

## Die Flavonoide der Samen von *Medicago × varia* Martyn c. v. Cardinal (Fabaceae)

The Seed-Flavonoids of *Medicago × varia* Martyn c. v. Cardinal (Fabaceae)

Eberhard Gehring\* und Hans Geiger

Institut für Chemie der Universität Hohenheim, Garbenstr. 30, D-7000 Stuttgart 70

Z. Naturforsch. **35 c**, 380–383 (1980); eingegangen am 22. Januar 1980

*Medicago × varia* c. v., Fabaceae, Flavonoids, 5-Methoxyflavones, 5-Methoxyflavonols

From the seeds of *Medicago × varia* Martyn c. v. Cardinal have been isolated twenty flavonoids, including four 5-methoxyflavonoids. Four compounds have been obtained the first time from a natural source. The constitution of all compounds is proved.

Im Rahmen unserer Arbeiten über die Flavonoide von Leguminosensamen [1] haben wir die Samen von *Medicago × varia* Martyn c. v. Cardinal untersucht. Durch Kombination verschiedener säulenchromatographischer Methoden konnten die in Tab. I aufgeführten Flavonoide isoliert werden.

Von diesen Verbindungen wurden **2**, **3**, **4**, **9**, **10**, **11**, **12**, **13**, **14** und **15** durch unmittelbaren Vergleich mit Material, dessen Struktur durch  $^{13}\text{C}$ -NMR abgesichert ist [2], identifiziert. **1** wurde mit synthetischem Material [3], **6** mit einem Präparat aus *Eriodictyon glutinosum* Benth. [4] und **19** mit einem Präparat aus *Cereus grandiflorus* [5] identifiziert.

Die Struktur der übrigen Verbindungen wurde auf Grund ihres Fluoreszenzverhaltens [6], ihrer FD- und EI-Massenspektren [7, 8] und von Abbaureaktionen ermittelt. Die spektroskopischen Daten dieser Verbindungen sind in Tab. II zusammengefaßt.

**5** läßt sich zu Luteolin (**3**) entmethylieren; die Stellung der einen, nach dem MS vorhandenen, Methoxylgruppe ergibt sich sowohl aus dem Fluoreszenzverhalten (starke, blaue Fluoreszenz auf dem nur mit EDTA besprühten Chromatogramm), als auch aus dem EI-MS (intensives  $[\text{M}-46]^{+}$ -Signal). **5** wurde schon früher in Juncaceen und Cyperaceen nachgewiesen [9, 10]. **7** läßt sich zu **6** und Glucose spalten; nach dem FD-MS zu schließen, ist es ein Monoglucosid; der Ort der Glucosidierung ergibt sich aus dem Fluoreszenzverhalten (mit EDTA besprüht keine Fluoreszenz, daher freie OH-Gruppe

am C-5 und grüne Fluoreszenz nach Besprühen mit Natriumcarbonat, daher freie OH-Gruppe am C-4'). **7** ist schon mehrfach in der Natur aufgefunden worden (vgl. [11]). **8** liefert bei der partiellen Entmethylierung **6**, daher befindet sich eine der beiden auf Grund des EI-MS vorhandenen Methoxylgruppen an C-3'; für die Stellung der zweiten Methoxylgruppe am C-5 gilt entsprechend das für **5** Gesagte. **8** war bislang nur als Syntheseprodukt bekannt [12]. **16** läßt sich alkalisch in **14** und *p*-Cumarsäure spalten. Daß die *p*-Cumarsäure mit der Glucose verestert ist, ergibt sich aus dem im FD-MS auftretenden *p*-Cumaroylanhydroglucosefragment (308 *m/e*) [7]; zur Ermittlung der Verknüpfungsstelle zwischen Zucker und Säure reichte die vorhandene Substanzmenge leider nicht aus. **16** ist bislang in der Natur noch nicht aufgefunden worden. **17** läßt sich zu Quercetin (**12**) entmethylieren; die eine nach dem EI-MS vorhandene Methoxylgruppe befindet sich nach dem EI-MS (starkes  $[\text{M}-46]^{+}$ -signal) und dem Fluoreszenzverhalten (starke, grüngelbe Fluoreszenz auf dem mit EDTA besprühten Chromatogramm) am C-5; es handelt sich bei **17** also um Azaleatin, das erstmalig aus *Rhododendron mucronatum* isoliert worden ist [13]. **18** liefert bei der sauren Hydrolyse **17** und Galactose; nach dem FD-MS ist es ein Monogalactosid; da es auf Grund der starken blauen Fluoreszenz auf dem EDTA-besprühten Chromatogramm keine freien OH-Gruppen an C-3 und C-5 besitzen kann, muß ihm die angegebene Konstitution zukommen; **18** ist erstmalig in der Gattung *Eucryphia* nachgewiesen worden [14]. **20** wird durch Säure zu **19** und Glucose gespalten; nach FD-MS und Fluoreszenzverhalten ist **20** ein 3-Glucosid der angegebenen Konstitution; es wurde erstmalig aus *Argemone mexicana* isoliert [15]. Der Quercetin-5,3'-

