

CONTRIBUȚII LA STUDIUL DERIVAȚILOR BENZO-ALFA-PIRONICI DIN FLORILE DE ROBINIA PSEUDACACIA L.

dr. Doina *Albulescu*, dr. Madelena *Palade*, Marga *Dinut*

Adus în 1601 din America de Nord de Robin (19), salcîmul cunoaște astăzi o largă arie de răspîndire în Europa.

În țara noastră există plantații forestiere întinse, arboretul de salcîm din pădurea Piscu Turnuri, situată în lunca Dunării din apropierea Calafatului, fiind caracterizat ca cel mai frumos din continentul european (21).

Folosit mult în scopuri industriale, datorită lemnului său rezistent și elastic, apreciat de apicultori ca o plantă meliferă deosebit de valoroasă, Robinia pseudacacia L. a polarizat și interesul fitochimiștilor concretizat în precizări referitoare la compoziția chimică a scoarței și a florilor acestui arbore (7, 9, 20). Prezența a numeroase flavone în flori (9), (acacina, acacetintrioida, robinina, dihidrorobinetina), ne-a pus problema dacă alături de acești compuși benzo-gama-pironici n-ar putea coexista și derivați benzo-alfa-pironici, avînd în vedere faptul că în desfășurarea complexelor procese de biosintetizare a acestor două clase de compuși există puncte nodale comune și anume un același precursor, acidul shikimic, care trecînd prin faza de fenil alanină conduce direct la derivați cumarinici, iar prînd faza de tirozină la compuși flavonoidici (8, 13, 15).

Datele din literatura de specialitate atestă prezența derivaților cumarinici în numeroase specii din familia Leguminosae (1, 3, 4, 6, 9, 16). Ipoteza noastră de lucru, fundamentată pe cele două criterii, biogenetic și filogenetic, ne-a determinat să ne propunem identificarea cumarinelor în florile de salcîm și în funcție de rezultatele obținute în această etapă să determinăm cantitativ, să izolăm și să stabilim numărul, eventual natura derivaților benzo-alfa-pironici.

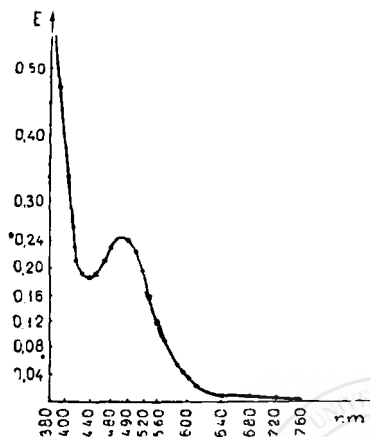


Fig. nr. 1: Curba de extincție a cumarinei
 (maxima de absorbție la fotocolorimetru
 Specol, filtru verde)

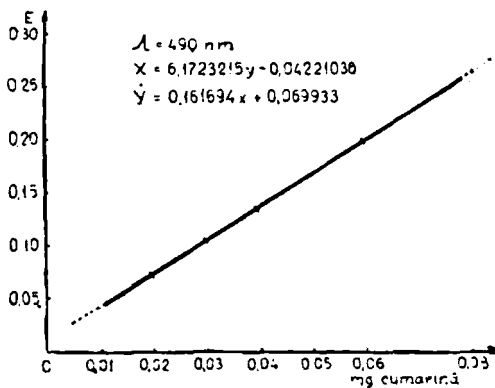
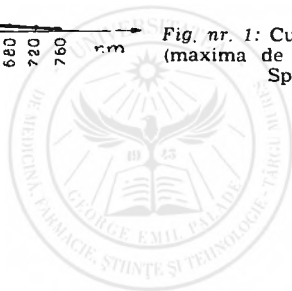
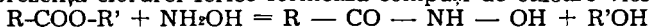


Fig. nr. 2: Curba de extincție
 a cumarinei (relația miligrame
 cumarină extincție, în baza
 calculului statistic din tabelul
 nr. 1)

1. Identificarea derivaților benzo-alfa-pironici

Dintre reacțiile chimice utilizate pentru decelarea derivaților cumarinici am întrebuițat reacția Feigl-Anger-Frehden (11), specifică inelului lactonic, al cărei principiu constă în transformarea esterilor acizilor carboxilici prin tratarea cu hidroxilamină și alcali în acizi hidroxamici care în prezența clorurei ferice formează compuși de culoare violetă.



