

FRANCO PIOZZI, ADOLFO QUILICO, CLAUDIO FUGANTI,
TOMMASO AJELLO e VINCENZO SPRIO

Struttura dell'atrattiloside (*)

Riassunto: Viene determinata la struttura dell'atrattiloside $C_{28}H_{46}O_{12}S_4K_2$. Per idrolisi totale in varie condizioni esso fornisce atrattiligenina $C_{11}H_{18}O_6$, acido isovalerianico, D (+) glucosio e bisolfato di potassio (due moli). Per distacco di acido isovalerianico si ottiene *apo-atrattiloside* $C_{17}H_{28}O_7S_4K_2$; da questo per desolfatazione si ha *atrattilina* $C_{17}H_{28}O_6$, scindibile infine in atrattiligenina e D (+) glucosio. Viene accertato che la genina è legata al glucosio con un legame glicosidico tra l'ossidrilico in C-1' del glucosio e l'ossidrilico in C-2 della genina. Le ossidazioni con acido periodico dimostrano che l'ossidrilico in C-6' del glucosio è libero e che i tre ossidrilici in C-2', C-3' e C-4' sono legati all'acido isovalerianico e ai residui solforici. La O-metilazione dell'atrattiloside e di alcuni suoi derivati dimostra che l'acido isovalerianico è effettivamente legato all'ossidrilico in C-2' e i residui solforici agli ossidrilici in C-3' e C-4'. All'atrattiloside spetta quindi la struttura (III).

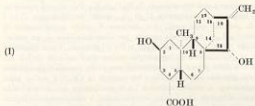
Résumé: On résout la structure de l'atractylósíde $C_{28}H_{46}O_{12}S_4K_2$. Par hydrolyse totale en différentes conditions on en tire atractylgénine $C_{11}H_{18}O_6$, acide isovalérique, D (+) glucose et bisulfate de potassium (deux moles). Par détachement d'acide isovalérique on obtient *apo-atractylósíde* $C_{17}H_{28}O_7S_4K_2$; de ceci par désulfatation on a *atractylíne* $C_{17}H_{28}O_6$, qui est enfin hydrolysée à atractylgénine et D (+) glucose. On reconnaît que la génine est liée au glucose par une liaison glicosidique entre l'hydroxyle en C-1' du glucose et l'hydroxyle en C-2 de la génine. Les oxydations par l'acide périodique démontrent que l'hydroxyle en C-6' du glucose est libre et que les trois hydroxyles en C-2', C-3' et C-4' sont liés à l'acide isovalérique et aux groupes sulphuriques. La O-méthylation de l'atractylósíde et de ses dérivés démontre que l'acide isovalérique est effectivement lié à l'hydroxyle en C-2' et les groupes sulphuriques aux hydroxyles en C-3' et C-4'. L'atractylósíde a donc la structure (III).

Summary: The structure of *atractylósíde* $C_{28}H_{46}O_{12}S_4K_2$ is elucidated. By total hydrolysis under different conditions, it gives atractyligenin $C_{11}H_{18}O_6$, isovaleric acid, D (+) glucose and potassium bisulphate (two moles). By cleavage of isovaleric acid, *apo-atractylósíde* $C_{17}H_{28}O_7S_4K_2$ is obtained: this gives *atractylíne* $C_{17}H_{28}O_6$, by splitting of sulphuric acid, the latter being eventually cleaved to atractyligenin and D (+) glucose. It is realized that the genin is linked to glucose by a glycosidic bond between C-1' hydroxy group of glucose and C-2' hydroxy group of the genin. Periodic acid oxidations show that C-6' hydroxy group of glucose is free, while the three hydroxy groups on C-2',

(*) Memoria presentata dall'Accademico DOMENICO MAROTTA.

C-3' and C-4' are linked to isovaleric and sulphuric acid. O-methylation of atractyloside and of some derivatives indicates that isovaleric acid is really linked to C-2' hydroxy group, while the C-3' and C-4' hydroxy groups are esterified by two moles of sulphuric acid. Structure (III) can therefore be assigned to atractyloside.

L'atrattiloside (*) è il noto glucoside tossico presente nelle radici di *Atractylis gummifera* L. (famiglia Compositae) e attualmente studiato da molti biologi per le sue interessanti proprietà. Isolata per la prima volta nel 1868 da LEFRANC (1-4), la sostanza è stata studiata in seguito da altri ricercatori (7-16), ma solo in tempi recenti ne è stato ripreso lo studio con tecniche più efficaci. A comunicazioni parziali pubblicate negli scorsi anni (17-19), è seguita recentemente (20-22) la determinazione della costituzione e della stereochimica dell'aglicone atrattiligénina $C_{11}H_{16}O_4$, cui compete la struttura (I):



Nella presente comunicazione si riferisce la struttura complessiva dell'atrattiloside.

All'atrattiloside, sostanza cristallina che fonde con decomposizione a temperature variabili con la velocità di riscaldamento, viene riconosciuta in base all'analisi e allo studio degradativo la formula $C_{27}H_{40}O_{16}S_2K_2$ (**). I due atomi di zolfo e i due di potassio risultano presenti sotto forma di due gruppi esteri solforici salificati $-O-SO_3^- K^+$ (dosaggio dopo idrolisi), mentre il carbossile dell'aglicone è libero. Dal sale bipotassico è possibile ottenere per cauta acidificazione l'acido libero instabile e non caratterizzabile, che si decompone perdendo un acido grasso a basso numero di atomi di carbonio; dall'acido derivano due serie di sali bibasici e tribasici. Mediante idrolisi con acido fosforico tale acido grasso viene liberato quantitativamente (una mole) e identificato con l'acido isovalerianico (formazione di derivati e analisi gascromatografica (***)). Nell'idrolisi con idrati alcalini

(*) Abbiamo preferito questo nome, da noi proposto alcuni anni fa (15) ed accettato dalla maggioranza dei biologi, alla vecchia denominazione « atrattillato di potassio » introdotta da LEFRANC. Abbiamo inoltre riservato ad uno dei prodotti di idrolisi il nome « atrattilina » da noi impiegato in una prima nota (17) in luogo di atrattiloside.

(**) Precedenti formule date in letteratura: $C_{26}H_{34}O_{16}S_2K_2$ (ANGELICO), $C_{26}H_{34}O_{16}S_2K_2$ (WUNSCHENDORFF), $C_{26}H_{36}O_{16}S_2K_2$ (AZELLO). La difficoltà di analisi della sostanza spiega le differenze dalla formula ora trovata.

(***) Alcuni dei precedenti ricercatori ritenevano che l'idrolisi liberasse due moli di acido, e che questo fosse l'acido valerianico normale.

si ottiene l'aglicone *atrrattiligénina*. L'idrolisi con acido solforico fornisce un monosaccaride, che si conferma essere il *D (+) glucosio* già riconosciuto e dosato da precedenti Autori (^{8, 11, 12}) e ora identificato con metodi cromatografici e gascromatografici.

L'idrolisi dell'atrrattiloside può perciò essere schematizzata con l'equazione seguente:



Nell'atrrattiloside è presente il doppio legame dell'aglicone: mediante idrogenazione catalitica si ha assorbimento di una mole di idrogeno, con formazione di *idro-atrrattiloside* $C_{23}H_{46}O_{16}S_2K_2$; questo per idrolisi fornisce *idro-atrrattiligénina* $C_{13}H_{22}O_6$, acido isovalerianico, acido solforico e *D (+) glucosio*.