\* Aus der Staatsexamensarbeit von cand. rer. nat. E. G., Hohenheim 1978.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Geiger.

0341-0382/80/0500-0380 \$ 01.00/0



Tab. I. Ausbeuten und  $R_f$ -Werte der Flavonoide aus *Medicago × varia*. NM = Nitromethan/Methanol (3:4), auf Mikropolyamidfolien (Schleicher und Schüll); EW = wässrige Essigsäure der angegebenen Konzentration, auf Celluloseschichten; BEW = *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser (4:1:5; Oberphase), auf Celluloseschichten.

			$R_f \cdot 100$					
			NM	EW				BEW
				0%	10%	20%	40%	
7,4'-Dihydroxyflavon	(1)	5	—	01	05	17	58	96
Apigenin	(2)	115	—	00	03	10	48	94
Luteolin	(3)	240	—	00	02	07	31	84
Luteolin-7-glucosid	(4)	125	—	01	04	17	44	51
Luteolin-5-methylether	(5)	325	—	00	02	08	35	68
Luteolin-3'-methylether	(6)	20	—	00	02	09	42	93
Luteolin-3'-methylether-7-glucosid	(7)	15	—	01	07	21	60	57
Luteolin-5,3'-dimethylether	(8)	130	—	00	03	10	41	74
Kämpferol	(9)	5	—	00	02	07	31	92
Kämpferol-3-glucosid	(10)	15	—	11	31	58	79	77
Kämpferol-3-rutinosid	(11)	20	—	21	47	71	87	70
Quercetin	(12)	45	—	00	01	05	20	74
Quercetin-3-arabopyranosid (= Guajaverin)	(13)	600	49	04	14	36	64	73
Quercetin-3-glucosid	(14)	Spur	44	08	25	49	71	72
Quercetin-3-galactosid	(15)	2600	50	07	23	47	70	67
Quercetin-3-( <i>p</i> -cumaroyl-glucosid)	(16)	90	—	02	09	33	68	87
Azaleatin	(17)	—	—	00	01	06	21	59
Azeleatin-3-galactosid	(18)	20	—	08	26	48	73	56
Isorhamnetin	(19)	—	—	00	01	05	26	88
Isorhamnetin-3-glucosid	(20)	10	—	07	25	52	77	74
Quercetin-5,3'-dimethylether	(21)	—	—	00	02	04	26	71
Quercetin-5,3'-dimethylether-3-glucosid	(22)	54	—	07	27	54	82	62

Tab. II. Fluoreszenzmaxima und MS-Fragmente derjenigen Flavonoide aus *Medicago × varia*, die nicht durch unmittelbaren Vergleich identifiziert wurden.

EDTA = mit 0,2 M Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz in Wasser besprüht

NA = mit 1-proz. Lösung von Triphenylborsäure- $\beta$ -aminoethylester in Methanol besprüht $\text{Na}_2\text{CO}_3$  = mit 5-proz. Lösung von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in Wasser besprüht.

