

**ATTI**  
**DELLA**  
**SOCIETÀ DEI NATURALISTI**  
**E MATEMATICI**  
**DI MODENA**

---

**Vol. LXXVII**  
**(XXIV della Serie VI)**

---

**MODENA**  
**SOCIETÀ TIPOGRAFICA MODENESE**  
**ANTICA TIPOGRAFIA SOLIANI**

---

**1946**

## CONSIGLIO DI PRESIDENZA

PER IL BIENNIO 1946-1947

|                       |                                                    |
|-----------------------|----------------------------------------------------|
| <i>Presidente</i>     | NEGODI prof. GIORGIO                               |
| <i>Vicepresidenti</i> | { GALLITELLI prof. PAOLO<br>PIERUCCI prof. MARIANO |
| <i>Segretario</i>     | PASQUINI dott. DIEGO                               |
| <i>Cassiere</i>       | AGGAZZOTTI prof. ALBERTO                           |
| <i>Archivista</i>     | CHIOSSI dott. ELSA                                 |

## COMITATO DI REDAZIONE DEGLI « ATTI »

IL PRESIDENTE

I VICE-PRESIDENTI

AGOSTINELLI prof. CATALDO

BERLINGOZZI prof. SERGIO

MONTANARO-GALLITELLI prof. EUGENIA

RODOLICO prof. FRANCESCO

## Sulle variazioni di colore degli antociani e sul loro impiego come indicatori (\*)

1.° — L'infinita polieromia dei fiori e di altre parti delle piante è dovuta a numerose classi di pigmenti, quali gli antociani, le antoxantine, i catecoli, le clorofille, i carotinoidi. Nella determinazione del colore dei fiori una parte preponderante l'hanno le antocianine, alle quali abbiamo dedicato l'attuale studio. Il numero relativamente esiguo di antocianine rispetto all'estrema varietà del colore dei fiori, nonchè la formazione di certi colori nei fiori, che le antocianine presentano in vitro solo in condizioni incompatibili con l'esistenza delle piante e non riscontrabili in esse, rendono ancora in parte oscura la genesi del colore dei fiori. Tra i fattori più importanti capaci di modificare il colore dei fiori abbiamo: 1) la coesistenza di pigmenti appartenenti a classi differenti, quali antoxantine, carotinoidi e clorofille (1); 2) la presenza di copigmenti o sostanze capaci di modificare in maniera più o meno specifica il colore degli antociani e che appartengono ai flavoni e flavonoli, ac. tannico e derivati (48, 29, 16); 3) la reazione del mezzo nel quale si trovano disciolti gli antociani (14); 4) la presenza di Fe nelle cellule vegetali (30); 5) lo stato molecolardisperso, cristallino o colloidale (30). I pigmenti differenti qualora esistano nel medesimo tessuto agiscono in maniera additiva e così forse pure alcuni copigmenti, quando non hanno stretta specificità (16). Anche a seconda dello stato di dispersione, aggregazione o adsorbimento a colloidi il colore degli antociani può variare. Allo stato cristallino (sferocristalli) (9) hanno un colore generalmente più cupo che allo stato di dispersione moleco-

(1) Ringrazio vivamente il Dott. DINO COPPINI, Assistente nell'Istituto di Chimica Farmaceutica, per il suo valido e disinteressato concorso nell'allestimento del materiale sperimentale e strumentale. Sono vivamente spiacente che per ragioni sue personali estrinseche dalla volontà di entrambi, abbia dovuto interrompere la sua valida collaborazione nell'esecuzione del presente lavoro.

(\*) Dall'Istituto di Fisiologia dell'Università di Modena diretto dal prof. A. Aggazzotti.

lare e nella medesima cellula in fasi funzionali e periodi differenti si può passare da uno stato all'altro (18) e pure a quello di adsorbimento su colloidi, che possono anche essere rappresentati da polisaccaridi (30) o tannini (9) o pectine (9).

Nel presente studio abbiamo avuto agio di approfondire e di chiarire parzialmente altre cause di variazione del colore dei fiori.

Il cambiamento di colore degli antociani col variare della reazione del mezzo costituì l'argomento delle prime indagini chimiche sulla classe di sostanze. R. BOYLE e N. GREW (47) descrissero primi il fenomeno, che fu osservato e studiato in seguito da largo stuolo di ricercatori. CHEVALLIER e PAYEN & CHEVALLIER ne proposero l'impiego come indicatori mediante cartine imbevute nelle tinture dei fiori o l'aggiunta diretta della tintura ai liquidi in esame. Anche PELLAGRI, SACHER e HARROW ne suggerirono l'uso come indicatori. PRATT e SWARTOUT misurarono i limiti di pH di soluzioni tampone, entro cui virava il colore di estratti di vegetali diversi. BUXTON & DARBISHIRE distinsero gli antociani in 2 gruppi: gruppo rosso, con colori dal rosso (pH 3) al rosso-scuro (alcalino); gruppo blu, con colori dal rosso al violetto e al verde. ROBERTSON & ROBINSON (26) suggerirono lo studio colorimetrico degli antociani in soluzione tampone fosfati, ac. fenilacetico, ac. borico, NaOH da 3,2 a 11, quale indice aggiuntivo per l'identificazione dei vari antociani SMITH, estraendo fiori di specie diversa con tamponi fosfato e confrontando i colori ottenuti con quelli di un altro indicatore (pantina) cercò in tal modo di determinare il pH del succo cellulare.

Le proposte e gli studi anzidetti, se hanno attirato l'attenzione sull'eventuale impiego degli antociani come indicatori, non ne hanno tuttavia stabilito le caratteristiche fondamentali che si esigono da un colorante per proporne l'impiego come indicatore. Infatti non basta che una sostanza vari di colore col modificarsi della reazione del mezzo perchè possa trovare impiego utile come indicatore; è necessario che essa soddisfi a particolari condizioni e segua determinate leggi. Scopo del presente lavoro è appunto anche quello di saggiare l'eventuale utilizzazione pratica come indicatori degli antociani. Lo studio ci ha condotto a risultati limitatamente positivi e ci ha portato ad acquisizioni che ci sembrano di un interesse generale sia per la classe degli antociani, come per quella più generale e numerosa degli indicatori.

**2° Estratti.** — Si sono adoperati petali di corolle fresche di *Papaver Rhoeas* L. selvatico, nei quali si aveva cura di tagliare in

antecedenza la base ed il picciolo del petalo, che mostra un colore rosso-violetto ed ha un aspetto carnoso e succulento, ovvero anche nerastro lucido, con un alone bianco splendente, che circonda il margine libero della zona nera. L'estrazione si è fatta per semplice immersione in etanolo o metanolo ca. 95% che in capo a poche ore e sempre più intensamente nei giorni successivi si colora in rosso rubino. Il colore si è dimostrato abbastanza stabile. La soluzione alcoolica veniva adoperata come tale previa filtrazione attraverso carta da filtro. JONESCO (21) aveva ammesso la presenza di antocianine nelle corolle di *Papaver Rhoeas*, riportando l'eventuale presenza di antocianidine all'idrolisi acida. In un successivo lavoro (13) elenca in un'antocianina, un'antocianidina ed un pigmento giallo (7) le sostanze coloranti di *Papaver Rhoeas*. WILSTATTER & WEIL avevano estratto dai petali di *Papaver Rhoeas* (49) la *mecocianina*, che GROVE, IMBUSE & ROBINSON hanno identificato per sintesi con un 3-bioside della cianidina. Il reperto sarebbe convalidato da quello di SCHMID & HUBER (38) che hanno riscontrato nel *Papaver Rhoeas* un antociano solubile in alcool, risultante dell'aglucone cianidina e di due molecole di glucoso. Ora i diglucosidi della cianidina sono o 3-5 dimonosidi oppure 3-biosidi (32). Per le indagini di WILSTATTER & WEIL e per quelle di GROVE & Coll. (49, 8) credo si possa ritenere accertata l'identificazione del diglucoside cianidinico di SCHMID & HUBER (38) nella *mecocianina*. E perciò anche la nostra sostanza colorante avrebbe dovuto identificarsi nella *mecocianina*. Che effettivamente si trattasse di un diglucoside e non di un monoside o di un aglucone era dimostrato dal fatto che l'alcool amilico (iso) non estraeva l'antociano (Prova di EVEREST), mentre invece lo estraeva da una soluzione acquosa dopo breve idrolisi con  $H_2SO_4$  15-20% all'ebollizione. La ragione del passaggio sarebbe dovuta ad uno stato di differente aggregazione degli antociani nei due solventi: esse sarebbero appaiate in soluzione cloridrica, allo stato di molecole semplici invece in alcool isoamilico (17). Il residuo solido ottenuto fu di gr. 0,06211%. Con NaOH il colore rosso passa al blu, e, se il pH supera 12, al verde (blu + giallo). Per l'interpretazione ed il significato di questo viraggio rimandiamo a (47, 6) ed alla discussione dei risultati. Facciamo pertanto rilevare per ora che il viraggio rivela la presenza di un -OH in 4' (2). Il colore blu rimaneva apparentemente inalterato fino anche 8 giorni dopo l'aggiunta della NaOH, per quanto effettivamente abbiamo potuto constatare al fotometro che per intensità il colore si uniformava già dopo 24 h, anche se il pH del liquido

andava da 8 a 11, 9. Dopo lungo periodo di tempo si aveva la graduale decolorazione del liquido per formazione di leucoantocianine (36), decolorazione che sarebbe caratteristica dei composti piril-3-ossisostituiti (24). Per aggiunta di una goccia di soluzione diluita di  $\text{FeCl}_3$  alla soluzione alcoolica della sostanza colorata compare immediatamente un colore blu, che dura immutato anche parecchi giorni. Se ne desume da ciò che l'antociano deve avere almeno due  $-\text{OH}$  contigui, di cui uno in 3' (6, 15, 28). Il legame glucosidico in 3 era confermato oltre che dalla ripartizione fra soluzione cloridrica ed alcool isoamilico anche dalla colorazione con Na-acetato, violetta prima, blu dopo idrolisi con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (41). Una soluzione acquosa di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  colora in blu-porpora stabilmente una soluzione acquosa di estratto alcoolico. Per alcalinizzazione con NaOH il colore vira al blu, come si è detto, e si ripristina di nuovo il color rosso per acidificazione, anche se si è spinto il pH fino a 11 per parecchie ore (prova di ossidazione (33). Si son dovuti aggiungere in media 4,5 voll. di benzolo alla soluzione in alcool isoamilico per far «ritornare» il colore nella soluzione cloridrica. Il colore veniva assunto dal «reagente della cianidina» (1 vol. cicloesanol, 5 voll. toluolo) ed anche in parte da alcool isoamilico se si saturava in precedenza la soluzione con NaCl (34, 33).

Tutte le prove sopra eseguite ci portano ad ammettere la presenza di un diglucoside della cianidina nel nostro estratto alcoolico, diglucoside che potrebbe essere la mecocianina o la cianina (32). Per quanto si è sopra detto si dovrebbe trattare della mecocianina, il che viene convalidato dall'intenso colore blu della sostanza in zona alcalina (7). Le curve di assorbimento ottenute corrispondono a quelle degli antociani (6). Essendosi adoperato come liquido di estrazione etanolo e metanolo, siccome i petali non erano stati prima triturati o macerati, per cui veniva rispettata al massimo l'integrità delle cellule vegetali e solo poche delle sostanze in esse contenute avrebbero potuto passare nell'alcool, siccome infine prima dell'estrazione veniva tagliato via il picciolo del petalo, che, per avere colori differenti, avrebbe potuto contenere pigmenti diversi, crediamo che il pigmento estratto sia solo o in assoluta prevalenza mecocianina. D'altra parte R. SCOTT-MONCRIEFF (42) afferma categoricamente che «most wild types, with the exception of *Papaver Rhoeas*, contain anthoxanthin».

