

3- α -(2-O- β -D-glucopiranosil)-D-glucofuranoside della quercetina: nuovo glucoside flavonico della *Vestia lycioides*

SILVIA ERAZO GIUFFRA (*), CORRADO GALEFFI, M. AMALIA CIASCA RENDINA
e ELISABETTA MIRANDA DELLE MONACHE

Laboratori di Chimica Biologica

Riassunto. — Dalle foglie di *Vestia lycioides* è stato isolato, accanto alla isoquercitrina, un nuovo glucoside flavonico, il quercetin-3- α -(2-O- β -D-glucopiranosil)-D-glucofuranoside. Il punto di attacco tra i due residui di glucosi è stato dedotto dall'ottenimento per idrolisi di soforosio (2-O- β -D-glucopiranosil-D-glucosio), mentre la natura furanica ed il tipo di legame α del glucosio legato alla quercetina è stato dedotto dalle caratteristiche RMN dell'idrogeno anomero corrispondente e dal comportamento verso gli enzimi.

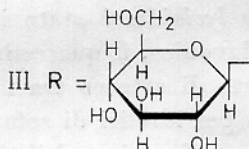
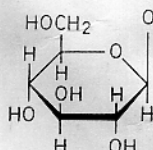
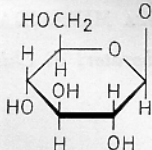
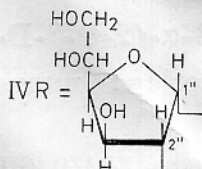
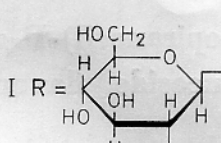
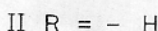
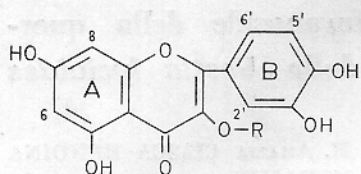
Summary (*Quercetin-3- α -(2-O- β -D-glucopyranosyl)-D-glucofuranoside, a new glycoside of Vestia lycioides*). — A new flavonol glycoside, the quercetin-3- α -(2-O- β -D-glucopyranosyl)-D-glucofuranoside, has been isolated from the leaves of *Vestia lycioides*.

By the NMR spectrum of the corresponding acetate the α furanosydic structure of the glucose bound to quercetin has been determined. By partial hydrolysis sophorose, (2-O- β -D-glucopyranosyl)-D-glucose, has been obtained.

Dalle foglie di *Sorbus aucuparia edulis* Dieck (NÜRNBERG, 1964), dai fiori di *Hibiscus* (MAKHSUDOVA, PAKUDINA & SADYKOV, 1967) e dai fiori di *Solanum tuberosum* (HÖRHAMMER *et al.*, 1968) è stato isolato il 3- β -(2-O- β -D-glucopiranosil)-D-glucopiranoside della quercetina (I) del quale è stata effettuata la sintesi (WAGNER *et al.*, 1968) a partire dalla 7,4'-dibenzil-quercetina e dall'acetobromo-soforosio.

(*) Borsista dell'Istituto Superiore di Sanità dall' Universidad Tecnica « Federico Santa Maria », Valparaiso (Chile).

Vari AA. (BIRKOFER & KAISER, 1962; PAKUDINA & SADYKOV, 1964; SOSA & PERCHERON, 1965) inoltre, descrivono il ritrovamento in varie piante del 3- β -soforoside della quercetina senza precisare se il glucosio legato alla quercetina (II) presenti struttura furanica o piranica.



Da una Solanacea sudamericana, la *Vestia lycioides*, alla quale si attribuiscono proprietà antipiretiche, febrifughe e vermifughe (MUÑOZ PIZARRO, 1959) abbiamo isolato, accanto alla isoquercitrina (III), una sostanza isomera della (I) nella quale abbiamo dimostrato che il glucosio legato alla quercetina presenta la struttura α -furanosidica (IV) anziché β -piranosidica. L'estratto metanolico delle foglie di questa pianta, dopo separazione della frazione alcaloidea, rivela la presenza di due glucosidi flavonici (Rf 0,67 e 0,48 in n-butanolo-acido acetico-acqua 4 : 1 : 5, carta Whatman 1, reattivo difenilborato di β -amminoetile) che si separano facilmente per ripartizione in controcorrente tra acetato di etile-n-butanolo-acqua. Il più mobile (Rf 0,67) fornisce, per idrolisi con β -glucosidasi, quercetina e glucosio ed è stato identificato, in base agli spettri UV ed agli spettri RMN dell'acetato, come quercetina-3-O- β -D-glucopiranoside o isoquercitrina (III).