Nell'atrrattiloside si riscontra la presenza di due ossidrili liberi, entrambi acetilabili con formazione di un *diacetilderivato*.

L'idrolisi progressiva dell'atrrattiloside, per distaccare alcuni dei componenti della complessa molecola, fornisce numerosi derivati.

Il trattamento con idrato di bario dà *apo-atrrattiloside* (*) come sale di bario $C_{22}H_{36}O_{12}S_2Ba$ (trasformabile nel sale bipotassico $C_{22}H_{36}O_{12}S_2K_2$, per successivo scambio con K_2SO_4), con distacco dell'acido isovalerianico.

Il trattamento dell'apo-atrrattiloside con amalgama di sodio distacca i due gruppi solforici e dà *atrrattilina* (**) $C_{18}H_{28}O_8$, caratterizzata come *metilestere-pentacetilderivato* $C_{28}H_{36}O_{14}$; essa è idrolizzabile ad atrrattiligénina e glucosio.

Il trattamento dell'atrrattiloside con metanolo e acido cloridrico distacca i due gruppi solforici (***) ma non l'acido isovalerianico; per metilazione con diazometano del prodotto ottenuto si ha *isovaleril-atrrattilina metilestere* $C_{31}H_{46}O_{10}$, idrolizzabile con idrato di bario ad atrrattilina (caratterizzata come *metilestere* $C_{24}H_{36}O_8$).

Il trattamento del diacetil-atrrattiloside con metanolo e acido cloridrico (e successiva metilazione con CH_3N_3) dà analogamente *diacetil-iso-valeril-atrrattilina metilestere* $C_{23}H_{32}O_{12}$.

Nessuno di questi derivati riduce il reattivo di FEHLING, se non dopo prolungata idrolisi con alcali: ciò dimostra che nell'atrrattilina un ossidrile dell'aglicone è legato alla posizione 1' del glucosio con un tipico legame glicosidico (****). Nell'atrrattilina risultano infatti presenti un carbossile esterificabile e cinque ossidrili acetilabili, come dimostrato dall'ottenimento di pentaacetil-atrrattilina metilestere $C_{34}H_{48}O_{18}$.

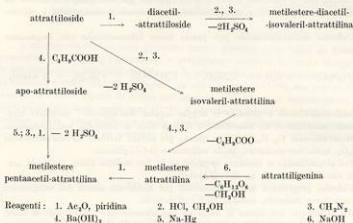
(*) Abbiamo preferito questa nuova denominazione a quella di β -atrrattilato usata da LEFRANC.

(**) Abbiamo ripristinato la denominazione atrrattilina, già usata dal tempo di LEFRANC, per il composto tra il glucosio e l'atrrattiligénina; come accennato nella prima nota, tale denominazione era stata da noi usata in una occasione in luogo di atrrattiloside.

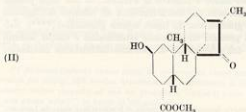
(***) Per queste desolfatazioni con acido cloridrico metanolico, si vedano (11) e (12).

(****) Ipotesi già avanzata da uno di noi (T.A.), si veda (14).

Questa serie di trasformazioni è raccolta nello schema seguente :



Quale dei due ossidril dell'aglicone sia legato al glucosio risulta dalle degradazioni seguenti; l'idroatrattiloside viene metilato con diazometano, ossidato blandamente con acido cromico e sottoposto ad idrolisi alcalina: dopo esterificazione con diazometano si ottiene un *monochetone metilestere* $C_{29}H_{48}O_4$. Ciò indica che uno degli ossidril liberi dell'atrattiloside si trova sull'aglicone, e che gli esteri solforici e isovalerianici si trovano quindi sul glucosio. Il monochetone possiede un carbonile esterificabile e un ossidril acetilabile: l'esame degli spettri IR e NMR indica che l'ossidril presente è quello della posizione 2 dell'atrattiligenina, e che il gruppo chetonico si trova nella posizione 15, come appare dalla struttura (II):



Ne deriva che l'aglicone è legato alla posizione 1' del glucosio mediante il proprio ossidril in posizione 2.

Il problema successivo, ossia a quali posizioni del glucosio sono legati l'acido isovalerianico e i due residui solforici, viene affrontato mediante ossidazione con quantità titolate di acido periodico. I risultati sono raccolti nella tabella seguente :

	moli di HIO ₄ consumate
atrattiloside	0
apo-atrattiloside	0
isovaleril-atrattilina metilestere	1
diacetil-isovaleril-atrattilina metilestere	1
atrattilina metilestere	2

Il fatto che l'apo-atrattiloside non consumi acido periodico dimostra che l'ossidrile libero e quello esterificato con l'acido isovalerianico non sono adiacenti. Il consumo di due moli di acido periodico da parte dell'atrattilina è quello previsto per un glucoside, e corrisponde alla scissione dei legami C₂-C₃ e C₄-C₅. Il consumo di una sola mole di acido periodico da parte della diacetil-isovaleril-atrattilina indica che i due ossidrili esterificati con acido solforico sono adiacenti, e quindi nelle posizioni 2'-3' oppure 3'-4' del glucosio. Poiché anche l'isovaleril-atrattilina metilestere richiede una sola mole di acido periodico, ciò significa che l'ossidrile originariamente libero nell'atrattiloside non è adiacente agli ossidrili esterificati con l'acido solforico: esso è quindi situato sulla posizione 6' del glucosio.

Si noti che i risultati della titolazione con acido periodico escludono l'ipotesi di una struttura furanosidica del glucosio.

Dall'interpretazione di questi risultati emergono due strutture alternative: la prima con l'acido isovalerianico in posizione 2' e i residui solforici in posizione 3' e 4'; la seconda con i residui solforici in posizione 2' e 3' e l'acido isovalerianico in posizione 4'. Per la risoluzione del problema si ricorre alla metilazione secondo KUHN⁽¹⁵⁾ dell'atrattiloside e dei suoi prodotti di idrolisi graduale: la successiva idrolisi fornisce differenti O-metil-derivati del glucosio, i cui acetati vengono separati e identificati mediante gascromatografia e spettrografia NMR.

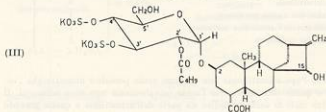
Con tale procedimento si ottengono:

da atrattiloside	6-0-metil-1,2,3,4-tetraacetil-D (+) glucosio
da apo-atrattiloside	6-0-metil-1,2,3,4-tetraacetil-D (+) glucosio
	2-0-metil-1,3,4,6-tetraacetil-D (+) glucosio
	2,6-di-0-metil-1,3,4-triacetil-D (+) glucosio
da atrattilina	2,3,4,6-tetra-0-metil-1-monoacetil-D (+) glucosio.

Ciò indica inequivocabilmente che nell'atrattiloside l'acido isovalerianico è legato alla posizione 2'.

