

**INSTYTUT UPRAWY NAWOŻENIA I GLEBOZNAWSTWA –  
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY W PUŁAWACH**



**Iwona Kowalska**

**„ Skład i zawartość związków fenolowych w częściach  
nadziemnych *Medicago truncatula* Gaertner.”**

**Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biochemii  
i Jakości Plonów pod kierunkiem  
doc. dr hab. Anny Stochmal**

**Puławy 2009**

Składam serdeczne podziękowania  
Pani doc. dr hab. Annie Stochmal  
za życzliwość i cenne wskazówki  
podczas realizacji pracy.

Pragnę również podziękować wszystkim,  
którzy pomogli mi w przeprowadzeniu  
badań.

Autorka

<b>SPIS TREŚCI</b>	<b>Strona</b>
<b>I. WSTĘP</b> .....	5
1. <i>Medicago truncatula</i> (Gaertn.).....	5
2. Flawonoidy.....	10
2.1. Budowa chemiczna.....	10
2.2. Występowanie.....	12
2.3. Właściwości biologiczne.....	14
2.3.1. Rola flawonoidów w roślinach.....	14
2.3.2. Właściwości farmakologiczne i prozdrowotne.....	16
3. Metabolity wtórne występujące w roślinach <i>Medicago truncatula</i> i <i>Medicago sativa</i> .....	20
4. Polimorfizm występowania metabolitów wtórnych.....	21
<b>II. CEL PRACY</b> .....	24
<b>III. MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ</b> .....	25
1. Rozdział i oczyszczanie pojedynczych flawonoidów części nadziemnych.....	25
1.1. Materiał roślinny.....	25
1.2. Ekstrakcja.....	26
1.3. Rozdział ekstraktu części nadziemnych.....	26
1.4. Rozdział frakcji flawonoidowej.....	26
2. Ustalenie struktury wyizolowanych związków flawonoidowych.....	27
3. Analiza ilościowa związków flawonoidowych <i>M. truncatula</i> .....	29
3.1. Przygotowanie próbek roślinnych do analizy UPLC.....	29
3.2. Ultrasprawa chromatografia cieczowa (UPLC) flawonoidów części nadziemnych.....	30
<b>IV. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA</b> .....	31
1. Rozdział i oczyszczanie pojedynczych flawonoidów.....	31
2. Ustalenie struktury wyizolowanych związków.....	31
3. Analiza flawonoidów <i>M. truncatula</i> metodą chromatografii cieczowej.....	45

4.	Oznaczanie zawartości związków flawonoidowych w częściach nadziemnych badanych odmian <i>M. truncatula</i> .....	49
V.	<b>PODSUMOWANIE I WNIOSKI</b> .....	61
VI.	<b>LITERATURA</b> .....	63
VII.	<b>SPIS RYSUNKÓW I TABEL UMIESZCZONYCH W PRACY</b> .....	82

## I. WSTĘP

### 1. *Medicago truncatula* (Gaertn.)

Rośliny bobowate (*Fabaceae*), dawniej nazywane motylkowate (*Papilionaceae*), stanowią trzecią, co do wielkości rodzinę roślin zielnych oraz drugą pod względem wykorzystania w rolnictwie na świecie. Jako gatunki rolnicze odgrywają bardzo ważną rolę w płodozmianie, stanowią zielony nawóz, szeroko wykorzystywany do wzbogacania gleb w azot oraz stanowią ważny składnik w żywieniu ludzi i zwierząt. Duże znaczenie pokarmowe i paszowe bobowatych wynika z ich korzystnego składu biologicznego, zawartości dużej ilości dobrej jakości białka i błonnika oraz cennych makro- i mikroelementów [Graham i Vance 2003, Choi i in. 2004b, Dita i in. 2006].

Rodzaj *Medicago*, którego nazwa pochodzi od miasta Medea w Północnej Afryce, należy do rodziny bobowatych i obejmuje 34 gatunki jednoroczne i 22 wieloletnie [Lesins i Lesins 1979]. Rośliną wieloletnią będącą w wielu krajach strefy umiarkowanej główną rośliną pastewną jest lucerna siewna (*Medicago sativa* L.). Jest ona uprawiana od ponad 2000 lat. Arabowie, wieki temu, wykorzystywali lucernę jako paszę dla koni. Ponieważ sprawiała ona, że zwierzęta były wytrzymałe i rącze, nazwana została „*Al-Fac-Facah*” – najlepsza pasza [Castelman 1991]. W przeciwieństwie do większości roślin strączkowych nie tylko nasiona, ale całe rośliny lucerny (liście, kielki) są konsumowane. Ze względu na korzystny wpływ na zdrowie lucerna nosi miano „Father of all food” (podstawa wszelkiej żywności). Obecnie z uwagi na wysoki plon, rozprzestrzenienie, odporność na choroby oraz wartości paszowe nazywana jest królową roślin pastewnych (Queen of forages). Gatunkiem blisko spokrewnionym z lucerną siewną jest *Medicago truncatula* Gaertn. (w języku angielskim zwana „barrel medic” lub „barrel clover”) (Rys. 1).

Wywodzi się z basenu Morza Śródziemnego. Zbudowana jest z prostych, osiągających 10-60 cm wysokości, silnie rozgałęzionych łodyg o liściach pierzastozłożonych, trójlistkowych, czasami z ciemną plamką w centrum (zależnie od odmiany). Kwiaty ma żółte pojedyncze lub zebrane w mały kwiatostan. Owocem

lucerny są wielonasienne, brunatne strąki, wypełnione drobnymi, jasnobrązowymi nasionami, które charakteryzują się stosunkowo wysokim poziomem twardości [Hill i Donald 1998] oraz zawierają dużo cennego białka (35-45%), więcej niż groch czy bobik [Djemel i in. 2005].

**Rys. 1.** *Medicago truncatula* Gaertn.



*Medicago truncatula* jest rośliną jednoroczną, samopylną [Abranches i in. 2005], o dużej płodności i krótkim okresie wegetacyjnym [Choi i in. 2004a]. Powszechnie uprawiana jest w Australii (na powierzchni ponad 4,5 mln hektarów) [Hill i Donald 1998] oraz we Francji, z przeznaczeniem na paszę dla zwierząt lub do przemysłowego przetwarzania na koncentraty białkowe [Cook 1999]. Czynnikiem znacznie wpływającym na wielkość plonów *M. truncatula* są temperatura i ilość opadów. Maksymalne plony osiągnięte są przy rocznych opadach wynoszących 250-600 mm oraz gdy jest ciepłe lato i łagodna zima [Brandsaeter i in. 2002]. *M. truncatula* rośnie na glebach typu piaszczystego po gliniasty, o odczynie obojętnym do zasadowego (pH od 6 do 8) [Evans i in. 1990]. Zazwyczaj wysiewana jest w ilości 8-12 kg/ha [Fitzgerald 1994] na głębokości około 1-2 cm. Populacje tego gatunku wykazują znaczne zróżnicowanie fenotypowe takich cech jak: okres kwitnienia, specyficzność symbiotyczna oraz odporność na choroby [Bonin i in. 1996]. Ponadto korzenie tego gatunku są zasiedlane przez bakterie wiążące azot [Howieson i Ballard 2004, Nunes i in. 2008], jak również są kolonizowane przez grzyby mykoryzowe [Huhman

i Sumner 2002, Krajinski i Frenzel 2007]. Zidentyfikowano 568 genów odpowiedzialnych za kolonizację grzybów mykoryzowych na korzeniach *Medicago truncatula* [Schliemann i in. 2008].

Jednym z głównych celów nowych kierunków badawczych biologii molekularnej jest uzyskanie zdefiniowanych genomów roślin wyższych, w tym roślin bobowatych [Sumner i in. 2003]. Badania molekularne prowadzone na tych roślinach są niezmiernie trudne, ze względu na ich duży genom, który zawiera liczne sekwencje powtarzające się. Z tego powodu prowadzono poszukiwania odpowiedniego roślinnego materiału badawczego [Huhman i in. 2002, Somers i in. 2003]. Jako rośliny modelowe do badania rodziny bobowatych zainteresowanie wzbudziły: *Pisum sativum*, *Glycine max*, *Melilotus alba*, *Lotus japonicus* i *Medicago truncatula* [Valot i in. 2004].