		Fluoreszenz- maxima [nm]			MS-Schlüsselfragmente [m/e]						
					FD		EI				
		EDTA	NA	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	$\text{M}^+$	Agly- kon $^+$	$\text{M}^+$	( $\text{M}-46$ ) $^+$	( $\text{A}_1+\text{H}$ ) $^+$	$\text{B}_1^+$	$\text{B}_2^+$
Luteolin-5-methylether	(5)	440	490	480			300	254	167	134	137
Luteolin-3'-methylether-7-glucosid	(7)	keine	500	490	462	300					
Luteolin-5,3'-dimethylether	(8)	430	430	490			314	268	167	148	—
Quercetin-3-( <i>p</i> -cumaroyl-glucosid)	(16)	keine	565	520	610	302					
Azaleatin	(17)	540	560	512			316	270	167	—	137
Azeleatin-3-galactosid	(18)	445	505	495	478	316					
Isorhamnetin-3-glucosid	(20)	keine	520	510	478	316					
Quercetin-5,3'-dimethylether	(21)	540	525	505			300	284	167	—	151
Quercetin-5,3'-dimethylether-3-glucosid	(22)	440	445	505	492	330					

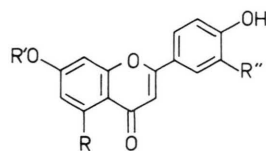
dimethylether (**21**) war bislang nur als Syntheseprodukt bekannt [16]; die 5-Stellung der einen Methoxylgruppe ergibt sich aus dem Fluoreszenzverhalten (starke, gelbgrüne Fluoreszenz auf dem EDTA-besprühten Chromatogramm) und dem EI-MS (intensives  $[M-46]^+$ -Signal); die 3'-Stellung der zweiten Methoxylgruppe wird durch die partielle Entmethylierung von **21** zu Isorhamnetin (**19**) bewiesen. **22** liefert bei der sauren Hydrolyse das Aglykon **21** und Glucose; nach dem FD-MS ist es ein Monoglucosid; die 3-Stellung des Zuckers ergibt sich wie bei **18** aus dem Fluoreszenzverhalten; **22** war bislang unbekannt.

Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung vom Standpunkt der Chemotaxonomie, so fällt vor allem das reichliche Vorkommen von 5-Methoxyflavonoiden (**5**, **8**, **18** und **22**) auf. Diese Verbindungen schienen nach bisherigen Erfahrungen (vgl. [9, 10] sowie [17]) hauptsächlich in anderen Familien vorzukommen. Eine eingehende Diskussion der Ergebnisse ist erst nach der Untersuchung der Samen weiterer Sorten möglich.

### Isolierung der Flavonoide

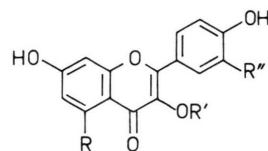
1 kg feingemahlene Samen von *Medicago × varia* Martyn c. v. Cardinal werden erst mit Petrolether entfettet und hernach durch Perkolation mit wassergesättigtem 2-Butanon erschöpfend extrahiert. Der Eindampfrückstand des Perkolats wurde, wie früher beschrieben [18], an einer Polyamidsäule mit Wasser, dem steigende Mengen Aceton zugefügt wurden, chromatographiert. Die verschiedenen Flavonoide wurden mit starken Überschneidungen in der Reihenfolge **22** > **11** = **7** > **18** > **4** > **10** = **20** = **15** + **14** > **13** > **16** = **8** > **1** = **5** > **9** = **6** > **2** = **3** = **12** eluiert.