Circa la configurazione del legame glicosidico, si osserva che l'atrrattilioside, l'apoatrrattilioside, l'atrrattilina, l'isovaleril-atrrattilina metilestere, la diacetil-isovaleril-atrrattilina metilestere e la pentaacetil-atrrattilina metilestere resistono inalterate all'azione dell'emulsina: ciò rende molto improbabile l'ipotesi di un legame β -glicosidico, per cui, pur in assenza di prove chimiche e fisico-chimiche dirette, si prospetta come molto attendibile l'ipotesi di un legame α -glicosidico, con l'ossigeno glicosidico in configurazione assiale rispetto al piano del glucosio.

Per l'atrrattilioside si propone pertanto la struttura totale (III).



SPETTRI NMR DEGLI O-METIL-DERIVATI DEL GLUCOSIO (*).

6-0-metil-1,2,3,4-tetraacetil-D (+) glucosio.

Il prodotto isolato a partire dall'atrrattilioside è costituito da un solo anomero. Il suo spettro (in CDCl_3) presenta quattro singoletti di tre protoni ciascuno, assegnabili a tre acetili equatoriali (2,01-2,02-2,03 δ) e all'acetile assiale in C-1 (2,17 δ) (2^a, 27). Ciò è confermato dal doppietto del protone equatoriale H-1 (6,37 δ , $J_{1,2} = 3,5$ cps). Non si osserva traccia apprezzabile dell'altro anomero. Si nota un solo metossile (singoletto a 3,38 δ) che deve essere legato al C-6, in quanto lo shift dei due protoni in C-6 (3,49 δ) è corretto per tale sostituente: la presenza di un acetile in C-6 sposterebbe il segnale del CH_2 di 0,8-1,0 ppm verso campi bassi. Il frammento $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{O})-\text{CH}(\text{O})-$, relativo a C-6, C-5 e C-4, mostra uno spettro apparentemente semplice, del tipo ABXY: la parte AB, ossia i protoni su C-6, è costituita da un doppietto di 4 cps a 3,49 δ ; la parte X, ossia il protone H-5, dà un doppietto di tripletti a 4,08 δ con separazioni di 9,5 e 4,0 cps, in quanto $\delta_A \approx \delta_B = 3,49 \delta$, $J_{AX} \approx J_{BX} = 4$ cps, J_{XY} (ossia $J_{2,4}$) = 9,5 cps, e J_{AY} e J_{BY} sono nulle. I tre protoni H-2, H-3 e H-4 mostrano un assorbimento complesso tra 4,9 e 5,8 δ : la posizione in cui essi cadono esclude per essi la presenza di gruppi $-\text{CH}-\text{OCH}_3$, ma indica invece la presenza di sistemi $-\text{CH}-\text{OAc}$.

(*) Gli spettri NMR sono stati determinati su apparecchio Varian A-60 in soluzione di CDCl_3 o di CCl_4 , in presenza di tetrametilsilano quale riferimento interno; i valori sono espressi in ppm assumendo $\delta = 0$ per i protoni del tetrametilsilano. Per la misura degli integrali si è usato un voltmetro numerico Hewlett-Packard mod. 405 CR. Gli spettri sono stati registrati e interpretati dalla dott. ROSANNA MONDELLI (Istituto di Chimica del Politecnico, Milano), alla quale va il nostro più vivo ringraziamento per la collaborazione.

Il prodotto ottenuto (*) da 6-O metil-D (+) glucosio sintetico mostra invece uno spettro (in CDCl_3) assai più complesso, dovuto alla presenza dei due anomeri, come risulta dai numerosi picchi visibili nella zona degli acetili: sono identificabili solo il doppietto dell'H-1 e (6,33 δ , $J_{12, 22} = 3,5$ cps) e il segnale allargato del metossile (3,35 δ).

20-0-metil-1,3,4,6-tetraacetil-D (+) glucosio.

Il prodotto isolato a partire dall'apo-atrattiloside è una miscela dei due anomeri nel rapporto 1:1 circa. Nello spettro (in CCl_4) si osservano infatti due singoletti per il metossile (3,42 e 3,49 δ), ed entrambi i doppietti del protone in C-1: H-1a (5,53 δ , $J_{12, 22} = 8,5$ cps), H-1e (6,38 δ , $J_{12, 22} = 4,0$ cps). La somma dei due segnali del metossile corrisponde a tre idrogeni, la somma di H-1a e H-1e a un idrogeno. Nella zona 1,97-2,02 δ vi sono numerosi segnali di acetili, pari a nove protoni; a 2,14 e 2,17 δ si distinguono due segnali, che integrano per un totale di tre protoni, attribuibili agli acetili in C-1, rispettivamente equatoriale e assiale. Gli assorbimenti degli altri idrogeni sono tutti complessi ma cadono nelle posizioni corrispondenti a quelle del campione sintetico usato come confronto (vedi più avanti). I protoni H-3 e H-4 cadono a 4,7-5,5 δ ; i due protoni su C-6 e il protone H-5 a 3,6-4,5 δ ; il protone H-2 è sovrapposto ai segnali del metossile nella zona 3,3-3,6 δ . In particolare, i valori dell'integrale assicurano la presenza di un solo metossile e di quattro acetili; la presenza di un acetile su C-6 è confermata dallo shift, anche se approssimato, del metilene a 4,1-4,2 δ : se l'ossidrilico su C-6 fosse metilato anziché acetilato, il segnale del metilene sarebbe spostato verso campi alti. Un campione sintetico di 2-0-metil-1,3,4,6-tetraacetil-D (+) glucosio (**) risulta invece costituito da un solo anomero. Il suo spettro (in CCl_4) mostra quattro singoletti di tre protoni ciascuno, attribuiti ai tre acetili in C-3, C-4 e C-6 (1,98-2,01-2,03 δ) e all'acetile equatoriale in C-1 (2,14 δ), e il segnale del metossile (singoletto a 3,47 δ). Il protone assiale H-1a si presenta come un doppietto a 5,53 δ ($J_{12, 22} = 8,5$ cps). Il protone H-2 si trova a campi più alti rispetto a tutti gli altri idrogeni e si presenta come un tripletto a 3,29 δ ($J_{12, 22} = J_{23, 33} = 8,5$ cps). I protoni su C-6 ($-\text{CH}_2\text{OAc}$) e su C-5 ($<\text{CH}-\text{O}-$) cadono in un complesso assorbimento a 3,5-4,5 δ (integrale: tre protoni); pure complessi sono i segnali dei due idrogeni H-3 e H-4 ($-\text{CHOAc}-$) a 4,6-5,3 δ .

2,6-di-0-metil-1,3,4-triacetil-D (+) glucosio.

Il prodotto isolato a partire dall'apo-atrattiloside è una miscela dei due anomeri nel rapporto H-1e/H-1a \approx 60/40 circa. Nel suo spettro (in CCl_4) la zona degli acetili presenta segnali per nove protoni, tra i quali si distinguono i due singoletti

(*) Preparato per acetilazione di 6-O-metil-D (+) glucosio: questo è stato ottenuto secondo BELL (19).

