



УДК 547.972+582.632

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ БЕРЕЗЫ

V. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД КАЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА
ФЛАВОНОИДНЫХ АГЛИКОНОВ ПОЧЕК БЕРЕЗЫ БОРОДАВЧАТОЙ
(*BETULA VERRUCOSA*) *

Кононенко Г. П., Поправко С. А., Вульфсон Н. С.

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

Разработан метод качественного анализа флавоноидных агликонов почек березы бородавчатой по группам однородно замещенных соединений в виде их полных метиловых и тридейтерометиловых эфиров. Этим методом проанализирован состав флавоноидов экстрактов почек, собранных в разные фазы развития растения: в фазе глубокого покоя, пробуждения и индукции цветения. Показано, что состав флавоноидов в первой и третьей фазах одинаков, но отличается от их состава в фазе пробуждения.

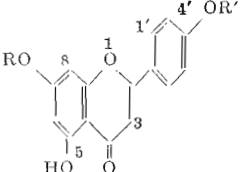
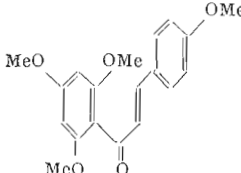
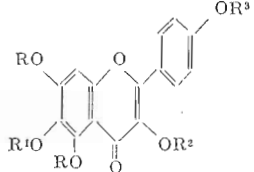
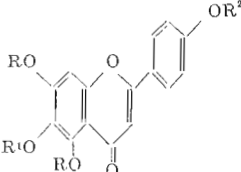
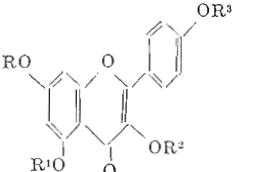
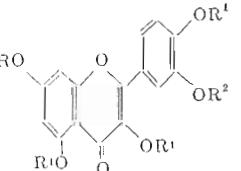
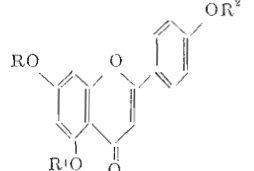
Ранее нами было показано, что в экстрактах зимующих почек березы бородавчатой (*Betula verrucosa*) содержатся 15 флавоноидных агликонов, 9 из которых были выделены в индивидуальном виде [2], а 6 соединений идентифицированы в смесях после исчерпывающего метилирования и тридейтерометилирования [1]. Все эти соединения по химической природе и характеру замещения могут быть отнесены к 6 основным группам, как показано в табл. 1. Это открывает возможность анализа смеси флавоноидов по группам одинаково замещенных соединений. Описанные ранее методы выделения и идентификации [1, 2] весьма трудоемки, требуют сравнительно больших количеств исходного материала и поэтому мало пригодны для изучения изменения состава флавоноидов по фазам развития растения, а также для химико-таксономических исследований.

В связи с этим нами разработан метод, который позволяет на сравнительно небольшом количестве растительного материала определять качественный состав флавоноидных агликонов почек березы бородавчатой и смесей аналогичного состава.

В основу метода положено исчерпывающее метилирование и тридейтерометилирование смеси агликонов с последующим градиентным хроматографическим разделением (табл. 2) и масс-спектрометрированием отдельных фракций метиловых и тридейтерометиловых эфиров. Как видно из табл. 1, агликоны с одинаковым характером замещения при исчерпывающем метилировании дают один полиметиловый эфир. Вместе с тем при исчерпывающем тридейтерометилировании в каждой из 6 групп выявляются 2—4 вещества, подвижность которых при ТСХ в системе 1 не отличается от подвижности соответствующего полиметилового эфира. Для

* Сообщение IV см. [1].

