



УДК 547.972.02+582.632

plet

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ КЛЕВЕРА

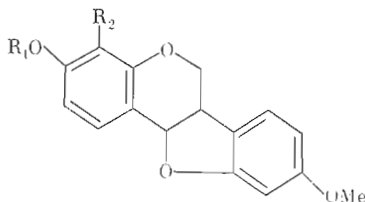
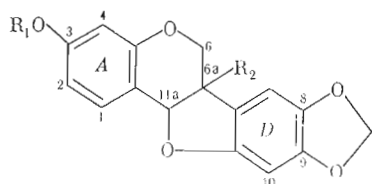
VIII. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПТЕРОКАРПАНОВ В КОРНЯХ КУЛЬТУРНЫХ ВИДОВ КЛЕВЕРОВ

Фрайштат П. Д., Поправко С. А., Вульфсон И. С.

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

Из метанольных экстрактов корней красного, белого и розового клевера выделено и идентифицировано семь соединений птерокарпанового ряда: инермин (III), трифоллан (IX), гомоптерокарпин (VIII), медикарпин (V), его 4-метоксипроизводное (VII), а также гликозиды инермина (II) и медикарпина (VI). Описана идентификация изофлавонов формонетина, псевдобаптигенина и генистенина в корнях белого и розового клевера.

Фитоалексины представителей семейства бобовых, к которым относится и клевер, принадлежат к классу птерокарпанов. Из надземной части растений выделены: пизатин (I) — из гороха [1], фазеоллин (X) — из фасоли [2], оксифазеоллин (XI) — из сои [3], медикарпин (V) — из люцерны [4].

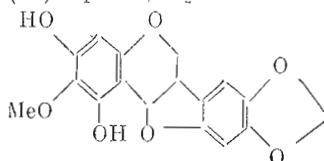


(I) $R_1=Me, R_2=OH$

(II) $R_1=Glc\beta 1, R_2=H$

(III) $R_1=R_2=H$

(IV) $R_1=Me, R_2=H$



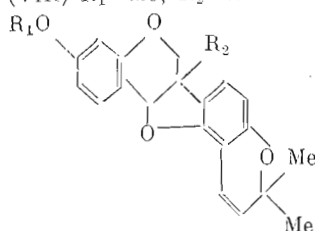
(IX)

(V) $R_1=R_2=H$

(VI) $R_1=Glc\beta 1, R_2=H$

(VII) $R_1=H, R_2=OMe$

(VIII) $R_1=Me, R_2=H$



(X) $R_1=R_2=H$

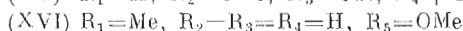
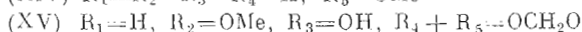
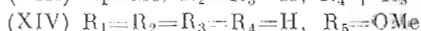
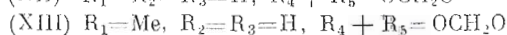
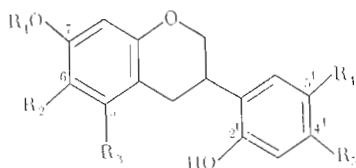
(XI) $R_1=H, R_2=OH$

Элементный состав основных ионов в масс-спектрах птерокарпанов по данным масс-спектров высокого разрешения

Соединение	Элементный состав иона	m/z		Соединение	Элементный состав иона	m/z	
		измеренное	вычисленное			измеренное	вычисленное
(III)	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284,0674	284,0685	Смесь (III) и (V)	C ₁₀ H ₉ O ₂	161,0593	161,0602
	C ₁₆ H ₁₁ O ₄	267,0668	267,0677		C ₉ H ₇ O ₂	147,0513	147,0524
	C ₁₀ H ₇ O ₃	175,0711	175,0718	(VIII)	C ₈ H ₇ O ₂	135,0446	135,0451
	C ₉ H ₇ O ₂	147,0444	147,0446		C ₁₇ H ₁₆ O ₄	284,1036	284,1049
(V)	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	270,0890	270,0892	C ₁₆ H ₁₅ O ₄	270,0853	270,0892	
	C ₁₃ H ₁₁ O ₄	255,0659	255,0667	C ₁₀ H ₉ O ₂	161,0615	161,0615	
	C ₁₀ H ₉ O ₂	161,0597	161,0602	C ₉ H ₈ O ₂	148,0526	148,0537	
Смесь (III) и (V)	C ₈ H ₇ O ₂	135,0442	135,0446	(IX)	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,0726	330,0729
	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284,0669	284,0685		C ₁₆ H ₁₁ O ₇	315,0459	315,0467
	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	270,0879	270,0892		C ₉ H ₆ O ₃	162,0348	162,0349
	C ₁₆ H ₁₁ O ₄	267,0647	267,0657		C ₈ H ₅ O	133,0576	133,0580
	C ₉ H ₆ O ₃	162,0317	162,0317				

Лишь в одном случае фитоалексин — птерокарпановый гликозид триффолиризин (II) — был выделен из корней клевера красного [5]. В дальнейшем при энзиматическом и кислотном гидролизе триффолиризина был выделен его агликон [6], который оказался идентичным инермину (III) [7].

