  $\rightarrow$  flavanone si verifica entro l'intervallo di pH compreso tra pH 1 circa e pH 11,5 circa e risulta accelerata notevolmente dal crescere del pH. La trasformazione flavanone  $\rightarrow$  calcione si verifica entro l'intervallo di pH compreso tra pH 12,5 circa e 14 e risulta anch'essa accelerata dal crescere del pH.

**Résumé.** — L'auteur a fait l'étude spectro-photométrique de l'équilibre entre le 2'-oxy-4',5'-dimetoxy-3,4 dioxyméthylène-calcione et son isomère 6,7-dimetoxy-3',4'-dioxyméthylène-flavanone. Il a pu observer que la transformation calcione  $\rightarrow$  flavanone, aussi bien que la transformation contraire, se développe selon une réaction de premier ordre, à pH et température constantes. La transformation calcione  $\rightarrow$  flavanone a lieu dans l'intervalle de pH compris entre pH 1 environ et pH 11,5 environ et s'accélère beaucoup à mesure que pH croît. La transformation flavanone  $\rightarrow$  calcione a lieu dans l'intervalle de pH compris entre pH 12,5 environ et 14 et est elle aussi accélérée à mesure que le pH augmente.

**Summary.** — The present report covers a spectro-photometric study of the equilibrium between 2'-oxy-4', 5'-dimetoxy-3, 4-dioxymethylene-calcione and its isomer 6, 7-dimetoxy-3', 4'-dioxymethylene-flavanone. It was possible to observe that both the calcione  $\rightarrow$  flavanone transformation and the transformation the other way round, take place in accordance with a first order reaction, at constant pH and temperature. The calcione  $\rightarrow$  flavanone transformation takes places within an pH interval comprised roughly between pH 1 and pH 11.5 and it appears considerably accelerated as pH grows. The flavanone  $\rightarrow$  calcione transformation takes place within pH interval comprised roughly between pH 12.5 and 14 and it also appears accelerated by the growht of pH.

**Zusammenfassung.** — Diese Arbeit enthält ein spektro-photometrisches Studium über das Gleichgewicht zwischen 2'-oxy-4' 5'-dimetoxy

-3.4, dioxymethylen-calcon und sein Isomer 6.7-dimetoxy-3.4, dioxymethylenflavanon. Es hat sich dabei erwiesen, dass sowohl die Veränderung von Calcon gegen Flavanon wie auch die umgekehrte Reaktion sich als eine Reaktion ersten Grades abspielen wobei pH und Temperatur konstant bleiben. Die Veränderung von Calcon in Flavanon geschieht während des Intervalls von pH, welches zwischen circa pH 11 und pH 11.5 circa mit einbegriffen ist und zeigt eine bemerkenswerte Beschleunigung bei Anwachsen des pH. Die Veränderung von Flavanon in Calcon geschieht während des Intervalls von pH welches zwischen circa pH 12.5 und 14 mit einbegriffen ist, und auch hier tritt eine Beschleunigung auf, die vom Anwachsen des pH abhängig ist.

---

E' noto da tempo che tra i 2'-ossi-calconi e gli isomeri flavanoni esiste in numerosi casi un equilibrio, spostabile in un senso o nell'altro secondo le condizioni di pH del mezzo in cui si opera.

Tale equilibrio è stato molto studiato, soprattutto dal punto di vista preparativo. Sono da ricordare a questo proposito i lavori di S. KOSTANECKI e W. SZABRANSKI <sup>(1)</sup>, S. KOSTANECKI e V. LAMPE <sup>(2)</sup> W. FEUERSTEIN e S. KOSTANECKI <sup>(3)</sup>, nei quali si descrivono preparazioni di calconi da acetofenoni ed aldeidi aromatiche in soluzioni alcaline concentrate e trasformazioni dei 2'-ossi-calconi in flavanoni per lunga ebollizione dei primi in soluzioni acide minerali diluite. Queste reazioni di preparazione furono poco dopo estesamente studiate da G. BARGELLINI nei suoi numerosi lavori sui derivati di vari polifenoli <sup>(4, 5, 6, 7, 8, 9)</sup>.

Successivamente A. LOWENBEIN ottenne dal 2'-ossi-calcone il flavanone con NaOH all'1,5% <sup>(10)</sup>. Questa tecnica preparativa, basata sullo impiego di soluzioni diluite, fu particolarmente studiata da L. REICHEL assieme a K. MÜLLER <sup>(11)</sup> e W. BURCHART <sup>(12)</sup> nel 1941 e negli anni successivi. Questi AA. si posero come scopo lo studio della formazione di

---

(1) Ber. 37, 2634 (1904).

(2) Ber. 37, 773 (1904).

(3) Ber. 31, 715 (1898).

(4) Gazz. chim. ital. 41, II°, 1 (1911).

(5) Gazz. chim. ital. 45, II°, 10 (1915).

(6) Gazz. chim. ital. 45, I°, 64 (1915).

(7) Gazz. chim. ital. 46, I°, 249 (1916).

(8) Gazz. chim. ital. 49, II°, 47 (1919).

(9) Gazz. chim. ital. 49, II°, 65 (1919).

(10) Ber. 57, 1515 (1924).

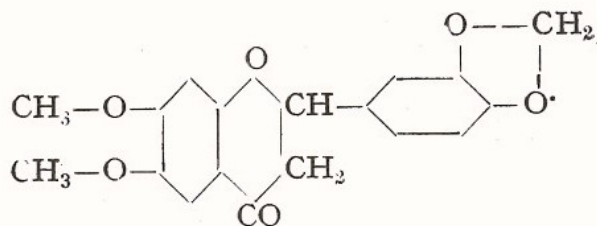
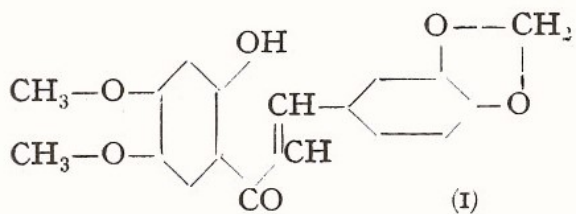
(11) Ber. 74, 1471 (1941).

(12) Ber. 74, 1802 (1941).

calconi e flavanoni in condizioni il più possibile vicine a quelle esistenti nei vegetali. Studiarono la condensazione di poli-ossi o -metossi acetofenoni con poli -ossi o -metossi benzaldeidi in soluzioni tampone ed alcaline diluite <sup>(13)</sup>. L. REICHEL e R. SCHICKLE <sup>(14, 15)</sup> e L. REICHEL e J. MAR-  
CHAND <sup>(16)</sup> estesero la reazione ai glucosidi di vari polioxiacetofenoni e polioxi-  
benzalaldeidi. Questi lavori, come pure quelli contemporanei di G. BARGELLINI e G. B. MARINI BETTOLO <sup>(17)</sup> e successivi di A. OLIVIERO, G. B. MARINI BETTOLO e G. BARGELLINI <sup>(18)</sup>, T. A. GEISSMAN e R. O. CLIN-  
TON <sup>(19)</sup>, hanno messo in evidenza l'influenza complessa dei sostituenti sulla possibilità maggiore o minore di trasformazione di un isomero nell'altro. In linea generale si può affermare che per un sistema calcone-flavanone isomero esiste un determinato valore di pH al di sotto del quale è stabile uno degli isomeri, generalmente il flavanone, mentre al disopra di esso è stabile l'altro isomero, ossia il calcone.

Si è ritenuto interessante verificare questo, studiando un caso di equilibrio calcone-flavanone con misure della velocità di trasformazione a vari pH ed a temperatura costante. In tal modo si è potuto precisare l'ordine delle reazioni di trasformazione. Negli altri casi citati di equilibrio calcone - flavanone si sono studiati gli aspetti preparativi o la identificazione di prodotti naturali; come ad esempio nei lavori di G. ZEM-  
PLEN e R. BOGNAR <sup>(20)</sup> sull'isomeria Salipurposide - Isosalipurposide, di C. Z. WAWRA e J. L. WEBB <sup>(21)</sup> sull'esperidina e da J. SHINODA e S. SATO <sup>(22)</sup> sulla sakuranetina.

Oggetto di questo studio è stato il sistema formato da due isomeri, il 2'-ossi-4',5'-dimetossi-3,4-diossimetilen-calcone (I) ed il 6,7-dimetossi-3',4'-diossimetilen-flavanone (II) la cui preparazione fu descritta da G. BARGELLINI e da G. B. MARINI BETTOLO <sup>(17)</sup>.



- (13) Ann. 550, 146 (1942).  
 (14) Ann. 553, 98 (1942).  
 (15) Ber. 76, 1134 (1953).  
 (16) Ber. 76, 1132 (1943).  
 (17) Gazz. chim. ital. 70, 170 (1940).  
 (18) Gazz. chim. ital. 78, 363 (1948).  
 (19) J. Am. Chem. Soc. 68, 697 (1946).  
 (20) Ber. 76, 386 (1943).  
 (21) Science 96, 302 (1942).  
 (22) J. Pharm. Soc. Jap. 48, 791, (1928).

Sono state scelte queste due sostanze perchè gli AA. già riconobbero nei derivati del 2'-ossi-4',5'-dimetossi-calcone una notevole capacità ad isomerizzarsi nel corrispondente flavanone, tanto che è possibile isolare nelle reazioni di preparazione una miscela dei due prodotti. Per misurare le concentrazioni dei due prodotti nelle miscele, si è pensato di impiegare il metodo spettrofotometrico, applicando le relazioni per l'assorbimento additivo in sistemi a due componenti, secondo G. MELLON (23). I metodi di separazione calcone - flavanone basati sulle differenze di solubilità, come per es. quello citato da L. REICHEL e W. BURCHART (12), sono relativamente poco precisi e non permettono di lavorare su piccole quantità di sostanze.