Il secondo (Rf 0,48) cristallizza da acqua (p.f. 201-2°), ed ha una formula che corrisponde abbastanza bene a quella di un diglucoside idrato $C_{27}H_{30}O_{17} \cdot H_2O$; fornisce anch'esso per idrolisi acida (H_2SO_4 N) quercetina e glucosio; per idrolisi con acidi molto diluiti (H_2SO_4 0,025 N) fornisce, accanto a quercetina e piccole quantità di glucosio, un bioso (Rf 0,1 in n-butanolo-acido acetico-acqua 4 : 1 : 5, carta Whatman 1) che reagisce con cloruro di trifeniltetrazolio (WALLENFELS, 1950) e con fosfato di difenilammina più anilina (BUCHAN & SAVAGE, 1952), ma non con ftalato di anilina. Questo comportamento, come pure il confronto del punto di fusione e del potere

rotatorio del bioso in esame e dei corrispondenti α - e β -ottoacetati, permette di identificare lo zucchero come soforosio (2-O- β -D-glucopiranosil-D-glucosio) (RABATÈ, 1940). Il soforosio è unito all'ossidrile in 3 della quercetina come risulta dalle modificazioni dello spettro UV in etanolo con $AlCl_3$, CH_3COONa , H_3BO_3 e C_2H_5ONa (GEISSMANN, 1962).

Il glucoside della *Vestia lycioides* è però, come abbiamo già detto, diverso da quello naturale sinora isolato in altre piante, come risulta dal comportamento enzimatico e dagli spettri RMN degli acetati corrispondenti (*) che presentano identica la parte aromatica, ma nettamente diversa la zona dei protoni glucidici e degli acetili. Infatti, mentre in (I) il glucosio legato alla quercetina ha la struttura β per la facile idrolisi con emulsina (NÜRNBERG, 1964), in (IV) il comportamento rispetto agli enzimi (formazione di quercetina con α -e non con β -glucosidasi) da un lato e lo spostamento chimico e la costante di accoppiamento dell'idrogeno anomero corrispondente dall'altro (vedi appresso), fanno ammettere che il glucosio legato alla quercetina abbia la struttura α -furanosidica.

L'esame dettagliato dello spettro RMN dell'acetato di (IV) conferma la struttura di quercetin-3-soforoside. Infatti la zona aromatica è identica a quella della quercetina acetato (vedi parte sperimentale) (TIRA, GALEFFI & MIRANDA DELLE MONACHE, 1969) salvo il *deshielding* dei protoni in 2' e 6' dell'anello B (δ 7,91 e 7,80 contro 7,60 e 7,62 ppm rispettivamente). Questo fenomeno, come pure la forma netta di doppietto (vedi appresso) del protone anomero del glucosio legato alla quercetina causato dalla limitata rotazione dello zucchero (MABRY, MARKHAN & THOMAS, 1970), confermano l'unione del soforosio con l'ossidrile in 3 della quercetina. Dei protoni della parte glucidica della molecola il preciso doppietto che compare a campi minori a 5,85 ppm ($J = 7,5$ cps.) spetta al protone anomero del glucosio legato alla quercetina. Il suo accoppiamento con un protone su un carbonio senza acetossili a 3,93 ppm conferma il legame 1-2 tra le due molecole di glucosio.

