



УДК 547.972+582.632

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ БЕРЕЗЫ

3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИНГИБИТОРОВ РОСТА В ПОЧКАХ

*BETULA VERRUCOSA**

Поправко С. А., Кононенко Г. П., Соколова С. А.,
Сизой М. Н., Вульфсон Н. С.

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

В экстрактах зимующих почек березы идентифицированы соединения, обладающие ростингибирующей активностью *in vitro*: сакуранин (I) и его 4'-метилловый эфир (II), ацетат α -бетуленола (III), *n*-метокси- (IV) и *n*-оксибензойная (V), *n*-кумаровая (VI) и абсцизовая (VII) кислоты. Соединения (I)–(VI) образуют в зимующих почках березы ростингибирующий комплекс, появляясь в фазе глубокого покоя и непосредственно перед зацветанием, и исчезают в отличие от абсцизовой кислоты (VII) перед началом активного роста. Приведены данные по ростингибирующей активности ряда природных флаванонов и по масс-спектрометрии триметилсилилового эфира абсцизовой кислоты.

Ранее мы сообщали о присутствии в почках березы бородавчатой (*Betula verrucosa*) двух соединений флаванонового ряда [1, 2], группы ароматических кислот и абсцизовой кислоты [3]. Содержание последней в почках березы было исследовано также Саундерсом с сотр. [4, 5]. Чернобровкина и Кефели [6] показали, что при хроматографии экстрактов почек березы карельской ростингибирующим действием обладают элюаты нескольких зон. Однако систематических исследований ингибиторов роста березы и других растений проведено не было. В связи с тем, что им отводится важная роль в приспособительных реакциях вида, в том числе в зимнем покое [7], мы предприняли попытку выявить основные соединения, которые содержатся в почках березы бородавчатой в различные периоды годового цикла и обладают ростингибирующей активностью в опытах *in vitro*.

Предварительно нами была определена активность экстрактов почек, собранных в период глубокого покоя и перед началом роста в тестах на растяжение клеток coleoptилей пшеницы. Для этой цели одинаковые по весу порции экстрактов были разделены на пластинках с силикагелем в системе бензол — ацетон (8 : 2) и элюаты из 9 собранных зон (R_f 0,1–0,2, 0,2–0,3 и т. д.) тестированы на растяжение стрезков coleoptилей пшеницы. Результаты биотестов приведены на рис. 1.

Полученные данные свидетельствовали о значительном снижении ростингибирующей активности экстракта при переходе от глубокого покоя к пробуждению, причем особенно существенное изменение активности наблюдалось для элюатов зон с R_f 0,6–0,7 и 0,7–0,8. Основными компо-

* Сообщения 1 и 2 см. [1, 2].

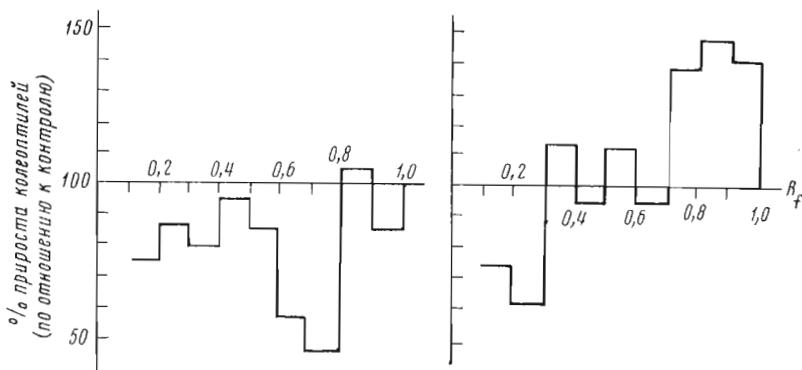


Рис. 1. Ростовая активность экстрактов почек, находящихся в состоянии глубокого покоя (а) и перед началом роста (б) (тест на растяжение отрезков coleoptилей пшеницы)

нентами этих зон в экстрактах почек, находящихся в состоянии глубокого покоя, оказались флаваноны сакуранетин (I) (R_f 0,58) и его 4'-метил-овый эфир (II) (R_f 0,85) и содержащиеся в меньшем количестве 5-окси-7, 4'-диметокси- и 3, 5-диокси-7, 4'-диметоксифлавоны (R_f 0,75 и 0,78 соответственно), описанные нами ранее [2]. Два последних соединения, подвергнутые биоиспытаниям в двух тестах — на растяжение отрезков coleoptилей пшеницы и на прорастание семян горчицы (см. табл. 1) оказались неактивными. Напротив, флаваноны (I) и (II) в концентрациях $2 \cdot 10^{-5}$ — $1,2 \cdot 10^{-4}$ М проявили заметную активность в обоих тестах. Попытки оценить биологическую активность чистых соединений (I) и (II) в более высоких концентрациях были, однако, неудачными вследствие их низкой растворимости в водных растворах. Способность тормозить растяжение отрезков coleoptилей ранее была выявлена для 5, 7, 4'-триоксифлаванона (нарингенина), накапливающегося в зимующих почках персика [8]. Полученные нами данные по ростингибирующей активности ряда других природных флаванонов свидетельствуют о том, что эта способность, возможно, является общим свойством данного класса соединений. Наличие в положении 4' (табл. 1) гидроксильной или метоксильной группы существенно не сказывается на активности. Заметно не влияет также на ее уровень алкилирование или гликозидирование гидроксильной группы в положении 7, что согласуется и с данными Коргана [8]. Введение гидроксильных групп в 3- и 3'-положения заметно снижает активность. С другой стороны, ароматизация кольца С приводит к полной потере способности ингибировать рост.