W świecie botanicznym *M. truncatula* reprezentuje grupę organizmów najbardziej zaawansowanych ewolucyjnie. Została ona uznana za organizm modelowy do badań m.in. ze względu na niezwykle mały (około 470 Mbp), diploidalny genom ( $2n=16$  chromosomów) [Bonin i in. 1996, Cook 1999], łatwość w transformowaniu [Barker i in. 1990, Trieu i Harrison 1996, Trieu i in. 2000], krótki cykl życiowy [Colebatch i in. 2002] oraz bliskie pokrewieństwo do lucerny siewnej (*Medicago sativa*), której tetraploidalny i duży genom utrudnia badania molekularne (1510 Mbp). Geny *M. truncatula* wykazują wysoki stopień podobieństwa sekwencji do ich odpowiedników występujących w *M. sativa*. Gatunek ten jest, więc doskonałym modelem genetycznym dla lucerny siewnej, a także dla innych roślin bobowatych [Huhman i Sumner 2002].

Genom *M. truncatula* jest jednym z najmniejszych, po *Arabidopsis thaliana* (80 Mbp), genomów wśród badanych dotąd pod tym względem roślin kwiatowych. Osiemdziesiąt procent DNA stanowią sekwencje niepowtarzające się lub występujące w jednej lub kilku kopiach i są to w większości sekwencje kodujące białka. [Choi i in. 2004a].

*M. truncatula* jest obecnie przedmiotem dużego przedsięwzięcia w zakresie genetyki, mającego na celu uzyskanie pełnego obrazu organizacji materiału genetycznego. Prace prowadzone są głównie w celu identyfikacji sekwencji

kodujących (ESTs – expressed sequence tags), mapowania genów, przypisania funkcji poszczególnym genom roślinnym, a także zlokalizowania ich ekspresji na poziomie tkanki i komórki [Bell i in. 2001, Lamblin i in. 2003]. Równolegle do prac nad sekwencjonowaniem poszczególnych genów *M. truncatula* prowadzi się badania w celu określenia funkcji genów oraz jednoczesnego profilowania i identyfikacji dużej liczby produktów ekspresji. Cele te są realizowane poprzez analizę ekspresji genów na poziomie transkrypcji mRNA [Kehoe i in. 1999], ekspresji i aktywności białek [Mathesius i in. 2001, Asirvatham i in. 2002] oraz monitorowania i identyfikacji metabolitów wtórnych [Trethewey i in. 1999, Fiehn i in. 2000].

Zasadnicze zmiany w profilach metabolitów wtórnych występujących w różnych organach poszczególnych gatunków roślin obserwowane są pod wpływem różnych stresów środowiskowych m.in. deficyt wody, temperatura, promieniowanie UV, oddziaływanie z mikroorganizmami [Glassbrook i Ryals 2001]. Regulacja akumulacji wtórnych metabolitów odbywa się poprzez kontrolę ekspresji odpowiednich genów oraz różnego rodzaju modyfikacje poszczególnych związków [Kączkowski 1985]. Prowadzone są także analizy zmian wywołanych wprowadzeniem w roślinach modyfikacji genetycznych lub pojedynczych mutacji w transformowanych genach [Dixon i Steele 1999, Yu i in. 2000]. Scharakteryzowano setki różnych mutacji *M. truncatula*. Dotyczą one niemal wszystkich części i organów rośliny. Wiele mutacji dotyczy enzymów różnych szlaków metabolicznych, takich jak fotosynteza czy synteza białek. Dotychczas zidentyfikowano ponad 300 białek pochodzących z różnych organów i tkanek *M. truncatula* [Watson i in. 2003]. Trzydzieści dziewięć procent to białka swoiste występujące tylko w pojedynczych tkankach. Udało się również scharakteryzować kilka enzymów biorących udział w szlakach biosyntezy lignin, tanin, flawonoidów i izoflawonoidów [Harrison i Dixon 1993, Suzuki i in. 2002, Xie i in. 2004]. Jednym z najlepiej poznanych enzymów uczestniczących w metabolizmie związków wtórnych jest amoniakoliaza fenyloalaniny (PAL), pełniąca podstawową rolę w szlaku biosyntezy związków fenolowych. Zmiany aktywności tego enzymu w tkankach roślinnych mają znaczenie dla kilku innych procesów m.in. takich jak: zmiany w tempie syntezy i degradacji innych enzymów, tworzenie nieaktywnych kompleksów PAL-inhibitor oraz



uwalnianie aktywnych enzymów [Podstolski 1983]. Obszerną klasę stanowią mutacje określane jako fizjologiczne lub hormonalne. Wpływają one przede wszystkim na zdolność rośliny do syntetyzowania regulatorów wzrostu, a także na zdolność do reagowania na nie [Penmetsa i Cook 2000, Wais i in. 2000].

Bardzo cenną zaletą wszystkich roślin bobowatych jest unikatowa w świecie roślin wyższych zdolność symbiotycznego wiązania azotu atmosferycznego, uczestniczą w nim zarówno geny pochodzenia bakteryjnego, jak i roślinnego. Kodują one cząsteczki enzymów odpowiedzialnych za przeprowadzenie kolejnych etapów powstawania brodawek [Graham i Vance 2000, Bell i in. 2001]. Proces ten zachodzi w wyniku symbiozy i przy współdziałaniu roślin oraz specyficznych bakterii znajdujących się w glebie. Ilość związanego tą drogą azotu jest znaczna i zależy głównie od rodzaju drobnoustroju, jego aktywności fizjologicznej, rośliny gospodarza oraz warunków środowiskowych. Najwięcej azotu wiążą bakterie symbiotyczne z rodziny *Rhizobiaceae* [Cook 1999, Natera i in. 2000]. Azot biologicznie związany przez rośliny i bakterie wykorzystywany jest, co jest warte podkreślenia, przez rośliny aż w 100%, podczas gdy z nawozów mineralnych tylko w około 50%. Negatywny wpływ na symbiozę ma wysoki poziom związków azotowych w glebie, gdyż powoduje on hamowanie aktywności bakteryjnej nitrogenazy i zmniejsza ilość brodawek na korzeniach [Martyniuk i in. 2005].

Symbioza między roślinami bobowatymi a rizobiami przynosi korzyści nie tylko roślinom korzystającym ze związków azotu dostarczanych przez mikrosymbionta, lecz również mikrosymbiontom kolonizującym tkanki roślin. System korzeniowy tych roślin stanowi dla rizobiów bardzo atrakcyjne i obfitujące w związki pokarmowe środowisko [Sturz i in. 1997, Wilson i in. 1998]. Rośliny bobowate wykształciły wiele mechanizmów ułatwiających bakteriom pokonanie barier i reakcji obronnych, które są aktywowane w kontakcie z bakteriami [Denton i in. 2007]. Wraz z fitoaleksynami i hydrolazami (chitynazy, glukonazy) rośliny te wydzielają do ryzosfery niskocząsteczkowe związki, takie jak cukry i kwasy organiczne, które mogą służyć bakteriom jako substancje odżywcze. W wydzielinach korzeniowych występują również flawonoidy nienależące do fitoaleksyn, które są atraktantami wywołującymi pozytywną reakcję chemotaktyczną rizobiów oraz pełnią

funkcję induktorów genów odpowiedzialnych za syntezę chitolipooligosacharydów, czyli czynników Nod [Spaink 2000, Knee i in. 2001].

Efektom złożonych oddziaływań roślin bobowatych, w tym *M. truncatula*, z mikroorganizmami było wykształcenie całej gamy szlaków biosyntetycznych związków naturalnych biorących udział zarówno we wzajemnych relacjach roślina-mikroorganizmy pożyteczne, jak i roślina-patogeny [Djemel i in. 2005]. Należą do nich szlak biosyntezy izoflawonoidów, substancji odpowiedzialnych za indukcję bądź supresję genów regulujących brodawkowanie i szlak syntezy fitoaleksyn indukowany w wyniku interakcji roślina-patogen [Lamblin i in. 2003]. Kontrola zmian zachodzących w szlakach metabolizmu jest niezwykle ważna, ponieważ na skutek działania różnych mechanizmów regulatorowych szereg enzymów posiadających określone funkcje wykazuje zmienioną poziom aktywności w roślinach.