(**) Preparato per acetilazione di un campione di 2-0-metil-D (+) glucosio donatoci dal prof. W. J. WHELAN (Lister Institute of Preventive Medicine, Londra) che vivamente ringraziamo.

dell'acetile in C-1 : assiale a 2,17 δ ed equatoriale a 2,12 δ , nel rapporto circa 60/40. Nella zona 3,2-3,5 δ si integrano segnali per otto protoni (due metossili e $-\text{CH}_2\text{O}-$): la presenza di un metossile su C-6 è provata dal valore dello shift dei due protoni sullo stesso carbonio (3,3-3,5 δ), caratteristico per un sistema $-\text{CH}_2-\text{OCH}_2-$. Il protone H-1e è visibile a 6,33 δ come doppietto con $J_{1e, 2e} = 4$ cps; il protone H-1a cade nella zona 4,5-5,6 δ assieme ad altri due idrogeni $>\text{CH}-\text{OAc}$ (integrale: circa 2,5 protoni). Il protone H-5 e l'altro protone $>\text{CH}-\text{OCH}_2$ assorbono nella zona 3,5-4,3 δ .

PARTE SPERIMENTALE (*).

Atrattiloside.

Il prodotto naturale, in forma di sale bipotassico, viene estratto dalle radici di *Atractylis gummifera* seguendo sostanzialmente il metodo descritto in passato da altri Autori (1, 2, 7). Cristallizzato più volte da acqua o da acqua-etanolo 50 : 50 si presenta in cristalli lucenti bianchissimi, che fondono in modo impreciso e con decomposizione a temperature variabili con la velocità di riscaldamento: in capillare con riscaldamento lento si ha decomposizione a 157-158°, con riscaldamento veloce decomposizione a 173-177°, su blocco Kofler decomposizione a 200-210°. Potere rotatorio $[\alpha]_D = -53^\circ$ in soluzione acquosa (c = 1,1). Data la lieve igroscopicità, il campione per analisi viene essiccato a 100° sotto 1 mmHg per 12 ore. Analisi:

	trov. %	C 44,93;	H 5,86;	S 8,37;	K 10,00;	SO_4^- 23,07;
	per $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{O}_{14}\text{S}_2\text{K}_2$					
	calc.	44,87;	5,52;	7,99;	9,74;	23,92.

Determinazione dell'acidità volatile : 0,99 moli/mole (idrolisi con idrati alcalini).

L'atrattiloside ammettato con acido solforico concentrato dà intensa colorazione arancio-bruno e caratteristico odore di acido grasso a 4-5 atomi di carbonio. Lo stesso odore si percepisce durante prolungata ebollizione della soluzione acquosa di atrattiloside; l'aggiunta di acidi favorisce il distacco dell'acido volatile, rendendolo rapidamente quantitativo.

Diidro-atrattiloside.

In una miscela di 100 cm³ di acqua e 200 cm³ di etanolo si disciolgono 3,70 g di atrattiloside, e si idrogena a pressione e temperatura ambiente su 200 mg di Pd-C al 10%: in un'ora vengono assorbiti 110 Nem³ di idrogeno, pari a 1,07 doppi

(*) I punti di fusione sono corretti. Gli spettri IR (dispersione in nujol o pastiglia di KBr secondo i casi) sono stati determinati su spettrofotometro Perkin Elmer Infracord 137, i poteri rotatori su polarimetro fotoelettrico Perkin Elmer 141.

legami. Filtrato il catalizzatore e svaporato il solvente a pressione ridotta, il residuo cristallizzato da acqua tiepida dà un feltro di aghi bianchissimi, che fondono in modo impreciso e con decomposizione a temperature variabili con la velocità di riscaldamento: in capillare con riscaldamento lento si osserva la fusione a 172-173°, con riscaldamento veloce intorno a 193°, su blocco Kofler a 204-206°. Potere rotatorio $[\alpha]_D^{20} = -34,5^\circ$ in soluzione acquosa ($c = 1,0$). Analisi:

trov. %: C 44,43; H 5,69; S 7,96; K 9,41;
per $C_{20}H_{16}O_{10}S_2K_2$ calc. : 44,76; 5,76; 7,97; 9,71.

Idrolisi con acido fosforico: dosaggio e riconoscimento dell'acido isovalerianico.

In 300 cm³ di soluzione molare di acido fosforico vengono disciolti g 1,606 di attrattiloside, pari a 2 mmoli: si porta all'ebollizione in un pallone munito di efficiente paraspruzzi, raccogliendo il distillato in beuta di Fresenius contenente acqua distillata di fresco e isolata dall'atmosfera mediante assorbitori a calce sodata. Si titola periodicamente il distillato con idrato potassico decinormale (indicatore rosso fenolo) finché risulta praticamente privo di acidità volatile. Due prove forniscono il seguente risultato:

dopo 1 h	9,45	7,90	cm ³ KOH 0,1 N
2 h	5,25	6,00	
3 h	3,45	4,10	
4 h	1,70	1,50	
5 h	0,50	0,60	
6 h	0,05	0,10	
totale	20,40	20,20	

Ciò indica il distacco di una sola mole di acido volatile per mole di attrattiloside (esattamente: 1,02 e 1,01 moli).

La soluzione del sale potassico dell'acido volatile così ottenuta viene dibattuta con resina Amberlite IR-120 e l'acido liberatosi, di odore caratteristico, estratto con etere. Sottoposto a cromatografia in fase vapore (apparecchio Fractovap B, C. Erba, con rivelatore a termoeconduttività, colonna di 2 m, riempimento celite 30-60 mesh con 20% olio di silicone e 3% acido stearico, temp. 130°, gas di trasporto H₂, flusso 10 l/h) l'acido risulta unitario e presenta identico tempo di ritenzione dell'acido *isovalerianico*, sia solo sia in miscela con prodotto purissimo. In miscela con acido valerianico normale si hanno due picchi con differenti tempi di ritenzione.

Analoga idrolisi con acido fosforico dell'idroattrattiloside fornisce eguale quantità di acido isovalerianico.

Idrolisi con acido solforico: riconoscimento del D (+) glucosio.

Un campione di attrattiloside del peso di 200 mg viene disciolto in una soluzione molare di acido solforico e questa bollita a ricadere per quattro ore: si estrae con etere per eliminare l'acido isovalerianico e l'attrattiliretina (*), si aggiunge eccesso di carbonato di bario e si filtra. La soluzione, che riduce i reattivi di Fehling e di TOLLENS, viene concentrata a pressione ridotta e a bassa temperatura fino a consistenza sciropposa. Il residuo risulta unitario alla cromatografia su carta (carta WHATMAN n. 1, elemento acetato d'etile-piridina-acqua 10:9:3, rivelatore ftalato di anilina in butanolo, sviluppo a 105° per 5'), con R identico a quello del D (+) glucosio in confronto con altri zuccheri: galattosio $R_f = 0,45$, glucosio $R_f = 0,50$, zucchero da attrattiloside $R_f = 0,50$, mannosio $R_f = 0,55$, fruttosio $R_f = 0,56$.

Il resto del residuo viene acilato con anidride acetica e piridina: il prodotto pastoso ottenuto presenta alla cromatografia in fase gassosa lo stesso tempo di ritenzione dell'1,2,3,4,6-pentaacetil-D (+) glucosio, sia solo sia in miscela con prodotto preparato per analogia acilazione del glucosio. Condizioni impiegate: apparecchio Wilkens Aerograph HyFI A-600 con rivelatore a ionizzazione di fiamma; colonna di $10' \times 1/8''$, riempimento 10% di metilsilicone Gum Rubber SE-30 su Chromosorb W 60/80, temperatura 220°, gas di trasporto N_2 , flusso 1,8 l/h; oppure colonna di $5' \times 1/8''$, riempimento 10% di fenilsilicone Dow 710 su Chromosorb W silanizzato 80/100, temperatura 220°, gas di trasporto N_2 , flusso 1,8 l/h.