Распределение флавоноидных агликонов почек березы по типам замещения до и после исчерпывающего метилирования

А. Группа нарингенина (тип замещения 5,7,4')	Б. Группа пентаоксифлавона (тип замещения 3,5,6,7,4')
 <p>(Ia) Сакуранетин, R=Me, R'=H (Iб) 5-Окси-7,4'-диметоксифлавоон, R=R'=Me</p>  <p>(II) 2',4',6',4-тетраметоксичалкон</p>	 <p>(IIIa) 5,7-Дифокси-3,6,4'-триметоксифлавоон, R=H, R1=R2=R3=Me (IIIб) Бегулетол, R=R2=H, R1=R3=Me (IIIв) Пентаметоксифлавоон, R=R1=R2= =R3=Me</p>
В. Группа скутеллярина (тип замещения 5,6,7,4')	Г. Группа кемфераола (V) (тип замещения 3,5,7,4')
 <p>(IVa) Пектолинарингенин R=H, R1=R2=Me (IVб) 5,7,4'-Триокси-1-6-метоксифлавоон, R=R2=H, R1=Me (IVв) Тетраметоксифлавоон, R=R1=R2=Me</p>	 <p>(Va) 3,5-Дифокси-7,4'-диметоксифлавоон, R1=R2=H, R=R3=Me (Vб) 5,7-Дифокси-3,4'-диметоксифлавоон, R=R1=H, R2=R3=Me (Vв) Кемферид, R=R1=R2=H, R3=Me (Vг) Тетраметоксифлавоон, все R=Me</p>
Д. Группа кверцетина (тип замещения 5,5',7,3',4')	Е. Группа апигенина (VII) (тип замещения 5,7,4')
 <p>(VIa) Рамназин, R1=H, R=R2=Me (VIб) Изорамнетин, R=R1=H, R2=Me (VIв) Пентаметоксифлавоон, R=R1=R2=Me</p>	 <p>(VIIa) 5-Окси-7,4'-диметоксифлавоон, R1=H, R=R2=Me (VIIб) Акадетин, R=R1=H, R2=Me (VIIв) Триметоксифлавоон, R=R1=R2=Me</p>

Условия градиентной колоночной хроматографии смеси полиметиловых эфиров флавоноидных агликонов *

Группа	Растворитель (соотношение бензола и ацетона)	Номер фракций	R_f (система 1)	Группа	Растворитель (соотношение бензола и ацетона)	Номер фракций	R_f (система 1)
А	95:5	1-10	0,93	Г	85:15	35-50	0,51
Б	90:10	11-30	0,85	Д	75:25	51-70	0,42
В	85:15	31-34	0,76	Е	50:50	71-80	0,38