## **2. Flawonoidy**

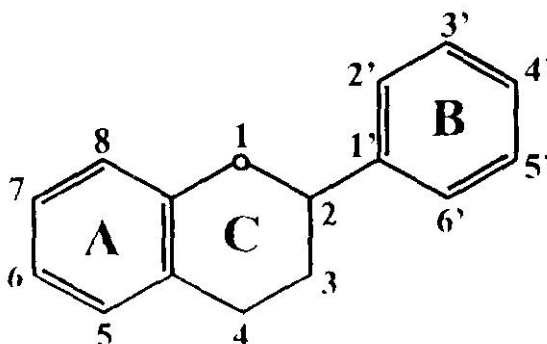
### **2.1. Budowa chemiczna**

Nazwa flawonoidy jest terminem określającym dużą grupę roślinnych metabolitów wtórnych należących do związków fenolowych. Stanowią jedną z najlepiej poznanych grup pod względem biosyntezy i roli w ewolucji roślin [Bors i in. 1996, Cooper-Driver i Bhattacharya 1998]. Za inicjowanie biosyntezy flawonoidów jest odpowiedzialny enzym - syntaza chalkonowa (CHS). Jego wytwarzanie jest zależne od czynników środowiskowych. Różne izoenzymy CHS reagują w zależności od stresu [Hrazdina i Zobel 1991]. Flawonoidy wytwarzane są przez retikulum endoplazmatyczne i po przyłączeniu glukozy przenoszone są przez drobne wakuole do wakuoli centralnej gdzie są magazynowane [Stern 1988]. Związki te mogą być również gromadzone na powierzchni tkanek [Wollenweber i Dietz 1981, Rhodes 1985].

Flawonoidy pod względem budowy chemicznej są grupą naturalnych pochodnych benzo- $\gamma$ -pironu [Diplock i in. 1998, Heim i in. 2002]. Z uwagi na strukturę i właściwości stanowią zróżnicowaną grupę niskocząsteczkowych związków o charakterze polifenolowym [Hollman i Katan 1999, Meng i Wang 2001]. Posiadają

one szkielet difenylopropanu (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) (Rys. 2) [Harborne i Williams 2000, Manach i in. 2005, Ramos 2007].

**Rys. 2.** Podstawowa struktura flawonoidów

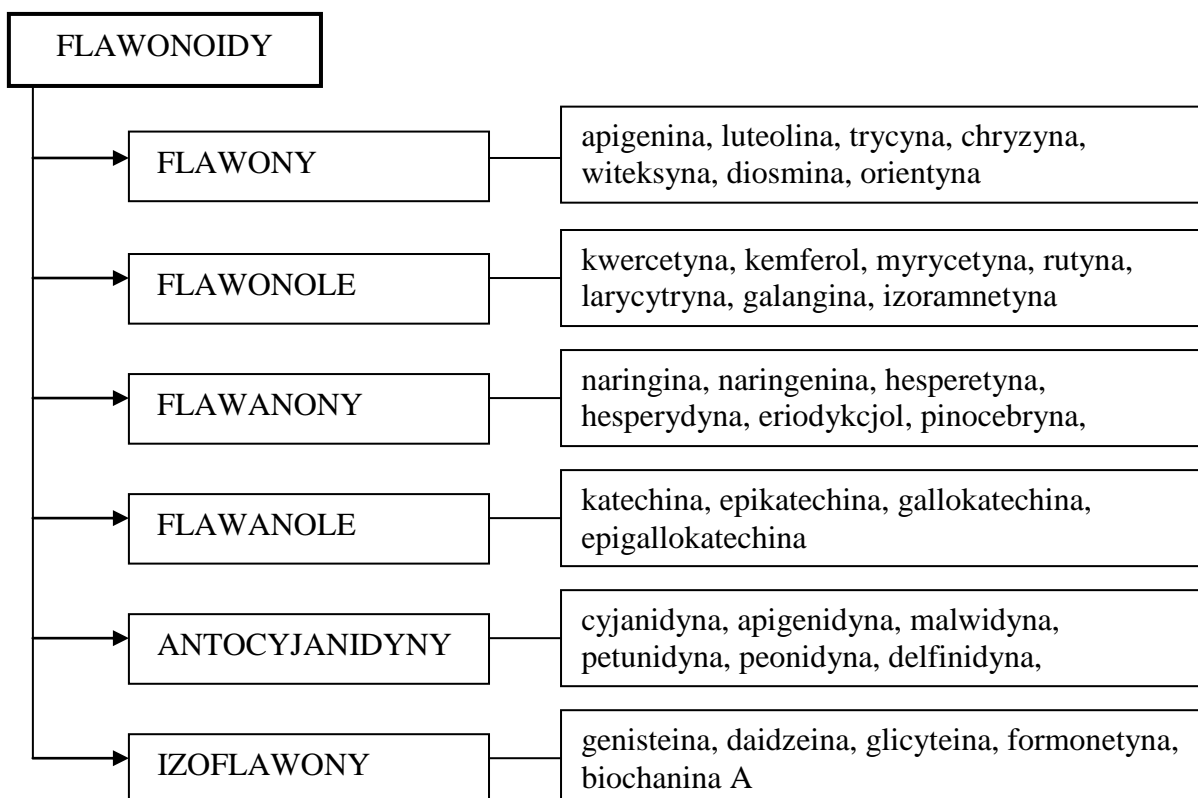


Ten podstawowy szkielet flawonoidów składający się z 15 atomów węgla można zinterpretować jako układ pierścienia benzoesowego (A), wywodzącego się biogenetycznie z trzech cząsteczek aktywnego octanu oraz układ C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (pierścien B+C) powstający na drodze przemian kwasu szikimowego [Dixon i in. 2002]. Większość flawonoidów charakteryzuje się obecnością pierścienia fenylowego B w pozycji C-2. Izoflawonoidy natomiast powstają przez izomeryczne przeniesienie pierścienia B z pozycji C-2 na C-3 [Messina 1999]. W większości flawonoidów występuje układ heterocykliczny między pierścieniami aromatycznymi A i B.

Flawonoidy występują w roślinach jako wolne aglikony lub też w połączeniu z cukrami w formie glikozydów [Cuyckens i Claeys 2004]. Większość flawonoidów ma postać *O*-glikozydów, a tylko niektóre połączone są przez atom węgla i mają postać *C*-glikozydów [Kazuno i in. 2005, Es-Safi i in. 2005]. Aktywność biochemiczną flawonoidów i ich pochodnych determinuje obecność i wzajemna orientacja grup czynnych, głównie hydroksylowych, metoksyłowych, metylowych i glikozydowych [Simons i in. 2005]. Często jedna lub więcej grup hydroksylowych jest metylowana, acylowana lub prenylowana [De Rijke i in. 2006, Winkel-Shirley 2006]. Rozpoznano ponad 9000 struktur tych związków [Harborne i Baxter 1999, Williams i Grayer 2004]. W zależności od struktury chemicznej wśród flawonoidów wyróżnia się kilka

głównych klas: flawony, flawonole, flawanony, flawanole, antocyjanidyny, izoflawonoidy (Rys. 3) [Peterson i in. 1998, Ross i Kasum 2002, Bosetti i in. 2005].

**Rys. 3.** Podstawowe klasy flawonoidów



## 2.2. Występowanie

Flawonoidy są substancjami fitochemicznymi występującymi głównie w świecie roślin i niemal wszystkie tkanki roślinne są zdolne do ich wytwarzania [Dixon i Paiva 1995, Shirley 1996, Taylor i Grotewold 2005]. Najczęściej występują w liściach i kwiatach; rzadziej spotyka się je w owocach, nasionach, korzeniach i pyłkach kwiatowych [Andreotti i in. 2006, Silva i in. 2006, Shirley 1998, Hertog i in. 1992]. Związki te są zwykle gromadzone w wakuoli komórkowej, przeważnie w połączeniu z cukrem. Flawonoidy są obecne w roślinie w mieszaninie i bardzo rzadko można znaleźć tylko jeden typ flawonoidu w tkance roślinnej [Wang i Huang 2004]. Różnorodność, jak i zawartość flawonoidów w danym surowcu jest zmienna i podlega silnym wpływom środowiska [Harborne 1984], które regulują aktywność genów

odpowiedzialnych za syntezę enzymów uczestniczących w szlakach przemian metabolitów wtórnych [Kubasek i in. 1992, Dixon i Paiva 1995]. Wynikiem tego są okresowe zmiany akumulacji niektórych flawonoidów w liściach, zarówno w zależności od wieku liścia, jak i okresu wegetacji roślin [Kainulainen i in. 1998].

Ponad 400 gatunków znanych roślin zawiera flawonoidy [Wollenweber 1986]. Związki te są rzadko spotykane wśród bakterii, glonów, porostów i mszaków. Powszechne występowanie tych związków rozpoczyna się w układzie systematycznym u roślin naczyniowych od klasy paproci (*Filices*), u których najczęściej stwierdza się obecność *O*-glikozydów flawonoli, jak i *C*-metyloflawonoidów i chalkonów [Christensen i in. 1998].

