

INSTYTUT UPRAWY NAWOŻENIA I GLEBOZNAWSTWA
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
INSTITUTE OF SOIL SCIENCE AND PLANT CULTIVATION
STATE RESEARCH INSTITUTE

Dyrektor: prof. dr hab. *Seweryn Kukula*



Redaktor: doc. dr hab. *Janusz Podleśny*

Recenzent: prof. dr hab. *Jan Oszmiański*

Opracowanie redakcyjne i techniczne: dr *Irena Marcinkowska*

Nakład 150 egz., B-5, zam. 25/F/07

Dział Upowszechniania i Wydawnictw IUNG - PIB w Puławach

tel. (081) 8863421 w. 301 i 307; fax (081) 8864547

e-mail: iung@iung.pulawy.pl; <http://www.iung.pulawy.pl>

PULAWY

INSTYTUT UPRAWY NAWOŻENIA I GLEBOZNAWSTWA
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
INSTITUTE OF SOIL SCIENCE AND PLANT CULTIVATION
STATE RESEARCH INSTITUTE



Anna Stochmal

FLAWONOIDY LUCERNY SIEWNEJ
(*MEDICAGO SATIVA* L.)
BUDOWA CHEMICZNA, WŁAŚCIWOŚCI
SPEKTRALNE, ZAWARTOŚĆ
W ZALEŻNOŚCI OD ODMIANY
I TERMINU ZBIORU

MONOGRAFIE
I ROZPRAWY
NAUKOWE

18

Anna Stochmal

FLAWONOIDY LUCERNY SIEWNEJ (*MEDICAGO SATIVA* L.)
BUDOWA CHEMICZNA, WŁAŚCIWOŚCI SPEKTRALNE,
ZAWARTOŚĆ W ZALEŻNOŚCI OD ODMIANY
I TERMINU ZBIORU

*Tacie mojemu
poświęcam*

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	7
2. CEL BADAŃ	8
3. PRZEGLĄD LITERATURY	8
3.1. Lucerna siewna (<i>Medicago sativa</i> L.)	8
3.2. Flawonoidy	10
4. MATERIAŁ I METODY	12
4.1. Materiał roślinny	12
4.2. Ekstrakcja flawonoidów	12
4.3. Oczyszczanie i frakcjonowanie ekstraktów	12
4.4. Wyodrębnianie pojedynczych flawonoidów	13
4.5. Pomiary fizykochemiczne i spektralne	13
4.6. Przygotowanie próbek roślinnych do analizy HPLC	13
4.7. Wysokosprawna chromatografia cieczowa	14
4.8. Obliczenia statystyczne	14
4.9. Pomiar molowych współczynników absorpcji wyodrębnionych flawonów ..	14
5. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA	16
5.1. Rozdzielanie i oczyszczanie pojedynczych flawonoidów	16
5.2. Ustalanie struktury flawonoidów	16
5.3. Właściwości spektralne flawonów lucerny i ich znaczenie	18
5.4. Analiza flawonów lucerny metodą chromatografii cieczowej	22
5.5. Oznaczanie zawartości związków flawonoidowych w odmianach lucerny	25
6. WNIOSKI	35
7. LITERATURA	36
8. STRESZCZENIE	43
9. ANEKS – wykaz prac (załączniki) wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej ...	49

1. WSTĘP

Zagadnienie jakości pasz jest od szeregu lat najważniejszym nurtem badawczym Zakładu Biochemii i Jakości Plonów Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach. Wcześniejsze prace dotyczyły głównie metabolizmu podstawowego (węglowodany, białka, tłuszcze) w aspekcie zmian jakościowych, zachodzących pod wpływem określonych zabiegów agrotechnicznych lub środowiskowych czynników biotycznych. Równoległe do tych prac prowadzono również badania nad wtórnym metabolizmem roślinnym i jego znaczeniem w żywieniu zwierząt. Początkowo wtórne metabolity roślinne traktowano jako tzw. substancje antyżywniowe i zabiegi hodowlane zmierzały w kierunku ograniczenia występowania tych związków w roślinach uprawnych. Dotyczyło to między innymi takich substancji, jak: alkaloidy w łubinie, trawach i roślinach z rodziny *Solanaceae* (94, 95, 141), kwas erukowy i glukozynolany w rzepaku, glikozydy cyjanogenne w komonicy i koniczynie białej (10, 126, 127), izoflawony w koniczynie czerwonej (16, 18, 63) czy triterpeny pięciocykliczne (saponiny) w lucernie (64, 104).

Od początku lat dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia obserwuje się w literaturze światowej ponowny wzrost zainteresowania wtórnymi metabolitami roślinnymi. Spowodowany był on rozwojem badań epidemiologicznych, wykazujących dodatnią korelację pomiędzy częstotliwością występowania chorób cywilizacyjnych w niektórych populacjach ludzi a ich odżywianiem się. Dotyczyło to głównie chorób nowotworowych i układu krążenia. Badania te wykazały, że wiele substancji metabolizmu wtórnego charakteryzuje się działaniem prozdrowotnym (8, 11, 103, 105, 108, 110, 119, 120). Substancje te nazwano nutraceutykami (4, 36), a produkty żywieniowe zawierające te związki sklasyfikowano jako „żywność funkcjonalną” (49, 86).

Od 3-4 lat wtórne metabolity roślinne są również obiektem zainteresowania przemysłu paszowego i nauki zajmującej się żywieniem zwierząt. Wynika to z faktu wystąpienia choroby bydła (BSE) oraz wycofywania przez kraje Unii Europejskiej antybiotyków jako dodatków do pasz (całkowity zakaz stosowania od 2006 roku). Alternatywą do stosowania tych związków są substancje naturalne występujące w roślinach, mające korzystny wpływ na dobrostan zwierząt hodowlanych (142).

Prezentowana rozprawa stanowi kontynuację badań składu związków naturalnych, występujących w jednej z bardziej popularnych roślin pastewnych, jaką jest lucerna siewna (*Medicago sativa* L.).

2. CEL BADAŃ

Wiedza na temat występowania flawonoidów w jednej z ważniejszych roślin pastewnych, jaką jest lucerna siewna (*Medicago sativa* L.), jest bardzo ograniczona. Phytochemical Dictionary of Leguminosae (9) podaje listę kilkudziesięciu związków flawonoidowych zidentyfikowanych w lucernie, ale są to doniesienia dotyczące głównie aglikonów lub fitoaleksyn flawonoidowych, najczęściej identyfikowanych w nieokreślonych organach rośliny. Wykaz ten zawiera jedynie 8 glikozydów flawonoidowych. Od czasu publikacji słownika w literaturze światowej nie ukazały się żadne prace na ten temat.

Dla uzupełnienia tych danych i pełnego wyjaśnienia składu chemicznego flawonoidów lucerny przeprowadzono badania, których celem było:

- wyodrębnienie oraz określenie budowy chemicznej i właściwości fizykochemicznych pojedynczych flawonoidów z części nadziemnych lucerny siewnej,
- opracowanie metody analitycznej (HPLC) oznaczania tych związków w materiale roślinnym,
- oznaczenie zawartości flawonoidów w wybranych odmianach lucerny,
- prześledzenie zmian zawartości różnych grup flawonoidów w lucernie w trzech sezonach wegetacyjnych i w różnych terminach zbioru.

Założono, że uzyskane wyniki będą przyczynkiem do poznania składu flawonoidów lucerny i ich potencjalnego wpływu na jakość paszową tej rośliny. Będą miały również znaczenie przy badaniu funkcji fizjologicznej flawonoidów w roślinie i ich udziału w reakcji roślin na czynniki środowiska.

Uzyskane wyniki dotyczące pomiarów fizykochemicznych i spektralnych zostały już opublikowane (130, 131, 132), natomiast pozostałe dane stanowią oryginalną, niepublikowaną część pracy badawczej.

3. PRZEGLĄD LITERATURY

3.1. LUCERNA SIEWNA (*Medicago sativa* L.)

Lucerna siewna jest wieloletnią rośliną z rodziny bobowatych, będącą w wielu krajach strefy umiarkowanej główną rośliną pastewną. Pochodzi z terenów byłej Persji (Iran, Irak), ale jej pokrewne formy i gatunki występują również w Centralnej Azji i Syberii. Rzymscy pisarze (490 r. p.n.e.) opisują lucernę jako roślinę pastewną, wykorzystywaną przez plemiona Medów do karmienia koni i innych zwierząt. Z uwagi na swoją wartość żywieniową określana była przez starożytnych jako *al-fac-facah* (20), „the father of all food” (podstawa wszelkiej żywności), a przez współczesnych „queen of forages” (królowa roślin pastewnych).

Roślina ta zbudowana jest z prostych, wzniesionych, osiagających 30-90 cm wysokości, silnie rozgałęzionych łodyg o liściach pierzastozłożonych, trzylistkowych. Kwitnie od maja do września. Kwiaty niebieskie lub fioletowe zebrane są w groniasty, główkowaty kwiatostan złożony z 5-30 kwiatów. Owocem lucerny są wielonasienne,

brunatne strąki o kilku (1,5-3,5) luźnych skrętach, wypełnione drobnymi, jasnobrązowymi, owalnymi nasionami.

Lucerna siewna jest rośliną wieloletnią, uprawianą na przewiewnych, przepuszczalnych oraz szybko nagrzewających się glebach o odczynie alkalicznym. Ze względu na to, że jest ona rośliną ciepłolubną dnia długiego, decydujący wpływ na wielkość plonu ma temperatura. Drugim czynnikiem znacznie wpływającym na plon jest ilość opadów; maksymalne plony osiągane są przy rocznych opadach wynoszących 500-700 mm. Korzenie lucerny zasiedlane są przez bakterie brodawkowe z rodzaju *Rhizobium*, mające zdolność wiązania azotu atmosferycznego. Dzięki takiemu symbiotycznemu współżyciu rośliny lucerny mogą dobrze rozwijać się na glebach ubogich w związki azotowe. Ze względu na oszczędne nawożenie azotem, uzyskiwany wysoki plon oraz pozostawianie dużej ilości resztek poźniwnych, lucerna jest stosowana w systemie rolnictwa ekologicznego oraz zrównoważonego (37).

Części nadziemne tej rośliny są wykorzystywane w postaci zielonki, siana, suchych granulatów lub koncentratów białkowych, głównie do karmienia zwierząt przeżuwających i monogastrycznych (7, 23, 41, 84). Dużym ograniczeniem w stosowaniu zielonki lucerny jako paszy do karmienia zwierząt, szczególnie monogastrycznych, jest zawartość substancji antyżywniowych, jakimi są saponiny triterpenowe. Wielu autorów wskazywało na ujemną korelację pomiędzy zawartością saponin a przyrostami zwierząt jednożołądkowych (21, 22, 40, 66). Nie rozstrzygnięto jednak definitywnie kwestii czy obserwowane obniżenie przyrostów, spowodowane obecnością saponin w paszy, wynika z ich toksycznego działania, czy raczej z obniżenia smakowitości paszy i zmniejszonego jej spożycia przez zwierzęta (24). Testy smakowitości głównych glikozydów saponinowych z części nadziemnych lucerny wykazały, że występujący w dużych ilościach tridesmozyd kwasu zanowego jest najbardziej gorzkim związkiem, o silnych właściwościach ściągających i podrażniających śluzówkę przełyku (93, 99). Po wprowadzeniu do przewodu pokarmowego może wpływać na przepuszczalność membran jelita, zmieniając absorpcję składników pokarmowych (100).

Liczne prace naukowe dowodziły związku pomiędzy zawartością saponin a powstawaniem wzdęć u zwierząt karmionych świeżą zielonką lucerny (25, 27, 38, 67, 68, 84). Jednakże inne doniesienia wykluczają udział saponin w wywoływaniu wzdęć (73, 74), czyniąc odpowiedzialnymi za te procesy takie czynniki, jak: zawartość białka rozpuszczalnego (54) i porę wypasu (33, 44, 45, 46). W pracach tych wskazuje się na wpływ saponin zawartych w paszy na dynamikę fermentacji mikrobiologicznej, degradację składników pokarmowych i liczebność pierwotniaków w żwacu, co może zwiększać współczynnik strawności substancji organicznej (a tym samym efektywność wykorzystania paszy), przesuwając te procesy z żołądka do jelita cienkiego (70).

W wielu krajach kiełki lucerny są dość popularnym składnikiem diety ludzkiej jako: zielone przybranie do potraw (ang. garnish), dodatki do sałatek, tabletki poprawiające trawienie lub napoje orzeźwiające, zawierające sok z części nadziemnych (6, 75, 76, 80, 91, 96, 97, 121, 133). Ponadto lucerną zainteresowany jest przemysł farmaceutyczny i na rynku oferowane są liczne produkty o działaniu leczniczym, wytworzone z części nadziemnych lucerny. Do najważniejszych zaliczyć można odżywkę Macronu-

trient – sproszkowane liście lucerny, 19% białka, witaminy, składniki mineralne, Cholestaid – preparat saponinowy obniżający poziom cholesterolu we krwi, Chlorophyllin – koncentrat chlorofilowy o działaniu przeciwrakowym i oczyszczającym wątrobę (55, 56).

Liczne testy przeprowadzone na zwierzętach (32, 34, 77-80, 124, 133, 143) i wstępne badania kliniczne (28, 89) wskazują, że ekstrakty z nasion i liści lucerny mogą mieć zastosowanie w leczeniu hipercholesterolemii. Podobnie na podstawie innych badań przeprowadzonych na zwierzętach stwierdzono, że lucerna może być bardzo wskazana w diecie dla diabetyków (42, 135).

Tak duże zainteresowanie żywieniowe lucerną wynika z faktu, iż części zielone zawierają duże ilości dobrego jakościowo białka. Ponadto, dzięki głęboko sięgającemu systemowi korzeniowemu lucerna gromadzi duże ilości składników mineralnych, takich jak: żelazo, wapń, magnez, potas, chrom, miedź, jod, molibden, selen, sód i cynk. Części nadziemne lucerny są jednym z najbogatszych roślinnych źródeł chlorofilu; zawierają duże ilości beta-karotenu (57) i witamin: C, E, B₁, B₂, B₆, B₁₂, niacyny, kwasu foliowego, biotyny, inositolu, choliny oraz znaczną ilość enzymów trawiennych, takich jak: lipaza, amylaza, peroksydaza, pektynaza, koagulaza i proteaza.

3.2. FLAWONOIDY

Flawonoidy są grupą związków polifenolowych występującą powszechnie w królestwie roślin. Stanowią jedną z najlepiej poznanych grup pod względem biosyntezy i roli w ewolucji roślin (12, 31). Niektóre z nich są barwnikami roślinnymi, których wysoką zawartość wykazano w liściach, kwiatach, owocach, nasionach i pyłkach kwiatowych (90, 123). W roślinach flawonoidy spełniają wielorakie funkcje fizjologiczne. Występują w membranach tylakoidów, gdzie aktywnie uczestniczą w procesach fotosyntezy jako katalizatory transportu elektronów, ale także chronią układ fotosyntetyczny i DNA przed szkodliwym działaniem promieniowania słonecznego UV-B (280-320 nm); (60, 122). Promieniowanie UV-B ma bezpośredni wpływ na ekspresję genów szlaku fenylopropanoidów (136) i akumulację, między innymi, flawonoidów i antocyjanów (15, 137). Mutanty *Arabidopsis thaliana* niezawierające flawonoidów wykazują wysoką wrażliwość na promieniowanie UV-B (69). Jak wykazały badania, zmiany w zdolnościach do absorpcji promieniowania UV-B mierzone w ekstraktach roślinnych poddanych działaniu promieniowania nie zależą wyłącznie od zmian w zawartości flawonoidów, ale także od obecności innych klas związków fenolowych, na przykład estrów kwasu hydroksycynamonowego lub kombinacji tych kwasów z flawonoidami (62). Niektóre rośliny akumulują flawonole acylowane kwasem *p*-kumarowym, których maksima absorpcyjne wynoszą 315 nm (59, 115, 117, 144). Takie acylowane flawonole były akumulowane w epidermie (118) i zapewniały skuteczną ochronę przed promieniowaniem UV fotosyntetycznie aktywnego mezofilu w siewkach sosny zwyczajnej (140).

Najlepiej udokumentowaną ze wszystkich funkcji jakie pełnią flawonoidy jest ich udział w oddziaływaniach rośliny gospodarza na czynniki biotyczne środowiska. Fla-

wony i flawonole obok antocyjanów decydują o barwie kwiatów (88) i pełnią funkcję wabienia zapylaczy (48). Również w oddziaływaniach rośliny z organizmami glebowymi flawonoidy odgrywają ważne funkcje ekologiczne. W przypadku symbiozy korzeni roślin motylkowatych z wiążącymi azot bakteriami związki flawonoidowe są substancjami sygnałnymi, uaktywniającymi w bakteriach gen brodawkowania. Szczepki *Rhizobium* dostosowane do współżycia z różnymi gatunkami roślin motylkowatych są aktywowane przez związki flawonoidowe. Przykładowo, luteolina (flawon) inicjuje zasiedlenie korzeni lucerny przez *R. meliloti*, 4,7-dihydroksyflawon zasiedlenie korzeni koniczyny przez *R. trifolii*, daidzeina i genisteina (izoflawony) zasiedlanie korzeni soi przez *Bradyrhizobium japonicum* oraz hesperetyna (flawonon) zasiedlanie korzeni grochu i wyki przez *R. leguminosarum* (107). Funkcję sygnałną pełni również ksenognizyna B (izoflawon) w wydzielinach korzeniowych z *Astragalus gum-mifer* (Leguminosae), stymulująca wytwarzanie haustoriów w roślinie pasożytniczej *Agalinis purpurea* (71). Flawonoidy stymulują również wzrost grzybów endomikoryzowych, ale ich funkcja w tych oddziaływaniach nie została dokładnie poznana (50). Związki flawonoidowe odgrywają również ważną rolę w determinowaniu wrażliwości lub odporności roślin na patogeny (92). Jak wykazano, glikozydy kwercetyny i kemferolu indukowały geny *vir* (virulencji) *Agrobacterium tumefaciens* (138).

Flawonoidy przez długi czas nie były uważane za związki mające znaczenie w żywieniu. Dopiero w ostatniej dekadzie obserwuje się ogromny wzrost zainteresowania tą grupą związków z uwagi na ich właściwości lecznicze (51, 87); szczególnie w chorobach wieńcowych (52, 53, 65), niektórych typach nowotworów (139), w schorzeniach przewodu pokarmowego, głównie wątroby, oraz dolegliwościach wieku starczego (30, 58). Strukturalnie różne flawonoidy mogą regulować aktywność szeregu kluczowych enzymów organizmów zwierzęcych (87). Czterem grupom związków flawonoidowych przypisuje się znaczenie żywieniowe. Są to antocyjany, izoflawony, pochodne flawan-3-oli (włączając taniny i katechiny) oraz 4-oksoflawonoidy, np. flawony i flawonole. Ich prozdrowotne działanie związane jest głównie z właściwościami przeciwutleniającymi i zdolnością do zmiatania wolnych rodników (13, 61, 111, 112). Właściwości te w dużej mierze zależą od struktury związków. Do najbardziej aktywnych w tym względzie w warunkach *in vitro* zalicza się związki posiadające wolną grupę 3-OH, ugrupowanie 4-okso, podwójne wiązanie C₂-C₃ w pierścieniu C oraz w pierścieniu B ugrupowanie *o*-dihydroksy (17, 35, 113, 114). Wszystkie te warunki spełnia przede wszystkim kwercetyna i temu związkowi poświęcono dotychczas najwięcej uwagi. Oprócz wymagań dotyczących budowy strukturalnej bardzo ważna jest również biodostępność w warunkach *in vivo* (1, 14, 43), która w dużym stopniu zależy od składu łańcucha cukrowego glikozydu flawonoidowego. Ma to związek z faktem, że glikozyd obecny w przewodzie pokarmowym, aby dostać się do krwioobiegu musi przed przejściem przez błony jelita ulec hydrolizie do aglikonu. Proces ten zachodzi pod wpływem odpowiednich enzymów związanych z błonami jelita lub enzymów mikroflory jelitowej (5, 81). Dlatego też, aby móc wnioskować o znaczeniu żywieniowym flawonoidów występujących w materiale roślinnym nieodzowne jest poznanie ich pełnej struktury chemicznej.

4. MATERIAŁ I METODY

4.1. MATERIAŁ ROŚLINNY

Do wyodrębniania związków flawonoidowych z lucerny odmiany Boja w roku 1997 wykorzystano rośliny pochodzące z doświadczeń prowadzonych w Rolniczym Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach. Rośliny zebrano w początkowym okresie kwitnienia, wysuszono i drobno zmielono przed ekstrakcją. Susz części nadziemnych lucerny portugalskiej odmiany Artal otrzymano od Marii Oliveira z Instituto Superior de Agronomia w Lizbonie.

Do oznaczenia zawartości flawonoidów w odmianach lucerny wykorzystano materiał roślinny zebrany z trzyletniego doświadczenia odmianowego prowadzonego przez Zakład Uprawy Roślin Pastewnych IUNG w Rolniczym Zakładzie Doświadczalnym Kępa - Puławy w latach 1993–1995. Doświadczenie obejmowało dziesięć odmian lucerny siewnej: S69⁺, Magali i Europe (odmiany francuskie), Lodi (odmiana włoska), Boja, Radius i Tula (odmiany polskie), Kanadyjska (populacja kanadyjska, nasiona dostępne w polskim handlu), Natsuwakaba (odmiana japońska), Julus (odmiana szwedzka). Próby do oznaczeń pobierano z pokosów ścinanych na początku kwitnienia (trzy pokosy w każdym roku). W części zebranego materiału oznaczono zawartość saponin w ramach projektu badawczego KBN (93), a pozostałość przechowywano w temperaturze -18°C do czasu wykonania analiz zawartości flawonoidów.

4.2. EKSTRAKCYJA FLAWONOIDÓW

Zmieszany materiał roślinny (1 kg) ekstrahowano chloroformem w aparacie Soxhleta w celu usunięcia tłuszczowców i chlorofilu. Porcję odtłuszczonego materiału (200 g) ekstrahowano w ciągu 16 godzin w temperaturze pokojowej 70% wodnym roztworem metanolu (2 l). Po odwirowaniu osad ponownie ekstrahowano przez ogrzewanie do wrzenia pod chłodnicą zwrotną (1,5 godz.), odwirowano i roztwory po ekstrakcjach połączono. Połączone ekstrakty odparowano do sucha (51,7 g) w temperaturze 50°C.

4.3. OCZYSZCZANIE I FRAKCJONOWANIE EKSTRAKTÓW

Do oczyszczenia i frakcjonowania ekstraktu lucerny wykorzystano metodę ekstrakcji do fazy stałej (SPE); (98). Uzyskany po zagęszczeniu osad rozpuszczono w wodzie i naniesiono na krótką kolumnę szklaną (3 x 5 cm), wypełnioną nośnikiem LiChroprep RP-18 (40-63 μm), wystabilizowaną metanolem, a następnie wodą. Kolumnę przemywano wodą (polarne składniki cukrowe), 40% wodnym roztworem metanolu (związki fenolowe – 5,1 g), a następnie 70% wodnym roztworem metanolu (saponiny – 3,5 g).

4.4. WYODRĘBNIANIE POJEDYNCZYCH FLAWONOIDÓW

Frację 40% metanolu zagęszczono do sucha, rozpuszczono w 10 ml wody destylowanej i naniesiono na kolumnę preparatywną (3 x 40 cm, LiChroprep PR-18, 25-40 μm , Merck) wystabilizowaną wodą destylowaną. Kolumnę wmywano wodą, a następnie wodnymi roztworami metanolu o stężeniu rosnącym co 5%, aż do czystego metanolu. Dziesięciomililitrowe frakcje zbierano za pomocą kolektora frakcji i analizowano stosując metodę chromatografii cienkowarstwowej na celulozie (DC-Alufolien Cellulose, Merck). Frakcje o podobnych profilach chromatograficznych łączono i odparowywano do sucha. W wyniku rozdziału uzyskano cztery pojedyncze związki flawonoidowe i trzydzieści frakcji zawierających mieszaniny dwu lub więcej związków flawonoidowych. Frakcje te rozdzielano następnie na kolumnie preparatywnej HPLC (1 x 40 cm, LiChroprep RP-18, 25-40 μm , Merck), stosując układy izokratyczne mieszaniny acetonitrylu i 1% kwasu orto-fosforowego. Stężenia acetonitrylu dla każdej frakcji dobierano indywidualnie na podstawie rozdziału analitycznego na chromatografie cieczowym (HPLC).

4.5. POMIARY FIZYKOCHEMICZNE I SPEKTRALNE

Widma absorpcyjne wyodrębnionych związków wykonano w metanolu na spektrofotometrze UV-Vis Hewlett-Packard 8453, a temperaturę topnienia za pomocą aparatu firmy Büchi. Oba aparaty znajdują się na wyposażeniu Zakładu Biochemii i Jakości Plonów IUNG w Puławach. Kąt skręcalności optycznej badano na aparacie Spektropolarymetr Jasco P-1020 (MeOH/MeOH : H₂O : DMSO, 20°C) w Instytucie Chemii Organicznej PAN w Warszawie.

Widma masowe FAB-MS wykonano w Centrum Badań Molekularnych i Mikromolekularnych w Łodzi, a wysokorozdzielcze widma masowe (ESI-HRMS) na spektrometrze Mariner Biospectrometry Workstation w Instytucie Chemii Organicznej PAN w Warszawie.

Widma ¹H i ¹³C NMR wykonano na spektrometrze Bruker DRX-600 na Uniwersytecie w Salerno (Włochy).

4.6. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK ROŚLINNYCH DO ANALIZY HPLC

Wykorzystano stosowaną wcześniej metodę wstępnego oczyszczania próbek roślinnych do analizy flawonoidów i saponin lucerny (101, 102, 128, 129). Susz lucerny (1 g) w 50 ml 70% MeOH ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną w ciągu 1 godziny. Po przesączeniu supernatant zagęszczano na wyparce próżniowej i nanoszono na mikrokolumny Sep-Pak C18 (Waters Associates) o masie nośnika 360 mg, stabilizowane wodą. Kolumnienki przemywano wodą, a następnie 20 ml 40% MeOH. Wyciek odparowywano do sucha i rozpuszczano w 1 ml 40% MeOH do wykonania analiz HPLC.

4.7. WYSOKOSPRAWNA CHROMATOGRAFIA CIECZOWA

Do oznaczania zawartości związków flawonoidowych w próbkach lucerny wykorzystano chromatograf cieczowy firmy Waters, wyposażony w detektor diodowy UV-Vis i komputerowy system przetwarzania danych Millennium. Rozdziały wykonywano na kolumnie Eurospher-100 (250 x 4,6 mm, C18, 5 μm , Säulentchnik, Niemcy) przy przepływie 1 ml/min. Zoptymalizowano dwa warianty rozdziału w układzie gradientowym:

A – gradient od 14% acetonitrylu w 1% H_3PO_4 do 40% acetonitrylu w 1% H_3PO_4 w ciągu 60 min przy temperaturze kolumny 20°C;

B – gradient od 8% acetonitrylu w 1% H_3PO_4 do 40% acetonitrylu w 1% H_3PO_4 w ciągu 70 min przy temperaturze kolumny 50°C.

Próbki wprowadzano na kolumnę za pomocą pętlicy o pojemności 20 μl . Oznaczenia wykonywano w oparciu o krzywe kalibracyjne, które ze względu na brak wzorców komercyjnych wykonano dla wcześniej wyodrębnionych pojedynczych związków flawonoidowych. Czystość wykorzystywanych wzorców wahała się od 85 do 96%. Każdą próbkę analizowano w trzech powtórzeniach. Przeprowadzoną walidację metody analizy HPLC zamieszczono w rozdziale „Wyniki badań i dyskusja”, ze względu na wykorzystanie do jej wykonania wzorców opisanych w tym rozdziale.

4.8. OBLICZENIA STATYSTYCZNE

Średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, testy porównań wielokrotnych wykonano metodą wykorzystania 95% przedziału ufności za pomocą programu komputerowego „Statgraphics Professional Plus 5”.

4.9. POMIAR MOLOWYCH WSPÓŁCZYNNIKÓW ABSORPCJI WYODRĘBNIONYCH FLAWONÓW

Dla wszystkich wyodrębnionych flawonów przygotowano roztwory wyjściowe o stężeniu 1 mg/ml. Związki **1-12** rozpuszczono w metanolu, natomiast związki **13-19** i **21-22** z powodu słabej rozpuszczalności w metanolu rozpuszczono w roztworze metanol – woda – DMSO (45 : 45 : 10); (rys. 1). Z roztworów wyjściowych przenoszono do pojemników szklanych porcje 50, 40 i 30 μl , a następnie je uzupełniano do objętości 2 ml za pomocą odpowiedniego rozpuszczalnika (MeOH lub MeOH : H_2O : DMSO). Dla tak przygotowanych roztworów, na spektrofotometrze Hewlett-Packard HP 8453 UV-Vis wyposażonym w program komputerowy do obróbki danych Advanced ChemStation, mierzono wartość absorbancji w przedziale 200-400 nm. Molowe współczynniki absorpcji ϵ ($1 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) dla dwóch maksimów (pasma I i II) wyliczono na podstawie prawa Lamberta-Beera według wzoru:

$$A = \epsilon cd$$

gdzie:

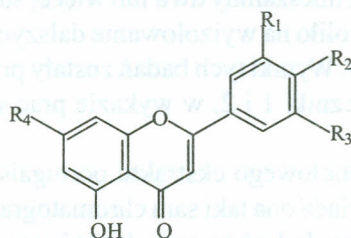
A – wartość absorbancji mierzona w jednym z maksimum absorpcji

ϵ – molowy współczynnik absorpcji

c – stężenie analitu ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

d – grubość kuwety pomiarowej (cm).