Dintre reacțiile de culoare am utilizat, de asemenea, reacția cu p-nitroanilină diazotată, care în prezența derivaților cumarinici dă complecși de culoare roșie-smeurie (10, 17).

Cele două reacții fiind net pozitive am considerat util să verificăm aceste date printr-o determinare cantitativă a compușilor cumarinici, folosind o metodă fotocolorimetrică care se bazează pe colorimetrarea complexului rezultat din reacția derivaților cumarinici cu p-nitroanilina diazotată (10, 17).

2. Determinarea cantitativă a derivaților benzo-alfapironici

a) Determinarea maximei de absorbție a cumarinei

Dintr-o soluție de cumarină 0,004 g⁰/₁₀₀ în alcool de 10° s-a pipetat într-un balon cotat de 50 ml, 0,75 ml (0,03 mg cumarină) apoi s-au adăugat 5 ml soluție Na₂CO₃ 7⁰/₁₀₀. După încălzire în baia de apă 5 minute și răcire, s-au adăugat 5 ml sare de diazoniu, după o ușoară agitare soluția se colorează în roșu-smeuriu (14). Am completat cu apă distilată pînă la semn, pe urmă am determinat maxima de absorbție la fotocolorimetru Spekol (Carl-Zeiss-Jena D.D.R.) filtrul verde, cuve de 1 cm (fig. nr. 1).

b) Determinarea curbei etalon

În baloane cotate de 50 ml am pipetat cite 0,25, 0,50, 0,75, 1, 1,50, 2 ml soluție 0,004 g⁰/₁₀₀ cumarină în alcool de 10° care corespunde la 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,06, 0,08 mg cumarină, aplicînd în continuare tehnica utilizată pentru determinarea maximei de absorbție. Valoarea extincțiilor în funcție de concentrație ne-a ajutat la stabilirea curbei etalon de extincție a cumarinei. În vederea reproductibilității acestei curbe, am aplicat calculul statistic (2,18). (Tabelul nr. 1, fig. nr. 2).

c) Determinarea cantitativă a derivaților benzo-alfa-pironici

Pentru determinarea cantitativă a derivaților cumarinici am preparat soluții extractive purificate.

Trei probe de cite 3 g din florile plantei studiate, sub formă de pulbere fină, uscate la etuvă la 37°C pînă la pondere constată, au fost triturate în piuliță cu nisip de cuarț (3 g) și 7 ml apă distilată. După triturare, probele s-au menținut la 40°C timp de o oră, apoi s-a adăugat în citeva porțiuni amestec de 5 ml alcool și 10 ml eter etilic. S-a repetat operația de cinci ori, pînă cînd proba n-a mai prezentat fluorescență. S-a lăsat soluția extractivă în repaos 24 de ore la temperatura camerei pentru evaporarea eterului, apoi s-a adăugat cite un volum egal de apă distilată și 5 ml acetat de plumb soluție 20⁰/₁₀₀ pentru precipitarea o-dihidroxifenolilor. Derivații cumarinici nu precipită în prezența ionului plumb. După centrifugarea probelor, în continuare s-a îndepărtat din soluție excesul de plumb cu acid sulfuric 0,05 N, centrifugînd apoi din nou. Soluțiile obținute s-au introdus în baloane cotate de 100 ml și s-au completat pînă la