I risultati ottenuti in questo lavoro permettono di affermare che nelle condizioni sperimentali qui definite, lavorando in soluzione tampone ed a basse concentrazioni, il 2'-ossi-4',5'-dimetossi-3,4-diossimetilen-calcone si trasforma nel suo isomero 6,7-dimetossi-3',4'-diossimetilen-flavanone secondo una reazione di primo ordine. La velocità di reazione cresce col crescere del pH da pH 4 circa fino a pH 12 circa. Oltre questo valore di pH, il senso della trasformazione si inverte rapidamente, ossia si ha la trasformazione del flavanone in calcone, anche in questo caso secondo una reazione di primo ordine, accelerata dal crescere del pH da 12 fino a 14.

#### PARTE SPERIMENTALE.

Le sostanze impiegate nelle prove sono state preparate secondo G. BARGELLINI e G. B. MARINI BETTOLO (17). Si sono preparate con esse due soluzioni « madre » in alcool etilico assoluto, contenenti circa 50  $\mu$  g. per  $\text{cm}^3$  di soluzione. Da tali soluzioni, per diluizione nel rapporto di 1:10 si sono preparate le varie soluzioni necessarie per le determinazioni spettrofotometriche. In primo luogo si sono eseguiti gli spettri in alcool etilico a 95° del calcone e del flavanone (Fig. 1). In base a tali spettri si sono periodicamente controllate le soluzioni di partenza che venivano conservate al riparo dalla luce ed in frigorifero, rinnovandole secondo necessità.

Tali cautele si sono rese necessarie perchè si è osservato che il flavanone in semplice soluzione alcoolica tende a trasformarsi nel tempo in calcone; quest'ultimo invece resta praticamente inalterato.

Tutte le misure sono state effettuate con lo spettrofotometro di

---

(23) M. G. MELLON: Analytical Absorption Spectroscopy, J. Wiley & Sons. New York 1950, pag. 350.

BECKMAN modello DU. Le estinzioni sono state misurate ogni 5 m $\mu$ , avvicinando le misure nelle regioni dello spettro nelle quali l'andamento dell'assorbimento lo richiedeva.

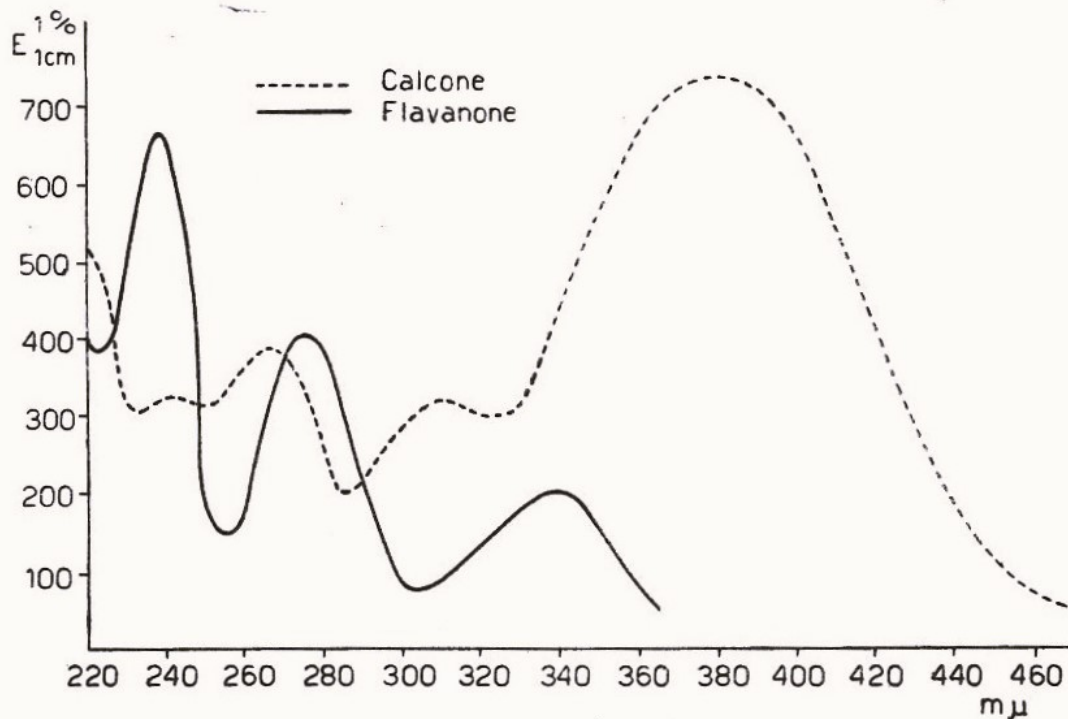


FIG. 1. - Spettri in alcool etilico a 95°.

#### MISURE IN SOLUZIONE TAMPONE.

Gli spettri del calcione e del flavanone sono stati ottenuti in soluzioni tamponate a pH variabili da 1 a 14. Per ragioni di solubilità i tamponi sono stati diluiti con alcool a 95° nella misura di 1 : 1. Le soluzioni di lavoro sono sempre risultate di questa composizione e la loro concentrazione è stata portata ad 1/10 di quella delle soluzioni madri.

Per i tamponi da pH 1 fino a 9, nei quali sia il calcione che il flavanone presentano una velocità di trasformazione relativamente bassa alla temperatura ambiente, si sono determinati gli spettri di assorbimento dei due prodotti iniziando la misura entro 15 - 30 minuti dopo la preparazione delle soluzioni. Successivamente le soluzioni venivano lasciate alla temperatura costante di 38° ± 0,5° in termostato ad acqua, per un tempo sufficientemente lungo, in modo da raggiungere lo stato di equilibrio o comunque uno stato ad esso prossimo. Raggiunta tale condizione, si determinava di nuovo lo spettro del calcione e del flavanone, eseguendo la misura delle estinzioni rispetto ad una aliquota di solvente che aveva subito lo stesso trattamento dei campioni.

Per i tamponi di pH superiore a 9, per i quali si è osservato che le velocità di trasformazione sono notevoli, e tali da produrre la trasformazione quasi completa di un isomero nell'altro nel tempo necessario a rilevare uno spettro, è stato necessario limitarsi a misurare gli spettri dopo 24 ore dalla preparazione delle soluzioni, cioè ad equilibrio raggiunto.

Poichè nel presente lavoro si è reso necessario eseguire misure della concentrazione in base a misure di estinzione, si è proceduto alla verifica della legge di Beer per le lunghezze d'onda scelte per le misure quantitative. Nel fare questo si ha avuto cura di procedere in ogni caso il più rapidamente possibile, affinché le estinzioni misurate non risultassero falsate dalle variazioni dovute alle reazioni di isomerizzazione. La misura del pH dei tamponi impiegati è stata eseguita con un potenziometro di Beckman, mod. G.

#### **CINETICA DELLA TRASFORMAZIONE CALCONE → FLAVANONE.**

Gli spettri di questo calcone e del flavanone isomero, mostrano, come in generale prevedibile (<sup>24</sup>, <sup>25</sup>), notevoli differenze. Il flavanone dà tre massimi d'assorbimento, il primo a 238 m $\mu$  in alcool e a 240 m $\mu$  in soluzioni acquose tamponate, fino a pH 9 circa, il secondo a 275 m $\mu$  in soluzioni tamponate fino a pH 9 circa, il terzo poco pronunciato e relativamente ampio a 340 - 345 m $\mu$ ; a 370 m $\mu$  il flavanone cessa praticamente di assorbire. I minimi sono nelle zone di 255 e di 305 m $\mu$ . Si è osservato che tale spettro coincide praticamente con quello ottenuto da M. K. SEIKEL e T. A. GEISSMAN (<sup>26</sup>) per il 3',4',6,7,-tetrametossi-flavanone.

Il calcone dà una banda d'assorbimento molto ampia nella zona di 380-400 m $\mu$  con massimo a 395 m $\mu$  nei vari tamponi fino a pH 9 circa e a 380 m $\mu$  in alcool etilico a 95°, dà un flesso a 340 m $\mu$ , due piccoli massimi nelle zone di 240 e 270 m $\mu$ , con piccoli spostamenti variabili da tampone a tampone e da questi all'alcool, inoltre due minimi nelle zone di 250 - 255 e 290 m $\mu$ . Tali caratteristiche qualitative e quantitative di assorbimento si mantengono costanti fino a pH 9 circa. A valori più alti del pH lo spettro del calcone subisce delle variazioni dovute alla presenza della forma ionizzata del calcone (ossidrile fenolico in 2'). L'assorbimento della forma ionizzata del calcone si può rilevare dalle misure in NaOH N/I, per quanto già in tampone a pH 12,5 il cal-

(<sup>24</sup>) Acta Phitochimica, 1, 92 - Chem. Zentr. 1923, III°, 224.

(<sup>25</sup>) Biochem. Z. 301, 150 (1939).

