



УДК 547.972.02:582.632

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ КЛЕВЕРА

VII. ИЗОФЛАВОНЫ КОРНЕЙ КЛЕВЕРА КРАСНОГО (*TRIFOLIUM PRATENSE*)*

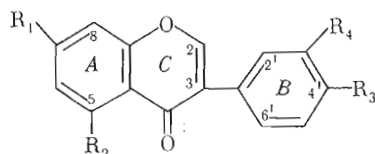
Фрайтат П. Д., Поправко С. А., Вульфсон Н. С.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Описаны выделение и идентификация из метанольных экстрактов корней клевера красного шести изофлавонов — каликозина (I), пратензина (II), формононетина (III), псевдобалтигенина (IV), гепистенина (V) и биоханина А (VI), а также трех гликозидов — ротиндина (VII), гепистина (VIII) и оноина (IX). Осуществлен синтез изофлавона (II).

Ранее мы сообщали о выделении из метанольных экстрактов корней клевера красного (*Trifolium pratense*) ряда изофлавоноидных агликонов [2, 3] и определении их биологической активности [4]. В настоящем сообщении мы более подробно описываем выделение веществ этого типа из корней клевера и их идентификацию. Описываемые в статье изофлавоны (I)–(VI) и гликозиды (VII)–(IX), как и в предыдущих случаях [5], выделены путем колоночной хроматографии на силикагеле с последующей очисткой методом препаративной ТСХ.

Соединение (I) выделено из фракции с R_f 0,14 (система А) в кристаллическом виде. По данным элементного анализа и масс-спектра, оно имело брутто-формулу $C_{16}H_{12}O_5$, образовывало диацетат при действии уксусного ангидрида в пиридине, а при этилировании иодистым этилом в ацетоне в присутствии K_2CO_3 — соответствующий диэтиловый эфир (Iб). По данным спектра ЯМР (табл. 1), соединение (I) содержало одну метоксильную группу и являлось изофлавоном, о чем свидетельствовал однопротонный



- | | |
|---|--|
| (I) $R_1 = R_3 = OH, R_4 = OMe, R_2 = H.$ | (IIIб) $R_1 = OEt, R_3 = OMe, R_2 = R_4 = H.$ |
| (Ia) $R_1 = R_4 = R_3 = OMe, R_2 = H.$ | (IV) $R_1 = OH, R_3 + R_4 = OCH_2O, R_2 = H.$ |
| (Iб) $R_1 = R_4 = OEt, R_3 = OMe, R_2 = H.$ | (V) $R_1 = R_2 = R_3 = OH, R_4 = H.$ |
| (II) $R_1 = R_2 = R_4 = OH, R_3 = OMe.$ | (VI) $R_1 = R_2 = OH, R_3 = OMe, R_4 = H.$ |
| (III) $R_1 = OH, R_3 = OMe, R_2 = R_4 = H.$ | (VII) $R_1 = OGlu, R_3 + R_4 = OCH_2O, R_2 = H.$ |
| (IIIa) $R_1 = R_3 = OMe, R_2 = R_4 = H.$ | (VIII) $R_1 = OGlu, R_2 = R_3 = OH, R_4 = H.$ |
| | (IX) $R_1 = OGlu, R_3 = OMe, R_2 = R_4 = H.$ |

* Сообщение VI см. [1].

синглет при 8,14 м.д., характерный для протона при С2 в γ -пироновом кольце [6]. Величины химических сдвигов и константы спин-спинового взаимодействия шести остальных ароматических протонов в спектре отвечали наличию в соединении двух ароматических колец с одинаковым 1,3,4-типом замещения.

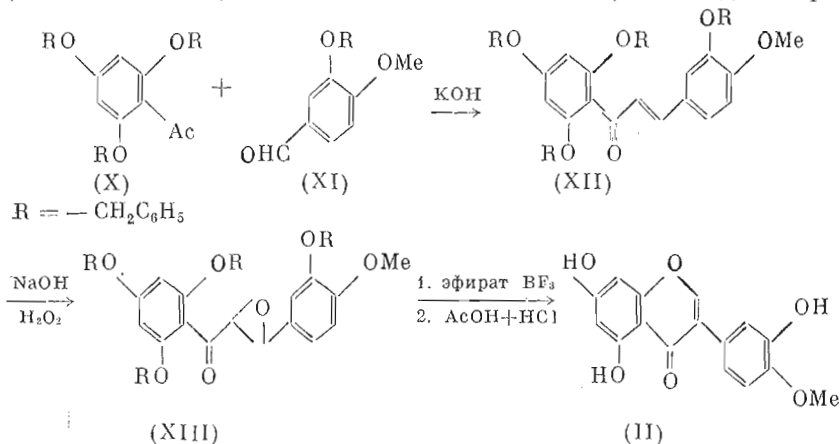
Согласно данным масс-спектра этого вещества и его диэтилового эфира (Iб) (табл. 2), одна гидроксильная группа в нем находится в кольце А, а вторая и метоксильная — в кольце В. Гидроксильная группа кольца А, очевидно, находится при С7, о чем свидетельствует bathochromный сдвиг максимума поглощения (λ 257 нм) эфира (Iб) на 10 нм при действии AsONa . Этот вывод, а также расположение OH и MeO-групп в положении С3' и С4' соответственно подтверждены перманганатным окислением диэтилового эфира (Iб), которое привело к 2-окси-4-этокси- и 4-метокси-3-этоксibenзойным кислотам. Последние идентифицированы прямым сравнением с образцами, полученными при окислении заведомого этилового эфира изохаветобела [7] и этилового эфира формонетина (IIIб) (см. «Экспериментальную часть»).

