

22. Elsa CAGGIANO e G. B. MARINI-BETTÒLO. — Contributo all'analisi cromatografica ed elettroforetica degli alcaloidi terziari degli *Strychnos*. (*)

Riassunto. — Nel quadro delle ricerche sugli alcaloidi delle *Strychnos* sono stati studiati i metodi cromatografici ed elettroforetici per la separazione analitica degli alcaloidi terziari, con speciale riguardo per i metodi su strati sottili.

Summary. — Paper and thin layer chromatography and electrophoretical methods for the analytical separation of *Strychnos* tertiary alkaloids have been developped.

Il problema della identificazione e della caratterizzazione delle basi terziarie che si ritrovano nelle piante del genere *Strychnos*, interessa lo studio chimico e biochimico di varie specie africane ed asiatiche di questo genere come pure di numerosi veleni elaborati con queste piante in Africa, Indonesia e Malesia.

La complessità delle miscele di composti naturali ha sempre reso difficili le separazioni degli alcaloidi secondari delle *Strychnos*, caratterizzati da gruppi amminici terziari.

Recentemente i metodi cromatografici su carta sono stati applicati con successo da BUCHI e SCHUMACHER ⁽¹⁾ alla separazione della brucina e della stricnina nei medicamenti. JAMINET ⁽²⁾ ha studiato inoltre le condizioni di separazione degli alcaloidi della *Strychnos holstii* su carta impiegando miscele di isobutanolo o isopropanolo con acido acetico o ammoniaca.

E' sembrato interessante, dovendo effettuare una ricerca sistematica su un certo numero di campioni di *Strychnos* della Malesia come anche per seguire le trasformazioni di questi alcaloidi mettere a punto tecniche cromatografiche che consentissero la rapida separazione e identificazione dei diversi alcaloidi e precisamente la cromatografia su carta e la cromatografia su strati sottili.

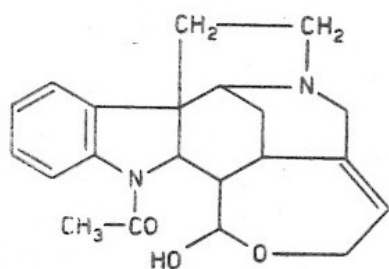
Abbiamo effettuato tutte le esperienze impiegando una serie di alcaloidi puri controllando le risoluzioni con miscele artificiali.

(*) I risultati di questo lavoro sono stati in parte comunicati al Simposio Internazionale di Cromatografia su carta - Praga 20-24 giugno 1961.

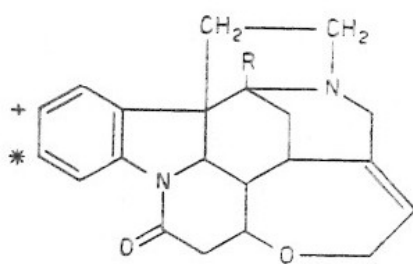
La cromatografia su carta è stata effettuata con quattro diversi solventi già impiegati con successo nella separazione di alcaloidi di struttura simile e cioè butanolo-acqua, butanolo-acido acetico acqua, piridina acetato di etile e acqua (solvente D di Karrer), metiletilchetone saturo di acqua (solvente C di Karrer).

I risultati di queste cromatografie sono riportati nella tabella I dove troviamo accanto ai valori degli R_F calcolati anche quelli del R_M .

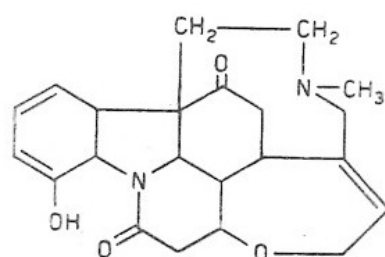
Se si considerano i valori degli R_F si nota che con questi solventi risulta particolarmente difficile la separazione della stricnina dai suoi omiologi α e β -colubrina che sono rispettivamente α -metossi-stricnina e la β -metossi-stricnina; più facile invece la separazione della brucina (dime-tossistricnina). Come era logico aspettarsi la presenza di un ossidrile fenolico libero nella molecola, consente, variando il pH del solvente, di ottenere delle buone separazioni, ad esempio nel caso della vomicina.