Analogia idrolisi solforica dell'idroattrattiloside fornisce D (+) glucosio, riconosciuto con le stesse tecniche.

Idrolisi dell'attrattiloside con idrato potassico: attrattiligensina.

Un campione di attrattiloside, del peso di g 1,6 viene disciolto in 20 cm³ di soluzione al 20% di idrato potassico e idrolizzato mediante ebollizione a ricadere per otto ore. Si diluisce con 80 cm³ di acqua, si raffredda e si acidifica con soluzione al 10% di acido cloridrico: il precipitato bianco viene lasciato flocculare e poi raccolto e lavato a fondo con acqua. Cristallizzato da etanolo acquoso fino a scomparsa dell'odore di acido isovalerianico, forma prismi bianchi che sfioriscono essiccandoli sotto vuoto a 60°: p.f. 189° dopo pseudofusione intorno a 155°. Il prodotto viene identificato (spettro IR, potere rotatorio, formazione di diacetil-derivato e di diidro-derivato) con l'attrattiligensina $C_{18}H_{30}O_4$. Nelle acque di idrolisi è presente abbondante ione solforico.

Idrolisi dell'idroattrattiloside con idrato potassico: idroattrattiligensina.

Un campione di idroattrattiloside, del peso di g 1,6, viene disciolto in 20cm³ di soluzione al 20% di idrato potassico. La soluzione viene bollita a ricadere per otto ore, diluita con 180 cm³ di acqua e acidificata, raffreddando, con soluzione al

(*) Nome dato dai primi ricercatori alla sostanza resinosa amorfa che si ottiene per idrolisi acida dell'attrattiloside, la cui struttura non è ancora nota.

10% di acido cloridrico; si bolle per scacciare in corrente di vapore la massima parte dell'acido isovalerianico, poi si raccoglie il precipitato bianco che viene cristallizzato da acetato d'etile fino a p.f. 236-237° costante. Il prodotto viene identificato (spettro IR, p.f. in miscela, potere rotatorio, formazione di diacetilderivato) con l'idroattrattilosidina $C_{19}H_{21}O_4$ (18). Nelle acque di idrolisi si rileva la presenza di abbondante ione solforico.

Diacetil-atrattiloside.

Un campione di attrattiloside, del peso di 1 g, viene sciolto in 5 cm³ di piridina e 5 cm³ di anidride acetica; si lascia in riposo per 24 ore, poi si versa in una capsula, si aggiungono 5 cm³ di metanolo e si lascia in essiccatore sotto vuoto su KOH e P₂O₅ per alcune settimane finché eliminatosi il solvente resta un residuo bianco microcristallino: questo viene lavato con acqua ghiacciata ed essiccato nel vuoto a 60° fino a peso costante: p.f. 225-227° con decomposizione.

Determinazione dell'acidità volatile (idrolisi con idrati alcalini):

trov. 2,98 moli/mole;

calc. 3,00 moli/mole.

Apo-atrattiloside (sale di bario e sale bipotassico).

Si seguono con lievi differenze le indicazioni di LEFRANC (*). Un campione di attrattiloside, del peso di 2g, viene sciolto in 40 cm³ di acqua insieme a 2 g di idrato di bario; si riscalda e si tiene all'ebollizione per un minuto esatto, poi si raffredda rapidamente e si filtra dal lieve intorbidamento; la soluzione è saturata con anidride carbonica, filtrata e poi neutralizzata con soluzione normale di acido cloridrico: si forma rapidamente un feltro cristallino di apo-atrattiloside, sale di bario, $C_{23}H_{26}O_{12}S_2Ba$, che viene raccolto e ricristallizzato da acqua. Il prodotto fonde con decomposizione intorno a 155° (in capillare, riscaldamento rapido); umettato con acido solforico concentrato, non svolge odore di acido isovalerianico.

Il sale di bario così ottenuto è convertibile nel sale bipotassico $C_{23}H_{26}O_{12}S_2K_{27}$ più solubile in acqua, mediante reazione di scambio. Si sciolgono 1 g di sale di bario e 0,24 g di solfato potassico in 20 cm³ di acqua bollente: filtrato il solfato di bario, si concentra a piccolo volume finché si separa cristallino il sale bipotassico. Il prodotto fonde con decomposizione intorno a 232-234° (in capillare, riscaldamento rapido).

Desolfatazione dell'apo-atrattiloside con amalgama di sodio: attrattilina.

In una miscela di 20 cm³ di acqua e 80 cm³ di metanolo si sospendono 3 g di sale di bario dell'apo-atrattiloside e 100 g di amalgama all'1% di sodio: si agita energeticamente per 72 ore, poi si filtra e si estrae con etere che viene scartato: la soluzione limpida è percolata ripetutamente prima su resina Amberlite IR-120 acida poi su resine Amberlite IRA-410 salificata come ione carbonato. Svaporida

la soluzione a pressione ridotta, lo scarso residuo viene trattato per 24 ore a temperatura ambiente con 10 cm³ di anidride acetica e 10 cm³ di piridina: si versa poi in ghiaccio, ottenendo la precipitazione di un solido bianco che viene raccolto, seccato, esterificato con soluzione eterea di diazometano; si ha una polvere bianca di *pentaacetil-atrattilina metilestere*, che cristallizzato da etanolo presenta p.f. 165-167°.

Analisi:

	trov. %:	C 61,11;	H 7,43;
per C ₂₀ H ₂₆ O ₁₄	calc.:	61,19;	7,13.

Desolfatazione dell'atrattiloside con acido cloridrico in metanolo: metilestere isovaleril-atrattilina.

A 200 cm³ di metanolo si aggiungono 2 cm³ di acido cloridrico concentrato e 2 g di atrattiloside: si fa sciogliere sotto agitazione, si lascia in riposo per 24 ore, poi si diluisce con 200 cm³ di acqua ghiacciata e si estrae sei volte con etere. L'estratto etero viene lavato con soluzione satura di cloruro sodico, poi trattato con eccesso di diazometano ed evaporato; il residuo, formato da metilestere isovaleril-atrattilina con poco metilestere atrattiligina, è cromatografato su 125 g di allumina neutra Woelm attività 1: con acetato d'etile-metanolo 99:1 si eluisce il metilestere atrattiligina, poi con acetato d'etile-metanolo 90:10 il *metilestere isovaleril-atrattilina*. Questo si ottiene dall'eluato in forma di polvere microcristallina con p.f. 112-114°, resa 55% sul teorico. Analisi:

	trov. %:	C 63,59;	H 8,54;
per C ₂₁ H ₂₆ O ₁₃	calc.:	64,11;	8,33.

Umettato con acido solforico concentrato, il prodotto svolge intenso odore di acido isovalerianico. Spettro IR: bande a 3300 cm⁻¹ (OH) e 1725 cm⁻¹ (COOR).