Из этого следует, что соединение (I) является 7,3'-диокси-4'-метоксиизофлавоном (каликозином). Изофлавоном (I) ранее был выделен из ряда других растений, в том числе из *Baptisia calycosa* [8], *Pterocarpus dalbergioides* [9], но его наличие в клевере красном не было отмечено.

Из менее полярной фракции с R_f 0,25 мы выделили бесцветные кристаллы еще одного изофлавона (II), который, судя по данным масс-спектра высокого разрешения (табл. 3), имел брутто-формулу $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$.

Изофлавоновая структура этого вещества следует из данных ЯМР (см. табл. 1). При действии As_2O в пиридине вещество (II) образует триацетат, в ЯМР-спектре которого, снятого в растворе $\text{C}^2\text{H}_3\text{O}^2\text{H}$, помимо пика AsO -групп при δ 2,3 м.д. (уширенный сигнал) имеются сигналы протонов одной метоксильной группы при 3,8 м.д. В УФ-спектрах соединения (II), снятых в присутствии AsONa и AlCl_3 , наблюдаются bathochromные сдвиги максимума поглощения соответственно на 10 и 11 нм, что характерно для 7- и 5-оксизамещенных изофлавонов [10]. Наличие хелатной гидроксильной группы в исследуемом веществе подтверждается появлением характерной зеленой окраски его раствора в присутствии FeCl_3 .

Близость физико-химических характеристик выделенного вещества с описанными для 5,7,3'-триокси-4'-метоксиизофлавона (пратензеина), обладающего той же брутто-формулой и выделенного ранее из листьев растений этого вида [11], позволило предположить, что соединение (II) является именно этим изофлавоном. Однако отсутствие заведомого образца этого вещества для их прямого сравнения побудило нас осуществить его синтез. С этой целью халкон (XII), полученный конденсацией трибензилоксиацетофенона (X) и бензилоксиизованилина (XI) в присутствии KOH, был окислен щелочной H_2O_2 в эпоксид (XIII). Последний при дей-



Данные ЯМР-спектров изофлавонов (I)–(VI) и их производных

Протоны	Вещество										
	(I)	(Iв)	(II)	(III)	(IIIа)	(IIIв)	(IV)	(V)	(Va)	(VI)	(VIa)
	1 *	1	2 *	1	3 *	1	1	4 *	4	4	3
2-H	8,29 с	8,52 с	8,07 с	8,36 с	7,91 с	8,52 с	8,36 с	8,15 с	8,30 с	8,19 с	8,01 с
5-H	8,00 с	8,19 (л, J9)	—	8,03 (л, J9)	8,22 (л, J9)	8,21 (л, J9)	8,01 (л, J9)	—	—	—	—
6-H	6,86– 7,10 м	7,32 (л, J2, J2 и 9)	6,24 (л, J2)	6,96 (л, J2 и 9)	6,98 (л, J2, J2 и 9)	7,36 (л, J2, J2 и 9)	6,94 м	6,32 (л, J2)	6,99 (л, J2)	6,32 (л, J2)	7,41 (л, J2)
8-H	—	7,56 (л, J2)	6,37 (л, J2)	6,92 (л, J2)	6,88 (л, J2)	7,58 (л, J2)	7,10 м	6,44 (л, J2)	7,38 (л, J2)	6,45 (л, J2)	7,50 (л, J2)
6'-H	—	7,52 (л, J2, J2 и 9)	7,05 (л, J9)	7,55 (л, J9)	7,55 (л, J9)	7,57 (л, J9)	—	7,51 (л, J9)	7,61 (л, J9)	7,57 (л, J9)	8,34 (л, J9)
2'-H	—	7,39 (л, J2)	7,0 (л, J9)	7,55 (л, J9)	7,55 (л, J9)	7,57 (л, J9)	—	7,51 (л, J9)	7,61 (л, J9)	7,57 (л, J9)	8,34 (л, J9)
5'-H	—	7,20 (л, J9)	7,04 (л, J9)	7,03 (л, J9)	6,97 (л, J9)	7,03 (л, J9)	—	6,94 (л, J9)	7,20 (л, J9)	7,01 (л, J9)	7,04 (л, J9)
3'-H	—	—	—	7,03 (л, J9)	6,97 (л, J9)	7,03 (л, J9)	—	6,94 (л, J9)	7,20 (л, J9)	7,01 (л, J9)	7,04 (л, J9)
OCH ₃	3,8	3,82	3,89	3,80	3,90 3,83	3,80	—	—	—	3,80	3,87
OC ₁₁ H ₂ O	—	—	—	—	—	—	6,07 с	—	—	—	—
OCOC ₁₁ H ₃	—	2,28 2,34	—	—	—	2,34	—	—	2,29 2,34 2,31	—	2,31 2,34

* Растворители: 1 — [H₂]ДМСО, 2 — C₂H₅O₂H, 3 — C₂HCl₃, 4 — [H₂]ацетон.