(<sup>26</sup>) J. Am. Chem. Soc. 72, 5720 (1950).

cone risulti quasi completamente dissociato. Gli spettri nei due solventi considerati sono riportati nelle figure 2 e 3. Si noti la scomparsa del massimo principale del calcione indissociato a 395 m $\mu$ . Da quanto sopra esposto, risulta come sia possibile misurare una variazione del

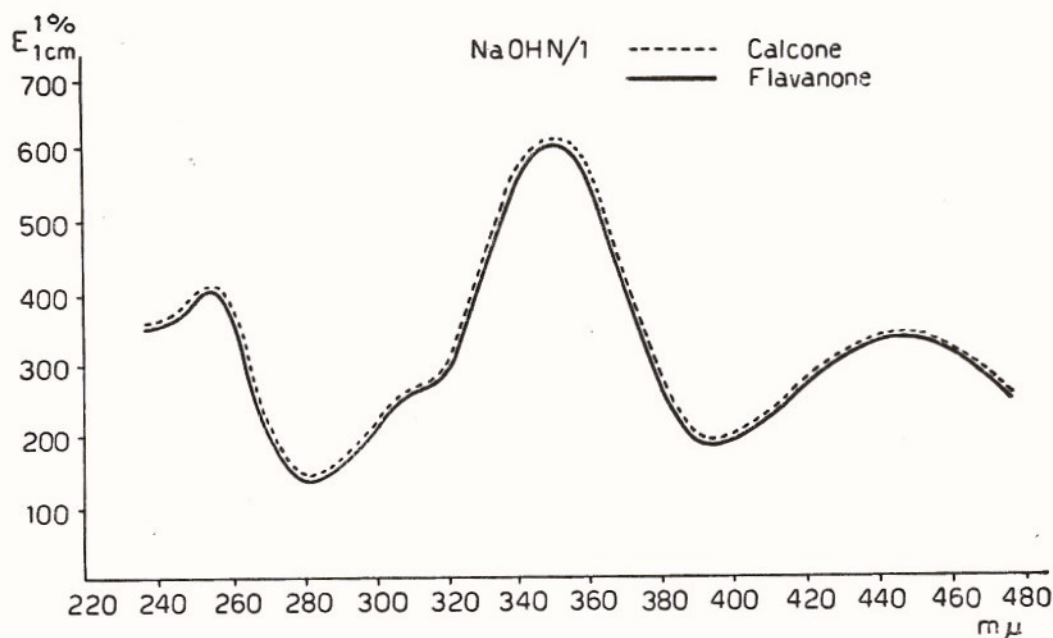


FIG. 2. - Spettri in soluzione di NaOH N/1.

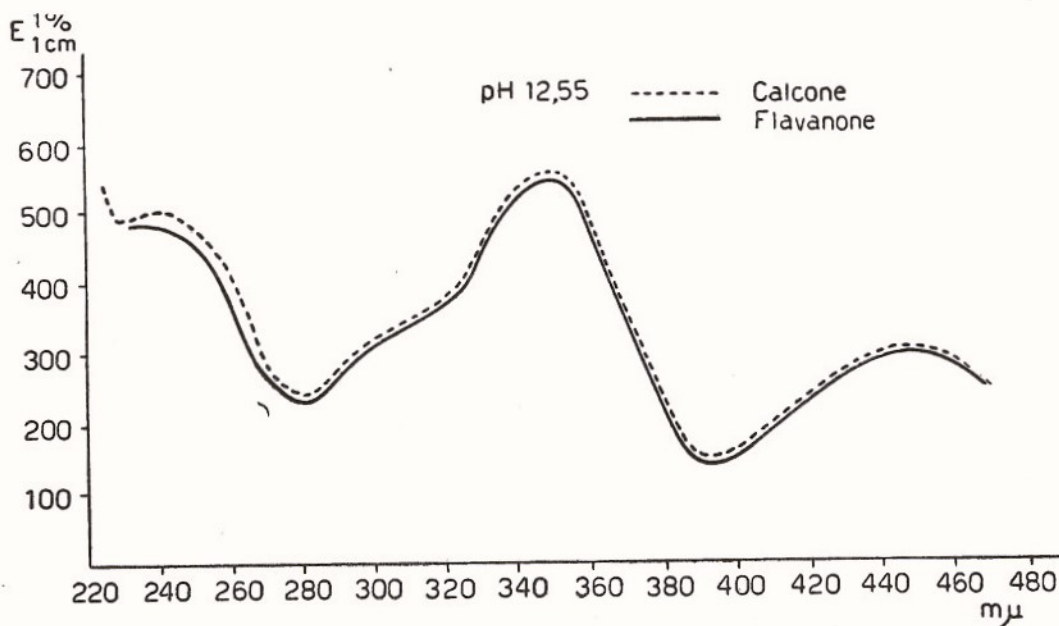


FIG. 3. - Spettri in soluzione tampone glicocollo-NaOH a pH 12,5.

contenuto in calcione, in una soluzione che lo contenga assieme a flavanone, misurando il valore dell'estinzione ottica a lunghezze d'onda opportune. In soluzioni alcool-tampone fino a pH 9 la misura dell'estinzione deve farsi a 395 m $\mu$ , in corrispondenza del massimo principale

del calcione indissociato. Per valori di pH superiori a 9, bisogna tenere conto dei diversi assorbimenti delle due forme coesistenti, indissociata e dissociata. Per fare questo si sono applicate le formule riportate da M. G. MELLON <sup>(23)</sup> per l'assorbimento additivo in sistemi a due componenti otticamente assorbenti. In entrambi i casi le misure vengono eseguite a lunghezze d'onda inferiori a 370 m $\mu$ , cioè in zone dello spettro nelle quali il flavanone non disturba le misure, poichè non assorbe.

Operando con questa tecnica, in condizioni definite di temperatura e di pH, è possibile pertanto seguire nel tempo la trasformazione del calcione in flavanone e viceversa.

#### DESCRIZIONE DELLE PROVE ESEGUITE IN SOLUZIONI IDROALCOLICHE CON VARI TAMPONI.

Sono state preparate soluzioni del calcione e del flavanone di concentrazione 5  $\gamma$  per cm<sup>3</sup> circa. Il solvente impiegato risultava costituito da alcool etilico a 95° e soluzione tamponata 0,1 M in parti eguali. Volumi adeguati di soluzione del calcione e del flavanone, ripartiti in vari flaconcini chiusi con tappo a smeriglio, sono stati mantenuti in termostato a 38° ± 0,5°. Ad intervalli di tempo misurati si sono prelevati campioni delle due soluzioni e si sono misurati i valori delle estinzioni a 395 m $\mu$ , per controllare le variazioni di concentrazione del calcione in entrambe le soluzioni, operando nel più breve tempo possibile. La concentrazione del calcione è stata misurata mediante la semplice relazione  $E = k c d$  ove E rappresenta l'estinzione misurata, d lo spessore della soluzione, preso eguale ad 1 e k il coefficiente d'estinzione, calcolato in precedenza verificando la legge in Beer.

Si è potuto subito rilevare che la trasformazione calcione  $\rightarrow$  flavanone decorre secondo una reazione di primo ordine. Infatti nelle varie prove eseguite risulta verificata la relazione:

$$K = \frac{2,303}{t} \cdot \log \frac{A}{A - x} = \frac{2,303}{t} \cdot \log \frac{E^0}{E_t}$$

ove A rappresenta la concentrazione iniziale del calcione ed A - x la concentrazione del calcione al tempo t. Analogamente E<sub>0</sub> ed E rappresentano le estinzioni della soluzione di calcione misurate al tempo zero ed al tempo t.

Nel vari grafici riportati viene verificato l'andamento lineare di  $\log \frac{A - x}{A}$  in funzione del tempo.

ELENCO DELLE PROVE.

1) Si è usata una soluzione a pH 1,33 ( $H_2SO_4$  0,05 M). Gli spettri del calcione e del flavanone all'inizio ed alla fine dell'esperienza sono riportati in fig. 4. Le concentrazioni usate sono di 4,9  $\gamma$  per  $cm^3$  per il calcione e di 5,06  $\gamma$  per  $cm^3$  per il flavanone.

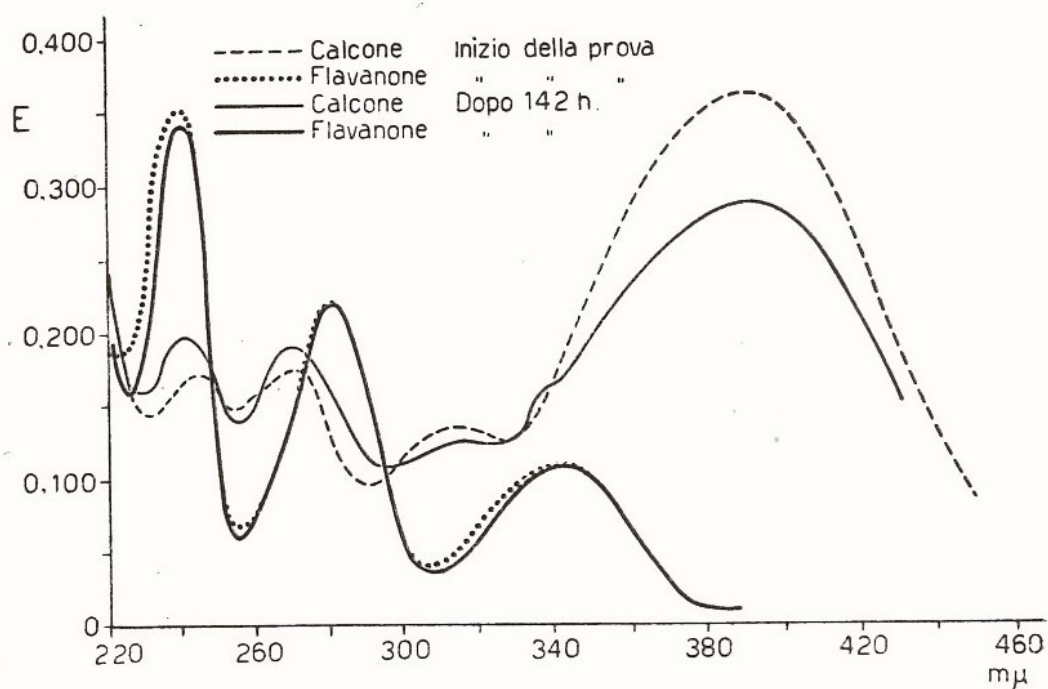


FIG. 4. - Spettri in soluzione a pH 1,33.