Głównym źródłem flawonoidów są warzywa (m.in. cebula, kapusta, kalafior, brokuły, soja, soczewica), owoce (m.in. jagody, winogrona, jabłka, śliwki) [Lopez i in. 2001, Franke i in. 2004, Dragovic-Uzelac i in. 2007], herbata, kawa, kakao, czerwone wino [Middleton i in. 2000, Kelm i in. 2005, Schreier 2005, Aaby i in. 2005] oraz zioła (m.in. *Silybum marianum*, *Alpina officinarum*, *Hypericum perforatum*) [Scalbert i Williamson 2000, Liu i Zhu 2007].

W badaniach związanych z identyfikacją metabolitów wtórnych, w tym flawonoidów, wykorzystuje się techniki chromatograficzne z różnego rodzaju detektorami. Najprzydatniejszym typem detektora w tego typu analizach jest spektrometr mas. Wynika to z wysokiej czułości i możliwości jednoznacznej identyfikacji substancji na podstawie zarejestrowanych widm masowych [Glassbrook i Ryals 2001]. Połączenie spektrometru masowego z chromatografem cieczowym pozwala na analizę polarnych związków organicznych bez konieczności przeprowadzania substancji w różnego rodzaju pochodne. W chwili obecnej układy LC-MS są powszechnie stosowane do monitorowania obecności połączeń glikozydowych różnych klas metabolitów wtórnych występujących w materiale roślinnym [Stobiecki 2001]. Układy LC-ESI-MS wykorzystywano już wcześniej do identyfikacji glikozydów flawonoidów w materiale roślinnym różnego pochodzenia [Barnes i in. 1994, Justesen i in. 1998, Mauri i in. 1999].

## 2.3. Właściwości biologiczne

### 2.3.1 Rola flawonoidów w roślinach

W roślinach flawonoidy spełniają wielorakie funkcje fizjologiczne. Najlepiej udokumentowaną ze wszystkich funkcji, jakie pełnią związki flawonoidowe jest ich udział w oddziaływaniach rośliny gospodarza na czynniki biotyczne środowiska. Flawony i flawonole, obok antocyjanów, nadają zabarwienie płatkom kwiatów, owocom, liściom i nasionom [Reinli i Block 1996, Winkel-Shirley 2001]. Flawonoidy w membranach tylakoidów aktywnie uczestniczą w procesach fotosyntezy jako katalizatory transportu elektronów, ale także chronią układ fotosyntetyczny i DNA przed szkodliwym działaniem promieniowania słonecznego [Jansen i in. 1998]. Wykazano, że mieszanina flawonoidów (głównie form 3-hydroksy i dihydroflawonoli, flawonów i flawonoli) w centralnej wakuoli komórki epidermy liści stanowi skuteczny filtr chroniący roślinę przed szkodliwym działaniem promieniowania UV-B (280-320 nm). Chroni to komórki przed destrukcją wynikającą z dimeryzacji zasad budujących DNA [Dixon i Paiva 1995, Takabe i in. 2001]. Flawonoidy, dzięki obecności licznych grup hydroksylowych, mogą absorbować ponad 90% promieniowania docierającego do tych komórek [Stafford 1991]. Promieniowanie UV-B ma bezpośredni wpływ na ekspresję genów szlaku fenylopropanoidów [Teramura i Sullivan 1994] i akumulację, między innymi, flawonoidów [Tevini i in. 1991]. Stwierdzono, że rośliny mogą reagować na działanie promieniowania UV-B zwiększonym wytwarzaniem wielu metabolitów wtórnych, w związku z tym zachodzą zmiany jakościowe i ilościowe w ich zawartości w komórkach epidermalnych [Teramura i Sullivan 1994, Mol i in. 1998]. Aktywacja dróg biosyntezy różnych związków flawonoidowych i wzrost ich zawartości w liściach wielu roślin pod wpływem UV może być ważną reakcją obronną na szkodliwe działanie tego promieniowania [Taylor i Grotewold 2005].

Absorpcja UV przez flawonoidy w płatkach kwiatowych służy jako przewodnik nektarowy, przyciągając ptaki i pszczoły, które są konieczne do wytwarzania i rozsiewania nasion. Wykazano, że rolę atraktanta pokarmowego w pojedynczej reakcji owad-roślina spełnia częściej mieszanina składników

chemicznych niż pojedynczy związek [Guerin i in. 1983] np. izokwercetyna i moryna są głównymi atraktantami dla jedwabnika. Flawony takie jak taksifolina, pinocebryna i dihydrokemferol działają jako atraktanty w stosunku do korników, natomiast chrząszcze żerujące na wierzbach są stymulowane do pobierania pokarmu m.in. przez powszechnie występujący w liściach 7-glukozyd luteoliny [Harborne 1997b].

Z drugiej strony flawonoidy są ważną grupą metabolitów wtórnych działających jako substancje odstraszające owady (repelenty). Stanowią one ważną barierę przeciwko żerowaniu owadów, głównie na roślinach okrytonasiennych. Właściwości takie wykazano między innymi w przypadku tanin, będących pochodnymi flawonoidów, a występujących powszechnie w stosunkowo dużych stężeniach w liściach roślin drzewiastych [Harborne 1997b, Berhow i Vaughn 1999].

Poza omówionymi wcześniej właściwościami flawonoidów zwraca się uwagę na ich rolę jako wewnętrznych czynników regulacyjnych - substancji przekaźnikowych w komórkach roślinnych. Tę właściwość flawonoidów wiąże się z ich wpływem na regulację poziomu kwasu indolilo-3-octowego (IAA) w komórce [Stafford 1991]. Monohydroksylowe formy flawonoidów są kofaktorami peroksydazy wchodzącej w skład kompleksu enzymatycznego oksydazy IAA, która jest odpowiedzialna za rozkład IAA w tkankach roślinnych, natomiast dihydroksyflawonoidy hamują aktywność tego enzymu [Powles 2004]. Ponadto wykazano, że zarówno mono-, jak i dihydroksylowe formy flawonoidów są inhibitorami transportu IAA przez błony komórkowe [Jacobs i Rubery 1988, Berleth 2007].

Jedną z istotnych ról, jakie przypisuje się flawonoidom, jest ich udział w reakcjach obronnych roślin przeciwko mikroorganizmom patogenicznym, gdyż odgrywają one ważną rolę w determinowaniu wrażliwości i odporności roślin na patogeny [Nicholson i Hammerschmidt 1992, Ielpo i in. 2000, Proestos i in. 2006]. Flawonoidy mogą oddziaływać bezpośrednio na mikroorganizmy patogeniczne niszcząc je [Weidenborner i Jha 1994, Aoki i in. 2000]. Antypatogeniczne właściwości tych związków mogą być związane z ich działaniem antyoksydacyjnym [Burda i Oleszek 2001], tj. zdolnością do usuwania reaktywnych form tlenu, które mogą być generowane przez patogeny, jak i przez rośliny w następstwie infekcji

[Jovanovic i in. 1994, Bors i in. 1997, Furusawa i in. 2005].

Flawonoidy mogą także pełnić funkcje sygnałów chemicznych dla innych organizmów uczestniczących w zjawiskach symbiozy i mikoryzy. W przypadku symbiozy korzeni roślin bobowatych z wiążącymi azot bakteriami związki flawonoidowe są substancjami sygnałnymi, uaktywniającymi w bakteriach gen brodawkowania [Cooper 2004, Ponce i in. 2004]. Szczepy *Rhizobium* dostosowane do współżycia z różnymi gatunkami roślin bobowatych są aktywowane przez flawonoidy, np. luteolina (flawon) inicjuje zasiedlanie korzeni lucerny przez *R. meliloti*, natomiast 4,7-dihydroksyflawon zasiedlenie korzeni koniczyny przez *R. trifolii* [Peters i Long 1988]. Wykazano, że flawonoidy takie jak kwercetyna, galaktozyd kwercetyny, kemferol stymulują kiełkowanie zarodników i wzrost grzybni niektórych grzybów wchodzących w symbiozę z korzeniami np. marchwi lub lucerny, co ułatwia m.in. pobieranie składników mineralnych z gleby i regulację gospodarki wodnej rośliny [Tsai i Phillips 1991, Rhlid i in. 1993].

Flawonoidy są związkami chemicznymi uczestniczącymi w zjawisku allelopatii, tj. wzajemnym oddziaływaniu między roślinami. Wydzielane przez korzenie i liście mogą działać jako inhibitory kiełkowania i rozwoju innych roślin [Harborne 1997, Mizutani 1999].