Pomiary wykonano dla trzech różnych stężeń analitu i dla dwóch powtórzeń każdego stężenia (z sześciu pomiarów wyliczono wartości średnie).



Związek Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1.	-H	-OGluA	-H	-OGluA(2→1) GluA
2.	-H	-OGluA	-H	-OH
3.	-H	-OH	-H	-OGluA(2→1) GluA
4.	-OH	-OH	-H	-OGluA
5.	-H	-OGluA	-H	-OGluA(2→1) GluA-2-O-Feruloyl
6.	-H	-OH	-H	-OGluA(2→1) GluA-[GluA(1→3)]-2-O-Feruloyl
7.	-H	-OH	-H	-OGluA(2→1) GluA-[GluA(1→3)]-2-O-p-Kumaroyl
8.	-H	-OH	-H	-OGluA
9.	-OH	-OGluA	-H	-OGluA(2→1) GluA-2-O-Feruloyl
10.	-H	-OGluA(2→1) GluA-2-O-Feruloyl	-H	-OH
11.	-H	-OGluA(2→1) GluA-2-O-Feruloyl	-H	-OGluA
12.	-H	-OGluA(2→1) GluA-2-O-p-Kumaroyl	-H	-OGluA
13.	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OGluA(2→1) GluA
14.	-OCH ₃	-OH	-H	-OGluA(2→1) GluA-[GluA(1→3)]-2-O-Feruloyl
15.	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OGluA(2→1) GluA-[GluA(1→3)]-2-O-Feruloyl
16.	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OGluA
17.	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OGluA(2→1) GluA-2-O-Synapoyl
18.	-OCH ₃	-OH	-H	-OGluA(2→1) GluA-2-O-Feruloyl
19.	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OGluA(2→1) GluA-2-O-Feruloyl
20.	-OCH ₃	-OH	-OH	-OGluA
21.	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OGluA(2→1) GluA-2-O-p-Kumaroyl
22.	-OCH ₃	-OGluA	-H	-OGluA

Rys. 1. Schemat struktur flawonów
Schematic diagram of flavones

5. WYNIKI BADAŃ I DISKUSJA

5.1. ROZDZIELANIE I OCZYSZCZANIE POJEDYNCZYCH FLAWONOIDÓW

W wyniku przeprowadzenia ekstrakcji z suszu części nadziemnych lucerny siewnej odmiany Boja oraz preparatywnego rozdziału na kolumnie wypełnionej nośnikiem RP-18 uzyskano cztery pojedyncze związki flawonoidowe: **1**, **5**, **16**, **19** oraz około trzydziestu frakcji zawierających mieszaniny dwu lub więcej substancji. Doczyszczanie poszczególnych frakcji pozwoliło na wyizolowanie dalszych piętnastu związków flawonoidowych oraz adenozyiny. Wyniki tych badań zostały przedstawione w dwóch publikacjach stanowiących załączniki 1 i 2, w wykazie prac wchodzących w skład niniejszej rozprawy.

Wstępna analiza HPLC metanolowego ekstraktu portugalskiej odmiany lucerny Artal pozwoliła stwierdzić, iż posiada ona taki sam chromatograficzny profil flawonoidowy, jak nasze krajowe odmiany. Jednakże związki, które w odmianie Boja występują w stężeniach śladowych i nie zostały wyodrębnione w ilościach pozwalających wykonać pełną analizę strukturalną są dominującymi składnikami odmiany portugalskiej Artal. W związku z tym zastosowano procedurę ekstrakcji i doczyszczania flawonoidów z ekstraktu nadziemnych części roślin tej odmiany. Pozwoliło to na wyizolowanie trzech dalszych substancji: **10**, **11**, **12**. Wyniki tych badań zostały opublikowane w oddzielnej pracy stanowiącej załącznik 3 w wykazie prac wchodzących w skład niniejszej rozprawy.

W sumie z części nadziemnych lucerny wyodrębniono 23 związki, w tym 22 związki flawonoidowe oraz adenozyinę.

5.2. USTALANIE STRUKTURY FLAWONOIDÓW

W celu ustalenia budowy chemicznej wyizolowanych związków wykonano analizy spektroskopii masowej: FAB-MS i ESI-HRMS oraz wodorowego i węglowego jądrowego rezonansu magnetycznego (^1H i ^{13}C NMR); eksperymenty takie, jak: COSY, ROE, HSQC, HMBC, TOCSY. Wyniki badań magnetycznego rezonansu jądrowego zawarte są w załącznikach 1, 2 i 3 wyszczególnionych w wykazie prac wchodzących w skład niniejszej rozprawy.

Na podstawie badań spektralnych ustalono pełną strukturę chemiczną wyodrębnionych związków. Związki te pod względem polarności można podzielić na dwie grupy. Pierwsza z nich to związki bardziej polarne, na schemacie struktur zaznaczone numerami od **1** do **12** (rys. 1), których aglikonem jest apigenina lub luteolina. Związki **1-3**, **5-8** oraz **10-12** mające w pozycji R_1 podstawiony wodór są glikozydami apigeniny. Aglikonem dwóch pozostałych glikozydów (**4** i **9**), które w pozycji R_1 mają podstawioną grupę hydroksylową, jest luteolina.

Wszystkie glikozydy zawierały od jednej do trzech cząsteczek kwasu glukuronowego jako jedyne go składnika cukrowego, występującego w łańcuchach cukrowych. Trzy związki zawierały po jednej cząsteczce kwasu glukuronowego: jeden z kwasem

glukuronowym podstawionym w pierścieniu B w pozycji C-4' – związek **2** (4'-*O*-β-D-glukuronopiranozyd apigeniny) oraz dwa podstawione w pierścieniu A w pozycji C-7 – związki **8** (7-*O*-β-D-glukuronopiranozyd apigeniny) i **4** (7-*O*-β-D-glukuronopiranozyd luteoliny). Dwa związki zawierały po dwie cząsteczki kwasu glukuronowego: związek **3**, który obydwa cukry miał przyłączone w pozycji C-7, zidentyfikowany jako 7-*O*-[β-D-glukuronopiranozylo(1→2)-*O*-β-D-glukuronopiranozyd] apigeniny i związek **10**, który dwie cząsteczki kwasu glukuronowego miał przyłączone w pozycji C-4', przy czym jedna cząsteczka kwasu glukuronowego była acylowana kwasem ferulowym i związek ten zidentyfikowano jako 4'-*O*-[2'-*O*-feruloylo-β-D-glukuronopiranozylo(1→2)-*O*-β-D-glukuronopiranozyd] apigeniny.

Związki zawierające trzy cząsteczki kwasu glukuronowego to: **1** – 7-*O*-[β-D-glukuronopiranozylo(1→2)-*O*-β-D-glukuronopiranozylo]-4'-*O*-β-D-glukuronopiranozyd apigeniny, acylowane w łańcuchu cukrowym w pozycji C-7 związki **5** – 7-*O*-[2-*O*-feruloylo-β-D-glukuronopiranozylo(1→2)-*O*-β-D-glukuronopiranozylo]-4'-*O*-β-D-glukuronopiranozyd apigeniny, **6** – 7-*O*-{2-*O*-feruloylo-[β-D-glukuronopiranozylo(1→3)]-*O*-β-D-glukuronopiranozylo(1→2)-*O*-β-D-glukuronopiranozyd} apigeniny, **7** – 7-*O*-{2-*O*-*p*-kumaroylo-[β-D-glukuronopiranozylo(1→3)]-*O*-β-D-glukuronopiranozylo(1→2)-*O*-β-D-glukuronopiranozyd} apigeniny, **9** – 7-*O*-[2-*O*-feruloylo-β-D-glukuronopiranozylo(1→2)-β-D-glukuronopiranozylo]-4'-*O*-β-D-glukuronopiranozyd luteoliny oraz acylowane w pozycji C-4' związki **11** – 7-*O*-β-D-glukuronopiranozylo-4'-*O*-[2'-*O*-feruloylo-*O*-β-D-glukuronopiranozylo(1→2)-*O*-β-D-glukuronopiranozyd] apigeniny i **12** – 7-*O*-β-D-glukuronopiranozylo-4'-*O*-[2'-*O*-*p*-kumaroylo-*O*-β-D-glukuronopiranozylo(1→2)-*O*-β-D-glukuronopiranozyd] apigeniny. Wszystkie związki zawierające trzy cząsteczki kwasu glukuronowego oraz acylowane pochodne, a więc flawonoidy **1**, **5**, **6**, **7**, **9**, **10**, **11** oraz **12** są związkami nowymi, dotychczas nieopisanymi w literaturze światowej.

Drugą grupę stanowiły związki trycyny (3'5'-metylotrycetyna) i chryzoeriolu (3'-metyloluteolina); (**13-22**) mające jako podstawnik R₁ grupę metoksylową. Związki **14**, **18** i **22**, których podstawnikiem w pozycji R₃ jest wodór są flawonami chryzoeriolu (3'-metyloluteolina). Flawonoidy **13**, **15-17**, **19** i **21** to związki trycyny, gdzie podstawnikiem w pozycji R₃ jest grupa metoksylowa. W przypadku związku **20**, w pozycji C-5' pierścienia B aglikonu stwierdzono występowanie grupy hydroksylowej i został on zidentyfikowany jako metylotrycetyna (selgina). Spośród tej grupy związków dwa miały po jednej cząsteczce kwasu glukuronowego. Były to związki **16** – 7-*O*-β-D-glukuronopiranozyd trycyny i **20** – 7-*O*-β-D-glukuronopiranozyd-3'-*O*-metylotrycetyny. Tylko dwa zawierały po trzy cząsteczki kwasu glukuronowego: **14** – 7-*O*-{2'-*O*-feruloylo-[β-D-glukuronopiranozylo(1→3)]-*O*-β-D-glukuronopiranozylo(1→2)-*O*-β-D-glukuronopiranozyd} chryzoeriolu oraz **15** – 7-*O*-{2'-*O*-feruloylo-[β-D-glukuronopiranozylo(1→3)]-*O*-β-D-glukuronopiranozylo(1→2)-*O*-β-D-glukuronopiranozyd} trycyny.

Najwięcej związków zawierało w strukturze dwie grupy glukuronowe: **13** – 7-*O*-[β-D-glukuronopiranozylo(1→2)-*O*-β-D-glukuronopiranozyd] trycyny i **22** – 7-*O*-β-D-glukuronopiranozylo-4'-*O*-β-D-glukuronopiranozyd chryzoeriolu oraz flawony acy-

lowane: **17** – 7-*O*-[2'-*O*-synapoylo- β -D-glukuronopiranozylo(\rightarrow 2)-*O*- β -D-glukuronopiranozyd] trycyny, **18** – 7-*O*-[2'-*O*-feruloylo- β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glukuronopiranozyd] chryzoeriolu, **19** – 7-*O*-[2'-*O*-feruloylo- β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glukuronopiranozyd] trycyny i **21** – 7-*O*-[2'-*p*-kumaroylo- β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glukuronopiranozyd] trycyny.

Większość związków tej grupy, tj. flawonoidy **14**, **15**, **17-22**, to substancje, których struktura chemiczna nie była do tej pory opisana w literaturze krajowej i zagranicznej.

Tak więc badania strukturalne flawonoidów części nadziemnych lucerny wykazały, że wszystkie występujące w niej związki należą do grupy flawonów i są glikozydami apigeniny, luteoliny, chryzoeriolu (komplawina A), trycyny i metylotrycetyny (selgina). Cechą charakterystyczną flawonoidów lucerny jest to, że jedynym składnikiem występującym w łańcuchach cukrowych jest kwas glukuronowy (od jednej do trzech cząsteczek połączonych wiązaniem 1 \rightarrow 2). Jest to zjawisko dość rzadkie, jako że w łańcuchach glikozydowych flawonoidów większości roślin występuje kilka różnych składników cukrowych, takich jak: glukoza, galaktoza, ramnoza, arabinoza, ksyloza, kwas glukuronowy i w nielicznych przypadkach apioza (85, 47). Większość glikozydów należy do grupy monodesmozydów z łańcuchem cukrowym w pozycji C-7 lub C-4' aglikonu, ale występują też bidesmozydy z łańcuchami cukrowymi zarówno w pozycji C-7, jak i w pozycji C-4'. Trzynastcie z wyodrębnionych związków było acylowanymi; większość kwasem ferulowym, trzy kumarowym, a jeden kwasem synapinowym. Acylacja zawsze miała miejsce przy węglu C-2 terminalnej cząsteczki kwasu glukuronowego. Taki typ acylacji flawonoidów nie był dotychczas opisany w literaturze; najczęściej stwierdzano przyłączanie cząsteczki kwasu do cząsteczki glukozy.

5.3. WŁAŚCIWOŚCI SPEKTRALNE FLAWONÓW LUCERNY I ICH ZNACZENIE

Dotychczas niewiele doniesień literaturowych dotyczyło znaczenia żywieniowego flawonoidów o aglikonach występujących w lucernie. Spośród nich więcej uwagi poświęcono jedynie luteolinie, jako substancji chroniącej przed oksydacyjnym uszkodzeniem DNA, utlenianiem lipidów oraz hamującej powstawanie wolnych rodników (19). Ten kierunek, nie będący przedmiotem niniejszej pracy, wymaga dalszych badań z uwagi na duże znaczenie paszowe i żywieniowe lucerny. Opisane glikozydy flawonów lucerny mają zapewne znaczący wpływ na jakość i wartość żywieniową pasz oraz dodatków żywnościowych wytwarzanych z lucerny.

Dużo więcej uwagi poświęcono w literaturze znaczeniu luteoliny i apigeniny dla samej rośliny. Udowodniono, że flawony, głównie luteolina, mogą mieć znaczenie w oddziaływaniu rośliny z bakteriami wiążącymi azot poprzez indukowanie ekspresji genów brodawkowania w *Rhizobium meliloti* (106, 109). Drugą ważną funkcją luteoliny i apigeniny podnoszoną w literaturze jest ich ochronne działanie przed szkodliwym promieniowaniem UV-B (82, 83, 125).

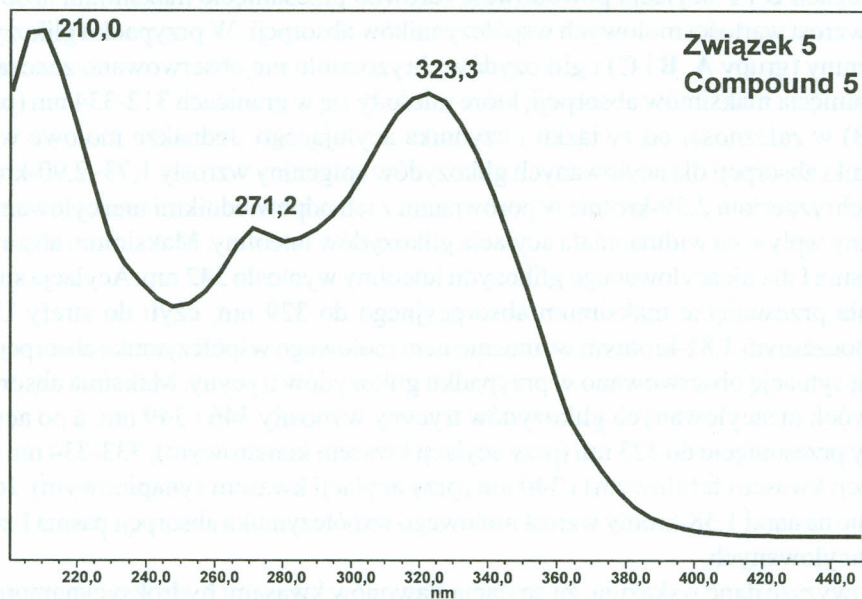
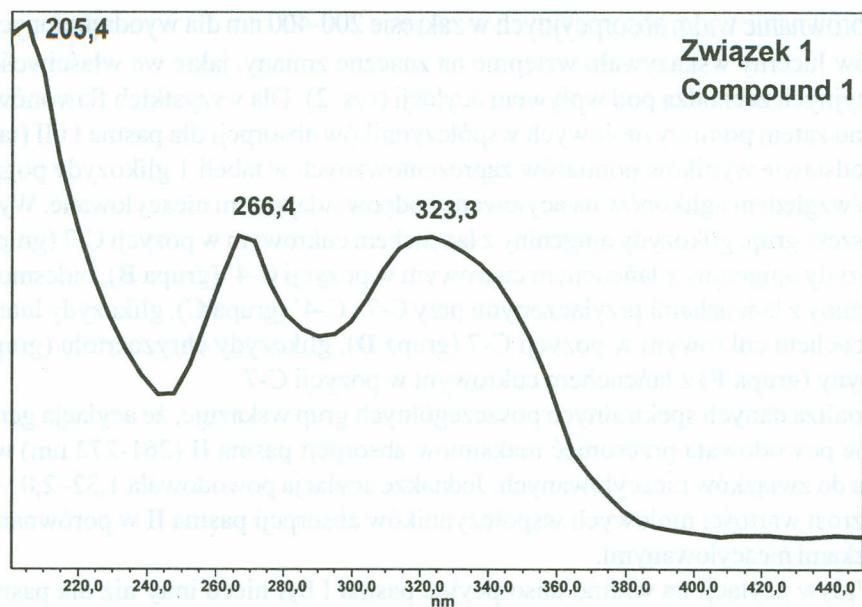
Porównanie widm absorpcyjnych w zakresie 200-400 nm dla wyodrębnionych flawonów lucerny wskazywało wstępnie na znaczne zmiany, jakie we właściwościach sorpcyjnych zachodzą pod wpływem acylacji (rys. 2). Dla wszystkich flawonów wykonano zatem pomiary molowych współczynników absorpcji dla pasma I i II (tab. 1). Na podstawie wyników pomiarów zaprezentowanych w tabeli 1 glikozydy pogrupowano względem aglikonów na acylowane i odpowiadające im nieacylowane. Wydzielono sześć grup: glikozydy apigeniny z łańcuchem cukrowym w pozycji C-7 (grupa A), glikozydy apigeniny z łańcuchem cukrowym w pozycji C-4' (grupa B), bidesmozydy apigeniny z łańcuchami przyłączonymi przy C-7 i C-4' (grupa C), glikozydy luteoliny z łańcuchem cukrowym w pozycji C-7 (grupa D), glikozydy chryzoeriolu (grupa E) i trycyny (grupa F) z łańcuchem cukrowym w pozycji C-7.

Analiza danych spektralnych poszczególnych grup wskazuje, że acylacja generalnie nie powodowała przesunięć maksimum absorpcji pasma II (261-272 nm) w stosunku do związków nieacylowanych. Jednakże acylacja powodowała 1,32–2,01-krotny wzrost wartości molowych współczynników absorpcji pasma II w porównaniu ze związkami nieacylowanymi.

Wpływ acylacji na widmo absorpcyjne pasma I był nieco inny niż dla pasma II. W grupach D i F acylacja powodowała zarówno przesunięcie maksimum absorpcji, jak i wzrost wartości molowych współczynników absorpcji. W przypadku glikozydów apigeniny (grupy A, B i C) i glikozydów chryzoeriolu nie obserwowano znaczącego przesunięcia maksimum absorpcji, które mieściły się w granicach 312-334 nm (pasma UV-B) w zależności od związku i czynnika acylującego. Jednakże molowe współczynniki absorpcji dla acylowanych glikozydów apigeniny wzrosły 1,73–2,90-krotnie, a dla chryzoeriolu 2,59-krotnie w porównaniu z ich odpowiednikami nieacylowanymi.

Inny wpływ na widma miała acylacja glikozydów luteoliny. Maksimum absorpcyjne pasma I dla nieacylowanego glikozydu luteoliny wyniosło 342 nm. Acylacja spowodowała przesunięcie maksimum absorpcyjnego do 329 nm, czyli do strefy UV-B, z jednoczesnym 1,81-krotnym wzmocnieniem molowego współczynnika absorpcji. Podobną sytuację obserwowano w przypadku glikozydów trycyny. Maksima absorpcyjne dwóch nieacylowanych glikozydów trycyny wynosiły 346 i 349 nm, a po acylacji uległy przesunięciu do 323 nm (przy acylacji kwasem kumarowym), 333-334 nm (przy acylacji kwasem ferulowym) i 340 nm (przy acylacji kwasem synapinowym). Jednocześnie nastąpił 1,58-krotny wzrost molowego współczynnika absorpcji pasma I związków acylowanych.

Powyższe dane wskazują, że acylacja flawonów kwasami hydroksycynamonowymi prowadzi zawsze do wzrostu absorbancji w zakresie UV-B. Jeśli związki posiadają maksima absorpcji przy dłuższych falach (powyżej 340 nm) acylacja powoduje przesunięcie tego maksimum do wartości z zakresu promieniowania UV-B (około 320 nm), z jednoczesnym wzmocnieniem molowego współczynnika absorpcji (1,58–2,90-krotnie). Zmiany te wskazują, że acylacja może być bardzo ważnym mechanizmem chroniącym roślinę przed szkodliwym działaniem promieniowania UV-B. Dane te, oparte na analizie właściwości absorpcyjnych unikalnej grupy związków o dobrze zdefiniowanych strukturach, są udokumentowaniem możliwej funkcji acylacji w przysto-



Rys. 2. Widma absorpcji 7-*O*-[β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glukuronopiranozylo]-4'-*O*- β -D-glukuronopiranozydu apigeniny (związek 1) i jego acylovanego odpowiednika 7-*O*-[2-*O*-feruloilo- β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glukuronopiranozylo]-4'-*O*- β -D-glukuronopiranozydu apigeniny (związek 5)

Absorption spectra of 7-*O*-[β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranosyl]-4'-*O*- β -D-glucuronopyranoside apigenin (compound 1) and its acylated analogue 7-*O*-[2-*O*-feruloyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranosyl]-4'-*O*- β -D-glucuronopyranoside apigenin (compound 5)

Tabela 1

Maksima absorpcji pasma I i II oraz molowe współczynniki absorpcji odpowiednio acylowanych i nieacylowanych flawonów

Absorption maxima of band I and II, and molar absorption coefficients of acylated and nonacylated flavones

Związek Compound	Pasma II Band II		Pasma I Band I		Stosunek** Ratio $\epsilon_{ac}/\epsilon_{nac}$
	λ_{max} (nm)	$\epsilon(\pm SD)^*$	λ_{max} (nm)	$\epsilon(\pm SD)$	
Glikozydy apigeniny z łańcuchem cukrowym w pozycji C-7 (grupa A) Apigenin glycosides substituted at C-7 (group A)					
3.	261	6940±520	331	7271±509	
8.	268	6323±560	334	7305±470	
6.	270	8364±420	328	12275±628	pasmo; band II 1,32
7.	270	9094±447	319	12979±546	pasmo; band I 1,73
Glikozydy apigeniny z łańcuchem cukrowym w pozycji C-4' (grupa B) Apigenin glycosides substituted at C-4' (group B)					
2.	269	5687±325	315	5004±317	pasmo; band II 1,93
10.	271	10986±435	324	14499±487	pasmo; band I 2,90
Glikozydy apigeniny z łańcuchem cukrowym w pozycji C-7 i C-4' (grupa C) Apigenin glycosides substituted at C-7 and C-4' (group C)					
1.	267	4230±256	312	4825±292	
5.	271	7419±298	322	9416±379	
11.	272	5671±220	321	7430±294	pasmo; band II 1,86
12.	273	6601±300	314	8710±387	pasmo; band I 2,18
Glikozydy luteoliny z łańcuchem cukrowym w pozycji C-7 (grupa D) Luteolin glycosides substituted at C-7 (group D)					
4.	269	3011±126	342	4056±162	pasmo; band II 2,01
9.	270	6053±267	329	9366±401	pasmo; band I 1,81
Glikozydy chryzoeriolu z łańcuchem cukrowym w pozycji C-7 (grupa E) Chrysoeriol glycosides substituted at C-7 (group E)					
22.	270	5578±165	333	5448±168	
18.	271	10460±328	331	15829±508	pasmo; band II 1,79
14.	271	9567±258	334	12357±352	pasmo; band I 2,59
Glikozydy trycyny (grupa F) Tricin glycosides (group F)					
13.	270	3623±115	349	4397±139	
16.	270	3234±128	346	3895±161	
21.	272	3047±105	323	3143±116	
17.	270	7096±201	340	9750±301	
15.	272	4636±154	334	6793±236	pasmo; band II 1,48
19.	272	5547±161	333	6647±220	pasmo; band I 1,58

* SD – odchylenie standardowe z sześciu pomiarów; standard deviation for six measurements

** $\epsilon_{ac}/\epsilon_{nac}$ – ϵ acylowanych (średnia arytmetyczna z grupy)/ ϵ nieacylowanych (średnia arytmetyczna z grupy); ϵ acylated (average for a group)/ ϵ nonacylated (average for a group)

sowaniu rośliny do warunków środowiska. Potwierdzają one w pełni wcześniejsze, oparte głównie na analizie właściwości absorpcyjnych ekstraktów lub pojedynczych związków, sugestie S c h n i t z l e r a i in. (118) oraz T u r u n e n a i in. (140) wskazujące na szczególną rolę acylowanych flawonów w ochronie roślin przed szkodliwym działaniem promieniowania UV-B. Promieniowanie UV-B (280-320 nm) dociera do powierzchni Ziemi i wywiera wpływ na wzrost i rozwój roślin. Jego natężenie może być różne w zależności od kąta nachylenia padającego światła słonecznego, grubości powłoki ozonowej, warunków meteorologicznych, pory roku i szerokości geograficznej (72). Mimo że natężenie UV-B w świetle słonecznym jest niewielkie, ma ono szkodliwy wpływ na DNA, aparat fotosyntetyczny, utlenianie lipidów błon, poziom fitohormonów i powstawanie wolnych rodników (60). Promieniowanie to wpływa również na wtórny metabolizm roślinny, głównie poprzez: aktywację receptorów UV-B (134), aktywację genów szlaku fenylopropanoidowego (136), akumulację alkaloidów, poliamin i wosków (39, 116) oraz flawonoidów, w tym antocyjanów (15, 137). Mutanty *Arabidopsis thaliana* pozbawione flawonoidów wykazują wysoką wrażliwość na UV-B (69). Jednakże zmian w absorpcji ekstraktów z roślin poddanych działaniu UV-B nie można było wyjaśnić jedynie wzrostem zawartości flawonoidów, ale należało również uwzględnić inne grupy związków fenolowych, w tym pochodne kwasu hydroksycynamonowego i ich kombinacje (62). Liczne doniesienia wskazywały również na akumulację pod wpływem UV-B flawonoli acylowanych kwasem p-kumarowym (59, 115, 117, 144). Jak wykazano, takie acylowane flawonole akumulowane są w epidermie (118) i skutecznie zabezpieczają fotosyntetycznie aktywny mezofil siewek sosny przed promienowaniem UV-B (140).

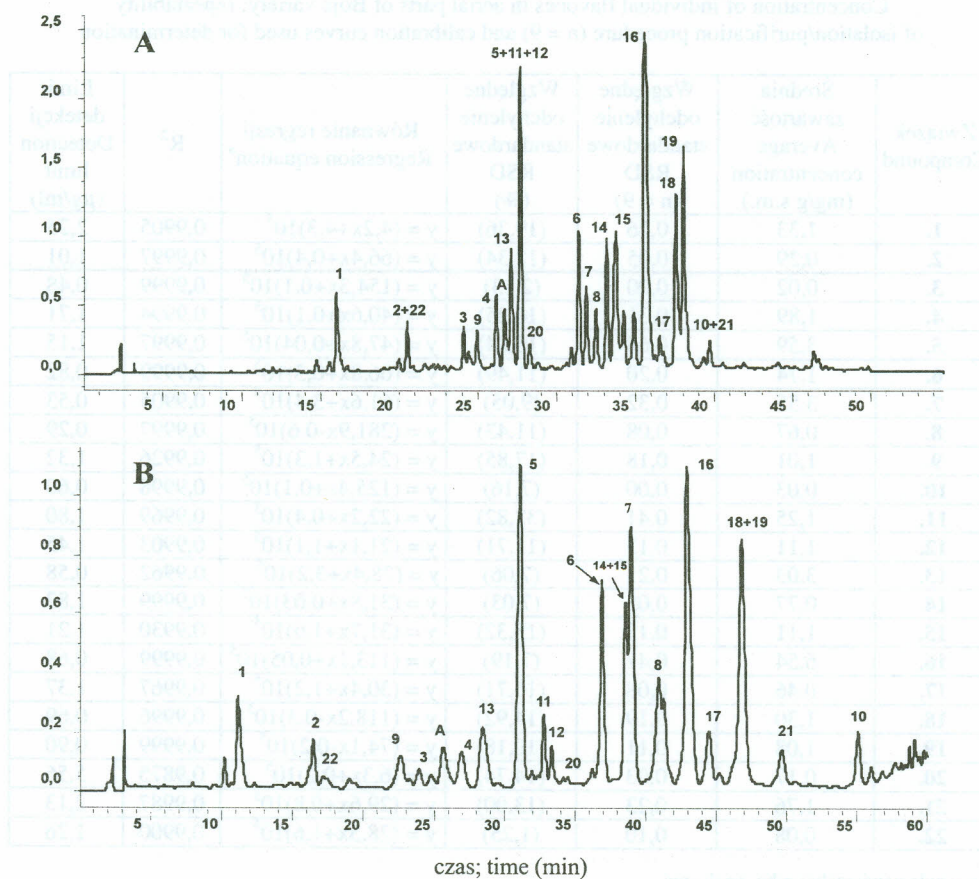
Przeprowadzone w tej pracy badania właściwości absorpcyjnych flawonów dostarczają nowych dowodów na znaczenie acylacji w mechanizmach ochronnych rośliny. Pełne poznanie funkcji tych związków wymaga dalszych szczegółowych badań. Lucerna, z uwagi na występujące w niej bogactwo struktur acylowanych i nieacylowanych flawonów, wydaje się być dobrym modelem roślinnym do kontynuowania prac nad tym zagadnieniem.

