



УДК 547.972+582.632

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ БЕРЕЗЫ

IV. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГРУППЫ ФЛАВОНОИДНЫХ АГЛИКОНОВ
В ПОЧКАХ БЕРЕЗЫ БОРОДАВЧАТОЙ (*BETULA VERRUCOSA*) **Ионраво С. А., Кононенко Г. П., Тихомирова В. И.,
Вульфсон Н. С.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Описана идентификация в виде метиловых и тридейтерометиловых эфиров 16 флавоноидных агликонов, содержащихся в экстрактах почек березы бородавчатой: кемпферола, рамназина, пектолинарингенина, 5,7,4'-триокси-6-метоксифлавона, бетулетола и его 3-метилового эфира.

Ранее мы сообщали о выделении в индивидуальном виде и идентификации в экстрактах зимующих почек березы бородавчатой 9 флавоноидных агликонов и о зависимости их содержания от фаз развития растения [1, 2]. Выделение остальных флавоноидных агликонов, присутствующих в экстрактах почек, представило значительные экспериментальные трудности, поскольку они обладали близкими физико-химическими характеристиками и образовывали хроматографически трудно разделяемые смеси. Ввиду этого мы провели идентификацию соединений данного типа в смесях, используя для этой цели хроматографию, масс-спектрометрию и спектроскопию ЯМР их полных метиловых и тридейтерометиловых эфиров. В результате в экстрактах почек березы идентифицированы еще 6 флавоноидных агликонов.

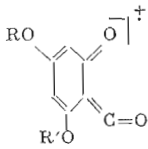
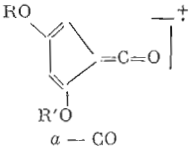
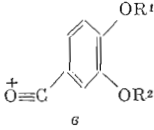
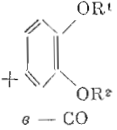
Для идентификации элюаты хроматографических зон, оставшиеся после отделения ранее описанных флавоноидов [2], объединили в две смеси (А и Б), каждая из которых была подвергнута исчерпывающему метилированию и тридейтерометилированию действием иодистого метила или его тридейтерометилового аналога в растворе диметилсульфоксида в присутствии гидрида натрия [3]. Продукты реакции разделяли хроматографически на пластинках с силикагелем и исследовали масс-спектрометрически.

После исчерпывающего метилирования смеси А продукт реакции хроматографически был разделен на две фракции с R_f 0,51 (A_1) и 0,42 (A_2). Фракция A_1 оказалась идентичной 3,5,7,4-тетраметоксифлавону (II), полученному исчерпывающим метилированием заведомого образца кемпферола (I). При исчерпывающем тридейтерометилировании смеси А также были получены две фракции с теми же значениями R_f . Однако в масс-спектре первой из них (A_1-d_3) четко выявились два пика молекулярных

* Сообщение III см. [1].

Таблица 1

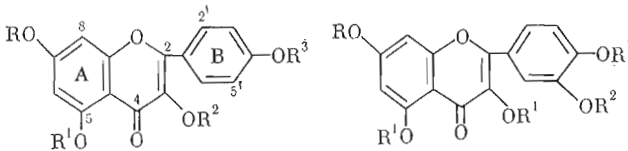
Основные характеристические данные масс-спектров фракций A_2 и A_2-d_3

Фракция	m/e (относительная интенсивность, %)					
	M^+	$(M-H-H_2O)^+$				
A_2	372(100)	353(22) *	180(1)	152(3)	165(7)	137(6)
A_2-d_3	384(15)	363(3)	186(1)	158(1)	} 168(7)	} 140(7)
	381(100)	360(17)	183(2)	155(5)		

* Ион $(M-H-H_2O)^+$.