Związki flawonoidowe jako substraty peroksydaz, przyczyniają się do usuwania  $H_2O_2$  z komórek roślinnych. Wykazano również, że mogą one regulować aktywność wielu enzymów, w tym enzymów biorących udział w wytwarzaniu reaktywnych form tlenu, np. oksydazy ksantynowej, lipooksygenaz, peroksydaz [Cos i in. 1998].

### **2.3.2 Właściwości farmakologiczne i prozdrowotne**

Zarówno medycyna tradycyjna, jak i współczesna wykorzystuje ekstrakty z roślin do leczenia wielu schorzeń. Wykazano, stosując metody izolacji i identyfikacji związków aktywnych w ekstraktach z roślin, że są to, między innymi flawonoidy [Kohlmunzer 1993, Bruneton 1995]. Działanie farmakologiczne i lecznicze flawonoidów na organizm zależy w znacznym stopniu od ich rozpuszczalności w



płynach ustrojowych i od biodostępności w warunkach *in vivo* [Siess i in. 1998, Bowey i in. 2003, Halaweish i in. 2003].

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 [Middleton i Kandaswami 1994, Havsteen 2002], szczególnie w chorobach wieńcowych [Keli i in. 1996, Hertog i in. 1997], w schorzeniach przewodu pokarmowego, głównie wątroby oraz dolegliwościach wieku starczego [Commenges i in. 2000, Ishige i in. 2001, Powles 2004]. Pozytywny wpływ flawonoidów na uszczelnianie i wzmacnianie ścian naczyń krwionośnych to jedno z lepiej udokumentowanych działań tych związków. Takie właściwości wykazuje m.in. rutyna i jej pochodne, które w połączeniu z witaminą C biorą udział w tworzeniu poprzecznych wiązań pomiędzy łańcuchami polipeptydowymi włókien kolagenu i w ten sposób uelastyczniają oraz wzmacniają tkankę łączną. Znalazły one zastosowanie jako środki zapobiegające uczuleniom, krwawieniom z mózgu i siatkówki, w leczeniu nadciśnienia i miażdżycy.

Związki flawonoidowe wykazują także działanie diuretyczne, spazmolityczne, m.in. na mięśnie gładkie naczyń krwionośnych [Nadrożna i Mądrzak 1999], przeciwzapalne, przeciwbakteryjne [Hanasaki i in. 1994]. Niektóre flawonoidy działają moczopędnie (np. mirycetyna i moryna), a siła ich działania zależy od liczby grup hydroksylowych w cząsteczce. Najczęściej wykorzystywanymi surowcami roślinnymi są liście brzozy, ziele pokrzywy i skrzypu [Glinka i Ochocki 2004]. Stwierdzono, że wiele związków flawonoidowych ma działanie rozkurczające na mięśnie gładkie, przeciwrzybicze, estrogenne [Adlercreutz i Mazur 1997, Dixon 1999] oraz przeciwalergiczne [Miean i Mohamed 2001, Manach i in. 2005]. Duże znaczenie w leczeniu chorób alergicznych mają flawonoidowe surowce zielarskie, np. ziele fiołka trójbarwnego, liść brzozy, ziele nawłoci, liście i owoce czarnej porzeczki, owoce bzu czarnego, aronii oraz czarnej jagody [Gu i in. 2004].

Flawonoidy budzą zainteresowanie jako aktywne związki przeciwko AIDS i chorobom nowotworowym [Mak i in. 2006, Bayard i in. 2007]. Działanie antykancerogenne tych związków (głównie flawonów, flawanonów, katechin i proantocyjanidyn) wynika głównie z ich właściwości przeciwutleniających,

zdolności do modulacji aktywności enzymów, blokowania receptorów hormonów oraz ograniczania aktywności mutagenów [Knekt i in. 1997]. Badania przeprowadzone *in vitro* wykazały, że np. kwercetyna posiada zdolność hamowania wzrostu wielu linii komórek nowotworów ludzi, takich jak nowotwory okrężnicy, płuc [Arts i Hollman 2005], piersi i jajników [Cai i in. 1997, Trevisanto i Kim 2000]. Jako inhibitor odwrotnej transkryptazy wykazuje spowalniający wpływ na namnażanie wirusa HIV. Ponadto jest ona również inhibitorem integrasy - enzymu odpowiedzialnego za włączanie wirusowego DNA do chromosomów gospodarza oraz proteiny wirusa HIV, która bierze udział w procesie dojrzewania wirusa [Malińska i Kiersztan 2004, Asres i in. 2005]. Genisteina, daidzeina i ich pochodne cukrowe zawarte w soi i produktach sojopochodnych zapobiegają powstawaniu nowotworów piersi oraz hamują wzrost raka prostaty i żołądka [Dixon i Steele 1999].

Związki flawonoidowe są inhibitorami wielu enzymów m.in.  $\beta$ -glukuronidazy [Kim i in. 1994], lipooksygenazy [Schewe i in. 2002], cyklooksygenazy [Leughton i in. 1991], monooksygenazy [Siess i in. 1995], peroksydazy tarczycowej [Doerge i Chang 2002], oksydazy ksantynowej [Sheu i in. 1998], fosfolipazy A<sub>2</sub> [Gil i in. 1994] oraz kinazy białkowej [Cushman i in. 1991].

Właściwości oksydacyjno-redukcyjne flawonoidów wpływają hamująco na agregację płytek krwi, poprzez przerywanie łańcuchowej reakcji utleniania lipidów, inicjowanej przez wolne rodniki tlenowe [Rice-Evans 2000]. Flawonoidy jako antyoksydanty wywierają ochronny wpływ na  $\alpha$ -tokoferol [Mukai i in. 2005], witaminę C, wielonienasycone kwasy tłuszczowe i lipoproteiny [Liu i in. 2000]. Ponadto mają zdolność do łączenia się z metalami ciężkimi, co ma bezpośredni wpływ na detoksykację organizmu ze szkodliwych pierwiastków [Havsteen 2002].

Liczne preparaty farmaceutyczne zawierające kompleksy flawonoidowe (tzw. bioflawonoidy), są uważane za czynniki witaminowe (witamina P). Często stosuje się preparaty zawierające flawonoid i witaminę C (np. Rutinoscorbin). Tego typu preparaty są stosowane w leczeniu schorzeń żył i zaburzeń w mikrokrążeniu. W badaniach epidemiologicznych wykazano odwrotną zależność pomiędzy wysokim spożyciem flawonoidów, zawartych w warzywach i owocach, a nawet w winie z czerwonych winogron, a częstością choroby niedokrwiennej serca [Wilska-Jeszka

i Podsądek 2001, Riboli i Norat 2003]. Dienne zapotrzebowanie na przeciwutleniacze w postaci flawonoidów i naturalnych witamin, zapewnia spożycie 1,5 kg świeżych owoców i 2 kg świeżych warzyw dziennie, pochodzących z czystych ekologicznie upraw (zalecana dzienna dawka flawonoidów to 1-2 gramy). Według statystyk spożywamy 1/5 tej dawki. Znakomitym środkiem stosowanym w suplementacji diety we flawonoidy są preparaty Flavon Max i Flavon Max Plus. Jedno opakowanie preparatu Flavon pokrywa miesięczne zapotrzebowanie na niezbędne dla zdrowia flawonoidy. Wyciąg z roślin wchodzących w skład preparatu zawiera łącznie ok. 400 aktywnych składników znajdujących również zastosowanie w kosmetyce. Poprawiają one nawilżenie skóry, odtwarzają jej przeciwbakteryjną barierę ochronną, wygładzają skórę oraz pobudzają wzrost jej komórek. Działają osłaniająco, ściągająco oraz przeciwobrzękowo. Stosowane są także w leczeniu trądziku, zaskórników i łupieżu. Zapobiegają łysieniu i tworzeniu się zmarszczek [Galikowska-Gula 2006].

Flawonoidy, jako związki o silnej aktywności biologicznej oddziałują także bezpośrednio na organizm zwierząt. Mechanizmy działania tych związków są złożone, podobnie jak w przypadku innych rodzajów dodatków do pasz. Dodatek wyciągów z jabłek oraz z ciemnych winogron (bogatych zwłaszcza w katechiny i taniny) do karmy młodych prosiąt, po zmianie diety z mlecznej na roślinną, ma korzystny wpływ na morfologię kosmków jelitowych i funkcjonowanie jelitowej tkanki limfatycznej [Sehm i in. 2006]. Bogate we flawonoidy oraz kwasy fenolowe ekstrakty z trzciny cukrowej (*Saccharum officinarum* L.) powodują korzystne zmiany histologiczne w przewodzie pokarmowym kurcząt (m.in. zwiększenie długości i powierzchni kosmków jelitowych), istotną poprawę wzrostu zwierząt oraz lepsze wykorzystanie paszy [Yamauchi i in. 2006].