5.4. ANALIZA FLAWONÓW LUCERNY METODĄ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

Dostępność 22 wzorców flawonów i wzorca adenozyiny pozwoliły na opracowanie parametrów metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej oznaczania zawartości tych związków w próbkach roślinnych lucerny siewnej. Po zastosowaniu standardowej procedury analitycznej (129), używanej w Zakładzie Biochemii i Jakości Plonów w Puławach do analizy flawonoidów lucerny (System B) i wykonaniu kochromatografii ze wszystkimi wzorcami, stwierdzono że spośród 22 flawonów tylko 18 rozdziela się w tych warunkach (rys. 3A). Niektóre flawony miały identyczne czasy retencji. Piki flawonów **2** i **22**, flawonów **5**, **11** i **12** oraz związków **10** i **21** odpowiednio nakładały się na siebie i oznaczenie pojedynczych substancji nie było w tych warunkach możliwe. Po licznych próbach zmiany kształtu gradientu i temperatury kolumny opracowano warunki (System A), w których powyższe, nakładające się

związki uległy rozdzielaniu. Niestety, stosując nowo opracowaną metodę nie uzyskano separacji flawonów **18** i **19** oraz **14** i **15** (rys. 3B). Dlatego pełna analiza flawonów lucerny była możliwa jedynie po wykonaniu dwóch niezależnych rozdzielów w systemach A i B.

Do oznaczeń ilościowych dla poszczególnych wzorców przygotowano krzywe kalibracyjne. Dla wszystkich związków stwierdzono liniową zależność pomiędzy powierzchnią pików a stężeniem związku w granicach stężeń 2-500 µg/ml. Limit detekcji poszczególnych związków wahał się między 0,48 a 5,56 µg/ml, co odpowiada wartościom uzyskiwanym przez innych autorów (29).



Rys. 3. Profil HPLC (350 nm) flawonów lucerny: A – system rozdziálu A; B – system rozdziálu B
The HPLC profile (350 nm) of alfalfa flavones: A – system of analysis A; B – system of analysis B

Korzystając z materiału roślinnego lucerny odmiany Boja oszacowano powtarzalność metody, to znaczy wpływ ekstrakcji do fazy stałej (SPE) i dokładność aparatu na rozrzut wyników. Wykazano, że dla $n = 9$ względne odchylenie standardowe wyniosło dla pojedynczych związków średnio 15% i wahało się od 7 do 19%; tylko w jednym przypadku, dla związku **11** wyniosło 32,8% (tab. 2). Wyniki te, biorąc pod uwagę, że analizowany był materiał biologiczny, w którym trudno zwykle uzyskać wysoką jednorodność, były dość dobre i mieszczą się w przedziałach powtarzalności uzyskiwanych przez innych badaczy (26).

Tabela 2

Stężenie pojedynczych flawonów części nadziemnych lucerny odmiany Boja, powtarzalność metody izolacji/oczyszczania ($n = 9$) oraz krzywe kalibracyjne wzorców
Concentration of individual flavones in aerial parts of Boja variety; repeatability of isolation/purification procedure ($n = 9$) and calibration curves used for determination

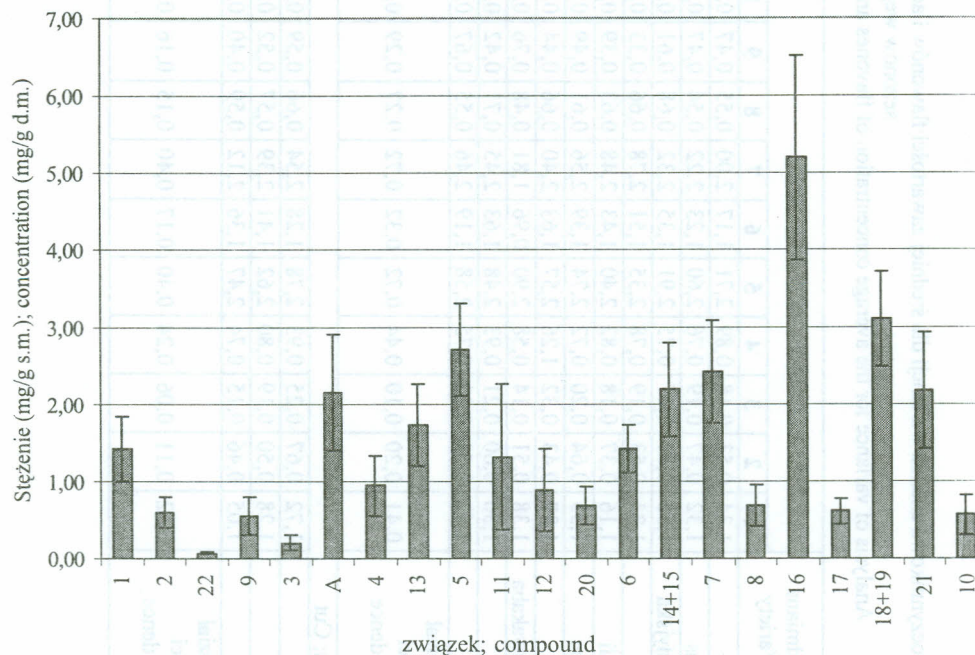
Związek Compound	Średnia zawartość Average concentration (mg/g s.m.)	Względne odchylenie standardowe RSD ($n = 9$)	Względne odchylenie standardowe RSD (%)	Równanie regresji Regression equation ^a	R ²	Limit detekcji Detection limit ($\mu\text{g/ml}$)
1.	1,33	0,26	(19,36)	$y = (4,2x+4,3)10^5$	0,9905	2,25
2.	0,29	0,05	(18,34)	$y = (66,4x+0,4)10^5$	0,9997	1,01
3.	0,02	0,00	(2,13)	$y = (154,3x+0,1)10^5$	0,9999	0,48
4.	1,89	0,31	(16,25)	$y = (40,6x+0,1)10^5$	0,9994	1,71
5.	3,59	0,60	(16,84)	$y = (47,8x+0,04)10^5$	0,9997	1,15
6.	1,74	0,20	(11,49)	$y = (66,8x+0,3)10^5$	0,9999	0,82
7.	3,55	0,32	(9,05)	$y = (61,6x+3,4)10^5$	0,9905	0,53
8.	0,67	0,08	(11,43)	$y = (281,9x-0,6)10^5$	0,9997	0,29
9.	1,01	0,18	(17,85)	$y = (24,5x+1,3)10^5$	0,9926	1,32
10.	0,03	0,00	(7,16)	$y = (125,4x+0,1)10^5$	0,9998	0,60
11.	1,25	0,41	(32,82)	$y = (22,2x+0,4)10^5$	0,9969	1,80
12.	1,11	0,13	(11,71)	$y = (21,1x+1,1)10^5$	0,9903	1,45
13.	3,03	0,21	(7,06)	$y = (78,4x+3,2)10^5$	0,9962	0,58
14.	0,77	0,05	(7,03)	$y = (31,8x+0,03)10^5$	0,9999	1,82
15.	1,11	0,17	(15,32)	$y = (31,7x+1,6)10^5$	0,9930	1,21
16.	6,54	0,47	(7,19)	$y = (113,1x+0,05)10^5$	0,9999	0,68
17.	0,46	0,08	(16,71)	$y = (30,4x+1,2)10^5$	0,9967	1,37
18.	1,30	0,19	(14,92)	$y = (118,2x-0,3)10^5$	0,9996	0,69
19.	1,08	0,11	(10,18)	$y = (74,1x-0,2)10^5$	0,9999	0,90
20.	0,17	0,03	(14,74)	$y = (6,3x+0,2)10^5$	0,9875	5,56
21.	1,76	0,23	(13,00)	$y = (29,6x+0,8)10^5$	0,9987	2,13
22.	0,08	0,10	(1,25)	$y = (28,3x+1,6)10^5$	0,9900	1,26

^a y – pole powierzchni piksu; peak area
x – stężenie; concentration

5.5. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI ZWIĄZKÓW FLAWONOIDOWYCH W ODMIANACH LUCERNY

Korzystając z opracowanej metody oznaczono zawartość poszczególnych glikozydów w 10 odmianach lucerny uprawianej w trzech kolejnych sezonach wegetacyjnych. Biorąc pod uwagę profile zawartości poszczególnych związków w różnych odmianach, latach i pokosach stwierdzono, że były one bardzo zbliżone (rys. 4, tab. 3). Dla wszystkich odmian dominującym związkiem był glukuronid trycyny – 16, którego maksymalne stężenie wynoszące 8,67 mg/g s.m. oznaczono w odmianie Magali. Natomiast w najmniejszych, śladowych ilościach występował dwuglukuronid chryzoeriolu – 22.

Sumaryczna zawartość flawonów w częściach nadziemnych odmian lucerny była bardzo wysoka i wahała się średnio za trzy lata w granicach 2,5-3,0% suchej masy (rys. 5). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic ($\alpha = 0,05$) w zawartości flawonów pomiędzy badanymi odmianami (tab. 4). Nagromadzanie flawonów w lucernie przebiega więc odmiennie niż saponin triterpenowych. Z badań Nowackiej-Zaborskiej (93) wynika bowiem, że te same odmiany znacznie różniły się zawartością biologicznie aktywnych saponin, których zawartość była zdecydowanie niższa niż flawonów i wahała się w granicach od 0,50 do 1,25% suchej masy.



Rys. 4. Zawartość poszczególnych flawonów oraz adenozyliny (A)
(średnia dla 10 odmian lucerny z trzech pokosów w trzech sezonach wegetacyjnych)
The concentration of individual flavonones and adenosine (A)
(average for 10 alfalfa varieties, three cuts in three vegetation seasons)

Tabela 3

Wieloczynnikowa analiza wariancji dla średniej zawartości flawonów i adenyzy (A) dla 10 odmian lucerny zbieranej w trzech pokosach, trzech sezonów wegetacyjnych

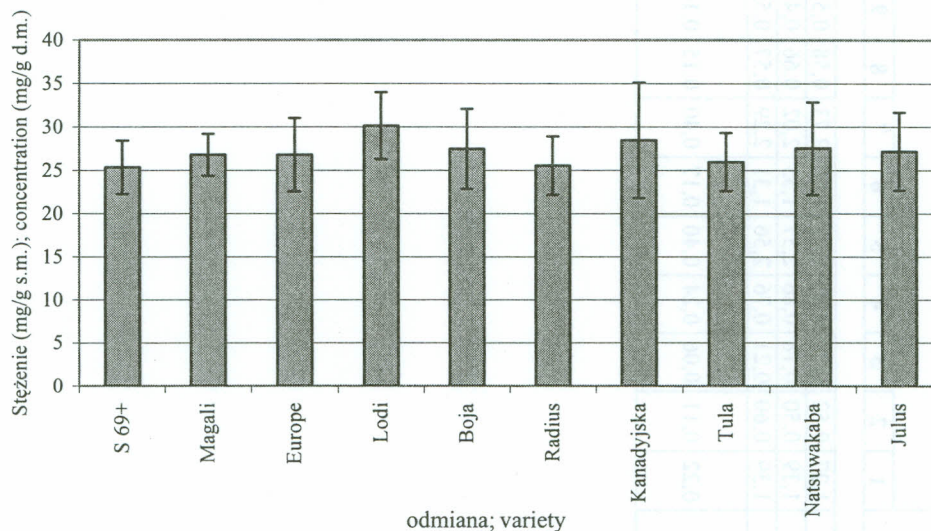
Analysis of variance for the average concentration of flavones and adenosine (A) in three cuts in each of three vegetation seasons

Odmiana Variety	Związek Compound																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14+15	16	17	18+19	20	21	22	A	
S 69+	1,34	0,53	0,18	0,89	2,71	1,17	2,00	0,55	0,47	0,48	1,42	0,77	1,22	2,23	4,33	0,43	2,46	0,29	1,83	0,03	1,89	
Radius	1,32	0,47	0,19	0,76	2,60	1,23	2,22	0,54	0,47	0,54	1,00	0,68	1,62	1,89	4,51	0,50	2,81	0,37	1,71	0,08	1,69	
Kanadyjska	1,55	0,81	0,17	0,75	2,91	1,35	2,32	0,68	0,61	0,63	1,36	0,89	1,51	2,21	5,15	0,49	2,79	0,42	1,79	0,07	2,47	
Tula	1,23	0,53	0,19	0,78	2,35	1,51	2,78	0,66	0,33	0,48	0,83	0,77	1,64	2,10	4,39	0,53	2,73	0,28	1,81	0,02	1,79	
Magali	1,16	0,37	0,18	0,82	2,40	1,43	2,48	0,63	0,39	0,35	1,05	0,80	1,33	2,42	5,23	0,57	2,76	0,54	1,87	0,00	1,91	
Europe	1,35	0,64	0,20	0,72	2,74	1,39	2,56	0,61	0,49	0,54	1,38	0,66	1,35	2,27	4,48	0,49	2,76	0,23	1,86	0,05	1,85	
Lodi	1,37	0,43	0,32	1,26	2,57	1,63	2,40	0,66	0,44	0,49	0,89	0,79	2,23	2,13	4,60	0,91	3,77	0,73	2,43	0,08	1,59	
Natsuwakaba	1,38	0,51	0,14	0,58	2,90	0,96	1,81	0,48	0,76	0,93	1,55	1,03	1,33	1,40	5,16	0,52	3,10	0,55	2,38	0,05	2,81	
Boja	1,36	0,60	0,21	0,93	2,48	1,63	2,45	0,71	0,42	0,43	1,05	0,75	1,63	3,08	4,29	0,49	2,68	0,26	1,97	0,05	1,71	
Julus	1,42	0,54	0,20	0,75	2,58	1,19	2,46	0,55	0,67	0,56	1,08	0,69	1,86	1,87	4,85	0,48	3,04	0,35	1,96	0,07	2,27	
Przedział ufności Confidence range	0,41	0,20	0,10	0,44	0,72	0,32	0,72	0,27	0,29	0,31	0,80	0,39	0,60	1,06	1,15	0,15	0,59	0,88	0,61	0,12	0,80	
Pokos; Cut																						
I	1,72	0,67	0,25	0,93	2,78	1,28	2,54	0,66	0,59	0,52	1,25	1,11	1,92	2,01	5,40	0,54	3,06	0,78	2,52	0,06	2,32	
II	1,28	0,50	0,19	0,80	2,62	1,41	2,39	0,57	0,52	0,46	1,23	0,68	1,47	2,26	4,44	0,55	2,87	0,27	1,86	0,06	1,87	
III	1,05	0,46	0,15	0,74	2,47	1,36	2,12	0,59	0,40	0,66	1,00	0,55	1,33	2,21	4,25	0,53	2,73	0,16	1,50	0,03	1,80	
Przedział ufności Confidence range	0,22	0,11	0,06	0,24	0,40	0,17	0,40	0,15	0,16	0,17	0,44	0,21	0,33	0,58	0,63	0,08	0,32	0,48	0,33	0,06	0,44	

Odmiana Variety	Związek Compound																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14+15	16	17	18+19	20	21	22	A
Rok; Year																					
1993	1,27	0,52	0,20	0,85	2,73	1,40	2,73	0,58	0,57	0,52	1,46	0,65	1,60	2,05	4,67	0,54	2,88	0,43	1,90	0,07	2,10
1994	1,39	0,50	0,18	0,86	2,57	1,33	2,02	0,66	0,41	0,56	1,82	0,55	1,50	2,48	4,71	0,55	2,79	0,14	2,01	0,06	1,58
1995	1,39	0,60	0,21	0,76	2,56	1,31	2,29	0,57	0,53	0,55	0,20	1,15	1,62	1,95	4,71	0,53	2,99	0,64	1,97	0,01	2,32
Przedział ufności Confidence range	0,22	0,11	0,06	0,24	0,40	0,17	0,40	0,15	0,16	0,17	0,44	0,21	0,33	0,58	0,63	0,08	0,32	0,48	0,33	0,06	0,44

W czasie trzyletniej uprawy lucerny obserwowano również zmiany całkowitej zawartości flawonów w kolejnych pokosach (statystycznie istotne różnice występowały między pokosem I a II i I a III). W każdym z badanych sezonów wegetacyjnych występowała taka sama tendencja zmian (nie stwierdzono istotnych różnic między latami uprawy); najwyższą zawartość flawonów odnotowano w I wiosennym pokosie, a znacznie mniejszą w pokosach II i III (rys. 6 i 7). W niektórych przypadkach różnice w zawartości pomiędzy I i III pokosem przekraczały 1% suchej masy. Jeśli porównać te wyniki do nagromadzenia saponin i tridesmozydu kwasu zanowego w tych samych odmianach, to w przypadku saponin trend był odwrotny. W pierwszym pokosie zawartość saponin zwykle była kilkakrotnie niższa niż w pokosach letnich, a w przypadku kwasu zanowego zawartość w okresie letnim, w porównaniu z wiosennym, zwiększyła się nawet 50-krotnie (93).

Różnice w dynamice nagromadzenia poszczególnych grup metabolitów wtórnych w lucernie w sezonie wegetacyjnym mogą wynikać z ich zróżnicowanej funkcji. W przypadku saponin triterpenowych, a w szczególności glikozydów kwasu zanowego, prawdopodobnie wskutek działania antyżywniowego, ich rola może polegać na zniechęcaniu roślinożerców do żerowania na lucernie w okresie wchodzenia w fazę generatywną (2, 3). W oddziaływaniach tych mogą uczestniczyć również flawony; obserwowano bowiem niewielkie zmiany w ich profilach spowodowane żerowaniem mszycy. Wydaje się, że, jak już dyskutowano powyżej, zasadnicza funkcja flawonów



Rys. 5. Sumaryczna zawartość flawonów
(średnia dla 10 odmian lucerny zbieranej w trzech pokosach, trzech sezonów wegetacyjnych)
The total concentration of flavones
(average for 10 alfalfa varieties three cuts in three vegetation seasons)

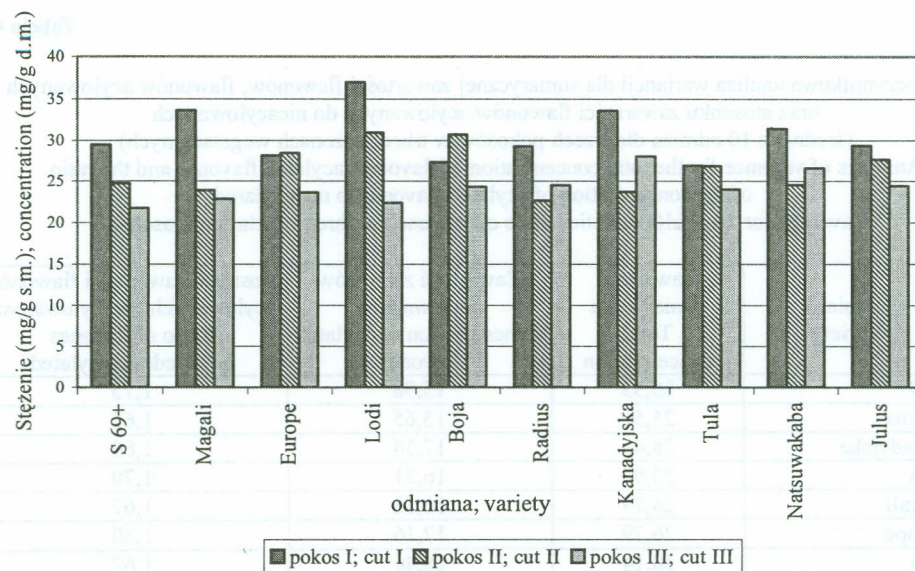
Tabela 4

Wieloczynnikowa analiza wariancji dla sumarycznej zawartości flawonów, flawonów acylowanych oraz stosunku zawartości flawonów acylowanych do nieacylowanych (średnia z 10 odmian dla trzech pokosów w trzech sezonach wegetacyjnych)
 Analysis of variance for the total concentration of flavones, acylated flavones and the ratio of the concentration of acylated flavones to nonacylated (average for 10 alfalfa varieties three cuts in each of three vegetation seasons)

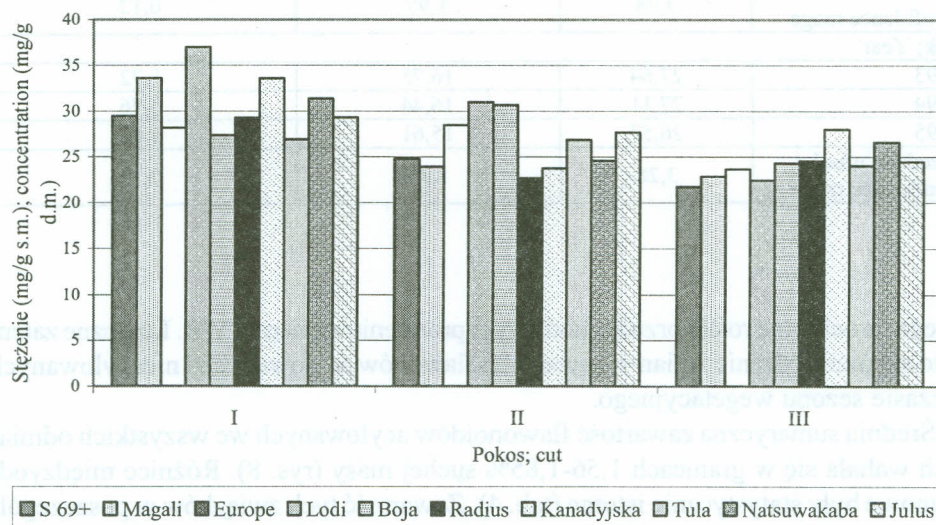
Odmiana Variety	Zawartość sumaryczna Total concentration	Zawartość związków acylowanych Concentration of acylated flavones	Stosunek zawartości flawonów acylowanych/nieacylowanych Ratio of flavones acylated/nonacylated
S 69+	25,33	15,98	1,75
Radius	25,51	15,65	1,62
Kanadyjska	28,45	17,34	1,60
Tula	25,94	16,21	1,70
Magali	26,79	16,52	1,67
Europe	26,79	17,16	1,80
Lodi	30,14	18,46	1,62
Natsuwakaba	27,52	17,33	1,74
Boja	27,46	17,42	1,77
Julus	27,16	16,75	1,61
Przedział ufności Confidence range	5,99	3,56	0,22
Pokos; Cut			
I	30,61	17,69	1,50
II	26,44	16,19	1,77
III	24,26	14,92	1,79
Przedział ufności Confidence range	3,28	1,95	0,12
Rok; Year			
1993	27,64	16,75	1,72
1994	27,11	16,44	1,76
1995	26,57	15,61	1,59
Przedział ufności Confidence range	3,28	1,95	0,12

polega na ochronie roślin przed szkodliwym promieniowaniem UV-B. Logiczne zatem stało się prześledzenie zmian w zawartości flawonów acylowanych i nieacylowanych w czasie sezonu wegetacyjnego.

Średnia sumaryczna zawartość flawonoidów acylowanych we wszystkich odmianach wahała się w granicach 1,56-1,85% suchej masy (rys. 8). Różnice międzyodmianowe były statystycznie istotne (tab. 4). Zawartość tych związków w poszczególnych sezonach wegetacyjnych nie różniła się istotnie, natomiast wyraźne różnice stwierdzono pomiędzy pokosem I i II oraz I i III (rys. 9). W poszczególnych odmianach stosunek zawartości flawonów acylowanych do nieacylowanych był średnio dla trzech sezonów wegetacyjnych prawie identyczny i wahał się w granicach 1,60-1,80 (tab.

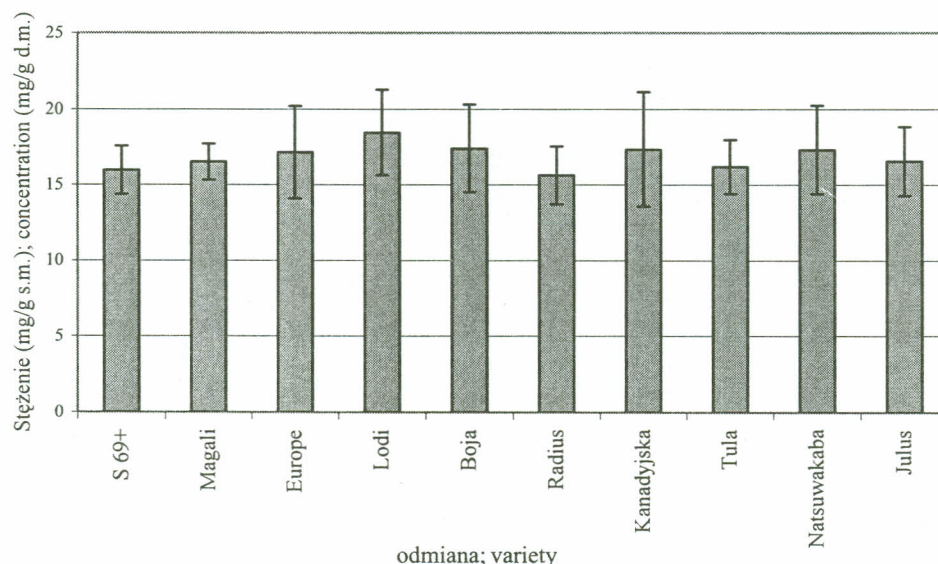


Rys. 6. Sumaryczna zawartość flawonów w pokosach
(średnia z trzech sezonów wegetacyjnych)
The total concentration of flavones for three cuts
(average for three vegetation seasons)

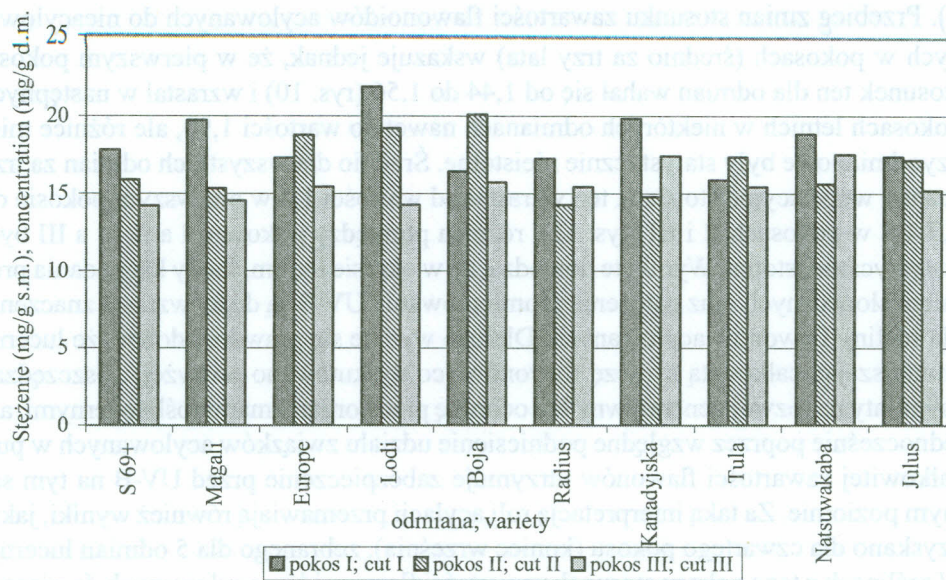


Rys. 7. Sumaryczna zawartość flawonów
(średnia z trzech sezonów wegetacyjnych)
The total concentration of flavones (average for three vegetation seasons)

4). Przebieg zmian stosunku zawartości flawonoidów acylowanych do nieacylowanych w pokosach (średnio za trzy lata) wskazuje jednak, że w pierwszym pokosie stosunek ten dla odmian wahał się od 1,44 do 1,56 (rys. 10) i wzrastał w następnych pokosach letnich w niektórych odmianach nawet do wartości 1,90, ale różnice międzyodmianowe były statystycznie nieistotne. Średnio dla wszystkich odmian za trzy sezony wegetacyjne stosunek ten wzrastał od wartości 1,5 w pierwszym pokosie do 1,7-1,8 w pokosach II i III (rys. 11); różnica pomiędzy pokosem I a II i I a III była statystycznie istotna. Wyniki te dowodzą, że w okresie letnim, kiedy kąt padania promieni słonecznych oraz natężenie promieniowania UV-B są duże, wzrasta znaczenie dla rośliny flawonów acylowanych. Dlatego wydaje się prawdopodobne, że lucerna zmniejszając całkowitą syntezę flawonów (co dyskutowano powyżej) „oszczędza” asymilaty na rozwój generatywny lub ochronę przed organizmami roślinożernymi, ale jednocześnie poprzez względne podniesienie udziału związków acylowanych w puli całkowitej zawartości flawonów utrzymuje zabezpieczenie przed UV-B na tym samym poziomie. Za taką interpretacją roli acylacji przemawiają również wyniki, jakie uzyskano dla czwartego pokosu (koniec września), zebranego dla 5 odmian lucerny. W roślinach z tego pokosu stosunek zawartości flawonoidów acylowanych do nieacylowanych zmniejszył się ponownie do poziomu pokosu pierwszego (maj); (rys. 12). Aby jednak w pełni udowodnić te hipotezy należałoby przeprowadzić badania w ściśle kontrolowanych warunkach, w których wszystkie czynniki środowiskowe byłyby iden-