ионов с m/e 351 и 354. Это указывало на содержание в исходной смеси А двух агликонов, имеющих одинаковый 3,5,7,4'-тип замещения. Очевидно, пик иона с m/e 354 принадлежит тетра(тридейтерометокси)флавонову (III), а пик с m/e 351, судя по наличию в спектре пика иона с m/e 135, содержащего кольцо В, — 3,5,7-три(тридейтерометокси)-4'-метоксифлавонову. Эти результаты свидетельствуют о наличии в исходной смеси А кемпферола (I) и кемпфериды (IV), выделенных нами ранее [2].

Фракция A_2 оказалась идентичной 3, 5, 7, 3', 4'-пентаметоксифлавонову (VII), полученному исчерпывающим метилированием заведомого образца кверцетина (VI). Однако во фракции A_2-d_3 , выделенной после исчерпывающего тридейтерометилирования смеси А, были обнаружены пики двух молекулярных ионов при m/e 384 и 381 (см. табл. 1). Первый из них, имеющий меньшую интенсивность (15% от интенсивности второго), принадлежит тетра(тридейтеро)метиловому эфиру (IX) изорамнетина (VIII), выделенного нами ранее [2].

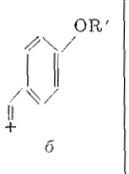


- (I) $R=R^1=R^2=R^3=H$
 (II) $R=R^1=R^2=R^3=CH_3$
 (III) $R=R^1=R^2=R^3=C^2H_5$
 (IV) $R=R^1=R^2=H, R^3=CH_3$
 (V) $R=R^1=H, R^2=R^3=CH_3$

- (VI) $R=R^1=R^2=H$
 (VII) $R=R^1=R^2=CH_3$
 (VIII) $R=R^1=H, R^2=CH_3$
 (IX) $R=R^1=C^2H_5, R^2=CH_3$
 (X) $R=R^2=CH_3, R^1=C^2H_5$
 (XI) $R=R^2=CH_3, R^1=H$

Второй пик при m/e 381, очевидно, обусловлен присутствием в этой фракции эфира, содержащего одну метоксигруппу. Фрагменты, содержащие кольцо В (ионы ϵ и $\epsilon-CO$) с m/e 168 и 140 (табл. 1), свидетельствуют о расположении в нем метокси- и дейтерометоксигрупп. С другой стороны, наличие в спектре смеси характеристических пиков ионов с m/e 363 и 360, отвечающих выбросу M^+-H-H_2O , говорит о наличии 3,5-ди(тридейтерометокси)групп [4]. Наконец, присутствие пиков ионов a и $a-CO$ с m/e 183 и 155 в спектре эфира с M^+ при m/e 381 позволяет заключить, что в положении 7 находится метоксигруппа. В спектре ЯМР фракции (A_2-d_3) выявились два трехпротоновых синглета при 3,96 и 3,92 м.д. Из данных спектров ЯМР заведомых образцов тридейтерометилловых эфиров соедине-

Основные характеристические данные масс-спектров продуктов фракций Б₂ и Б₂-d₃

Фракция	<i>m/e</i> (относительная интенсивность, %)					
	<i>M</i> ⁺	(<i>M</i> -CH ₃) ⁺	 <i>a'</i> - CH ₃	 <i>a'</i> - CH ₃ -CO	 <i>b</i>	 <i>c</i>
Б ₂	342(40)	327(100)	195(3)	167(6)	132(2)	135(2)
Б ₂ -d ₃	348(42)	333(100)	} 201(5)	} 173(8)	132(4)	135(6)
	351(6)	336(12)				

ний (IV), (V), (VIII), а также трех 5,7,4'-тризамещенных флавонов следовало, что сигналы протонов 3,5,3'-метоксигруппы находятся при 3,96 м.д., а 7- и 4-метоксигруппы — при 3,92 и 3,88 м.д. соответственно. Следовательно, в кольце В молекулы присутствуют 3'-метокси-4'-тридейтерометоксигруппы, и эфир с *M*⁺ при *m/e* 381 является 3,5,4'-три(тридейтерометокси)-7,3'-диметоксифлавоном (X). Таким образом, в смеси А кроме трех указанных выше агликонов содержится рамназин (XI).