Содержание флаванонов (I) и (II) составляло $\sim 6,2\%$ от веса сухого остатка экстракта почек, собранных в фазе глубокого покоя. При навеске, взятой для получения гистограмм (6 мг), это означало их концентрацию в тестируемом растворе порядка $6 \cdot 10^{-4}$ М, что намного превышает минимальные значения концентрации, необходимые для проявления ростингибирующего эффекта (ср. табл. 1). Таким образом, высокая активность элюатов зон с R_f 0,6—0,8 хорошо согласуется с содержанием и уровнем ростовой активности присутствующих в них флаванонов (I) и (II).

Элюат зоны с R_f 0,9—1,0, который также проявил способность подавлять рост (рис. 1), содержал сесквитерпеноидное маслообразное соединение с эмпирической формулой $C_{17}H_{26}O_2$, определенной по масс-спектру высокого разрешения. Согласно данным ИК- и ЯМР-спектров, это соединение имело ацетоксильную и экзоциклическую метиленовую группы, двойную связь и 3 метильные группы. По совокупности физико-химических характеристик и данных масс-спектрометрии высокого разрешения оно оказалось идентичным ацетату α -бетуленола (III), описанному ранее

Таблица 1

Ростингибирующая активность группы природных флаванонов и флавонов

Вид биотеста	Соединение	Концентрация, М	% подавления
Растяжение отрезков ко- леоптилей пшеницы	Ф л а в а н о н ы		
	5,4'-Дюокси-7-метокси-(са- куранетин) (I)	2·10 ⁻⁵ 10 ⁻⁴	17,6 19,3
	5-Окси-7,4'-диметокси- (II)	2·10 ⁻⁵ 10 ⁻⁴	16,9 10,9*
	3,5,7,4'-Тетраокси-(аромап- дендрин)	2·10 ⁻⁵ 10 ⁻⁴	7,3 16,3
	3,5,7,3',4'-Пентаокси-(так- сифолий)	2·10 ⁻⁵ 10 ⁻⁴	3,4 5,4
	5,4'-Дюокси-7-глюкозилокси- (нарингин)	2·10 ⁻⁵ 10 ⁻⁴	10,0 17,7
	Ф л а в о н ы		
	5-Окси-7,4'-диметокси-	2·10 ⁻⁵ 10 ⁻⁴	— —
	3,5-Дюокси-7,4'-диметокси-	2·10 ⁻⁵ 10 ⁻⁴	— —
	Прораствание семян горчицы	Ф л а в а н о н ы	
5,4'-Дюокси-7-метокси-(са- куранетин) (I)		6·10 ⁻⁵ 1,2·10 ⁻⁴	26,6 29,6
5-Окси-7,4'-диметокси- (II)		6·10 ⁻⁵ 1,2·10 ⁻⁴	26,0 32,6

* Наблюдается частичное выпадение испытуемого вещества в осадок.

Таблица 2

Данные хромато-масс-спектрометрического изучения Me₃Si-эфиров заведомых образцов *n*-метокси- (IV), *n*-оксибензойной (V) и *n*-кумаровой кислот (VI) и природной смеси кислот (ср. рис. 2)

Me ₃ Si-эфир	Ионы, <i>m/e</i> (относительная интенсивность, %)				Относи- тельное время удержи- вания
	<i>M+</i>	[<i>M-Me</i>] [†]	[<i>M-Me-CO₂</i>] [†]	[<i>M-Me₃SiO</i>] [†]	
<i>n</i> -Метоксибензойной кислоты (IV)	224 (25)	209 (83)	165 (59)	135 (100)	0,54
Соединения из пика 4	224 (26)	209 (85)	165 (65)	135 (100)	0,55
<i>n</i> -Оксибензойной кис- лоты (V)	282 (37)	267 (100)	223 (57)	193 (65)	0,78
Соединения из пика 5	282 (33)	267 (100)	223 (54)	193 (59)	0,77
<i>n</i> -Кумаровой кислоты*	308 (67)	293 (70)	249 (34)	219 (79)	1,00
Соединения из пика 6	308 (53)	293 (56)	249 (23)	219 (57)	1,00

* 100% интенсивность имеет ион с *m/e* 73.

Голубом с сотр. [9], и его строение было подтверждено превращением при действии LiAlH₄ в α-бетулепол [9].

Ацетат α-бетулепола, являющийся главным сесквитерпеноидным компонентом зимующих почек березы, уже в концентрации 10⁻⁴ М подавлял растяжение отрезков колеоптилей пшеницы на 33%. Содержание этого вещества составляло 1,5% от веса сухого остатка экстракта покоящихся почек; следовательно, при взятой для получения гистограмм навеске в 6 мг его содержание в 2 мл раствора, использованного для тестирования соответствующей зоны, было близко к 1,5·10⁻⁴ М, т. е. находилось на уровне, достаточном для проявления ростингибирующего эффекта.