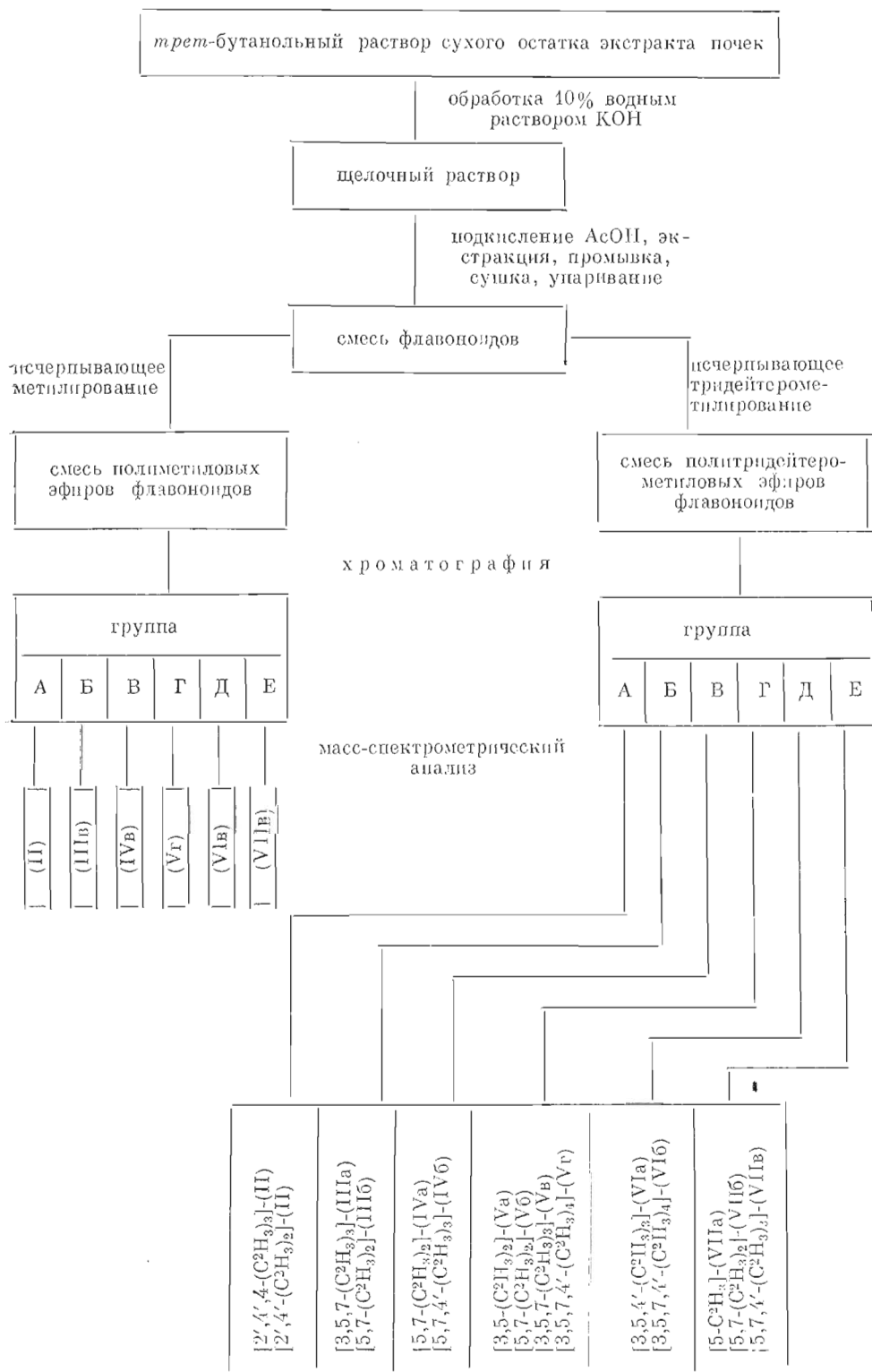
* При исходной навеске 1 г.

проведения данного анализа важно отделить флавоноидные агликоны от сопутствующих соединений, содержащихся в сыром экстракте почек. Это удалось осуществить растворением сухого остатка экстракта в *трет*-бутаноле с последующей экстракцией раствора 10% водным КОН, подкислением водно-щелочного слоя ледяной уксусной кислотой до pH 5 и извлечением флавоноидов этилацетатом. Применение других растворителей не дает положительных результатов. Таким образом, весь ход качественного анализа флавоноидного состава почек березы может быть представлен схемой.

Масс-спектрометрический анализ компонентов отдельных групп флавоноидов (группы А—Е) с различным типом замещения проводился аналогично описанному ранее [2]. В случае групп А—В, Д и Е он затруднений не вызывал (табл. 3). Более сложным оказался анализ 4 тридейтерометиловых эфиров, составляющих группу Г (табл. 3). Обнаружение эфиров [3,5,7-(C²H₃)₃]- (Vв) и [3,5,7,4'-(C²H₃)₄]- (Vг) не вызывало трудностей, так как они различались значениями *m/e* для M^+ (351 и 354 соответственно). Два других эфира, [3,5-(C²H₃)₂]- (Va) и [5,7-(C²H₃)₂]- (Vб), имели одинаковое значение *m/e* для M^+ , равное 348, и одинаковые заместители в положениях 5 и 4'. Анализ масс-спектров заводомых образцов этих тридейтерометиловых эфиров показал, что различить их в смеси можно только по соотношению интенсивностей пиков ионов ($M-H-H_2O$)⁺ с *m/e* 329, ($M-H-^2HON$)⁺ с *m/e* 328 и ($M-H-^2H_2O$)⁺ с *m/e* 327. Присутствие в спектре смеси Г пиков всех этих ионов с интенсивностью 10—20% в пересчете на интенсивность пика M^+ указывает на то, что она содержит оба эфира. Наличие близкого по интенсивности пика при *m/e* 327 и значительно менее интенсивных пиков двух других ионов в спектре указывает на присутствие в образце только эфира [3,5-(C²H₃)₂]- (Va). Пики при *m/e* 328 и 329 той же интенсивности при малоинтенсивном пике с *m/e* 327, наоборот, указывают на присутствие в образце только [5,7-(C²H₃)₂]- (Vб). Как видно из данных табл. 3, в фазе покоя в почках содержатся оба эфира.