Tabelul nr. 1
Calculul statistic al curbei pentru cumarină

Nr.	x mg/ml	x ²	y	y ²	xy	x+y	(x+y) ²
1.	0,20	0,04	0,0393	0,001544	0,007860	0,2393	0,05726449
2.	0,40	0,16	0,717	0,005140	0,028680	0,4717	0,22250089
3.	0,60	0,36	0,1046	0,100941	0,062760	0,7046	0,49646116
4.	0,80	0,64	0,1350	0,018225	0,108000	0,9350	0,87422500
5.	1,20	1,44	0,2030	0,041209	0,243600	1,4030	1,96720900
6.	1,60	2,56	0,2650	0,070225	0,424000	1,8650	3,47822500
7.	4,80	5,20	0,8186	0,147285	0,874900	5,6186	7,09588554

$$\bar{x} = 0,8$$

$$\bar{y} = 0,1364$$

$$\bar{x} = 0,47609$$

$$\bar{y} = 0,077055$$

$$r = 0,999$$

$$x = 6,1723215 \quad y = 0,04221036$$

$$y = 0,161694 \quad x + 0,069933$$

semn cu H₂SO₄ 0,05 N. După agitare probele s-au introdus într-o baie de apă încălzită la 70°C, menținându-se 30 de minute, apoi s-au răcit la temperatura camerei și s-au filtrat cantitativ. Din aceste soluții s-au luat câte 5 ml s-au adus în baloane cotate de 50 de ml, adăugându-se apoi câte 5 ml Na₂CO₃ 7%. Astfel pregătite baloanele s-au încălzit 5 minute la 85°C în baia de apă în fierbere. După răcire la temperatura camerei s-au adăugat 5 ml H₂SO₄ 0,05 N și 5 ml sare de diazoniu. Baloanele cu probele de analizat s-au completat cu apă distilată pînă la 50 ml și s-au colorimetrat la fotocolorimetrul Spekol, filtrul verde și cuve de 1 cm, probe în diluție de 1/4. Ca lichid de compensație am folosit probe martor preparate în aceleași condiții dar fără a mai adăuga sare de diazoniu.

Rezultatele obținute prin interpolarea extincțiilor pe curba etalon a cumarinei sînt redată în tabelul nr. 2.

Tabelul nr. 2

Organul vegetal	Extincția	g% derivați cumarinici
Flori	0,155	0,240
	0,1587	0,244

3. Izolarea derivaților benzo-alfa-pironici

Rezultatele dozării ne-au determinat să ne orientăm în continuare studiul asupra izolării derivaților cumarinici, folosind următoarea metodă (5, 11).

200 g produs vegetal uscat și mărunțit (IV) s-a supus extracției de 3 ori cu câte 200 ml HCl 5 N pe baia de apă în fierbere timp de 30 de minute. Soluțiile extractive apoase, reunite, s-au extras cu un amestec de eter-cloroform (3:1) pînă la reacția Feigl-Anger-Frehden negativă. Soluția etero-cloroformică menținută pe Na₂SO₄ sicc. s-a supus distilării, iar rezidu-

duul s-a luat cu mici cantități de apă distilată fierbinte. Soluția apoasă s-a purificat prin defecare cu soluție acetat de plumb 20%. Precipitatul s-a îndepărtat prin centrifugare, iar excesul de plumb s-a eliminat cu acid sulfuric 0,06 N, centrifugând din nou. Soluția apoasă după neutralizare cu Na_2CO_3 s-a epuizat din nou cu amestec eter-cloroform (3:1) până când reacția Feigl-Anger-Frehden a fost negativă. Soluția eterocloroformică după menținerea pe NA_2SO_4 sicc. s-a supus distilării. S-a obținut un reziduu cristalizat cu miros plăcut în cantitate de 0,776 g care s-a supus analizei cromatografice.

4. Separarea și identificarea cromatografică a derivaților benzo-alfa-pironici

S-au analizat cromatografic o soluție extractivă purificată și reziduu cristalizat, utilizând ca substanțe de referință esculetul și umbeliferona.

Soluția extractivă s-a obținut din 4 g produs vegetal pulverizat (IV) care s-a hidrolizat cu acid clorhidric 5N timp de 30 de minute. După răcire, soluția apoasă acidă s-a extras cu un amestec de eter-cloroform (2:1 v/v) până la reacția Feigl-Anger-Frehden negativă. După îndepărtarea solventului sub presiune redusă s-a reluat reziduu cu 5 ml acetonă, soluția acetonică rezultată prin filtrare, fiind analizată cromatografic paralel cu soluția acetonică a reziduuului cristalizat și a celor două substanțe etalon. Condițiile de lucru au fost următoarele (12):

Faza fixă: silicagel G Merck-celuloză (1:1);

Faza mobilă: toluen, acetat de etil, acid formic (5:4:1, v/v);

Developarea pe un parcurs de 17 cm;

Examinare la U.V. și după revelare cu sare de diazoniu.