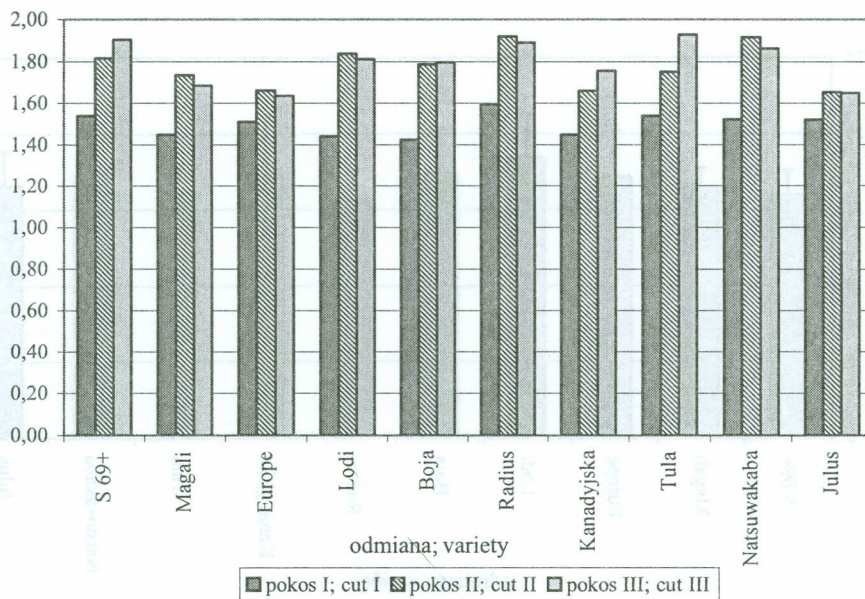


Rys. 8. Sumaryczna zawartość flawonów acylowanych w odmianach lucerny (średnia dla trzech pokosów w trzech sezonach wegetacyjnych)
The total concentration of acylated flavones in alfalfa varieties (average for three cuts in three vegetation seasons)



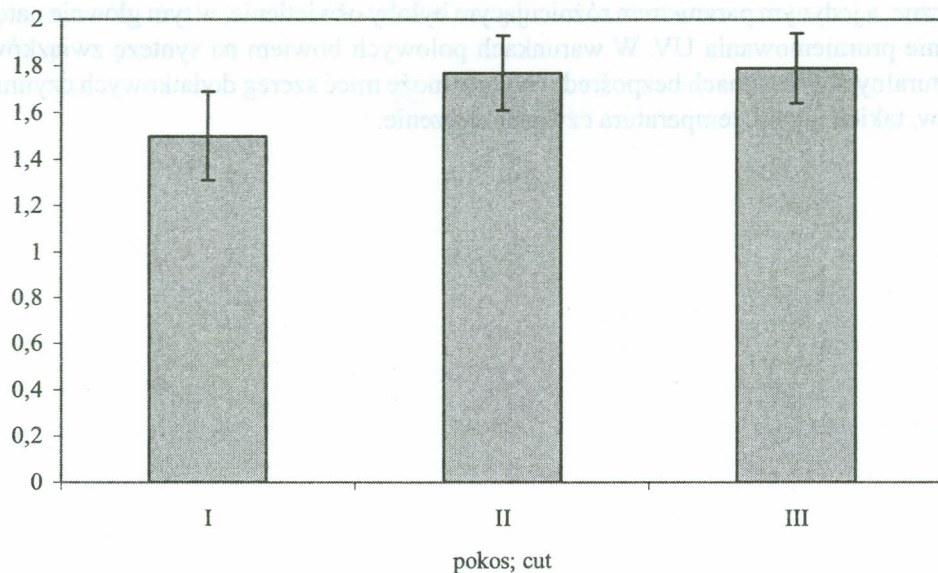
Rys. 9. Sumaryczna zawartość flawonów acylowanych w odmianach lucerny (średnia z trzech sezonów wegetacyjnych)

The total concentration of acylated flavones in alfalfa varieties (average for three vegetation seasons)

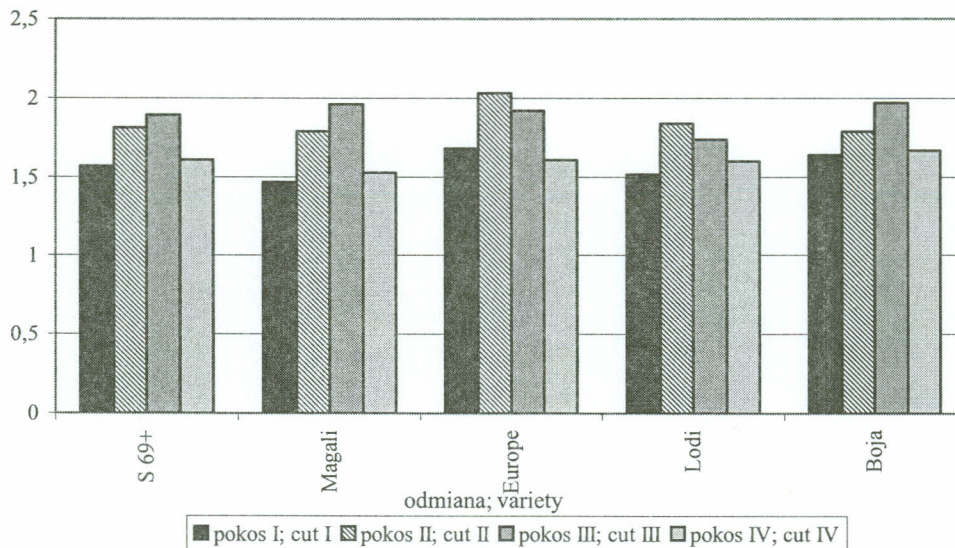


Rys. 10. Stosunek zawartości flawonów acylowanych do nieacylowanych w pokosach (średnia z trzech sezonów wegetacyjnych)

The ratio of the concentration of acylated to nonacylated flavones in the cuts (average for three vegetation seasons)



Rys. 11. Stosunek zawartości flawonów acylowanych do nieacylowanych w pokosach (średnia dla 10 odmian lucerny z trzech sezonów wegetacyjnych)
The ratio of the concentration of acylated to nonacylated flavonoids in the cuts (average for 10 alfalfa varieties in three vegetation seasons)



Rys. 12. Stosunek zawartości flawonów acylowanych do nieacylowanych w pokosach (średnia z sezonów wegetacyjnych 1993–1994)
The ratio of the concentration of acylated to nonacylated flavonoids in cuts for alfalfa varieties (average for vegetation seasons 1993–1994)

tyczne, a jedynym parametrem różnicującym byłoby oświetlenie, w tym głównie natężenie promieniowania UV. W warunkach polowych bowiem na syntezę związków naturalnych w roślinach bezpośredni wpływ może mieć szereg dodatkowych czynników, takich jak np. temperatura czy zachmurzenie.



Fig. 1. Stężenie związków flawonoidowych w roślinach lucerny w trzech lokalizacjach (I, II, III) w warunkach polowych (średnia trzech pomiarów w trzech lokalizacjach). The table of the concentration of flavonoid compounds in lucerne vegetation in three locations (I, II, III) in the field (average of three measurements in three locations).

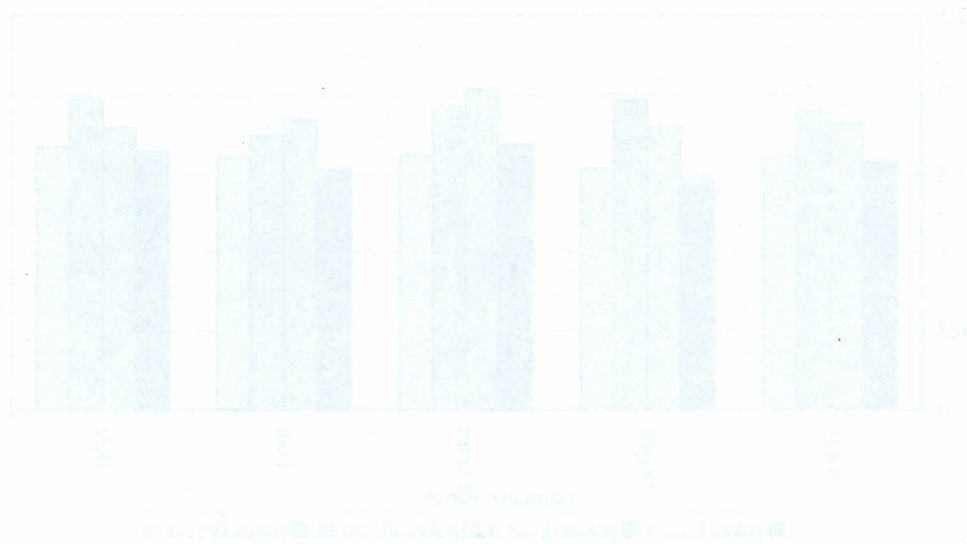


Fig. 2. Stężenie związków flawonoidowych w roślinach lucerny w pięciu lokalizacjach (I, II, III, IV, V) w warunkach polowych (średnia trzech pomiarów w trzech lokalizacjach). The table of the concentration of flavonoid compounds in lucerne vegetation in five locations (I, II, III, IV, V) in the field (average of three measurements in three locations).

6. WNIOSKI

1. Z części nadziemnych lucerny siewnej (*Medicago sativa* L.) wydzielono i doczyszczono 23 pojedyncze związki. Jeden ze związków zidentyfikowano jako adenozyne, natomiast przy użyciu metod spektralnych ustalono strukturę 22 flawonoidów będących glikozydami apigeniny, luteoliny, trycyny, metylotrycetyny i chryzoeriolu.

2. Jedynym składnikiem cukrowym, występującym we wszystkich wyodrębnionych związkach, był kwas glukuronowy (od 1 do 3 cząsteczek podstawionych w pozycjach 7 i 4' aglikonu). Glikozydy 13 flawonoidów były dodatkowo acylowane kwasem ferulowym, *p*-kumarowym i synapinowym.

3. Szesnaście z wyodrębnionych flawonoidów to związki nowe, nie wyizolowane dotychczas z żadnej rośliny i nie opisane w literaturze.

4. Widma absorpcyjne związków acylowanych w porównaniu ze związkami nieacylowanymi charakteryzowały się przesunięciem i/lub silnym wzmocnieniem absorbancji pasma I (320-330 nm), co przypuszczalnie może mieć znaczenie w ochronie rośliny przed tym zakresem promieniowania słonecznego; zagadnienie to wymaga dalszych badań dokumentujących.

5. Opracowano metodę wstępnego oczyszczania flawonoidów z ekstraktów roślinnych oraz metodę oznaczania flawonoidów w lucernie z zastosowaniem chromatografii cieczowej (HPLC).

6. Stwierdzono identyczne profile chromatograficzne związków fenolowych różnych odmian lucerny. Wyjątek stanowiła odmiana lucerny Artal, rosnąca w Portugalii, w której występowały różnice ilościowe w porównaniu z odmianami krajowymi. Może to sugerować, że warunki środowiska modyfikują tylko skład ilościowy flawonoidów lucerny.

7. Oznaczono zawartość sumy flawonoidów oraz poszczególnych glikozydów w 10 odmianach lucerny uprawianej w okolicy Puław (3 lata, 3 pokosy w każdym roku). Stwierdzono, że zawartość flawonoidów w lucernie jest wysoka i waha się w granicach 16-49 mg/g suchej masy.

8. Związkiem dominującym we wszystkich odmianach lucerny był glikozyd trycyny (**16**) z jedną cząsteczką kwasu glukuronowego w pozycji 4', a w śladowych ilościach występował dwuglukuronid chryzoeriolu.

9. Stosunek glikozydów acylowanych do nieacylowanych wahał się dla odmian w granicach 1,2-2,2, w stopniu nieistotnym.

10. Porównanie zawartości flawonoidów w pokosach lucerny wskazuje, że najwyższa ich zawartość występuje w pierwszym pokosie zbieranym wiosną.

7. LITERATURA

1. Ader P., Wessman A., Wolfram S.: Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Radical Biology & Medicine*, 2000, **28**: 1056-1067.
2. Agrell J., Anderson P., Oleszek W., Stochmal A., Agrell C.: Combined effects of elevated CO₂ and herbivore damage on alfalfa and cotton. *J. Chem. Ecol.*, 2004, **30**: 2309-2323.
3. Agrell J., Oleszek W., Stochmal A., Olsen M., Anderson P.: Herbivore induced responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J. Chem. Ecol.*, 2003, **29**: 303-319.
4. Andlauer W., Fürst P.: Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Res. Int.*, 2002, **35**: 171-176.
5. Andlauer W., Kolb J., Fürst P.: Absorption and metabolism of genistin in the isolated rat small intestine. *FEBS Letters*, 2000, **475**: 127-130.
6. Anonim: The use of alfalfa as a vegetable. *Science*, 1937, **30**: 2222.
7. Antongiovanni M., Bruni R.: Quality and utilization of perennial Lucerne as animal feed. *EUCARPIA „Breeding for Quality”*, Belgium, 1994, 107-122.
8. Bidlack W.R., Omaye S.T., Meskin M.S., Topham D.K.W.: Phytochemicals as bioactive agents. Technomic Publ. Co., Lancaster, USA, 2000, 1-270.
9. Bisby F.A., Buckingham J., Harborne J.B.: *Phytochemical Dictionary of Leguminosae*. Chapman and Hall, London, 1994.
10. Blaim H., Nowacki E.: Cyanogenesis in *Lotus* and *Trifolium* species. *Acta Agrob.*, 1979, **32(1)**: 19-26.
11. Block G., Patterson B., Subar A.: Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review on epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*, 1992, **18**: 1-29.
12. Bors W., Heller W., Michel C., Stettmaier K.: Flavonoids and polyphenols: chemistry and biology. In: *Handbook of antioxidants* (Cadenas E., Packer, L. ed.). New York, Marcel Dekker Inc., 1996, 409-468.
13. Bors W., Michel C., Stettmaier K.: Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors*, 1997, **6**: 399-402.
14. Bowey E., Adlercreutz H., Rowland I.: Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food and Chem. Toxic.*, 2003, **41**: 631-636.
15. Braun J., Tevini M.: Regulation of UV-protective pigment synthesis in the epidermal layer of rye seedlings (*Secale cereale* L. cv. Kustro). *Photochrom. Photobiol.*, 1993, **57**: 318-323.
16. Burda S., Górski P.M., Jurzysta M., Płoszyński M.: Zawartość formononetyny w wybranych polskich odmianach di- i tetraploidnej koniczyny czerwonej. *Acta Agrob.*, 1991, **44(1-2)**: 81-85.
17. Burda S., Oleszek W.: Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**: 2774-2779.
18. Burda S., Ścibior H., Bawolski S.: Wpływ terminu zbioru na zawartość izoflawonów w liściach koniczyny czerwonej. *Acta Agrob.*, 1997, **50(1-2)**: 87-92.
19. Cai Q., Rahn R.O., Zhang R.: Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Letters*, 1997, **119**: 99-107.
20. Castelman M.: *The healing herbs: The ultimate guide to the curative power of nature's medicines*. Emmaus, PA: Rodale Press, 1991.
21. Cheeke P.R., Kinzell J.H., Pedersen M.W.: Influence of saponins and alfalfa utilization by rats, rabbits and swine. *J. Anim. Sci.*, 1977, **51**: 621-625.
22. Cheeke P.R., Pedersen M.W., England D.C.: Response of rats and swine to alfalfa saponin. *Can. J. Anim. Sci.*, 1978, **58**: 783-785.
23. Cheeke P.R.: Biological properties and nutritional significance of legume saponins. In: *Leaf protein concentrates*. Red. Telek L, Graham HD, AVI Wesport, CT, USA, 1980, 396-415.

24. Cheeke P. R.: Natural toxicans in feeds, forages and poisonous plants. Interstate Publishers. Inc., Danville, USA, 1998.
25. Cheeke P. R.: Nutritional and physiological properties of saponins. *Nutr. Rep. Int.*, 1976, **13**: 315-324.
26. Chen F., Duran A. L., Blount J. W., Sumner L. W., Dixon R. A.: Profiling phenolic metabolites in transgenic alfalfa modified in lignin biosynthesis. *Phytochemistry*, 2003, **64**: 1013-1021.
27. Cole H. H., Boda J. M.: Continued progress toward controlling bloat. *J. Dairy Sci.*, 1960, **43**: 1585-1589.
28. Colodny L. R., Montgomery A., Houston M.: The role of esterified alfalfa saponins in reducing cholesterol. *J. Am. Nutraceutical Assoc.*, 2001, **3**: 6-15.
29. Colombo R., Lancas F. M., Yariwake J. H.: Determination of flavonoids in cultivated sugarcane leaves, bagasse, juice and transgenic sugarcane by liquid chromatography-UV detection. *J. Chromatography A*, 2006, **1103**: 118-124.
30. Commenges D., Scotet V., Renaud S., Jacqmin-Gadda H., Barberger-Gateau P., Dartiguez J. F.: Intake of flavonoids and risk of dementia. *Europ. J. Epidem.*, 2000, **16**: 357-363.
31. Cooper-Driver G. A., Bhattacharya M.: Role of phenolics in plant evolution. *Phytochemistry*, 1998, **49**: 1165-1174.
32. Dixit V. P., Joshi S. C.: Antiatherosclerotic effect of alfalfa meal ingestion in chicks: a biochemical evaluation. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 1985, **29**: 47-50.
33. Dougerthy F., Fløyen A., Tonnesen H. H.: Continued progress toward controlling bloat. *Vet. Res. Comm.*, 1991, **15**: 481-487.
34. Esper E., Barichello A. W., Chan E. K.: Synergistic lipid-lowering effects of alfalfa meal as an adjuvant to the partial ideal bypass operation. *Surgery*, 1987, **102**: 39-51.
35. Foti M., Piatteli M., Baratta M. T., Ruberto G.: Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in micellar system. Structure-activity relationship. *J. Agric. Food Chem.* 1996, **44**: 497-501.
36. Foundation for Innovation in Medicine. The nutraceuticals initiative: a proposal for economic and regulatory reform. *Food Technol.*, 1992, **6**: 77.
37. Gawęł E., Brzóška F.: Uprawa i użytkowanie lucerny oraz wykorzystanie w żywieniu zwierząt gospodarskich. Instrukcja Upowszechnieniowa 83/01. IUNG Puławy, 2001/2002.
38. George A. J.: Legal status and toxicity of saponins. *Food Cosmet. Toxicol.*, 1965, **3**: 85-87.
39. Gonzales R., Paul N. D., Percy K., Ambrose C. K., McLaughlin C. K., Barnes J. D., Areses M., Wellburn A. R.: Responses to ultraviolet-B radiation (280-315 nm) of pea (*Pisum sativum*) lines differing in leaf surface wax. *Physiol. Plant.*, 1996, **98**: 852-860.
40. Górski P. M., Górski G., Jurzysta M.: Wpływ saponin lucerny w diecie myszy na wzrost, narządy wewnętrzne oraz obraz morfologiczny krwi obwodowej. *Annales UMCS DD*, 1977/1978, **17**: 175-180.
41. Górski P. M., Jurzysta M., Płoszyński M.: Badanie jakości koncentratów białkowych z lucerny nieselekcjonowanej i niskosaponinowej. *Ann. UMCS*, 1986, **41**: 151-161.
42. Gray A. M., Flatt P. R.: Pancreatic and extra-pancreatic effects of the traditional anti-diabetic plant, *Medicago sativa* (lucerne). *Br. J. Nutr.*, 1997, **78**: 325-334.
43. Halawish F., Kronberg S., Rice J. A.: Rodent and ruminant digestive response to flavonoids in *Euphorbia esula*. *J. Chem. Ecol.*, 2003, **29**: 1073-1082.
44. Hall J. W., Majak W., Williams R. J., Howarth R. E.: Effect of daily weather conditions on bloat in cattle fed fresh alfalfa. *Can. J. Anim. Sci.*, 1984, **64**: 943-950.
45. Hall J. W., Majak W.: Effect of time grazing or cutting and feeding on incidence of alfalfa bloat in cattle. *Can. J. Anim. Sci.*, 1995, **73**: 271-273.
46. Hall J. W., Majak W.: Relationship of weather and plant factors to alfalfa bloat in autumn. *Can. J. Anim. Sci.*, 1991, **71**: 861-866.

47. Harborne J., Mabry T.: The flavonoids: Advances in research. Chapman and Hall, London, 1982.
48. Harborne J. B.: Ekologia biochemiczna. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 1997.
49. Hardy G.: Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning. Nutrition, 2000, **16**: 688-697.
50. Harrison M.: The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground association. Trends in Plant Sci., 1997, **2**: 54-60.
51. Havsteen B. H.: The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol. Ther., 2002, **96**: 67-202.
52. Hertog M. G. L., Feskens E. J., Kromhout D.: Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. The Lancet, 1997, **349**: 699-710.
53. Hertog M. G. L., Feskens E. J. M., Hollman P. C. H., Katan M. B., Kromhout D.: Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. The Lancet, 1993, **342**: 1007-1011.
54. Howarth R. E., McArthur J. M., Goplen B. P.: Bloat investigations: determination of soluble protein concentration in alfalfa. Crop Sci., 1973, **51**: 94-98.
55. <http://www.iherb.com/cholesterin.html> (dane internetowe)
56. <http://www.purilife.com/vitamins.htm> (dane internetowe)
57. Ignasiak T., Lesińska K.: Carotenoids in petals of perennial *Medicago* species. Biochem. Sys. Ecol., 1975, **2**: 177-180.
58. Ishige K., Schubert D., Sagara Y.: Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. Free Radical Biology & Medicine, 2001, **28**: 1056-1067.
59. Ivanova S. Z., Zapesochayaya G. G., Tyukavkina N. A., Medvedeva S. A.: O-acylated flavonoid glycosides of the needles of *Pinus sylvestris*. Chem. Nat. Comp., 1978, **14**: 335-336.
60. Jansen A. K. M., Gaba V., Greenberg B. M.: Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. Trends in Plant Sci., 1998, **3**: 131-135.
61. Jovanovic S. V., Steenken S., Tosic M., Marjanovitz B., Simic M. G.: Flavonoids as antioxidants. J. Am. Chem. Soc., 1994, **116**: 4846-4851.
62. Jungblut T. P., Schnitzler J. P., Heller W., Hertkorn N., Metzger J. W., Szymczak W., Sandermann H.: Structures of UV-B induced sunscreen pigments of the Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). Angew. Chem. Int. Ed Engl., 1995, **34**: 312-314.
63. Jurzysta M., Burda S., Żurek J., Płoszyński M.: Występowanie izoflawonów w krajowych gatunkach koniczyny. Acta Agrob., 1988, **41(1)**: 77-90.
64. Jurzysta M.: Badania nad saponinami krajowych populacji lucerny mieszańcowej (*Medicago media* Pers.). Wyd. IUNG Puławy, 1982, **R(170)**: 1-64.
65. Keli S. O., Hertog M. G. L., Feskens E. J. M., Kromhout D.: Dietary flavonoids, antioxidant vitamins and incidence of stroke. Arch. Intern. Med., 1996, **154**: 637-642.
66. Klita P. T., Mathison G. W., Fenton T. W., Hardin R. T.: Effect of alfalfa root saponins on digestive function in sheep. J. Anim. Sci., 1996, **74**: 1144-1156.
67. Lindhal J. L., Cook R. E., Davis R. E., Mackley W. D.: Preliminary investigations on the role of alfalfa saponins in ruminant bloat. Science, 1954, **119**: 157-158.
68. Lindhal J. L., Davis R. E., Tertell R. T.: Production of bloat and other symptoms in intact sheep by alfalfa saponin administration. U.S. Dept. Agric. Tech. Bull., 1957, 2-15.
69. Lois R., Buchanan B. B.: Severe sensitivity to ultraviolet radiation in an *Arabidopsis* mutant deficient in flavonoid accumulation. II. Mechanisms of UV-resistance in *Arabidopsis*. Planta, 1994, **194**: 504-509.
70. Lu C. D., Jorgensen N. A.: Alfalfa saponins affect site and extent of nutrient digestion in ruminants. J. Nutr., 1987, **117**: 919-927.
71. Lynn D.: The involvement of allelochemicals in the host selection of parasitic angiosperms. In: Thomson AC (ed.) The chemistry of allelopathy: biochemical interactions among plants. ACS Symp. Series, Washington DC, 1985, 55-61.

72. Madronich S.: Changes in ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *AMBIO*, 1995, **24**: 143-152.
73. Majak W., Hall J. W., McCaughey W. P.: Pasture management strategies for reducing the risk of legume bloat in cattle. *J. Anim. Sci.*, 1995, **73**: 1493-1498.
74. Majak W., Howarth R. E., Fesser A. C., Goplen B. P., Pedersen M. W.: Relationship between ruminant bloat and the composition of alfalfa herbage. II. Saponins. *Can. J. Anim. Sci.*, 1980, **60**: 699-708.
75. Malinow M. R., Connor W. E., McLaughlin P., Stafford C., Lin D. S., Livingstone A. L., Kohler G. O., McNulty W. P.: Cholesterol and bile acid balance in *Macca fascicularis*: Effect of alfalfa saponins. *J. Clin. Invest.*, 1981, **67**: 156-161.
76. Malinow M. R., McLaughlin P., Naito H. K., Lewis L. A., McNulty W. P.: Effect of alfalfa meal on shrinkage (regression) of atherosclerotic plaques during cholesterol feeding in monkeys. *Atherosclerosis*, 1978, **30**: 27-31.
77. Malinow M. R., McLaughlin P., Papworth L.: Effect of alfalfa saponins on intestinal cholesterol absorption in rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1977, **30**: 2061-2067.
78. Malinow M. R., McLaughlin P., Stafford C.: Alfalfa saponins and alfalfa seeds. Dietary effects in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 1980, **37**: 433-438.
79. Malinow M. R., McLaughlin P., Stafford C.: Comparative effects of alfalfa saponins and alfalfa fiber on cholesterol absorption in rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1979, **32**: 1810-1812.
80. Malinow M. R., McNulty W. P., McLaughlin P., Stafford C., Burns A. K., Livingstone A. L., Kohler G. O.: The toxicity of alfalfa saponins in rats. *Food Cosmet. Toxicol.*, 1981, **19**: 443-445.
81. Manach C., Morand C., Crespy V., Demigne C., Texier O., Regerat F., Remesy C.: Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Letters*, 1998, **426**: 331-336.
82. Markham K. R., Ryan K. G., Bloor S. J., Mitchell K. A.: An increase in the luteolin: apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV-B enhancement. *Phytochemistry*, 1998, **48**: 791-794.
83. Markham K. R., Tanner G. J., Caasi-Lit M., Whitecross M. I., Nayudu M., Mitchell K. A.: Possible protective role for 3'4'-dihydroxyflavones induced by enhanced UV-B in a UV-tolerant rice cultivars. *Phytochemistry*, 1988, **49**: 1913-1919.
84. Marten G. C., Jordan R. M., Ristau E. A.: Performance and adverse response of sheep during grazing of flour legumes. *Crop Sci.*, 1990, **30**: 860-866.
85. Mathney J. A., Buslig B. S.: *Flavonoids in the living system*. Plenum Press, New York, 1998.
86. Menrad K.: Market and marketing of functional food in Europe. *J. Food Engineering*, 2003, **56**: 181-188.
87. Middleton E., Kandaswami C.: The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: *The flavonoids: advances in research since 1986* (Harborne J. B., ed.). London UK, Chapman & Hall, 1994, 619-652.
88. Mol J., Grotewold E., Koes R.: How genes paint flowers and seeds. *Trends in Plant Sci.*, 1998, **3**: 212-217.
89. Molgaard J., von Schenck H., Olsson A. G.: Alfalfa seeds lower low density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B concentrations in patients with type II hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis*, 1987, **65**: 173-179.
90. Nartowska J.: Związki naturalne o właściwościach antyoksydacyjnych. *Farmacja Polska*, 2001, **57**: 741-745.
91. Newman H. A. I., Kummerow F. A., Scott H. M.: Dietary saponin, a factor which may reduce liver and serum cholesterol levels. *Poultry Sci.*, 1958, **37**: 42-44.
92. Nicholson R. L., Hammerschmidt R.: Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann. Rev. of Phytopathology*, 1992, **30**: 369-389.

93. Nowacka-Zaborska J. M.: Tridesmozyd kwasu zanowego w częściach nadziemnych lucerny siewnej (*Medicago sativa* L.) – oznaczenie, zawartość, toksyczność dla zwierząt. Praca doktorska, IUNG Puławy, 1997.
94. Nowacki E., Jurzysta M., Górski P.: Effect of availability of nitrogen on alkaloid synthesis in *Solanaceae*. Biul. Acad. Pol. Sci., 1975, **23(3)**: 219-225.
95. Nowacki E.: Alkaloidy traw – cecha taksonomiczna czy niebezpieczeństwo? Biul. Oceny Odmian, 1981, **9(1-2)**:13-14.
96. Oakenfull D., Sidhu G. S.: Could saponin be useful in treatment for hypercholesterolemia? Eur. J. Clin. Nutr., 1990, **44**: 79-88.
97. Oakenfull D.: Saponins in food. Food Chem., 1980, **6**: 19-40.
98. Oleszek W.: Solid-phase extraction-fractionation of alfalfa saponins. J. Sci. Food. Agric., 1988, **44**: 43-49.
99. Oleszek W., Jurzysta M., Płoszyński M., Colquhoun I. J., Price K. R., Fenwick G. R.: Zanhic acid tridesmoside and other dominant saponins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) aerial parts. J. Agric. Food Chem., 1992, **40**: 191-196.
100. Oleszek W., Nowacka J. M., Gee G. M., Wortley G. M., Johnson I. T.: Effects of some purified alfalfa (*Medicago sativa*) saponins on transmural potential difference in mammalian small intestine. J. Sci. Food Agric., 1994, **65**: 35-39.
101. Oleszek W., Stochmal A., Karolewski P., Simonet A. M., Macias F. A., Tava A.: Flavonoids from *Pinus silvestris* needles and their variation in trees of different origin grown nearly a century at the same area. Bioch. System. Ecol., 2002, **30/11**: 1011-1022.
102. Oleszek W., Stochmal A.: Triterpene saponins and flavonoids in the seeds of *Trifolium* species. Phytochemistry, 2002, **61**: 165-170.
103. Oleszek W.: Dietary phytochemicals and human health. Phytochem. Rev., 2002, **1**: 163-166.
104. Oleszek W.: Saponiny korzeni lucerny siewnej (*Medicago sativa* L.) – budowa chemiczna, aktywność biologiczna, oznaczenie. Wyd. IUNG Puławy, 1990, **R(273)**: 1-74.
105. Packer L., Hiramatsu M., Yoshikawa T.: Antioxidant food supplements in human health. Acad. Press, San Diego, USA, 1999, 1-511.
106. Peters N. K., Frost J. W., Long S. R.: A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Science, 1986, **233**: 977-980.
107. Peters N. K., Long S. R.: Alfalfa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Plant Physiol., 1988, **88**: 396-400.
108. Ransley J. K., Donnelly J. K., Read N. W.: Food and nutritional supplements, their role in health and disease. Springer, Berlin, 2001, 1-197.
109. Redmont J. W., Batley M., Djordjevic M. A., Innes R. W., Kuempel P. L., Rolfe B. G.: Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. Nature, 1986, **323**: 632-635.
110. Renaud S., Lorgeril M.: Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. The Lancet, 1992, **339**: 1523-1526.
111. Rice-Evans C.: Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity. In: Antioxidant food supplements in human health. (Packer, L., Hiramatsu, M., Yoshikawa, T. Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1999, 239-253.
112. Rice-Evans C.: Wake up to flavonoids. The Royal Society of Medicine Press Ltd., London, 2000, 1-74.
113. Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G.: Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology & Medicine, 1996, **20**: 933-956.
114. Rice-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G.: Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Sci., 1997, **2**: 152-159.
115. Romussi G., Bignardi G., Pizza C., DeTommasi N.: New and revised structures of acylated flavonoids from *Quercus suber* L. Arch. Pharmaz., 1991, **324**: 519-524.