Этим методом был проанализирован флавоноидный состав почек березы бородавчатой, собранных в фазе глубокого покоя, начала весеннего пробуждения и индукции цветения. Качественный состав флавоноидных агликонов в фазе глубокого покоя и индукции цветения оказался одинаковым, но резко отличался от состава флавоноидов в фазе весеннего пробуждения (табл. 4). В этот период в почках отсутствовали флаваноны (группа А), обладающие ростиингибирующей активностью [3], все производные кверцетина (группа Д), 5,7,4'-триоксифлавои (апигенин) и 3,5-диокси-7,4'-диметоксифлавои (Va). Ранее было показано, что содержание 5,7,4'-триоксифлаванона (парингенина) в почках персика (*Prunus persica*), также обладающего ростиингибирующей активностью *in vitro*, максимально в состоянии покоя и резко снижается к началу весеннего роста [4]. Флавоны, характерные для покоящихся почек березы и исчезающие

Схема метода качественного анализа смеси флавоноидных агликонов почек березы



Основные характеристические данные масс-спектров, полученные при качественном анализе флавоноидов почек березы в фазе покоя по группам одинаково замещенных соединений в виде тридейтерометилловых эфиров *

Группа	Вещество	Ионы (m/e)						
		M+	(M-CO)+	(M-CH ₃)+	(M-OCH ₃)+	(M-H-H ₂ O)+	(M-H- ² HOH)+	(M-H- ² H ₂ O)+
А	[2,4,4-(C ² H ₃) ₂]- (II)	334 (8)	306 (32)	-	-	-	-	-
	[2,4,4-(C ² H ₃) ₃]- (II)	337 (32)	309 (100)	-	-	-	-	-
Б	[5,7-(C ² H ₃) ₂]- (IIIa)	378 (98)	-	363 (100)	-	-	-	-
	[3,5,7-C ² H ₃) ₃]- (IIIб)	381 (36)	-	366 (39)	-	-	-	-
В	[5,7-(C ² H ₃) ₂]- (IVa)	348 (42)	-	333 (100)	-	-	-	-
	[5,7,4-(C ² H ₃) ₃]- (IVб)	351 (6)	-	336 (12)	-	-	-	-
Г	[3,5-(C ² H ₃) ₂]- (Va)	348 (76)	-	-	-	329 (15)**	328 (17)**	327 (12)**
	[5,7-(C ³ H ₃) ₂]- (Vб)	-	-	-	-	332 (7)	331 (13)	330 (33)
Д	[3,5,7-(C ² H ₃) ₃]- (Vв)	351 (93)	-	-	-	-	-	-
	[3,5,7,4-(C ³ H ₃) ₄]- (Vг)	354 (9)	-	-	-	-	-	-
Е	[3,5,4-(C ² H ₃) ₃]- (VIa)	384 (100)	-	366 (43)	-	-	-	-
	[3,5,7,4-(C ² H ₃) ₄]- (VIб)	384 (22)	-	369 (11)	-	-	-	-
Е	[5-C ² H ₃]- (VIIa)	315 (48)	-	-	285 (15)	-	-	-
	[5,7-(C ³ H ₃) ₂]- (VIIб)	318 (100)	-	-	288 (18)	-	-	-
	[5,7,4-(C ³ H ₃) ₃]- (VIIв)	321 (13)	-	-	291 (3)	-	-	-

* В скобках приведена относительная интенсивность пика.