Rispetto al segnale RMN del protone anomero degli acetati di alcuni 3- β -D-glucopiranosidi della quercetina (acetil (I) δ 5,35 ppm, $J = 8$ cps e acetilrutina 5,37 ppm, $J = 8$ cps) il segnale corrispondente dell'acetato di (IV) è da campi minori (5,85 ppm). Si deve quindi escludere per esso la struttura β -piranosidica compatibile con la costante di accoppiamento osservata ($J = 7,5$ cps) e con la conformazione C_1 comune ai glucopiranosidi (RAO & FOSTER, 1963; 1965) come pure al α -ottoacetato del soforosio (O-C-HOAc 6,30 ppm, $J = 4,5$ cps, accoppiamento equatoriale-assiale) e

(*) Ringraziamo il prof. L. Farkas per averci fornito il campione di 3- β -(2-O- β -D-glucopiranosil-) D-glucopiranoside della quercetina naturale. Lo spettro RMN dell'acetato corrispondente è stato registrato con il timer averaging su mg 0,8 di sostanza.

al β -ottoacetato del soforosio ($O-\overset{1}{\text{C}}\text{H}-\text{OAc}$ 5,66 ppm, $J = 8$ cps, accoppiamento assiale-assiale).

La struttura β -piranosidica per il glucosio legato alla quercetina si deve escludere anche in base al comportamento di (IV) riguardo agli enzimi (formazione di quercetina con α -e non con β -glucosidasi). Parimenti, per il valore elevato della costante di accoppiamento dell'idrogeno anomero, si deve escludere per lo stesso glucosio, sempre nella conformazione C_1 , la struttura α -piranosidica.

Si deve quindi ammettere per il glucosio legato alla quercetina la struttura furanosidica con legame α .

A conferma di questo, lo spostamento chimico dell'idrogeno anomero dell'acetil (IV) rispetto all'acetil (I) (0,50 ppm) è identico a quello del metil- α -furanoside rispetto al metil- β -piranoside del D-glucosio (0,50 ppm) (CAPON & THACKER, 1964).

Il valore della costante di accoppiamento dell'idrogeno anomero dell'acetil (IV), elevato come in altri α -furanosidi (LEMIEUX, 1961), corrisponde all'angolo diedro $\text{H}-\text{C}_{1'}-\text{C}_{2'}-\text{H}$ di circa 23° con l'equazione di Karplus modificata (HALL, 1963).

Nulla si può dire della conformazione «envelope» o «half chair» (JARDETZKY, 1962), dell'anello furanico per la difficoltà di determinazione delle altre costanti di accoppiamento con la doppia risonanza a causa della sovrapposizione dei segnali dei due glucosidi del soforosio.

PARTE SPERIMENTALE

La *Vestia lycioides* è stata raccolta in Cile nei dintorni di Valparaiso. Per l'estrazione dei composti flavonici sono state utilizzate le foglie perché più ricche rispetto alle altre parti della pianta.

Le cromatografie su carta sono state realizzate su carta Whatman N. 1, eluente n-butanolo-acido acetico-acqua 4 : 1 : 5. Come rivelatore degli zuccheri si è usato, salvo diversa indicazione, ftalato di anilina. Per i composti flavonici, evidenziabili già con luce UV, si è usato come rivelatore il reattivo di Benedict o il β -ammino-etil-difenilborato Fluka (1% in MeOH). Gli spettri RMN sono stati registrati con il Varian HA 100 (solvente deuterocloroformio, riferimento interno tetrametilsilano). I poteri rotatori sono stati determinati con l'apparecchio Cary 60 a λ 589 nm.

Estrazione e separazione

Le foglie triturate sono state esaurite con metanolo per una notte. L'operazione è stata ripetuta altre due volte e gli estratti metanolici riuniti sono stati concentrati nel vuoto: il residuo ammonta al 10% circa delle foglie fresche. 10 g di questo materiale è stato ripartito in controcorrente in

apparecchio di Craig (200 stadi, v 10:10) tra cloroformio-acetato di etile (7:3) e tampone fosfato 1/15M a pH 3,5 con un tempo di decantazione di oltre 10 min a causa delle emulsioni.

Dopo 200 trasferimenti la frazione alcaloidica è compresa tra le frazioni 175 e 198 (reattivo di Dragendorff). Le frazioni tra 50 e 170 di colore giallo, emulsionate in parte, e che contengono parzialmente separati due composti flavonici, sono riunite, la parte organica è separata, mentre la fase acquosa è estratta tre volte con 500 ml di n-butanolo.

Le fasi organiche riunite sono concentrate nel vuoto ed il residuo, che ammonta a g 5,5 è frazionato al Craig tra acetato di etile ed acqua.