Продолжая изучение вторичных метаболитов клевера красного и поиск соединений, обладающих антифунгальной активностью, из метанольных экстрактов лиофилизированных корней этого растения путем их колоночной хроматографии на силикагеле мы выделили кристаллическое вещество (III). По данным масс-спектрометрии высокого разрешения (табл. 1), оно имело эмпирическую формулу C₁₆H₁₂O₅ и при действии уксусного ангидрида в пиридине образовывало ацетат (IIIa). Данные ЯМР (табл. 2), ИК- и масс-спектров (см. «Экспериментальную часть») позволили предположить, что исследуемое вещество (III) является инермином [7]. Однако ввиду отсутствия образца для сравнения и учитывая, что масс-спектры птерокарпанов не всегда дают однозначную информацию о расположении заместителей в молекуле [8], мы подвергли соединение (III) восстановительной дециклизации над 10% Pd/C в растворе уксусной кислоты при 20° С, в результате которой получили известный 7,2'-диокси-4',5'-метилendioксиизофлаван (XII).



Данные его ЯМР- и масс-спектра высокого разрешения (табл. 3 и «Экспериментальная часть») подтверждают присутствие метилendioкси-группы в кольце D, а гидроксильной — в кольце A. Поскольку все ранее описанные птерокарпаны содержат заместитель в положении C3, логично

Химические сдвиги (δ , м.д.) протонов и константы спин-спинового расщепления (J , Гц) птерокарианов (III)–(V), (VII)–(IX) и их ацетатов (IIIa), (Va), (VIIa) и (IXa)

Соединение	Протоны										Растворитель	
	1-Н	2-Н	4-Н	7-Н	8-Н	10-Н	6a-Н	11a-Н	ОСН ₃	ОСН ₂ О		ОСОСН ₃
(III)	7,37, л J 8	6,52, дд J 2 и 8	6,38, л J 2	6,89, с	—	6,39, с	4,28, л J 6	5,49, л J 6	—	5,93, л J 2	—	(C ² H ₃) ₂ CO
(IIIa)	7,53, л J 8	6,8, дд J 2 и 8	6,73, л J 2	6,72, с	—	6,44, с	4,34, л J 6	5,48, л J 6	—	5,90, л J 2	2,27, с	»
(IV)	7,38, л J 8	6,64, дд J 2 и 8	6,42, л J 2	6,86, с	—	6,37, с	4,29, л J 6	5,48, л J 6	3,73, с	5,87, л J 2	—	»
(V)	7,37, л J 8	6,66, дд J 2 и 8	6,54, л J 2	7,07, л J 8	6,36–6,47, м	—	3,5–3,7 м	5,54, л J 8	3,77, с	—	—	C ² HCl ₃
(Va)	7,53, л J 8	6,8, дд J 2 и 8	6,75, л J 2	7,12, л J 8	6,45, дд J 2 и 8	6,36, л J 2	3,6–3,72 м	5,48, л J 8	3,74, с	—	2,26, с	»
(VII)	7,26, л J 8	6,75, л J 8	—	7,0, л J 8	6,41, дд J 2 и 8	6,52, л J 2	4,35, л J 6	5,49, л J 6	3,77, с 3,87, с	—	—	(C ² H ₃) ₂ CC
(VIIa)	7,32, л J 8	6,96, л J 8	—	7,14, л J 8	6,43, дд J 2 и 8	6,43, дд J 2	4,35, л J 6	5,52, л J 8	3,76, с 3,85, с	—	2,32, с	»
(VIII)	7,44, л J 8	6,66, дд J 2 и 8	6,49, л J 2	7,14, л J 8	6,43, дд J 2 и 8	6,43, л J 2	4,24, л J 6	5,53, л J 8	3,78, с 3,81, с	—	—	C ² HCl ₃
(IX)	—	—	6,56, с	6,93, с	—	6,44, с	4,30, л J 6	5,53, л J 6	3,85, с	5,94, л J 2	—	(C ² H ₃) ₂ CO
(IXa)	—	—	6,92, с	7,18, с	—	6,44, с	4,38, л J 6	5,56, л J 6	3,8, с	5,96, л J 2	2,3, с	»

Элементный состав основных ионов в масс-спектрах изофлаванов по данным масс-спектров высокого разрешения

Соединение	Элементный состав иона	m/z		Соединение	Элементный состав иона	m/z	
		измеренное	вычисленное			измеренное	вычисленное
(XII)	C ₁₆ H ₁₁ O ₅	286,1204	286,1207	(XIV)	C ₈ H ₉ O ₂	137,0587	137,0593
	C ₉ H ₈ O ₃	164,0488	164,0489		C ₇ H ₇ O ₂	123,0436	123,0438
	C ₈ H ₇ O ₃	151,0395	151,0399	(XV)	C ₁₇ H ₁₆ O ₇	332,0896	332,0898
	C ₇ H ₇ O ₂	123,0488	123,0451		C ₉ H ₈ O ₃	164,0486	164,0491
(XIII)	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	300,0978	300,0981		C ₈ H ₉ O ₄	169,0501	169,0512
	C ₉ H ₇ O ₃	151,0414	151,0421	C ₇ H ₇ O ₂	151,0401	151,0403	
	C ₉ H ₈ O ₃	164,0465	164,0469	(XVI)	C ₁₇ H ₁₈ O ₄	286,1196	286,1197
	C ₈ H ₉ O ₂	137,1334	137,1342		C ₉ H ₁₀ O ₂	150,0679	150,0683
(XIV)	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	272,1007	272,1011		C ₈ H ₉ O ₂	137,0604	137,0611
	C ₉ H ₁₀ O ₂	150,0668	150,0670				

считать, что гидроксильная группа в птерокарпане (III) также находится в этом положении. Структура этого вещества было подтверждено его метилированием диазометаном в птерокарпин (IV). Данные кругового дихроизма и угол вращения позволили установить конфигурацию вещества (III) как 6*aR*, 11*aR*-3-окси-8,9-метилendioксиптерокарпана.