Основные характеристические данные масс-спектров изофлавонов (I)–(VI) и продуктов их алкилирования
 [m/e (относительная интенсивность в %)]

Ионы	Вещество										
	(I)	(Ia)	(Ib)	(II)	(III)	(IIIa)	(IIIb)	(IV)	(V)	(VI)	
M^+	284(100)	312(100)	340(100)	300(100)	268(100)	282(100)	296(100)	282(100)	270(100)	284(100)	
($M-H$) ⁺	283(10)	311(7)	339(2)	299(3)	267(27)	281(17)	295(33)	281(27)	269(19)	283(11)	
($M-Me$) ⁺	269(12)	297(19)	325(7)	285(37)	253(27)	267(7)	281(17)	267(21)		269(18)	
($M-CHO$) ⁺		283(2)	311(24)	271(12)				253(8)		255(11)	
($M-Me-CO$) ⁺	241(10)	269(5)	297(17)	257(21)	225(14)	239(23)	253(9)			241(14)	
($M-Me-2CO$) ⁺	213(12)		269(11)	229(20)	197(4)	211(11)	225(2)			213(4)	
($\alpha+H$) [*]	137(26)	151(5)	165(6)	153(33)		151(8)	165(3)			153(4)	
α		150(4)		152(4)		150(19)	164(7)			152(18)	
($\alpha-CO$)		122(10)		124(4)			136(7)			124(4)	
(b) [*]	148(6)	162(7)	176(2)	148(9)	132(87)	132(49)	146(5)			132(37)	
($b-Me$)	133(18)	147(7)		133(20)	117(23)	117(13)	117(7)			117(11)	
($b-Me-CO$)	105(24)	119(19)	133(10)	105(15)	89(22)	89(36)	89(9)				

^{*} Фрагментацию изофлавонов см. [1].

Элементный состав основных ионов в масс-спектре
изофлавона (II) по данным масс-спектра высокого
разрешения

Ион	Измерено	Элементный состав	Вычислено
M^+	300,0642	$C_{16}H_{12}O_6$	300,0638
$(M-Me)^+$	285,0339	$C_{15}H_9O_6$	285,0369
$(M-CHO)^+$	271,0572	$C_{15}H_{11}O_5$	271,0589
$(M-Me-CO)^+$	257,0426	$C_{14}H_9O_5$	257,0438
$(M-Me-2CO)^+$	229,0437	$C_{13}H_9O_4$	229,0469
$(a+H)$	153,0186	$C_7H_5O_4$	153,0187

ствии эфира BF_3 превращен в пратензеин (II) (схема), который оказался действительно полностью идентичным с выделенным нами соединением.

Из фракции с R_f 0,28–0,43 (система А) нами выделены еще четыре кристаллических вещества (III)–(VI), которые, по данным масс-спектров и спектров ЯМР (см. табл. 1 и 2), также являлись изофлавонами. Строение этих веществ как формононетина (III), псевдобаптигенина (IV), генистеина (V) и биоханина А (VI) подтверждено прямым их сравнением с заведомыми образцами изофлавонов, полученных от фирмы Serva. Эти четыре соединения ранее были выделены из наземной части клевера красного [12–15], однако данные об их наличии в корнях растения отсутствовали. Помимо соединений (I)–(VI) из экстрактов корней были выделены и гликозиды агликонов (III)–(V).

Соединение (VII), элюированное с колонки смесью хлороформ–метанол (9:1), получено в кристаллическом виде. При действии уксусным ангидридом в пиридине оно легко переходило в соответствующий тетраацетат, в масс-спектре которого выявлен пик молекулярного иона с m/e 612, а также хорошо прослеживались интенсивные пики фрагментных ионов: агликона с m/e 282 и остатка тетраацетата гексозы с m/e 331 и 169. Элементный состав этих ионов определен как $C_{16}H_{10}O_5$ и $C_{14}H_{10}O_6$ соответственно на основании данных масс-спектра высокого разрешения. В слабopольной области ЯМР-спектра тетраацетата этого вещества имеются сигналы протонов его агликона (IV), синглетные сигналы протонов четырех ацетоксильных групп глюкозы при δ 2,06–2,12 м.д., а также сигналы протонов моносахаридного остатка при δ 3,85–5,4 м.д.

На основании этих данных для соединения (VII) вытекает строение моноглюкозида псевдобаптигенина (IV). Действительно, при ферментативном гидролизе β -глюкозидазой соединение (VII) образует изофлавоны (IV) и глюкозу (хроматография на бумаге). Дополнительные данные в пользу β -конфигурации глюкозидной связи в соединении (VII) получены из данных его ИК-спектра и молекулярного вращения. В ИК-спектре имеется полоса поглощения при 890 см^{-1} , характерная для β -глюкозидной связи, и полоса при 925 см^{-1} , соответствующая асимметричным колебаниям пиранозного кольца [16]. В метаноле молекулярное вращение вещества составляет -130° , что близко к значению этой величины для фенил- β -D-глюкопиранозида (-182°), и резко отличается от вращения его α -изомера ($+402^\circ$), а также фенил- β -D-глюкофуранозида (-364°). Следовательно, соединение (VII) является 7-O- β -D-глюкопиранозилокси-3',4'-метилendioксиизофлавоном (ротиндином).