Dopo 200 trasferimenti una frazione cromatograficamente unitaria (Rf 0,67) è raccolta tra i tubi 120 e 160 (frazione A) mentre l'altra frazione flavonica compresa tra i tubi 1 e 10 viene purificata con una diversa fase superiore (n-butanolo-acetato di etile 1:1). Dopo 160 passaggi si raccoglie tra i tubi 80 e 120 la frazione anzidetta cromatograficamente unitaria (Rf 0,48) (Frazione B).

Frazione A.

3- β -D-glucopiranoside della quercetina = isoquercitrina (III). Cristallizza da acqua (g 0,3), p.f. 221-2°.

λ_{\max} in EtOH 363 e 261; + AcONa 375 e 269; + H₃BO₃ 390 e 265; + AlCl₃ 430, 368 e 276; + EtONa 418 e 278 nm.

Idrolisi: 40 mg in 20 ml di tampone acido citrico-fosfato bisodico a pH 5,5 con 10 mg di β -glucosidasi Fluka sono tenuti a 30°C per 12 h.

Il flavone che precipita viene centrifugato, lavato con acqua, seccato ed acetilato con piridina ed anidride acetica. L'acetato, cristallizzato da etanolo, non presenta depressione in miscela con la pentaacetilquercetina (p.f. 197-200°). Lo zucchero contenuto nella fase acquosa, dopo estrazione con acetato di etile della quercetina residua, è identificato per cromatografia su carta come glucosio.

Acetilazione della frazione A.

100 mg di frazione A sono acetilati con piridina ed anidride acetica. Dopo 24 ore i reagenti vengono eliminati nel vuoto spinto ed il residuo è purificato in colonna di silice, solvente cloroformio-acetato di etile 7:3. L'acetato cristallizza da etanolo, p.f. 170-172°.

L'ottoacetato della isoquercitrina ha p. f. 170,5-171,5°C (WEINGES, BÄHR & KLOSS, 1968).

Frazione B.

3- α -(2-O- β -D-glucopiranosil)-D-glucofuranoside della quercetina (IV). Cristallizza in prismi irregolari da etanolo-acetato di etile con un largo intervallo del p.f.; dopo ripetute cristallizzazioni da acqua ha p.f. 201-202°.

$[\alpha]_D^{20} = -27^\circ$ in EtOH 90 % $c = 1,7$; λ_{\max} in EtOH 360 ($\log \varepsilon 4,27$) e 260 ($\log \varepsilon 4,16$); + AcONa 365 e 272; + H_3BO_3 385 e 265; + $AlCl_3$ 420 e 275; + EtONa 415 e 275 nm.

Analisi

	trov. % : C 50,06; H 4,62
per $C_{27}H_{30}O_{17} \cdot H_2O$	calc. : C 50,31; H 5,00

Idrolisi totale: 100 mg di glucoside sono scaldati per 1h a b.m. bollente con 30 ml di H_2SO_4 N. La soluzione acquosa viene quindi estratta con acetato di etile, la fase organica viene separata, lavata con acqua, evaporata ed il residuo viene acetilato. L'acetato, dopo due cristallizzazioni da etanolo, non presenta depressione alla fusione in miscela con un campione di pentaacetilquercetina (p.f. 197-200°). Nella fase acquosa precedente, neutralizzata con carbonato di bario, filtrata ed opportunamente concentrata si identifica, per cromatografia su carta, il glucosio.

Idrolisi parziale: si fa bollire a ricadere una soluzione di 500 mg del glucoside in esame in 100 ml di H_2SO_4 0,025 N. Dopo 2h la sostanza di partenza è quasi scomparsa; la soluzione si estrae con acetato di etile e nella fase organica si identifica, come nel procedimento precedente, la quercetina. La fase acquosa si neutralizza con carbonato di bario, si filtra e si concentra nel vuoto a piccolo volume. Il residuo si purifica per colonna di celite n. 535-carbone 1 : 1 con acqua a percentuale crescente di etanolo (CLANCY, 1970). Il bioso, che si eluisce dopo il glucosio, ha Rf 0,1 e non è rivelabile su carta con ftalato di anilina mentre si rivela con cloruro di trifeniltetrazolio (WALLENFELS, 1950) e con fosfato di difenilammina ed anilina (BUCHAN & SAVAGE, 1952). Questo suggerisce l'identità col soforosio (RABATÈ, 1940).