Diabolina



Stricnina



Vomicina

R = OH: pseudostricnina

* = OCH_3 : α -colubrina

+ = OCH_3 : β -colubrina

+ * = OCH_3 : brucina

Egualemente la diabolina può separarsi dalla stricnina con l'impiego di solventi basici e neutri.

Esaminando i valori dei diversi R_M calcolati per i solventi studiati non è stato possibile riscontrare una relazione diretta tra struttura e R_M .

Infatti malgrado si abbia un unico sistema fondamentale in particolare per la stricnina, le colubrine e la brucina, non è stato possibile dimostrare proprietà additive come sono state riscontrate da BATE-SMITH ⁽³⁾ nella serie dei flavoni e da MAČEK ⁽⁴⁾ negli alcaloidi del gruppo dell'acido lisergico e quelli della cevina.

Abbiamo voluto effettuare oltre che la cromatografia su carta di questi alcaloidi la cromatografia su strati sottili e precisamente su gel di silice con una serie di solventi quali cloroformio-dietilammina al 10%, metanolo, cloroformio con il 20% di metanolo, cloroformio con il 30%

Cromatografia su carta.

Solvente	Bu - Ac - H ₂ O		Bu : H ₂ O		Solv. C		Solv. D	
	R _F	R _M	R _F	R _M	R _F	R _M	R _F	R _M
Desacetildiabolina	0,67	-0,31	0,61	-0,19	0,26	0,45	0,58	-0,14
Diabolina	0,61	-0,19	0,36	0,25	0,24	0,50	0,34	0,29
Stricnina	0,67	-0,21	0,49	0,02	0,42	0,14	0,42	0,14
α -Colubrina	0,67	-0,31	0,44	0,11	0,20	0,60	0,49	0,02
β -Colubrina	0,69	-0,35	0,42	0,14	0,33	9,31	0,46	0,07
Brucina	0,57	-0,12	0,44	0,11	0,26	0,45	0,53	-0,05
Diidrobrucina	0,61	-0,19	0,41	0,16	0,28	0,41	0,29	0,89
Vomicina	0,66	-0,29	0,70	-0,37	0,92	0,66	0,93	-0,69
N-Ossistricnina	0,70	-0,37	0,60	-0,18	0,26	0,45	0,33	0,31
Pseudostricnina	0,83	-0,69	0,80	-0,60	0,76	-0,50		
Retulina	0,69	-0,35	0,53	-0,05	0,24	0,50	0,37	0,23
Holstina	0,66	-0,29	0,47	0,05	0,33	0,31	0,40	0,18
Alcaloide C *	0,56	-0,11	0,50	-0,12	0,61	-0,19	0,65	-0,27

* Da *Strychnos holstii*.

di metanolo, cicloesano con il 10% dietilammina, cloroformio-acetone-dietilammina (⁵, ⁴, ¹), secondo le tecniche di D. WALDI, K. SCHNACKER, F. HUNTER (⁵) E. STAHL (⁶), E. DEMOLE (⁷).

Va notato che in queste separazioni si ha una notevole costanza di R_F (tabella II), e che talune miscele di solventi consentono delle separazioni molto nette soprattutto tra diabolina e stricnina, cosa di un certo interesse pratico per seguire la trasformazione della diabolina che si considera un precursore della stricnina.

Con questo sistema invece non si ha una buona risoluzione delle metossi-stricnine: α e β colubrina e brucina.

E' stata anche effettuata la cromatografia di questi alcaloidi su strato sottile di allumina, secondo V. ČERNÝ, J. JOSKA e L. LABLER (⁸), impiegando come solvente cloroformio-acetato di etile e cloroformio e acetato di etile e benzolo.

Anche in questo caso, mentre è difficile separare la stricnina dalle colubrine si hanno buone risoluzioni con gli altri alcaloidi (vedi tabella III).

Se si impiega una miscela artificiale di desacetildiabolina, diabolina, stricnina e N-ossistricnina usando come solvente cloroformio-metanolo 8:2; su gel di silice si ha una buona risoluzione che consente di distinguere i quattro componenti anche se gli R_F vengono influenzati reciprocamente.

Oltre ai metodi cromatografici abbiamo studiato il comportamento elettroforetico di questi stessi alcaloidi a pH 2,5, 6,8 e 10,4.