Per trattamento con anidride acetica e piridina a freddo, si ottiene un tetraacetilderivato vetroso non caratterizzabile (spettro IR, assenza di bande di ossidril): alla cromatografia su strato sottile (eluente etere-tolueno 2:1) è unitario con R_f = 0,58; nelle stesse condizioni il metil-estere pentaacetil-atrattilina ha R_f = 0,49 e il metilestere diacetil-atrattiligina ha R_f = 0,70.

Idrolisi del metilestere isovaleril-atrattilina: atrattilina.

Si sciogliono in 20 cm³ di metanolo 200 mg di metilestere isovalerilatrattilina e si aggiungono a caldo 20 cm³ di soluzione al 5% di idrato di bario. Si tiene a 70-80° per dieci minuti, poi si fa passare una lenta corrente di anidride carbonica, si scalda all'ebollizione e si filtra; il filtrato, reso leggermente acido con acido cloridrico diluito, viene estratto cinque volte con cloroformio. Si secca su cloruro di calcio, si concentra ad incipiente precipitazione, si aggiunge soluzione eterea di diazometano in eccesso, si tira a secco e si riprende a caldo con cloroformio; per raffreddamento si depositano fiocchi bianchi di *metilestere atrattilina*, p.f. 130-132°. Alla cromatografia su strato sottile (eluente acetato d'etile 80 — etanolo 30 — acqua 15) risulta unitario con R_f = 0,75.

Per trattamento con anidride acetica e piridina si ottiene *metilestere pentacetil-atrattilina*, p.f. 165-167° (cristallizzato da etanolo) anche in miscela con il prodotto ottenuto per desolfatazione dell'apo-atrattilioside con amalgama di sodio. Alla cromatografia su strato sottile (eluente etere-toluene 2:1) è unitario con $R_f = 0,49$, Spettro IR: bande di ossidrilie assenti: banda larga di estere a 1730-1745 cm^{-1} ; banda di $\text{C}=\text{CH}_2$ a 910 cm^{-1} .

Desolfatazione del diacetil-atrattilioside con acido cloridrico in metanolo: metilestere diacetil-isovaleril-atrattilina.

A 80 cm^3 di metanolo si aggiungono 0,8 cm^3 di acido cloridrico concentrato e 800 mg di diacetil-atrattilioside: dopo dissoluzione si lascia in riposo per 24 ore, poi si versa in ghiaccio e si estrae quattro volte con etere. L'estratto etero viene lavato con soluzione satura di cloruro di sodio, seccato su solfato sodico, trattato con eccesso di diazometano ed evaporato. Il residuo vetroso bianco è cromatografato su 40 g di allumina neutra Woelm attività 1, eluendo con acetato d'etile: dopo alcune impurezze iniziali, si raccoglie il prodotto unitario in forma di solido vetroso bianco, non cristallizzabile, con p.f. 108°. Alla cromatografia su strato sottile (eluente acetato d'etile-metanolo 99:1) ha $R = 0,43$. Analisi:

trov. %: C 63,43; H 8,00;
per $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_{12}$ calc. : 63,23; 7,88.

Spettro IR (in KBr): 3350 cm^{-1} (OH), 1730 cm^{-1} (COOR), 1650 cm^{-1} (C=C), 965 cm^{-1} (C=CH²).

Umettato con acido solforico concentrato, il prodotto svolge odore di acido isovalerianico.

Trattato con anidride acetica e piridina a freddo, fornisce tetracetil-isovaleril-atrattilina metilestere, non caratterizzabile, identico al prodotto ottenuto per analogia acetilazione del metilestere isovaleril-atrattilina.

Idrolisi dell'atrattilina: atrattiligenina e D (+) glucosio.

Un campione di metilestere atrattilina, del peso di 100 mg, viene bollito a ricadere per sei ore in 5 cm^3 di soluzione al 20% di idrato potassico: dopo diluizione ed acidificazione, si isola un prodotto bianco che dopo cristallizzazione da etanolo acquoso viene riconosciuto identico ad *atrattiligenina*.

Un campione di metilestere atrattilina, del peso di 100 mg, viene bollito a ricadere per quattro ore in 5 cm^3 di soluzione molare di acido solforico: dopo l'usuale trattamento, nella soluzione acquosa si riconosce mediante cromatografia su carta la presenza di *D (+) glucosio*.

Identici risultati per il riconoscimento dell'atrattiligenina e del glucosio si hanno operando le idrolisi alcalina ed acida su metilestere pentaacetil-atrattilina.

Saggio di Fehling su attrattiloside e derivati.

Ad un campione di prodotto da saggiare (10 mg) sciolto o sospeso in 2 cm³ di acqua vengono aggiunti 1 cm³ di ciascuno dei due reattivi di FEHLING; si riscalda entro b.m. bollente per 5 minuti, poi a fiamma diretta all'ebollizione per 30 secondi.

Il saggio viene eseguito su i seguenti prodotti: attrattiloside, apo-attrattiloside sale bipotassico; apo-attrattiloside sale di bario; metilestere isovaleril-attrattilina; metilestere attrattilina; metilestere penta-acetil-attrattilina.

Per tutti il saggio risulta negativo dopo il riscaldamento in b.m., e debolmente positivo dopo l'ebollizione a fiamma diretta; prolungando l'ebollizione il saggio si fa progressivamente più positivo.

Ossidazione cromica dell'idroattrattiloside: metilestere 15-cheto-idro-attrattiligenina.

Un campione di idroattrattiloside, del peso di 1 g, viene disciolto in etanolo e trattato con eccesso di soluzione etanolica di diazometano; si allontana il solvente a pressione ridotta, si scioglie il residuo a 40-50° in 20 cm³ di acido acetico glaciale e si aggiunge goccia a goccia a quella temperatura una soluzione formata da 200 mg di anidride cromica, 5 cm³ di acido acetico e 0,1 cm³ di acqua.

L'aggiunta dura circa dieci minuti; il consumo di reattivo è molto rapido all'inizio e la presenza di eccesso è controllata versando in acqua una goccia di soluzione e osservandone il colore. Terminata l'aggiunta, si mantiene per quindici minuti a temperatura ambiente, quindi si versa in ghiaccio; si aggiungono 100 cm³ di soluzione al 20% di idrato potassico e si bolle a ricadere per dodici ore sotto agitazione. Si filtra dall'idrato di cromo, si versa in ghiaccio e si acidifica con acido cloridrico (diluito 1:1); si estrae con etere, che si lava con acqua e si tratta con eccesso di diazometano.

Per evaporazione dell'etere si ha un residuo oleoso che viene ripreso a caldo con acetato d'etile: da questo, dopo riposo in frigorifero, si hanno grossi cristalli bianchi aventi p.f. 124°; resa 20% circa. Analisi:

	trov. %	C 71,91	H 8,98
per C ₂₀ H ₂₆ O ₄	calc.	71,82	9,04

Alla cromatografia su strato sottile (eluente acetato d'etile-metanolo 99:1) presenta R_f = 0,57 rivelando con soluzione etanolo solforica di 2,4-dinitrofenilidrazina.

Spettro IR (in KBr): 3400 cm⁻¹ (OH), 1715 cm⁻¹ (COOR e CO).