116. Rozema J., van de Staa ij J., Bjorn L. O., Caldwell M.: UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trees*, 1997, **12**: 22-28.
117. Schnitzler J. P., Jungblut T. P., Feicht C., Kofferlein M., Langebartels C., Heller W., Sandermann Jr. H.: UV-B induction of flavonoid biosynthesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Trees*, 1997, **11**: 162-168.
118. Schnitzler J. P., Jungblut T. P., Heller W., Kofferlein M., Hutzler P., Heinzmann U., Schmelzer E., Ernst D., Langebartels C., Sandermann Jr. H.: Tissue localization of UV-B-screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine seedlings. *New Phytol.*, 1996, **132**: 247-258.
119. Scott G.: Antioxidants in science, technology, medicine and nutrition. Albion Chemical Science Series, Chichester, UK, 1997, 1-334.
120. Severson R. K., Nomura A. M., Grove J. S., Stemmermann G. N.: A perspective study of demographic, diet and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii. *Cancer Res.*, 1989, **49**: 1857-1860.
121. Sharma R. D.: An evaluation of hypocholesterolemic activity of some uncommon legumes. *Nutr. Res.*, 1987, **7**: 351-363.
122. Shirley B. W.: Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. *Trends in Plant Sci.*, 1996, **1**: 377-382.
123. Shirley B. W.: Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Sci. Res.*, 1998, **8**: 415-422.
124. Srinivasan S. R., Patton D., Radhakrishnamurthy B.: Lipid changes in atherosclerotic aortas of *Macaca fascicularis* after various regression regimens. *Atherosclerosis*, 1980, **37**: 591-601.
125. Stapleton A. E., Walbot V.: Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiol.*, 1994, **105**: 881-889.
126. Stochmal A., Oleszek W.: The changes of cyanogenic glucosides in white clover (*Trifolium repens* L.) by high performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.*, 1994, **5**: 271-272.
127. Stochmal A., Oleszek W.: Determination of cyanogenic glucosides in white clover (*Trifolium repens* L.) during the growing season. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **11**: 4333-4336.
128. Stochmal A., Oleszek W.: Wykorzystanie HPLC do określania sezonowych zmian ogólnej zawartości flawonoidów w koniczynie białej. Materiały X Konferencji Chromatograficznej Nauka-Przemysł: *Metody chromatograficzne w analizie żywności i ekotoksykologii*. Lublin, 1999, 32.
129. Stochmal A., Oleszek W., Leitz R. E., DiPaola P.: Saponin and flavonoid profiles of 47 alfalfa varieties of different origin. Book of Abstracts, Int. Conf. *Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants*, Pulawy, 1999, 31.
130. Stochmal A., Piacente S., Pizza C., De Riccardis F., Leitz R., Oleszek W.: Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 1. Apigenin and luteolin glycosides from aerial parts. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**: 753-758.
131. Stochmal A., Simonet A. M., Macias F. A., Oleszek W.: Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 2. Tricin and chrysoeriol glycosides from aerial parts. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**: 5310-5314.
132. Stochmal A., Simonet A. M., Macias F. A., Oliveira M. A., Abreu J. M., Nash R., Oleszek W.: Acylated apigenin glycosides from alfalfa (*Medicago sativa* L.) var. Artal. *Phytochemistry*, 2001, **57**: 1223-1226.
133. Story J. A., LePage S. L., Petro M. S., West L. G., Cassidy M. M.: Interactions of alfalfa sprout saponins with cholesterol in vitro and cholesterol-fed rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1984, **39**: 917-929.
134. Strid A., Chow W. S., Anderson J. M.: UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynth. Res.*, 1994, **39**: 475-489.
135. Swanston-Flatt S. K., Day C., Bailey C. J.: Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetologia*, 1990, **33**: 462-464.

136. Teramura A. H., Sullivan J. H.: Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. *Photosynth. Res.*, 1994, **39**: 463-473.
137. Tevini M., Braun J., Fieser G.: The protective function of the epidermal layer of rye seedlings against ultraviolet-B radiation. *Photochem. Photobiol.*, 1991, **53**: 329-333.
138. Tinland B.: The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends in Plant Sci.*, 1996, **1**: 178-184.
139. Trevisanto S. I., Kim Y. I.: Tea and health. *Nutr. Review*, 2000, **58**: 1-10.
140. Turunen M., Heller W., Stich S., Sandermann H., Sutinen M. L., Norokorpi Y.: The effects of UV exclusion on the soluble phenolics of young Scots pine seedlings in the subarctic. *Environ. Poll.*, 1999, **106**: 219-228.
141. Waller G. R., Nowacki E.: Alkaloids biology and metabolism in plants. Plenum Press, New York, 1978.
142. Wenk C.: Herbs and botanicals as feed additive in monogastric animals. *Asian-Austr. J. Anim. Sci.*, 2003, **16**: 282-289.
143. Yanaura S., Sakamoto M.: Effect of alfalfa meal on experimental hyperlipidemia. *Nippon Yakugaku Zasshi*, 1975, **71**: 387-393.
144. Zazdrozny A. M., Zapesochnaya G. G., Pervykh L. N., Shehavlinsky A. N., Kovtun L. S., Svanidze N. V.: Studies of *Aerva lanata* Juss. I. O-acylglycosides of flavonoids. *Khim. Pharm. Zh.*, 1986, **20**: 855-858.

FLAWONOIDY LUCERNY SIEWNEJ (*MEDICAGO SATIVA* L.) – BUDOWA CHEMICZNA, WŁAŚCIWOŚCI SPEKTRALNE, ZAWARTOŚĆ W ZALEŻNOŚCI OD ODMIANY I TERMINU ZBIORU

Streszczenie

Słowa kluczowe: *Medicago sativa*, flawony, acylacja, HPLC.

Wyodrębniono flawonoidy części nadziemnych lucerny (*Medicago sativa* L.) odmiany Boja i odmiany portugalskiej Artal, stosując chromatografię na kolumnach RP-18. Ich strukturę chemiczną określono za pomocą technik spektralnych (FABMS, ESI-HRMS, ^1H i ^{13}C NMR). Dwadzieścia dwa spośród dwudziestu trzech wyizolowanych pojedynczych związków to flawonoidy, jeden to adenozyna.

Wykazano, że flawonoidy lucerny są glikozydami pięciu aglikonów flawonów: apigeniny (5, 7, 4'-trihydroksy flawon) – glikozydy 1-3, 5-8, 10-12, luteoliny (5, 7, 3', 4'-tetrahydroksy flawon) – glikozydy 4 i 19, trycyny (5, 7, 4'-trihydroksy-3', 5'-dimetoksy flawon) – glikozydy 13, 15-17, 19, 21, chryzoeriolu (5, 7, 4'-trihydroksy-3'-metoksy flawon) – glikozydy 4, 8, 22 oraz 5, 7, 4', 5'-tetrahydroksy-3'-metoksyflawon (3'-metylotrycetyna) – glikozyd 20.

Zidentyfikowano następujące glikozydy flawonów:

apigeniny 7-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (8), **apigeniny** 4'-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (2), **apigeniny** 7-*O*-[β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (3), **apigeniny** 7-*O*-[β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-*O*- β -D-glukuronopiranozylo-4'-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (1), **apigeniny** 7-*O*-[2-*O*-feruloylo- β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (1), **apigeniny** 7-*O*-[2-*O*-feruloylo- β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (5), **apigeniny** 7-*O*-{2-*O*-feruloylo- β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (6), **apigeniny** 7-*O*-{2-*O*-*p*-kumaroylo-[β -D-glukuronopiranozylo (1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (7), **apigeniny** 4'-*O*-[2'-*O*-feruloylo-*O*- β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (10), **apigeniny** 7-*O*- β -D-glukuronopiranozylo-4'-*O*-[2'-*O*-feruloylo-*O*- β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (11), **apigeniny** 7-*O*- β -D-glukuronopiranozylo-4'-*O*-[2'-*O*-*p*-kumaroylo-*O*- β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (12), **luteoliny** 7-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (4), **luteoliny** 7-*O*-[2-feruloylo- β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukuronopiranozylo-4'-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (9), **3'-*O*-metylotrycetyny** 7-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (20), **chryzoeriolu** 7-*O*- β -D-glukuronopiranozylo-4'-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (22), **chryzoeriolu** 7-*O*-[2'-*O*-feruloylo- β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (18), **chryzoeriolu** 7-*O*-{2'-*O*-feruloylo-[β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (14), **trycyny** 7-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (16), **trycyny** 7-*O*-[β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (13), **trycyny** 7-*O*-[2'-*O*-synapoylo- β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (17), **trycyny** 7-*O*-[2'-*O*-feruloylo- β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (19), **trycyny** 7-*O*-[2'-*O*-*p*-kumaroylo- β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (21), **trycyny** 7-*O*-{2'-*O*-feruloylo-[β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-glukuronopiranozylo(1 \rightarrow 2)]-*O*- β -D-glukuronopiranozyd (15). Szesnaście spośród tych związków, tzn.: 1, 5-7, 9-12, 14, 15, 17-22, to substancje dotychczas niezidentyfikowane w świecie roślinnym.

Cechą charakterystyczną wszystkich wyizolowanych glikozydów było występowanie kwasu glukuronowego, jako jedyne go cukrowca w łańcuchu cukrowym. Łańcuchy te przyłączane

były do aglikonów w dwóch pozycjach: C-7 i C-4'. Niektóre z tych związków acylowane były kwasem ferulowym, kumarowym bądź synapinowym. Ich przyłączenie zawsze do kwasu glukuronowego było całkowicie wyjątkowe, gdyż dotychczasowe dane literaturowe jako miejsce acylacji wskazują wyłącznie glukozę. W większości przypadków acylacji ulegał łańcuch cukrowy podstawiony w pozycji C-7 aglikonu. Do wyjątków należały związki **10-12**, glikozydy apigeniny z acylowanym łańcuchem cukrowym w pozycji C-4'. Jednakże zawartość tych związków w częściach nadziemnych polskiej odmiany Boja była śladowa i substancje te izolowano z rosnącej w Portugalii odmiany Artal, w profilu flawonoidowym której związek **10** jest dominującym.

Badano wpływ acylacji kwasami hydroksycynamonowymi na spektra absorpcji flawonów lucerny. Pomiar widm absorpcyjnych wykonano w roztworach metanolowych, na diodowym spektrofotometrze firmy Hewlett Packard. Przesunięcie maksimum absorbancji oraz molowe współczynniki absorpcji zmierzono dla pasm I i II acylowanych oraz nieacylowanych flawonów. Obliczenia wykonano dla następujących grup związków (acylowane/nieacylowane): **A** – apigenina (glikozydy z łańcuchem cukrowym w pozycji C-7), **B** – apigenina (glikozydy z łańcuchem cukrowym w pozycji C-4'), **C** – apigenina (glikozydy z łańcuchem cukrowym w pozycji C-7 i C-4'), **D** – luteolina (glikozydy z łańcuchem cukrowym w pozycji C-7), **E** – chryzoeriol (glikozydy z łańcuchem cukrowym w pozycji C-7), **F** – trycyna (glikozydy z łańcuchem cukrowym w pozycji C-7).

Wykazano, że acylacja nie powodowała przesunięcia maksimum absorpcji widm pasma II (261-272 nm), jednakże 1,32–2,01-krotnie podwyższała wartość molowego współczynnika absorpcji pasma II związków acylowanych w stosunku do nieacylowanych. W przypadku pasma I obserwowano zarówno przesunięcia maksimum absorpcji, jak i zmiany molowych współczynników absorpcji. Dla glikozydów apigeniny (**A**, **B**, **C**) oraz chryzoeriolu (**E**) tylko nieznacznemu przesunięciu uległy maksima absorpcji pasma I (w granicach 312-334 nm), natomiast molowe współczynniki absorpcji wzrosły odpowiednio: 1,73-2,90 razy i 2,59 razy. Dla nieacylowanego glikozydu luteoliny (**D**) maksimum absorpcji pasma I wynosiło 342 nm i przesunęło się do 329 nm dla związku acylowanego; równocześnie molowy współczynnik absorpcji wzrósł 1,81 razy. Podobna sytuacja wystąpiła w przypadku glikozydów trycyny (**F**). Dwa nieacylowane glikozydy wykazywały maksima absorpcji przy 346 i 349 nm, podczas gdy po acylacji uległy one przesunięciu do 323 nm (acylacja kwasem kumarowym), 333-334 nm (acylacja kwasem ferulowym) oraz 340 nm (acylacja kwasem synapinowym); molowy współczynnik absorpcji glikozydów acylowanych w porównaniu do nieacylowanych wzrósł 1,58 razy.

Otrzymane wyniki wskazują, że acylacja flawonów lucerny powoduje przesunięcia maksimum absorpcji w paśmie I w stronę fal krótszych (około 320 nm) oraz znaczny wzrost molowych współczynników absorpcji pasm I i II. Fakt ten może sugerować, że acylacja kwasami aromatycznymi stanowi dla rośliny mechanizm ochronny aparatu fotosyntetycznego przed promieniowaniem UV-B. O istnieniu takiego mechanizmu mogą świadczyć wyniki badań uzyskane dla 10 odmian lucerny, uprawianych w ciągu trzech sezonów wegetacyjnych. Począwszy od wiosny do jesieni, dla każdej odmiany, sumaryczna zawartość flawonów malała, natomiast w tym samym czasie stosunek zawartości glikozydów acylowanych do nieacylowanych zwiększał się.

Opracowano metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej i zastosowano ją do oznaczenia zawartości dwudziestu dwóch flawonów w częściach nadziemnych dziesięciu odmian lucerny (*Medicago sativa* L.), uprawianych na polu przez trzy sezony wegetacyjne. Wykazano,

że dominującymi związkami były glikozydy trycyny i apigeniny (zawartość każdego około 40% sumy). Łączna zawartość glikozydów lucerny i chrysoeriolu nie przekraczała 10% sumy flawonów. Sumaryczna zawartość flawonów była wysoka, wahała się w granicach 16 do 49 mg/g suchej masy i nie różniła się w poszczególnych odmianach. Sukcesywnie malała zawartość flawonoidów w pokosach; największe stężenie odnotowano w pierwszym, wiosennym zbiorze lucerny. Jednocześnie stosunek flawonów acylowanych kwasami hydroksycynamonowymi do nieacylowanych wzrastał od 1,5 w pierwszym pokosie do 1,8 w drugim i trzecim pokosie. Te wyniki wskazują na rolę związków acylowanych w ochronie roślin przed promieniowaniem UV-B w czasie lata.

THE FLAVONOIDS OF ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA* L.) – CHEMICAL COMPOSITION,
SPECTRAL PROPERTIES, CONCENTRATION AS INFLUENCED BY VARIETY
AND HARVEST DATE

Summary

Key words: *Medicago sativa*, flavones, acylation, HPLC.

Flavonoids from alfalfa (*Medicago sativa* L. var. Boja) aerial parts have been separated by combination of low pressure chromatographic procedures on reverse phase (RP-18) columns. Their structures were fully characterized with spectral techniques (FABMS, ESI-HRMS, ¹H and ¹³C NMR). Twenty three individual compounds were isolated and twenty-two of them were identified as flavonoids and one compound; was confirmed to be adenosine (23).

It was shown that flavonoids of alfalfa are glycosides of five flavone aglycones: apigenin (5, 7, 4'-trihydroxy flavone) – glycosides **1-3**, **5-8**, **10-12**, luteolin (5, 7, 3', 4'-tetrahydroxy flavone) – glycosides **4** and **19**, tricetin (5, 7, 4'-trihydroxy-3', 5'-dimethoxy flavone) – glycosides **13**, **15-17**, **19**, **21**, chrysoeriol (5, 7, 4'-trihydroxy-3'-methoxy flavone) – glycosides **4**, **8**, **22**, and 5, 7, 4', 5'-tetrahydroxy-3'-methoxy flavone (3'-methyltricetin) – glycoside **20**.

The following flavone glycosides were identified:

apigenin 7-*O*-β-D-glucuronopyranoside (**8**), **apigenin** 4'-*O*-β-D-glucuronopyranoside (**2**), **apigenin** 7-*O*-[β-D-glucuronopyranosyl(1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranoside] (**3**), **apigenin** 7-*O*-[β-D-glucuronopyranosyl(1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranosyl]-4'-*O*-β-D-glucuronopyranoside (**1**), **apigenin** 7-*O*-[2-*O*-feruloyl-β-D-glucuronopyranosyl(1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranosyl]-4'-*O*-β-D-glucuronopyranoside (**5**), **apigenin** 7-*O*-{2-*O*-feruloyl-[β-D-glucuronopyranosyl(1→3)]-*O*-β-D-glucuronopyranosyl(1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranoside} (**6**), **apigenin** 7-*O*-{2-*O*-*p*-coumaroyl-[β-D-glucuronopyranosyl(1→3)]-*O*-β-D-glucuronopyranosyl(1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranoside} (**7**), **apigenin** 4'-*O*-[2'-*O*-feruloyl-*O*-β-D-glucuronopyranosyl(1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranoside (**10**), **apigenin** 7-*O*-β-D-glucuronopyranosyl-4'-*O*-[2'-*O*-feruloyl-*O*-β-D-glucuronopyranosyl(1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranoside (**11**), **apigenin** 7-*O*-β-D-glucuronopyranosyl-4'-*O*-[2'-*O*-coumaroyl-*O*-β-D-glucuronopyranosyl(1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranoside (**12**), **luteolin** 7-*O*-[2-*O*-feruloyl-β-D-glucuronopyranosyl(1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranosyl]-4'-*O*-β-D-glucuronopyranoside (**9**), **luteolin** 7-*O*-β-D-glucuronopyranoside (**4**), **3'-*O*-methyltricetin** 7-*O*-β-D-glucuronopyranosyl (**20**), **chrysoeriol** 7-*O*-β-D-glucuronopyranosyl-4'-*O*-β-D-glucuronopyranoside (**22**), **chrysoeriol** 7-*O*-[2'-*O*-feruloyl-β-D-glucuronopyranosyl(1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranosyl]-4'-*O*-β-D-glucuronopyranoside (**8**).

pyranoside] (**18**), **chrysoeriol** 7-*O*-{2'-*O*-feruloyl-[β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside (**14**), **tricin** 7-*O*-[2'-*O*-sinapoyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside] (**17**), **tricin** 7-*O*-[2'-*O*-feruloyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside] (**19**), **tricin** 7-*O*-[2'-*O*-*p*-coumaroyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside] (**21**), **tricin** 7-*O*-{2'-*O*-feruloyl-[β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside} (**15**), **tricin** 7-*O*- β -D-glucuronopyranoside (**16**) and **tricin** 7-*O*-[β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside] (**13**). Sixteen of these compounds, including **1**, **5-7**, **9-12**, **14**, **15**, **17-22**, have not been reported previously in the plant kingdom.

The characteristic feature of all isolated flavonoid glycosides was the fact that they all possess glucuronic acid as the only sugar unit present in sugar chain. These sugar chains were attached exclusively at two positions of aglycone, C-7 and C-4'. Some of them were acylated with ferulic, coumaric or sinapic acids and acylation took place at glucuronic acid, which was quite unique, as literature data published so far indicated that acylation takes place rather on glucose unit. In most of instances acylation of alfalfa flavonoids occurred on a sugar attached at C-7 position. Some exceptions were found for compounds **10-12**, which were apigenin glycosides acylated at sugar chain attached at C-4'. But concentration of compounds **10-12** in Polish variety Boja, was extremely low and these compounds were isolated from the variety Artal, grown in Portugal, in which flavonoid **10** was a dominant compound in HPLC profile.

The influence of acylation with hydroxycinnamic acids on absorption spectra of alfalfa flavones was studied. The spectra were measured with Hewlett Packard diode array spectrophotometer in MeOH. Shifts of the absorption maxima and a specific absorption coefficients were calculated both for band I and II in groups of acylated and nonacylated flavones. Calculations were performed for the following groups of compounds (acylated versus nonacylated): **A** – apigenin (glycosides with sugars at C-7), **B** – apigenin (C-4'), **C** – apigenin (C-7 and C-4'), **D** – luteolin (C-7), **E** – chrysoeriol (C-7) and **F** – triclin (C-7).

It was shown that in general there was no shift in band II (261-272 nm) as result of acylation. However, acylation increased 1,32-2,01 times the values of specific absorption coefficients of band II as compared to nonacylated compounds. For band I, the shifts in maximum of absorption and the changes in specific absorption coefficient were observed. For apigenin (**A**, **B**, **C**) and chrysoeriol (**E**) glycosides there was no substantial shift of absorption maximum in band I and this ranged between 312-334 nm depending on the compound and the structure of acylating acid. Their specific absorption coefficients increased by 1,73; 2,9; 2,18 and 2,59 fold, respectively. For nonacylated luteolin glycoside (**D**), the absorption maximum was at 342 nm and it shifted to 329 nm in acylated compound. The same time specific absorption coefficient increased 1,81 fold. Similar situation was registered with triclin glycosides (**F**). Two nonacylated glycosides had absorption maxima at 346 and 349 nm, while after acylation the maximum shifted to 323 nm (acylation with coumaric acid), 333-334 nm (acylation with ferulic acid) and 340 nm (acylation with synapic acid). Specific absorption coefficient increased 1,58 times in acylated flavones.

The obtained data indicate that acylation of flavones in alfalfa result in some cases in shift of band I towards the shorter wavelength (around 320 nm) and in substantial increase of specific absorption coefficients of both band I and II. This may suggest that acylation with aromatic acids can serve as mechanism of better protection of photosynthetic apparatus against UV-B. Such mechanism can be supported by presented findings that for 10 alfalfa varieties

grown for three consecutive years decrease of total concentration of flavones from spring to autumn was observed but the same time ratio of concentration of acylated/nonacylated flavones increased.

A high performance-liquid chromatographic (HPLC-DAD) method was developed and applied for determination of twenty two flavones in aerial parts of ten varieties of alfalfa (*Medicago sativa* L.) grown in a field for three consecutive years. It was shown that tricetin and apigenin glycosides (around 40% of total each) were the dominant flavonoids of alfalfa. Concentration of both luteolin and chrysoeriol glycosides did not exceed 10% of total. The total concentration of flavones was high and ranged between 16 and 49 mg/g d.m. and was not significantly different between varieties. Successive decrease in total flavonoid concentration was found between the cuts; concentration of the first spring cut was the highest and decreased for the second and third cut. At the same time the ratio of flavones acylated with hydroxycinnamic acids to non-acylated increased from 1,5 in the first to 1,8 for the second and third cuts. This finding may prove importance of acylated forms for protection of plant against UV-B during the summer time.

Wyniki badań prezentowane w niniejszej pracy uzyskano podczas realizacji projektu badawczego KBN: 5 P06A 007 18.

ANEKS

Wykaz prac wchodzących w skład rozprawy:

1. Stochmal A. (84%), Piacente S. (5%), Pizza C. (5%), Riccardis F. (2%), Leitz R. (2%), Oleszek W. (2%): Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 1. Apigenin and luteolin glycosides from aerial parts. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**: 753-758.
2. Stochmal A. (93%), Simonet A. M. (2,5%), Macias F. A. (2,5%), Oleszek W. (2%): Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 2. Tricin and chrysoeriol glycosides from aerial parts. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**: 5310-5314.
3. Stochmal A. (87%), Simonet A. M. (2,5%), Macias F. A. (2,5%), Oliveira M. A. (2%), Abreu J. M. (2%), Nash R. (2%), Oleszek W. (2%): Acylated apigenin glycosides from alfalfa (*Medicago sativa* L.) var. Artal. *Phytochemistry*, 2001, **8**: 1223-1226.

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Flavonoids. 1. Apigenin and Luteolin Glycosides from Aerial Parts

Anna Stochmal,*[†] Sonia Piacente,[‡] Cosimo Pizza,[‡] Francesco De Riccardis,[§] Rick Leitz,^{||} and Wieslaw Oleszek[†]

Department of Biochemistry, Institute of Soil Science and Plant Cultivation, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Pulawy, Poland, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, via Ponte Don Melillo, 84084 Fisciano, Salerno, Italy, Dipartimento di Chimica, via S. Allende, 84081 Baronissi, Salerno, Italy, and Nutrition Consultants International, Hemet, California 92544

Nine flavones and adenosine have been identified in aerial parts of alfalfa, and their structures were established by spectral (FABMS and NMR) techniques. Five of the identified compounds, including apigenin 7-*O*-[β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranosyl]-4'-*O*- β -D-glucuronopyranoside, apigenin 7-*O*-[2-*O*-feruloyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranosyl]-4'-*O*- β -D-glucuronopyranoside, apigenin 7-*O*-[2-*O*-feruloyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside, apigenin 7-*O*-[2-*O*-coumaroyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside, and luteolin 7-*O*-[2-*O*-feruloyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranosyl]-4'-*O*- β -D-glucuronopyranoside, have not been reported before in the plant kingdom. Additionally, five known compounds, including apigenin 7-*O*- β -D-glucuronopyranoside, apigenin 4'-*O*- β -D-glucuronopyranoside, apigenin 7-*O*-[β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside], luteolin 7-*O*- β -D-glucuronopyranoside, and adenosine, were identified.

Keywords: *Medicago sativa*; flavone glucuronides; acylated flavones; adenosine

INTRODUCTION

The literal translation of the word alfalfa is "father of all food", and for centuries it has been grown and used as feed for livestock in the form of green feed, hay, or pellets. Alfalfa sprouts are widely consumed by humans as a garnish, and leaf protein concentrates and the dehydrated plant are components of many nutritional supplement products. In addition to the nutritional components (protein and carbohydrates) that are important to its use as an animal feed or food supplements (1), alfalfa also contains numerous secondary metabolites that are of interest in human nutrition. These include saponins (2 and 3), flavonoids (4 and 5), tannins (6), coumestrol (7), carotenoids, and tocots (8 and 9). Characterizing the phytochemical composition of alfalfa can help to improve our understanding of its nutritional value.

A number of flavonoids from different, most often unspecified, parts of the alfalfa plant have been identified (5). However, in most cases, only the aglycons after hydrolysis were reported and in only a few instances were the full glycosidic forms structurally determined. Preliminary analyses using liquid chromatography (HPLC with diode array detection) of 47 varieties of alfalfa, selected from USDA stocks and grown in research plots in Southern California, showed that all

varieties had similar profiles of flavonoids. Their total concentration ranged from 0.24 to 0.78% in dry matter (10). On the basis of the absorption spectra of individual peaks in the chromatograms, these flavonoids were preliminarily classified as glycosides of apigenin, luteolin, and triclin. Because flavonoids have been recently recognized as active principles, showing structure-dependent physiological activity (antioxidant, cancer-preventing, and antimicrobial) (11), and their occurrence in food is highly desirable, we deemed it worthy to isolate and establish the structures of individual compounds occurring in the green aerial parts of alfalfa.

MATERIALS AND METHODS

Spectral Analysis. Melting points were uncorrected. The CD spectra were recorded in MeOH at 20 °C on a Jasco P-1020 spectropolarimeter. FABMS spectra were recorded on a MAT 95 (Finnigan) spectrometer with glycerol as a matrix and the ESI-HRMS were recorded on a Mariner Biospectrometry Workstation (Per Septive Biosystems). ¹H and ¹³C NMR spectra were measured on a Bruker DRX-600 spectrometer, and the UHNMR software package was used for NMR measurements in CD₃OD solutions. 2D experiments ¹H-¹H double quantum filtered-direct chemical shift correlation spectroscopy (DQF-COSY) (12), inverse detected ¹H-¹³C heteronuclear single quantum coherence (HSQC) (13), and heteronuclear multiple bond connectivity (HMBC) (14) were obtained using UX-NMR software. 1D-TOCSY (15) data were acquired using waveform generator-based GAUSS shaped pulses, with mixing times ranging from 100 to 120 ms and an MLEV-17 spin-lock field of 10 kHz preceded by a 2.5 ms trim pulse.