Le nostre determinazioni sono state eseguite con luci monocromatiche, filtrate attraverso i filtri S del fotometro graduale di Pulfrich, per cui l'eventuale presenza di altri pigmenti, data anche

l'assoluta preponderanza della mecocianina, non avrebbe potuto esercitare che un'influenza trascurabilissima sui risultati. In alcune serie di esperienze abbiamo infine eseguito confronti fra misure fotometriche e colorimetriche, ed esse collimano in maniera confortevole, convalidando con ciò la supposizione che, se degli altri pigmenti sono passati nell'alcool oltre alla mecocianina, essi debbono trovarsi in quantità talmente esigua da essere in ogni caso incapaci di esercitare influenza di sorta sui risultati. Per quanto riguarda altre eventuali sostanze passate nell'alcool e che avrebbero potuto influenzare i risultati facciamo rilevare che nei nostri esperimenti abbiamo adoperato al massimo 40 gocce di estratto alcoolico per 10 ml. di liquido, una quantità cioè inferiore al 10 %. Ed in questa % le i sali, gli xilani, ecc., anche per la loro scarsa o nulla solubilità in alcool non avrebbero del pari potuto interferire apprezzabilmente sui nostri risultati.

Oi crediamo perciò fondatamente autorizzati ad ascrivere alla mecocianina i risultati nostri. Data poi la scarsa differenza nelle colorazioni fra mecocianina e cianina i risultati crediamo che con le dovute limitazioni potrebbero estendersi alla cianidina ed in parte anche a tutti gli antociani e alle antocianidine.

**3° Cenno generale sui metodi adoperati.** — La concentrazione Hionica si determinò con potenziometro a valvola bigriglia, con resistenza di griglia di  $10^{13}$  Ohm, per cui la corrente derivata dal sistema era assolutamente trascurabile e con ciò anche trascurabile diveniva l'eventualità di una polarizzazione di esso. L'apparecchio funzionava come strumento di zero; l'amperometro aveva una sensibilità di  $1 \times 10^{-6}$  Ampère per 1° di derivazione ed assumeva la sua posizione di equilibrio in qualche secondo. Lo spostamento dell'indice era ingrandito da un cannocchiale. La sensibilità dell'apparecchio permetteva di misurare f.e.m. fino a  $3 \cdot 10^{-5}$  Volta. Le caratteristiche dell'apparecchio ci permisero di giungere con buona approssimazione alla determinazione della terza cifra decimale del pH. Si tenne evidentemente conto della temperatura e della pressione atmosferica, apportando le dovute correzioni. Si adoperò l'elettrodo ad U di MICHAELIS. L'apparecchio e tutto il sistema delle sorgenti di f.e.m. venivano tarati prima di ogni serie di letture con la pila campione WHEATSTONE e con altra pila al cadmio costruita da noi, e, parallelamente, le letture venivano confrontate con quelle ottenute con soluzioni tampone a vario pH. La concentrazione della sostanza colorante si mantenne costante per ogni serie di ricerche. Si trascurò

il fattore  $K_{\lambda}$  contemplato dalla legge di BEER:  $-\log T_{\lambda} = K_{\lambda} l$ , avendo eseguito le misure fotometriche sempre alla medesima lunghezza d'onda col medesimo filtro spettrale (S — 50). In alcuni casi si eseguirono anche delle misure colorimetriche col colorimetro di DUBOSCQ, le quali, come si disse, furono in confortante accordo con quelle fotometriche. Per quanto riguarda altri particolari di tecnica riferiremo nell'esposizione dei risultati singoli.

## RISULTATI SPERIMENTALI

**1° Curve di assorbimento isoidriche o isobatme.** — Si è seguito l'assorbimento — a parità di concentrazione  $c$  e di spessore  $l$  — allo stesso pH in funzione della lunghezza d'onda  $\lambda$  e, per la medesima lunghezza d'onda  $\lambda$  e lo stesso pH, in funzione del tempo. L'annessa Fig. 1 rappresenta le curve di assorbimento isoidriche da pH 1 a 11 in soluzioni tampone varie. Si vede come il coefficiente di estinzione sposti il suo massimo verso il rosso con l'innalzarsi del pH, passando da ca. 500 m $\mu$  in zona acida a ca. 570 m $\mu$  in zona alcalina (pH 8 — 11). Un punto isobestico non si può dire che esista, in quanto non c'è un punto o tratto delle curve comune a tutte. Un tratto comune a tutte le curve

esiste da pH 3 a pH 11 (compresi) e si trova vicino a 720 m $\mu$ . Ciò potrebbe interpretarsi nel senso che solo entro questi limiti di pH vi sono due stati della meocianina in relazione col pH e che a pH 1 e 2 la meocianina si trovi sotto altri stati. Avremo occasione di ribadire, chiarire e ampliare ciò meglio in seguito.

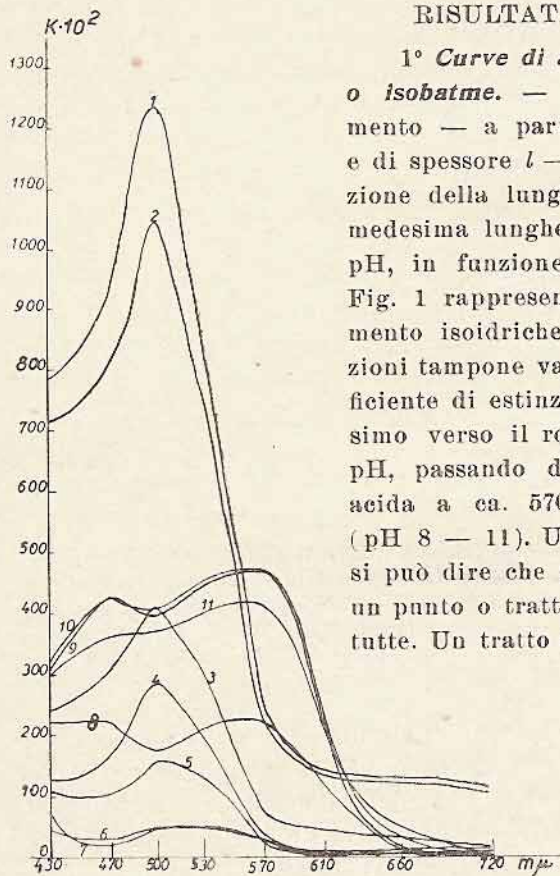


Fig. 1.

Curve approssimative di assorbimento isoidriche da pH 1 a pH 11. Le cifre sulle ascisse, anche nelle Figg. successive, rappresentano le lunghezze d'onda (Filtro S), in corrispondenza delle quali furono eseguite le letture. Le soluzioni tampone per pH 1 e 2 furono di HCl e KCl 0,2 M, per pH da 3 a 8 di ac. citrico 0,1 M e  $\text{HNa}_2\text{PO}_4$  0,2 M, per pH 9 di HCl 0,1 M e borace 0,05 M, per pH 10 e 11 di NaOH 0,1 M, e borace 0,05 M.

Il coefficiente di estinzione, a parità di condizioni, varia in funzione del tempo (Figg. 2 e 3) secondo modalità differenti in zona acida o alcalina.

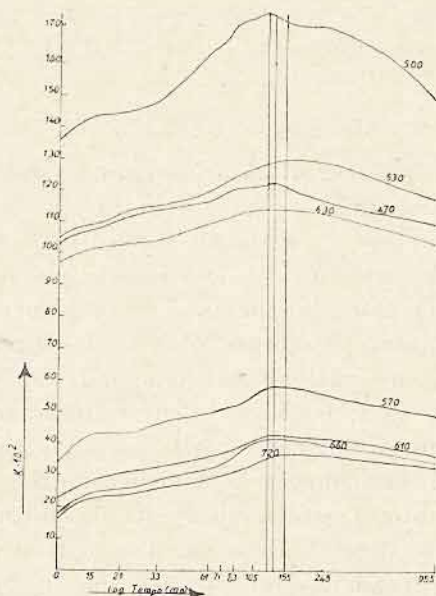


Fig. 2

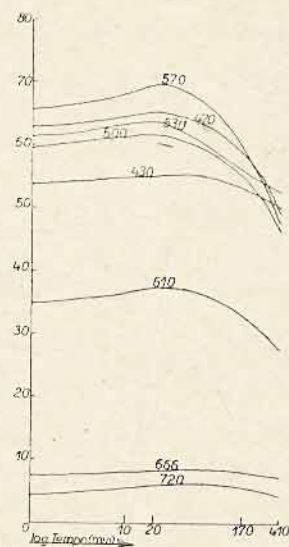


Fig. 3

Variazione dei coefficienti di estinzione a pH 1 e 11 in funzione del tempo. Le due Figg. sono su scale differenti. I numeri in corrispondenza delle singole curve si riferiscono alle lunghezze d'onda. Le curve della Fig. 2 sono state eseguite a pH 1 (soluzione tampone HCl - KCl 0,2 M); le curve della Fig. 3 a pH 11 (soluzione tampone borace 0,05 M - NaOH 0,1 M).

Esso aumenta dapprima per diminuire in seguito, più rapidamente in zona alcalina che acida. A pH 11 già dopo ca. 170 min il coeff. d'est. si abbassa al di sotto dei valori iniziali. A pH 1, nei limiti di tempo delle nostre ricerche non si è mai osservato invece un abbassamento al disotto dei valori iniziali. Siccome le dette variazioni sono approssimativamente parallele, alle varie lunghezze d'onda, e non mostrano d'altra parte delle brusche deviazioni, se ne desume che delle letture di trasparenza con soluzioni di meocianina possono avere valore comparativo anche parecchio tempo dopo che sono state ottenute, e con maggior attendibilità in zona acida che in zona alcalina.

I sali (NaCl) modificano la curva d'assorbimento in quanto:  
a) accrescono il coeff. est.  $K$ ; b) col crescere della lunghezza d'onda

e del pH fanno diminuire il coeff. est. relativamente meno, in modo che fra 530 e 570 m $\mu$  le curve isoidriche s'incrociano (fig. 4).

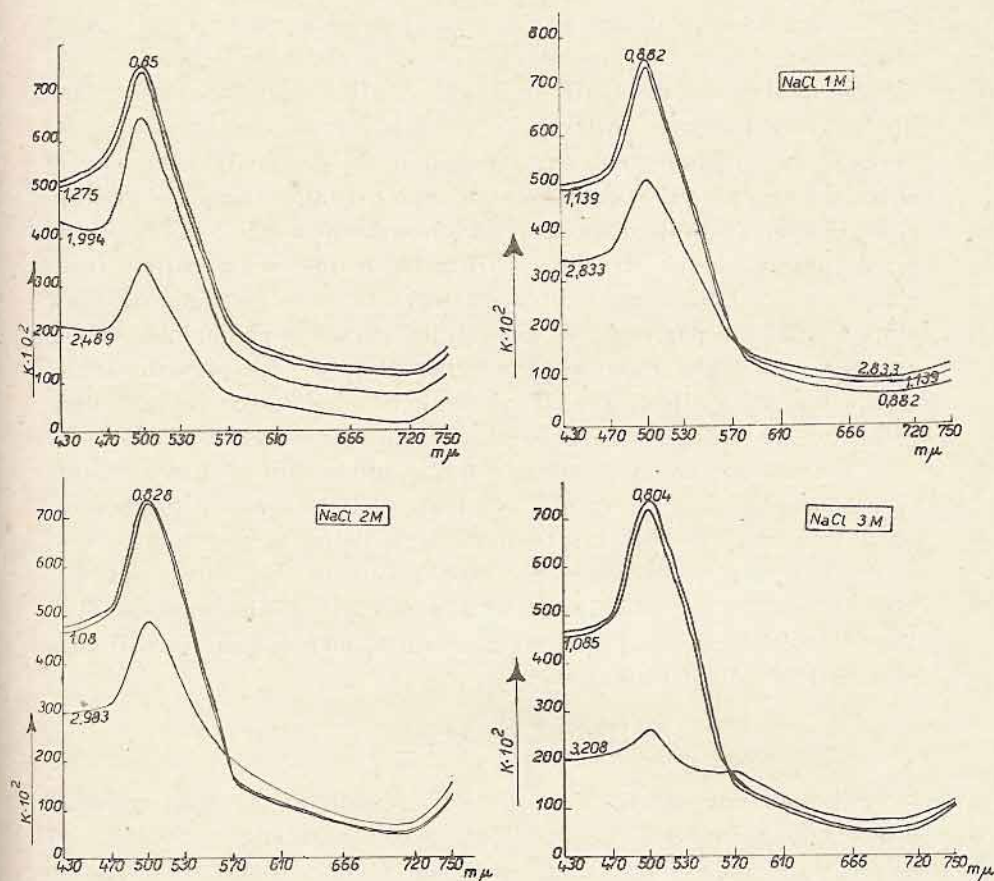


Fig. 4

Influenza dei sali neutri sulle curve di assorbimento isoidriche. Le curve in alto a sinistra sono state ottenute in HCl e sono riportate a scopo comparativo; le altre in soluzione NaCl 1-2 e 3 M. I numeri in corrispondenza di ogni curva si riferiscono al pH.