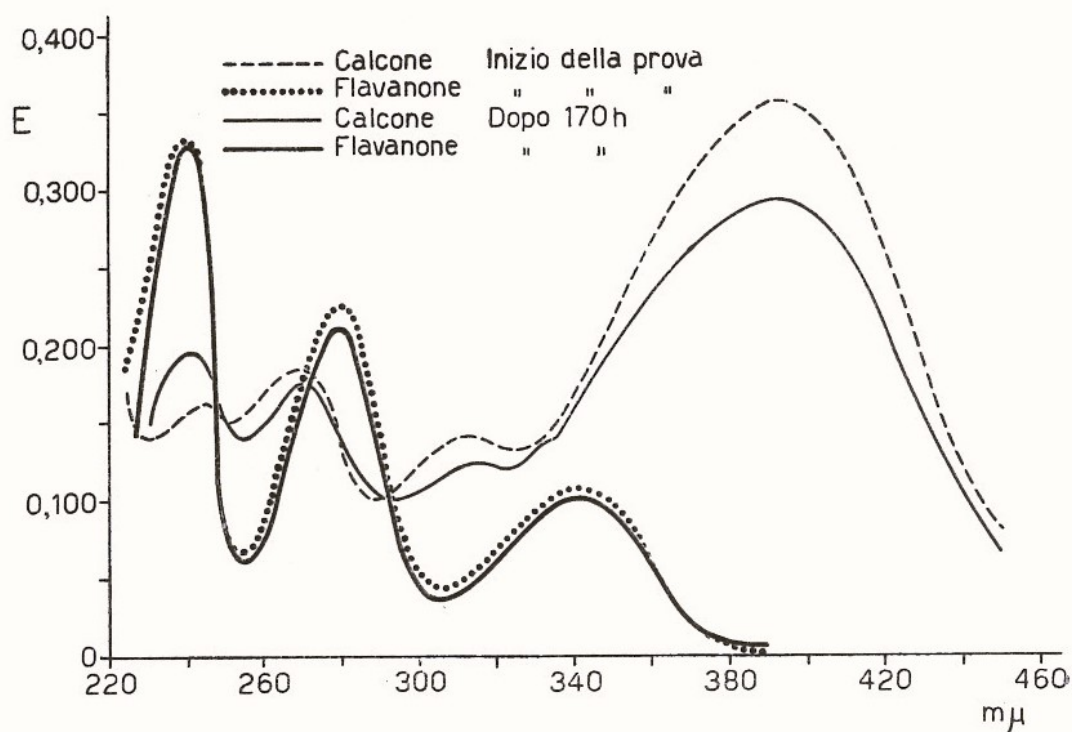


FIG. 6. - Spettri in soluzione a pH 3,90.

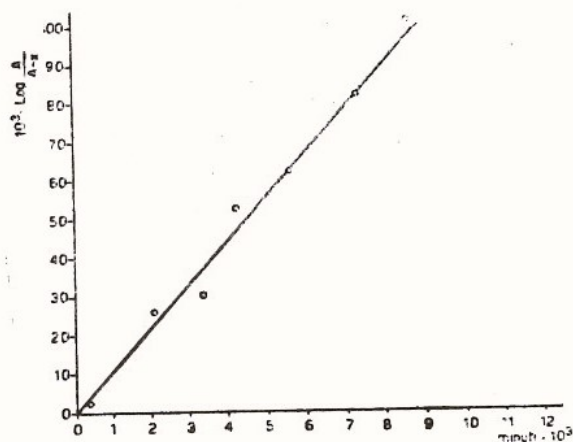


FIG. 5. - Misure in soluzione a pH 1,33.

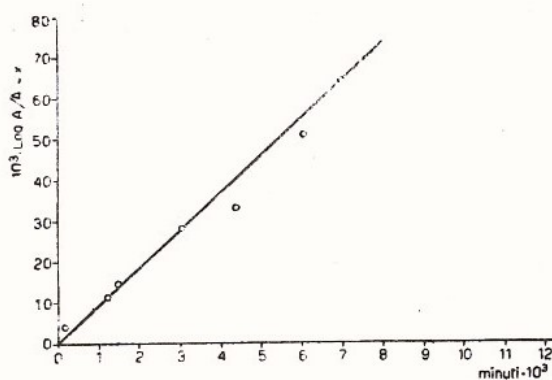


FIG. 7. - Misure in soluzione a pH 3,90.

Il valore della costante di velocità per la reazione monomolecolare è  $K = 2,35 \cdot 10^{-5} \text{ minuti}^{-1}$ , valore medio calcolato con scarto massimo  $\pm 0,35 \cdot 10^{-5}$  (fig. 5).

2) Si è usata una soluzione tampone acquosa a pH 3,90, preparata con soluzioni 0,1 M di acido acetico ed acetato sodico. Gli spettri del calcione e del flavanone sono riportati in fig. 6. Le concentrazioni usate sono le medesime della prova precedente. In fig. 7 è riportato l'andamento di  $\log. A / A - x$  in funzione del tempo. Dalle misure risulta  $K = 2,22 \cdot 10^{-5} \text{ minuti}^{-1}$ , valore medio con scarto massimo  $\pm 0,5 \cdot 10^{-5}$ .

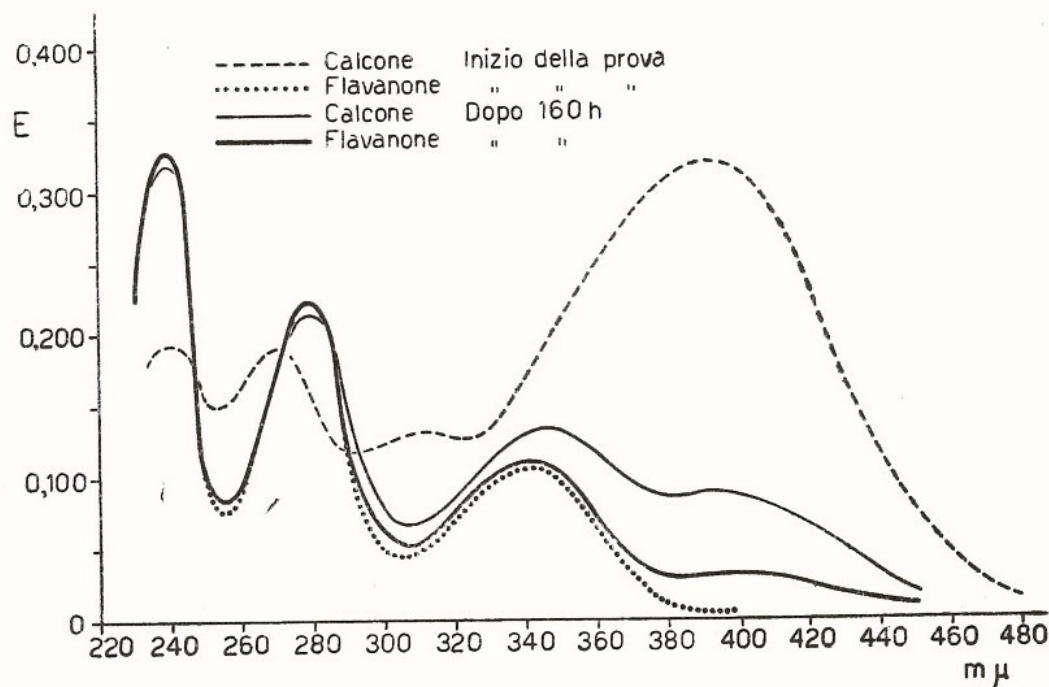


FIG. 9. - Spettri in soluzione a pH 6,65.

3) Si è usata una soluzione tampone acquosa a pH 6,65 preparata con soluzioni di citrato sodico ed idrato sodico 0,1 M. Gli spettri del calcione e del flavanone sono riportati in fig. 9. Le concentrazioni usate sono le medesime della prova precedente. In fig. 8 è riportato l'andamento di  $\log A / A - x$  in funzione del tempo; dalle misure risulta  $K = 1,73 \cdot 10^{-4}$  minuti<sup>-1</sup>, valore medio con scarto massimo  $\pm 0,3 \cdot 10^{-4}$ .

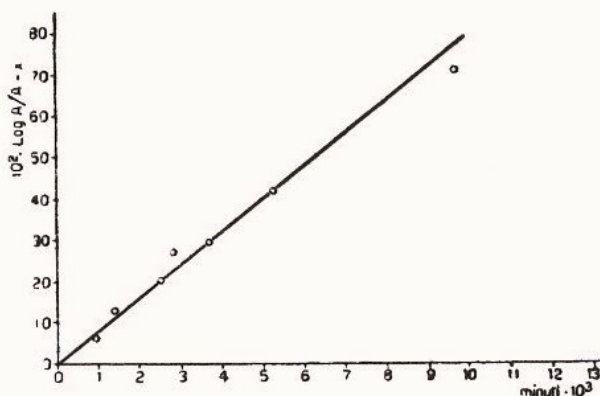


FIG. 8. - Misure in soluzione a pH 6,65.

4) Si sono usate soluzioni tampone acquose a pH 8,56, 9,35 e 9,59 preparate con miscele di soluzioni 0,1 M di idrato sodico e di glicocolloruro di sodio. Gli spettri del calcione e del flavanone a pH 8,56 sono

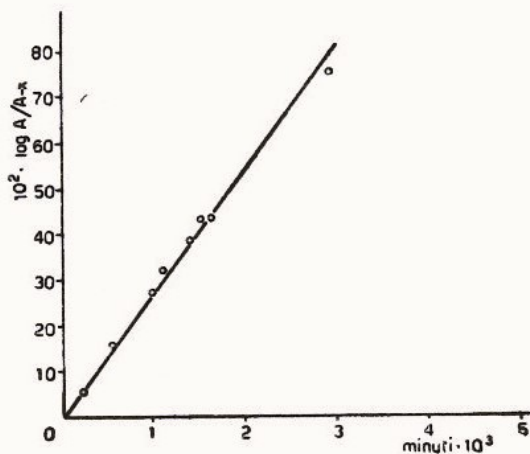


FIG. 10. - Misure in soluzione a pH 8,56.