Второе соединение птерокарпановой природы, элюированное с колонки после выделения инермина более полярной системой растворителей, получено в виде бесцветных кристаллов. Оно легко ацетируется искусственным ангидридом в пиридине с образованием тетраацетата (IIa). При мягком кислотном и ферментативном гидролизе β-глюкозидазой соединение (II) образует инермин (III) и моносахарид, идентифицированный хроматографией на бумаге как *D*-глюкопираноза.

На основании этих данных, а также результатов ЯМР- и масс-спектрометрического исследования (см. «Экспериментальную часть») соединение (II) идентифицировано как 3-О-β-*D*-глюкопиранозид инермина — трифолиризин.

Ранее Хнетала [5] приписал трифолиризину функцию фитоалексина красного клевера. Однако обнаруженное нами неожиданно высокое содержание инермина (III) и трифолиризина (II) в корнях этого вида (~20% от сухого веса экстракта) заставило нас усомниться в этом, так как в литературе еще не была отмечена такая высокая концентрация фитоалексинов в каком-либо органе растений. Поэтому был проведен сравнительный анализ химического состава изофлавоноидов в корнях стерильных и зараженных растений клевера. Основным результатом этого опыта заключался в том, что инермин и трифолиризин полностью отсутствовали в корнях заведомо здоровых растений и появлялись в ответ на заражение их патогенным микроорганизмом. Следовательно, оба эти соединения действительно являются фитоалексинами данного вида.

Из этого же экстракта мы выделили и идентифицировали также новый птерокарпан (IX), названный нами трифолпаном, о котором уже сообщалось ранее [9] (см. также табл. 1—3).

В связи с тем что белый (*Trifolium repens*) и розовый клевер (*Trifolium hybridum*) отличаются большей устойчивостью к неблагоприятным условиям внешней среды [10] и являются важными сельскохозяйственными культурами, мы изучили содержание изофлавонов и птерокарпанов также в корнях и этих видов.

В отличие от красного клевера аналогичные экстракты белого клевера содержали небольшое количество птерокарпанов. Из фракции, идентичной по *R_f* инермину (III), мы выделили кристаллическое вещество (V), которое по данным ЯМР- и масс-спектров (см. табл. 1 и 2) идентифици-

ровами как медикарпин, что было подтверждено также реакцией восстановительной дециклизации в изофлаван веститол (XIV) (см. табл. 3), выделенный ранее нами из экстрактов розового клевера [11].

Наряду с медикарпином (V) в экстракте корней белого клевера обнаружен и его гликозид (VI). Строение этого вещества как 3-О-β-D-глюкопиранозида медикарпина установлено на основании изучения масс- и ЯМР-спектров его тетраацетильного производного (VIa) и гидролизом его до агликона (V) и глюкозы в присутствии β-глюкозидазы.

Из корней этого вида мы выделили в небольшом количестве еще одно кристаллическое соединение птерокарпанового ряда (VII) с т. пл. 159–161° С, которое, по данным масс-спектра высокого разрешения, имело эмпирическую формулу C₁₇H₁₆O₅ (измерено M⁺ 300,0125, вычислено 300,0137). При действии уксусного ангидрида в пиридине соединение (VII) дает ацетат (VIIa). При этом в ЯМР-спектре наблюдается заметный сдвиг сигнала протона, локализованного при С2, на 0,21 м. д. в слабопольную область (см. табл. 2), что подтверждает его о-положение к гидроксильной группе. Таким образом, соединение (VII) является 4-метокси-медикарпином. Действительно, его температура плавления, данные УФ- и масс-спектров оказались идентичными данным анализа соединения, выделенного ранее из древесины *Pericopsis angolensis* [12].

Особый интерес представлял анализ фракций птерокарпанов из экстрактов розового клевера, поскольку последний вид рассматривается как естественный гибрид первых двух видов — *Trifolium repens* и *Trifolium pratense* [13].

При разделении метанольных экстрактов корней этого вида, проведенном в аналогичных условиях, мы выделили три фракции, содержащие птерокарпаны и изофлаван веститол (XIV).

Фракция, идентичная по значению R_f инермину (III) и медикарпину (V), судя по данным ЯМР- и масс-спектрометрии (см. табл. 1 и 2), оказалась смесью обоих этих птерокарпанов примерно в равном соотношении. Этот вывод был подтвержден алкилированием этой фракции действием иодистого метила и карбоната кальция в ацетоне. Масс-спектрометрический анализ продуктов реакции показал смещение пиков молекулярных ионов двух основных компонентов от m/z 270 и 284 к 284 и 298. При этом аналогичный сдвиг наблюдался и для ионов, образующихся из фрагментов кольца А птерокарпановой молекулы, что было подтверждено и данными масс-спектров высокого разрешения, снятых для индивидуальных образцов инермина (III) и медикарпина (V).

Третьим птерокарпаном, также выделенным из экстрактов корней розового клевера в небольшом количестве, оказалось вещество (VIII) с эмпирической формулой C₁₇H₁₆O₄ (см. табл. 1). Наличие в молекуле двух метоксильных групп, выявленных согласно данным ЯМР-спектра, и системы ароматических и алифатических протонов, характерных для молекулы медикарпина, позволило предположить, что соединение (VIII) является 3-О-метиловым эфиром последнего или гомоптерокарпином. Это предположение подтвердилось также данными масс-спектра продукта его гидрогенолиза (XVI) (см. табл. 3 и «Экспериментальную часть»). Действительно, прямое сравнение вещества (VIII) с продуктом метилирования медикарпина и образцом гомоптерокарпина показало полную идентичность этих соединений.