Flawonoidy z zielonej herbaty (głównie katechiny) hamują rozwój szkodliwej mikroflory jelitowej (m.in. *Clostridium perfringens*) i stymulują równocześnie wzrost dobroczynnych bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* [Okubo i Oura 1992]. U kurcząt ograniczają zahamowanie wzrostu spowodowane indukowanym stresem oksydacyjnym, a u głodzonych szczurów zapobiegają skracaniu się kosmków jelitowych [Asfar i in. 2003].

Bogatym źródłem izoflawonów jest soja, zawierająca głównie genisteinę i daidzeinę. W układzie pokarmowym, przy udziale mikroorganizmów, są one pozbawiane grup cukrowych i metabolizowane do bardziej aktywnych biologicznie związków. Izoflawony sojowe mają przy tym działanie prebiotyczne. Stwierdzono, że daidzeina stymuluje wzrost bakterii z rodzaju *Lactobacillus* [Han i in. 2006].

### **3. Metabolity wtórne występujące w roślinach *Medicago truncatula* i *Medicago sativa***

W przypadku *Medicago truncatula* niewiele jest danych w literaturze dotyczących fitochemii tego gatunku. Pierwsze wyniki badań nad występowaniem metabolitów wtórnych w *M. truncatula* pojawiły się w 2002 roku i dotyczyły saponin korzeni tego gatunku. Huhman i Sumner [2002] wykorzystując spektrometrię mas na podstawie mas cząsteczkowych oraz fragmentacji jonów molekularnych określili przybliżoną strukturę 27 saponin odmiany Jemalong A17. W dalszych pracach autorzy Ci [Huhman i in. 2005] oznaczyli w częściach nadziemnych i korzeniach zawartość 31 saponin; zawartość związków, których aglikonem była hederagenina, kwas zanowy, bayogenina i kwas medikagenowy podawano w przeliczeniu na 3-*O*-glukozyd kwasu medikagenowego, natomiast zawartość związków, których aglikonem był soyasapogenol przeliczono na soyasaponinę I. Duży postęp w tych badaniach został wykonany w Zakładzie Biochemii i Jakości Plonów IUNG-PIB. Z części nadziemnych *M. truncatula* odmiany Jemalong A17 wyizolowano technikami chromatografii preparatywnej 15 glikozydów saponinowych [Kapusta i in. 2005]. Metodami spektralnymi (NMR, MS) określono strukturę 7 glikozydów kwasu medikagenowego i 8 glikozydów kwasu zanowego. Dwanaście spośród nich okazało się być związkami nowymi. Izolacja standardów saponinowych pozwoliła na ilościowe określenie zawartości tych związków w różnych odmianach *M. truncatula*. W zakresie drugiej grupy metabolitów wtórnych – flawonoidów *M. truncatula* w literaturze znajduje się tylko jedna publikacja, zawierająca wyniki badań prowadzonych przez Farag i in. [2007] na korzeniach i kulturach zawieszin komórkowych. Autorzy Ci na podstawie widm UV i charakterystycznych widm

masowych określili strukturę 35 polifenoli, w tym 26 izoflawonów, 3 flawonów, 2 flawanonów, 2 auronów i chalkonu.

Znacznie więcej badań w zakresie występowania związków fenolowych przeprowadzono nad gatunkiem pokrewnym, jakim jest lucerna siewna (*Medicago sativa*). Największy postęp w badaniach fitochemii *M. sativa* został wykonany w Zakładzie Biochemii i Jakości Plonów IUNG-PIB w Puławach. Z części nadziemnych lucerny siewnej wyizolowano 23 pojedyncze związki. Przy użyciu metod spektralnych ustalono strukturę 22 flawonoidów będących glikozydami apigeniny, luteoliny, trycyny, metylotrycetyny i chryzoeriolu. Aglikon metylotrycetyna oraz szesnaście z wyodrębnionych flawonoidów okazało się być związkami nowymi, nie opisanymi w literaturze światowej [Stochmal i in. 2001a, Stochmal i in. 2001b, Stochmal i in. 2001c].

Cechą charakterystyczną flawonoidów lucerny siewnej jest to, że jedynym składnikiem cukrowym występującym we wszystkich związkach jest kwas glukuronowy. Wszystkie wyodrębnione glikozydy zawierały od jednej do trzech cząsteczek tego kwasu połączonych wiązaniem 1→2. Jest to zjawisko rzadkie, ponieważ w łańcuchach glikozydowych flawonoidów większości roślin występuje kilka różnych składników cukrowych, takich jak: glukoza, galaktoza, ramnoza, arabinoza, ksyloza, kwas glukuronowy i w niektórych przypadkach apioza [Mathney i Buslig 1998]. Część glikozydów było acylowanych kwasem ferulowym, *p*-kumarowym lub synapinowym. Acylacja zawsze miała miejsce przy węglu C-2 terminalnej cząsteczki kwasu glukuronowego. Taki typ acylacji flawonoidów nie był dotychczas opisany w literaturze, gdyż najczęściej stwierdzano przyłączenie cząsteczki kwasu do cząsteczki glukozy [Stochmal i Oleszek 2002].

#### **4. Polimorfizm występowania metabolitów wtórnych**

Zjawisko polimorfizmu polega na tym, że w populacji gatunku roślin lub zwierząt występuje obok siebie większa liczba wyraźnie różniących się form, przy czym różnice te są dziedziczne. Genetyczne zróżnicowanie danej populacji roślinnej określa się najczęściej wykorzystując analizę biometryczną cech morfologicznych

i anatomicznych rośliny. W warunkach różnego rodzaju stresów środowiskowych (promieniowanie UV, deficyt wody, oddziaływanie z mikroorganizmami), mających wpływ na rośliny, obserwowane są zasadnicze zmiany w profilach metabolitów wtórnych występujących w różnych organach poszczególnych gatunków roślin [Glassbrook i Ryals 2001].

Prace nad zróżnicowaniem międzyosobniczym lucerny pod względem zawartości saponin były prowadzone przez Jurzystę [1982]. Wykorzystując właściwości fungistatyczne biologicznie czynnych frakcji saponin względem grzyba *Trichoderma viride* przebadano zmienność międzyosobniczą roślin w obrębie różnych form lucerny. Rośliny *Medicago sativa* charakteryzowały się zróżnicowanym stopniem hamowania wzrostu grzyba, jednakże udział osobników silnie hamujących ten rozwój był niewielki. Wykazano, że cecha dużej zawartości saponin jest prawdopodobnie sprzężona z niepożądanymi w hodowli cechami morfologicznymi. Dzięki temu, w wyniku selekcji i hodowli część osobników wysokosaponinowych może być wyeliminowana. Ponadto duże zróżnicowanie międzyosobnicze w obrębie populacji stwarza możliwość uzyskania na drodze selekcji form niskosaponinowych.

W literaturze spotykamy również wiele doniesień na temat gatunków roślin cyjanogennych, z których wyróżnić można kilka, które są polimorficzne pod tym względem, tzn. charakteryzujące się występowaniem osobników cyjanogennych i acyjanogennych: koniczyna biała, komonica zwyczajna, komonica wąskolistna i fasola limeńska.

Prace wykonane w Zakładzie Biochemii i Jakości Plonów IUNG-PIB przez Stochmal i Oleszka [Stochmal i Oleszek 1996, Stochmal 2001] pozwoliły poznać zjawisko polimorfizmu biochemicznego, występowania glikozydów cyjanogennych – linamaryny i lotaustraliny w koniczynie białej (*Trifolium repens* L.).

Cyjanogenność koniczyny białej nie jest cechą jednorodną wszystkich osobników określonej populacji. W obrębie gatunku obserwuje się duże, międzyosobnicze zróżnicowanie zawartości związków cyjanogennych. Polimorfizm cyjanogeny warunkują tu dwie niezależne pary alleli. Jeden z genów (*Ac*) odpowiedzialny jest za syntezę glikozydów cyjanogennych – linamaryny

i lotaustraliny, drugi zaś (*Li*) za biosyntezę linamarazy – enzymu hydrolizującego te glukozidy. Naturalne populacje koniczyny mogą zatem zawierać cztery genotypy: *AcLi*, *Acli*, *acLi* i *acli* [Hughes 1991].