После исчерпывающего метилирования смеси Б и последующего хроматографирования (ТСХ) выделены три фракции с *R_f* 0,51 (Б₁), 0,76 (Б₂) и 0,85 (Б₃). Первая из них оказалась идентичной 3,5,7,4'-тетраметоксифлавону (II), выделенному из продукта метилирования смеси А. При исчерпывающем тридейтерометилировании смеси Б также получены три фракции с теми же значениями *R_f*. Однако в масс-спектре первой из них (Б₁-d₃) четко выявились два пика молекулярных ионов с *m/e* 351 и 348 и все пики, характерные для тридейтерометилловых эфиров кемпфериды (IV) и 5,7-диокси-3,4'-диметоксифлавоны (V), ранее выделенных нами в индивидуальном виде [2].

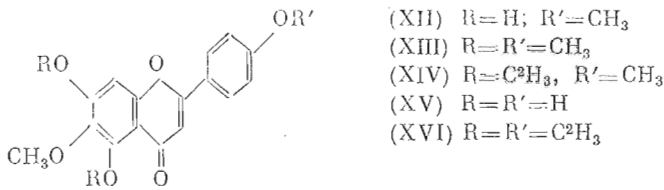
Фракция Б₂, судя по значению *m/e* молекулярного иона, является тетраметоксифлавоном, а максимальная интенсивность в спектре пика иона (*M*-CH₃)⁺ (табл. 2) указывает на нахождение одной из метоксигрупп при C₍₆₎ или C₍₈₎ [4]. В спектре ЯМР этой фракции присутствует пара двухпротонных дублетов при 7,00 и 7,82 м.д. с *J* 9 Гц, что однозначно указывает на расположение одной метоксигруппы в 4'-положении. Это также подтверждается наличием в масс-спектре пиков ионов *b* и *c* с *m/e* 132 и 135. Фрагменты, содержащие кольцо А — ионы *a*-CH₃ и *a*-CH₃CO с *m/e* 195 и 167, свидетельствуют о расположении в нем трех метоксигрупп, одна из которых, как уже указывалось, находится при C₍₆₎ или C₍₈₎. В спектре ЯМР протонам этих заместителей соответствуют три синглета при 4,00; 3,98 и 3,92 м.д. (запись спектра в C²HCl₃). Как видно из данных табл. 3, при повторной записи спектра в смеси C²HCl₃-C₆H₆ (1:1) наблюдается смещение двух последних сигналов на 0,11 и 0,54 м.д. в область более сильного поля, что имеет диагностическое значение и позволяет отнести их к 5,7- и 6-метоксигруппам [5]. Тогда однопротонные сигналы при 6,58 и 6,78 м.д. принадлежат атому водорода у C₍₃₎ и единственному протону при C₍₈₎ [6]. Действительно, сравнение ЯМР- и масс-спектров этой фракции со спектрами эфира (XIII), полученного из пектолиларингенина (XII), показало полную идентичность этих веществ.

Присутствие в масс-спектре фракции (Б₂-d₃) двух пиков молекулярных ионов с *m/e* 348 и 351 свидетельствует о наличии в ней двух компонентов, причем содержание второго, судя по интенсивности пиков *M*⁺ и (*M*-CH₃)⁺, примерно в 7 раз меньше первого (см. табл. 2). Оба компонента фракции, судя по присутствию в спектре пиков ионов (*M*-CH₃)⁺, имеют 6-метокси-

Основные характеристические данные ЯМР-спектров фракций Б₂ и Б₂-d₃ и эфиров (XIII) и (XIV)