Помимо агликонов (III) и (V) в корнях розового клевера мы обнаружили и их гликозиды (II) и (VI), которые также были выделены в виде не разделяемой хроматографическими методами кристаллической смеси. Ее анализ был проведен аналогично исследованию гликозидов (II) и (VI), а именно путем ацетилирования и изучения ЯМР- и масс-спектров ацетатов, а также гидролиза их действием β-глюкозидазы до агликонов (III) и (V) и глюкозы, идентифицированных прямым сравнением с известными образцами.

Сравнительный состав изофлавоноидов в корнях трех культурных видов клеверов

Вид клевера	Птерокарпаны							Изофлавоны			Изофлава-ны
	(II)	(III)	(V)	(VI)	(VII)	(VIII)	(IX)	(XVII)	(XVIII)	(XIX)	(XIV)
<i>Tr. pratense</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Tr. repens</i>	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>Tr. hybridum</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+

* Минус означает отсутствие соединения.

Таким образом, основными компонентами птерокарпановых фракций корней розового клевера являются соединения (II) и (III), (V) и (VI), попарно присутствующие в белой и красной разновидности клевера, что, очевидно, служит подтверждением предположения о происхождении генома этой культуры из двух последних видов. В связи с этим интересно было сопоставить состав и других изофлавоноидных соединений, характерных для разных видов *Trifolium*.

При исследовании фракций, полученных при хроматографическом разделении экстрактов на колонках с силикагелем в условиях, описанных ранее [14], было определено, что белый клевер содержит лишь генистеин (XVII), в то время как розовый и красный содержат формонетин (XVIII), псевдобаптинин (XIX) и генистеин. Строение этих веществ было установлено на основании данных физико-химического анализа и затем подтверждено прямым сравнением с образцами веществ, выделенных нами ранее из корней красного клевера [15].

Сопоставление полученных данных с результатами химического анализа корней красного клевера (табл. 4) свидетельствует о том, что в корнях белого и розового клевера нет такого обогащения состава изофлавоноидами, как в красной разновидности, а содержание их намного меньше. Интересно также, что гибридизация (розовый клевер), как видно из данных таблицы 4, сопровождается биосинтезом новых птерокарпановых соединений и их ближайших аналогов, в том числе гомоптерокарпина (VIII) и изофлавана веститола (XIV). Однако птерокарпаны (VII) и (IX), выделенные в небольшом количестве из корней белого и красного клевера, в розовом обнаружены не были.

Проведенные биологические испытания показали, что инермин и трифолиризин обладают не только высокой ростингибирующей, но и антифунгальной активностью в отношении патогенного для данного вида гриба *Sclerotinia trifoliorum*, подавляя рост его колоний на 50%.

Экспериментальная часть

ИК-спектры измеряли на спектрофотометре UR-20 в таблетках 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). ЯМР-спектры измеряли на приборе «Varian XL-100» (США) (внутренний стандарт — тетраметилсилан; константы спин-спинового взаимодействия в герцах, с — синглет, д — дублет, дд — дублет дублета, м — мультиплет). Спектры КД измеряли на дихрографе «Mark-3» (Jobin Ivon, Франция). ТСХ проводили на силуфол в системах этилацетат — гексан, 1:1 (система А), хлороформ — метанол, 89:11 (система Б), а колоночную хроматографию — на силикагеле марки

L100/160 меш (Chemapol, СССР). Для сравнения были использованы синтетические образцы веществ птерокарпина, гомоптерокарпина, формонетина, псевдобаптигенина и генистеина (Serva, США).

Выделение трифолиризина (II) и инермина (III) проводили как описано ранее [14]. При элюировании бензолом, сопровождаемом ТСХ-контролем, были отобраны фракции с R_f 0,48 (система А). После упаривания бензола в вакууме остаток кристаллизовали из бензола. Получили 12,2 г блестящих бесцветных кристаллов инермина (III) с т. пл. 180–181° С (ср. [7]); УФ: $\lambda_{\text{макс}}$ 281 нм ($\lg \epsilon$ 3,58), 287 ($\lg \epsilon$ 3,65), 310 ($\lg \epsilon$ 3,86); ИК: 3540, 3460, 1617, 1600, 1509, 1030, 930 см^{-1} ; масс-спектр*: M^+ 284(100), 283(27), 175(10), 162(15), 149(23), 147(7), 134(14); ЯМР- и масс-спектры высокого разрешения см. в табл. 1 и 2; $[\alpha]_D^{20} - 245^\circ$ (c 1 мг в 1 мл MeOH); КД: $\Delta\epsilon_{303} +5,68$, $\Delta\epsilon_{278} -0,85$, $\Delta\epsilon_{237} -11,76$, $\Delta\epsilon_{211} -34,77$. Найдено, %: С 65,50; Н 4,38. $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$. Вычислено, %: С 65,53; Н 4,46.

При дальнейшем элюировании колонки градиентной системой бензол – ацетон в соотношении 20 : 1 были отобраны фракции с R_f 0,32 (система А), из которых выделили 30 мг коричневых кристаллов трифолиана (IX) с т. пл. 132–134° С (из MeOH), масс-спектр: M^+ 330(100), 315(55), 297(13), 269(3), 241(2), 227(5), 168(4), 165(7), 162(32); ЯМР- и масс-спектры высокого разрешения см. в табл. 1 и 2.