Spettro NMR (in CDCl₃): singoletto a 0,96 δ (metile terziario), doppietto a 1,10 δ (J = 6 cps: metile secondario), singoletto a 3,68 δ (COOCH₃), tripletto di doppietti a 2,68 δ (J_{4', 3'} = 2,3 cps; J_{4', 5'} = 5,5 cps: protone equatoriale in C-4), tripletto di tripletti a 4,25 δ (J_{2', 1'} = J_{2', 3'} = 12,5 cps; J_{2', 1'} J_{2', 3'} = 5 cps: protone assiale in C-2).

I valori analitici e spettroscopici sono in accordo con la struttura di metilestere 15-cheto-idroattrattiligenina.

Un campione di prodotto trattato con anidride acetica e piridina, fornisce un *monoacetiliderivato* che viene purificato mediante cromatografia su allumina neutra Woelm, attività 2, eluente benzene, e presenta p.f. 159°. Analisi:

trov. %:	C 69,90;	H 8,74;	CH ₃ CO 10,56;	
per C ₁₂ H ₁₁ O ₃	calc. :	70,18;	8,57;	11,43.

Alla cromatografia su strato sottile (stesso eluente, stesso rivelatore del prodotto non acetilato) presenta R = 0,72.

Spettro I.R.: 1730 cm⁻¹ (COOR e CO), 1250 cm⁻¹ (CH₃COO).

Titolazioni con acido periodico ()*.

Il campione di sostanza da ossidare, pari a 0,2 mmoli, viene disciolto in una miscelazione di 20 cm³ di metanolo, 20 cm³ di soluzione 0,1-molare di acido acetico e acetato sodico, 10 cm³ di soluzione 0,1 molare di acido periodico. Si conserva a temperatura ambiente e al buio, e ad intervalli di tempo si prelevano 10 cm³ di soluzione: questi vengono versati in 20 cm³ di soluzione satura di bicarbonato sodico cui si aggiungono 3 cm³ di soluzione al 20% di ioduro potassico. Dopo 10 minuti si titola lo iodio liberatosi con soluzione 0,02-normale di arsenito sodico in presenza di salda d'amido.

Le titolazioni su i prodotti da analizzare vengono eseguite in parallelo con una prova in bianco e con prove su sostanze note (*z*-metilglucoside e 4,6-benziliden-*z*-metilglucoside).

I risultati sono raccolti nella tabella a pagina seguente.

O-metilazione dell'atrattiloside e suoi derivati: O-metil-acetiliderivati del glucosio.

In 25 cm³ di dimetilformammide distillata su idrato potassico si sciolgono 5 g di atrattiloside; si aggiungono 5 g di ossido d'argento e 10 cm³ di ioduro di metile. Si sbatte per 24 ore a temperatura ambiente su agitatore a slitta, poi si versa in 200 cm³ di metanolo, si riscalda all'ebollizione, si filtra, si tira a secco a pressione ridotta, si riprende ancora con 150 cm³ di metanolo bollente, si rifiltra e si tira a secco di nuovo. Si aggiungono 200 cm³ di soluzione doppio-normale di acido solforico e si bolle a ricadere per 12 ore; si formano durante il riscaldamento delle sostanze gommose che a freddo si rapprendono in un solido resinoso brunastro. Alla soluzione fredda si aggiunge eccesso di carbonato di bario e si tiene a 40°-50° finché la reazione diviene neutra, poi si scalda ad incipiente ebollizione e si filtra. Il filtrato è evaporato a secchezza a pressione ridotta e trattato con 5 cm³ di anidride acetica e 5 cm³ di piridina; dopo 24 ore si versa in ghiaccio e si estrae con etere. L'estratto eterico viene lavato con soluzioni di bicarbonato sodico e di bisolfato potassico, poi con acqua, seccato ed evaporato: si ottiene un olio denso, giallastro, del peso di circa 600 mg, che viene sottoposto a gascromatografia.

(*) Si è seguita sostanzialmente per le titolazioni la tecnica indicata in (2).

TABELLA.

Moli di H ₂ O, consumati per mole sostanza					
	4	8	24	36	48 ore
atrattiloside	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
apo-atrattiloside sale bipotassico . .	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
metilestere atrattilina	1,7	2,0	2,1	2,1	2,1
metilestere isovaleril-atrattilina . .	0,45	0,6	0,9	0,95	1,1
metilestere diacetil- isovaleril-atrattilina	0,6	0,7	1,0	1,0	1,0
α -metil-glucoside	1,7	2,0	2,0	2,0	2,1
4,6-benziliden- α -metil-glucoside . .	0,4	0,6	0,75	0,85	0,9
prova in bianco	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1

Analoga operazione viene eseguita per la O-metilazione dell'apo-atrattiloside e del metilestere atrattilina.

Gascromatografia analitica e preparativa degli acetil-O-metil-derivati del glucosio.

Per l'esame analitico si impiega un apparecchio Wilkens Aerograph A-600 HyFI con rivelatore a ionizzazione di fiamma, temperatura delle colonne 220°, gas di trasporto azoto, flusso 1,8 litri/ora. Si usano: colonna A di 10' x 1/8", riempimento 5% di metilsilicone Gum Rubber SE-30 su Chromosorb W 60/80; colonna B di 5' x 1/8", riempimento 10% di fenilsilicone Dow 710 su Chromosorb W silanizzato 80/100.

Per la separazione preparativa si impiega un apparecchio Wilkens Aerograph A-350 con rivelatore a termoconduttività; si usa: colonna C di 10' x 1/4", riempimento 10% di metilsilicone Fluid SP-96 su Chromosorb W 100/120, temperatura della colonna 210°, gas di trasporto elio, flusso 60 cm³/minuto.

Vengono rilevati i seguenti tempi di ritenzione relativi per i sottolencati derivati sintetici; si assegna il valore 1 all'1,2,3,4,6-pentaacetil-glucosio:

	colonna A	colonna B	colonna C
1,2,3,4,6-pentaacetil-	1,00	1,00	1,00
3-0-metil-1,2,4,6-tetraacetil- (*)	0,93	0,87	non det.
2-0-metil-1,3,4,6-tetraacetil- (vedi nota 2ª a pag. 7)	0,83	0,83	0,87
4-0-metil-1,2,3,6-tetraacetil- (**)	0,76	0,70	0,80
6-0-metil-1,2,3,4-tetraacetil- (vedi nota 1ª a pag. 7)	0,67	0,59 \pm 0,64 \pm	0,69
2,3-di-0-metil-1,4,6-tetraacetil- (***)	0,45	non det.	non det.
2,3,4,6-tetra-0-metil-1-acetil- (****)	0,29	0,23	non det.

(*) Preparato per acetilazione di 3-0-metil-D (+) glucosio della ditta Koch-Light.

(**) Preparato per acetilazione di 4-0-metil-D (+) glucosio; questo è stato sintetizzato secondo P. A. LEVENE e A. L. RAYMOND (29).

(***) Preparato per acetilazione di 2,3-di-0-metil-D (+) glucosio; questo è stato ottenuto secondo J. C. IRVINE e J. P. SCOTT (12).

(****) Preparato per acetilazione del 2,3,4,6-tetra-0-metil-D (+) glucosio; questo è stato sintetizzato secondo W. N. HAWORTH (13).