Фракция или вещество	Растворитель	δ, м.д.			
		5-OMe	7-OMe	6-OMe	4'-OMe
Б ₂	C ² HCl ₃	4,00с	3,98с	3,92с	3,89с
	C ² HCl ₃ - C ₆ H ₆ (1 : 1)	4,00с	3,44с	3,81с	3,47с
Б ₂ -d ₃	C ² HCl ₃	—	—	3,93с	3,89с
	C ² HCl ₃ - C ₆ H ₆ (1 : 1)	—	—	3,82с	3,52с
(XIII)	C ² HCl ₃	4,00с	3,98с	3,92с	3,89с
	C ² HCl ₃ - C ₆ H ₆ (1 : 1)	4,00с	3,44с	3,81с	3,47с
(XIV)	C ² HCl ₃	—	—	3,93с	3,89с
	C ² HCl ₃ - C ₆ H ₆ (1 : 1)	—	—	3,82с	3,52с

группу. Фрагменты с m/e 201 и 173, содержащие кольцо А, показывают, что у эфира с M^+ 348 при $C_{(5)}$ и $C_{(7)}$ находятся тридейтерометоксигруппы. Следовательно, в 4'-положении содержится метоксигруппа, что и подтверждается значениями m/e ионов b и v . Второй компонент фракции с M^+ 351, очевидно, имеет три тридейтерометоксигруппы при $C_{(5)}$, $C_{(7)}$ и $C_{(4')}$. Это подтверждается и данными спектра ЯМР фракции Б₂-d₃ (см. табл. 3), записанного в смеси C²HCl₃-C₆H₆ (1 : 1), где сигналы протонов 6- и 4'-метоксигруппы четко разрешены. Интенсивность сигнала 4'-метоксигруппы при 3,52 м.д. равна лишь 87% от интенсивности сигнала 6-метоксигруппы при 3,82 м.д., являющейся общей для обоих веществ.

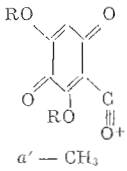
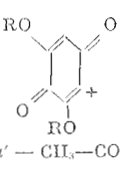
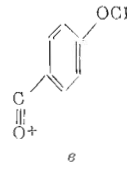
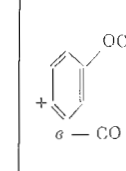


Таким образом, в смеси Б содержатся пектолицарингенин (XII) и 5,7,4'-триокси-6-метоксифлавоон (XV).

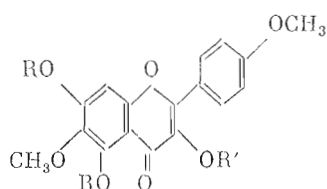
Фракция Б₃, судя по данным масс-спектра, содержит пять метоксигрупп (M^+ , m/e 372). Интенсивности основных пиков спектра и значения m/e фрагментов кольца А находились в хорошем соответствии с данными масс-спектра 3,5,6,7,3',4'-гексаметоксифлавона (кверцетлагетина) [7]. Это позволило предположить, что фракция Б₃ представлена 3,5,6,7,4'-пентаметоксифлавоном (XVII). Следует также отметить, что из почек другого вида березы (*Betula ertmanii*) ранее выделены два флавонола этого типа, а именно бетулетол (XVIII) и его 3-метиловый эфир (XIX) [8].

Это предположение подтвердилось, так как в спектре фракции Б₃ максимальный пик иона ($M-CH_3$)⁺ с m/e 357 указывает на присутствие в ней метоксигруппы при $C_{(6)}$, а средней интенсивности (28%) пик иона ($M-H-H_2O$)⁺ с m/e 353 говорит о наличии двух метоксигрупп при $C_{(3)}$ и $C_{(5)}$ [4]. Значение m/e ионов ($a'-CH_3$)⁺ и ($a'-CH_2-CO$)⁺ (см. табл. 4) указывает на содержание в кольце А трех метоксигрупп. Присутствие в спектре ЯМР фракции Б₃ однопротонного сигнала с δ 6,75 м.д., аналогичного сигналу протона при $C_{(8)}$ (6,78 м.д.) в спектре соединения (XIII), позволило показать, что третья метоксигруппа расположена при $C_{(7)}$. С другой стороны, значение m/e ионов v и $v-CO$ (см. табл. 4) свидетельствует о присутствии пятой метоксигруппы в кольце В, а наличие в спектре ЯМР пары двухпротонных сигналов при δ 7,2 и 8,6 м.д., соответствующих