**2° Studio della mecocianina come indicatore.** — È noto da tempo che gli antociani cambiano il loro colore col variare della reazione del mezzo. La mecocianina in ambiente acido prende un colore rosso, con una lieve fluorescenza violetta, molto più appariscente in soluzione di ac. acetico, una colorazione blu-violetta intensa invece in ambiente alcalino. Fra pH 4 e 7 il colore non è più apprezzabilmente percepito ed a pH  $\approx$  6, in assenza di sali, la

mecocianina è quasi incolore. Perciò dall'acido all'alcalino la mecocianina passa dal rosso al violetto attraverso uno stato pressochè incolore. Il colore blu o violetto nell'alcalino si attenua col tempo e già dopo 48 h tende ad assumere un'intensità costante, che non si altera più neanche dopo diversi giorni e che è all'incirca la medesima qualunque sia il pH da 8 a 11. A  $\text{pH} > 11,9$  il colore diventa blu-scuro e l'aspetto torbido: dopo pochi minuti il colore passa al verde e la soluzione ridiventa limpida, col tempo il color verde sbiadisce sempre più per passare al verde-giallo prima al giallo-chiaro dopo. Tutto il processo di trasformazione a  $\text{pH} > 12$  impiega circa 15 min. L'acidificazione ( $\text{pH} = 12$ ) a questo punto può fare ritornare il color rosso, con una intensità tuttavia che sembra inferiore a quella di partenza. Se si acidifica invece dopo qualche tempo o appare un colore roseo appena percettibile ovvero permane inalterato il color giallo chiaro. L'eventuale uso della mecocianina come indicatore nell'alcalino sarebbe già, perciò solo, limitato a  $\text{pH} 11,9$ .

In ambiente acido il colore è molto più stabile e le variazioni di colore col tempo sono molto più lente e di minore entità; perciò in questa zona le possibilità d'impiego della mecocianina come indicatore potrebbero essere molto più fondate. Una prima condizione per l'impiego della mecocianina come indicatore sarebbe l'applicabilità ad essa della relazione fondamentale che lega il pH al «grado di dissociazione»  $\alpha$ :

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\alpha}{1 - \alpha} \quad (1)$$

Siccome non sappiamo se la «dissociazione» consista in una dissociazione in senso acido o basico con parallele variazioni di colore, dato dallo ione o dallo ionogeno, (teoria di OSTWALD), ovvero in una trasformazione in tautomeri differentemente colorati parleremo così d'ora in avanti di «grado di dissociazione apparente».  $\alpha$  è stato determinato mediante il fotometro di PULFRICH, applicando la legge di LAMBERT. Le letture sono state eseguite in corrispondenza del massimo d'assorbimento (500 m $\mu$ ) e si è adoperata la formula:

$$\alpha = \frac{l_m c_m k_i}{l_x c_x k_i} \cdot \frac{\log T_x}{\log T_m} \quad (2)$$

dove  $l$ ,  $c$ ,  $k$ , e  $T$ , indicano rispettivamente la lunghezza della vaschetta, la concentrazione della sostanza, una costante relativa alla lunghezza d'onda alla quale si fa la misura e la trasparenza in % o rapporto % le fra luce emergente  $E$  e luce incidente  $I$ . Gli indici

$m$  ed  $x$  sono relativi nel nostro caso a due stati differentemente colorati della mecocianina. Siccome  $l_m, c_m, k_i$  si sono mantenuti uguali rispettivamente a  $l_x, c_x, k_i$  per cui il rapporto dei loro prodotti  $= 1$ , così abbiamo determinato  $\alpha$  dal semplice rapporto  $\frac{\log T_x}{\log T_m}$ . Se nella (2) è noto  $\alpha$  ad un determinato pH, basta moltiplicare questo per il rapporto  $\frac{\log T_x}{\log T_m}$  ottenuto ad un altro pH per avere il nuovo  $\alpha$  a quest'ultimo pH. Se invece non è noto  $\alpha$  allo stato  $m$ , il rapporto  $\frac{\log T_x}{\log T_m}$  ci darà soltanto una misura relativa, ci dirà cioè soltanto secondo quale numero è multiplo  $\alpha_x$  di  $\alpha_m$ . Per conoscere perciò  $\alpha_m$  si deve abbassare od innalzare il pH, fintantochè il coeff. est. non vari più. A questo punto si deve ritenere che  $\alpha_m$  sia 0 ovvero 1, che rappresentano i valori estremi che può assumere  $\alpha$ , e che significano che in corrispondenza di essi la sostanza sia niente o totalmente «dissociata», oppure che si trovi tutta sotto forma  $x$  od  $m$ .

Una volta conosciuto  $\alpha$  è facile calcolare il pK sec. la (1). Il pH l'abbiamo fatto variare con l'aggiunta di HCl,  $H_2SO_4$ , ac. citrico, ed il risultato fu piuttosto sorprendente, in quanto mise in evidenza una *variazione del pK*, cioè di una costante, col variare del pH. La variazione si ebbe in tutti i casi e procedeva nel medesimo senso di una variazione del pH.

Le letture potenziometriche potevano eseguirsi con buona approssimazione fino alla terza cifra decimale; ne venivano fatte una prima e due dopo (delle quali una prima ed una dopo la lettura al fotometro) l'aggiunta della soluzione alcoolica della mecocianina. E siccome la mecocianina faceva variare il pH e non sempre nel medesimo senso, nè ugualmente per la medesima entità, si tenne conto delle due ultime letture eseguite che furono quasi sempre coincidenti, dopo l'aggiunta della mecocianina. La temperatura si mantenne rigorosamente costante per ogni serie di esperienze. Le letture al fotometro furono praticate sempre con la medesima vaschetta ed ogni lettura riportata rappresenta la media di 10 letture consecutive, ognuna non discordante dall'altra di massima per più di  $\pm 1\%$ .

Per tutte le anzidette ragioni non credo possa mettersi in dubbio l'effettiva consistenza dei risultati ottenuti, che consistono, ripeto, nel curioso reperto della variabilità di pK. Già per questo solo fatto se ne potrebbe desumere che la mecocianina se ne discosta dagli altri indicatori.

Nelle due Tabelle seguenti diamo appunto un saggio delle variazioni del pK in funzione del pH, in due serie di esperienze eseguite la prima con HCl, la seconda con ac. citrico a tre mesi di distanza l'una dall'altra. Le due Tabelle mostrano che il pK cresce col crescere del pH anche se non nella medesima misura. Ma le due grandezze non risultano l'una (pH) funzione lineare dell'altra,

T A B E L L A I  
( H Cl )

| pH    | D %   | $-\frac{\log E}{\log I} = K$ | $\alpha$ | pK   |
|-------|-------|------------------------------|----------|------|
| 1,053 | 16,64 | . 7788                       | —        | —    |
| 1,321 | 16,53 | . 7821                       | —        | —    |
| 1,37  | 16,55 | . 7815                       | —        | —    |
| 1,59  | 25,08 | . 6012                       | 0,23     | 2,11 |
| 1,8   | 25,35 | . 5958                       | 0,24     | 2,25 |
| 2,00  | 26,66 | . 5739                       | 0,26     | 2,43 |
| 2,168 | 26,97 | . 5694                       | 0,27     | 2,60 |
| 2,65  | 36,68 | . 4357                       | 0,44     | 2,8  |
| 2,897 | 43,69 | . 36                         | 0,54     | 2,73 |
| 2,902 | 44,28 | . 3595                       | 0,542    | 2,83 |
| 3,2   | 52,5  | . 28                         | 0,64     | 2,95 |
| 3,5   | 65,66 | . 1827                       | 0,77     | 2,99 |
| 3,647 | 68,42 | . 1645                       | 0,79     | 3,07 |
| 3,74  | 79,1  | . 1015                       | 0,87     | 2,91 |
| 4,12  | 90,8  | . 042                        | 0,956    | 2,88 |

T A B E L L A I I  
( Ac. citrico )

| pH    | D %   | $-\frac{\log E}{\log I} = K$ | $\alpha$ | pK    |
|-------|-------|------------------------------|----------|-------|
| 2,08  | 12,66 | . 8974                       | 0,264    | 2,525 |
| 3,345 | 16,16 | . 7918                       | 0,299    | 2,715 |
| 2,567 | 18,81 | . 7258                       | 0,327    | 2,88  |
| 2,63  | 20,06 | . 6988                       | 0,339    | 2,92  |
| 3,1   | 28,93 | . 5391                       | 0,44     | 3,27  |
| 3,26  | 32,66 | . 4861                       | 0,488    | 3,29  |
| 3,75  | 43,8  | . 3593                       | 0,66     | 3,57  |
| 4,00  | 48,3  | . 3162                       | 0,75     | 3,523 |
| 4,3   | 52,30 | . 2824                       | 0,84     | 3,50  |
| 4,54  | 54,45 | . 2635                       | 0,90     | 3,59  |
| 4,9   | 56,42 | . 248                        | 0,952    | 3,61  |
| 5,21  | 57,97 | . 2372                       | 1,000    | —     |

bensi curvilinea (parabolica) e soddisfano alla relazione generale seguente:

$$-apH^2 + bpH = pK \quad (3)$$

nella quale  $a$  e  $b$  sono due coefficienti, che nel caso in esame presentano valori leggermente differenti (0,17 e 0,25 per  $a$ ; 1,56 e 1,72 per  $b$ ) per l'ac. citrico e per l'HCl. Non sappiamo se le differenze riscontrate siano riferibili alla natura dell'acido ovvero alle modificazioni subite dalla meocianina col trascorrere del tempo. Quello che interessa particolarmente ci sembra essere per ora il tipo di di relazione che lega il pH al pK.

La relazione (3) è stata calcolata nel modo seguente: anzitutto la relazione non poteva essere rettilinea, in quanto la retta, calcolata col metodo dei minimi quadrati, toccava solo gli estremi valori ottenuti sperimentalmente, quasi fosse tangente ad una curva ideale che raccogliesse i luoghi di massima probabilità. L'angolo formato dalle tangenti alla curva nei vari punti del suo decorso sarebbe

dato dal rapporto  $\frac{pH}{pK}$ . Questo rapporto si è dimostrato ora essere una funzione lineare del pH. Una volta stabilito ciò riusciva perciò facile l'esecuzione del calcolo pratico: infatti se pH e pK sono legati dalla relazione seguente:

$$pK = u \text{ pH} \quad (a)$$

dove

$$u = f(pH)$$

sostituendo in (a) si ottiene:

$$pK = f(pH) \cdot pH \quad (b)$$

per cui basta conoscere  $f(pH)$  per calcolare pK. Siccome:

$$u = \operatorname{tg} \alpha = \begin{array}{ll} -0,17 \text{ pH} + 1,56 & \text{per l'ac. citrico} \\ -0,25 \text{ pH} + 1,72 & \text{per l'HCl} \end{array}$$

sostituendo in (a) si avrà:

$$\text{per l'ac. citrico} \quad pK = -0,17 \text{ pH}^2 + 1,56 \text{ pH} \quad (3a)$$

$$\text{per l'HCl} \quad pK = -0,25 \text{ pH}^2 + 1,72 \text{ pH} \quad (3b)$$

Mediante le due formule suddette si sono ottenute le due curve della fig. 5.