Plant Material. Alfalfa (*Medicago sativa* L. var. Boja) was grown at the experimental farm of the Institute of Soil Science and Plant Cultivation in Pulawy in 1997. Plants were collected at the beginning of flowering, freeze-dried, and finely powdered.

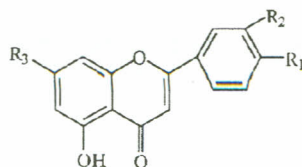
* Corresponding author. Tel: 48-81 8863421, ext. 205. Fax: 48-81 8864547. E-mail: asf@IUNG.Pulawy.pl.

[†] Department of Biochemistry, Institute of Soil Science and Plant Cultivation.

[‡] Dipartimento di Scienze Farmaceutiche.

[§] Dipartimento di Chimica.

^{||} Nutrition Consultants International.



	R ₁	R ₂	R ₃
1	-OGluA	-H	-OGluA(2→1) GluA
2	-OGluA	-H	-OH
3	-OH	-H	OGluA(2→1) GluA
4	-OH	-OH	-OGluA
6	-OGluA	-H	-OGluA(2→1) GluA-2-O-Feruloyl
7	-OH	-H	-OGluA(2→1) GluA-[GluA(1→3)]-2-O-Feruloyl
8	-OH	-H	-OGluA(2→1) GluA-[GluA(1→3)]-2-O- <i>p</i> -Coumaroyl
9	-OH	-H	-OGluA
10	-OGluA	-OH	-OGluA(2→1) GluA-2-O-Feruloyl

Figure 1. Chemical formulas of the identified compounds (GluA = glucuronic acid).

Isolation of Flavonoids. *Extraction.* Powdered material (1 kg) was pigmented and defatted in a Soxhlet extractor with chloroform. For extraction, 200 g of defatted material was refluxed for 1.5 h with 2 L of 70% aqueous MeOH. The extract was centrifuged and the supernatant was evaporated under reduced pressure to dryness (51.7 g).

Purification. The extract, suspended in water, was passed through a short column (3 cm × 5 cm, LiChroprep RP-18, 40–63 μm, Merck), preconditioned with water. The column was washed successively with water, 40% aqueous MeOH (5.1 g), and 70% MeOH (3.5 g). Using analytical HPLC as a check, the fraction washed out with 40% MeOH was used for flavonoid separation.

Flavonoid Separation. The 40% MeOH fraction was condensed nearly to dryness in vacuo, redissolved in distilled water, and loaded onto a preparative column (3 × 40 cm, LiChroprep RP-18, 25–40 μm, Merck). The column was washed with water and then with increasing concentrations of MeOH in water (5% increments from 0 to 100% MeOH). Fractions of 10 mL were collected with a fraction collector. Fractions were analyzed with TLC (DC-Alufolien Cellulose, Merck) developed in 15% acetic acid (OHAc) and observed under long wavelength UV (366 nm) illumination. Fractions showing similar TLC patterns were further analyzed by HPLC (Waters with 996 PAD detector, 616 Pump and Millennium software) using an isocratic solvent system (AcN-1% H_3PO_4) with concentration of acetonitrile (AcN) dependent on the specific fraction. Fractions possessing one compound were combined and evaporated to dryness. Fractions containing more than one compound were further separated/purified on a stainless Vertex column (0.8 × 25 cm, Eurospher 100, RP-18, 10 μm, Säulenteknik) using an isocratic system (AcN-1% H_3PO_4) optimized for each fraction based on the analytical separation. Separation was monitored with a UV detector. This yielded several individual compounds as shown in Figure 1.

1 (42.4 mg); Amorphous yellow powder; Mp 182–183 °C (with browning); $[\alpha]_D^{20}$ -50.8° (50% MeOH, *c* 0.05). HRMS m/z 797.1387. Calcd for $C_{33}H_{33}O_{23}$ (M)⁻. 797.1407. FABMS (negative ion mode) m/z 797 [M-H]⁻, 621 [M-GlcA-H]⁻, 269 [M-3GlcA-H]⁻, (positive ion mode) 799 [M+H]⁺, 623 [M-GlcA+H]⁺. UV λ_{max} (nm) (MeOH) 266, 323. ¹H NMR δ : 7.81 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-2', H-6'), 7.15 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-3', H-5'), 6.77 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-8), 6.62 (1H, s, H-3), 6.45 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-6), 5.39 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1GluA₁), 5.26 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1GluA₃) 4.74 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1GluA₂). For ¹³C NMR data see Table 1.

2 (4.9 mg); (C₂₁H₁₈O₁₁). FABMS (negative ion mode) m/z 445 [M-H]⁻, 269 [M-H-GlcA]⁻. UV, λ_{max} (nm) (MeOH) 266, 318. ¹H NMR δ : 7.96 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, H-2', H-6'), 7.24 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, H-3', H-5'), 6.82 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-8), 6.72

(1H, s, H-3), 6.49 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-6), 5.18 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-1GluA), 4.14 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-5 GluA), 3.67 (1H, dd, *J* = 9.5 and 9.5 Hz, H-4 GluA), 3.58 (1H, dd, *J* = 7.5 and 9.5 Hz, H-2 GluA) 3.58 (1H, dd, *J* = 9.5 and 9.5 Hz, H-3 GluA). For ¹³C NMR data see Table 1.

3 (5 mg); (C₂₇H₂₆O₁₇). FABMS (negative ion mode) m/z 621 [M-H]⁻, 445 [M-H-GluA]⁻, 269 [M-H-2GluA]. UV, λ_{max} (nm) (MeOH) 266, 337. ¹H NMR δ 7.92 (2H, *J* = 8.3 Hz, H-2', H-6'), 6.96 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, H-3', H-5'), 6.82 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-8), 6.65 (1H, s, H-3), 6.50 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-6), 5.44 (1H, d, *J* = 6.5 Hz, H-1 GluA₁), 4.71 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1 GluA₂). For ¹³C NMR data see Table 1.

4 (31.5 mg); (C₂₁H₁₈O₁₂). FABMS (negative ion mode) m/z 461 [M-H]⁻, 285 [M-H-GluA]⁻. UV, λ_{max} (nm) (MeOH) 252, 347. ¹H NMR δ 7.44 (1H, dd, *J* = 1.4 and 8.3 Hz, H-6'), 7.43 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, H-2'), 6.93 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-5'), 6.81 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-8), 6.67 (1H, s, H-3), 6.52 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-6), 5.21 (1H, d, *J* = 7.0 Hz, H-1 GluA), 4.13 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-5 GluA), 3.66 (1H, *J* = 9.5 and 9.5 Hz, H-4 GluA), 3.58 (1H, dd, *J* = 7.0 and 9.5 Hz, H-2 GluA), 3.58 (1H, *J* = 9.5 and 9.5 Hz, H-3 GluA). For ¹³C NMR data see Table 1.

5 (5.9 mg); FABMS (positive ion mode) m/z 133 [C₅O₄H₃]⁺, 136 [C₅N₅H₆]⁺. UV, λ_{max} (nm) (MeOH) 248, 271, 328. For ¹³C NMR data see Table 1.

6 (12.2 mg); Amorphous yellow powder; Mp 205–206 °C; $[\alpha]_D^{20}$ -13.8° (MeOH, *c* 0.1). HRMS m/z 973.1935 [Calcd for C₄₃H₄₁O₂₆ (M)⁻, 973.1881]. FABMS (negative ion mode) m/z 973 [M-H]⁻, 797 [M-H-ferulic acid]⁻, 445 [M-H-ferulic acid-2GluA]⁻, 269 [M-H-ferulic acid-3GluA]⁻. UV, λ_{max} (nm) (MeOH) 271, 323. ¹H NMR δ 7.74 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H- β ferulic acid), 7.74 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-2', H-6'), 7.14 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, H-2 ferulic acid), 7.10 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-3', H-5'), 7.04 (1H, dd, *J* = 1.7 and 8.3 Hz, H-6 ferulic acid), 6.78 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-5 ferulic acid), 6.72 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-8), 6.56 (1H, s, H-3), 6.40 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-6), 6.38 (1H, d, *J* = 15.9 Hz, H- α ferulic acid), 5.35 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1GluA₁), 5.23 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1GluA₃) 5.05 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-1GluA₂), 4.88 (1H, dd, *J* = 7.5 and 9.5 Hz, H-2GluA₂), 3.83 (OC₂H₃). For ¹³C NMR data see Table 1.

7 (10 mg); Amorphous yellow powder; Mp 210–211 °C; $[\alpha]_D^{20}$ -50.8° (MeOH, *c* 0.1). HRMS m/z 973.1940 [Calcd for C₄₃H₄₁O₂₆ (M)⁻, 973.1881]. FABMS (negative ion mode) m/z 973 [M-H]⁻, 797 [M-H-ferulic acid]⁻, 445 [M-H-ferulic acid-2GluA]⁻, 269 [M-H-ferulic acid-3GluA]⁻. UV, λ_{max} (nm) (MeOH) 271, 323. ¹H NMR δ 7.88 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-2', H-6'), 7.57 (1H, d, *J* = 16 Hz, H- β ferulic acid), 7.11 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-2 ferulic acid), 7.00 (1H, d, *J* = 8.0 and 1.2 Hz, H-6 ferulic acid), 6.96 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-3', H-5'), 6.75 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, H-5 ferulic acid), 6.74 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-8), 6.60 (1H, s, H-3), 6.48 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-6), 6.33 (1H, d, *J* = 16 Hz,

Table 1. ^{13}C NMR Data of Compounds (1–10) in CD_3OD^a

C	δ									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Aglycons									
2	166.1	166.0	166.9	166.9	153.7	165.8	166.6	166.7	166.8	166.7
3	104.5	105.2	105.5	104.2		104.8	103.8	103.9	104.2	105.7
4	183.9	184.1	184.2	184.1	152.4	183.9	184.3	184.3	184.1	184.0
5	162.7	162.9	162.9	162.9	118.4	162.7	162.0	163.3	162.9	162.8
6	101.8	101.6	100.9	101.1	155.3	101.3	100.4	100.8	101.2	101.4
7	164.3	164.5	164.1	164.5		164.3	163.8	164.0	164.5	164.3
8	95.3	96.1	96.2	96.0	138.6	95.8	96.2	95.5	96.1	96.1
9	158.7	158.9	159.0	158.9		158.7	158.7	158.8	158.9	158.9
10	107.1	107.0	107.2	107.2		107.1	106.9	106.9	107.3	107.4
1'	125.8	126.2	123.2	123.5	90.3	125.6	123.0	123.0	123.1	126.7
2'	129.2	129.4	129.7	114.3	72.3	129.2	129.7	129.7	129.7	115.1
3'	117.2	118.1	117.1	147.1	75.6	117.7	117.0	116.7	117.1	148.0
4'	161.2	161.8	162.9	151.2	87.4	161.2	162.7	162.8	162.9	149.7
5'	117.2	118.1	117.1	116.8	63.2	117.7	117.0	116.7	117.1	117.7
6'	129.2	129.4	129.7	120.5		129.2	129.7	129.7	129.7	120.8
	Sugars									
1''	99.3		100.0	101.5		99.3	98.9	99.2	101.4	99.2
2''	83.7		84.1	74.4		83.4	82.2	82.4	74.5	82.9
3''	75.7		76.3	77.2		75.8	75.8	76.0	77.2	75.4
4''	72.4		72.4	72.8		72.9	72.6	72.4	72.9	72.6
5''	76.1		76.7	76.8		76.0	76.0	75.9	76.7	75.9
6''	172.0		172.3	172.0		172.0	171.9	172.0	172.3	172.1
1'''	104.3		104.1			103.0	101.9	102.1		103.1
2'''	74.5		75.5			75.3	73.3	73.5		75.2
3'''	77.6		77.2			75.8	83.6	83.8		75.8
4'''	72.0		73.3			73.4	71.6	71.6		73.8
5'''	76.0		76.8			76.0	75.8	76.0		76.3
6'''	172.0		172.3			172.0	171.8	172.0		172.0
1''''	101.0	101.3				101.0	105.0	104.8		101.2
2''''	74.5	74.5				74.4	73.8	73.9		74.3
3''''	77.0	77.3				77.1	76.9	77.0		77.3
4''''	72.6	72.9				72.9	72.9	72.7		72.6
5''''	76.2	76.6				76.5	75.7	75.8		76.4
6''''	172.0	172.1				172.0	172.3	172.7		172.0
	Phenolic acid									
1						127.8	127.6	127.1		127.0
2						111.7	111.3	131.2		111.8
3						149.5	149.4	117.1		149.1
4						150.5	150.4	161.1		150.4
5						116.4	116.6	131.2		116.6
6						124.1	124.3	117.1		124.2
α						115.5	115.3	115.6		115.5
β						147.0	147.0	146.8		146.9
C=O						168.8	168.5	168.8		168.6
OMe						56.4	56.3			56.4

^a Assignments confirmed by HSQC and HMBC experiments.

H- α ferulic acid), 5.42 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1 GluA₁), 5.12 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1 GluA₂), 5.10 (1H, dd, $J = 7.5$ and 9.0 Hz, H-2 GluA₂), 4.49 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1 GluA₃), 4.10 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-5 GluA₁), 4.00 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-5 GluA₂), 3.99 (dd, $J = 9.5$ and 9.5 Hz, H-3 GluA₂), 3.86 (d, $J = 9.5$ Hz, H-5 GluA₃), 3.83 (OC_H), 3.75 (1H, dd, $J = 7.5$ and 9.5 Hz, H-2 GluA₁), 3.75 (1H, dd, $J = 9.5$ and 9.5 Hz, H-4 GluA₂), 3.70 (1H, dd, $J = 9.5$ and 9.5 Hz, H-3 GluA₁), 3.65 (1H, dd, $J = 9.5$ and 9.5 Hz, H-4 GluA₁), 3.50 (1H, dd, $J = 9.5$ and 9.5 Hz, H-4 GluA₃), 3.33 (1H, dd, $J = 9.5$ and 9.5 Hz, H-3 GluA₃), 3.26 (1H, dd, $J = 7.5$ and 9.0 Hz, H-2 GluA₃). For ^{13}C NMR data see Table 1.

8 (36 mg); Amorphous yellow powder; Mp 203–204 °C; $[\alpha]_D^{20} -61.0^\circ$ (MeOH, c 0.1). HRMS m/z : 943.1755 [Calcd for C₄₂H₃₉O₂₅ (M)⁻, 943.1775]. FABMS (negative ion mode) m/z : 943 [M-H]⁻, 797 [M-H-coumaric acid]⁻, 445 [M-H-coumaric acid-2GluA]⁻, 269 [M-H-coumaric acid-3GluA]⁻. UV, λ_{max} (nm) (MeOH) 271, 323. ^1H NMR δ 7.89 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', H-6'), 7.60 (1H, d, $J = 16$ Hz, H- β *p*-coumaric acid), 7.42 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2, H-6, *p*-coumaric acid), 6.95 (2H, d, $J = 7.5$ Hz, H-3', H-5'), 6.76 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-3, H-5 *p*-coumaric acid), 6.76 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-8), 6.62 (1H, s, H-3), 6.47 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-6), 6.34 (1H, d, $J = 16$ Hz, H- α *p*-coumaric acid), 5.41 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1 GluA₁), 5.11

(1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1 GluA₂), 5.09 (1H, dd, $J = 7.5$ and 9.5 Hz, H-2 GluA₂), 4.50 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-1 GluA₁), 4.08 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5 GluA₁), 3.99 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5 GluA₂), 3.99 (1H, dd, $J = 9.5$ and 9.5 Hz, H-3 GluA₂), 3.85 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-5 GluA₃), 3.75 (1H, dd, $J = 7.5$ and 9.5 Hz, H-2 GluA₁), 3.75 (1H, dd, $J = 9.5$ and 9.5 Hz, H-4 GluA₂), 3.68 (1H, dd, $J = 9.5$ and 9.5 Hz, H-3 GluA₁), 3.64 (1H, dd, $J = 9.5$ and 9.5 Hz, H-4 GluA₁), 3.50 (1H, dd, $J = 9.5$ and 9.5 Hz, H-4 GluA₃), 3.33 (1H, dd, $J = 9.5$ and 9.5 Hz, H-3 GluA₃), 3.24 (1H, dd, $J = 7.5$ and 9.5 Hz, H-2 GluA₃). For ^{13}C NMR data see Table 1.

9 (25 mg); (C₂₁H₁₈O₁₁). FABMS (negative ion mode) m/z : 445 [M-H]⁻, 269 [M-H-GluA]⁻, (positive ion mode) 447 [M+H]⁺, 271 [M+H-GluA]⁺. UV, λ_{max} (nm) (MeOH) 266, 337. ^1H NMR δ 7.88 (2H, $J = 8.3$ Hz, H-2', H-6'), 6.96 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, H-3', H-5'), 6.82 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-8), 6.66 (1H, s, H-3), 6.50 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-6), 5.23 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1 GluA), 4.15 (1H, $J = 9.5$ Hz, H-5 GluA), 3.67 (1H, $J = 9.5$ and 9.5 Hz, H-4 GluA), 3.59 (1H, dd, $J = 7.0$ and 9.5 Hz, H-2 GluA), 3.59 (1H, dd, $J = 9.5$ and 9.5 Hz, H-3 GluA). For ^{13}C NMR data see Table 1.

10 (2 mg); Amorphous yellow powder; Mp 214–215 °C (with browning); $[\alpha]_D^{20} -38.4^\circ$ (MeOH, c 0.1). HRMS m/z : 989.1860 [Calcd for C₄₃H₄₁O₂₇ (M)⁻, 989.1830]. FABMS (negative ion

mode) m/z 989 [M-H]⁻, 813 [M-H-ferulic acid]⁻, 461 [M-H-ferulic acid-2GluA]⁻, 285 [M-H-ferulic acid-3GluA]⁻. UV, λ_{\max} (nm) (MeOH) 247, 328. ¹H NMR δ 7.64 (1H, d, J = 16.0 Hz, H-6'), 7.46 (1H, d, J = 1.5 Hz, H-2'), 7.25 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5'), 7.18 (1H, d, J = 1.7 Hz, H-2 ferulic acid), 7.08 (1H, dd, J = 1.7 and 8.2 Hz, H-6 ferulic acid), 6.84 (1H, d, J = 1.2 Hz, H-8), 6.82 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-5 ferulic acid), 6.69 (1H, s, H-3), 6.54 (1H, d, J = 1.2 Hz, H-6), 6.39 (1H, d, J = 16 Hz, H- α ferulic acid), 5.26 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1 GluA₁), 5.23 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1 GluA₃), 5.18 (1H, d, J = 7.5 Hz, H-1 GluA₂), 4.89 (1H, dd, J = 7.5 and 9.5 Hz, H-2 GluA₂), 3.91 (OMe). For ¹³C NMR data see Table 1.

RESULTS AND DISCUSSION

Analysis of the flavonoid profile obtained from analytical liquid chromatography of the methanol extract of the aerial green parts of alfalfa using photodiode array detection showed the presence of a number of flavonoid compounds. Nine of these compounds showed absorption spectra characteristic for apigenin and luteolin derivatives (16). Separation of the extracts by low-pressure liquid chromatography, followed by purification of fractions on a semipreparative C18 column, afforded several single compounds for which structures have been determined by spectral analyses (FABMS, NMR).

Thus, FAB mass spectrometry of **9** gave the molecular ion peak at m/z 445 and a second peak at 269 corresponding to the loss of uronic acid from the parent molecule. The ¹³C NMR spectrum showed the presence of 21 carbons, 15 of which corresponded to an aglycon molecule with chemical shifts consistent with those obtained for apigenin (16 and 17). Similarly, in the ¹H NMR spectrum, six proton signals in the range of 6.50–7.88 ppm corresponded to the aglycon part of the molecule. The remaining five proton signals in the region of 3.59–5.23 ppm and six carbon signals (Table 1) corresponded to a glucuronic acid molecule (17). The position of the sugar was confirmed by HMBC spectra; cross-peaks were observed between H-1 of the sugar (δ 5.23) and C-7 of the aglycon (δ 164.5). Thus, the structure of **9** was established as apigenin 7-*O*- β -D-glucuronopyranoside.

Compound **2** had mass spectral characteristics identical to those of flavonoid **9**. Its UV spectrum, however, showed a shift in band I of the absorption spectra from 337 (in **9**) to 318 nm indicating substitution occurring in ring B of the aglycon. The ¹³C NMR spectrum of the aglycon portion of **2** was similar to that registered for **9** with some differences for the values of ring B (Table 1). The HMBC correlation between H-1GluA (glucuronic acid) (δ 5.18) and C-4' of the aglycon (δ 161.8) allowed us to deduce that the sugar moiety was linked to C-4'. Thus, the structure of **2** was established as apigenin 4'-*O*- β -D-glucuronopyranoside.

Compound **3** showed a UV spectrum identical to that of **9**, and three characteristic peaks could be identified in the FABMS spectrum. The molecular ion was registered at m/z 621, and two other peaks at m/z 445 and 269 were ascribed to the loss of uronic acid molecule and an aglycon, respectively. Based on the mass spectrum it was evident that compound **3** had two uronic acid units attached to apigenin. The ¹³C NMR values (Table 1) were consistent with the occurrence of two glucuronic acid units with 1 \rightarrow 2 linkage. The attachment of the disaccharide moiety to C-7 of the aglycon was deduced from the HMBC correlation between H-1GluA₁ (δ 5.44) and C-7 of the aglycon (δ 164.1). Thus, the

structure of **3** was established as apigenin 7-*O*-[β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside].

Compound **1** showed a UV spectrum with maxima at 266 and 323 nm, similar to the spectrum of flavonoid **2**. The mass spectrum showed the molecular ion at m/z 797 and peaks at m/z 623 and 269, corresponding to the loss of uronic acid and to the aglycon, respectively. It was clear that **1** contained apigenin with three uronic acid moieties. Comparing ¹H and ¹³C NMR data of **1** to those of **3** (Table 1) it was evident that **1** differed from **3** only for the occurrence of a further glucuronic acid unit which was located at C-4' on the basis of the HMBC correlation between H-1GluA₃ (δ 5.26) and C-4' of the aglycon (δ 161.2). Thus the structure of **1** was established as apigenin 7-*O*-[β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranosyl]-4'-*O*- β -D-glucuronopyranoside.

Compound **7** showed a quasi-molecular ion [M-H]⁻ at m/z 973 and further peaks at m/z 797, 445, and 269. Analysis of ¹H and ¹³C NMR (Table 1) spectra of **7** clearly suggested the occurrence of apigenin, three glucuronic acid units, and a ferulic acid moiety. Selected 1D-TOCSY spectra, obtained by irradiating each anomeric proton signal, yielded the subspectrum of each glucuronic acid unit with high resolution. The results of 1D-TOCSY and DQF-COSY experiments allowed the sequential assignments of all the proton resonances of the three sugar units. In particular the proton signal at δ 5.10, lowfield shifted as reported for acylated kaempferol glycosides (18), was assigned to H-2 GluA₂. HSQC experiments, which correlated all the proton resonances with those of each corresponding carbon, allowed the identification of the glycosidation sites by comparison of the observed carbon chemical shifts with those of the corresponding methylpyranosides (19). Glycosidation shifts were observed for C-2 GluA₁ (δ 82.2) and C-3 GluA₂ (δ 83.6). The structure of **7** was definitely determined by the HMBC experiment which showed long-range correlations between H-1GluA₁ (δ 5.42) and C-7 of the aglycon (δ 163.8), H-1 GluA₂ (δ 5.12) and C-2 GluA₁ (δ 82.2), H-1 GluA₃ (δ 4.49) and C-3 GluA₂ (δ 83.6), and H-2 GluA₂ (δ 5.10) and C=O of the ferulic moiety (δ 168.5). Thus, **7** was determined as apigenin 7-*O*-[2-*O*-feruloyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside).

Compound **6** showed in the FABMS spectrum an identical molecular ion at m/z 973 and a very similar degradation pattern to compound **7**, indicating a structure closely related to it. Analysis of ¹H and ¹³C NMR data and comparison with those of **7** clearly revealed that the difference between the two compounds should be confined to the position of the third glucuronic acid unit. The chemical shift of H-1 GluA₃ (δ 5.23) as well as the absence of any glycosidation shift for the carbons of GluA₁ and GluA₂ except that exhibited by C-2 GluA₁ (δ 83.4) indicated that GluA₃ was linked to the aglycon. The HMBC correlation between H-1 GluA₃ (δ 5.23) and C-4' (δ 161.2) suggested that the third glucuronic acid unit was attached at C-4'. Thus, the structure of **6** was established as apigenin 7-*O*-[2-*O*-feruloyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranosyl]-4'-*O*- β -D-glucuronopyranoside.

The FABMS spectrum of compound **8** showed a molecular ion at m/z 943 with additional peaks at m/z 797, 445, and 269, corresponding to the successive loss

of 146 amu, two glucuronic acids, and one glucuronic acid, respectively. Inspection of ^1H and ^{13}C NMR data of **8** and comparison with those of **7** suggested that the two compounds differed only in the acyl moiety linked to C-2'', being in **8** *p*-coumaroyl rather than feruloyl as in **7**. The structure of **8** was thus established as apigenin 7-*O*-[2-*O*-*p*-coumaroyl- $[\beta$ -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside}.

The UV spectrum of compound **4** showed absorption at 252 and 347 nm, characteristic for luteolin (16). Compound **4** showed a molecular ion at m/z 461 and a peak at m/z 285 corresponding to the aglycon obtained after glucuronic acid loss from parent molecule. The identification of the aglycon as luteolin was further confirmed by its ^{13}C NMR spectrum which was in a good agreement with the data presented by Harborne (16). The glucuronic acid was located at C-7 of the aglycon on the basis of the HMBC correlation between H-1 of the sugar (δ 5.21) and C-7 of the aglycon (δ 164.5). Thus, the structure of **4** was established as luteolin 7-*O*- β -D-glucuronopyranoside.

Compound **10** showed a molecular ion at m/z 987 and additional intensive peaks at m/z 813, 461, and 285 corresponding to the loss of ferulic acid, ferulic acid, and two glucuronic acid molecules and to the aglycon part (luteolin as in **4**), respectively. Analysis of ^1H and ^{13}C NMR data of **10** in comparison to those of **6** clearly suggested that the two compounds possessed an identical sugar portion, and differed only for the aglycon, being luteolin in **10** instead of apigenin as in **6**. Thus, the structure of **10** was established as luteolin 7-*O*-[2-feruloyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl]-4'-*O*- β -D-glucuronopyranoside.

The UV spectra for compound **5** showed three absorption maxima at 248, 271, and 328 nm, indicating dissimilarity of this compound from the remaining flavones. The FABMS spectrum contained two distinct signals at m/z 133 and 136 corresponding to $[\text{C}_5\text{O}_4\text{H}_9]^-$ and $[\text{C}_5\text{N}_9\text{H}_6]^-$. On the basis of ^1H and ^{13}C NMR, compound **5** was identified as adenosine (19).

Some of the above apigenin and luteolin structures have been previously reported in alfalfa (9) (5) or in other plant sources (3 (17) and 9 (20)). However, to our knowledge, compounds **1**, **6**, **7**, **8**, and **10** are novel structures and have never before been reported in the plant kingdom. Furthermore, compounds **1**–**8** and **10** have been identified in *Medicago sativa* aerial parts for the first time. Glucuronoflavones are rare in plants, especially those with apigenin and luteolin as aglycons. Diglucuronoflavones have been identified only in a few plant sources, eg. *Clerodendron trichotomum*, *Medicago radiata*, *Adenocalymma alliaceum*, *Elodea canadensis*, *Secale cereale*, and *Perilla ocimoides* (17 and 21). Derivatives of flavonol, flavones, or anthocyanin glycosides acylated with hydroxycinnamic acid (*p*-coumaric, caffeic, ferulic, and sinapic) of flavonol, flavones, or anthocyanin glycosides have been found in a few plant sources including *Matthiola incana* (22 and 23), *Brassica oleracea* and *Raphanus napus* (18 and 24), *Pisum sativum* (25), *Salix gilgiana* (26), *Asplenium proloungatum* (27), and *Brunfelsia grandiflora* (28).

Flavonoid glycosides occur ubiquitously in the plant kingdom and are recognized as UV-B radiation protectors. However, great diversity of the glycoside structures within the plant suggest their function in plant-herbivores association (oviposition and feeding stimu-

lants, toxicity and inhibitory effect for insects) (29). Their nutritional importance in food formulas has received much attention (11). None of the glycosides acylated with hydroxycinnamic derivatives has been examined with respect to such properties. Because alfalfa is an important crop, both as feed for livestock and as a good raw material for food additive preparations, it seems crucial to characterize its unique flavonoid composition.