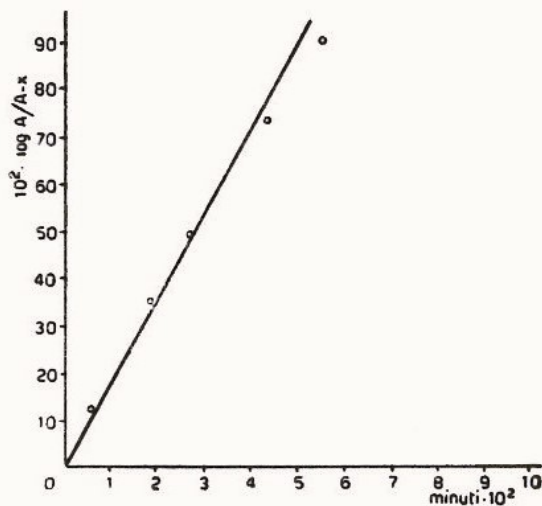


FIG. 11. - Misure in soluzione a pH 9,59.

riportati in fig. 12. Le concentrazioni usate sono di  $5,24 \gamma/\text{cm}^3$  per il calcione e di  $4,98 \gamma/\text{m}^3$  per il flavanone. Nelle figg. 10 e 11 sono riportati gli andamenti di  $\log A / A - x$  in funzione del tempo per i

tamponi a pH 8,56 e 9,59. Dalle misure risultano i seguenti valori di  $K$  :  $6,41 \cdot 10^{-4}$  minuti<sup>-1</sup> a pH 8,56;  $2,8 \cdot 10^{-3}$  minuti<sup>-1</sup> a pH 9,30;  $4,34 \cdot 10^{-3}$  minuti<sup>-1</sup> a pH 9,59. Tali sono i valori medi di  $K$  calcolati con scarti massimi di  $\pm 0,4 \cdot 10^{-4}$ ,  $\pm 0,2 \cdot 10^{-3}$ ,  $\pm 0,4 \cdot 10^{-3}$  minuti<sup>-1</sup> ai vari pH considerati nell'ordine sopra esposto.

E' interessante notare come già a questi valori di pH la reazione di trasformazione calcione  $\rightarrow$  flavanone sia sufficientemente rapida ed in un tempo adeguato praticamente completa, come risulta dalla fig. 12, nella quale si può notare che dopo 80 ore circa lo spettro del calcione si è trasformato, diventando praticamente coincidente con quello del flavanone, restato a sua volta inalterato.

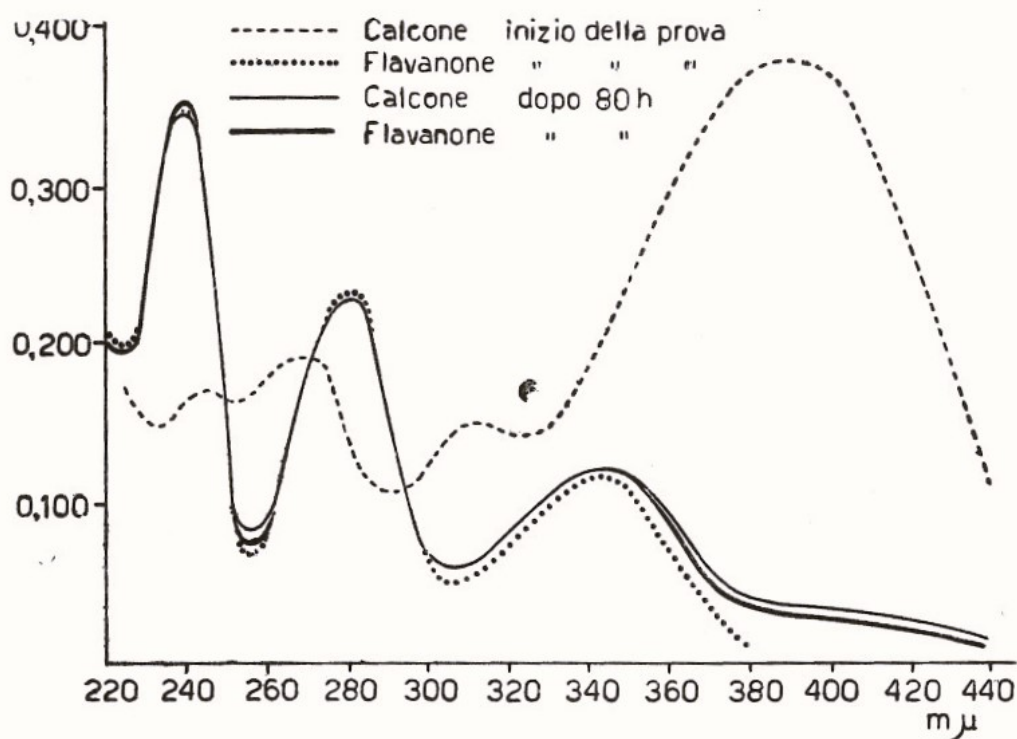


FIG. 12. - Spettri in soluzione a pH 8,56.

5) Le soluzioni tampone acquose a pH 10,03, 10,45, 11,40 e 12,02 sono state preparate con soluzioni 0,1 M di idrato sodico e di glicocolloruro sodico. A causa dell'aumento notevole della velocità di trasformazione presentato a questi valori di pH, non è stato possibile misurare con la tecnica precedentemente descritta il variare della concentrazione del calcione nel tempo. Infatti la trasformazione è praticamente completa in 15 minuti a pH 11,40.

E' stato necessario ricorrere ad un particolare sistema di termostati, uno mantenuto a  $38^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$  e l'altro a qualche grado sotto  $0^{\circ}$ . Essi venivano percorsi successivamente da una spirale di vetro sottile e sufficientemente lunga per permettere un rapido scambio di tempe-

ratura tra soluzione e termostato. Il volume della spirale è stato calcolato in modo da corrispondere al volume di liquido necessario a riempire una vaschetta dello spettrofotometro di Beckman. La soluzione per la misura è stata preparata diluendo la soluzione madre del calcione con la conveniente quantità di miscela alcool-tampone esattamente misurata e portata precedentemente a qualche grado sotto 0°. Operando con rapidità per mantenere la vaschetta alla più bassa temperatura possibile, si sono misurate le estinzioni a 395 m $\mu$  e 450 m $\mu$ , dalle quali si è calcolato l'ammontare del calcione come somma del prodotto dissociato ed indissociato.

Subito dopo si è portata la soluzione nella prima spirale immersa nel termostato a 38°. La soluzione è stata fatta scorrere entro tale spirale, mantenendovela per un tempo variabile, esattamente misurato ad ogni esperienza e successivamente è stata immessa nell'altra spirale, mantenuta a temperatura inferiore allo zero per essere raffreddata. Precedentemente si era controllato che a questa temperatura la velocità di reazione risultava molto bassa. Appena uscita dalla seconda spirale la soluzione è stata portata allo spettrofotometro e si sono misurati i valori delle estinzioni a 395 m $\mu$  e a 450 m $\mu$ . Il calcolo delle concentrazioni del calcione dissociato ed indissociato è stato eseguito applicando le seguenti formule, nelle quali l'estinzione è sempre riferita allo spessore di un cm:

$$(1) \quad E_{T,395} = k_{i,395} \cdot c_i + k_{d,395} \cdot c_d \quad (2) \quad E_{T,450} = k_{i,450} \cdot c_i + k_{d,450} \cdot c_d$$

in esse  $c_i$  e  $c_d$  sono rispettivamente le concentrazioni del calcione indissociato e dissociato, espresse in  $\gamma$  per cm<sup>3</sup>,  $k_{i,\lambda}$  e  $k_{d,\lambda}$  sono i coefficienti d'estinzione, riferiti ad una soluzione contenente 1  $\gamma$  per cm<sup>3</sup>, misurati a 395 m $\mu$  e a 450 m $\mu$ , valori di lunghezza d'onda corrispondenti ai massimi del calcione indissociato e dissociato;  $E_{T,\lambda}$  rappresenta il valore dell'estinzione della miscela misurata alla lunghezza d'onda indicata. Sviluppando la (1) e la (2) rispetto a  $c_i$  e  $c_d$  si ha:

$$(3) \quad c_i = \frac{(E_{T,395} \cdot K_{d,450}) - (E_{T,450} \cdot K_{d,395})}{(K_{i,395} \cdot K_{d,450}) - (K_{i,450} \cdot K_{d,395})} \quad \text{e} \quad c_d = \frac{(E_{T,395} \cdot K_{i,450}) - (E_{T,450} \cdot K_{i,395})}{(K_{d,395} \cdot K_{i,450}) - (K_{d,450} \cdot K_{i,395})} \quad (4)$$

Nel caso presente, i quattro valori dei coefficienti d'estinzione riferiti alla concentrazione 1  $\gamma$  per cm<sup>3</sup>, sono i seguenti:

$$k_{i,395} = 0,0731 ; \quad k_{d,395} = 0,0174 ; \quad k_{i,450} = 0,0156 ; \quad k_{d,450} = 0,0322$$

Nelle numerose prove eseguite, i valori della concentrazione totale del calcione, ottenuti come somma delle concentrazioni delle due ali-

quote, la dissociata e l'indissociata sono risultati in accordo con i valori ottenuti dalla pesata e dalla diluizione entro i limiti del 4%.