** В скобках приведена интенсивность по отношению к интенсивности пика иона с m/e 351.

Основные характеристические данные масс-спектров, полученные при качественном анализе флавоноидов почек березы в фазе пробуждения по группам одинаково замещенных соединений в виде тридейтерометилловых эфиров *

Группа	Вещество	Ионы (m/e)					
		$M+$	$(M--CH_3)+$	$(M--OCH_3)+$	$(M-H--H_2O)+$	$(M-H--^2HOH)+$	$(M-H--^3H_2O)+$
Б	[5,7-(C ² H ₃) ₂]- (IIIa)	378 (92)	363 (100)	—	—	—	—
	[3,5,7-(C ² H ₃) ₃]- (IIIб)	381 (17)	366 (18)	—	—	—	—
В	[5,7-(C ² H ₃) ₂]- (IVa)	348 (42)	333 (100)	—	—	—	—
	[5,7,4 ¹ -(C ² H ₃) ₃]- (IVб)	351 (6)	336 (12)	—	—	—	—
Г	[5,7-(C ² H ₃) ₂]- (Vб)	348 (93)	—	—	329 (18)	328 (25)	327 (2)
	[3,5,7-(C ² H ₃) ₃]- (Vв)	351 (38)	—	—	332 (3)	331 (7)	330 (17)
Е	[5-C ² H ₃]- (VIIa)	315 (100)	—	285 (28)	—	—	—
	[5,7-(C ² H ₃) ₂]- (VIIб)	318 (34)	—	288 (10)	—	—	—

* В скобках приведена относительная интенсивность пика.

в период пробуждения, оказались практически неактивными *in vitro* [3]. Причина их исчезновения наряду с биологически активными флаванонами пока неясна.

Относительное содержание в экстрактах почек флавоноидных агликонов, сгруппированных по типам замещения, в различных фазах развития растения определяли спектрофотометрически [9]. Оказалось, что в фазе пробуждения резко падает содержание производных кемпферола (группа Г) и незначительно возрастает содержание производных скутелляреина (группа В). Фаза индукции цветения отличается от фазы покоя некоторым увеличением содержания флаванолов группы А и флавонов групп Г и Д. Эти данные свидетельствуют о том, что для целей изучения полного состава флавоноидных агликонов почек березы наиболее подходящим периодом сбора растительного материала являются фазы индукции цветения и особенно глубокого покоя, в течение которого флавоноидный состав не изменяется. Это особенно существенно для химико-таксономических исследований. Разработанный нами способ идентификации, по-видимому, может быть использован и для анализа флавоноидов почек других древесных, таких, как *Populus* [5, 6], *Aesculus* [7, 8] и *Alnus* [10, 11].

Экспериментальная часть

Для анализа флавоноидов экстрактов по группам одинаково замещенных соединений использовали почки березы, собранные во время глубокого покоя (19 декабря), перед началом роста (28 апреля) и непосредственно перед зацветанием (6 мая). Пробы отбирали в 1974 г. с растений, произраставших в естественных условиях вблизи Москвы.

Для колонночной хроматографии использовали силикагель L100/160 (Chemapol, ЧССР). Аналитическую ТСХ проводили на пластинках силифола (Chemapol, ЧССР) в системе бензол — этилацетат, 3:7 (система 1). Условия записи УФ- и масс-спектров указаны ранее [2].

Получение ацетоно-метанольных экстрактов. Пробу в 35 г почек встряхивали с 100 мл ацетона в течение 10 мин, затем ацетоновый раствор сливали, а почки без высушивания измельчали и трижды экстрагировали сначала ацетоном, а затем метанолом (по 100 мл). Экстракты объединяли, упаривали и удаляли остатки воды многократной отгонкой с бензолом в вакууме при 45° С.

Выделение суммарной фракции, содержащей флавоноиды. Сухой остаток ацетоно-метанольного экстракта (15 г) растворяли при 50° С в 50 мл *трет*-бутанола и полученный раствор шестикратно экстрагировали порциями по 20 мл 10% водного раствора КОН. Объединенные щелочные

растворы подкисляли ледяной уксусной кислотой до pH 5,0 и экстрагировали равным объемом этилацетата. Экстракт упаривали в вакууме до объема 30 мл, промывали водой до нейтральной реакции, высушивали над сульфатом натрия и упаривали в вакууме досуха. Получили сухой остаток суммарного продукта, содержащего флавоноиды, который к весу сухого остатка ацетоно-метанольного экстракта составил 40% для почек во время глубокого покоя, 15% перед началом роста и 60% в момент зацветания.