LITERATURE CITED

- Hatfield, R. D. Carbohydrates composition of alfalfa cell walls isolated from stem sections differing in maturity. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *40*, 424–430.
- Oleszek, W. Alfalfa saponins: Structure, biological activity and chemotaxonomy. In *Saponins Used in Food and Agriculture*, Waller, G. R., Yamasaki, K., Eds.; Plenum Publishing: New York, 1996; pp 155–170.
- Oleszek, W. Alfalfa saponins: Chemistry and application. In *Phytochemicals as Bioactive Agents*, Bidlack, W. R., Omaye, S. T., Meskin, M. S. Topham, D. K., Eds.; Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA and Basel, Switzerland, 2000; pp 167–188.
- Hernández, T.; Hernández, A.; Martínez, C. Polyphenols in alfalfa leaf concentrates. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 1120–1122.
- Bisby, F. A., Buckingham, T., Harborne, T. B., Eds. *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*, Vols. 1 and 2; Chapman and Hall: London, 1994.
- Martensson, P. Studies on tannins, saponins and trypsin inhibitors in lucerne. *Biul. Inst. Hod. Rosl.* **1979**, *135*, 294–301.
- Knuckles, B. E.; deFremery, D.; Kohler, G. O. Coumestrol content of fractions obtained during wet processing of alfalfa. *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24*, 1177–1180.
- Livingston, A. L.; Kohler, G. D.; Kuzmicky, D. D. Comparison of carotenoid storage stability in alfalfa leaf protein (Pro-Xan) and dehydrated meals. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 652–656.
- Hegsted, M.; Linkswiler, H. M. Protein quality of high and low saponin alfalfa protein concentrate. *J. Sci. Food Agric.* **1980**, *31*, 777–781.
- Stochmal, A.; Oleszek, W.; Leitz, R. E.; Di Paola, P. Saponin and flavonoid profiles of 47 alfalfa varieties of different origin. *Book of Abstracts of the Phytochemical Society of Europe Meeting*, IUNG Pulawy, Poland, 1999; p 30.
- Packer, L.; Hiramatsu, M.; Yoshikawa, T. *Antioxidant Food Supplements in Human Health*. Academic Press: San Diego, CA, 1999.
- Rance, M.; Sorensen, O.; Bodenhausen, G.; Ernst, R. R.; Wuthrich, K. Improved spectral resolution in COSY ^1H NMR spectra of proteins via double quantum filtering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, *117*, 479–485.
- Martin, G. E.; Crouch, R. C. Inverse detected two-dimensional NMR methods application in natural products chemistry. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1–70.
- Summers, M. F.; Marzilli, L. G.; Bax, A. Complete ^1H and ^{13}C Assignments of coenzyme through the use of new two-dimensional NMR experiments. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 4285–4294.
- Kessler, H.; Oschkinat, H.; Griesinger, C.; Bermel, W. Transformation of homonuclear two-dimensional NMR techniques into one-dimensional technique using Gaussian pulses. *J. Magn. Reson.* **1986**, *70*, 106–133.
- Harborne, J. B. *Methods in Plant Biochemistry. Volume 1. Plant Phenolics*. Academic Press: San Diego, CA, 1989.
- Yoshida, K.; Kameda, K.; Kondo, T. Diglucuronoflavones from purple leaves of *Perilla ocimoides*. *Phytochemistry* **1993**, *33*, 917–919.

- (18) Nielsen, J. K.; Norbek, R.; Olsen, C. E. Kaempferol tetraglucosides from cabbage leaves. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 2171–2176.
- (19) Breitmeier, E.; Voelter, W. *Carbon-13 NMR Spectroscopy*. VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim, Germany, 1989.
- (20) Wagner, H.; Danninger, H.; Iyengar, M. A.; Seligmann, O.; Farkas, L.; Subramanian, S. S.; Nair, A. G. Synthesis of glucuronides in the flavonoid-series. 3. Isolation of apigenin-7-D-glucuronide from *Ruellia tuberosa* L. and its synthesis. *Chem. Ber.* **1971**, *104*, 2681–2687.
- (21) Schulz, M.; Strack, D.; Weissenböck, G.; Markham, K. R.; Dellamonica, G.; Chopin, J. Two luteolin O-glucuronides from primary leaves of *Secale cereale*. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 343–345.
- (22) Harborne, J. B. *Comparative Biochemistry of Flavonoids*; Academic Press: London, 1967.
- (23) Saito, N.; Tatsuzawa, F.; Hongo, A.; Win, K. W.; Yokoi, M.; Shighihara, A.; Honda, T. Acylated pelargonidine 3-sambubioside-5-glucosides in *Matthiola incana*. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1613–1620.
- (24) Nielsen, G. E.; Olsen, C. E.; Petersen, M. K. Acylated flavonol glycosides from cabbage leaves. *Phytochemistry* **1993**, *34*, 539–544.
- (25) Ferreres, F.; Esteban, E.; Carpena-Ruiz, R.; Jimenez, M. A.; Tomas-Barberan, F. A. Acylated flavonol sophorotrioses from pea shoots. *Phytochemistry*, **1995**, *39*, 1443–1446.
- (26) Mizuno, M.; Kato, M.; Limuna, M.; Tanaka, T.; Kimura, A.; Ohashi, H.; Sakai, H. Acylated luteolin glucosides from *Salix gilgiana*. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2418–2420.
- (27) Mizuno, M.; Kyotani, Y.; Linuma, N.; Tanaka, T.; Iwatsuki, K. Kaempferol 3-rhamnoside-7-[6-feruloylglucosyl(1–3)rhamnoside] from *Asplenium prolougatum*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2742–2743.
- (28) Brunner, G.; Burger, U.; Castioni, P.; Kapetanidis, I. A novel acylated flavonol glycoside isolated from *Brunfelsia grandiflora* ssp. *grandiflora*. Structure elucidation by gradient accelerated NMR spectroscopy at 14T. *Phytochem. Anal.* **2000**, *11*, 29–33.
- (29) Harborne, J. B. *Introduction to Ecological Biochemistry*; Academic Press: San Diego, CA, 1993.

Received for review July 17, 2000. Revised manuscript received November 1, 2000. Accepted November 3, 2000.

JF000876P

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Flavonoids. 2. Tricin and Chrysoeriol Glycosides from Aerial Parts

Anna Stochmal,*[†] Ana M. Simonet,[‡] Francisco A. Macias,[‡] and Wieslaw Oleszek[†]

Department of Biochemistry, Institute of Soil Science and Plant Cultivation, ul. Czarzoryskich 8, 24-100 Pulawy, Poland, and Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, C/República Saharaui s/n, Apartado 40, 11510 Puerto Real, Cádiz, Spain

Ten flavone glycosides have been isolated and identified in aerial parts of alfalfa. These included six tricin, one 3'-*O*-methyltricetin, and three chrysoeriol glycosides. Most of these compounds were acylated with ferulic, coumaric, or sinapic acids, and acylation occurred on the terminal glucuronic acid. Eight of these compounds, including 7-*O*- β -D-glucuronopyranosyl-3'-*O*-methyltricetin, 7-*O*- β -D-glucuronopyranosyl-4'-*O*- β -D-glucuronopyranosidechrysoeriol, 7-*O*-[2'-*O*-feruloyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside]chrysoeriol, 7-*O*-{2'-*O*-feruloyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside}chrysoeriol, 7-*O*-[2'-*O*-feruloyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside]tricin, 7-*O*-[2'-*O*-feruloyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside]tricin, 7-*O*-[2'-*O*-*p*-coumaroyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside]tricin, and 7-*O*-{2'-*O*-feruloyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside}tricin, have not been reported previously in the plant kingdom. Two previously identified alfalfa flavones, 7-*O*- β -D-glucuronopyranosidetricin and 7-*O*-[β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside]tricin, were also isolated.

Keywords: *Medicago sativa*; acylated flavones; tricin; tricetin; chrysoeriol

INTRODUCTION

Alfalfa (*Medicago sativa* L.), a crop that has been used for centuries as an animal feedstuff, is gaining much attention as a human food component, consumed as a garnish, leaf protein concentrate, or food nutritional supplement. Thus, understanding of the alfalfa chemical composition remains one of the most important factors in designing new nutritional formulas. Although the primary composition (protein and carbohydrates) is well understood (1, 2), secondary metabolites are not yet fully characterized. The best recognized secondary metabolite groups are carotenoids (3) and saponins (4). The phenolic composition, including flavonoids, despite extensive work, is still poorly understood (5), and only a few glycosides have been fully characterized.

Our previous work on flavonoid composition indicated that flavonoid profiles of several alfalfa varieties are very similar and contain >20 individual compounds (6). A number of these compounds from the more polar fraction of the flavonoid mixture from the Boja cultivar were identified (7). They were shown to be unique glucuronides of apigenin and luteolin, acylated at glucuronic acid residues with ferulic or coumaric acids. Three further acylated apigenin glucuronides, present only in trace amounts in the Boja cultivar grown in Poland, were characterized in the Artal cultivar collected in Portugal (8). In the present work we describe the remaining more hydrophobic glycosides, which form a quite uniform group in their flavonoid profile, characterized by a strong absorption in band I (337–355 nm)

and two weak maxima in band II (247–270 nm), present in the Boja cultivar.

MATERIALS AND METHODS

Spectral Analysis. Melting points are uncorrected. Optical rotations were obtained in a mixture of MeOH/H₂O/DMSO (45:45:10) at 24 °C on a Jasco P-1020 spectropolarimeter. ESI-MS were recorded on a Mariner Biospectrometry workstation (PerSeptive Biosystems). ¹H, ¹³C, and 2D NMR spectra were recorded in DMSO-*d*₆ or CD₃OD on a Varian UNITY-400 instrument operating at 400 MHz for ¹H NMR and at 100 MHz for ¹³C NMR. Chemical shifts are reported in parts per million (δ), relative to TMS.

Plant Material. Alfalfa (*Medicago sativa* L. var. Boja) was grown at the Experimental Farm of the Institute of Soil Science and Plant Cultivation in Pulawy, Poland, in 1997. Plants were collected at the beginning of flowering, freeze-dried, and finely powdered.

Isolation of Flavonoids. Flavonoids were extracted with 70% aqueous MeOH from the Boja variety and first purified by solid phase extraction as previously described (7). The purified flavonoid fraction was loaded onto a preparative column (400 \times 30 mm i.d., LiChroprep RP-18, 25–40 μ m, Merck). The column was washed with water and then with increasing concentrations of MeOH in water (5% increments from 0 to 100% MeOH). Ten milliliter fractions were collected with a fraction collector. The first 400 fractions obtained by eluting the column with water and 5% MeOH contained the majority of apigenin and luteolin glycosides as previously described (7). Fractions 400–1250, obtained by washing the column with solvent containing >10% MeOH, showed the presence of compounds with characteristic strong absorption in band I. Fractions showing similar TLC profiles (DC-Alufolien Cellulose, Merck; solvent 15% HOAc) were combined. They were further separated/purified on a stainless Vertex column (250 \times 8 mm i.d., Eurospher 100, RP18, 10 μ m, Säulentechnik, Berlin, Germany) using an isocratic system (CH₃CN/1% H₃PO₄) optimized individually for each fraction

* Corresponding author (telephone 48-81 8863421, ext. 205; fax 48-81 8864547; e-mail asf@IUNG.Pulawy.pl).

[†] Institute of Soil Science and Plant Cultivation.

[‡] Universidad de Cádiz.

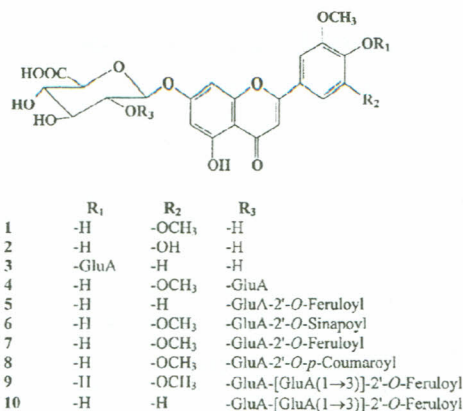


Figure 1. Isolated compounds from alfalfa (GluA = glucuronic acid).

with HPLC. Some fractions were separated on an analytical column (250 × 4.6 mm i.d., Eurospher 100, RP18, 5 μm, Säulentchnik) heated to 50 °C, using an isocratic system (CH₃CN/1%H₃PO₄). Separations were performed on HPLC (Waters with 996 PAD detector, 616 pump and Millennium software). These yielded several individual compounds as shown in Figure 1.

1: 163.1 mg, 0.408% yield; C₂₃H₂₁O₁₃; FABMS (negative ion mode), *m/z* 505 [M - H]⁻, 329 [M - H - GluA]⁻; UV, λ_{max}(nm) (MeOH) 247sh, 265sh, 352; for ¹H and ¹³C NMR see Tables 1 and 2, respectively.

2: 4.6 mg, 0.012% yield; amorphous yellow powder; mp 219–220 °C; [α]_D²⁴ -27.6 [MeOH - H₂O - DMSO (45:45:10), *c* 0.1]; HRMS, *m/z* 491.0832 [calcd for C₂₂H₁₉O₁₃ (M)⁻, 491.0820]; FABMS (negative ion mode), *m/z* 491 [M - H]⁻, 315 [M - H - GluA]⁻; UV, λ_{max}(nm) (MeOH) 247sh, 265sh, 352; for ¹H and ¹³C NMR see Tables 1 and 2, respectively.

3: 1.7 mg, 0.004% yield; amorphous yellow powder; mp 207–208 °C; [α]_D²⁴ -47.4 [MeOH - H₂O - DMSO (45:45:10), *c* 0.1]; HRMS, *m/z* 651.1209 [calcd for C₂₈H₂₇O₁₈ (M)⁻, 651.1192]; FABMS (negative ion mode), *m/z* 651 [M - H]⁻, 475 [M - H - GluA]⁻, 299 [M - H - 2GluA]⁻; UV, λ_{max}(nm) (MeOH) 247sh, 271, 338; for ¹H NMR see Table 1.

4: 26.1 mg, 0.065% yield; C₂₉H₂₉O₁₉; FABMS (negative ion mode), *m/z* 681 [M - H]⁻, 505 [M - H - GluA]⁻, 329 [M - H - 2GluA]⁻; UV, λ_{max}(nm) (MeOH) 247sh, 265sh, 352; for ¹H and ¹³C NMR see Tables 1 and 2, respectively.

5: 13.1 mg, 0.033% yield; amorphous yellow powder; mp 235–236 °C; [α]_D²⁴ -77.8 [MeOH - H₂O - DMSO (45:45:10), *c* 0.1]; HRMS, *m/z* 827.1667 [calcd for C₃₈H₃₅O₂₁ (M)⁻, 827.1665]; FABMS (negative ion mode), *m/z* 827 [M - H]⁻, 651 [M - H - ferulic acid]⁻, 475 [M - H - ferulic acid - GluA]⁻, 299 [M - H - ferulic acid - 2GluA]⁻; UV, λ_{max}(nm) (MeOH) 248, 271sh, 338; for ¹H and ¹³C NMR see Tables 1 and 2, respectively.

6: 2.9 mg, 0.007% yield; amorphous yellow powder; mp 227–228 °C; [α]_D²⁴ -61.6 [MeOH - H₂O - DMSO (45:45:10), *c* 0.1]; HRMS, *m/z* 887.1889 [calcd for C₄₀H₃₉O₂₃ (M)⁻, 887.1877]; FABMS (negative ion mode), *m/z* 887 [M - H]⁻, 681 [M - H - sinapic acid]⁻, 505 [M - H - sinapic acid - GluA]⁻, 329 [M - H - sinapic acid - 2GluA]⁻; UV, λ_{max}(nm) (MeOH) 223sh, 247sh, 269sh, 342; for ¹H and ¹³C NMR see Tables 1 and 2, respectively.

7: 30.2 mg, 0.076% yield; amorphous yellow powder; mp 307–308 °C (with browning); [α]_D²⁴ -70.2 [MeOH - H₂O - DMSO (45:45:10), *c* 0.1]; HRMS, *m/z* 857.1715 [calcd for C₃₉H₃₇O₂₂ (M)⁻, 857.1711]; FABMS (negative ion mode), *m/z* 857 [M - H]⁻, 681 [M - H - ferulic acid]⁻, 505 [M - H - ferulic acid - GluA]⁻, 329 [M - H - ferulic acid - 2GluA]⁻; UV, λ_{max}(nm) (MeOH) 247sh, 269sh, 338; for ¹H NMR see Table 1.

8: 5.6 mg, 0.014% yield; amorphous yellow powder; mp 232–233 °C; [α]_D²⁴ -14.7 [MeOH - H₂O - DMSO (45:45:10), *c* 0.1]; HRMS, *m/z* 827.1682 [calcd for C₃₈H₃₅O₂₁ (M)⁻, 827.1665]; FABMS (negative ion mode), *m/z* 827 [M - H]⁻, 681 [M - H - coumaric acid]⁻, 505 [M - H - coumaric acid - GluA]⁻, 329 [M - H - coumaric acid - 2GluA]⁻; UV, λ_{max}(nm) (MeOH) 223sh, 271, 323; for ¹H NMR see Table 1.

9: 6.8 mg, 0.017% yield; amorphous yellow powder; mp 199–200 °C; [α]_D²⁴ -35.3 [MeOH - H₂O - DMSO (45:45:10), *c* 0.1]; HRMS, *m/z* 1033.2104 [calcd for C₄₃H₄₅O₂₈ (M)⁻, 1033.2092]; FABMS (negative ion mode), *m/z* 1033 [M - H]⁻, 857 [M - H - ferulic acid]⁻, 681 [M - H - ferulic acid - GluA]⁻, 505 [M - H - ferulic acid - 2GluA]⁻, 329 [M - H - ferulic acid - 3GluA]⁻; UV, λ_{max}(nm) (MeOH) 247sh, 269sh, 338; for ¹H and ¹³C NMR see Tables 1 and 2, respectively.

10: 2.8 mg, 0.007% yield; amorphous yellow powder; mp 254–255 °C; [α]_D²⁴ -37.6 [MeOH - H₂O - DMSO (45:45:10), *c* 0.1]; HRMS, *m/z* 1003.2009 [calcd for C₄₄H₄₃O₂₇ (M)⁻, 1003.1986]; FABMS (negative ion mode), *m/z* 1003 [M - H]⁻, 827 [M - H - ferulic acid]⁻, 651 [M - H - ferulic acid - GluA]⁻, 475 [M - H - ferulic acid - 2GluA]⁻, 299 [M - H - ferulic acid - 3GluA]⁻; UV, λ_{max}(nm) (MeOH) 248, 269sh, 338; for ¹H NMR see Table 1.

RESULTS AND DISCUSSION

Extraction and preliminary purification of flavonoids from alfalfa (*M. sativa*) cultivar Boja afforded a mixture containing over 20 individual glycosides as shown by analytical liquid chromatography. The flavonoid profile contained two basic groups of flavonoids, one with apigenin and luteolin aglycons, having spectra with two distinct absorption bands, and the other one characterized by strong absorption in band I (337–355 nm) and only weak shoulders in the range of 247–270 nm. The first fraction, containing luteolin and apigenin glycosides, was more polar and easily separated into individual compounds on a C18 preparative column, eluted with water and 5% aqueous MeOH. These flavonoids were described previously (7). The second fraction, which consisted of 10 compounds of similar UV characteristics, was much more hydrophobic than the first fraction and more difficult to separate into individual compounds. In most cases separation on a semipreparative column failed (compounds 2, 3, 5, 6, 9, and 10), and an analytical HPLC system with a column heated to 50 °C was required. This allowed successful separation of all compounds and their full characterization with spectral techniques.

All isolated compounds (1–10) had ¹H and ¹³C NMR spectra (Tables 1 and 2) consistent with a structure of a glycosylated flavonoid (9). The downfield region of the ¹H NMR spectrum (Table 1) of these compounds showed a 2H AX system, correlated by 2D-COSY with typical shifts of an A ring of flavonoid with oxygenation at C-5 and C-7.

The B-ring signals in seven compounds (1, 2, 4, and 6–9) consisted of a two-proton singlet resonance arising from a pair of degenerated protons (H-2', H-6'), indicating oxygenation at C-3', C-4', and C-5'. The oxygenation of the B-ring of the other three compounds (3, 5, and 10) had to be at C-3' and C-4', which was shown by a three-proton ABX system, with coupling constants (2 and 8 Hz) characteristic for meta and ortho coupling, in their ¹H NMR spectra. The rotating frame effect (ROE) correlations (Figure 2) between the H-2' and H-6' signals and the H-3 singlet signal in each compound confirmed the substitution pattern of the aglycons. Together with the substitution patterns, the ¹H NMR

Table 1. ¹H NMR Data of Compounds 1–10 in DMSO^{a,b}

H	δ									
	1	2	3 ^c	4	5	6	7	8	9	10
aglycons										
3	7.06 s	6.90	6.74	7.07	6.95	6.99	6.96	7.01	7.03	6.92
6	6.47 d	6.45	6.49	6.44	6.42 brs	6.42 d	6.40 brd	6.41 d	6.42	6.41
8	6.91 d	6.83	6.84	6.81	6.78 brs	6.82 d	6.80 brd	6.82 d	6.83	6.76
2'	7.35 s	7.18	7.55 d	7.36 s	7.58 (o)	7.33 s	7.32	7.33	7.35	7.57 (o)
5'			7.27 d		6.94 (o)					6.95 d
6'	7.35 s	7.18	7.60 dd	7.36 s	7.57 (o)	7.33 s	7.32	7.33	7.35	7.56 (o)
OCH ₃	2 × 3.88 s	3.87	3.96	2 × 3.88	3.89	2 × 3.88	2 × 3.88	2 × 3.87	2 × 3.88	3.89
sugars										
1	5.24 d	5.27	5.17	5.41	5.38	5.38	5.36	5.35	5.36	5.36
2	3.28 dd	3.28	3.55	3.54	3.55	3.56	3.53	3.53 brdd	3.53 (o)	3.54 (o)
3	3.33 dd	3.33	3.60 (o)	3.46 dd	3.40 (o)	3.41 (o)	3.42 (o)	3.41 (o)	3.41 (o)	3.38 (o)
4	3.38 dd	3.39	3.62 (o)	3.49 dd	3.40 (o)	3.41 (o)	3.42 (o)	3.41 (o)	3.41 (o)	3.38 (o)
5	3.98 d	4.03	4.07 d	4.10	4.02	3.99	3.92	3.97	4.01 brd	3.97 d
1'			5.12 d	4.55	4.91	4.92	4.93	4.92	4.98	4.98
2'			3.60 (o)	3.01 dd	4.64	4.64	4.63	4.62	4.80	4.79
3'			3.60 (o)	3.22 dd	3.40 (o)	3.41 (o)	3.42 (o)	3.41 (o)	3.86 (o)	3.79 (o)
4'			3.62 (o)	3.26 dd	3.40 (o)	3.41 (o)	3.42 (o)	3.41 (o)	3.53 (o)	3.49 (o)
5'			3.99 d	3.66	3.72	3.69	3.57 brd	3.69 d	3.82	3.79 (o)
1''									4.37 d	4.32
2''									2.96 dd	2.95
3''									3.07 dd	3.06
4''									3.25 dd	3.20
5''									3.62 d	3.49 (o)
phenolic acids										
2					7.25 brs	6.92 s	7.17 brs	7.47 d	7.22 brs	7.19 brs
3								6.74 d		
5					6.76 d		6.70 brd	6.74 d	6.77	6.74
6					7.07 brd	6.92 s	7.00 brdd	7.47 d	7.06 brd	7.03
7					7.50 d	7.48	7.44	7.48	7.46	7.44
8					6.41 d	6.42	6.32	6.31	6.37	6.33
OCH ₃					3.80 s	2 × 3.76	3.76		3.80	3.79

^a Multiplicities are not repeated if identical to those of previous column. ^b Coupling constant values (Hz) for aglycons: 1–4, 6, 8–10, $J_{6-8} = 2$; 3, $J_{2'-6'} = 2$; 3, 10, $J_{5-6'} = 9$. Coupling constant values (Hz) for sugars: 1–10, $J_{1-2} = 7$; 1–4, 6, 7, $J_{2,3} = 8$; 1, 2, 4, $J_{3,4} = 9$; 1–4, 6, 8, 9, $J_{4,5} = 9$; 3–10, $J_{1'-2'} = 8$; 4–10, $J_{2,3'} = 9$; 4, $J_{3,4'} = 9$; 3–6, 8, 9, $J_{4',5'} = 9$; 9, 10, $J_{1''-2''} = 7$; 9, 10, $J_{2'',3''} = 8$; 9, 10, $J_{3'',4''} = 9$; 9, 10, $J_{4'',5''} = 10$. Coupling constant values (Hz) for phenolic acids: 5, 7–10, $J_{5,6} = 8$; 5–10, $J_{7-8} = 16$. ^c Spectrum obtained in CD₃OD.

Table 2. ¹³C NMR Data of Compounds 1, 2, 4–6, and 9 in DMSO-*d*₆

C	δ												
	1	2	4	5	6	9	C	1	2	4	5	6	9
aglycons													
2	164.2	164.5	164.2	164.2	164.1	164.2							
3	103.9	103.6	103.8	103.5	103.8	103.8							
4	182.1	182.0	182.2	182.1	182.0	182.1				104.5	100.8	100.4	100.7
5	161.2	161.2	161.2	161.2	161.2	161.2				74.2	75.7	75.4	75.8
6	99.3	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2				75.9	73.8	73.9	81.3
7	162.6	162.5	162.3	162.2	162.2	162.2				70.8	71.4	71.3	71.4
8	95.1	94.7	95.3	94.9	95.2	95.2				74.9	74.9	74.8	74.8
9	156.9	157.0	156.8	156.9	156.8	156.8				169.9	169.8	169.9	169.8
10	105.5	105.5	105.5	105.5	105.5	105.5							102.7
1'	120.2	121.3	120.3	121.4	120.3	120.3							71.4
2'	104.6	102.6	104.5	110.4	104.5	104.6							75.2
3'	148.2	148.6	148.2	148.0	148.2	148.2							70.3
4'	140.1	138.9	140.0	150.9	140.0	140.0							75.0
5'	148.2	146.1	148.2	115.8	148.2	148.2							169.7
6'	104.6	107.8	104.5	120.4	104.5	104.6							
OCH ₃	2 × 56.4	56.3	2 × 56.4	56.0	2 × 56.4	2 × 56.4							
sugars													
1	99.3	99.2	97.8	97.3	97.2	97.4							
2	72.8	72.8	82.6	79.9	79.8	80.2							
3	75.7	75.6	75.6	73.4	73.4	72.8							
4	71.3	71.3	71.6	71.9	71.9	71.9							
5	75.2	75.6	75.0	75.0	74.9	75.0							
6	170.3	170.2	170.2	170.0	170.1	170.2							
phenolic acids													
1											125.8	124.5	125.9
2											111.2	105.9	111.3
3											149.1	148.0	149.0
4											147.9	138.1	147.8
5											115.5	148.0	115.5
6											122.8	105.9	122.7
7											144.6	144.9	144.4
8											115.0	115.3	114.9
9											165.8	165.7	165.5
OCH ₃											55.7	2 × 56.0	55.7

spectra indicated the presence of methoxyl groups in each aglycon. Six compounds (1, 4, and 6–9) showed a six-proton singlet at δ 3.88, which had an ROE correlation with the singlet signal of H-2' and H-6'. This is characteristic of two methoxyl groups at C-3' and C-5', so the aglycon part for these compounds was determined to be triclin.

Compound 2 had the same oxygenation pattern as compound 1, but its ¹H NMR spectrum showed a three-proton singlet at δ 3.87, corresponding to a methoxyl group in the molecule. The ¹³C NMR spectrum of 2 showed a signal at δ 56.3 for this methoxyl group, characteristic of either one or no *ortho* substituents (10), eliminating the possibility that the methoxyl group was

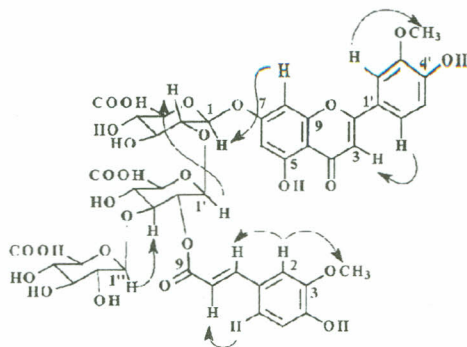


Figure 2. Example of ROE correlations, compound 10.

located at C-4'. On the other hand a ROE correlation between the H-2' and H-6' signals and the methoxyl group signal was observed. This confirmed the localization of the methoxyl group at the C-3' in the aglycon of compound 2. Thus, the aglycon of 2 was established as 3'-*O*-methyltricetin.

Compounds 3, 5, and 10 showed in their ^1H NMR spectra a three-proton singlet at δ 3.89 in $\text{DMSO}-d_6$, assigned to a methyl group at C-3' as indicated by the correlation between the H-2' signal and the methoxyl signal observed in the ROE spectra of the compounds (Figure 2). This substitution determined the nature of their aglycon as chrysoeriol.

The UV (11) and ^{13}C NMR (12) (Table 2) spectra of each compound confirmed their aglycon structures deduced above (Figure 1). Their molecular formulas were further supported by FAB mass spectrometry, which in negative ion mode gave clear aglycon peaks, which for compounds 3, 5, and 10 were found at m/z 299 (chrysoeriol), for compound 2 at m/z 315 (methyltricetin), and for compounds 1, 4, and 6–9 at m/z 329 (tricin).

The nature of the sugars was similar to the apigenin and luteolin glycosides as previously reported (7). The only sugar unit comprising the glycosidic moieties was glucuronic acid. This was evident from FAB mass spectrometry, showing for each compound losses of 176 amu, which was characteristic for a uronic acid. The signals of ^1H and ^{13}C NMR spectra corresponding to the sugar moieties were in agreement with previous values for glucuronic acid (7). Their β -configuration was deduced from the coupling constant of the anomeric protons.

The connection between glucuronyl moieties and aglycons were established in each compound to be at the hydroxyl group of C-7. The ROE correlation between H-6 and H-8 of the A-ring and H-1 of the first glucuronic acid was observed (Figure 2). Thus, compounds 1 and 2 had one glucuronic acid attached to C-7. This was supported by the FAB mass spectra, which showed in negative ion mode molecular ions at m/z 505 and 491, respectively. Thus, the structure of 1 was elucidated as 7-*O*- β -D-glucuronopyranosidetricin, a compound previously identified in alfalfa (13), and that of 2 as 7-*O*- β -D-glucuronopyranoside-3'-*O*-methyltricetin, which is a novel structure.