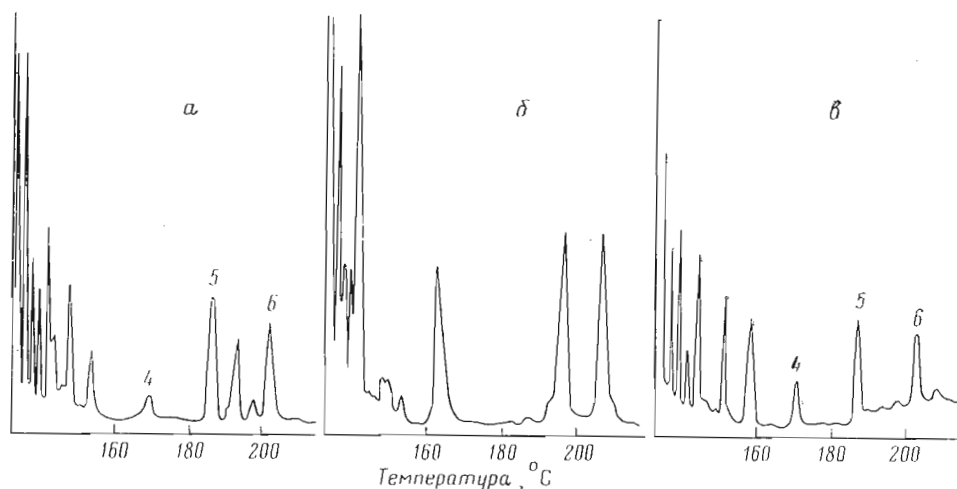
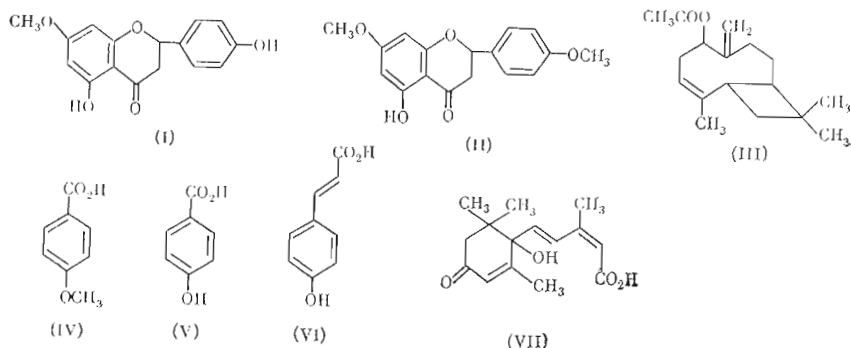


Рис. 2. Газожидкостная хроматография Me_3Si -производных кислот из почек, находящихся в состоянии глубокого покоя (а), перед началом роста (б) и непосредственно перед зацветанием (в)

Ввиду важной роли, приписываемой абсцизовой кислоте в регуляции фаз развития растений, особый интерес представляло изучение химической природы кислых ростиингибирующих соединений, которые содержались в полярной фракции экстрактов и имели одинаковое с нею значение R_f .



Для обнаружения этих соединений нами были взяты 100-граммовые пробы почек, собранные сразу после опадения листьев, во время глубокого покоя, перед началом роста и непосредственно перед зацветанием. Для удаления с их поверхности смолообразных малополярных веществ они были предварительно обработаны бензолом, после чего размельчены и многократно проэкстрагированы метанолом.

Газожидкостная хроматография триметилсилильных производных кислот, выделенных из экстрактов почек обработкой их водным раствором бикарбоната натрия, показала наличие большого числа пиков различных соединений (рис. 2). Три из них, обозначенные на рис. 2а и 2в цифрами 4, 5 и 6, полностью отсутствовали во фракции, полученной из почек, собранных перед началом роста (рис. 2б). По аналогии с флаванонами (I) и (II), обладающими ростиингибирующей активностью и исчезающими в почках в фазе пробуждения [1], можно было ожидать, что соответствующие кислоты также обладают способностью препятствовать росту растения и поэтому удаляются из почек в период активного роста. Строение этих кислот было установлено следующим образом. Комбинированной

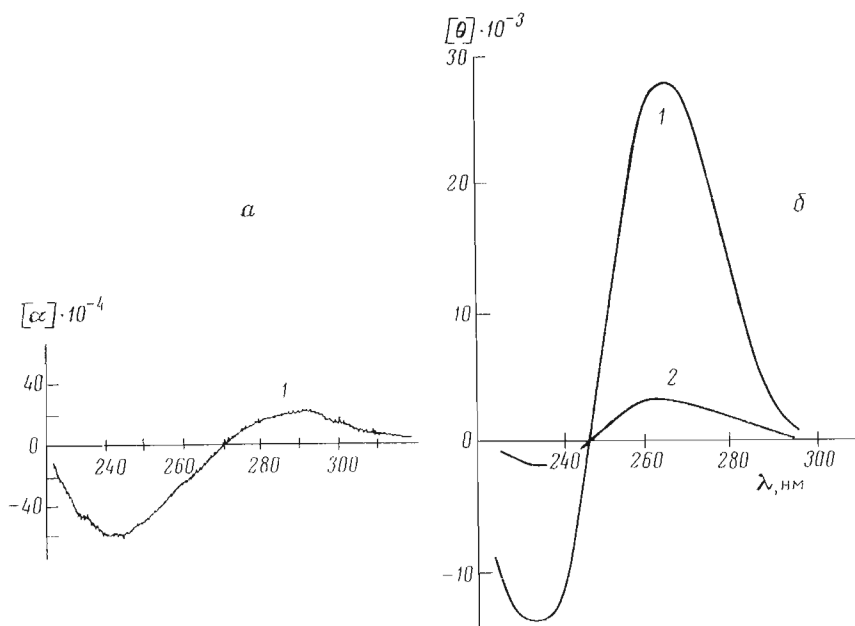


Рис. 3. Кривые ДОВ (а) и КД (б) сухих остатков элюатов, содержащих абсцизовую кислоту (1 – в фазе глубокого покоя, 2 – в фазе вынужденного покоя)