Элюируя колонку смесью тех же растворителей в соотношении 1 : 1, отобрали фракции с R_f 0,21 (система Б), из которых выделили после кристаллизации из метанола 18 г бесцветных кристаллов трифолиризина (II) с т. пл. 142–144° С (ср. [6]); $[\alpha]_D^{20} - 183^\circ$ (c 1,5; MeOH); УФ: $\lambda_{\text{макс}}$ 280, 285, 310 нм ($\lg \epsilon$ 3,86; 3,66; 3,86); ЯМР ($[\text{D}_6]$ -ДМСО, δ , м.д.): 5,94 (2H, д, J 2, OCH₂O), 7,0 (1H, с, 7-Н), 6,53 (1H, с, 10-Н), 7,38 (1H, д, J 4, 1-Н), 6,75 (1H, дд, J 2 и 8, 2-Н), 6,57 (1H, д, J 2, 4-Н), 5,59 (1H, д, J 6, 11a-Н), 4,29 (1H, д, J 6, 6a-Н), 4,85 (1H, д, J 6, 1'-Н); масс-спектр: M^+ 446(15), 285(19), 284(100), 283(11), 267(5), 175(5), 162(7), 151(5), 147(5). Найдено, %: С 57,89; Н 5,58. $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$. Вычислено, %: С 57,73; Н 5,48.

Ацетилирование птерокарпанов. Ацетилирование птерокарпанов (III) и (IX), а также глюкозида (II) проводили обычным методом действием Ac_2O в пиридине при 20° С.

Ацетат инермина (IIIa). Бесцветные кристаллы с т. пл. 176–178° С (из этилацетата) (ср. [7]), $[\alpha]_D^{20} - 176^\circ$ (c 1,0; CHCl_3); УФ: $\lambda_{\text{макс}}$ 285, 311 нм ($\lg \epsilon$ 3,79; 4,14); ИК: 1750, 1030, 935 см^{-1} ; ЯМР-спектр см. в табл. 2. Найдено, %: С 66,54; Н 4,21. $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_6$. Вычислено, %: С 66,25; Н 4,32.

Ацетат трифолиана (IXa). Коричневые кристаллы с т. пл. 115–117° С (из бензола), ЯМР-спектр см. в табл. 2; масс-спектр: M^+ 414(44), 372(28), 330(100), 315(36), 297(12), 269(16), 227(10), 168(16), 162(84).

Ацетат трифолиризина (IIa). Бесцветные иглы с т. пл. 188–189° С из MeOH (ср. [6]), $[\alpha]_D^{20} - 126^\circ$ (c 1,0; MeOH); ЯМР-спектр ($(\text{C}^2\text{H}_5)_2\text{CO}$, δ , м.д.): 2,0–2,12 (12H, с, 4-OAc), 5,89 (2H, д, J 2, OCH₂O), 6,97 (1H, с, 7-Н), 6,52 (1H, с, 10-Н), 7,38 (1H, д, J 4, 1-Н), 6,75 (1H, дд, J 2 и 8, 2-Н), 6,54 (1H, д, J 2, 4-Н), 5,58 (1H, д, J 6, 11a-Н), 4,3 (1H, д, J 6, 6a-Н), 4,85 (1H, д, J 6, 1'-Н); масс-спектр: M^+ 614(2), 331(30), 271(23), 284(14), 267(4), 169(89), 161(5), 109(55), 43(100). Найдено, %: С 58,49; Н 4,49. $\text{C}_{30}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$. Вычислено, %: С 58,63; Н 4,92.

Птерокарпин (IV). Раствор 50 мг инермина в 6 мл ацетона обрабатывали эфирным раствором диазометана при 0° С и оставляли на ночь. Остаток после упаривания эфира кристаллизовали из абсолютного этанола. Получили 30 мг бесцветных блестящих пластинок с т. пл. 185–186° С (ср. [16]); УФ: $\lambda_{\text{макс}}$ 281, 287, 311 нм ($\lg \epsilon$ 3,58; 3,65; 3,87); ИК: 1634, 1585, 1503, 1493, 1027, 930 см^{-1} ; $[\alpha]_D^{20} - 220^\circ$ (c 0,7; CHCl_3). Найдено, %: С 67,92; Н 4,74. $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_5$. Вычислено, %: С 68,45; Н 4,37.

* Здесь и далее даются m/z (относительная интенсивность, %).

7,2'-Диокси-4',5'-метилендиоксиизофлаван (XII). К раствору 20 мг ивермина (III) в 4 мл ледяной уксусной кислоты прибавляли 20 мг 10% Pd/C и гидрировали при 60° С. Через 2 ч после поглощения 1 моль H₂ смесь охлаждали, отфильтровывали катализатор, растворитель упаривали в вакууме. Остаток кристаллизовали из этанола. Получили 10 мг бесцветных игл с т. пл. 195–196° С. ЯМР-спектр ((C²H₅)₂CO, δ, м.д.): 5,87 (2H, с, ОСН₂O); 6,93 (1H, д, J 8, 5-H), 6,34 (1H, дд, J 2 и 6, 6-H), 6,44 (1H, д, J 2, 8-H), 6,54 (1H, с, 3'-H), 6,71 (1H, с, 6'-H), 8,04 (1H, с, 7-OH), 8,21 (1H, с, 2'-OH); УФ: λ_{макс} 291, 301 нм (lg ε 3,82; 3,8); ИК: 3410–3320, 1622, 1604, 1025, 937 см⁻¹; масс-спектр высокого разрешения см. в табл. 3. Найдено, %: С 67,95; Н 4,99. С₁₆H₁₄O₅. Вычислено, %: С 67,12; Н 4,93.