Из фракции с R_f 0,12 (система В) выделено бесцветное кристаллическое вещество (VIII), которое при ацетилировании дало гексаацетат. В масс-спектре последнего выявлен пик молекулярного иона с m/e 684 и пики фрагментных ионов: агликона с m/e 270 и остатка тетраацетилгексозы с m/e 331 и 169. Спектр ЯМР гексаацетата в слабopольной области

содержит сигналы, аналогичные сигналам генистеина (V), сигналы шести ацетоксильных групп при 2,41 и 2,43 м.д., а также сигналы протонов остатка моносахарида при 3,8–5,4 м.д. Следовательно, соединение (VIII) является моногликозидом генистеина (V). В веществе (VIII) остаток сахара, очевидно, находится в положении C7, поскольку в присутствии хлористого алюминия в его УФ-спектре наблюдается bathochromный сдвиг максимума поглощения на 12 нм, в то время как добавление ацетата натрия такого эффекта не вызывает.

При мягком кислотном и ферментативном гидролизе β -гликозидазой соединение (VIII), дает генистеин (V) и глюкозу (хроматография на бумаге). Молекулярное вращение соединения (VIII) в метаноле составляет -135° , и, следовательно, это соединение является β -гликопиранозидом. Таким образом, эти данные указывают на то, что соединение (VIII) имеет строение 7-O- β -D-гликопиранозилокси-5,4'-диоксиизофлавона и является генистином.

Аналогичным образом было установлено строение гликозида, выделенного из фракции с R, 0,14 (система B). Основная информация о строении этого вещества была получена при изучении его ЯМР-спектра и масс-спектра ацетильного производного (см. «Экспериментальную часть» и табл. 1 и 2). Точка плавления, УФ-спектр и значения оптического вращения этого соединения были такие же, как у ононина (7-O- β -D-гликозида формонетина) (IX). Действительно, агликон, полученный после ферментативного гидролиза выделенного вещества, был идентифицирован по ИК- и масс-спектру как формонетин (III), что подтверждено сравнением с заводомым образцом. В гидролизатах бумажной хроматографией обнаружена глюкоза.

Таким образом, в корнях красного клевера мы идентифицировали семь изофлавонов, из которых три (каликозин, псевдобаптигенин, а также ирилон [5]) выявлены в данном виде впервые, а четыре других (формонетин, биоханин А, генистеин и пратензин) ранее описаны как компоненты наземной части растения. Кроме этих соединений из клевера выделены гликозиды ононин, ротиндин, генистин и ранее описанный нами 7-O- β -D-гликозид ирилона [5].

Большинству описанных выше агликонов свойственна биологическая активность, в том числе противораковая [17] и эстрогенная [18]. Последняя сильно влияет на качество клеверного корма. Изофлавоны (I), (III)–(VI), а также ирилон уже в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М обладают способностью тормозить растяжение растительных клеток, причем их содержание резко меняется в период подготовки растения к зимовке. Эти же изофлавоны проявляют значительную антифунгальную активность в отношении ряда патогенных для клевера грибов [4, 5], что свидетельствует об участии этих веществ в защитных реакциях вида.

Экспериментальная часть

ИК-спектры измеряли на спектрофотометре UR-20 в таблетках с KBr, масс-спектры — на приборе MX-1309 с прямым вводом в ионный источник при ионизирующем напряжении 70 В, а масс-спектры высокого разрешения — на приборе MS-902 (Англия). Спектры ПМР измеряли на приборе Varian XL-100 (США); химические сдвиги приведены в миллионных долях (м.д.), внутренний стандарт тетраметилсилан; сокращения: с — синглет, д — дублет, дд — дублет дублета, т — триплет, м — мультиплет. ТСХ проводили на силуфоле в системах этилацетат — гелтан, 1 : 1 (система А), хлороформ — метанол, 89 : 11 (система В). Для сравнения были использованы образцы формонетина (III), псевдобаптигенина (IV), генистеина (V) и биоханина А (VI), полученные от фирмы Serva (США).

Выделение изофлавонов (I)–(VI) и их гликозидов (VII)–(IX) проводили из метанольных экстрактов корней красного клевера, собранных

в апреле 1974 г. на экспериментальном участке вблизи Ташкента. Сухой остаток (89 г) экстракта хроматографировали на колонке с 5 кг силикагеля L 100/160 в градиенте бензол—ацетон. При элюировании этой смесью в соотношении 20:1, сопровождаемом ТСХ-контролем, отобрана фракция с $R_f,0,43$ (система А), которая была повторно разделена на меньшей колонке в той же системе. После упаривания элюата в вакууме остаток кристаллизовали в водном спирте. Получили 18 мг биоханина А (VI) с т. пл. 214° С (ср. [19]); УФ: $\lambda_{\text{макс}} 263$ нм ($\lg \epsilon 4,5$).

При дальнейшем промывании колонки той же смесью растворителей была отобрана фракция с $R_f,0,3$ (система А), из которой выделили 12,5 г формонетина (III) с т. пл. 260—262° С (из метанола) (ср. [18]); ИК: 3150, 1639, 1615, 1570, 1518, 1460, 1030 см^{-1} , а также 5,3 г псевдобаптегина (IV) с т. пл. 293—294° С (ср. [20]); ИК: 3150, 1626, 1598, 1574, 1490, 1032, 935 см^{-1} .