După revelare cu sare de diazoniu, spectrul cromatografic evidențiază prezența a cinci spoturi de culoare roșie-violetă pentru soluția extractivă purificată (R_f -uri = 0,68; 0,85; 0,88; 0,90; 0,97), la reziduu cristalizat fiind puse în evidență trei spoturi (R_f -uri = 0,60; 0,62; 0,68). Spotul cu R_f -ul 0,68 foarte apropiat ca valoare de R_f -ul umbeliferonei (0,67) ne determină să presupunem prezența acesteia în florile de salcîm. Esculetul (R_f -ul = 0,08) este absent.

Concluzii

Studiul derivaților benzo-alfa-pironici din florile de Robinia pseudacacia L. orientat după criterii biogenetice și filogenetice s-a concretizat în următoarele:

1) Punerea în evidență a derivaților cumarinici prin reacția Feigl-Anger-Frehden;

2) determinarea cantitativă a acestor compuși printr-o metodă fotocolorimetrică menționată în literatura de specialitate, conținutul procentual fiind de 0,240—0,244 g;

3) obținerea unui reziduu cristalizat cu un randament de 0,388 g% care analizat prin cromatografie în strat subțire pune în evidență trei spoturi revelabile cu sarea de diazoniu, dintre care unul cu R_f -ul 0,68 foarte apropiat de cel al umbeliferonei (0,67).

Sosit la redacție: 13 martie 1974.

Bibliografie

1. Arora N. D., Arora S. K., Lodhi G. P.: Haryana Agr. Univ. J. Res. (1971), 1, 1, 97 (cit. C. A. (1972), 76, 9, 43963; 2. Batumer L. M., Pozin M. E.: Metoda matematică în tehnică, Ed. tehnică, București, 486; 3. Bodea C.: Tratat de biochimie vegetală, Ed. Acad. R.S.R., București 1964, 1, 717; 1965, 2, 850; 4. Claus E. P., Tyler V. E.: Pharmacognosy. Ed. 5, Ed. Febiger, Philadelphia, 1965, 145; 5. Constantinescu E. și colab.: Farmacia (1969), 17, 10, 591; 6. Farnsworth R. N.: J. Pharm. Sci. (1966), 55, 3, 265; 7. Gildemeister E., Hoffman F. R.: Die Äterischen Öle. Ed. Academie, Berlin, 1959, 5, 340; 8. Grigorescu E.: Farmacia (1968), 16, 10, 583; 9. Karrer W.: Konstitution und Vorkommen der organische Pflanzenstoffe, Ed. Birkhäuser, Stuttgart, 1958, 1458; 10. Mavrodin Al. și colab.: Lucrări practice de chimie organică, I.M.F. București, 1963, 196; 11. Paech K., Tracey M. V.: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Ed. Springer, Berlin, 1955, 2, 583; 12. Palade Madelena: Teză de doctorat, I.M.F. București, 1973; 13. Pișlărașu Nadejdea: Teză de doctorat, I.M.F. București, 1970; 14. Pișlărașu Nadejdea, Ababii Raisa: Farmacia (1973), 21, 10, 625; 15. Soine T. O.: J. of Pharm. Sci. (1964), 53, 3, 231; 16. Sommer Lia, Mihele Denisa: Farmacia (1969), 17, 2, 65; 17. Sulma T., Wierzchowska K.: Acta Polonica Pharmaceutica (1963), 20, 1, 77; 18. Steinbach M.: Calculul statistic în medicină și biologie, Ed. Acad. R.S.R., București, 1961, 233; 19. Tschirch A.: Handbuch der Pharmakognosie, Ed. Tauchnitz, Leipzig, 1925, 3, 753; 20. Wehmer C.: Die Pflanzenstoffe, Ed. Fischer, Berlin, 1925, 1, 545; 21. * * * Flora R.S.R., Ed. Acad. R.S.R., București, 1957, 5, 245.
-