Die weitere Auftrennung erfolgte an Säulen von Sephadex LH 20 mit den Elutionsmitteln Aceton/Methanol/Wasser (2:1:1) (Reihenfolgen der Elution: Polymere > **22** > **11** = **7** > **18** > **10** = **20** > **15** + **14** = **4** > **13** und Polymere > **8** > **20** = **13** = **16** > **5** = **1** > **6** > **2** > **3** = **9** > **15**) und Methanol/Wasser (7:3) (Reihenfolgen der Elution: **22** > **11** > **7** = **18** > **10** = **20** = **4** > **15** + **14** > **13** und **8** > **15** + **14** > **5** > **1** > **16** > **6** > **2** > **3** > **9** > **12**), sowie an einer Cellulosesäule mit dem Elutionsmittel Aceton/Eisessig/Wasser (20:5:80) [18] (Reihenfolge der Elution: **20** > **10** > **15** > **4**) und an Polyvinylpyrrol-



- |                     |                                       |
|---------------------|---------------------------------------|
| 1: R=R'=R''=H       | 5: R=OCH <sub>3</sub> ; R'=H; R''=OH  |
| 2: R=OH; R'=R''=H   | 6: R=OH; R'=H; R''=OCH <sub>3</sub>   |
| 3: R=R''=OH; R'=H   | 7: R=OH; R'=glc; R''=OCH <sub>3</sub> |
| 4: R=R''=OH; R'=glc | 8: R=R''=OCH <sub>3</sub> ; R'=H      |

Formelschema 1.



- |                         |   |
|-------------------------|---|
| 9: R=OH; R'=R''=H       | 16: R=R''=OH; R'=H                      |
| 10: R=OH; R'=glc; R''=H | 17: R=OCH <sub>3</sub> ; R'=H; R''=OH   |
| 11: R=OH; R'=rut; R''=H | 18: R=OCH <sub>3</sub> ; R'=gal; R''=OH |
| 12: R=R''=OH; R'=H      | 19: R=OH; R'=H; R''=OCH <sub>3</sub>    |
| 13: R=R''=OH; R'=ara    | 20: R=OH; R'=glc; R''=OCH <sub>3</sub>  |
| 14: R=R''=OH; R'=glc    | 21: R=R''=OCH <sub>3</sub> ; R'=H       |
| 15: R=R''=OH; R'=gal    | 22: R=R''=OCH <sub>3</sub> ; R'=glc     |

Formelschema 2.

donsäulen (Polyclar AT) mit Methanol/Wasser (7:3) als Elutionsmittel (Reihenfolgen der Elution: **7** > **22** > **11** > **18**, **20** > **10** > **15**, **1** > **5** und **2** > **3** > **9** > **12**).

Durch geeignete Kombination der vorstehend angegebenen chromatographischen Methoden wurden die in Tab. I aufgeführten Flavonoide isoliert. **1**, **2**, **3**, **4**, **6**, **9**, **10**, **11**, **12**, **13**, **14**\*, **15** und **19** wurden durch  $R_F$ -Werte, Schmp. sowie IR- und Fluoreszenzspektren mit authentischem Material [2–5] identifiziert. Die übrigen Flavonoide sind nachfolgend beschrieben.

5-O-Methyluteolin (**5**) kristallisiert aus Methanol/Wasser in langen, dünnen, blaßgelben Nadeln vom Schmp. 290–292 °C (zers.).

$C_{16}H_{12}O_6$  (300,3) Gef.:  $M_r$  = 300 (EI-MS).

3'-O-Methyluteolin-7-glucosid (= Chrysoeriol-7-glucosid) (**7**). Aus wasserhaltigem Methanol kleine hellgelbe Drusen vom Schmp. 232–234 °C.

$C_{22}H_{12}O_6$  (462,4) Gef.:  $M_r$  = 462 (FD-MS).

5,3'-di-O-Methyluteolin (**8**). Aus Methanol/Wasser dünne, blaßgelbe Nadeln vom Schmp. 293 bis 294 °C (zers.) (Lit. [12]: 273–276 °C).

$C_{17}H_{14}O_6$  (314,3) Gef.:  $M_r$  = 314 (EI-MS).

\* **14** wurde nur chromatographisch in den Mutterlaugen von **15** nachgewiesen.

Quercetin-3-(*p*-cumaroylglucosid) (**16**). Aus Methanol/Wasser kurze, gelbe Nadelchen vom Schmp. 245–247 °C (zers.).