ГЖХ-масс-спектрометрией их Me_3Si -производных на колонках с 3% SE-30 были получены масс-спектры всех трех эфиров, молекулярные веса которых оказались равными соответственно 224, 282 и 308 а.е.м. На основании масс-спектров и последующим прямым сравнением с известными образцами эти соединения были идентифицированы как Me_3Si -эфиры *n*-метокси- (IV), *n*-оксибензойной (V) и *n*-кумаровой (VI) кислот (табл. 2).

Для *n*-оксибензойной и *n*-кумаровой кислот способность подавлять растяжение отрезков колеоптилей злаков была известна ранее; так, у *n*-кумаровой кислоты ED_{50} составляет $4 \cdot 10^{-3}$ М, а нулевая точка активности $-0,8 \cdot 10^{-3}$ М [10, 11]. Проведенные нами биоиспытания *n*-метоксибензойной кислоты показали, что в тесте на растяжение отрезков колеоптилей пшеницы ее ED_{50} равно $1,3 \cdot 10^{-3}$ М, а нулевая точка находится при $0,3 \cdot 10^{-3}$ М. Таким образом, все три ароматические кислоты покоящихся почек березы, не обнаруженные в экстракте перед началом роста, обладали примерно одинаковым уровнем и характером ростигибирующей активности и могли быть в существенной степени ответственными за наблюдаемую активность полярных фракций экстракта: соединение (IV) имеет R_f 0,4, а соединения (V) и (VI) R_f 0,2.

Очистку абсцизовой кислоты мы проводили сначала на силикагеле последовательно в двух системах растворителей и затем на бумаге. Зона с R_f 0,62–0,66 (бумага, изопропанол – аммиак – вода, 10 : 1 : 1) была элюирована спиртом и для полученного элюата были измерены спектры ДОВ и КД (рис. 3), которые близко соответствовали описанным [5, 12]. Для окончательной идентификации растворы после снятия спектров были упарены, содержащиеся в них вещества триметилсилилированы и подвергнуты хромато-масс-спектрометрическому анализу. Масс-спектр эфира, время удерживания которого совпадало со временем удерживания Me_3Si -производного известной рацемической абсцизовой кислоты, приведен на рис. 4. Как и следовало ожидать при анализе природной смеси, пик молекулярного иона эфира абсцизовой кислоты не выявлялся ввиду его низкой интенсивности (у известного образца менее 5%). Однако пики характеристических ионов со значениями m/e ниже 250 а.е.м. обнаруживались вполне четко.

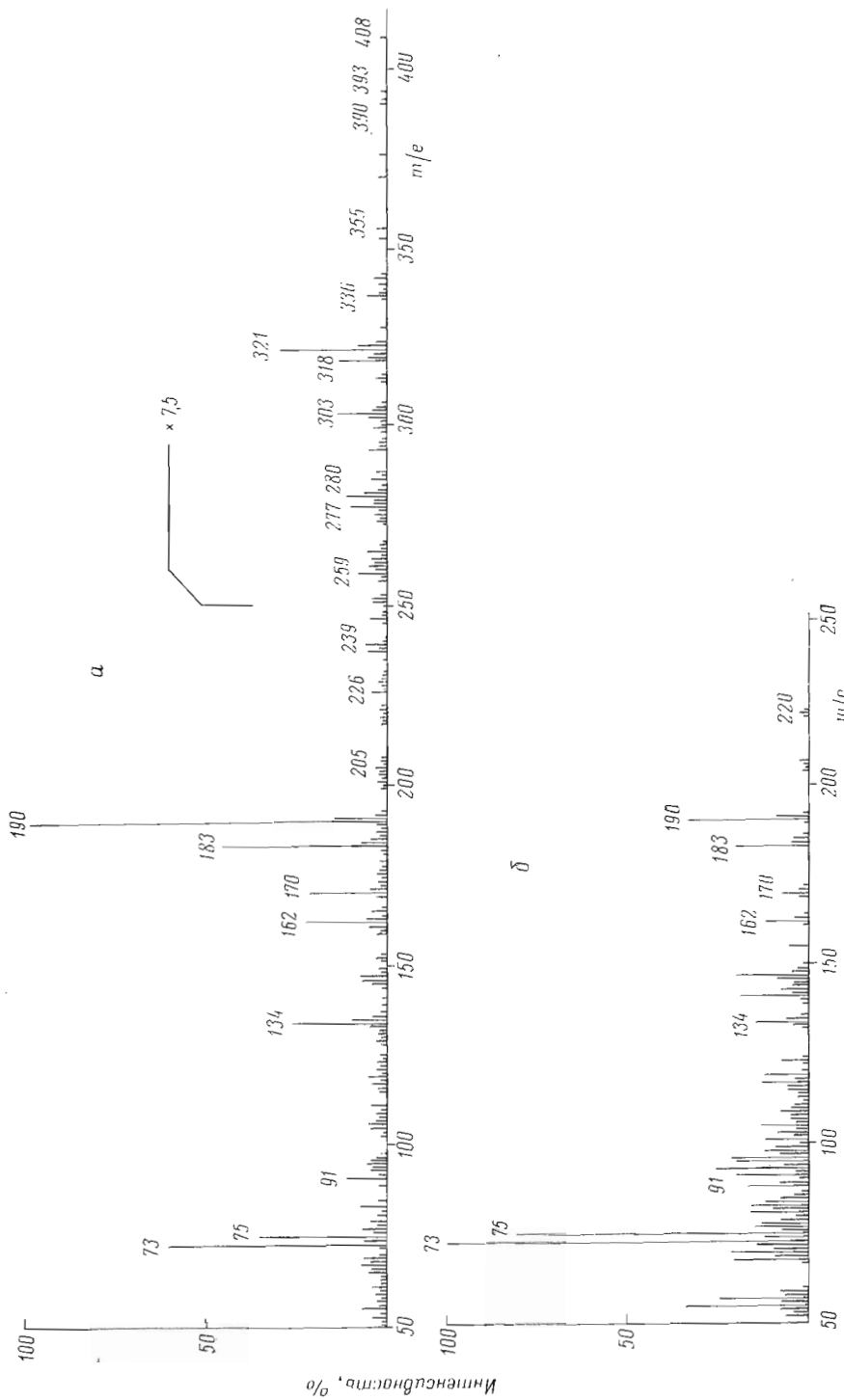
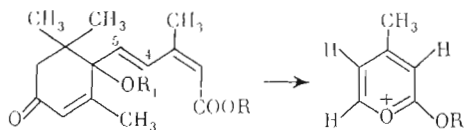