Nella tabella IV sono riportati i valori delle migrazioni in mm per i diversi alcaloidi per 3 ore. Di questo si trova conferma a quanto già osservato da MARINI-BETTÒLO e COCH (⁹), sulla influenza determinante dell'ossidril fenolico sulla migrazione in una molecola di alcaloide quando venga variato il pH, come si nota per la vomicina e la pseudostricnina.

Si può pertanto concludere che l'impiego di metodi cromatografici su carta e su strati sottili come pure dell'elettroforesi su carta offre la possibilità di separare e di riconoscere e caratterizzare rapidamente i principali alcaloidi terziari presenti nelle Strychnos.

PARTE SPERIMENTALE

Alcaloidi

Abbiamo impiegato alcaloidi purificati sotto forma basica. Soluzioni alcooliche o acquose all'1%.

TABELLA II

Cromatografia su strati sottili di gel di silice.

Sostanza	Cloroformio Dietilamina 9 : 1	Metanolo	Cloroformio Metanolo 8 : 2	Cloroformio Metanolo 7 : 3	Cicloesano Dietilamina 9 : 1	Cloroformio Acetone - Dietilamina 5 : 4 : 1
	R _F	R _F	R _F	R _F	R _F	R _F
Desacetildiabolina	0,64 0,56; 0,58	0,07; 0,69	0,18; 0,14; 0,13	0,30; 0,23	0,10; 0,12	0,67; 0,60
Diabolina	0,70; 0,60; 0,62	0,11; 0,07 0,09	0,29; 0,30; 0,30	0,40; 0,45		0,69; 0,65
Stricnina	9,81; 0,78; 0,87	0,10; 0,12	0,77; 0,80; 0,77	0,80; 0,79	0,07; 0,07	0,77; 0,88
α-Colubrina	0,83; 0,76; 0,83	0,07; 0,07	0,78; 0,74; 0,77	0,81; 0,79		0,79; 0,81
β-Colubrina	9,81; 0,73; 0,80	0,07; 0,07	0,83; 0,78; 0,79	0,82; 0,75		0,82; 0,80
Brucina	0,79; 0,76; 0,79	0,04; 0,04	0,82; 0,82; 0,79	0,80		0,73; 0,68
Diidrobrucina	0,80; 0,88; 9,88	0,04; 0,05	0,79; 0,86; 0,81	0,79		0,78; 0,68
Vomicina	0,90; 0,95; 0,94	0,62; 0,67 0,66				0,53
N-Ossistricnina	0,04; 0,03; 0,03	0,15; 0,18 0,18	0,52; 0,36	0,42		
Pseudostricnina	0,79; 0,83; 0,86	0,69; 0,64	0,82; 0,91	0,77		
Retulina	0,53; 0,58; 0,58	0,11; 0,13	0,34; 0,34	0,34		0,70; 0,65
Holstina	0,40; 0,47; 0,87	0,10; 0,8	0,22; 0,24	0,16		
Alcaloide C	0,85; 0,91	0,56; 0,51	0,90; 0,97			

Cromatografia su strato sottile di allumina.

Sostanza	Cloroformio	Acetato etile Cloroformio 1 : 1	Acetato etile Benzolo
Desacetildiabolina	0,16; 0,29; 0,13	0,55; 0,51; 0,46	0,35; 0,53
Diabolina	0,10; 0,13; 0,15	0,50; 0,50; 0,46	0,37; 0,56
Stricina	0,52; 0,63; 0,58	0,69; 0,85; 0,76	0,76; 0,76; 0,77
α -Colubrina	0,40; 0,59; 0,51	0,81; 0,82; 0,80	0,76; 0,75; 0,74
β -Colubrina	0,42; 0,55; 0,43	0,86; 0,80; 0,77	0,70; 0,71; 0,72
Brucina	0,44; 0,50; 0,51	0,64; 0,73; 0,69	0,58; 0,56; 0,56
Diidrobrucina	0,42; 0,50; 0,50 0,48	0,70; 0,68; 0,60	0,56; 0,49; 0,52
Vomicina	0,51; 0,63; 0,56	0,88; 0,85	0,85; 0,87; 0,84
N-Ossistricina	0,04; 0,08		
Pseudostricina	0,61; 0,55	0,81; 0,72; 0,76	0,72; 0,73; 0,70
Retuina	0,37; 0,41; 0,35	0,53; 0,55; 0,56	0,53; 0,53
Holstina	0,07; 0,07	0,16; 0,12; 0,06	0,19; 0,24
Alcaloide C (*)	0,43; 0,39	0,64; 0,67	0,53; 0,61

(*) Da *Strychnos holstii*.