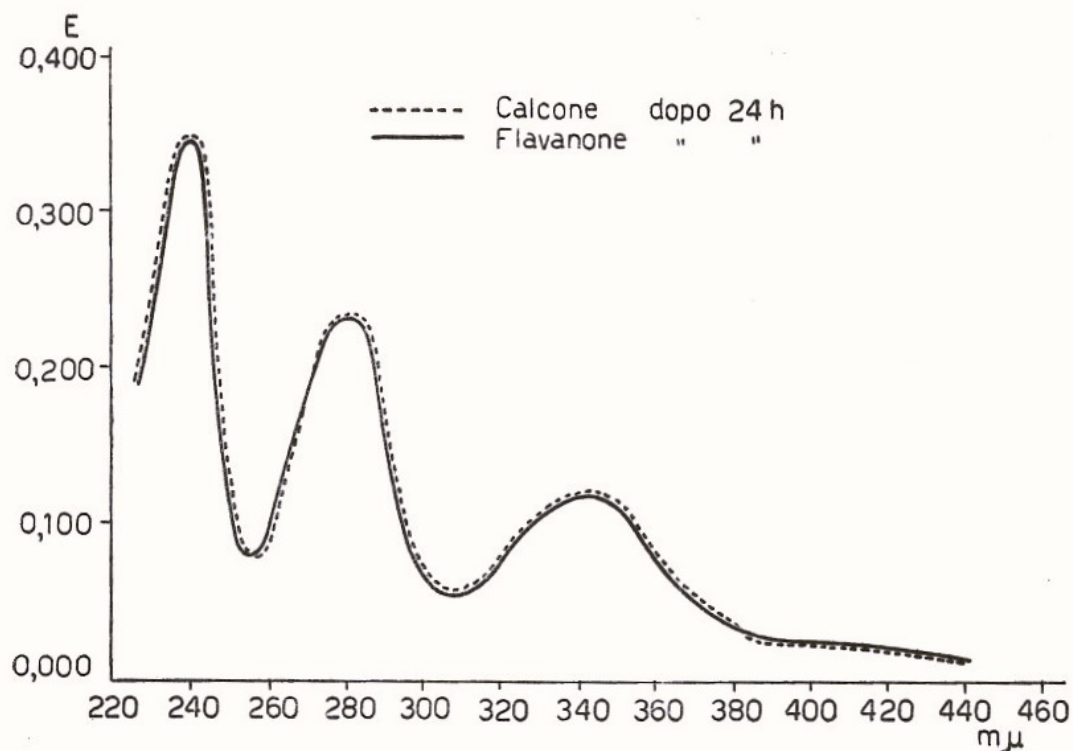


FIG. 13. - Spettri in soluzione a pH 10,03.

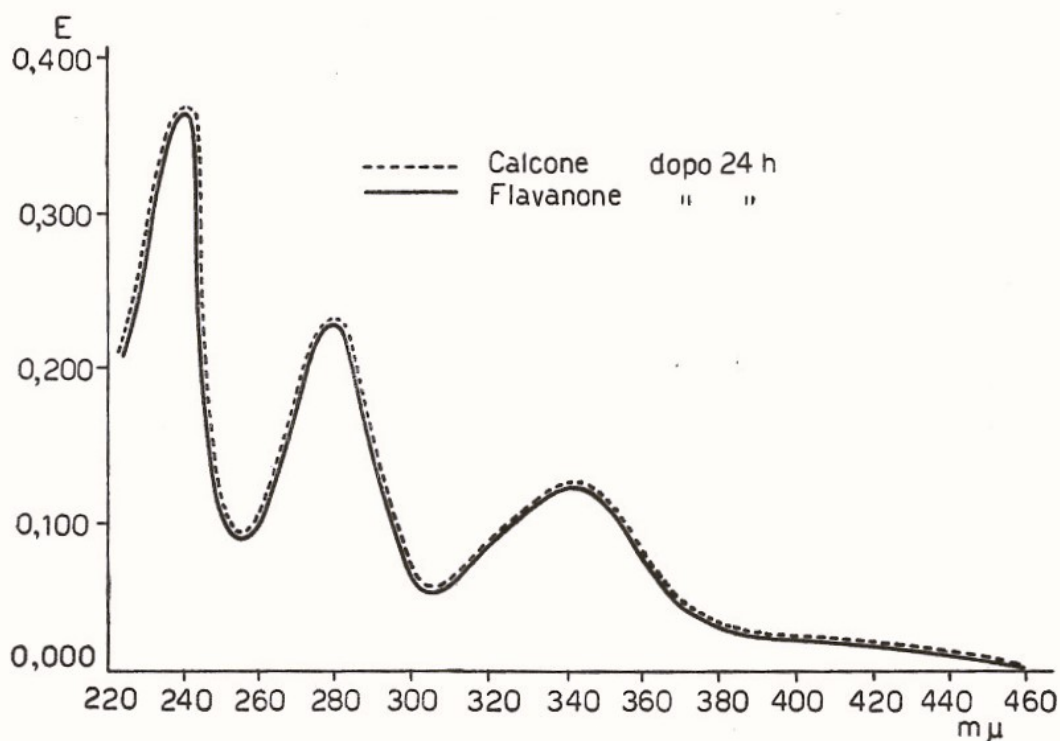


FIG. 14. - Spettri in soluzione a pH 10,45.

Dall'esame degli spettri riportati nelle figure 13, 14 e 15 risulta che nelle soluzioni preparate con i tamponi a pH 10,03 e 10,45 la reazione è molto rapida ed ancora praticamente completa. A pH 11,40 si ha il

massimo della velocità di trasformazione calcione  $\rightarrow$  flavanone, ma lo stato di equilibrio si raggiunge quando non tutto il calcione si è trasformato. Questo risulta dallo spettro riprodotto in fig. 15, dove si rileva

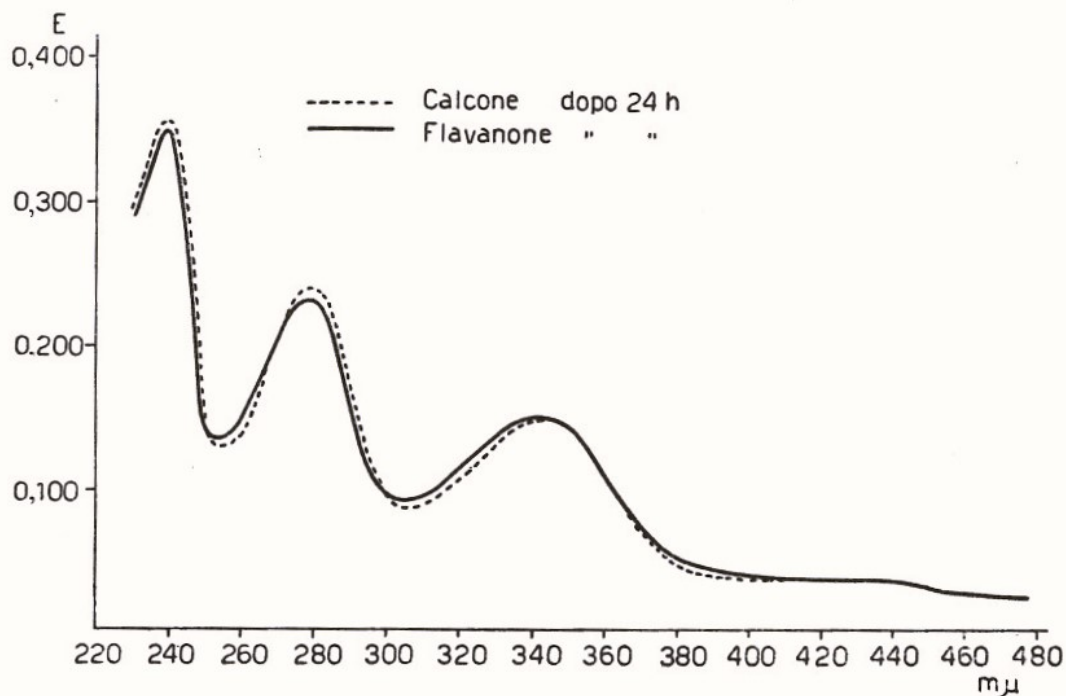


FIG. 15. - Spettri in soluzione a pH 11,40.

un modesto assorbimento nella zona a 450 mμ ed un piccolo aumento dell'assorbimento a 340 mμ dovuti alla presenza di piccole quantità di calcione.

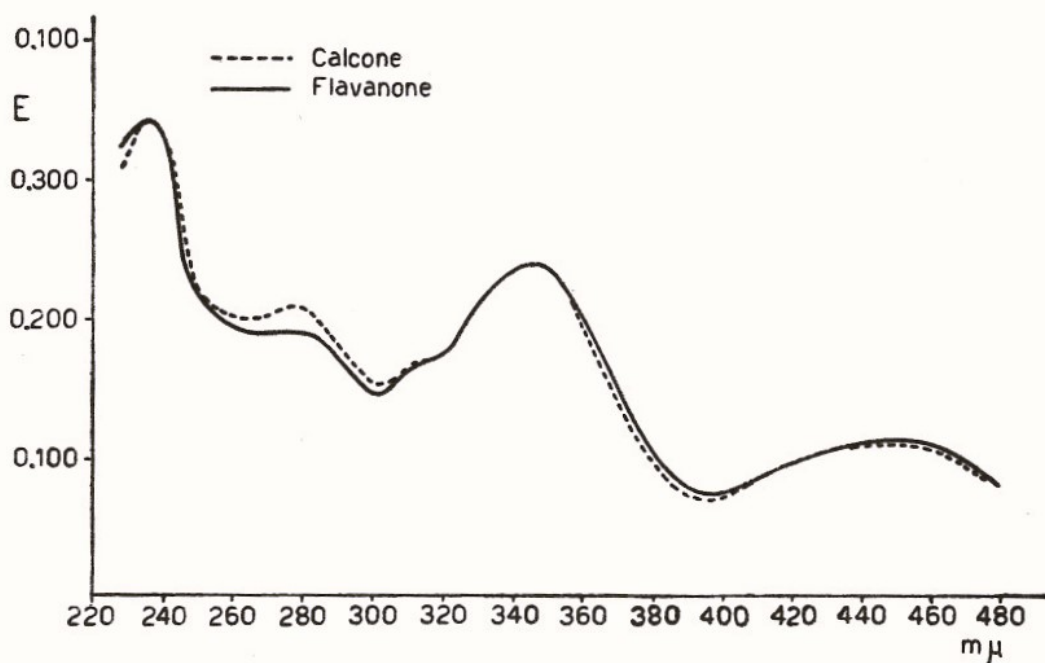


FIG. 16. - Spettri in soluzione a pH 12,02.