Рис. 4. Масс-спектры Me_3Si -производных синтетической (а) и выделенной из экстракта почеч бер-зы (б) абсциссовой кислоты

По данным масс-спектра высокого разрешения, у Me_3Si -производного заведомого образца абсцизовой кислоты (VIII) (рис. 4) ионы с m/e 246, 190, 162, 134, 106, 91 имели тот же состав, что и в спектре монометилового эфира этой кислоты (IX), описанном ранее [13]. Простой отрыв всей боковой цепи эфира (VIII) приводит к иону с m/e 183 ($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{O}_2\text{Si}$); аналогичные ионы с m/e 125 и 111 выявляются в спектре монометилового эфира [13] и самой кислоты [14] соответственно



(VII)	$\text{R}=\text{R}_1=\text{H}$	M^+ 338	m/e 111
(VIII)	$\text{R}=\text{R}_1=\text{SiMe}_3$	M^+ 408	m/e 183
(IX)	$\text{R}=\text{Me}, \text{R}_1=\text{H}$	M^+ 352	m/e 125

Ионы с m/e 170 и 239 образуются, по-видимому, путем разрыва двойной связи при атомах 4,5. Первый ион содержит 1—4-й атомы боковой цепи молекулы ($\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2\text{Si}$) и эквивалентен иону с m/e 112 в спектре монометилового эфира (IX). Второй ион с m/e 239 ($\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{O}_2\text{Si}$), очевидно, включает циклогексановое кольцо молекулы и С-5 боковой цепи; соответствующий ион в спектре монометилового эфира не обнаружен.

Проведенный анализ показал, что абсцизовая кислота присутствует в почках, собранных сразу после опадения листьев, а также во время глубокого покоя и перед началом роста, но не обнаруживается в почках, собранных непосредственно перед зацветанием. Таким образом, она имеется в почках и в тех фазах, когда другие ингибиторы роста, соединения (I)—(VI), отсутствуют в них полностью. Это, очевидно, свидетельствует о различных механизмах контроля биосинтеза этих метаболитов в изучаемом растении.

Судя по гистограмме (рис. 1), вклад абсцизовой кислоты в активность экстрактов (ее R_f равен 0,14) невелик. Однако сравнительно невысокая активность элюата зоны с R_f 0,1—0,2 могла быть результатом одновременного присутствия в ней других соединений, обладающих ростстимулирующим действием. В связи с этим мы оценили количественно содержание абсцизовой кислоты в экстрактах почек по методу [5], т. е. по кривым ДОВ с учетом установленных ранее потерь на рацемизацию. Этот расчет привел к величине 0,2 мкг/г сырого растительного материала для почек, собранных во время глубокого покоя. Харрисон и Саундерс [5] приводят величину 0,96 мкг/г для почек, собранных в ноябре, и 0,52 мкг/г для почек декабряского сбора. При такой концентрации кислоты в почках вклад ее в активность соответствующей фракции экстракта должен быть крайне незначительным или отсутствовать вовсе. Действительно, для получения гистограмм были взяты порции по 6 мг сухого остатка ацетон-метанольного экстракта, который составляет $1/3$ от исходного веса почек. Следовательно, концентрация абсцизовой кислоты во взятом для тестирования объеме раствора (2 мл) могла в этих условиях лишь незначительно превысить уровень 10^{-8} М и, таким образом, выйти или оказаться на границе чувствительности выбранного биотеста [11].

Другие ингибиторы роста, идентифицированные в почках березы, а именно соединения (I)—(VI), накапливались в них в существенно больших концентрациях и, несмотря на свойственный им более низкий уровень удельной активности, обуславливали, очевидно, основной вклад в наблюдаемую активность *in vitro*. Соединения (I)—(VI) появляются и исчезают в почках одновременно, что указывает на то, что они входят в состав ростингибирующего комплекса данного вида и играют важную роль в его приспособительных реакциях к условиям внешней среды.