Częstotliwość występowania cyjanogenezy jest cechą charakterystyczną różnych populacji koniczyny białej. Badania przeprowadzone na populacjach europejskich wykazały, że istnieje korelacja pomiędzy częstotliwością występowania cyjanogenezy a średnią temperaturą stycznia. Stwierdzono, że każdy spadek temperatury o 1°C równa się ubytkowi 10% roślin cyjanogennych z populacji. Zjawisko to może być spotęgowane również i tym, że w miarę przesuwania się na północny wschód Europy maleje znacznie ilość zimujących, dorosłych osobników bezkręgowców, żywiących się liśćmi koniczyny [Daday 1954].

Polimorfizm cyjanogeny obserwowany jest również w przypadku jadalnych części roślin cyjanogennych, takich jak śliwy czy maniok [Nahrstedt 1993]. Potencjalne stężenie HCN w różnych częściach danej rośliny może znacznie się różnić. Duże ilości cyjanoglikozydów gromadzą organy reprodukcyjne, takie jak nasiona, owoce, kwiaty, ale również młode liście i siewki, czyli tkanki, które ze względu na funkcję, lub etap rozwoju, wymagają szczególnej ochrony [Brunt i in. 2006].

Poznanie polimorfizmu chemicznego i reguł genetyki populacyjnej, rządzących zachowaniem się genotypów, jest warunkiem podstawowym hodowli i utrzymania w czystości odmian o pożądanym składzie chemicznym [Blaim i in. 1972]. Rośliny o obniżonej zawartości związków niepożądanych (antyżywniowych) selekcjonuje się z populacji i wyprowadza z nich linie o pożądanym składzie jakościowym.

## II. CEL PRACY

*Medicago truncatula* jest obecnie przedmiotem zainteresowania genetyków w wielu placówkach naukowych na całym świecie. Prace badawcze mają na celu uzyskanie pełnego obrazu organizacji materiału genetycznego. Szczególny nacisk położony jest na identyfikację sekwencji kodujących i zapisywanie ich w międzynarodowym banku genów. Równolegle do prac nad sekwencjonowaniem poszczególnych genów *M. truncatula* dynamicznie rozwija się genomika funkcjonalna, czyli badania nad określeniem funkcji genów. W badaniach genomiki funkcjonalnej jednym z jej elementów jest metabolomika, łącząca ekspresję określonego genu z końcowym produktem jakim jest metabolit. Aby ten kierunek badań mógł się rozwijać konieczne jest poznanie struktur możliwie największej liczby metabolitów wtórnych występujących w badanej roślinie. Wiedza na temat fitochemii *M. truncatula* jest bardzo ograniczona. Dotychczas nie była badana w częściach nadziemnych tej rośliny grupa wtórnych metabolitów, jakimi są flawonoidy. W związku z tym przeprowadzono badania, których celem było:

- wyodrębnienie i identyfikacja związków flawonoidowych z części nadziemnych *M. truncatula*
- ustalenie struktury chemicznej wyizolowanych związków
- opracowanie metody UPLC oznaczania zawartości poszczególnych flawonoidów w częściach nadziemnych
- przebadanie polimorfizmu biochemicznego flawonoidów w *M. truncatula*
- przebadanie profili flawonoidów w *M. truncatula* w trakcie rozwoju roślin.



### III. MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

#### 1. Rozdział i oczyszczenie pojedynczych flawonoidów części nadziemnych

##### 1.1. Materiał roślinny

Do badań wykorzystano rośliny *Medicago truncatula* Gaertn. odmiany Jemalong A17 oraz *Medicago truncatula* Gaertn. var *longispina* Urb. (MED. 98/96) i *Medicago truncatula* Gaertn var *truncatula* (MED.161/95). Nasiona otrzymano od Dr XianZhi He (The Samuel Roberts Foundation, Admore OK. USA – *M. truncatula* Jemalong A17) oraz od Dr J. M. Prosperi (Institut National de Recherche Agronomique – Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, Montpellier Francja – *M. truncatula* var *longispina* i *M. truncatula* var *truncatula*).

Lucernę (*Medicago truncatula*) odmiany Jemalong A17 (Rys. 4) uprawiano na poletku doświadczalnym Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach w okresie od czerwca do sierpnia 2002 roku. Części nadziemne roślin były zbierane w początkowym okresie kwitnienia, zamrażane w temperaturze -18°C, liofilizowane i mielone. Tak przygotowany materiał posłużył do wyodrębnienia flawonoidów z części nadziemnych *M. truncatula*.

**Rys. 4.** Rośliny *M. truncatula* uprawiane na poletku doświadczalnym IUNG-PIB



Materiał roślinny do badania polimorfizmu biochemicznego oraz profili flawonoidów w trakcie rozwoju roślin uzyskano z 3-letniego doświadczenia poletkowego w latach 2005 – 2007, zakładanego i prowadzonego zgodnie z agrotechniką zalecaną dla lucerny przez Zakład Uprawy Roślin Pastewnych IUNG-PIB.

## **1.2. Ekstrakcja**

Drobno zmielone części nadziemne *Medicago truncatula* odmiany Jemalong A17 (400 g) odtłuszczano chloroformem (3 l) w aparacie Soxhleta w ciągu 40 godzin, a następnie ekstrahowano 3 litrami 80% MeOH w temperaturze pokojowej w ciągu 72 godzin. Ekstrakt przesączono, a pozostałość ekstrahowano jeszcze dwukrotnie na gorąco, pod chłodnicą zwrotną przez 2 godziny. Tak uzyskane ekstrakty połączono i zagęszczono pod zmniejszonym ciśnieniem w celu usunięcia metanolu.

## **1.3. Rozdział ekstraktu części nadziemnych**

Zagęszczony ekstrakt został następnie rozpuszczony w wodzie (150 ml) i naniesiony na krótką kolumnę szklaną (6 x 10 cm) wypełnioną nośnikiem RP-18 (LiChroprep RP-18, 40-63µm, firmy Merck), zrównoważoną wcześniej metanolem, a następnie wodą. Po naniesieniu ekstraktu na złożę chromatograficzne, kolumnę eluowano wodą w celu usunięcia cukrowców, a następnie 40% MeOH (1 l) - wmywając zawieszony na kolumnie flawonoidy.

## **1.4. Rozdział frakcji flawonoidowej**

Frację 40% MeOH zagęszczono prawie do sucha na wyparce próżniowej, rozpuszczono w wodzie destylowanej i naniesiono na kolumnę preparatywną (4 x 50 cm) wypełnioną zmodyfikowanym żelem krzemionkowym RP-18 (LiChroprep RP-18, 40-63µm, firmy Merck), zrównoważoną uprzednio metanolem, a następnie wodą. Kolumnę eluowano stosując liniowy gradient fazy ruchomej 0-100% MeOH w wodzie. Dziesięciomililitrowe frakcje zbierano za pomocą kolektora frakcji

i analizowano metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) na płytkach celulozowych (DC-Alufolien Cellulose, Merck), które rozwijano w 15% kwasie octowym i obserwowano w świetle UV. Frakcje chromatograficznie jednorodne łączono i zagęszczano na wyparce próżniowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskano 55 frakcji, które następnie poddano analizie z zastosowaniem chromatografu cieczowego (HPLC) z detektorem 996 PDA, firmy Waters. Analiza uzyskanych widm pozwoliła wyodrębnić frakcje zawierające jeden glikozyd oraz frakcje zawierające mieszaninę dwu lub więcej związków. Frakcje te poddano doczyszczaniu stosując kolumnę preparatywną (2×50cm, LiChrorep RP-18, 25-40µm) (Rys. 5), wymywaną izokratycznie układem acetonitryl (AcN) – 1% kwas orto-fosforowy. Stężenie acetonitrylu dla każdego rozdziału dobierano indywidualnie na podstawie analizy HPLC. Zastosowana technika pozwoliła wyizolować 23 czyste związki, których struktura została ustalona metodami spektralnymi.

**Rys. 5.** Kolumna preparatywna



## **2. Ustalenie struktury wyizolowanych związków flawonoidowych**

W celu ustalenia budowy chemicznej wyizolowanych związków wykonano analizy spektroskopii masowej oraz wodorowego i węglowego, jądrowego rezonansu magnetycznego ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR).

Widma masowe zostały wykonane na spektrometrze masowym LCQ Advantage Max (Thermo Finnigan) z detektorem w postaci pułapki jonowej (Rys. 6).