При промывании колонки с исходным экстрактом смесью бензол—ацетон в соотношении 15:1 была отобрана фракция с $R_f,0,28$ (система А), из которой после кристаллизации из метанола выделили 53 мг генистеина (V) с т. пл. 299—300° С (ср. [19]); ИК: 3425, 1656, 1618, 1575, 1510, 1360, 1310, 1180, 1048 см^{-1} ; УФ: $\lambda_{\text{макс}} 263$ нм ($\lg \epsilon 4,5$).

Из фракции с $R_f,0,25$ (система А) после упаривания и кристаллизации из спирта получили 18 мг пратензеина (II) с т. пл. 274—275° С (ср. [8]); УФ: $\lambda_{\text{макс}} 261$ нм ($\lg \epsilon 4,55$); ИК: 3426, 3310, 2840, 1665, 1243, 1021 см^{-1} . Найдено, %: С 64,0; Н 4,5. $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$. Вычислено, %: С 64,0; Н 4,0.

При элюировании смесью бензол—ацетон в соотношении 5:1 была отобрана фракция с $R_f,0,14$ (система А), из которой выделили 753 мг каликозина (I) с т. пл. 246—247° С (из водного метанола) (ср. [8, 9]); УФ: $\lambda_{\text{макс}} 249, 257, 292$ нм ($\lg \epsilon 4,25; 4,23; 4,03$); ИК: 3571, 1618, 1575, 1235, 1125, 885, 813 см^{-1} . Найдено, %: С 68,08; Н 4,26. $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$. Вычислено, %: С 67,6; Н 4,26. Промывание колонки смесью метанола и хлороформа в соотношении 9:1 дало фракцию с $R_f,0,14$ (система В), из которой выделили 5,6 г оноина (IX) с т. пл. 218° С (из спирта) (ср. [21]); УФ: $\lambda_{\text{макс}} 261$ нм ($\lg \epsilon 4,55$); ЯМР (C^2HCl_3 , δ , м.д.): 7,85 (1Н, с, 2-Н), 8,16 (1Н, д, J₉, 5-Н), 7,02 (1Н, кв, J₉ и 2, 6-Н), 6,93 (1Н, д, J₂, 8-Н), 7,46 (1Н, д, J₉, 2'-Н), 6,86 (2Н, д, J₉, 3'-Н, 5'-Н), 7,46 (1Н, д, J₉, 6'-Н); сигналы протонов моносахаридного остатка—3,98 (1Н, м, 5-Н), 4,30 (2Н, м, 6-Н₂), 5,22—5,36 (3Н, м, 2-Н, 3-Н, 4-Н). Найдено, %: С 61,24; Н 5,24. $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_9$. Вычислено, %: С 61,39; Н 5,20.

Из той же фракции выделили 2,1 г ротиндина (VII) с т. пл. 236—237° С (из метанола) (ср. [22]), $[\alpha]_D^{20} -38,1^\circ$ (c 0,5; метанол).

При элюировании смесью метанола и хлороформа в соотношении 12:1 отобрали фракцию с $R_f,0,12$ (система В), из которой выделили 6 мг светло-желтых кристаллов генистина (VIII) с т. пл. 260—261° С (из метанола) (ср. [23]), $[\alpha]_D^{20} -21,5^\circ$ (c 0,5; метанол).

Ацетилирование изофлавонов. Ацетилирование изофлавонов и их глюкозидов проводили обычным методом действием Ac_2O в пиридине при 20° С.

Диацетат каликозина (Iв): т. пл. 202—203° С (из метанола) (ср. [9]); ИК: 1754, 1634, 1370, 1125, 847, 813 см^{-1} ; масс-спектр*: 368 (M^+ , 16), 326, (96), 284 (65), 269 (11), 241 (5), 148 (4), 137 (9), 133 (7), 105 (7), 43 (100). Найдено, %: С 65,27; Н 4,44. $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_7$. Вычислено, %: С 65,21; Н 4,38.

Ацетат формонетина (IIIв): т. пл. 171—172° С (из метанола) (ср. [21]); масс-спектр: 310 (M^+ , 12), 268 (19), 253 (5), 132 (27), 43 (100).

Ацетат псевдобаптегина: т. пл. 178—179° С (из спирта) (ср. [20]); масс-спектр: 324 (M^+ , 12), 282 (15); 146 (17), 43 (100).

* Здесь и везде далее даны m/e (относительная интенсивность, %).

Ацетат генистеина (Va): т. пл. 201–202°С (из спирта) (ср. [19]); ИК: 1715, 1630, 1573, 1515, 1435, 1368, 1048 см⁻¹; масс-спектр: 396 (*M*⁺, 8), 354 (37), 312 (72), 270 (100), 241 (14), 153 (22), 152 (16), 124 (12), 118 (22).

Диацетат биоханина А (VIa): т. пл. 191–192°С (из спирта) (ср. [22]); масс-спектр: 368 (*M*⁺, 24), 326 (100), 284 (60), 269 (10), 255 (6), 132 (8).

Тетраацетат ононина: т. пл. 188°С (из метанола) (ср. [21]); $[\alpha]_D^{20}$ –28,5° (*c* 0,5; хлороформ); масс-спектр: 598 (*M*⁺, 33), 331 (78), 268 (8), 253(2), 169 (100), 132 (4), 109 (42). Найдено, %: С 60,85; Н 5,0. С₃₀Н₃₀О₁₃. Вычислено, %: С 60,70; Н 5,05.