Экспериментальная часть

Для экстракции использовали почки березы *Betula verrucosa*, собранные сразу после опадения листьев (19 сентября, проба А), во время глубокого покоя (19 декабря, проба Б), перед началом роста (28 апреля, проба В) и непосредственно перед зацветанием (6 мая, проба Г). Пробы отбирали в 1974 г. с растений, произраставших в естественных условиях вблизи Москвы. Полученные ацетоновых и ацетон-метанольных экстрактов описано нами ранее [2]. Для колоночной хроматографии использовали силикагель (Л, 100/160 меш, Chemapol, ЧССР), нейтральную окись алюминия (активность II) и кизельгель-100 (70–230 меш, Merck, ФРГ). Для ТСХ применяли пластинки размером 15×15 см с незакрепленным слоем силикагеля (ЛЛ₂₅₄, 5/40 м с люминесцентным индикатором) толщиной 0,5 мм и силуфол (Chemapol, ЧССР). На каждую пластинку наносили 15 мг разделяемой смеси. Хроматографию на бумаге «Ленинградская медленная» проводили восходящим способом.

Спектры КД записывали на приборе Cary-60 (США) в растворе этанола (c — концентрация в мг/л) при толщине слоя 0,01 см. Спектры ДОВ снимали на том же приборе с приставкой Cary-60001 (США). Показатель преломления измеряли на рефрактометре ИРФ-22. ИК-спектры снимали на приборе UR-20 (ГДР) в пленке вещества. Комбинированную ГЖХ-масс-спектрометрию Me_3Si -эфиров кислых фракций экстрактов проводили на приборе LKB-9000, снабженном колонкой размером 1500×3 мм с 3% SE-30 Chromosorb W (80–100 меш) при программировании температуры от 160 до 220° (4°/мин) для анализа фракций Me_3Si -эфиров фенолкарбоновых кислот и от 180 до 310° (10°/мин) для анализа фракций, содержащих абсцизовую кислоту. Температура инжектора 220°, молекулярного сепаратора и ионного источника 240°, энергия ионизирующих электронов 70 эВ. Масс-спектры высокого разрешения Me_3Si -эфиров абсцизовой кислоты и фенолкарбоновых кислот измеряли на приборе MS-902 с системой обработки данных DS-30 (температура ионизационной камеры 150°, энергия ионизирующих электронов 70 эВ), ацетата α -бетуленола и продукта его восстановления — на приборе AEI MS-30 с системой обработки данных DS-50 при тех же параметрах. Триметилсилилирование проводили действием 1 мл свежеперегнанного N,O-бис-(триметилсилил)ацетамида на 1 мг образца (5 мин при 20°).

Биоиспытания соединений (I)–(VI) на растяжение отрезков coleoptилей пшеницы (сорт «Альбидум-43») проводили по методике [15], используя 1,5% добавку этанольного раствора вещества к водным растворам сахарозы. Тест на прорастание семян горчицы (сорт «Скороспелка») проводили следующим образом. В 5-см чашки Петри, содержащие по 2 мл дистиллированной воды и 0,03 мл раствора испытуемого вещества в ацетоне, помещали диски из фильтровальной бумаги и на них равномерно размещали по 50 семян горчицы. Проращивание проводили в темноте при 26° в течение 15 ч. Проросшими считали семена с длиной проростков от 1 до 3 мм.

Образцы арамадендрина и таксифомина были получены из ИОХ СО АН СССР, а образец нарингина — из ВИЛР.

Анализ ацетон-метанольных экстрактов на содержание ростингибирующих компонентов. Четыре порции (по 6 мг) сухого остатка ацетон-метанольного экстракта (пробы Б и В) растворяли в 2 мл смеси ацетон — 80% метанол (1:1) и наносили на 4 пластинки силуфола в виде узких полос. В качестве контроля использовали 4 пластинки с тем же адсорбентом, на старт которых наносили равное количество растворителя. После одновременного хроматографирования в системе бензол — ацетон (8:2) (система А) зону пробега системы (13 см) размечали на 10 равных по длине участков, адсорбент соскребали и элюировали на фильтрах тремя 10-мл порциями метанола (зоны с R_f 0,1–0,3), ацетона (зоны с R_f 0,3–

0,6) и бензола (зоны с R_f 0,6—1,0). Объединенный элюат каждой зоны после высушивания пад сульфатом натрия упаривали досуха в вакууме и взвешивали (распределение по весу сухих остатков элюатов трех вышеуказанных групп зон для пробы Б составило 1 : 1 : 2). Растворы полученных сухих остатков в 0,03 мл этанола анализировали в тесте на растяжение срезов колеоптилей пшеницы (рис. 1).