Poichè allo stesso pH si ha il medesimo pK si possono sommare membro a membro la (1) e la (3):

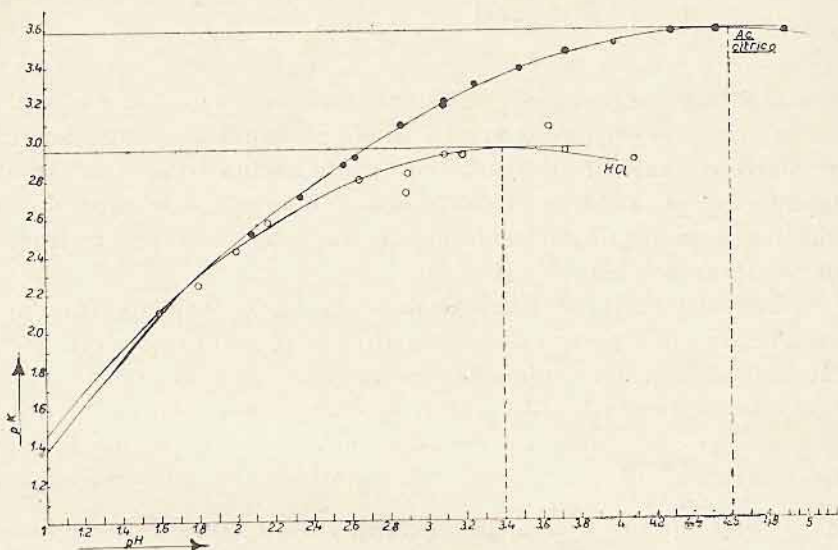


Fig. 5

Variazione di pK in funzione di pH. Le due curve sono state tracciate secondo le formule (3a) e (3b).

$$\begin{aligned} \text{pH} &= \text{pK} + \log \frac{\alpha}{1 - \alpha} + \\ &- a \text{pH}^2 + b \text{pH} = \text{pK} \\ \hline -a \text{pH}^2 + (b + 1) \text{pH} &= 2\text{pK} + \log \frac{\alpha}{1 - \alpha} \quad (4) \end{aligned}$$

Portando tutti i termini nel 1° membro, considerando pK e  $\log \frac{\alpha}{1 - \alpha}$  come termini noti e risolvendo rispetto a pH si ottiene:

$$\text{pH} = \frac{-(b + 1) \pm \sqrt{(b + 1)^2 - 8a \text{pK} - 4a \log \frac{\alpha}{1 - \alpha}}}{-2a} \quad (5)$$

La relazione (4) mette in rapporto pH, pK ed  $\alpha$ .

Sostituendo nella (3) a pK il valore di esso ricavato dalla (1) si ottiene:

$$-a \text{pH}^2 + (b - 1) \text{pH} + \log \frac{\alpha}{1 - \alpha} = 0 \quad (6)$$

che lega il pH con il grado di dissociazione apparente.

Risolvendo rispetto a pH si ha:

$$\text{pH} = \frac{1 - b \pm \sqrt{(b - 1)^2 + 4a \log \frac{\alpha}{1 - \alpha}}}{-2a} \quad (7)$$

Mediante questa relazione si può calcolare  $\alpha$  dal pH e viceversa il pH da  $\alpha$ ; e siccome  $\alpha$  si può a sua volta determinare con uno dei tanti metodi noti — fotometrici, spettrofotometrici, colorimetrici, ecc. — anche il pH si può determinare coi medesimi metodi, mediante l'impiego della mecocianina, alla quale perciò potrebbe competere il ruolo di indicatore.

Perchè i valori di pH della (5) siano reali è necessario che:

$$(b + 1)^2 - 8a \text{pK} - 4a \log \frac{\alpha}{1 - \alpha} \geq 0$$

ovvero:

$$2\text{pK} + \log \frac{\alpha}{1 - \alpha} \leq \frac{(b + 1)^2}{4a}$$

L'espressione ci mette in condizione di poter calcolare i limiti dei valori di  $\alpha$  per i corrispondenti valori assegnati a pK.

Per  $\alpha = 0,5$

$$\text{pK} \leq \frac{(b + 1)^2}{8a}$$

che ci dà il massimo valore che può assumere pK per  $\alpha = 0,5$ .

Perchè i valori di pH dalla (7) siano reali è necessario che:

$$(b - 1)^2 + 4a \log \frac{\alpha}{1 - \alpha} \geq 0 \quad \text{cioè} \quad \log \frac{\alpha}{1 - \alpha} \geq - \frac{(b - 1)^2}{4a}$$

Sostituendo a  $b$  ed  $a$  i valori per essi trovati nella (3a) e (3b) si ha:

$$\alpha \leq 0,74 \quad (8) \qquad \qquad \alpha \leq 0,77 \quad (9)$$

Il che significa che valori reali di pH secondo l'espressione (7) si possono ottenere solo quando il grado di dissociazione apparente non supera il 74% in ac. citrico, il 77% in HCl.

Se la mecocianina si comportasse come un acido o base debole, il cui ione (o ionogeno) fosse associato al colore il suo grado di dissociazione si modificherebbe allora col variare entro certi limiti del pH sec. la relazione (1). E la curva di dissociazione o curva del residuo di dissociazione avrebbe l'andamento di una S. Le medesime conclusioni varrebbero qualora il colore fosse associato

ad un tautomero e dipendesse perciò da equilibri dinamici tautomerici le cui costanti di dissociazione fossero funzione del pH; solo che in quest'ultimo caso invece di parlare di «costante di dissociazione» sarebbe più opportuno parlare di «costante di affinità totale» (ACREE) o di «costante di dissociazione apparente» (NOYES) (40).

Nel nostro caso abbiamo visto che il grado di dissociazione apparente dipende dal pH secondo la (4) o la (6), nella quale ultima non figura il pK. Le «curve di dissociazione» della mecocianina in funzione del pH, calcolate secondo la (6), nella quale ad  $\alpha$  e  $b$  si sostituiscono i coefficienti noti trovati per l'ac. citrico e l'HCl, sono rappresentate nella seguente fig. 6:

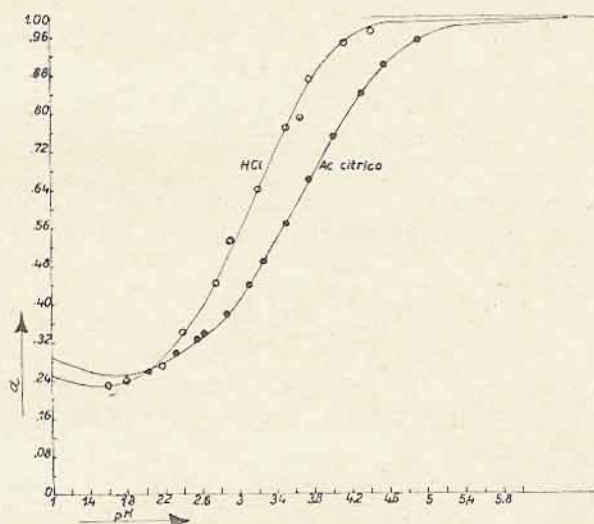


Fig. 6

Curva di dissociazione apparente della mecocianina in HCl ed ac. citrico.

Anche queste curve hanno una forma ad S. Si differenziano da quelle ottenibili con la (1) perché per  $\alpha = 0$ , pH non tende asintoticamente a  $-\infty$  parallelamente all'ascissa. Per  $\text{pH} < 1,6$  le due curve tendono nuovamente a sollevarsi e siccome appare assurda tale possibilità ed è contraria inoltre ai risultati sperimentali non resta che fissare a pH 1,6 il limite inferiore di validità della (6). Non è improbabile, come avremo occasione di discutere in seguito che per  $\text{pH} < 1,6$  la curva di dissociazione apparente segua la (1).

L'aggiunta di sali neutri (NaCl) abbiamo visto che modifica le curve di assorbimento isoidriche (fig. 4). Abbiamo perciò seguito

pK e  $\alpha$  in funzione di pH in soluzioni variamente concentrate di NaCl — 0,1 — 0,4 — 1,0 M. Come dimostrano le figg. 7 e 8 tratte dalle Tabb. III, IV e V le curve si modificano col variare della concentrazione di NaCl, nel senso soprattutto che ad un medesimo pH il pK cresce col crescere della concentrazione di NaCl.

TABELLA III  
(NaCl 0,1 M)

| pH    | D %   | K      | $\alpha$ | pK    |
|-------|-------|--------|----------|-------|
| 1,61  | 13,29 | . 8763 | —        | —     |
| 2,769 | 15,34 | . 8142 | 0,07     | 3,888 |
| 3,154 | 15,91 | . 7987 | 0,089    | 4,167 |
| 3,293 | 15,99 | . 7963 | 0,092    | 4,289 |
| 4,430 | 21,74 | . 6632 | 0,244    | 4,921 |
| 5,475 | 35,95 | . 4445 | 0,493    | 5,487 |
| 6,019 | 48,85 | . 3112 | 0,645    | 5,76  |

TABELLA IV  
(NaCl 0,4 M)

| pH    | D %   | K      | $\alpha$ | pK   |
|-------|-------|--------|----------|------|
| 1,505 | 11,78 | . 9288 | —        | —    |
| 2,581 | 11,07 | . 9562 | —        | —    |
| 3,004 | 11,73 | . 9308 | —        | —    |
| 3,087 | 11,12 | . 9542 | —        | —    |
| 4,269 | 14,84 | . 8288 | 0,121    | 5,13 |
| 5,19  | 20,07 | . 684  | 0,275    | 5,61 |
| 5,727 | 26,01 | . 5848 | 0,38     | 5,94 |

TABELLA V  
(NaCl 1,0 M)

| pH    | D %   | K      | $\alpha$ | pK    |
|-------|-------|--------|----------|-------|
| 1,583 | 7,92  | 1,101  | —        | —     |
| 2,854 | 10,84 | . 9654 | —        | —     |
| 3,293 | 10,64 | . 9734 | —        | —     |
| 3,744 | 10,72 | . 9702 | —        | —     |
| 5,169 | 16,06 | . 7942 | 0,171    | 5,855 |
| 5,846 | 22,96 | . 6428 | 0,337    | 6,14  |

Siccome d'altra parte lo sviluppo in lunghezza delle curve, per la ragione sopradetta diminuisce col crescere della concentrazione ne risulta che il massimo della curva si ha ad un pH tanto più basso quanto più elevata è la concentrazione di NaCl. L'influenza del NaCl risalta poi pienamente ove si confrontino le curve delle figg. 5 e 6 con quelle delle figg. 7 e 8 e qualche cifra

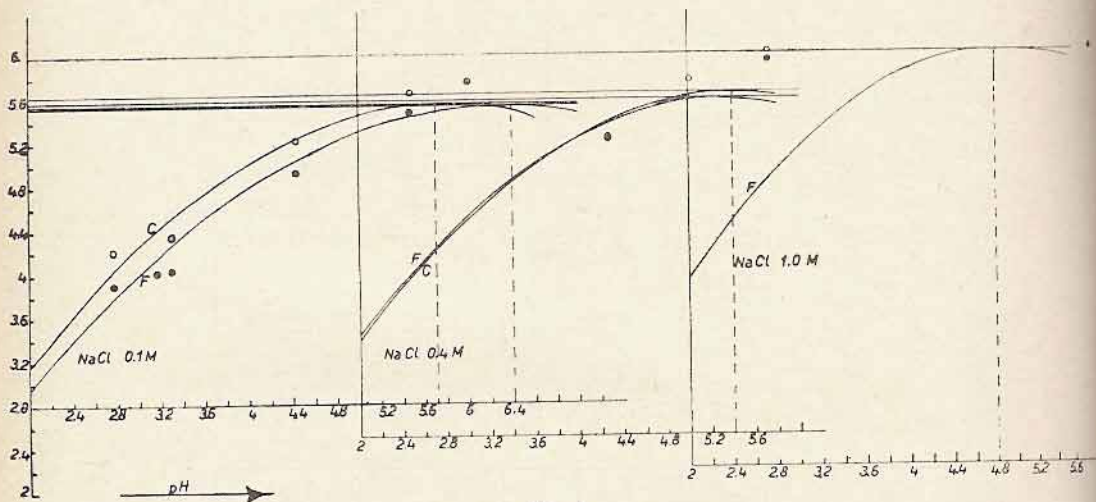


Fig. 7

Variazioni di pK in funzione di pH in presenza di NaCl 0,1 — 0,4 — 1,00 M. Le lettere F e C si riferiscono alle curve ottenute con le letture al fotometro (●) ed al colorimetro (○), le quali ultime non sono riportate nelle Tabelle.

varrà a chiarire ed illustrare meglio l'influenza del NaCl. Così mentre a  $\text{pH} = 2$  il pK in HCl è di 2,44, allo stesso pH in presenza di NaCl 0,1 — 0,4 — 1,0 M il pK è invece di 2,96 — 3,43 — 3,92. L'ac. citrico per l'ampio sviluppo della sua curva e per l'alto valore del suo massimo si avvicina alla soluzione di NaCl + HCl; per i valori che il pK assume in esso ai bassi pH si avvicina invece di più alle soluzioni di HCl.