Il prodotto ottenuto per metilazione, idrolisi e acetilazione dell'atrattiloside presenta un picco predominante a $T_R = 0,67$ (colonna A) e $T_R = 0,59$ (colonna B); sono presenti tracce di altri componenti e un picco secondario a $T_R = 0,29$ (colonna A) e $T_R = 0,23$ (colonna B).

Mediante iniezioni incrociate con 2,3,4,6-tetra-0-metil-1-acetil-glucosio e con 6-0-metil-1,2,3,4-tetraacetil-glucosio sintetici (il secondo è la miscela dei due epimeri), si hanno sulla colonna A due picchi con $T_R = 0,29$ e $0,67$, e sulla colonna B tre picchi con $T_R = 0,23$, $0,59$ e $0,64$. Ciò identifica qualitativamente i due derivati naturali con i prodotti sintetici usati per l'iniezione incrociata. Il prodotto naturale predominante viene separato mediante gascromatografia preparativa (colonna C), raccogliendo il picco a $T_R = 0,69$; esso viene esaminato mediante spettroscopia NMR (vedi in precedenza) che ne conferma la struttura di 6-0-metil-1,2,3,4-tetraacetil-glucosio.

Il prodotto ottenuto per metilazione, idrolisi e acetilazione dell'apo-atrattiloside presenta sulle colonne A e B i seguenti picchi, corrispondenti ai composti designati 1-2-3-4 (in ordine di eluizione):

composto 1	0,28 (colonna A)	0,23 (colonna B)	circa 5%
composto 2	0,50	0,49	• 50%
composto 3	0,67	0,59	• 20%
		0,64	
composto 4	0,83	0,83	• 25%

Mediante iniezioni incrociate i composti 1 - 3 - 4 sono identificati rispettivamente con 2,3,4,6-tetra-0-metil-1-acetil-glucosio, 6-0-metil-1,2,3,4-tetraacetil-glucosio, 2-0-metil-1,3,4,6-tetraacetil-glucosio. Il composto 2, in base al valore di T_R , è ritenuto essere un di-0-metil-triacetil-glucosio.

Con l'ausilio della gascromatografia preparativa (colonna C) si separano e raccolgono i composti 2 e 4, aventi picchi a $T_R = 0,50$ e $0,87$ rispettivamente. Per il composto 2 l'esame spettroscopico NMR (vedi in precedenza) conferma una struttura di di-0-metil-triacetil-glucosio, con uno dei metossili sul carbonio C-6; si tratta verosimilmente di 2,6-di-0-metil-1,3,4-triacetil-glucosio. Per il composto 4 l'esame spettroscopico NMR (vedi in precedenza) conferma la struttura di 2-0-metil-1,3,4,6-tetraacetil-glucosio.

Il prodotto ottenuto per metilazione, idrolisi e acetilazione del metilestere atrattilina presenta sulle colonne A e B un picco largamente predominante a $T_R = 0,29$ (colonna A) e $0,23$ (colonna B), oltre a tracce di composti con T_R compreso tra $0,40$ e $0,90$. Mediante iniezione incrociata il composto viene identificato con 2,3,4,6-tetra-0-metil-1-acetil-glucosio.

Palermo - Istituto di Chimica Organica dell'Università.

Milano - Istituto di Chimica del Politecnico - Centro Nazionale di Chimica delle Sostanze Organiche Naturali, Sezione 1^a.

Palermo - Istituto di Chimica Farmaceutica dell'Università.

Cagliari - Istituto di Chimica Farmaceutica dell'Università.

25 gennaio 1967.

Lavoro eseguito con il contributo del C.N.R.

BIBLIOGRAFIA

- (1) M. LEFRANC, *Comptes Rend.*, **67**, 954 (1868).
(2) M. LEFRANC, *J. Pharm. et Chimie* [4], **9**, 81 (1869).
(3) M. LEFRANC, *J. prakt. Chem.*, **100**, 181 (1869).
(4) M. LEFRANC, *Comptes Rend.*, **76**, 438 (1873).
(5) M. LEFRANC, *J. Pharm. Chimie* [4], **17**, 187 (1873).
(6) M. LEFRANC, *J. Pharm. Chimie* [4], **17**, 263 (1873).
(7) F. ANGELICO, *Gazz. Chim. Ital.*, **36**, II, 636 (1906).
(8) F. ANGELICO, *Gazz. Chim. Ital.*, **40**, I, 403 (1910).
(9) F. ANGELICO e F. MONFORTE, *Gazz. Chim. Ital.*, **53**, 808 (1923).
(10) H. WUNSCHENDORF e P. BRAUDEL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **13**, 758 (1931).
(11) H. WUNSCHENDORF e P. BRAUDEL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **13**, 764 (1931).
(12) H. WUNSCHENDORF e P. VALIER, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **16**, 74 (1934).
(13) T. AJELLO, *Gazz. Chim. Ital.*, **63**, 99 (1933).
(14) T. AJELLO, *Gazz. Chim. Ital.*, **63**, 289 (1933).
(15) T. AJELLO, *Gazz. Chim. Ital.*, **64**, 59 (1934).
(16) T. AJELLO, *Gazz. Chim. Ital.*, **64**, 938 (1934).
(17) T. AJELLO, F. PIOZZI, A. QUILICO e V. SPRIO, *Rend. Acc. Lincei*, VIII, **28**, 545 (1969).
(18) T. AJELLO, F. PIOZZI, A. QUILICO e V. SPRIO, *Chimica Industria*, **42**, 876 (1960).
(19) T. AJELLO, F. PIOZZI, A. QUILICO e V. SPRIO, *Gazz. Chim. Ital.*, **93**, 867 (1963).
(20) F. PIOZZI, A. QUILICO, T. AJELLO, V. SPRIO e A. MELERA, *Tetrahedron Letters*, **1965**, 1829.
(21) F. PIOZZI, A. QUILICO, R. MONDELLI, T. AJELLO, V. SPRIO e A. MELERA, *Chimica Industria*, **48**, 371 (1966).
(22) F. PIOZZI, A. QUILICO, R. MONDELLI, T. AJELLO, V. SPRIO e A. MELERA, *Tetrahedron, Suppl.* **8**, II, 515 (1966).
(23) E. JOHNSTONE e E. G. V. PERCIVAL, *J. Chem. Soc.*, **1950**, 1994.
(24) T. G. KANTON e M. SCHUBERT, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 152 (1957).
(25) E. KUHN, H. TRISCHMANN e I. LÖW, *Angew. Chem.*, **67**, 32 (1955).
(26) N. NAKAJIMA, A. HASEGAWA e F. W. LICHTENTHALER, *Ann.*, **669**, 75 (1963) e bibliografia ivi citata.
(27) A. C. RICHARDSON e K. A. McLAUCHLAN, *J. Chem. Soc.*, **1962**, 2499.
(28) D. J. BELL, *J. Chem. Soc.*, **1936**, 859.
(29) E. MÜLLER e O. FRIEDBERGER, *Ber.*, **35**, 2552 (1902).
(30) P. A. LEVENE e A. L. RAYMOND, *J. Biol. Chem.*, **97**, 763 (1932).
(31) J. C. IRVINE e J. P. SCOTT, *J. Chem. Soc.*, **103**, 575 (1913).
(32) W. N. HAWORTH, *J. Chem. Soc.*, **107**, 8 (1915).