β -Ottoacetato del bioso.

Il residuo dell'evaporazione (mg 120) viene acetilato con anidride acetica ed acetato sodico secondo il procedimento descritto per il β -ottoacetilsoforosio (RABATÈ, 1940). Il prodotto si purifica dal poco pentaacetilglucosio in colonna di silice, solvente cloroformio-cicloesano 8 : 2 e si cristallizza da etanolo, p. f. 190-192°; $[\alpha]_D^{20} = -2,6$ in $CHCl_3$ $c = 1,2$.

Il segnale RMN dell'idrogeno anomero $O-\underline{C}H-OAc$ è un doppietto a 5,66 ppm, $J = 8$ cps.

Il β -ottoacetilsoforosio ha p.f. 192° e $[\alpha]_D^{20} = -2,8$ in $CHCl_3$ (RABATÈ, 1940). Per saponificazione dei gruppi acetilici con etilato sodico (FREUDENBERG, 1936) si ottiene il bioso libero il cui potere rotatorio dopo mutarotazione $[\alpha]_D^{20} = +20 \pm 3$, $c = 0,9$ (in acqua) è in buon accordo con quello del soforosio $[\alpha]_D^{20} = +18,6$ (RABATÈ, 1940).

α -Ottoacetato del bioso.

Il bioso viene acetilato con anidride acetica ed acido solforico secondo quanto descritto per l' α -ottoacetilsoforosio (RABATÈ, 1940) ed ha p.f. 110-111°. Il segnale dell'idrogeno anomeroico OCHAc è un doppietto a 6,30 ppm, $J = 4,5$ cps.

Il punto di fusione dell'ottoacetato del soforosio è 110-111° (RABATÈ, 1940).

Idrolisi con maltasi (α -glucosidasi).

10 mg di glucoside (IV) sciolti in 5 ml di tampone fosfato a pH 6,5 sono tenuti a 30-35° con 4 mg di maltasi di lievito (Light). Dopo 48h l'idrolisi non è ancora completa ma si identificano cromatograficamente la quercetina (confermata dopo estrazione con acetato di etile come pentaacetato) ed il soforosio (Rf 0,1, reazione positiva con cloruro di trifeniltetrazolio e negativa con ftalato di anilina); il glucosio risulta totalmente assente. Nelle stesse condizioni di idrolisi, ma senza maltasi, il glucoside resta inalterato. La specificità della maltasi usata come α -glucosidasi è provata dalla mancata idrolisi della isoquercitrina (III) (3- β -D-glucopiranoside della quercetina).

Idrolisi con β -glucosidasi.

Una soluzione di 10 mg di glucoside (IV) e di 5 mg di β -glucosidasi Fluka in 2 ml di tampone acido citrico-fosfato bisodico a pH 5,5 coperta con due gocce di toluolo è esaminata cromatograficamente nel giro di 15 giorni.

L'idrolisi procede lentamente con formazione di glucosio ma senza alcuna traccia nè di quercetina nè di soforosio.

Nelle stesse condizioni la isoquercitrina (3- β -D-glucopiranoside della quercetina) (III) si idrolizza rapidamente.

Acetilazione della frazione B (IV).

250 mg di frazione B sono acetilati con 6 ml di piridina e 6 ml di anidride acetica. Dopo una notte si evaporano i reattivi con vuoto spinto a t.a. ed il residuo si purifica per colonna di silice, solvente cloroformio-acetato di etile 7:3. L'acetato non cristallizza e si precipita da acetato di etile con cicloesano.

Analisi	trov. % : C 54,55 ; H 4,09
per $\text{C}_{49}\text{H}_{52}\text{O}_{28}$	calc. : C 54,05 ; H 4,81

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -22,8 \text{ in } \text{CHCl}_3 \text{ (c = 1,1)}.$$

I segnali RMN più significativi ai fini del chiarimento della struttura sono i seguenti: δ_6 6,80 (d), δ_8 7,25 ppm (d) $J_{6,8}$ 2,5 cps; δ_2 7,91 (d), δ_3 7,30 (d), δ_6 7,80 (q) ppm, $J_{2,6}$ 2 cps, $J_{5,6}$ 9 cps; 4 acetili singoletti della parte flavonica tra 2,30 e 2,41 ppm e 7 acetili singoletti della parte

glucidica tra 1,88 e 2,08 ppm, doppietto a 5,85 ppm $J = 7,5$ cps dovuto al protone anomero del glucosio legato alla quercetina. Nella pentaacetilquercetina i segnali aromatici sono: δ_6 6,77 (d), δ_8 7,23 (d), $\delta_{2'}$ 7,60 (d), d_5 7,25 (d), d_6 7,62 ppm (q) (TIRA, GALEFFI & MIRANDA DELLE MONACHE, 1969).