Interessante risulta anche il raffronto fra il grado di dissociazione apparente ed il pH. Le curve relative hanno sempre la forma ad S; però mentre ad es. la dissociazione apparente del 50 % si ha ad un pH di 2,87 in HCl, essa si ha ad un pH di 5,43 — 5,58 — 5,84 — in presenza di NaCl 0,1 — 0,4 — 1,0 M. In ac. citrico la meocianina è apparentemente dissociata del 50 % a  $\text{pH} = 3,28$ , valore medio fra quello di HCl e quello di NaCl + HCl.

L'influenza del NaCl potrebbe interpretarsi nel senso che esso ostacola fortemente la dissociazione apparente della meocianina ed

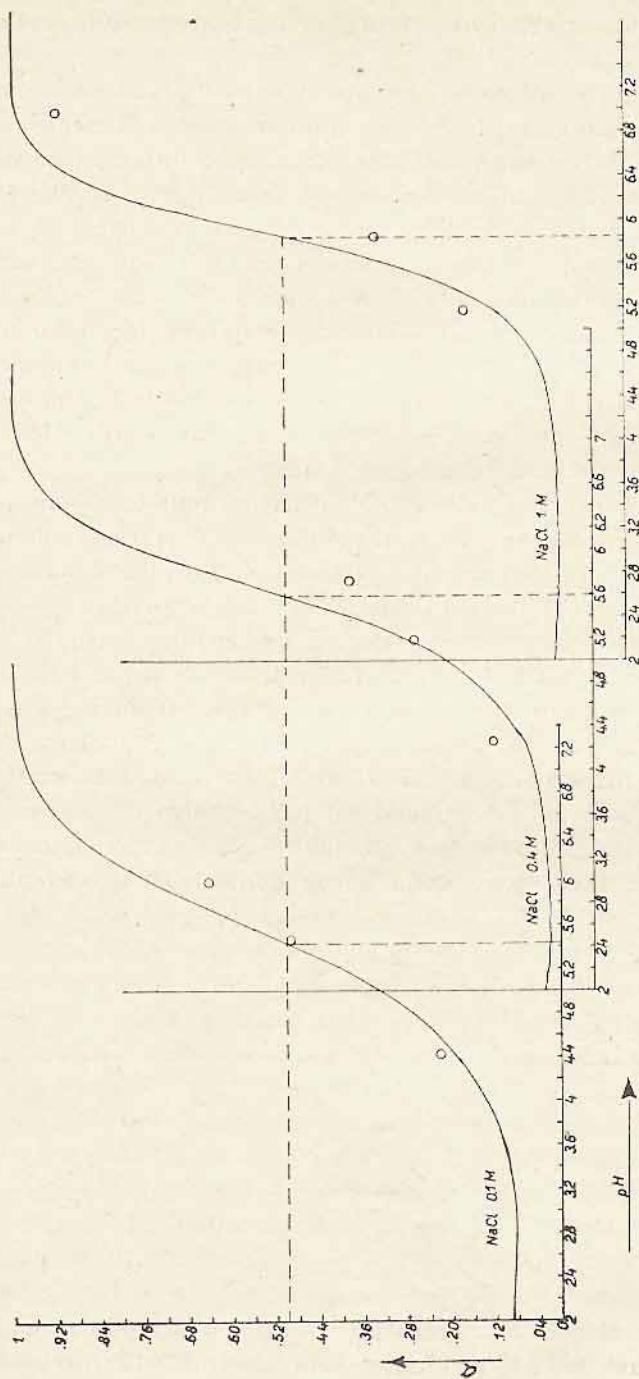


Fig. 8

Curve di dissociazione apparente della mecocianina in presenza di NaCl 0,1 - 0,4 - 1,0 M

in grado tanto maggiore quanto più concentrata è la sua soluzione.

Dato il forte scarto del grado di dissociazione apparente in presenza di sali l'uso della mecocianina come indicatore acido-basico sarebbe, più che limitato, escluso. Basti infatti pensare che a parità di concentrazione di mecocianina mentre in H Cl si misurerebbe un pH di 2,87 in Na Cl 0,1 a 1,0 M si misurerebbe un pH da 5,43 a 5,84 di quasi il doppio cioè. Altra limitazione nell'impiego della mecocianina come indicatore è data dalla variabilità riscontrata nel suo grado di dissociazione (e quindi nell'intensità del colore che è in grado di sviluppare) in rapporto con la natura dell'acido. Per quest'ultima ragione l'impiego come indicatore necessiterebbe della conoscenza preventiva della natura dell'acido e della curva di dissociazione della mecocianina in esso.

Per indagare sulla natura acida o basica della mecocianina, che nel contempo avrebbe potuto illuminarci sul colore dello ione e dello ionogeno, anche per evitare l'errore da sali, che abbiamo visto essere tanto forte, abbiamo preferito ad una titolazione potenziometrica la semplice tecnica seguente: si misurava cioè il pH di una soluzione prima e dopo l'aggiunta di una quantità fissa di mecocianina in soluzione alcoolica o in polvere, ottenuta per evaporazione dell'alcool a temperatura ambiente e si rapportava la variazione del pH ( $\Delta$  pH) al pH stesso della soluzione. La variazione si riteneva come positiva quando il pH cresceva (comportamento come base), negativa invece quando diminuiva (comportamento come acido). Dall'esame della curva della fig. 9 si vede che la

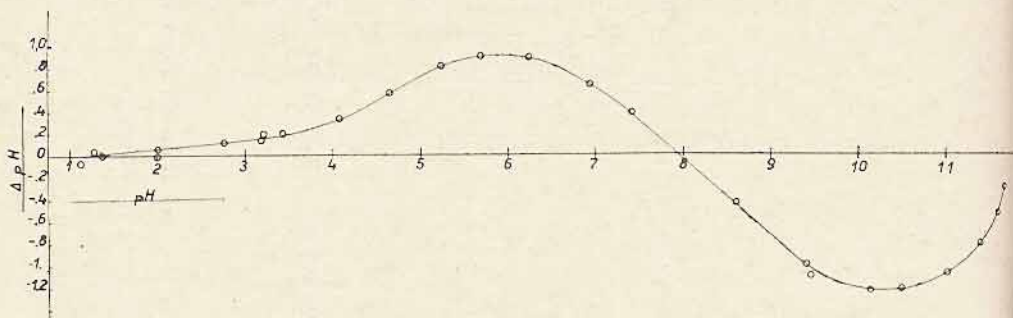


Fig. 9  
Comportamento della mecocianina ai vari pH.

mecocianina si comporta come un anfotita: è un acido in ambiente alcalino, è una base in ambiente acido e ad un pH fra 7 e 8 ovvero 1 la mecocianina non è dissociata nè come acido nè come base

ovvero le sue valenze acide equivalgono quelle basiche. Il Na Cl riduce fortemente la basicità della mecocianina in ambiente acido.

## DISCUSSIONE

I fatti più salienti rilevati in precedenza sono: 1) La variazione del pK in funzione del pH; 2) la correlazione secondo la (6) fra « grado di dissociazione apparente » e  $\alpha$ ; 3) il comportamento anfotero della mecocianina.

pK, è noto, non rappresenta che  $\log \frac{1}{K}$ , cioè il logaritmo decimale della costante di associazione. Siccome abbiamo visto che in zona acida la mecocianina si comporta come base, possiamo chiamare, come d'altra parte si ritenne in un primo tempo (6), con COH lo ionogeno, la cui costante di dissociazione dipenderebbe allora dal rapporto:

$$\frac{[C \cdot] \times [OH']}{[COH]} \quad (10)$$

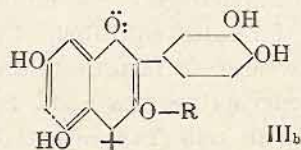
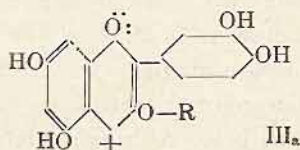
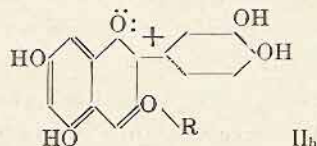
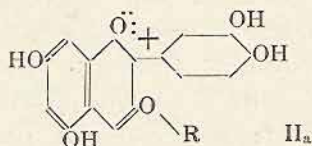
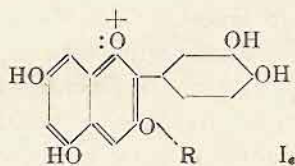
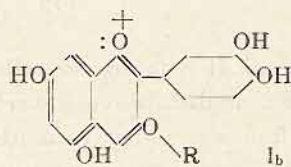
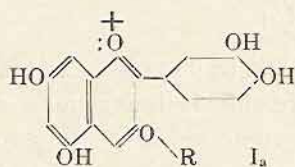
Se il nostro pK dipendesse dalla (10) esso sarebbe allora un pK<sub>b</sub> e risponderebbe a:

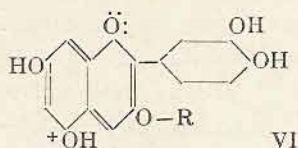
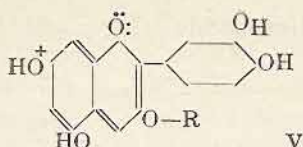
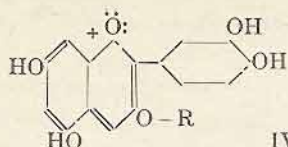
$$\log \frac{[COH]}{[C \cdot] + [OH']}$$

Poichè il color rosso della mecocianina ha la massima intensità alle forti acidità, dove dovrebbe esistere solo lo ionogeno, e si attenua fino a scomparire a pH > 5, al quale si dovrebbe avere la massima dissociazione alcalina, il colore dovrebbe essere legato allo ionogeno COH, mentre lo ione C· dovrebbe essere incolore. Ma in tal caso la curva di dissociazione apparente (fig. 6) dovrebbe essere parallela a quella della fig. 9, contrariamente al risultato sperimentale. Mentre la mecocianina presenta la minima saturazione rossa a pH = 4,6, al quale essa dovrebbe essere « dissociata » per il 99 %, la curva della fig. 9 (che chiameremo « curva di dissociazione potenziometrica ») fa rilevare che la massima dissociazione come base avviene ad un pH  $\cong$  6. Inoltre se per la mecocianina fosse valida la (10) anche la (1) dovrebbe allora avere anche validità e allora pK avrebbe dovuto essere costante e non variare in funzione del pH. Bisogna quindi ammettere o che non sia valida la (10) o che essa non rappresenti l'unico equilibrio. Che la mecocianina in acidi si comporti come base è un fatto noto da lungo tempo e risulta ancora chiaro dalla curva riportata nella fig. 9. Saremo perciò inclini a pensare che la (10) non rappresenti l'unico equilibrio. Abbiamo visto che

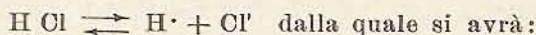
da pH 4,6 in su il colore della mecocianina in H Cl non si modifica praticamente più e che già a pH 4,6 si dovrebbe avere una dissociazione del 99 %. La « curva di dissociazione potenziometrica » dimostra invece un ulteriore aumento della « forza » basica fino a pH  $\cong$  6. Tutto ciò dimostra che la variazione di colore se ha rapporti con la dissociazione basica non è tuttavia a questa direttamente ricollegabile, bensì attraverso un probabile composto, in equilibrio tautomerico con lo ionogeno. Ciò sarebbe ancora corroborato dall'esame delle curve di assorbimento isoidriche che mancano di un tratto o punto isobestico, il che indicherebbe che non sono più due i componenti del sistema. In favore di un equilibrio tautomerico starebbe ancora « l'effetto sali »: il NaCl abbiamo visto che sposta fortemente verso l'alcalino infatti la dissociazione e nel contempo ostacola la dissociazione alcalina della mecocianina.