Выделение ацетата α -бетуленолола (III). 64,2 г сухого остатка ацетонового экстракта почек (проба Б) наносили на колонку (1000×80 мм), содержащую 1500 г окиси алюминия, и элюировали петролейным эфиром. Первые 9350 мл элюата далее не использовали. Из следующих 7250 мл элюата после упаривания в вакууме получили 4,03 г маслообразного продукта с R_f 0,90—0,95 в системе А. Продукт наносили на колонку (350×25 мм), содержащую 100 г того же адсорбента, и элюировали петролейным эфиром. Первые 105 мл элюата далее не использовали. Следующие 645 мл элюата упаривали в вакууме (0,94 г, 1,5% от веса сухого остатка экстракта), полученный сухой остаток наносили на колонку (270×25 мм), содержащую 30 г кизельгеля, и элюировали бензолом. Из первых 150 мл элюата после упаривания получили 0,15 г соединения (III) в виде масла бледно-желтого цвета, R_f 0,92 (система А). Масс-спектр, m/e (интенсивность, %): 262,2459 (M^+ , вычислено для $C_{17}H_{26}O_2$ 262,1933), 262 (1,2), 247 (0,01) ($C_{16}H_{23}O_2$, [$M-CH_3$] $^+$), 220 (2,3) ($C_{15}H_{24}O$, [$M-CH_2CO$] $^+$), 205 (0,01) ($C_{14}H_{21}O$, [$M-CH_2CO-CH_3$] $^+$), 202 (19,3) ($C_{15}H_{22}$, [$M-CH_2CO-H_2O$] $^+$), 187 (14,2) [$C_{14}H_{19}$] $^+$, 159 (26,9) [$C_{12}H_{15}$] $^+$, 131 (32,3) [$C_{10}H_{11}$] $^+$, n_D^{20} 1,4940 (лит. данные [9]: 1,4946), $[\alpha]_D^{20}$ -11,1°; ИК-спектр идентичен описанному для ацетата α -бетуленолола [9].

Восстановление ацетата α -бетуленолола (III). Раствор 120 мг (III) в 3 мл абс. эфира прибавляли по каплям к раствору 30 мг алюмогидрида лития в 8 мл абсолютного эфира и смесь кипятили 6 ч. Затем к реакционной смеси добавляли воду до прекращения выделения пузырьков газа и подкисляли 10% серной кислотой до pH 5. Раствор экстрагировали эфиром и полученную смесь (112,9 мг) хроматографировали на силуфол в системе этилацетат — гексан (2 : 3) (система Б). Из зоны с R_f 0,6 элюировали эфиром 31 мг α -бетуленолола; масс-спектр: m/e (относительная интенсивность, %) 220,1815 (M^+ , вычислено для $C_{15}H_{24}O$ 220,1827), 220 (1,9), 205 (3,9) ($C_{14}H_{21}O$, [$M-CH_3$] $^+$), 203 (1,0) ($C_{15}H_{23}$, [$M-OH$] $^+$), 202 (7,3) ($C_{15}H_{22}$, [$M-H_2O$] $^+$), 191 (1,2) ($C_{13}H_{19}O$, [$M-C_2H_5$] $^+$), 190 (1,3) ($C_{14}H_{22}$, [$M-CH_2O$] $^+$), 188 (1,3) ($C_{14}H_{20}$, [$M-CH_3OH$] $^+$), 175 (1,5) ($C_{13}H_{19}$, [$M-CH_2O-CH_3$] $^+$), 174 (2,5) ($C_{13}H_{18}$, [$M-CH_3O-CH_3$] $^+$), 164 (12,3) ($C_{11}H_{16}O$, [$M-C_4H_8$] $^+$), 163 (2,4) ($C_{11}H_{15}O$, [$M-C_4H_9$] $^+$), 161 (5,1) ($C_{12}H_{17}$, [$M-C_3H_7O$] $^+$), 159 (16,2) [$C_{12}H_{15}$] $^+$, 131 (22,7) [$C_{10}H_{11}$] $^+$, n_D^{20} 1,5130 (лит. данные [9]: 1,5127 и 1,5133), $[\alpha]_D^{20}$ +1,5°, ИК-спектр идентичен описанному для α -бетуленолола [9].

Определение содержания флаванонов (I) и (II) в экстрактах почек. 1 г экстракта, полученного из почек, собранных в фазе глубокого покоя как описано ранее [2], растворяли в 10 мл сухого диметилсульфоксида, добавляли при перемешивании 0,5 г гидрида натрия и 5 мл иодистого метила и перемешивали при 20° 3 ч. Реакционную смесь подкисляли $AsOH$, разбавляли равным объемом смеси бензол — этилацетат (1 : 1), органический слой промывали растворами $NaHCO_3$, $Na_2S_2O_3$ и водой, сушили $MgSO_4$, упаривали в вакууме, после чего хроматографировали на колонке (350×30 мм) с силикагелем Л (100/160 меш). Образовавшийся в результате реакции из флаванонов (I) и (II) 2,4,6,4'-тетраметоксикалкон [2] вымывали смесью бензол — ацетон (95 : 5). После кристаллизации из смеси бензол — петр. эфир выход 68 мг, т. пл. 117—118°.

Получение и разделение кислой фракции водно-метанольных экстрактов. 100 г почек (пробы А—Г) выдерживали 4 ч в бензоле, затем бензол сливали и далее не использовали. После подсушивания на воздухе почки измельчали и трижды экстрагировали порциями по 500 мл 80% мета-

пола при -4° . Выделение кислой фракции проводили по методу Поздовой [12].