Compound 3 had one additional glucuronic acid in comparison to 2, as indicated by the FAB mass spectrum showing a molecular ion at m/z 651 and additional peaks at 475 and 299 corresponding to the loss of one and two

uronic acids, respectively. The attachment of the additional glucuronic acid was established to be at C-4' of the B-ring of chrysoeriol, which was evident from ROE correlations between H-5' (δ 7.27 *d*, 9 Hz) and H-1' of the second glucuronic acid (δ 5.12 *d*, 8 Hz). Thus, 3 was identified as 7-*O*- β -D-glucuronopyranosyl-4'-*O*- β -D-glucuronopyranosidechrysoeriol.

The difference between compounds 4 and 1 was in the presence of an additional glucuronic acid unit. The FAB mass spectrum of the former showed a molecular ion at m/z 681 and two other ions at m/z 505 and 329 arising from the loss of one and two uronic acids, respectively. The ^{13}C NMR values (Table 2) were consistent with a 1 \rightarrow 2 linkage between two glucuronic acids, which was confirmed with the ROE correlation between H-2 and H-1' of the first and second sugars (Figure 2). Thus, 4 was identified as 7-*O*-[β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside]tricin. The presence of this compound in alfalfa was previously reported (13).

The other five compounds (5–10) had additional signals in the downfield region of their ^1H NMR spectrum, corresponding to a phenolic acyl moiety (14). Two coupled doublets ($J = 16$ Hz) in the region of 7.50 and 6.31 ppm indicated the presence of a trans double bond of the phenolic acyl moiety, and three signals in their ^{13}C NMR at δ 165.8, 144.6, and 115.0 (values for 5) corresponded to C-9, C-7, and C-8, respectively (Table 2). The other signals belonged to the aromatic ring of the phenolic moiety.

In the ^1H NMR spectrum of 8 a pair of two-proton, ortho-coupled doublets ($J = 8$ Hz) arising from two pairs of degenerate protons [(H-2, H-6, δ 7.47) and (H-3, H-5, δ 6.74)] were observed, which is typical for a coumaroyl group. The FAB mass spectrum showed a molecular ion at m/z 827 and additional peaks at m/z 505 and 329 corresponding to the loss of coumaric acid and glucuronic acid, respectively. The pronounced downfield shift of H-2' of the second glucuronic acid (δ 4.64), suggested the linkage between the sugar and the acyl moiety at C-2' as previously reported (7). Thus, flavonoid 8 was the acylated form of compound 4, and its structure was established as 7-*O*-[2'-*O*-*p*-coumaroyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside]tricin.

In the ^1H NMR spectra of 5, 7, 9, and 10 a three-proton ABX system characteristic of ortho and meta couplings typical for a feruloyl moiety was observed. The position of the methoxyl group at C-3 of the feruloyl residue was confirmed by ROE correlation between the signal at δ 3.80 (s) and H-2. Compounds 5, 7, 9, and 10 showed molecular ions at m/z 827, 857, 1033, and 1003, respectively. The pronounced downfield shift of H-2' of a second glucuronic acid (δ 4.64 and 4.63) in 5 and 7 suggested the linkage between the sugar and the acyl moiety at C-2' as previously reported (7). Thus, flavonoids 5 and 7 were identified as 7-*O*-[2'-*O*-feruloyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside]chrysoeriol and 7-*O*-[2'-*O*-feruloyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside]tricin. Flavonoids 9 and 10 were analogues of 7 and 5, respectively, each possessing one more glucuronic acid molecule. The ROE correlation between this third sugar and the rest of the molecule indicated its attachment at C-3'' of the second glucuronic acid (Figure 2). On the basis of these findings structures 9 and 10 were established as 7-*O*-[2'-*O*-feruloyl- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 3)]-*O*- β -D-glu-

curonopyranosyl(1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranoside]tricin and 7-*O*-[2'-*O*-feruloyl-β-D-glucuronopyranosyl(1→3)]-*O*-β-D-glucuronopyranosyl(1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranoside]-chrysoeriol.

In the ¹H NMR spectrum of **6** a two-proton singlet (δ 6.92 s) was observed, indicating three oxygenated positions in the phenolic moiety, together with a six-proton signal corresponding to two methoxyl groups (δ 3.76 s). The ROE correlation between the double-bond signals and the aromatic protons singlet (Figure 2) suggested that the oxygenated positions were at C-3, C-4, and C-5, and the correlation between methoxyl and aromatic singlets confirmed the attachment of the methoxyls at C-3 and C-5, which is characteristic for a sinapoyl residue. The presence of this acyl group was further confirmed by the FAB mass spectrum, showing a molecular ion at *m/z* 857, which was 30 mu different (−OCH₂−) from that found for flavonoid **7**. Thus, the structure of **6** was established as 7-*O*-[2'-*O*-sinapoyl-β-D-glucuronopyranosyl(1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranoside]-tricin. The nature of the coumaroyl, feruloyl, and sinapoyl groups was confirmed also by their ¹³C NMR spectra (Table 2), which were consistent with previously published data (14).

To the best of our knowledge flavones **2**, **3**, and **5–10** are novel structures, not identified previously in the plant kingdom. Isolated novel flavonoids confirm our previous findings that alfalfa flavonoids are unique compounds as they all possess only glucuronic acid as the sole sugar in the sugar chains (7). Most of these glycosides are acylated with ferulic, coumaric, or synapic acid, and acylation takes place on a terminal glucuronic acid molecule. It was also established that acylation takes place on the sugar chain attached at the C-7 position. These were generally found in the Polish cultivar Boja, but our studies on the cultivar Artal grown in Portugal showed that the dominant flavonoid was acylated at the sugar chain attached at the C-4' position. These differences may reflect variety specificity or may be generated by the environment. The function of acylated flavone glucuronides in the host plant remains unclear. The nutritional implications of such structures are also uncertain. More research is required to establish the role and bioactivity of these flavonoids.

LITERATURE CITED

- Hegsted, M.; Linkswiler, H. M. Protein quality of high and low saponin alfalfa protein concentrate. *J. Sci. Food Agric.* **1980**, *31*, 777–781.
- Hatfield, R. D. Carbohydrate composition of alfalfa cell walls isolated from stem sections differing in maturity. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 424–430.

- Livingston, A. L.; Kohler, G. D.; Kuzmicky, D. D. Comparison of carotenoid storage stability in alfalfa leaf protein (Pro-Xan) and dehydrated meals. *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 652–656.
- Oleszek, W. Alfalfa saponins: Chemistry and application. In *Phytochemicals as Bioactive Agents*; Bidlack, W. R., Omaye, S. T., Meskin, M. S., Topham, D. K., Eds.; Technomic Publishing: Lancaster, PA, 2000; pp 167–188.
- Bisby, F. A., Buckingham, T., Harborne, T. B., Eds. *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*; Chapman and Hall: London, U.K., 1994; Vol. 1 and 2.
- Stochmal, A.; Oleszek, W.; Leitz, R. E.; Di Paola, P. Saponin and flavonoid profiles of 47 alfalfa varieties of different origin. *Book of Abstracts of Annual Phytochemical Society of Europe Meeting*; IUNG: Pulawy, Poland, 1999; p 30.
- Stochmal, A.; Piacente, S.; Pizza, C.; De Riccardis, F.; Leitz, R.; Oleszek, W. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Flavonoids. 1. Apigenin and Luteolin Glycosides from Aerial Parts. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 753–758.
- Stochmal, A.; Simonet, A. M.; Macias, F. A.; Oliveira, M. A.; Abreu, J. M.; Nash, R.; Oleszek, W. Acylated apigenin glycoside from alfalfa (*Medicago sativa*) var. Artal. *Phytochemistry* **2001**, *8*, 1223–1226.
- Markham, K. R. Flavones, Flavonols and their Glycosides. In *Methods in Plant Biochemistry. Vol. 1. Plant Phenolics*; Dey, P. M., Harborne, J. B., Eds.; Academic Press: London, U.K., 1989; pp 197–235.
- Roitman, J. N.; James, L. F. Chemistry of toxic range plants. Highly oxygenated flavonol methyl ethers from *Gutierrezia microcephala*. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 835–848.
- Mabry, T. J.; Markham, K. R.; Thomas, M. B. *The Systematic Identification of Flavonoids*; Springer-Verlag: New York, 1970.
- Agrawal, P. K., Ed. *Carbon-13 NMR of Flavonoids*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1989.
- Harborne, J. B.; Hall, E. Plant Polyphenols—XII. The occurrence of tricetin and of glycoflavones in grasses. *Phytochemistry* **1964**, *3*, 421–428.
- Ibrahim, R.; Barron, D. Phenylpropanoids. In *Methods in Plant Biochemistry. Vol. 1. Plant Phenolics*; Dey, P. M., Harborne, J. B., Eds.; Academic Press: London, U.K., 1989; pp 75–111.

Received for review May 9, 2001. Revised manuscript received August 10, 2001. Accepted August 10, 2001. We are grateful to the Polish Committee of Science (KBN) for financial support (Grant 5P06A00718), to the Ministerio de Asuntos Exteriores (Spanish–Polish Joint Cooperation PO-1998), and to the European Commission, Program "Quality of Life and Management of Living Resources" (QLRT-2000-01967) UE.

JF010600X



Acylated apigenin glycosides from alfalfa (*Medicago sativa* L.) var. Artal

Anna Stochmal^{a,*}, Ana M. Simonet^b, Francisco A. Macias^b, Maria A. Oliveira^c,
Josi M. Abreu^c, Robert Nash^d, Wieslaw Oleszek^a

^aDepartment of Biochemistry, Institute of Soil Science and Plant Cultivation, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Pulawy, Poland

^bDepartamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, C/República Saharaui s/n, Apdo. 40,
11510-Puerto Real, Cádiz, Spain

^cInstituto Superior de Agronomia, Secção de Produção Animal, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal

^dInstitute of Grassland and Environmental Research, Plas Gogerddan, Aberystwyth, Cardiganshire SY23 3EB, UK

Received 27 February 2001; received in revised form 24 April 2001

Abstract

Three flavones, including 4'-*O*-[2'-*O*-*E*-feruloyl-*O*-β-D-glucuronopyranosyl(1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranoside]apigenin, 7-*O*-β-D-glucuronopyranosyl-4'-*O*-[2'-*O*-*E*-feruloyl-*O*-β-D-glucuronopyranosyl(1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranoside]apigenin and 7-*O*-β-D-glucuronopyranosyl-4'-*O*-[2'-*O*-*p*-*E*-coumaroyl-*O*-β-D-glucuronopyranosyl(1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranoside]apigenin have been identified in alfalfa var. Artal. The known flavone 7-*O*-[2'-*O*-*E*-feruloyl-β-D-glucuronopyranosyl(1→3)]-*O*-β-D-glucuronopyranosyl (1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranoside apigenin was also isolated. The structures of these compounds were deduced on the basis of their spectral data. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Medicago sativa*; Aerial parts; Acylated apigenin glucuronides

1. Introduction

Alfalfa is a pasture crop rich in good quality protein. Its nutritional value has been, however, influenced by the presence of secondary metabolites including saponins and flavonoids. While saponins have been extensively studied (Oleszek, 2000), very little is known on alfalfa flavonoids (Bisby et al., 1994). In our preliminary HPLC screening of 50 alfalfa varieties obtained from USDA stocks it was clear that flavonoid profiles of all tested samples contained a number of glycosides and were, with some exceptions, very similar to each other (Stochmal et al., 1999). From the Polish variety Boja several novel, acylated with ferulic and coumaric acids apigenin and luteolin glycosides have been isolated and fully characterized (Stochmal et al., 2001). All these flavonoids had only glucuronic acid in the sugar moiety and the acylation occurred on the sugar attached at C-7 of the aglycone. The HPLC profile of the variety Artal showed some dissimilarities with other cultivars and

thus, the aim of the present work was to isolate and chemically characterize the unknown compounds.

2. Results and discussion

Preliminary analyses with HPLC (diode array detection) of flavonoids in the aerial parts of alfalfa var. Artal indicated the presence of several flavones, out of which, the one dominant and two minor compounds had UV spectra identical to apigenin glycosides, but their retention times were different from the others so far characterized. The column chromatography of a purified flavonoid fraction afforded four compounds, which were fully characterized by spectral techniques. Compound **4** was identified as 7-*O*-[2'-*O*-*E*-feruloyl-β-D-glucuronopyranosyl(1→3)]-*O*-β-D-glucuronopyranosyl (1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranoside apigenin by comparison of its NMR and FAB-MS spectra with previously reported literature data (Stochmal et al., 2001).

Compound **1** gave a molecular ion (ESI-*HRMS*, negative ion mode) at *m/z* 797.1575, which together with the ¹H and ¹³C NMR spectral data (Tables 1 and 2) was consistent with the empirical formula C₃₇H₃₄O₂₀.

* Corresponding author. Tel. +48-81-8863421; fax +48-81-8864547.

E-mail address: asf@iung.pulawy.pl (A. Stochmal).

Table 1
¹H NMR data of flavonoids 1–3 (CD₃OD)

H	1 ^a	2	3
Apigenin			
3	6.87 <i>s</i>	6.61 <i>s</i>	6.61 <i>s</i>
6	6.19 <i>d J</i> =1.9	6.48 <i>d J</i> =2.0	6.46 <i>d J</i> =2.0
8	6.51 <i>d J</i> =1.9	6.79 <i>d J</i> =2.0	6.78 <i>d J</i> =2.0
2' and 6'	7.98 <i>d J</i> =8.7	7.84 <i>d J</i> =9.0	7.83 <i>d J</i> =9.0
3' and 5'	7.10 <i>d J</i> =8.7	7.15 <i>d J</i> =9.0	7.14 <i>d J</i> =9.0
Glucuronic acids			
1	5.32 <i>d J</i> =7.4	5.37 <i>d J</i> =7.1	5.35 <i>d J</i> =6.8
2	3.56 <i>brdd</i>	3.74 <i>dd J</i> =7.1, 5.1	3.73 <i>dd J</i> =7.1, 6.8
3	3.40 (o)	3.62 (o)	3.63 (o)
4	3.40 (o)	3.62 (o)	3.63 (o)
5	3.97 <i>brd</i>	4.01 <i>d J</i> =9.8	4.06 <i>d J</i> =9.5
1'	4.93 <i>d J</i> =8.2	5.09 <i>d J</i> =7.8	5.07 <i>d J</i> =8.1
2'	4.64 <i>dd J</i> =8.7, 8.2	4.90 <i>dd J</i> =9.0, 7.8	4.92 <i>dd J</i> =8.8, 8.1
3'	3.40 (o) ^b	3.66 <i>dd J</i> =9.0, 9.0	3.68 <i>dd J</i> =9.0, 8.8
4'	3.40 (o) ^b	3.62 (o)	3.63 (o)
5'	3.71 <i>brd</i>	3.87 <i>d J</i> =9.5	3.91 <i>d J</i> =9.3
1''		5.18 <i>d J</i> =7.6	5.19 <i>d J</i> =7.6
2''		3.57 <i>brdd</i>	3.58 <i>brdd</i>
3''		3.62 (o)	3.63 (o)
4''		3.62 (o)	3.63 (o)
5''		4.07 <i>d J</i> =9.0	4.12 <i>d J</i> =9.5
Phenolic acid			
2	7.26 <i>d J</i> =1.9	7.07 <i>d J</i> =2.0	7.40 <i>d J</i> =8.5
3	–	–	6.74 <i>d J</i> =8.5
5	6.77 <i>d J</i> =8.2	6.73 <i>d J</i> =8.3	6.74 <i>d J</i> =8.5
6	7.08 <i>dd J</i> =8.2, 1.9	6.99 <i>dd J</i> =8.3, 2.0	7.40 <i>d J</i> =8.5
7	7.50 <i>d J</i> =15.8	7.53 <i>d J</i> =15.9	7.58 <i>d J</i> =15.9
8	6.41 <i>d J</i> =15.8	6.25 <i>d J</i> =15.9	6.30 <i>d J</i> =15.9
OCH ₃	3.80 <i>s</i>	3.84 <i>s</i>	–

^a DMSO-*d*₆.

^b (o) Overlapped with other signals.

The downfield region of the ¹H NMR spectrum (Table 1) showed two spin systems correlated by ¹H–¹H shift correlation (COSY): an AA'BB' system at δ 7.98 (*d*, 8.7 Hz, H-2' and H-6') and δ 7.10 (*d*, 8.7 Hz, H-3' and H-5'), and an AB system at δ 6.51 (*d*, 1.9 Hz, H-8) and δ 6.19 (*d*, 1.9 Hz, H-6). These two systems together with a singlet at δ 6.87 (H-3) indicated the presence of an apigenin aglycone in compound **1** (Stochmal et al., 2001). The UV and ¹³C NMR (Table 2) spectra and the ROE correlations between the H-2'/H-6' signal and the H-3 signal of the apigenin confirmed this structure.

The other group of signals in the downfield region of the ¹H NMR spectrum corresponded to a phenolic acyl moiety. An ABX system at δ; 7.26 (*d*, 1.9 Hz, H-2); δ 7.08 (*dd*, 8.2 Hz, 1.9 Hz, H-6) and δ; 6.77 (*d*, 8.2 Hz, H-5), and two doublets at δ 7.50 (H-7) and δ 6.41 (H-8) with a coupling constant of 15.8 Hz typical of an *E*-double bond were observed. The ROE correlation between a methoxyl group signal at δ 3.80 (*s*) with H-2 and the correlation between the double bond signals and the aromatic protons H-2 and H-6 (Fig. 1) sug-

Table 2
¹³C NMR data of flavonoids 1–3 (CD₃OD)

C	Apigenin			Glucuronic acids			Phenolic moiety				
	1	2	3	C	1	2	3	C	1	2	3
2	166.1	165.9	166.0	1	99.7	99.1	99.4	1	127.8	127.8	127.3
3	104.8	104.9	105.0	2	82.9	82.6	82.9	2	111.7	111.6	131.2
4	183.9	184.0	184.0	3	76.5	76.4	76.5	3	149.3	149.2	116.7
5	163.2	162.9	162.8	4	72.8	72.9	72.9	4	150.5	150.6	161.2
6	100.2	101.3	101.2	5	76.1	76.2	76.1	5	116.4	116.4	116.7
7	165.5	164.5	164.5	6	172.5	172.6	172.6	6	124.2	124.2	131.2
8	95.1	96.0	95.9	1'	102.7	101.6	102.3	7	147.0	146.9	146.7
9	159.4	158.9	158.9	2'	75.2	75.2	75.2	8	115.7	115.5	115.4
10	105.4	107.3	107.3	3'	75.9	75.9	75.9	9	168.7	168.6	168.7
1'	126.1	125.8	125.8	4'	73.4	73.4	73.4	OCH ₃	56.4	56.4	–
2'	129.1	129.2	129.3	5'	75.9	75.9	76.2				
3'	117.9	117.9	117.9	6'	172.5	172.6	172.6				
4'	161.3	161.4	161.4	1''		101.3	101.3				
5'	117.9	117.9	117.9	2''		8.1	8.1		74.4	74.4	
6'	129.1	129.2	129.3	3''		77.3	77.3				
				4''		73.1	73.0				
				5''		76.6	76.7				
				6''		173.0	172.8				

gested the presence of a ferulic acyl moiety, confirmed with the presence of nine signals in the ¹³C NMR spectrum (Ibrahim and Barron, 1989) (Table 2).

The sugar region of the ¹H NMR spectrum showed the presence of two sugar units, with anomeric proton signals at δ 5.32 (*d*, 7.4 Hz, H-1) and δ 4.93 (*d*, 8.2 Hz, H-1'). The ¹³C NMR spectrum showed 12 signals for two hexose units. Two typical C-6 signals of carboxyl groups at δ 172.5 suggested two glucuronic acid moieties. Their β-configuration was evident from the coupling constant of the anomeric protons.

The connection between the glucuronyl moieties and apigenin was established as 4'-[glucuronopyranosyl (1→2)glucuronopyranosyl] apigenin, from the observed ROE correlation between H-3' and H-5' of apigenin and H-1 of the first glucuronic acid and H-2 and H-1' of both glucuronic acids. The pronounced downfield shift of H-2' of the second glucuronic acid (δ 4.64) indicated the linkage between the sugar and the acyl moiety at C-2', and thus **1** is 4'-*O*-[2'-*O*-*E*-feruloyl-*O*-β-D-glucuronopyranosyl(1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranoside]apigenin.

Compound **2** showed a molecular ion (ESI–HRMS, negative ion mode) at *m/z* 973.1903 according with a molecular formula C₄₃H₄₁O₂₆ and peak at 269.0452 corresponding to the aglycone. The ¹H and ¹³C NMR spectra of **2** (Tables 1 and 2) were very similar to those of compound **1**. The additional signals that appeared in its spectra corresponded to a third glucuronic acid moiety. The observed ROE correlation between H-6 and H-8 of the apigenin moiety and H-1'' of the third glucuronic acid determined the structure of **2** as 7-*O*-β-D-glucuronopyranosyl-4'-*O*-[2'-*O*-*E*-feruloyl-*O*-β-D-glucuronopyranosyl(1→2)-*O*-β-D-glucuronopyranoside]apigenin.

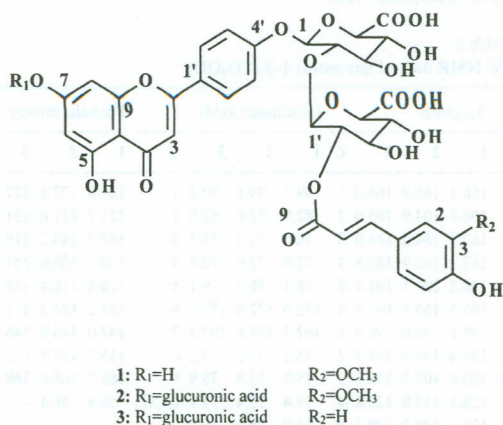


Fig. 1. Chemical formula of compounds 1–3.

Compound 3 gave a molecular ion (ESI–HRMS, negative ion mode) at m/z 943.1765 with a molecular formula $C_{42}H_{40}O_{26}$ and peak at 269.0470 corresponding to the aglycone. The only spectroscopic difference between the spectra of compounds 2 and 3 was in the phenolic moiety signals, the 1H NMR spectrum (Table 1) of 3 had two doublets δ 7.40, d , 8.5 Hz, H-2 and H-6 and δ 6.74, d , 8.5 Hz, H-3 and H-5) typical of a *p*-coumaroyl moiety. The ^{13}C NMR spectrum (Table 2) was in agreement with the structure of the acyl moiety and the ROE effects observed confirmed an identical connection of apigenin, glucuronic acids and coumaroyl moiety as compound 2. The structure of 3 was established as 7-*O*- β -D-glucuronopyranosyl-4'-*O*-[2'-*p*-*E*-coumaroyl-*O*- β -D-glucuronopyranosyl (1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside]apigenin.

As far as we know, the three flavone glycosides (1, 2 and 3) are reported here for the first time as natural compounds. They, similarly to previous identified apigenin glycosides in alfalfa (Stochmal et al., 2001), possess glucuronic acid as a sole sugar subunit in the sugar chain, and acylation with ferulic and coumaric acids occurred on the glucuronic acid moieties. However, the difference with previously identified compounds is in the acylation position. The three identified glycosides are acylated on sugars attached at C-4', while all previously reported compounds were acylated on sugars at C-7. These differences may be specific for this particular variety or they may reflect the influence of environmental conditions. Plant material from which present flavonoids were separated was collected from plants grown in Portugal. The four isolated compounds were tested for their antioxidant activity in β -carotene/linoleic acid heterogeneous system (Pratt, 1992), and for radical scavenging activity in methanolic solution of DPPH (Lee et al., 1998). They showed no activity in both tests performed. More research is needed, in order to shed some light on the function of acylated glucuronides in the host plant on their adaptation to environmental conditions.

3. Experimental

3.1. General

Flavonoids were chromatographed on Cellulose (Merck) ready to use plates, developed with 15% AcOH and after drying plates were observed under a UV lamp. High-performance liquid chromatography was performed on an HPLC system (Waters) consisting of 616 pump, a 600 s controller, and a 996 photodiode array detector. The Millennium Chromatography Manager was used to monitor chromatographic parameters and to process the data.

1H , ^{13}C and 2D NMR spectra were recorded in CD_3OD and $DMSO-d_6$ on a Varian UNITY-400 instrument operating at 400 MHz for 1H NMR and 100 MHz for ^{13}C NMR. Chemical shifts are reported in ppm (δ). ESI–HRMS were recorded in the negative ion mode on a Mariner Biospectrometry Workstation (Per Septive Biosystems). UV spectra were recorded on a HP 8453 UV/vis spectrophotometer. The α values were obtained in MeOH at 20°C on a Jasco P-1020 spectropolarimeter. Melting points were uncorrected.

3.2. Plant material and isolation

The lucerne var. Artal (American variety) was seeded in March 1999 in the north of Portugal, at Vairco (near Porto), and the samples were collected on the 23 August 1999, and they were from a 2nd harvest. The material was freeze dried, powdered and used for extraction.

Powdered plant material was extracted in a Soxhlet with chloroform to remove chlorophyll and fats. After drying it was extracted with 70% MeOH at room temperature. After filtration the extract was evaporated in vacuo (40°C) yielding a brown solid. The solid was suspended in water and loaded onto a C18 filled column (30 \times 70 mm, 60 μ m, Baker) equilibrated with water. The column was washed with water to remove carbohydrates, and flavonoids were washed out with 40% MeOH. The 40% MeOH fraction was evaporated to dryness, redissolved in 20% MeOH and loaded onto a C18 column (40 \times 300 mm, 25–40 μ m, Merck). The column was washed with MeOH–H₂O (linear gradient 20–70% MeOH) and 10 ml fractions were collected with a fraction collector. Fractions showing identical chromatographic characteristics (TLC, HPLC) were combined. Four single flavonoids were obtained.

3.2.1. 4'-*O*-[2'-*O*-*E*-Feruloyl- β -D-glucuronopyranosyl (1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucuronopyranoside]apigenin (1)

Amorphous yellow powder (15 mg); mp. 197–198°C; UV λ_{max}^{MeOH} nm: 271 *sh*, 325; $[\alpha]_D^{20}$ –74.2° (MeOH, *c* 0.1); HRMS m/z : 797.1575 [calc. for $C_{37}H_{33}O_{20}$ [M-1]⁻, 797.1560], 269.0457 [M-H-ferulic acid-2GluA]⁻. For 1H and ^{13}C NMR see Tables 1 and 2, respectively.

3.2.2. 7-O- β -D-Glucuronopyranosyl-4'-O-[2'-O-E-feruloyl-O- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)]-O- β -D-glucuronopyranoside]apigenin (2)

Amorphous yellow powder (3 mg); mp. 197–198°C; UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm: 270 sh, 319; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -10.23° MeOH, *c* 0.1); HRMS *m/z*: 973.1903 [calc. for C₄₃H₄₁O₂₆ [M-1]⁻, 973.1881], 269.0452 [M-H-ferulic acid-3GluA]⁻. For ¹H and ¹³C NMR see Tables 1 and 2, respectively.

3.2.3. 7-O- β -D-Glucuronopyranosyl-4'-O-[2'-*p*-E-coumaroyl-O- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)]-O- β -D-glucuronopyranoside]apigenin (3)

Amorphous powder (3 mg); mp. 197–198°C; UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm: 272 sh, 314; α_{D}^{20} -52.45° $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ *c* 0.1); HRMS *m/z*: 943.1575 [calc. for C₄₂H₃₉O₂₅ [M-1]⁻, 943.1775], 269.0470 [M-H-coumaric acid-3GluA]⁻. For ¹H and ¹³C NMR see Tables 1 and 2, respectively.

3.2.4. 7-O-{2-E-Feruloyl-[β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucuronopyranosyl(1 \rightarrow 2)]-O- β -D-glucuronopyranoside}apigenin (4) (10 mg)

UV, HRMS and NMR data were in accordance with literature data (Stochmal et al., 2001).

Acknowledgements

The authors are grateful to the Polish Committee of Science (KBN) for financial support (grant no.

5P06A00718), to the Ministerio de Asuntos Exteriores (Spanish-Polish Joint Cooperation PO-1998) and the Comisión Interministerial de Ciencias y Tecnología (C.I.C.Y.T.; Project No. AGF97-1230-C02-02) Spain.

References

- Bisby, F.A., Buckingham, J., Harborne, J.B., 1994. Phytochemical Dictionary of the Leguminosae. Chapman and Hall, London, UK.
- Ibrahim, R., Barron, D., 1989. Phenylpropanoids. In: Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), Methods in Plant Biochemistry, Vol. 1. Plant Phenolics. Academic Press, London, UK, pp. 75–111.
- Lee, S.K., Mbwambo, Z.H., Chung, H.-S., Luyengi, L., Games, E.J.C., Metha, R.G., Kinghorn, A.D., Pezzuto, J.M., 1998. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Combin. Chem. High Throughput Screen* 1, 35–46.
- Oleszek, W., 2000. Alfalfa saponins: chemistry and application. In: Bidlack, W.R., Omaye, S.T., Meskin, M.S., Topham, D.K. (Eds.), *Phytochemicals as Bioactive Compounds*. Technomic Publishing, Lancaster-Basel, pp. 67–88.
- Pratt, D.E., 1992. Natural antioxidants from plant material. In: Huang, M.-T., Ho, C.-T., Lee, C.Y. (Eds.), *Phenolic Compounds in Food and their Effect on Health. II. Antioxidants and Cancer Prevention*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 54–71.
- Stochmal, A., Oleszek, W., Leitz, R.E., Di Paola, P., 1999. Saponin and flavonoid profiles of 47 alfalfa varieties of different origin. In: *Phytochem. Soc. Europe Meeting, Book of Abstracts*, p. 30.
- Stochmal, A., Piacente, S., Pizza, C., De Riccardis, F., Leitz, R., Oleszek, W., 2001. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. I. Apigenin and luteolin glycosides from aerial parts. *J. Agric. Food Chem.* 49, 753–758.