TABELLA IV

Elettroforesi su carta.

Sostanza	pH 2,5	6,8	10,4
	Spostamento in mm dall'origine		
Diabolina	58 mm	64 mm	38 mm
Stricnina	58	59	24
α -Colubrina	51	52	25
β -Colubrina	53	52	21
Brucina	51	51	20
Diidrobrucina	50	51	22
Vomicina	52	17	9
N-Ossistricnina	46	13	19
Pseudostricnina	47	19	16
Retulina	60	68	50
Holstina	57	62	25
Alcaloide C *	36	16	15

* Da *Strychnos holstii*.

Cromatografia.

Si è impiegato il metodo discendente con carta Whatman 1 per 4 ore e mezzo per i solventi C e D, e 18 ore per il solvente butanolo-acqua e butanolo-acido-acetico-acqua, in modo che il fronte del solvente raggiunga una distanza di 34-38 cm a temperatura ambiente.

I solventi impiegati sono stati i seguenti:

- 1 - Butanolo-acqua
- 2 - Butanolo-acido-acetico-acqua - 4:1:5
- 3 - Metiletilchetone-acqua-metanolo (500 cm^3 - 70 cm^3 - 5 cm^3): Solvente C
- 4 - Piridina-acetato d'etile - Acqua (230 cm^3 - 750 cm^3 - $16,5 \text{ cm}^3$): Solvente D

Cromatografia su strati sottili.

Si è impiegato l'apparecchio originale di Stahl impiegando gel di silice scalfato di calcio (Kieselguhr G - Merck - Darmstadt).

I campioni sono stati applicati all'origine e fatti correre in parallelo con un colorante standard fino a che il fronte del solvente non avesse raggiunto i 10 cm dall'origine.

Come solventi sono stati impiegati:

Cloroformio - Dietilamina (9:1)

Metanolo

Cloroformio - Metanolo (8:2)

Cloroformio - Metanolo (7:3)

Cicloesano - Dietilamina (9:1)

Cloroformio - Acetone - Dietilamina (5:4:1)

Elettroforesi su carta.

Si è utilizzato l'apparecchio LKB impiegando strisce di carta di cm $18,5 \times 46$ Whatman N. 1 e una tensione di 5 V per cm per 3 ore. Come tampone è stato usato il tampone universale di Britton a pH 2,5 e diluito a 1/4 per pH 6,8 e 10,4.

La sostanza viene applicata esattamente nel centro della striscia dopo avere lasciato equilibrare la striscia per un'ora.

Lo spostamento viene misurato in millimetri dall'origine dopo 3 ore.

Rivelazione.

Gli elettroferogrammi ed i cromatogrammi su carta vengono osservati alla luce U.V.

Come reattivi si possono usare i vapori di iodio ⁽¹⁰⁾ sia per elettroferogrammi che per i cromatogrammi su carta e su gel di silice.

Una di noi (E. C.) desidera ringraziare il Governo italiano per una borsa di perfezionamento per l'Uruguay che gli ha consentito di effettuare questo lavoro.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Laboratori di Chimica biologica.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) BUCHI J. e SCHUMACHER A. - *Pharm. Acta Helv.*, 32: 375 (1958).
 - (²) JAMINET F. - *J. Pharm. Belg.*, 8: 449 (1953).
 - (³) BATE-SMITH E. C. - *Biochem. Soc. Symp.*, 3: 61 (1949).
 - (⁴) MACEK G. e VEJDELEK Z. J. - *Nature*, 176: 1173 (1955).
 - (⁵) WALDI D., SCHNACKER K e HUNTER F. - *J. Chromatog.*, 6: (1961).
 - (⁶) STAHL E. - *Pharm. Rundsch.*, 1: (1959).
 - (⁷) DEMOLE J. - *J. Chromatog.*, 6: (1961).
 - (⁸) CERNY V., JOSKA e LABLER L. - *Coll. czech. Comm.*, 26: 1658 (1961).
 - (⁹) MARINI-BETTOLO G. B. e FRUGONI COCH J. - *Gazz. chim. ital.*, 86: 1314 (1956).
 - (¹⁰) MARINI-BETTOLO G. B. e GUARINO G. - *Experientia*, 6: 309 (1950).
-