Основные характеристические данные масс-спектров фракций Б₃ и Б₃-d₃

Фракция	<i>m/e</i> (относительная интенсивность, %)					
	<i>M</i> ⁺	(<i>M</i> -CH ₃) ⁺				
Б ₃	372(95)	357(100)	195(18)	167(27)	135(37)	107(13)
Б ₃ -d ₃	378(98) 381(36)	363(100) 366(39)	201(18)	173(28)	135(64)	107(15)

para-дизамещенному бензольному кольцу, указывает на локализацию этой группы в положении 4'.



- (XVII) R=R'=CH₃
 (XVIII) R=R'=H
 (XIX) R=H, R'=CH₃
 (XX) R=C²H₃, R'=CH₃
 (XXI) R=R'=C²H₃

Как и в предыдущих случаях, масс-спектр продукта исчерпывающего тридейтерометилирования смеси Б (фракции Б₃-d₃) показал наличие двух компонентов, пикам молекулярных ионов которых отвечают значения *m/e* 378 и 381 (см. табл. 4). Следовательно, первый компонент содержит две, а второй — три тридейтерометоксигруппы. Содержание второго компонента во фракции Б₃-d₃, судя по значениям интенсивностей пиков ионов *M*⁺ и (*M*-CH₃)⁺, в 1,5–2 раза меньше. Максимальная интенсивность пика иона (*M*-CH₃)⁺ и в спектре дейтерированной фракции Б₃-d₃ говорит о том, что и в ней содержится метоксигруппа при C₍₆₎, а смещение значений *m/e* пиков, отвечающих ионам (α'-CH₃)⁺ и (α'-CH₃-CO)⁺, в результате тридейтерометилирования в область больших масс означает, что в обоих компонентах этой фракции содержатся две тридейтерометоксигруппы в кольце А. С другой стороны, так как значения *m/e* ионов *v* и *v*-CO при дейтерометилировании не изменились, очевидно, что третья тридейтерометоксигруппа второго компонента может находиться лишь при C₍₃₎.

Таким образом, установлено, что фракция Б₃-d₃ содержит 5,7-ди-(тридейтерометокси)-3,6,4'-триметоксифлавоны (XX) и 3,5,7-три-(тридейтерометокси)-6,4'-диметоксифлавоны (XXI) и, следовательно, в исходной смеси содержится бетулетол (XVIII) и его 3-метиловый эфир (XIX).

В результате проделанной работы кроме выделенных ранее в индивидуальном состоянии 9 флавоноидных агликонов [2] в экстрактах почек березы бородавчатой установлено присутствие еще 6 флавоноидных компонентов, а именно кемпферола (I), рамзазина (XI), пектолинаренгина (XII), 5,7,4'-триокси-6-метоксифлавоны (XV), бетулетола (XVIII) и его 3-метилового эфира (XIX).

Экспериментальная часть

Идентификацию флавонов (I), (X), (XII), (XV), (XVIII), (XIX) проводили в смесях, полученных из экстрактов почек березы бородавчатой, собранных 19 декабря 1971 г. с растений, произрастающих в естественных условиях вблизи Москвы [2].

Препаративную хроматографию проводили на силикагеле L 5/40 (Сhemarol, ЧССР) в системах бензол-этилацетат, 3:7 (система 1) и хлороформ-этилацетат-метанол, 45:4:1 (система 2); аналитическую хроматографию проводили на пластинках силуфола (Сhemarol, ЧССР) в той же системе. Условия записи ЯМР- и масс-спектров указаны ранее [2].

Образец кверцетина (VI) получен из Института органической химии СО АН СССР, образец пектолинарингенина (XII) — из Всесоюзного научно-исследовательского института лекарственных растений МИНМЕДПРОМ. Получение метиловых (VII, XIII) и тридейтерометилового (XIV) эфиров заведомых образцов проводили как описано ранее [2].