Per valori superiori di pH diventa sempre più apprezzabile la reazione inversa e all'equilibrio si ottiene una miscela di calcone e flavanone che p. es. a pH 12 risulta costituita dal 68% di calcone. Tale stato

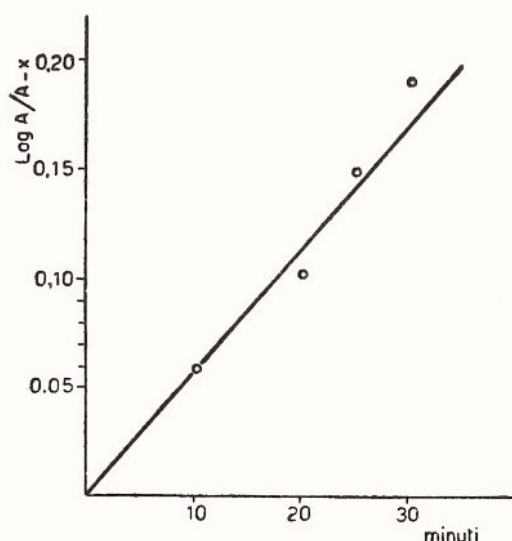


FIG. 17. - Misure in soluzione a pH 10,03.

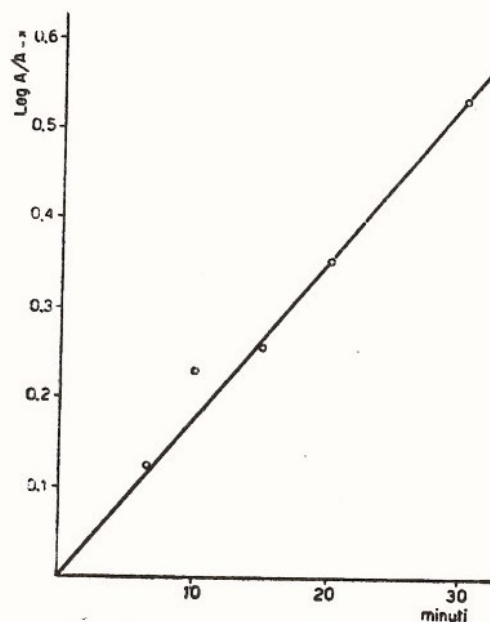


FIG. 18. - Misure in soluzione a pH 10,45.

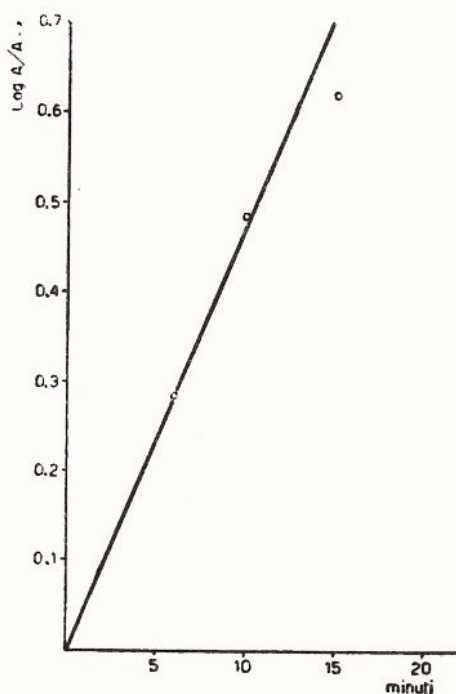


FIG. 19. - Misure in soluzione a pH 11,40).

di equilibrio è facilmente raggiungibile da entrambi i componenti, come mostrano gli spettri riportati in fig. 16. Nelle fig. 17, 18 e 19 sono riportati gli andamenti di  $\log A / A - x$  in funzione del tempo. Dalle

misure risulta  $K = 1,32 \cdot 10^{-2}$  minuti<sup>-1</sup> per la soluzione tamponata a pH 10,03,  $K = 4,13 \cdot 10^{-2}$  minuti<sup>-1</sup> per la soluzione tamponata a pH 10,45 e  $K = 11,07 \cdot 10^{-2}$  minuti<sup>-1</sup> per la soluzione tamponata a pH 11,40. Tali sono i valori medi, calcolati con uno scarto massimo di  $\pm 0,2 \cdot 10^{-2}$  minuti<sup>-1</sup>.

TRASFORMAZIONE FLAVANONE  $\longrightarrow$  CALCONE.

In soluzione a pH 12,55 ed in soluzione di NaOH N/1 il calcone si trova disciolto allo stato praticamente dissociato e non si trasforma in flavanone. E' molto veloce invece la trasformazione flavanone  $\longrightarrow$  calcone, tanto che non è stato possibile eseguire prove in termostato a 38°, perchè non vi era il tempo per ottenere valori precisi e concordanti nella misura delle estinzioni e ci si è dovuti limitare a seguire la reazione a temperatura ambiente di 20° circa.

Una soluzione di flavanone a concentrazione nota è stata diluita con miscela alcool - tampone ed appena effettuata la diluizione si è incominciato a contare il tempo. La soluzione è stata portata subito in una vaschetta dello spettrofotometro di Beckman e si è misurato il valore dell'estinzione a 450 m $\mu$ , continuando le misure ogni 30 e 60 secondi, fino ad ottenere valori costanti dell'estinzione. A pH 12,55 la reazione è praticamente completata in 7-8 minuti, in NaOH N/1 in 60'' circa. A pH 12,02 si raggiunge l'equilibrio con il 68% di calcone in 23 minuti circa.

Nel caso della trasformazione flavanone  $\longrightarrow$  calcone l'espressione  $\log \frac{A}{A-x}$  è stata calcolata dall'eguaglianza:

$$\log \frac{A}{A-x} = \log \frac{c_f}{c_f - (E_{450}/k_{c,450})}$$

ove  $c_f$  rappresenta la concentrazione iniziale della soluzione del flavanone, espressa in  $\gamma$  per cm<sup>3</sup>,  $E_{450}$  l'estinzione misurata a 450 m $\mu$ ,  $k_{c,450}$  il coefficiente d'estinzione del calcone misurato a 450 m $\mu$ , (concentrazione 1 $\gamma$  per cm<sup>3</sup>). Si è scelto il valore di lunghezza d'onda di 450 m $\mu$ , perchè in corrispondenza di essa si trova il massimo del calcone dissociato ed in tale forma viene a trovarsi prevalentemente il calcone lavorando ai pH qui considerati. Nelle fig. 20 e 21 sono riportati i valori di  $\log A / A - x$  in funzione del tempo per le misure eseguite a pH 12,02 e 12,55 alla temperatura di 20°; in entrambi i casi l'andamento è lineare. I valori medi di K sono  $1,038 \cdot 10^{-1}$  e  $5,78 \cdot 10^{-1}$  minuti, rispettivamente a pH 12,02 e 12,55.

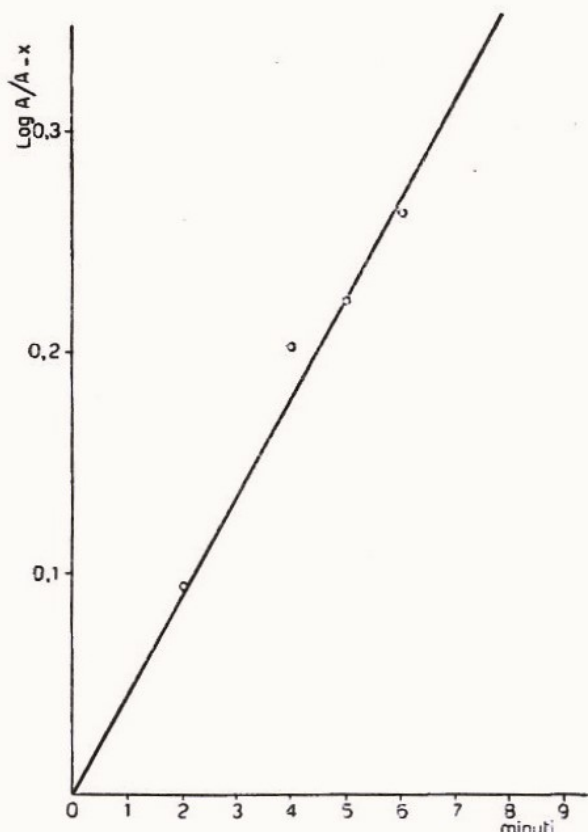


FIG. 20. - Misure in soluzione a pH 12,02.

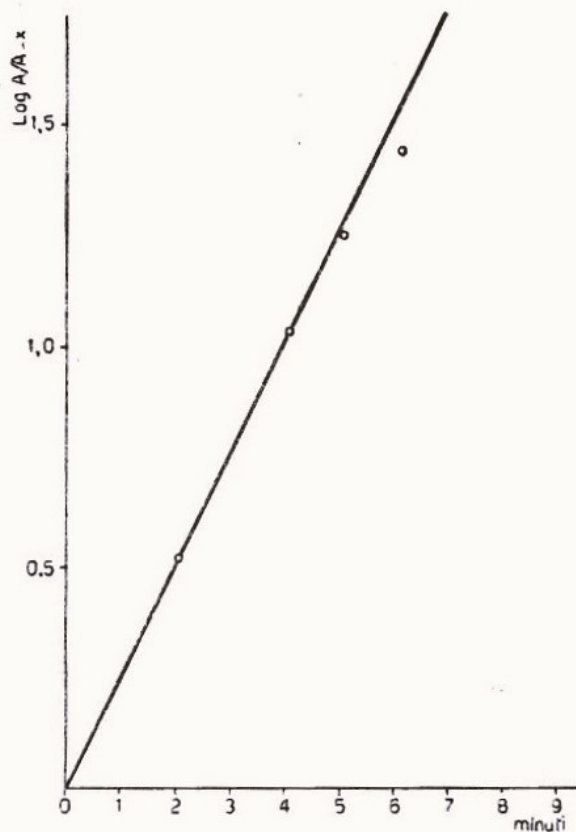


FIG. 21. - Misure in soluzione a pH 12,55.