Per la formulazione di equilibri tautomerici non si può non tener conto delle strutture in risonanza degli antociani (11). Secondo questa teoria non è la struttura oxonica o « carbonica », che spetta unicamente alle antocianine; il loro « normal state corresponds to resonance among them all » (19). Le strutture prevedibili sarebbero le seguenti:





Sviluppando una teoria quanto-meccanica del colore PAULING (20) ha avanzato l'ipotesi che l'intensità e l'altezza del colore dipendono per gli antociani (ed anche per gli altri coloranti) dalla risonanza della carica positiva da un atomo all'altro nell'ambito della molecola. Tale risonanza è in previsione possibile per le forme II-VI le quali perciò dovrebbero essere le responsabili del colore rosso della mecocianina in zona alcalina. Esse forme dovrebbero essere a loro volta in equilibrio con le forme I, le quali ci danno ragione delle proprietà basiche della mecocianina. E tutto ciò s'inquadra perfettamente nei nostri reperti sperimentali, che già da soli ci avevano portato a prevedere l'esistenza di un tautomero neutro colorato in equilibrio con un tautomero incolore alcalino. La forma basica ha una struttura ossonica, con Ossigeno «tetravalente» con un solo doppietto elettronico solitario e perciò stesso come se fosse depositario di una carica elettrica positiva. La ragione del comportamento basico della struttura benzopirilica è forse da ricercarsi nella capacità d'interferire nella dissociazione degli acidi. Nel caso dell'HCl si ha:



$$\frac{[\text{H} \cdot] \cdot [\text{Cl}']}{[\text{H Cl}]} = K_a \quad (11)$$

Per il cloruro della struttura benzopirilica si avrà:

$$\frac{[\text{Bp} \cdot] [\text{Cl}']}{[\text{Bp Cl}]} = K_b \quad (11a)$$

nella quale con Bp si è indicata la struttura benzopirilica.

Moltiplicando membro a membro, invertendo e prendendo i logaritmi decimali si avrà:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{Cl}']}{[\text{H Cl}]} + \text{p}K_b + \log \frac{[\text{Cl}']}{[\text{Bp Cl}]} + \log [\text{Bp} \cdot]$$

Sviluppando i logaritmi dei rapporti avremo:

$$pH = pK_a + pK_b + \log \frac{[Cl']^2}{[HCl]} + \log \frac{[Bp']}{[BpCl]}$$

Mettendo:  $pK_a + pK_b = K$

si avrà:

$$pH = K + \log \frac{[Cl']^2}{[HCl]} + \log \frac{[Bp']}{[BpCl]} \quad (12)$$

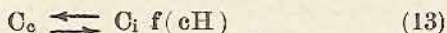
Siccome  $K$  è una costante e  $\log \frac{[Cl']^2}{[HCl]}$  si può considerare

dipendente dall'acido, si può dire che la mecocianina interviene sul pH attraverso il log decimale del rapporto fra la concentrazione dello ione e dello ionogeno della sua struttura benzopirilica.

Poichè le forme I possono facilmente e reversibilmente passare nelle II-VI è molto probabile che i due gruppi di forme siano in equilibrio; equilibrio che dovrebbe spostarsi a favore delle forme II-VI ai pH bassi, ai quali dovrebbe predominare lo ionogeno delle strutture benzopiriliche, a favore delle forme I invece ai pH alti, nei quali per le strutture benzopiriliche dovrebbe predominare lo ione. A  $pH \cong 1$  dovrebbero esistere solo le forme II-VI, a  $pH \cong 6$  invece solo le forme I. Ciò perchè a  $pH \cong 1$  le proprietà basiche sono nulle e massime invece a  $pH \cong 6$ . È perciò probabile che in equilibrio con le forme II-VI sia soltanto lo ionogeno delle forme I.

Il NaCl, che sposta verso i pH alti la «dissociazione» della mecocianina, dovrebbe intervenire in detto equilibrio spostandolo fortemente a favore delle forme neutre. Responsabili dello spostamento sono forse sia il Na<sup>+</sup> come il Cl<sup>-</sup>: il primo per la sua carica elettrica positiva respingendo il catione benzopirilico, il secondo attraverso la (12) aumentando la concentrazione del Cl<sup>-</sup>.

Chiamando con  $C_i$  la mecocianina incolore, con  $C_c$  quella colorata delle forme II-VI, l'equilibrio fra queste e le forme I sarebbe il seguente:



dove con  $C_i f(cH)$  si vuol esprimere il concetto della variabilità della concentrazione della forma  $C_i$  in funzione del pH. Il 1° e 2° membro della (13) rappresentano già la risultante di vari equilibri. Ad equilibrio stabilito della (13) si avrà:

$$\frac{[C_i]}{[C_c]} f(cH) = K_t \quad (14)$$

Mettendo:  $\alpha = C_o$  per cui sarà anche  $1 - \alpha = C_i$  si avrà invertendo e prendendo i logaritmi:

$$\log \frac{\alpha}{1 - \alpha} + f(\text{pH}) = \text{pK}_t \quad (15)$$

che si può mettere a raffronto con la (1).

Se  $\text{pK}$  varia in funzione di  $\text{pH}$  ciò significa che sec. la (1) le variazioni di  $\text{pH}$  non sono perfettamente compensate da variazioni corrispondenti di  $\log \frac{\alpha}{1 - \alpha}$  e che le differenze fra i valori trovati

di  $\log \frac{\alpha}{1 - \alpha}$  e quelli che invece avrebbe dovuto avere secondo la (1) sono una funzione di  $\text{pH}$ . Poichè per  $\alpha = 0,5$   $\log \frac{\alpha}{1 - \alpha} = 0$

per cui la (1) diventa:  $\text{pH} = \text{pK}$ , si può definire il  $\text{pK}$  come quel  $\text{pH}$  al quale l'indicatore è dissociato (o tautomerizzato) per il 50%. Se per la mecocianina il  $\text{pK}$  varia ciò significherebbe che la mecocianina sarebbe dissociata per il 50% a  $\text{pH}$  differenti, e siccome ciò non avrebbe senso, si potrebbe allora pensare che la mecocianina si trasformasse in uno dei tanti tautomeri in risonanza, ognuno dei quali avrebbe una dissociazione apparente del 50% a vario  $\text{pH}$ . Ma ad ogni scarto per quanto piccolo di  $\text{pH}$  corrisponde un nuovo  $\text{pK}$  per cui dovrebbero essere infiniti i tautomeri in risonanza della mecocianina. E siccome anche ciò è impossibile non resta che ammettere un continuo «assestamento» dell'equilibrio fra le forme che abbiamo chiamato  $C_i$  e  $C_o$  in modo che la quantità loro complessiva ai vari  $\text{pH}$  non sia = 1, ma vari. E ciò non può aversi se non ammettendo che alcune delle forme in risonanza non abbiano influenza sull'equilibrio (13), e solo altre, che chiameremo «attive», partecipino invece attivamente all'equilibrio (13). Ciò potrebbe esprimersi brevemente dicendo che la somma delle concentrazioni dei due componenti del sistema in equilibrio vari col variare del  $\text{pH}$ . Perciò solo alcune delle forme conglobate nei simboli  $C_i$  e  $C_o$  sono attive, contribuiscono cioè nella determinazione dell'equilibrio (13). Qualche dato numerico tratto dalla Tabella II vale a chiarire il presente concetto più che altre parole: in ac. citrico a  $\text{pH} = 4,3$  il  $\text{pK}$  è 3,58; il che significa che le due forme in equilibrio sono in uguale concentrazione a  $\text{pH} = 3,58$ . A quest'ultimo  $\text{pH}$  il  $\text{pK}$  dovrebbe essere anch'esso di 3,58 ed invece si trova uguale a 3,4. Ora se si mettono = 100 tutte le molecole colorate ed incolore a  $\text{pH} 4,3$ , a questo  $\text{pH}$  84 sono le molecole incolore, 16 quelle colorate; per quanto si è detto sopra a  $\text{pH} 3,58$  le molecole colorate ed in-

colori dovrebbero essere uguali per numero fra di loro, cioè 50 ciascuno, ed invece si trova che ve ne sono 60 incolori e 40 colorate, cioè si trovano nel rapporto:

$$\frac{\alpha}{1 - \alpha} = \frac{4}{6} = \frac{2}{3}. \quad (16)$$

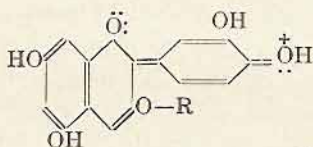
La differenza fra i valori trovati e quelli calcolati, secondo la interpretazione data sopra, sarebbe dovuta al fatto che sono entrate a « far parte » dell'equilibrio altre forme « attive », che le 100 molecole « attive » a pH 4,3 sono passate a 125 a pH 3,58. Infatti sostituendo nella (16) a 1 1,25 si ottiene per  $\alpha = 0,5$ :

$$\frac{0,50}{1,25 - 0,50} = \frac{0,50}{0,75} = \frac{2}{3} \quad (17)$$

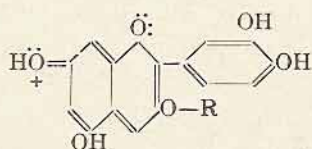
un rapporto cioè identico a quello della (16).

Secondo questa interpretazione perciò la mecoecianina seguirebbe in effetti fedelmente la (1) e solo in apparenza se ne discosterebbe, in quanto altri equilibri vengono a turbare l'equilibrio del sistema (13). La combinazione di questi equilibri porta alle (5) e (6). La variazione di pK è perciò solo apparente e pure parzialmente apparente è la variazione di  $\alpha$  in funzione del pH secondo la (6).

Le forme che possono turbare l'equilibrio (13), oltre che dalle II - VI (zona acida) è probabile derivino anche dalle seguenti, che verisimilmente sono anch'esse in equilibrio con le I e sulle quali avremo occasione di ritornare fra breve.