7-Метокси-2'-окси-4',5'-метилендиоксиизофлаван (XIII). Аналогичным образом была проведена восстановительная дециклизация птерокарпина (IV). В результате получили бесцветные кристаллы с т. пл. 177–178° С, ИК: 3300, 1613, 1583, 1496, 1025, 934 см⁻¹; ЯМР-спектр ((C²H₅)₂CO, δ, м.д.): 5,88 (2H, с, ОСН₂O), 7,0 (1H, д, J 8, 5-H), 6,4 (1H, дд, J 2 и 8, 6-H), 6,51 (1H, д, J 2, 8-H), 6,53 (1H, с, 3'-H), 6,71 (1H, с, 6'-H), 3,73 (3H, с, OMe), 8,2 (1H, с, 2'-OH); масс-спектр высокого разрешения см. в табл. 3; масс-спектр: M⁺ 300(68), 274(18), 272(21), 241(12), 164(100), 151(27), 137(78).

7,5,2'-Триокси-6-метокси-4',5'-метилендиоксиизофлаван (XV). В результате восстановительной дециклизации трифолиана (IX) получили изофлаван (XV), ЯМР-спектр ((C²H₅)₂CO, δ, м.д.): 5,86 (2H, с, ОСН₂O), 6,13 (1H, с, 8-H), 6,51 (1H, с, 3'-H), 6,68 (1H, с, 6'-H), 3,88 (3H, с, OMe); масс-спектр высокого разрешения см. в табл. 3; масс-спектр: M⁺ 332(100), 318(14), 292(7), 248(7), 194(21), 182(18), 170(25), 169(9), 164(60), 151(40).

Кислотный и ферментативный гидролиз трифолиризина (II) проводили аналогично описанному ранее [15] и получили ивермици (III) и глюкозу, идентифицированные сравнением с известными образцами.

Выделение птерокарпанов (V) – (VII) проводили из метанольных экстрактов белого клевера, собранного в июле 1976 г. на экспериментальном участке ВНИИ кормов им. В. Р. Вильямса. Хроматографическое разделение сухого остатка (2 г) экстракта проводили аналогично описанному для красного клевера. При элюировании бензолом были отобраны фракции с R_f 0,48 (система А). Упаривание растворителя и кристаллизация остатка из хлороформа дало 17 мг медикарпина (V) с т. пл. 130–132° С (ср. [17]), УФ: λ_{макс} 282, 287 нм (lg ε 3,56; 3,65); ИК: 3390, 1619, 1588, 1493, 1461, 1322, 1187, 1035, 992 см⁻¹; ЯМР- и масс-спектры высокого разрешения см. в табл. 1 и 2; масс-спектр: M⁺ 270(100), 269(33), 255(19), 253(7), 161(4), 152(7), 151(7), 137(11), 135(18), 121(14), 109(11); [α]_D²⁰ –235° (с 1,3 мг в 1,2 мл MeOH); КД: Δε₂₈₇ +10,3, Δε₂₃₇ –24,0, Δε₂₁₃ –11,7.

При элюировании колонки системой растворителей бензол – ацетон, 20 : 1, получили фракцию с R_f 0,28 (система А), из которой выделили 6 мг 4-метоксимедикарпина (VII) с т. пл. 159–161° С (ср. [12]); УФ: λ_{макс} 284 нм (lg ε 4,09); ИК: 3390, 1620, 1600, 1500 см⁻¹; ЯМР- и масс-спектры высокого разрешения см. в табл. 1 и 2; масс-спектр: M⁺ 301(20), 300(100), 299(15), 286(7), 285(40), 284(5), 267(7), 239(5), 211(5), 168(3), 161(7), 152(8), 148(24), 137(2); [α]_D²⁰ –117,6° (с 1 мг в 1,2 мл MeOH); КД (с 1,2 мг в 1 мл MeOH): ε₂₈₆ +4,86, ε₂₃₃ –15,84, ε₂₁₂ –18,1.

При дальнейшем элюировании колонки смесью бензол – ацетон, 1 : 1, были отобраны фракции с R_f 0,32 (система Б), из которых выделили после кристаллизации из MeOH 40 мг кристаллов птерокарпана (VI) с т. пл. 270–272° С (ср. [17]), [α]_D²⁰ –149° (с 0,9; пиридин); УФ: λ_{макс} 287 нм (lg ε 4,09); ИК: 3560, 3080, 1620, 1576, 1284, 1072, 955, 832 см⁻¹; ЯМР-спектр (DMSO-d₆, δ, м.д.): 3,69 (3H, с, 9-OMe), 7,38 (1H, д, J 8, 1-H), 6,71 (1H, дд, J 2 и 8, 2-H), 6,55 (1H, д, J 2, 4-H), 7,24 (1H, д, J 8, 7-H), 6,45 (1H,

дд, J2 и 8, 8-Н), 6,41 (1Н, с, 10-Н), 5,60 (1Н, д, J7, 11а-Н), 4,28 (1Н, д, J7, 6а-Н), 4,83 (1Н, д, J7, 1'-Н). Найдено, %: С 60,56; Н 5,47. $C_{22}H_{24}O_9$. Вычислено, %: С 61,11; Н 5,59.