Для выделения абсцизовой кислоты $\%_{10}$ от общего количества сухого остатка кислой фракции экстрактов А—Г растворяли в минимальном количестве этанола, наносили на пластинки силикагеля и хроматографировали в системе бензол — этилацетат — уксусная кислота (50:5:2) [16]. Этанольный элюат зоны с R_f 0,2—0,3 хроматографировали в тех же условиях в системе бензол — этилацетат — уксусная кислота (70:30:5) [16]. Зону с R_f 0,4—0,6 элюировали этанолом и полученный элюат хроматографировали на бумаге в системе изопропанол — аммиак — вода (10:1:1). Сухой остаток элюата зоны с R_f 0,62—0,66 растворяли в 6 мл смеси этанол — 0,005 н. серная кислота (1:1) и использовали для снятия спектров ДОВ и КД (рис. 3). Затем раствор нейтрализовали 2 каплями гидрата окиси аммония и упаривали досуха в вакууме при 40° . Полученный сухой остаток и 0,2 мг синтетического образца абсцизовой кислоты (Calbiochem, рацемат) триметилсилилировали и Me_3Si -эфиры анализировали методом ГЖХ-масс-спектрометрии (рис. 4).

Фенолкарбоновые кислоты анализировали следующим образом. Десятую часть от общего количества кислой фракции каждого из экстрактов проб почек А—Г растворяли в минимальном количестве хлороформа, наносили на колонку, содержащую 100 г силикагеля, и элюировали последовательно смесями хлороформ — метанол (98:2, 95:5 и 90:10). Элюаты, вымытые смесью в соотношении 95:5, содержали кислоты, имеющие R_f 0,2—0,4 в системе А. По 10 мг сухого остатка из этих элюатов и по 1 мг синтетических образцов *n*-метоксибензойной (IV), *n*-оксибензойной (V) и *n*-кумаровой (VI) кислот триметилсилилировали и анализировали методом ГЖХ-масс-спектрометрии (рис. 2).

n-Метоксибензойную кислоту (IV) получали окислением анисового альдегида [17], т. пл. 184° , R_f 0,40 (система А); *n*-оксибензойную кислоту (V) получали из салициловой кислоты [18], т. пл. 213° (из смеси бензол — метанол, 3:1), R_f 0,20 (система А), *n*-кумаровую кислоту (VI) получали конденсацией *n*-оксибензальдегида и малоновой кислоты [19], т. пл. 179° , R_f 0,20 (система А).

ЛИТЕРАТУРА

1. Поправко С. А., Кононенко Г. П., Вульфсон Н. С. (1974) Изв. АН СССР, Сер. хим., 2389.
2. Кононенко Г. П., Поправко С. А., Вульфсон Н. С. (1975) Биоорг. химия, 1, 506—511.
3. Поправко С. А., Кононенко Г. П., Вульфсон Н. С. (1975) Тезисы XII Международного ботанического конгресса, т. 1, с. 24, «Наука», Л.
4. Lenton I. R., Perry V. M., Saunders P. F. (1972) *Planta*, 106, 13—22.
5. Harrison M. A., Saunders P. F. (1975) *Planta*, 123, 291—298.
6. Чернобровкина Н. П., Кефели В. И. (1975) Физиол. раст., 22, 1013—1020.
7. Hemberg T. (1949) *Physiol. Plant.*, 2, 2437.
8. Corgan J. N. (1965) *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 86, 129—132.
9. Holub M., Herout V., Horak M., Sorm F. (1959) *Czech. Collect. Chem. Commun.*, 24, 3730—3738.
10. Vieitez E., Seoane E., Gesto D. V., Mato C., Vazquez A., Carnicer A. (1966) *Physiol. Plant.*, 19, 294—307.
11. Turetskaya R., Kefeli V., Kutaček M., Vackova K., Tschumakovski N., Kvypnikova T. (1968) *Biol. Plant.*, 10, 205—221.
12. Поздова Л. М. (1973) в сб.: Методы определения фитогормонов, ингибиторов роста, дефолиантов и гербицидов, с. 90—95, «Наука», М.
13. Gray R. T., Mallaby R., Ryback G., Williams V. P. (1974) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2, 919—924.
14. Cornforth J. W., Milborrow B. V., Ryback G., Wareing P. F. (1966) *Tetrahedron, Suppl.* 8, Part II, 603—610.
15. Кефели В. И., Турецкая Р. X., Коф Э. М., Власов И. В. (1973) в сб.: Методы определения фитогормонов, ингибиторов роста, дефолиантов и гербицидов, с. 7—21, «Наука», М.

16. Коф Э. М., Власов П. В., Ласовский Я., Ильин Г. С. (1973) Докл. АН СССР, **212**, 1003–1006.
17. Синтезы органических препаратов (1949) сб. 2, с. 417.
18. Синтезы органических препаратов (1949) сб. 2, с. 390.
19. Синтезы органических препаратов (1953) сб. 4, с. 199.

Поступила в редакцию
10.VIII.1978

После доработки
7.XII.1978

**SECONDARY METABOLITES OF BIRCH. III. IDENTIFICATION
OF GROWTH INHIBITORS IN THE BUDS OF *BETULA VERRUCOSA***

ПОПРАВКО S. A., KONONENKO G. P., SOKOLOVA S. A.,
SIZOI M. N., WULFSON N. S.

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

In the extracts of wintering burch buds, the following seven constituents have been identified which possess in vitro growth-inhibitory activity: sakuranetin (I) and its 4'-methyl ether (II), α -betulenol acetate (III), *p*-methoxy- (IV) and *p*-hydroxybenzoic acid (V), *p*-cumaric (VI) and abscisic acid (VII). The compounds (I)–(VI) form a growth inhibiting complex appearing in the buds during dormancy and just before flowering. These, in contrast to (VII), disappear before the beginning of active growth. The data are presented on the growth-inhibitory activity of a number of naturally-occurring flavanones, as well as on mass spectra of (VII) trimethylsilyl ether.