VII

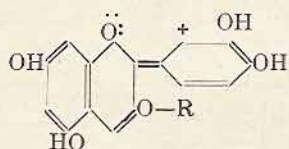


VIII

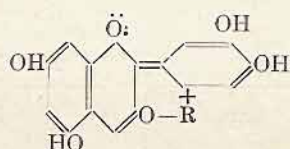
Dall'esempio numerico portato sopra e tratto da dati sperimentali si è visto infatti che con l'abbassarsi del pH aumenta il numero delle molecole « attive » le quali è probabile traggano origine da forme al di fuori di quelle dell'equilibrio (13) e che potrebbero appunto identificarsi con le VII - VIII. In conseguenza i valori di  $\alpha$  e di pK, che si avvicinano di più a quelli calcolabili con la (1) dovrebbero essere quelli trovati ai pH più bassi, in corrispondenza dei quali è proprio presumibile che altre forme oltre le I - VI non ne esistano. Nè sembra a priori verisimile, data la notevole rassomiglianza strutturale, che alcune delle I o delle II - VI entrino a far parte ed altre no nell'equilibrio. Le curve ottenute con la (3) e la

(6) dovrebbero perciò avere una limitazione ai pH bassi, come infatti abbiamo già avuto occasione di far rilevare e come effettivamente viene dimostrato dal contrasto fra la curva della fig. 6, ottenuta con la (6) ed i risultati sperimentali. Infatti mentre l'esperimento dimostra che  $\alpha$  diminuisce col decrescere del pH, secondo la (6) invece da pH 1,6 in giù  $\alpha$  aumenta. Per ciò stesso il limite inferiore di validità della (6) si può fissare a pH 1,6 e corrispondentemente si potrebbe dedurre che da questo pH indietro potrebbe avere validità la (1), il cui limite superiore di validità sarebbe perciò dato da pH 1,6.

Le forme VII e VIII dovrebbero essere collegate col colore « più alto » (blu, azzurro) presentato dalle antocianine. Il loro carattere acido è dato dai gruppi fenolici, ed è rinforzato dalla carica positiva degli ossigeni, portanti un solo doppietto elettronico solitario, la quale scaccia perciò il protone (19). Nella curva della fig. 9 si vede appunto che la massima acidità la mecocianina la presenta a pH  $\cong$  10. A pH più elevati, ai quali l'acidità tende a ridursi, la mecocianina si trasforma probabilmente nelle forme IX e X, dalle quali infine a pH 12 prendono origine la leucoantocianina (36,35) e successivamente ac. protocatechico e fluoroglucina.



IX



X

Non abbiamo approfondito ed estese le ricerche sul comportamento della mecocianina nella zona alcalina in quanto con l'invecchiarsi della soluzione alcoolica il suo comportamento cromatico può modificarsi radicalmente, come dimostrano le due Tabelle VI e VII eseguite a 3 mesi di distanza l'una dall'altra. Perciò i dati ottenuti non avrebbero dato affidamento veruno di certezza.

TABELLA VI

| pH     | D %  | K     | $\alpha$ | pK   |
|--------|------|-------|----------|------|
| 6,8    | 43,2 | . 365 | 0,335    | 7,1  |
| 9,136  | 16,7 | . 777 | 0,713    | 8,74 |
| 9,329  | 16,4 | . 785 | 0,718    | 8,92 |
| 11,905 | 8,1  | 1,092 | —        | —    |
| 12,845 | 8,2  | 1,086 | —        | —    |
| 13,53  | 8,1  | 1,092 | —        | —    |

TABELLA VII

(Risultati conseguiti con la medesima soluzione a tre mesi di distanza)

| pH     | D %   | K      | $\alpha$ | pK    |
|--------|-------|--------|----------|-------|
| 7,163  | 45,93 | . 337  | 0,455    | 7,086 |
| 7,828  | 66,55 | . 1775 | 0,978    | 6,176 |
| 8,158  | 70,73 | . 15   | —        | —     |
| 8,349  | 70,23 | . 153  | —        | —     |
| 9,275  | 70,54 | . 152  | —        | —     |
| 11,569 | 69,42 | . 158  | —        | —     |

La sostanziale differenza di comportamento della mecocianina in soluzione alcolica con l'invecchiamento della soluzione può essere eliminata per «neutralizzazione» con NaOH o per essiccamento della sua soluzione alcolica alla temperatura ambiente. Gli esperimenti riportati nelle seguenti due Tabelle VIII e IX sono stati eseguiti gli uni sopra la soluzione neutralizzata qualche giorno prima (Tabella VIII), gli altri sopra polvere della sostanza, ottenuta per essiccamento della soluzione alcolica a temperatura ambiente, anche qualche giorno prima ed a breve intervallo di tempo, entrambi le serie di esperimenti, da quelli della Tabella VII.

TABELLA VIII

| pH     | D %   | K      | $\alpha$ | pK    |
|--------|-------|--------|----------|-------|
| 6,59   | 26,59 | . 5753 | 0,684    | 6,924 |
| 7,88   | 19,42 | . 7116 | 0,846    | 7,14  |
| 12,369 | 14,42 | . 8414 | —        | —     |

TABELLA IX

| pH    | D %   | K      | $\alpha$ | pK    |
|-------|-------|--------|----------|-------|
| 5,408 | 49,96 | . 3012 | —        | —     |
| 6,175 | 45,1  | . 346  | 0,13     | 7,0   |
| 6,455 | 41,56 | . 3817 | 0,22     | 7,005 |
| 7,87  | 29,16 | . 5356 | 0,44     | 7,975 |
| 9,28  | 22,8  | . 642  | 0,53     | 9,23  |
| 9,595 | 18,66 | . 7292 | 0,59     | 9,437 |

Quello che malgrado l'instabilità della sostanza si può rilevare in zona alcalina è una variazione anche qui del pK, probabilmente secondo una funzione altrettanto ben determinabile come in zona

acida. Non abbiamo ricavato la funzione in conseguenza dell'instabilità, l'insicurezza e la scarsità dei dati.

Crediamo tuttavia da quanto osservato poter fare le seguenti deduzioni:

1) È probabile che anche in zona alcalina lo spostamento del  $pK$  col  $pH$  sia in relazione «all'immissione» di altre molecole nell'equilibrio fra le forme colorate e quelle incolore.

2) Siccome il colore s'intensifica da  $pH$  6 a  $pH$  12 mentre la massima acidità la mecocianina la presenta a  $pH$  10, non si può pensare all'identità del cromogeneo con lo ione (o lo ionogeno) e ammettere che le variazioni di colore siano solo relative alla dissociazione ionica di un acido, il cui ionogeno sia incolore e lo ione invece colorato. Con tutta probabilità siamo anche qui in presenza di un equilibrio complesso fra forme tautomere da una parte, ioni e ionogeni dall'altra.

Non è improbabile che le forme in risonanza IX e X siano le responsabili del colore in zona alcalina, in quanto in esse la carica elettrica positiva può oscillare fra gli atomi di C 1' e 5' e queste siano le forme prevalenti nell'estremo alcalino, dove si viene ad avere la minima acidità, e siano a loro volta in equilibrio con le forme VII- VIII, responsabili delle proprietà acide, le quali infine sarebbero a loro volta in equilibrio con le strutture benzopiriliche (forme I<sub>a</sub>, b, c).

Anche in zona alcalina non è improbabile che ai più bassi  $pH$  si abbia un equilibrio semplice e che perciò a questi  $pH$  abbia validità la (1), come è dimostrato dal fatto (v. Tab. IX) che il  $pK$  da  $pH$  6,17 a 6,45 praticamente non vari, mentre per uno scarto di  $pH$  quasi uguale (da 9,28 a 9,59) il  $pK$  si porti da 9,23 a 9,43.

## CONCLUSIONI

Le variazioni di colore degli antociani in rapporto alla reazione del mezzo sono note da lungo tempo. Non è sopra di esse che abbiamo voluto soffermarci quanto sulle particolarità, sulle leggi, sulle espressioni algebriche che governano e regolano i detti cambiamenti di colore, nonchè sullo studio delle forme o strutture che ad ogni zona di  $pH$  e quindi ad ogni colore competono. Sono emerse così delle nozioni, che non credo inutili sia per la conoscenza delle proprietà chimico-fisiche degli antociani, sia per lo studio generale degli indicatori, come infine per il ruolo e l'importanza biologica degli antociani.

È probabile infatti che altri indicatori seguano il comportamento della mecocianina e che il loro studio sistematico, sulla traccia di quello da noi condotto, possa portare all'amplificazione di quell'angusta serie di indicatori elaborata da CLARK e da SÖRENSEN e possa portare a più ampie e particolari e insospettate possibilità d'impiego pratico comodo e preciso per un numero notevole di altri indicatori scartati finora. I risultati del presente lavoro potrebbero poi costituire punto di partenza per lo studio dell'intimo meccanismo d'azione dell'« errore da sali » e forse anche dell'« errore da proteine » degli indicatori. L'enorme influenza dei sali neutri sul colore della mecocianina messa in evidenza da noi, annulla infine la validità di tutte le proposte d'impiego degli antociani come indicatori acido-basici, sin qui avanzate senza criterio e serietà, e tutte le deduzioni circa la determinazione del pH del succo cellulare attraverso il colore dei vegetali stessi o di estratti in soluzioni saline di esse.

L'influenza dei sali sul colore dei vegetali contenenti antociani dev'essere considerevole. Essa consiste nel « fissare » un colore mantenendolo anche a pH compatibili con la vita cellulare ed in corrispondenza dei quali, in assenza dei sali, gli antociani in qualsivoglia alta quantità sarebbero pressochè incolori. L'ineguale distribuzione dei sali nella cellula, in corrispondenza di organuli e di membrane, potrebbe già di per se sola portare a modificazioni del colore già nell'ambito della stessa cellula. Certo che non è questo l'unico fattore di colorazione degli antociani nella cellula vegetale; esso è uno dei tanti, ma non credo dei meno importanti (42). Esso andrebbe ad aggiungersi agli altri effetti biochimici influenzanti il colore dei vegetali e costituenti altrettanti caratteri mendeliani ereditari, indipendenti ed interagenti.

Il nostro studio ci ha permesso di rilevare la possibilità d'impiego della mecocianina per la determinazione del pH acido entro determinati limiti e, nel caso che si conosca la natura dell'acido, in assenza di sali. Le limitazioni d'impiego sono numerose, ma i risultati sono esatti e l'uso economico.

Dal punto di vista biologico la larga diffusione degli antociani nei fiori frutta e molte altre parti di vegetali, la loro stretta parentela chimica con i catecoli e le antoxantine (flavoni, flavonoli, flavanoni, isoflavoni), delle quali dovrebbe far parte il fattore P (= fattore permeabilità), la possibilità intravista, ammessa ma non ancora comprovata in vivo di far parte di sistemi redox credo giustifichino già di per sè sole il lavoro, che può contribuire a chiarire qualche punto dei problemi sopra esposti.

In vitro gli antociani si riducono reversibilmente in catecoli con  $\text{Zn} - \text{ac}$  acetico e in via fitochimica. Non si è riusciti invece a realizzare il processo opposto. Ragione per cui REICHEL & BURKART credono che le piante o dispongono di un sistema redox sconosciuto ovvero che gli antociani siano in esse formate direttamente senza lo stadio delle antoxantine. Non è improbabile che solo qualcuna delle forme in risonanza sia in equilibrio redox con le antoxantine e che perciò solo dall'apparenza di un colore nelle piante possa desumersi la presenza e la localizzazione di un processo redox, con formazione di antocianine dalle antoxantine. Crediamo che su questa via possa essere avviato l'importante annoso problema. Non è poi escluso che in certe zone del pH (e perciò con certi colori) le relative forme in risonanza tendono a ridursi, in altre zone invece ad ossidarsi.

# R I A S S U N T O

1) Le curve d'assorbimento approssimative della mecocianina mostrano un netto massimo sui 500  $\text{m}\mu$ , da pH 1 a 5, un altro massimo spostato verso il rosso a  $\text{m}\mu$  570 da pH 8 in su. A  $\text{pH} > 12$  la mecocianina viene in pochi minuti scissa in fluoroglucina e acido protocatechico, donde la comparsa del colore verde (blu + giallo) prima, giallo chiaro dopo a scissione avvenuta. I sali ( $\text{NaCl}$ ) modificano le curve d'assorbimento.