Тетраацетат рогиндина: бесцветные кристаллы из метанола с т. пл. 218–220°С, $[\alpha]_D^{20}$ –30,3° (*c* 0,5; метанол); УФ: λ_{max} 263 нм (*Ig* ϵ 4,5); ПМР (С²НCl₃, δ , м.д.): 7,93 (1Н, с, 2-Н), 8,26 (1Н, д, J₉, 5-Н), 6,01 (2Н, с, ОСН₂O), 6,86 (1Н, д, J₉, 5'-Н), 6,94–7,09 (4Н, м, 6-Н, 8-Н, 2'-Н, 6'-Н), сигналы протонов моносахаридного остатка –3,98 (1Н, м, 5-Н), 4,30 (2Н, м, 6-Н₂), 5,22–5,36 (3Н, м, 2-Н, 3-Н, 4-Н), 2,06–2,1 (12Н, СН₃СО-группы при С2, С3, С4, С5); масс-спектр: *M*⁺ 612,1495, С₃₀Н₂₈О₁₄. Вычислено *M*⁺ 612,1475. Для агликона *M*⁺ 282,0554, С₁₆Н₁₀О₅. Вычислено *M*⁺ 282,0528. Для тетраацетата гексозы *M*⁺ 331,1009, С₁₄Н₁₉О₉. Вычислено *M*⁺ 331,1027.

Гексаацетат генистина: т. пл. 191–192°С (из метанола) (ср. [23]); УФ: λ_{max} 261 нм (*Ig* ϵ 4,55); масс-спектр: 684 (*M*⁺, 3), 642 (6), 331 (13), 270 (16), 169 (46), 109 (34), 43 (100).

Диметилловый эфир каликозина (Ia). Раствор 20 мг каликозина (I) в 25 мл сухого ацетона кипятили 8 ч с 0,5 мл Me₂SO, и 1 г безводного K₂CO₃. Смесь фильтровали, остаток промыли 40 мл ацетона, объединенные фильтраты упарили в вакууме, остаток растворили в эфире, промыли 5% раствором соды (3×5 мл) и водой. После упаривания эфира и перекристаллизации остатка из метанола получили 18 мг эфира (Ia) с т. пл. 160–161°С (ср. [9]); УФ: λ_{max} 262, 288 нм (*Ig* ϵ 4,28 и 4,09).

Диэтиловый эфир каликозина (Ib). К раствору 120 мг каликозина в 100 мл сухого ацетона добавили 5,5 мл EtI, 1,5 г K₂CO₃ и смесь кипятили 6 ч. Реакционную смесь отфильтровали, растворитель упарили в вакууме, остаток растворили в эфире, промыли 5% раствором NaOAc и водой. Обычной обработкой эфирного слоя и кристаллизацией продукта из спирта получили 84 мг эфира (Ib) с т. пл. 131–132°С (ср. [9]); УФ: λ_{max} 262, 288 нм (*Ig* ϵ 4,28 и 4,09). Найдено, %: С 70,2; Н 6,4. С₂₀Н₂₀О₅. Вычислено, %: С 70,6; Н 5,9.

Окисление диэтилового эфира каликозина. К кипящему раствору 40 г эфира (Ib) в 80 мл ацетона прибавили небольшими порциями порошок KMnO₄ до появления устойчивой розовой окраски, растворитель упарили, остаток растворили в воде и добавили раствор NaHSO₃ до полного обесцвечивания раствора. Экстракцией эфиром выделили 12 мг смеси кислот, которую разделили ТСХ в бутаноле, насыщенном NH₃. Зону с *R_f* 0,37, соответствующую по *R_f* О-этилизованилиновой кислоте, элюировали метанолом. После упаривания растворителя и кристаллизации остатка из водного спирта получили 6 мг 4-этокси-3-метоксибензойной кислоты с т. пл. 165°С, идентичной заводскому образцу, полученному при окислении этилового эфира изохавибетола [7]. ПМР [(С²Н₅)₂СО, δ , м.д.]: 1,41 (3Н, т, J 7, СН₃СН₂O), 3,91 (3Н, с, СН₃O), 4,12 (2Н, кв, J 7, СН₃СН₂O), 7,05 (1Н, д, J 8, 5-Н), 7,59 (1Н, дд, J 2 и 8, 6-Н), 7,72 (1Н, д, J 2, 2-Н); масс-спектр: 196 (*M*⁺, 44), 178 (7), 168 (100), 153 (66), 151 (14).

Фракцию с *R_f* 0,17 обрабатывали аналогичным образом. Получили 2,6 мг 2-окси-4-этоксibenзойной кислоты с т. пл. 175°С (см. ниже); масс-спектр: 182 (75), 164 (87), 136 (96), 108 (100), 95 (31), 80 (68), 63 (56), 51 (72).