Ацетат медикарпина (Va). Белые кристаллы с т.пл. 107–108°С (из хлороформа) (ср. [17]), УФ: $\lambda_{\text{макс}}$ 286 нм ($\lg \epsilon$ 3,67); ИК: 1760, 1620, 1600, 1490, 1016 см^{-1} ; ЯМР-спектр см. в табл. 2; масс-спектр: M^+ 312 (33), 271 (17), 270 (100).

Ацетат 4-метоксимедикарпина (VIIa). Пластинки из этилацетата с т.пл. 128–130°С (ср. [12]), $[\alpha]_D^{20} -110^\circ$ (c 1,0; CHCl_3); УФ: $\lambda_{\text{макс}}$ 283 нм ($\lg \epsilon$ 3,64); ИК: 1750, 1610, 1490 см^{-1} ; ЯМР-спектр см. в табл. 2; масс-спектр: M^+ 342 (37), 301 (13), 300 (100), 299 (11), 285 (18). Найдено, %: С 66,7; Н 5,5. $C_{19}H_{18}O_6$. Вычислено, %: С 68,0; Н 5,3.

Ацетат глюкозида медикарпина (VIa). Белые кристаллы из этилацетата с т.пл. 183–184°С (ср. [17]), $[\alpha]_D^{20} -105^\circ$ (c 0,8 мг в 1,2 мл MeOH); ИК: 1750, 1618, 1595, 1495, 1032, 832 см^{-1} ; ЯМР-спектр ($(C^2H_5)_2CO$, δ , м.д.): 2–2,15 (12Н, с, 4-ОAc), 3,77 (3Н, с, OMe), 7,5 (1Н, д, J8, 1-Н), 6,8 (1Н, дд, J2 и 8, 2-Н), 6,55 (1Н, д, J2, 4-Н), 7,28 (1Н, д, J8, 7-Н), 6,41–6,47 (2Н, м, 8, 10-Н), 4,26 (1Н, д, J2, 6а-Н), 5,61 (1Н, д, J6, 11а-Н), 4,85 (1Н, д, J6, 1'-Н). Найдено, %: С 59,94; Н 5,24. $C_{30}H_{22}O_{13}$. Вычислено, %: С 59,99; Н 5,37.

Метилловый эфир медикарпина (VIII). Обработка медикарпина (V) диазометаном дала соединение, полностью идентичное гомоптерокарпину (VIII), выделенному из корней розового клевера (см. ниже).

Гидрогенолиз медикарпина (V) проводили подобно описанному для ипермина. В результате получили 7,2'-диокси-4'-метоксизофлаван (XIV), полностью идентичный изофлавану веститолу, выделенному из экстрактов корней розового клевера (см. ниже).

Выделение птерокарпанов (III), (V), (VIII) и изофлавана веститола (XIV) проводили из метанольных экстрактов корней розового клевера, собранного в июле 1976 г. на экспериментальном участке ВНИИкормов им. В. Р. Вильямса. Хроматографическое разделение сухого остатка (12 г) экстракта осуществили аналогично описанному выше для красного клевера. Фракции, содержащие смесь ипермина и медикарпина, а также их глюкозиды, обрабатывали и исследовали подобно описанным ранее индивидуальным соединениям в красном клевере. Данные физико-химического анализа см. в табл. 1 и 2.

При элюировании колонки системой бензол – ацетон (1:1) получили 25 мг кристаллов гомоптерокарпина (VIII) с т.пл. 83–85°С (из этанола) (ср. [18]), $[\alpha]_D^{20} -214^\circ$ (c 1 мг в 0,5 мл MeOH); УФ: $\lambda_{\text{макс}}$ 281, 286 нм ($\lg \epsilon$ 3,79 и 3,85); ИК: 1620, 1500 см^{-1} ; ЯМР- и масс-спектр высокого разрешения см. в табл. 1 и 2; масс-спектр: M^+ 284 (100), 283 (75), 269 (15), 161 (34), 149 (19), 147 (45). Найдено, %: С 71,8; Н 5,7. $C_{17}H_{14}O_4$. Вычислено, %: С 71,8; Н 5,7.

Дальнейшее элюирование колонки смесью тех же растворителей в соотношении 1:2 позволило выделить 21 мг 7,2'-диокси-4'-метоксизофлавана веститола (XIV) с т.пл. 156°С (из хлороформа), $[\alpha]_D^{20} -15,8^\circ$ (c 1,2, MeOH); УФ: $\lambda_{\text{макс}}$ 206, 228, 285 нм ($\lg \epsilon$ 4,36; 4,12 и 3,62); ИК: 3500, 3250, 1620 см^{-1} ; ЯМР-спектр (C^2HCl_3 , δ , м.д.): 3,77 (3Н, с, OMe), 4,5–3,0 (3Н, м, 2-Н, 3-Н), 2,85 (2Н, д, J8, 4-Н), 6,99 (1Н, д, J8, 5-Н), 6,85 (1Н, д, J8, 6'-Н), 6,46 (1Н, д, J3, 8-Н), 6,26 (1Н, д, J3, 3'-Н), 6,43 (1Н, дд, J3 и 8, 6-Н), 6,38 (1Н, дд, J3 и 8, 5'-Н); масс-спектр высокого разрешения см. в табл. 3; масс-спектр: M^+ 272 (31), 151 (12), 150 (100), 149 (15), 138 (17), 137 (32), 135 (15), 121 (16), 109 (12), 107 (15). Найдено, %: С 70,90; Н 5,95. $C_{16}H_{16}O_4$. Вычислено, %: С 70,57; Н 5,92.