2) I cambiamenti di colore della mecocianina col pH non seguono l'espressione fondamentale:  $\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\alpha}{1 - \alpha}$ , ma un'altra generale:

$$- a \text{pH}^2 + (b - 1) \text{pH} = - \log \frac{\alpha}{1 - \alpha}$$

Il pK varia in funzione del pH secondo l'espressione generale:

$$\text{pK} = - a \text{pH}^2 + b \text{pH}$$

La ragione della variazione viene riportata all'immissione di nuove forme « attive » negli equilibri che stabiliscono le dette relazioni. Il limite inferiore di validità dell'espressioni di cui sopra è a pH 1,6; il limite superiore pare vari con la natura dell'acido ed è compreso fra pH 4 e 5. Da pH 1,6 in giù ha forse validità l'espressione (1).

3) Ad ogni zona di pH corrisponde probabilmente una struttura (od un insieme di strutture in equilibrio). È altresì probabile che non alle forme acide (in mezzo alcalino) o alcaline (in mezzo acido) spetti il colore, bensì a forme neutre in equilibrio con queste. Le proprietà basiche della struttura benzopirlica sono riportabili alla carica elettrica positiva della medesima in corrispondenza dell'O oxonico, che probabilmente riduce il grado di dissociazione o il coefficiente di attività dell'acido. Le proprietà alcaline sono invece riferibili alle strutture chinoniche, il cui O

elettropositivo scaccia il protone. Il Na Cl ostacola, tanto più quanto più è concentrato, la formazione di strutture benzopiriliche, dai cromogeni rossi, spostando fortemente verso i pH elevati il grado di dissociazione apparente.

### R É S U M É

1) Les courbes d'absorption de la mérocyanine montrent un maximum approximative à 500 m $\mu$  à un pH de 1 à 5, et un autre maximum déplacé vers le rouge, qu'on distingue bien à un pH 8. A pH > 12 la mérocyanine vient rapidement détruite en donnant lieu à la phluoroglucine et à l'ac. pyrocathélique, en même temps que le couleur vire au vert (bleu + jaune) et ensuite au jaune. Les sels (NaCl) modifient les courbes d'absorption.

2) Les changements de couleur de la mérocyanine par le pH ne suivent pas la loi générale:  $\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\alpha}{1-\alpha}$  mais l'expression suivante:

$$-a \text{ pH}^2 + (b - 1) \text{ pH} = -\log \frac{\alpha}{1-\alpha}$$

pK varie en fonction du pH selon l'expression générale:

$$\text{pK} = -a \text{ pH}^2 + b \text{ pH}$$

On rapporte la cause de cette variation à l'introduction de nouvelles formes « actives » dans les équilibres, qui sont à base des relations ici données.

Les limites de validité des expressions vont de pH 1,6 à pH 4-5. Au dessous de pH 1,6 c'est, peut être, l'expression  $\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\alpha}{1-\alpha}$  qui a validité

3) On peut assigner à la mérocyanine une structure pour chaque zone de pH. Il est probable que le couleur provient non de formes acides (en milieu alcalin) ou des formes alcalines (en milieu acide) mais bien des structures neutres en équilibre avec les premiers. La charge électrique positive de l'O de la structure benzopyrrique est responsive des propriétés basiques; les structures chinoides au contraire des propriétés acides. Na Cl semble s'opposer à la formation des structures benzopyrriques.

### S U M M A R Y

1) Mero-cyanin exhibits two absorption maximums in the visible: towards 500 m $\mu$  from pH 1 to 5, towards 570 m $\mu$  at pH > 8. At pH > 12 mero-cyanin undergoes dissolution within a few minutes, phluoroglucine and pyrocathelic acid taking in the meantime place and the colour becoming green and then yellow. Salts, such as Na Cl, change the absorption curves.

2) Man cannot estimate mero-cyanin colour variation from the pH fonction by the general relationship:  $\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\alpha}{1-\alpha}$ ; the following

relationships have been found:  $-a \text{ pH}^2 + (b - 1) \text{ pH} = -\log \frac{\alpha}{1-\alpha}$  and  $\text{pK} = -a \text{ pH}^2 + b \text{ pH}$ , which relate pH to  $\alpha$  and pK.

pK variation has been interpreted as being due to intervention or displacement of molecules, which are capable to influence equilibria states. Validity ranges of the given relationships go from pH 1,6 to 4–5. Under pH 1,6 relationship  $\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\alpha}{1-\alpha}$  may have full value

3) Some structures of mecocyanin, in resonance among them, can be assigned to every pH zone. Mecocyanin red colour in acid solution, where mecocyanin exhibits alkaline properties, and mecocyanin violet colour in alkaline solution, where mecocyanin exhibits acid properties, are probably not directly responsible of colour itself. Other structures than cations (benzopyrilium) or anions (chinoids) are probably responsible of mecocyanin colours. Neutral salts, as Na Cl, inhibit the formation of benzopyrilium structures.

## Z U S A M M E N F A S S U N G

1) Die Absorptionskurve von Mecocyanin zeigt einen Berg in säuren Medium zu 500 m $\mu$  (pH 1–5), und einen Berg in alkaline Medium zu 570 m $\mu$  (pH > 8).

Mecocyanin ist plötzlich gespalten in Phluoroglucin und Protocatechinsäure bei pH > 12. Die Farbe bekommt grüne und dann gelbe. Na Cl verändert die Absorptionskurve.

2) Mecocyaninfarbenumschlage ist eine pH Funktion, nach der klassische Formel:

$$\text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\alpha}{1-\alpha}$$

wenn pH < 1,6 ist. —  $\alpha$  und pK sind beide Funktionen von pH nach den Formeln:  $-a \text{ pH}^2 + (b - 1) \text{ pH} = -\log \frac{\alpha}{1-\alpha}$  und  $\text{pK} = -a \text{ pH}^2 + b \text{ pH}$  wenn  $4 \div 5 > \text{pH} > 1,6$  ist.

Die Abwechselung von pH ist wahrscheinlich zu schreiben zu Molekelzahlverwechslung zu, die die Gleichgewichtslage bedingen.

3) Man kann schreiben eine bestimmte Molekülbau zu jeder pH Zone zu. Die roten Mecocyaninmolekülgestalten, die alkaline Eigenschaften besitzen, und die weichenblauen Mecocyaninmolekülgestalten, die saure Eigenschaften besitzen, sind nicht wahrscheinlich unmittelbar verantwortlich für Farben, wohl aber andere Molekülgestalten, die in Gleichgewicht mit den ersten sind. Neutralsalzen, so wie Na Cl, hindern die Bildung von Benzopyriliumgestalten.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) BERGMAN E.: 1933, *Erg. Physiol.*, **35**, 158.
- (2) BUCH J. S. and HEILBRON J. M.: 1924, *J. chem. Soc.*, **123**, 2521.
- (3) BUXTON B. H. and DARBISHIRE F. W.: 1929, *J. Genet.*, **21**, 71.
- (4) CHEVALLIER A.: 1820, *J. Pharmacie*, **6**, 177.
- (5) CLARK W. M.: *The determination of hydrogen ions.*, III Ed., Baillière, Tyn-dall & Cx, London, 1928.
- (6) DEKKER J.: *Die Anthocyane*. Da HOUBEN J.: *Die Methoden der organischen Chemie*, B. III, III Ed., G. Thieme, Leipzig, 1930, pagg. 1009-59.
- (7) FONSECA E. L. and R. ROBINSON: 1931, *J. chem. Soc.*, 2730.
- (8) GROVE K. E., MOTOTARO IMBUSE and R. ROBINSON: 1934, *J. chem. Soc.*, 1698.
- (9) GUILLIERMOND A.: 1933 e 1934, *Rév. gén. Bot.*, **45** e **46**, 158, 258, 307, 379, 455, 508, 596, 683 e 50, 89.
- (10) HARROW B.: 1930 II, *Science* (N. Y.) **486**.
- (11) HILL D. W.: 1936, *Chem. Rev.*, **19**, 27.
- (12) JONESCO ST.: 1921, *C. R. hébd. d. séanc. Acad. Sc.*, **173**, 426.
- (13) JONESCO ST.: 1922, *C. R. hébd. d. séanc. Acad. Sc.*, **174**, 1635.
- (14) KARRER P., R. WIDMER, A. H. HELFENSTEIN, W. HÜRLIMAN, O. NIEVERGELT und P. TH. MONSARRAT: 1927, *Helv. Chim. Acta*, **10**, 729.
- (15) KARRER P. und A. HELFENSTEIN: 1932, *Ann. Rev. Biochem.*, **1**, 550.
- (16) LAWRENCE W. J. C.: 1932, **1**, *Nature* (London), 834.
- (17) LEVY F. and ROBINSON R.: 1931, *J. chem. Soc.*, 2715.
- (18) NOACK K.: 1922, *Z. Bot.*, **14**, 1.
- (19) PAULING L.: 1939, *Fortschritte d. Chem. org. Naturstoffe*, **3**, 218.
- (20) PAULING L.: 1939, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **25**.
- (21) PAYEN A. et CHEVALLIER A.: 1822, *J. Pharmacie*, **8**, 483.
- (22) PELLACCI G.: 1876, *Gazz. Chim. It.*, **6**, 35.
- (23) PRATT D. B. and SWARTOUT H. D.: 1930, **1**, *Science* (N. Y.), 486.
- (24) PRATT D. B. and R. ROBINSON: 1923, *J. chem. Soc.*, **123-4**, 745.
- (25) REICHEL L. and W. BURKART: 1938, *Lieb. A.*, **536**, 164.
- (26) ROBERTSON A. and R. ROBINSON: 1929, *Biochem. J.*, **29**, 35.
- (27) ROBERTSON A. and R. ROBINSON: 1926, *J. chem. Soc.*, 1951.
- (28) ROBERTSON A. and R. ROBINSON: 1926, *J. chem. Soc.*, 1951.
- (29) ROBINSON G. M. and ROBINSON R.: 1932, *Biochem. J.*, **26**, 1647.
- (30) ROBINSON G. M.: 1939, *J. amer. chem. Soc.*, **61**, 1606.
- (32) ROBINSON G. M. and ROBINSON R.: 1931, *Biochem. J.*, **25**, 1687.
- (33) ROBINSON G. M. and ROBINSON R.: 1933, *Biochem. J.*, **27**, 206.
- (34) ROBINSON G. M. and R. ROBINSON: 1932, *Biochem. J.*, **26**, 1647.
- (35) ROBINSON G. M. and R. ROBINSON: 1933, *Biochem. J.*, **27**, 206.
- (36) ROSENHEIM O.: 1920, *Biochem. J.*, **14**, 178.
- (37) SACHER J. F.: 1910, *Chem. Z.*, **34**, 1333.
- (38) SCHMID L. und R. HUBER: 1930, *Sitzgsber. Akad. Wiss. Wien, Math. — Naturwiss. Kl.*, 1049.
- (39) SCHMID L. und R. HUBER: 1931, *Monath.*, **57**, 383.
- (40) SCHON S. H.: 1927, *Helv. Chim. Acta*, **10**, 907.
- (41) SCOTT-MONCRIEFF R.: 1930, *Biochem. J.*, **24**, 753.
- (42) SCOTT-MONCRIEFF R.: 1939, *Erg. Enzymfschg.*, **8**, 277.
- (43) SMITH E. P.: 1933, *Protoplasma*, **18**, 112.
- (44) SÖRENSEN S. P. L.: 1912, *Erg. Physiol.*, **12**, 393.
- (45) TASAKI T.: 1927, *Acta Phytochimica*, **3**, 1.
- (46) WEBER F.: 1936, *Protoplasma*, **26**, 100.
- (47) WHELDALE M.: *The anthocyanin pigments of plants.* — Cambridge University Press, 1916, pagg. 318.
- (48) WILSTÄTTER R. und R. ZÖLLINGER: 1916, *Lieb. A.*, **412**, 195 e 1915, *Lieb. A.*, **408**, 147 (insieme con la MALLISON).
- (49) WILSTÄTTER R. und F. J. WEIL: 1916, *Lieb. A.*, **412**, 182.