Трибензилоксиацетофенон (X). Смесь 14 г флорацетофенона [24], 40 мл бензилхлорида, 35 г K_2CO_3 и 15 г KI в 150 мл сухого ацетона кипятили 6 ч, периодически встряхивая сосуд. Затем добавили еще 35 г K_2CO_3 и кипятили еще 24 ч. Охлажденный раствор фильтровали, упарили ацетон, добавили 50 мл воды и избыток хлористого бензила отогнали с паром. Остаток экстрагировали этилацетатом, упарили в вакууме и после кристаллизации из метанола получили 13 г трибензилоксиацетофенона с т. пл. $114^\circ C$; R_f 0,75 (система А); масс-спектр: 438 (M^+ , 18), 396 (8), 347 (100), 305 (53), 257 (37), 215 (31), 168 (8).

Бензилоксиизованилин (XI). Смесь 5 г изованилина, 4 мл бензилхлорида и 3 г K_2CO_3 в 50 мл сухого ацетона кипятили 10 ч. Смесь фильтровали, фильтрат упарили до половины исходного объема, добавили 50 мл воды и хлористый бензил отогнали с паром. Остаток экстрагировали эфиром, эфирный слой промыли 5% раствором щелочи (3×50 мл) для удаления непрореагировавшего изованилина, затем водой и сушили $CaCl_2$. Эфир упарили, остаток кристаллизовали из метанола и получили 5,8 г эфира (XI) с т. пл. $63^\circ C$ (ср. [25]); R_f 0,58 (система А); ИК: 2925, 1680, 1510, 1385, 1135, 1015 cm^{-1} ; масс-спектр: 242 (M^+ , 28), 214 (3), 152 (70), 151 (68), 137 (6), 123 (12), 109 (12), 91 (100).

2',4',6',3-Тетрабензилокси-4-метоксикалкон (XII). К раствору 2 г трибензилоксиацетофенона и 1 г бензилоксиизованилина в 30 мл спирта прибавили при перемешивании и слабом нагревании раствор 1,5 г КОН в 1,5 мл воды. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при $20^\circ C$. Образовавшийся желтый осадок отфильтровали, промыли спиртом (5×20 мл), водой и кристаллизовали из спирта. Получили 1,5 г халкона (XII) с т. пл. $170-171^\circ C$; R_f 0,66 (система А); масс-спектр: 662 (M^+ , 46), 572 (32), 571 (53), 482 (5), 481 (11); 415 (10), 331 (26), 267 (16), 242 (11), 241 (16), 91 (100).

Эпоксид 2',4',6',3-тетрабензилокси-4-метоксикалкона (XIII). К раствору 1 г халкона (XII) в 60 мл ацетона и 10 мл метанола добавили 2 мл 8% водного раствора NaOH и 2 мл 30% H_2O_2 . Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч при $20^\circ C$, нагревали до кипения и оставили на ночь при $20^\circ C$. Затем добавили 100 мл воды, выпавший осадок фильтровали, промыли водой и сушили. После кристаллизации из смеси хлороформ — петролейный эфир получили 0,8 г эпоксида (XIII) с т. пл. $180-182^\circ C$.

Пратензеин (II). К раствору 0,7 г эпоксида (XIII) в 30 мл сухого бензола добавили 1 мл эфирата BF_3 , смесь перемешивали 1 ч и экстрагировали эфиром (5×50 мл). Эфирный экстракт промыли водой (10×30 мл), упарили в вакууме, к остатку добавили 10 мл $AsOH$ и 3 мл конц. HCl. Смесь нагревали на кипящей водяной бане 2 ч, охладили, добавили 180 мл воды и встряхивали со смесью этилового эфира и этилацетата. Органический слой экстрагировали водным раствором Na_2CO_3 (20%, 5×50 мл), щелочной слой подкислили разбавленной HCl и раствор экстрагировали этилацетатом. После упаривания растворителя в вакууме остаток разделили ТСХ на силикагеле в системе А и из зоны с R_f 0,25 после обычной обработки получили 18 мг пратензеина с т. пл. $274^\circ C$, полностью идентичного природному образцу.

Метилловый эфир формононетина (IIIa). К раствору 150 мг формононетина (III) в 2,5 мл ДМСО и 1,5 мл MeI прибавили 80 мг NaH и реакционную смесь перемешивали 1,5 ч при $20^\circ C$, затем добавили 5 мл $AsOH$, разбавили водой и экстрагировали этилацетатом (3×50 мл). После обычной обработки экстракта и кристаллизации продукта из бензола получили 107 мг метилового эфира (IIIa) с т. пл. $172-174^\circ C$.

Этиловый эфир формононетина (IIIb). Раствор 280 мг формононетина (III) в 130 мл сухого ацетона кипятили 8 ч с 20 мл EtI и 3,2 г K_2CO_3 . Реакционную смесь фильтровали, растворитель удалили в вакууме, остаток растворили в эфире, промыли 5% раствором $NaHCO_3$, водой, сушили

хлористым кальцием и упарили в вакууме. После кристаллизации из метанола получили 180 мг эфира (III6) с т. пл. 160° С; масс-спектр: 296 (M^+ , 100), 268 (9), 253 (9), 239 (9), 189 (5), 164 (7), 146 (6), 132 (30).

Окисление этилового эфира формонетина. К кипящему раствору 106 мг эфира (III6) в 100 мл ацетона прибавили небольшими порциями 2 г порошкообразного $KMnO_4$ (до образования устойчивой розовой окраски реакционной смеси), растворитель упарили, остаток растворили в воде и добавили $NaHSO_3$ до полного обесцвечивания раствора. После экстракции эфиром получили 50 мг смеси двух кислот, которую разделили как описано для диэтилового эфира каликозина (I6). В результате получили 10 мг 2-окси-4-этоксibenзойной кислоты с т. пл. 175° С.