Исчерпывающее метилирование суммарной фракции, содержащей флавоноиды. К раствору 1,5 г продукта в 15 мл диметилсульфоксида небольшими порциями прибавляли 0,7 г NaN и 7,5 мл CH_3I . Реакционную смесь после непрерывного перемешивания в течение 3 ч при 20° С подкисляли 3 каплями ледяной AsOH и разбавляли равным объемом смеси бензол — этилацетат, 1 : 1. Органический слой промывали водой до нейтральной реакции и затем последовательно растворами бикарбоната натрия, поваренной соли, гипосульфита натрия и водой, сушили над сульфатом магния, после чего упаривали в вакууме досуха.

Разделение продукта исчерпывающего метилирования флавоноидов на группы и анализ фракций. Раствор 1 г продукта метилирования в 5 мл смеси бензол — ацетон (98 : 2) вносили в колонку (350×30 мм), содержащую 180 г силикагеля, и проводили элюирование системой бензол — ацетон (95 : 5). Первые 250 мл элюата далее не использовали, затем начинали отбор фракций по 50 мл. Условия разделения приведены в табл. 2. Контроль за разделением проводили в системе 1. Объединенные элюаты упаривали в вакууме досуха, взвешивали и далее использовали для снятия масс- и УФ-спектров. Индивидуальные флавоноиды имели следующие максимумы поглощения в УФ-спектрах [приведены вещество и λ_{max} , нм ($\lg \epsilon$)]: (II), 330 (4,45); (IIIв), 3,22 (4,08); (IVв), 324 (4,23); (Vг), 337 (4,40); (VIв), 340 (4,49); (VIIв), 326 (4,52).

ЛИТЕРАТУРА

1. Поправко С. А., Копоненко Г. П., Тихомирова В. И., Вульфсон Н. С. (1979) Биоорганич. химия, 5, 1662—1667.
2. Копоненко Г. П., Поправко С. А., Вульфсон Н. С. (1975) Биоорганич. химия, 1, 506—511.
3. Поправко С. А., Копоненко Г. П., Соколова С. А., Сизой М. Н., Вульфсон Н. С. (1979) Биоорганич. химия, 5, 735—745.
4. El-Mansy H. I., Walker D. R. (1969) J. Amer. Soc. Hort. Sci., 94, 298—301.
5. Egger K., Tissut M., Wollenweber E. (1969) Phytochem., 8, 2425—2426.
6. Wollenweber E., Egger K. (1974) Phytochem., 10, 225—226.
7. Egger K., Wollenweber E., Tissut M. (1970) Z. Pflanzenphysiol., 62, 464—466.
8. Wollenweber E., Egger K. (1970) Tetrahedron Lett., 1601—1604.
9. Копоненко Г. П. (1977). Канд. дис. «Изучение химической природы ростингибирующего комплекса почек березы бородавчатой», М.
10. Wollenweber E., Egger K., Schnepf E. (1971) Biochem. und Physiol. Pflanz., 162, 193—202.
11. Wollenweber E., Wassum M. (1972) Tetrahedron Lett., 797—800.

Поступила в редакцию
12.IV.1979

SECONDARY METABOLITES OF BIRCH. V. MASS-SPECTROMETRIC METHOD OF QUANTITATIVE ANALYSIS OF FLAVONOID AGLYCONS FROM BIRCH BUDS (*BETULLA VERRUCOSA*)

KONONENKO G. P., POPRAYKO S. A., WULFSON N. S.

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

The method of quantitative analysis of flavonoid aglycons from birch buds in the form of equally substituted permethyl and perdeuteriomethyl ethers has been developed. The flavonoid composition of the bud extracts collected at several stages of plant development — dormancy, breaking stages and before flowering — were analyzed. It was shown that the flavonoid composition was the same at the first and third stages but differed in the breaking stage.