Получение и анализ смеси А. Маточные растворы, оставшиеся от выделения соединений (IV) и (VIII) [1], объединили и упарили в вакууме досуха. Порцию в 6 мг полученной смеси А делили по весу на две равные части и подвергали отдельно метилированию и тридейтерометилированию в условиях исчерпывающего замещения [3]. После обычной обработки сухие остатки продуктов реакций подвергали препаративной ТСХ в системе 1. Зоны с R_f 0,51 (фракция A_1) и 0,42 (фракция A_2) элюировали бензолом и элюаты анализировали методами ЯМР- и масс-спектрометрии.

Получение и анализ смеси Б. Зоны хроматограмм с $R_f < 0,53$, полученные при ТСХ-очистке эфира (V) в системе бензол-этилацетат (9:1), и с $R_f < 0,40$ в системе 2 объединяли, элюировали и после упаривания элюата в вакууме получили смесь Б, которую подвергали исчерпывающему метилированию и хроматографическому разделению, как указано выше. Зоны с R_f 0,51 (фракция B_1), 0,76 (фракция B_2) и 0,85 (фракция B_3) элюировали бензолом, элюаты анализировали аналогично.

Отнесение сигналов 3,5,7,3',4'-метоксильных групп в спектрах ЯМР флавонов, снятых в растворе C^2HCl_3 (δ , м.д.), проведено следующим образом: 5,7-ди(тридейтерометокси)-4'-метоксифлавоны — 3,88 (4'- CH_3O), 5-тридейтерометокси-7,4'-диметоксифлавоны — 3,93 (7- CH_3O), 3,90 (4'- CH_3O); 5,7,4'-триметоксифлавоны — 3,97 (5- CH_3O), 3,92 (7- CH_3O), 3,89 (4'- CH_3O); 3,5,7-три(тридейтерометокси)-4'-метоксифлавоны — 3,89 (4'- CH_3O); 5,7-ди(тридейтерометокси)-3,4'-диметоксифлавоны — 3,96 (3- CH_3O), 3,89 (4'- CH_3O); 3,5-ди(тридейтерометокси)-7,4'-диметоксифлавоны — 3,93 (7- CH_3O), 3,90 (4'- CH_3O); 3,5,7,4'-тетра(тридейтерометокси)-3'-метоксифлавоны — 3,96 (3'- CH_3O).

ЛИТЕРАТУРА

1. Поправко С. А., Копоненко Г. П., Соколова С. А., Сизой М. Н., Вульфсон Н. С. (1979) Биоорганическая химия, 5, 735-745.
2. Копоненко Г. П., Поправко С. А., Вульфсон Н. С. (1975) Биоорганическая химия, 1, 506-511.
3. Поправко С. А., Гуревич А. И., Колосов М. П. (1969) Химия природных соединений, 476-482.
4. Kingston D. G. I. (1971) Tetrahedron, 27, 2691-2700.
5. Natarajan S., Datta S. C., Murti V. V. S., Seshadri T. R. (1971) Ind. J. Chem., 9, 813-814.
6. Markham K. R., Mabry T. J. (1975) in: The Flavonoids (Harborn J. B., Mabry T. J., Mabry H., eds), pp. 64-67, Chapman and Hall, London.
7. Bowie J. H., Cameron D. W. (1966) Austr. J. Chem., 19, 1627-1635.
8. Wollenweber E., Lebreton Ph. (1971) Biochimie, 53, 935-938.

Поступила в редакцию
12.IV.1979

SECONDARY METABOLITES OF BIRCH. IV. IDENTIFICATION OF THE GROUP OF FLAVONOID AGLYCONS IN BIRCH BUDS (*BETULA VERRUCOSA*)

POPRAVKO S. A., KONONENKO G. P., TIKHOMIROVA V. I., WULFSON N. S.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

In the extract of birch buds the following 6 flavonoid aglycons have been identified in the form of permethyl and perdeuteriomethyl ethers: kaempferol, rhamnazin, pectolinarigenin, 5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavone, betuletol and its 3-methyl ether.