Il comportamento della reazione di trasformazione calcione  $\rightarrow$  flavanone è riassunto in un grafico (22) dove sono riportati i valori di  $\log K$  (costante di velocità per le reazioni di primo ordine) in funzione del pH delle soluzioni usate nel preparare le rispettive soluzioni idroalcoliche. Da esso risulta che la reazione di trasformazione calcione  $\rightarrow$  flavanone a partire da pH 4 circa è catalizzata dagli ioni OH, si ha un incremento dell'azione catalitica a partire da pH 9 circa fino ad un massimo a pH 11,5 circa, dopo di che la velocità di trasformazione decre-

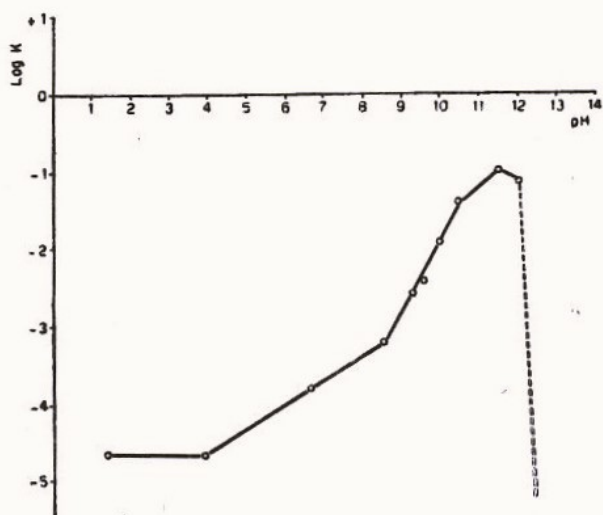


FIG. 22. - Andamento di  $\log K$  in funzione del pH.

scende rapidamente, fino ad annullarsi a pH 12,55 circa. Dopo pH 12 il diagramma è tratteggiato, poichè non è stato possibile misurare sperimentalmente i valori di  $K$  in un campo di pH nel quale incomincia ad essere particolarmente veloce la reazione opposta. Tale reazione, corrispondente alla trasformazione flavanone  $\rightarrow$  calcione si verifica a partire da pH 12 circa fino a pH 14 circa.

Per tale reazione sarebbe possibile costruire un grafico analogo al precedente, ma le difficoltà sono risultate maggiori, dato il breve intervallo di pH a disposizione per ottenere misure attendibili.

L'inflessione che si verifica dopo pH 9 circa nell'andamento di  $\log K$  in funzione del pH per la trasformazione calcione  $\rightarrow$  flavanone può spiegarsi considerando che dopo tale valore di pH è presente in soluzione il calcione dissociato.

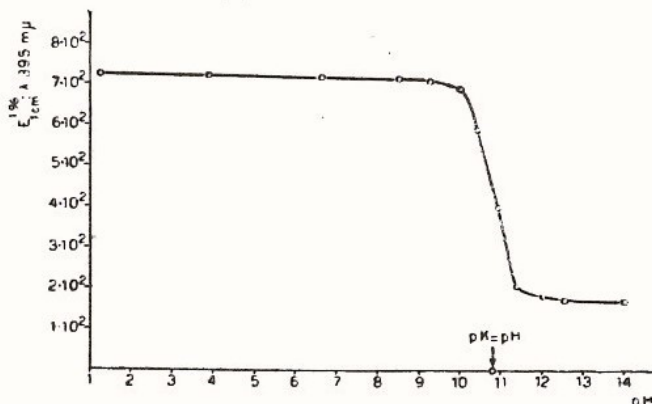


FIG. 23. - Variazione dell'estinzione a 395 m in funzione del pH.

Questo risulta dal grafico in fig. 23 ove viene riportato l'andamento di  $E_1^{1\% \text{ cm}}$  alla lunghezza d'onda di 395  $\text{m}\mu$  in funzione del pH. Da tale grafico può calcolarsi il valore del pK relativo all'equilibrio calcione dissociato  $\rightleftharpoons$  indissociato; risulta  $\text{pK} = 10,8$ . Applicando il metodo di L. FLEXNER, L. HAMMETT e A. DINGWALL <sup>(27)</sup> risulta:

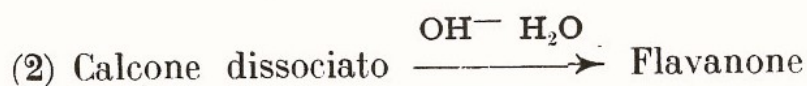
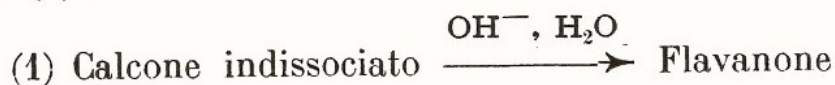
$$\text{pK} = \text{pH} - \log \frac{c_a \cdot f_a}{c_{aH} \cdot f_{aH}} \quad (*) \quad \text{ove} \quad \log \frac{c_a}{c_{aH}} = \log \frac{\epsilon_{aH} - \epsilon}{\epsilon - \epsilon_a}$$

Il simbolo  $\epsilon_a$  rappresenta l'estinzione molecolare della forma dissociata,  $\epsilon_{aH}$  è la stessa grandezza riferita alla forma indissociata ed  $\epsilon$  è riferita alla miscela delle due forme. Per semplificazione si è posto  $f_a / f_{aH} = 1$ . I valori di pK calcolati con la formula (\*) sono 10,91 e 10,86 rispettivamente a pH 10,44 e 11,00.

La presenza del calcione dissociato in soluzione conduce all'ammis-sione che la reazione di trasformazione calcione  $\rightarrow$  flavanone possa avvenire sia da parte del calcione indissociato che da quello dissociato. Dopo un certo tempo  $t$  si avrà, chiamando  $x_1$  le molecole del calcione

(27) J. Am. Chem. Soc. 57, 2103 (1935).

trasformate secondo la reazione (1) e  $x_2$  le molecole trasformate secondo la reazione (2):



$$(3) \frac{d x_1}{d t} = K_1 \cdot C_{\text{OH}} \cdot C_{i,t} \quad (4) \quad \frac{d x_2}{d t} = K_2 \cdot C_{\text{OH}} \cdot C_{d,t}$$

ove la (3) e la (4) esprimono le velocità delle due reazioni.

Poichè le concentrazioni del calcione dissociato ed indissociato rispettivamente  $C_d$  e  $C_i$  sono legate fra di loro dalla costante di dissociazione del calcione si può scrivere:

$$C_d = \frac{C_i}{C_{\text{H}^+}} \cdot K_c \quad \text{Sostituendo in (4) } C_d :$$

$$\frac{d x_2}{d t} = K_2 \cdot C_{\text{OH}} \cdot \left( K_c \cdot \frac{C_i}{C_{\text{H}^+}} \right) \quad (5) \quad \text{lavorando a pH costante la (5) può porsi:}$$

$$\frac{d x_2}{d t} = K'_2 \cdot C_{\text{OH}} \cdot C_{i,t} \quad (6) \quad \text{Sommando le due velocità si avrà:}$$

$$\Sigma \frac{d x_n}{d t} = K_1 \cdot C_{\text{OH}} \cdot C_{i,t} + K'_2 \cdot C_{\text{OH}} \cdot C_{i,t} = (K_1 + K'_2) \cdot C_{\text{OH}} \cdot (C_{i,0} - x) \quad (7)$$

ove  $C_{i,0}$  è la concentrazione iniziale del calcione indissociato.

La (7) può scriversi  $\frac{d}{d t} \Sigma x_n = K_T \cdot (C_{i,0} - x)$  (8) ed in tale forma essa può facilmente integrarsi, essendo ridotta all'espressione della velocità per le reazioni di ordine primo.

Dalla integrazione risulta che la costante di velocità per la reazione apparente di ordine primo è data da  $K_T = C_{\text{OH}} \cdot (K_1 + K'_2)$  (9) ove  $K_1 + K'_2$  possono riunirsi in un unico termine  $K_{\text{OH}}$ , coefficiente catalitico secondo GLASSTONE (28) e la (9) assume la forma usuale delle reazioni catalizzate dagli ioni OH. La natura additiva di  $K_{\text{OH}}$  può spiegare l'andamento riscontrato per  $\log K$  in funzione del pH.

Col presente lavoro si è inteso dare una spiegazione per quanto possibile completa dell'andamento di una reazione invertibile calcione  $\rightleftharpoons$  flavanone, reazione già nota dal punto di vista preparativo ed applicata a numerosi composti di questo tipo. Si ritiene utile suggerire lo studio delle condizioni di equilibrio calcione  $\rightleftharpoons$  flavanone in casi in

(28) S. GLASSTONE: Textbook of Physical Chemistry. Van Nostrand Co. Inc. New York 1946, II Ed., pag. 1132.

cui risultino dubbi che in operazioni di preparazione o di estrazione si abbia una parziale o totale isomerizzazione dei composti. Questo può avere una particolare importanza nel caso della esatta individuazione di prodotti naturali. Si sottolinea che con l'ausilio della tecnica spettrofotometrica bastano minime quantità di sostanze per eseguire un tale studio.

L'A. desidera ringraziare sentitamente il Prof. G. B. Marini Bet-  
tòlo per l'interesse dimostrato a questo lavoro e per i numerosi consi-  
gli fornitigli nel corso dell'esecuzione.

Roma — Istituto Superiore di Sanità — Laboratorio di Biologia.

---