$C_{30}H_{26}O_{14}$  (610,5) Gef.:  $M_r = 610$  (FD-MS).

Azaleatin (**17**). Entsteht bei der sauren Hydrolyse von **18** und kristallisiert aus wässrigem Methanol in gelben Nadelchen, die sich ab 300 °C unter Braunfärbung zersetzen. (Lit.-Schmp.: ca. 320 [13]).

$C_{16}H_{12}O_7$  (316,3) Gef.:  $M_r = 316$  (EI-MS).

Azaleatin-3-galactosid (**18**). Aus Methanol/Wasser flache, hellgelbe Nadelchen vom Schmp. 206 bis 208 °C (zers.).

$C_{22}H_{22}O_{12}$  (478,4) Gef.:  $M_r = 478$  (FD-MS).

Isorhamnetin-3-glucosid (**20**). Aus Methanol/Wasser gelbe, kugelige Kristallaggregate vom Schmp.

181–182 °C (zers.) (Lit. [15]: 165–167 °C).

$C_{22}H_{22}O_{12}$  (478,4) Gef.:  $M_r = 478$  (FD-MS).

5,3'-di-O-Methylquercetin (**21**). Entsteht bei der sauren Hydrolyse von **22**. Aus Methanol/Wasser Rosetten von flachen, gelben Nadeln. Schmp.: 320 bis 322 °C (zers.) (Lit. [16]: 314–317 °C).

$C_{17}H_{14}O_7$  (330,3) Gef.:  $M_r = 330$  (EI-MS).

5,3'-di-O-Methylquercetin-3-glucosid (**22**). Aus Methanol/Wasser blaßgelbe Nadelchen vom Schmp. 257–258 °C (zers.).

$C_{23}H_{24}O_{12}$  (492,4) Gef.:  $M_r = 492$  (FD-MS).

#### Danksagung

Herrn G. Schwinger danken wir für die Aufnahme der Massenspektren.

- [1] A. Traub u. H. Geiger, Z. Naturforsch. **30 c**, 823 (1975).
- [2] K. R. Markham, B. Ternai, R. Stanley, H. Geiger u. T. J. Mabry, Tetrahedron **34**, 1389 (1978).
- [3] St. v. Kostanecki u. F. W. Osius, Ber. dtsch. chem. Ges. **32**, 325 (1899).
- [4] F. B. Power u. F. Tutin, Proc. Am. Pharm. Assoc. **54**, 352 (1906).
- [5] L. Hörhammer, H. Wagner, H. G. Arndt, H. Kraemer u. L. Farkas, Tetrahedron Letters **1966**, 567.
- [6] H. Homberg u. H. Geiger, Phytochemistry, im Druck.
- [7] H. Geiger u. G. Schwinger, Phytochemistry, im Druck.
- [8] T. J. Mabry u. K. R. Markham, The Flavonoids (J. B. Harborne, T. J. Mabry u. H. Mabry, Hrsg.), S. 78 uff., Chapman and Hall, London 1975.

- [9] Ch. A. Williams u. J. B. Harborne, Biochem. Syst. Ecol. **3**, 181 (1975).
- [10] Ch. A. Williams u. J. B. Harborne, Biochem. Syst. Ecol. **5**, 45 (1977).
- [11] J. S. Challice u. A. H. Williams, Phytochemistry **7**, 1781 (1968).
- [12] B.-G. Österdahl, Acta Chem. Scand. **B 30**, 867 (1976).
- [13] E. Wada, J. Am. Chem. Soc. **78**, 4725 (1956).
- [14] E. C. Bate-Smith, S. M. Davenport u. J. B. Harborne, Phytochemistry **6**, 1407 (1967).
- [15] W. Rahman u. M. Ilyas, J. Org. Chem. **27**, 153 (1962).
- [16] L. Farkas, B. Vermes u. M. Nögrádi, Chem. Ber. **105**, 3505 (1972).
- [17] J. B. Harborne, Phytochemistry **8**, 419 (1969).
- [18] S. Beckmann u. H. Geiger, Phytochemistry **7**, 1667 (1968).