Acetilazione del 3- β (2-O- β -D-glucopiranosil)-D-glucopiranoside della quercetina.

La sostanza viene acetilata come descritto per la frazione B. Data la esigua quantità di sostanza, lo spettro RMN è stato registrato con il *timer averaging* su mg 0,8. I segnali della zona aromatica sono identici a quelli dell'acetato di (IV) mentre i segnali dei protoni glucidici e degli acetili sono nettamente diversi.

Il segnale del protone anomero legato alla quercetina compare come doppietto a 5,35 ppm, $J = 8$ cps.

Gli Autori ringraziano il sig. G. Conti per la registrazione degli spettri RMN con l'apparecchio Varian HA 100 ed il sig. G. Del Guercio per le misure dei poteri rotatori con l'apparecchio Cary 60.

Ricevuto il 17 marzo 1971.

Accettato il 15 luglio 1971.

BIBLIOGRAFIA

- BIRKOFER, L. & C. KAISER, 1962. *Z. Naturforsch.*, **17** b, 359.
 BUCHAN, J. L. & R. I. SAVAGE, 1952. *Analyst*, **77**, 401.
 CAPON, B. & D. THACKER, 1964. *Proc. Chem. Soc.*, 369.
 CLANCY, M. J., 1960. *J. Chem. Soc.*, 4213.
 FREUDENBERG, K. & K. SOFF, 1936. *Chem. Ber.*, **69**, 1245.
 GEISSMANN, T. A., 1962. *The chemistry of flavonoid compounds*, Pergamon Press, cap. 5.
 HALL, L. D., 1963. *Chem. Ind. (London)*, 950.
 HÖRHAMMER, L., H. WAGNER, H. G. ARNDT, R. DIRSCHERL & L. FARKAS, 1968. *Chem. Ber.*, **101**, 450.
 JARDETZKY, C. D. 1962. *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 62.
 LEMIEUX, R. U. 1961. *Can. J. Chem.*, **39**, 116.
 MABRY, T. J., K. R. MARKHAM & M. B. THOMAS, 1970. *The systematic identification of flavonoids*, Springer Verlag, cap. VIII, p. 269.
 MAKHSUDOVA, B., E. P. PAKUDINA & A. S. SADYKOV, 1967. *Khim. Prir. Soedin*, **3**, 346.
 MUÑOZ PIZARRO, C., 1959. *Sinopsis de la flora chilena*, ed. Univ. Chile.
 NÜRNBERG, H., 1964. *Pharmazie*, **19**, 476.
 PAKUDINA, Z. P. & A. S. SADYKOV, 1964. *Dokl. Akad. Nauk. Uz. SSR*, **21**, (9) 30.
 RABATÈ, J., 1940. *Bull. Soc. Chim. France*, VII, 565.
 RAO, V. S. R. & J. FOSTER, 1963. *J. Phys. Chem.*, **67**, 951.
 RAO, V. S. R. & J. FOSTER, 1965. *J. Phys. Chem.*, **69**, 636.
 SOSA, F. & F. PERCHERON, 1965. *Compt. Rend.*, **261**, 4544.
 TIRA, S., C. GALEFFI & E. MIRANDA DELLE MONACHE, 1969. *Ann. Chim. (Rome)* **59**, 284.
 WAGNER, H., L. HÖRHAMMER, R. DIRSCHERL, L. FARKAS & M. NOGRADI, 1968. *Chem. Ber.*, **101**, 1186.
 WALLENFELS, K., 1950. *Naturwissenschaften*, **37**, 491.
 WEINGES, K., W. BÄHR & P. KLOSS, 1968. *Arzneimittel-Forsch.*, **18**, 539.