Кислотный гидролиз ононина. 267 мг выделенного глюкозида (IX) кипятили 2 ч с 150 мл 10% спиртового раствора H_2SO_4 . Растворитель отогнали, остаток разбавили водой и экстрагировали эфиром. Эфирный раствор промыли 3% раствором соды и подкислили HCl . Продукт гидролиза извлекли эфиром, растворитель упарили, остаток кристаллизовали из метанола и получили 160 мг агликона, идентичного по ИК- и масс-спектрам с формонетинном (III).

Водный раствор нейтрализовали $BaCO_3$, осадок отфильтровали и фильтрат упарили в вакууме. Остаток хроматографировали на бумаге FN-3 в системе изоамиловый спирт — пиридин — вода, 5 : 5 : 4, и этилацетат — пиридин — вода, 2 : 2 : 1. Основной продукт гидролиза — вещество с R_f 0,32 и 0,85 в этих системах идентично заведомой глюкозе.

Ферментативный гидролиз ононина. К раствору 15 мг ононина (IX) в 20 мл натрийфосфат-цитратного буфера (рН 5,0) добавили 1 мг 92% β -глюкозидазы (Олайнский завод химреактивов), оставили при 37° С на 6 ч, после чего экстрагировали эфиром. В остатках после упаривания эфирного и водного растворов идентифицировали, как описано выше, агликон (III) и глюкозу.

Аналогичным образом проведен кислотный и ферментативный гидролиз ротиндина (VII) и генистина (VIII).

ЛИТЕРАТУРА

1. Поправко С. А., Соколова С. А., Кононенко Г. П. (1980) Биоорган. химия, 6, 1255–1264.
2. Поправко С. А., Садовская В. Л., Фрайштат П. Д., Хромова Л. Н. (1973) в сб.: Прикладная ботаника и интродукция растений (под ред. Н. В. Цицина), с. 128, «Наука», М.
3. Popravko S. A., Fraishtat P. D., Wulfson N. S. (1976) 4th Indo-Soviet Symposium on the Chemistry of Natural Products, p. 81, Lucknow.
4. Поправко С. А., Соколова С. А., Фрайштат П. Д., Кононенко Г. П. (1979) Биоорган. химия, 5, 1654–1661.
5. Фрайштат П. Д., Поправко С. А., Вульфсон Н. С. (1979) Биоорган. химия, 5, 228–233.
6. Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. B. (1970) The systematic identification of flavonoids, pp. 267–268, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York.
7. Фрайштат П. Д., Поправко С. А., Вульфсон Н. С. (1978) Биоорган. химия, 4, 563–565.
8. Markham K. R., Mabry T. J., Swift T. W. (1968) Phytochemistry, 7, 803–808.
9. Parthasarathy M. R., Puri R. N., Seshadri T. R. (1969) Ind. J. Chem., 7, 118–120.
10. Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. B. (1970) The systematic identification of flavonoids, pp. 49–61, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York.
11. Wong E. (1961) Chem. and Ind., 1963–1964.
12. Virtanen A. J., Hietala P. K. (1958) Acta chem. scand., 12, 579–580.
13. Bradbury R. B., White D. E. (1954) Vitams. Horm., 12, 207–210.
14. Curnow D. H. (1954) Biochem. J., 58, 283–287.
15. Francis C. M., Millington A. J. (1965) Austral. J. Agric., 16, 557–564.
16. Ковалев И. П., Литвиненко В. И. (1965) Химия природн. соед., 233–241.
17. Василенко Ю. К., Дорофеев Г. Н., Казаков А. Л., Лисевицкая Л. И., Леонтьева Т. П., Межеридский В. В., Парфентьева Е. П., Шинкаренко А. Л. (1976). Тез. III Всес. симпоз. по фенольным соединениям, с. 134–135, Тбилиси.
18. Wong E. (1962) J. Sci. Food Agric., 13, 304–308.

19. Wong E., Flux D. S. (1962) *Endocrin.*, **24**, 341-348.
20. Suginome H., Kio T. (1966) *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **39**, 1541-1543.
21. Lebreton P., Markham K. R., Swift W. T., Oung-Boran, Mabry T. J. (1967) *Phytochemistry*, **6**, 1675-1680.
22. Nair A. G. R., Subramanian S. S. (1976) *Ind. J. Chem.*, **14B**, 801-802.
23. Harborne J. B. (1959) *J. Chromatogr.*, **2**, 581-604.
24. Синтезы органических препаратов (1949) т. 2, с. 531-532.
25. Lovecy A., Robinson R., Sugasawa B. (1930) *J. Chem. Soc.*, 817-820.

Поступила в редакцию
6.II.1980

CLOVER SECONDARY METABOLITES. VII. ISOFLAVONES FROM THE ROOTS OF RED CLOVER (*TRIFOLIUM PRATENSE*)

FRAISHTAT P. D., POPRAVKO S. A., WULFSON N. S.

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

Six isoflavones — calycosin, pseudobaptigenin, pratensein, formononetin, genistein and biochanin A — have been isolated from the roots of red clover and identified along with three glycosides — ononin, rothindin and genistin. The synthesis of pratensein has been carried out.