7,4'-Диметокси-2'-оксизофлаван (XVI) был получен из гомоптерокарпина (VIII) восстановительной дециклизацией как описано для соединения (XII). Изофлаван (XVI) – бесцветные кристаллы с т.пл. 153–155°С, УФ: $\lambda_{\text{макс}}$ 228, 285 нм ($\lg \epsilon$ 4,12 и 3,62); ИК: 3574, 3030, 2941, 1629,

1590, 1534, 1515, 1460, 1267, 1111, 943, 930, 845 cm^{-1} ; ЯМР-спектр ($(\text{C}^2\text{H}_5)_2\text{CO}$, δ , м.д.): 7,02 (1H, д, J8, 5-H), 6,94 (1H, д, J7, 6'-H), 6,49 (1H, д, J2, 8-H), 6,36 (1H, дд, J2 и 8, 6-H), 6,42 (1H, дд, J2 и 7, 5'-H), 6,3 (1H, д, J2, 3'-H), 4,5–4,0 (2H, м, 2-H), 3,69 (6H, с, OMe), 3,2–2,8 (3H, м, 3-H, 4-H); масс-спектр высокого разрешения см. в табл. 3; масс-спектр: M^+ 286 (50), 150 (68), 149 (31), 137 (100). Найдено, %: C 71,38; H 6,3. $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_4$. Вычислено, %: C 71,31; H 6,34.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cruickshank I. A. M. Studies on phytoalexins. IV. The antimicrobial spectrum of pisatin.— Austr. J. Biol. Sci., 1962, v. 15, p. 147–159.
2. Perrin D. R. Phytoalexins of the Leguminosae — phaseollin from *Phaseolus vulgaris*.— Tetrahedron Lett., 1964, v. 1, p. 438–441.
3. Smith D. G., McInnes A. G., Higgins V. J., Millar R. L. Nature of the phytoalexin produced by alfalfa in response to fungal infection.— Physiol. Plant Pathol., 1971, v. 1, p. 41–44.
4. Higgins V. J., Smith D. G. Separation and identification of two pterocarpanoid phytoalexins produced by red clover leaves.— Phytopathol., 1972, v. 62, p. 235–238.
5. Hietala P. K. A countercurrent distribution method for separation of chemical compounds.— Ann. Acad. Sci. Fennicae, Series A II Chemica, 1960, v. 100, p. 54–62.
6. Bredenberg J. B., Hietala P. K. Investigation of the structure of trifolirhizin, an antifungal compound from *Trifolium pratense*.— Acta chem. scand., 1961, v. 15, p. 696–699.
7. Cocker W., Dahl T., Dempsey C., McMurphy T. B. H. Inermin, an extractive of *Andira inermis*.— Chem. and Industry, 1962, p. 216–217.
8. Harborne J. B., Mabry T. J., Mabry H. The flavonoids. London: Chapman and Hall, 1975, p. 774.
9. Фрайштар П. Д., Поправко С. А., Вульфсон Н. С. Вторичные метаболиты клевера. V. Новый птерокарпан в корнях красного клевера.— Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 12, с. 1879–1880.
10. Мухина Н. А., Шестиперова Э. И. Клевер. Л.: Колос, 1978, с. 28–29.
11. Фрайштар П. Д., Поправко С. А. Идентификация 7,2'-диокси-4'-метоксипизофлаванна (веститола) в корнях розового клевера.— Химия природн. соед., 1979, т. 4, с. 729–730.
12. Harper S. H., Kemp A. D., Underwood W. G. E., Campbell R. V. M. Pterocarpanoid constituents of the Heartwood of *Pericopsis angolensis* and *Swartzia madagascariensis*.— J. Chem. Soc. (C), 1969, p. 1109–1116.
13. Ingham J. L. Isosativan: and isoflavan phytoalexin from *Trifolium hybridum* and other *Trifolium* species.— Z. Naturforsch., 1976, v. 31c, p. 331–332.
14. Фрайштар П. Д., Поправко С. А., Вульфсон Н. С. Вторичные метаболиты клевера. I. Выделение производных 5-(пропен-1'-ил)пирокатехина из корней клевера красного.— Биоорг. химия, 1978, т. 4, № 4, с. 563–565.
15. Фрайштар П. Д., Поправко С. А., Вульфсон Н. С. Вторичные метаболиты клевера. VII. Изофлавоны корней красного клевера.— Биоорг. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1722–1732.
16. Suginome H. Sophorol.— Bull. Chem. Soc. Jap., 1966, v. 39, p. 1525–1529.
17. Sakagami Y., Kumai S., Suzuki A. Isolation and structure of medicarpin- β -D-glucoside in Alfalfa.— Agr. Biol. Chem., 1974, v. 38, p. 1031–1034.
18. Suginome H., Iwadare T. The synthesis of *d,l*-homopterocarpin.— Bull. Chem. Soc. Jap., 1966, v. 39, p. 1535–1541.

Поступила в редакцию
3.XI.1980

CLOVER SECONDARY METABOLITES. VIII. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PTEROCARPANS FROM THE ROOTS OF CULTURED SPECIES OF CLOVER

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

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

From the roots of *Trifolium pratense*, *repens* and *hybridum* seven pterocarpanes have been isolated and identified: inermin, trifolian, homopterocarpin, medicarpin, 4-methoxymedicarpin, as well as inermin and medicarpin glucosides. Isoflavones formononetin, pseudobaptigenin and genistein have been identified in the roots of *Trifolium repens* and *hybridum*.