**Rys. 6.** Spektrometr masowy LCQ Advantage Max (Thermo Finnigan) sprzężony z chromatografem cieczowym



Spektrometr ten sprzężony jest z chromatografem cieczowym Finnigan Surveyor, który posiada pompę z kontrolerem gradientu, automatyczny podajnik próbek i detektor diodowy PDA. Jako technikę jonizacji zastosowano elektrorozpylanie (ESI). Wyizolowane związki flawonoidowe rozpuszczano w 40% metanolu i rozpylano w polu elektrycznym przy napięciu jonizacji 4,2 kV; napięciu kapilary  $-10\text{V}$  i temperaturze  $220^{\circ}\text{C}$ . Zakres analizowanych mas wynosił od 400 do 2000 Da. Analizę wysokorozdzielczych widm masowych (HRMS) rejestrowano na spektrometrze Voyager DE (Applied Biosystem, Foster City, CA), stosując jonizację przez desorpcję laserową w matrycy (MALDI).

Widma  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR wykonano stosując spektrometr Bruker DRX-600 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Niemcy) w roztworze  $\text{CD}_3\text{OD}$  (Rys. 7). Częstotliwości robocze wynosiły odpowiednio 599,19 MHz dla  $^1\text{H}$  i 150,86 MHz dla  $^{13}\text{C}$ .

**Rys. 7.** Spektrometr NMR Bruker DRX-600



### **3. Analiza ilościowa związków flawonoidowych *M. truncatula***

#### **3.1. Przygotowanie próbek roślinnych do analizy UPLC**

Wykorzystano stosowaną w Zakładzie Biochemii i Jakości Plonów IUNG-PIB metodę wstępnego oczyszczania próbek roślinnych do analizy [Stochmal i in. 1999, Stochmal i Oleszek 1999, Oleszek i in. 2002, Oleszek i Stochmal 2002]. W celu określenia zmian jakościowych i ilościowych związków flawonoidowych przebadano rośliny *Medicago truncatula* Gaertn. odmiany Jemalong A17 oraz *Medicago truncatula* Gaertn. var *longispina* Urb. (MED. 98/96) i *Medicago truncatula* Gaertn. var *truncatula* (MED.161/95), które były uprawiane na poletku doświadczalnym IUNG-PIB w ramach trzyletniego doświadczenia. Materiał roślinny do badań stanowiły liście, łodygi i części nadziemne w czterech fazach rozwojowych (wzrostu wegetatywnego, formowania się pąków kwiatowych, kwitnienia oraz przekwitania z jednoczesnym rozwojem nasion). Próbki 100 mg wysuszonego i drobno zmielonego materiału roślinnego ekstrahowano przez jedną godzinę 70% MeOH (30 ml) na gorąco pod chłodnicą zwrotną, sączono i odparowywano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem.

W celu oczyszczenia frakcji flawonoidowej ekstrakt po rozpuszczeniu w wodzie (10 ml) nanoszono na mikrokolumny Sep-Pak C18 (Waters Associates), które

przemywano wodą, a następnie 40% MeOH (frakcja flawonoidowa). Otrzymane frakcje po odparowaniu i rozpuszczeniu w 1ml 40% acetonitrylu stanowiły ekstrakty do analiz UPLC.

### 3.2. Ultrasprawa chromatografia cieczowa (UPLC) flawonoidów części nadziemnych

Metodę analizy flawonoidów opracowano na aparacie UPLC firmy Waters, typ Acquity™ (Rys. 8). Stosowano kolumnę BEH C<sub>18</sub> (50 x 2,1 mm, 1,7μm) (Waters), w temperaturze 50°C. Eluenty, 0,1% kwas octowy w wodzie oraz 40% AcN, podawano w układzie gradientowym przy przepływie 0,35 ml/min. w ciągu 16,5 min. We wszystkich oznaczeniach pomiary wykonywano dla trzech niezależnych prób, a związki identyfikowano poprzez porównanie ich czasów retencji z odpowiednimi zidentyfikowanymi wcześniej wzorcami. Do oznaczeń ilościowych wykonano krzywe kalibracyjne zależności pól powierzchni pików od stężeń roztworów wcześniej wyizolowanych substancji wzorcowych. Do obliczeń statystycznych wykorzystano program komputerowy „Statgraphics Plus”.

**Rys. 8.** Ultrasprawy chromatograf cieczowy, typ Acquity™, firmy Waters





## IV. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

### 1. Rozdział i oczyszczenie pojedynczych flawonoidów

W wyniku przeprowadzenia ekstrakcji materiału roślinnego części nadziemnych *M. truncatula* i wstępnego oczyszczenia poprzez ekstrakcję do fazy stałej otrzymano surową frakcję flawonoidową. Przeprowadzenie preparatywnego rozdziału tej frakcji na kolumnie wypełnionej nośnikiem RP-18 pozwoliło na uzyskanie trzech pojedynczych związków oraz około trzydziestu frakcji, zawierających mieszaniny dwu lub więcej substancji. Doczyszczanie poszczególnych frakcji pozwoliło na wyizolowanie dalszych dwudziestu związków flawonoidowych.

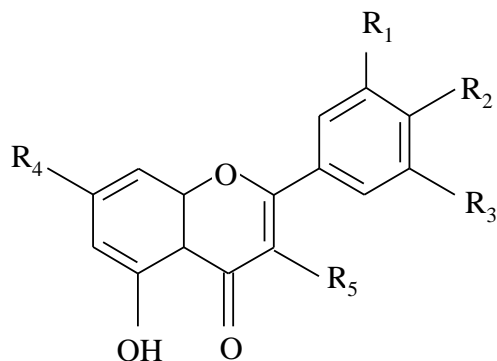
### 2. Ustalenie struktury wyizolowanych związków

Budowę chemiczną wyizolowanych flawonoidów ustalono stosując spektrometrię mas oraz wodorowy i protonowy, jądrowy rezonans magnetyczny ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR). Wyniki badań magnetycznego rezonansu jądrowego przedstawiają tabele 1- 4, natomiast spektroskopii masowej tabela 5.

Zidentyfikowane związki flawonoidowe to dwadzieścia flawonów i trzy flawonole. Schemat ich struktur chemicznych przedstawiono na rysunku 9.

Spośród wyizolowanych flawonoli (**1**, **8** i **21**) związek **8** posiadał jon molekularny o  $m/z$  609 i dwa dodatkowe jony o  $m/z$  463 i 301, odpowiadające kolejno fragmentom powstałym po odszczepieniu deoksyheksozy i heksozy. Na podstawie tych danych oraz szeregu eksperymentów: COSY, ROE, HSQC, HMBC, TOCSY i spektrum UV tego związku zidentyfikowano go jako 3-O- $\beta$ -D-ramnopiranozylo-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glukopiranozyd kwercetyny (rutyna). Flawonoidy **1** i **21** posiadały identyczne widma absorpcyjne, w wyniku ich rozpadu MS/MS stwierdzono obecność fragmentu o  $m/z$  331, charakterystycznego dla aglikonu larycytryny. Jon molekularny związku **21** wynosił 655 i widmo MS/MS zawierało dodatkowo dwa jony o  $m/z$  493 i 331. Sygnały te odpowiadały kolejno fragmentom, powstałym po odszczepieniu jednej oraz dwóch heksoz.

**Rys. 9.** Schemat struktur wyizolowanych związków flawonoidowych części nadziemnych *M. truncatula*



Związek	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
<b>Flawony</b>					
2	-OH	-OH	-H	-OGluA(2→1) GluA	-H
3	-H	-OH	-H	-OGluA(2→1) GluA	-H
4	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	-OGluA(2→1) GluA	-H
5	-OH	-OH	-H	-OGluA	-H
6	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OGluA(2→1) GluA	-H
7	-H	-OH	-H	-OGluA(2→1) GluA-[GluA(1→3)]-2-O-feruloyl	-H
9	-H	-OH	-H	-OGluA(2→1) GluA-[GluA(1→3)]-2-O- <i>p</i> -kumaroyl	-H
10	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	-OGluA(2→1) GluA-[GluA(1→3)]-2-O-feruloyl	-H
11	-H	-OH	-H	-OGluA(2→1) GluA-2-O-synapoyl	-H
12	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OGluA(2→1) GluA-[GluA(1→3)]-2-O-feruloyl	-H
13	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	-OGluA(2→1) GluA-[GluA(1→3)]-2-O- <i>p</i> -kumaroyl	-H
14	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OGluA(2→1) GluA-[GluA(1→3)]-2-O- <i>p</i> -kumaroyl	-H
15	-H	-OH	-H	-OGlc(2→1) GluA-[GluA(1→3)]-2-O-feruloyl	-H
16	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OGluA(2→1) GluA-2-O-synapoyl	-H
17	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OGluA	-H
18	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OGluA(2→1) GluA-2-O-feruloyl	-H
19	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OGluA(2→1) GluA-2-O- <i>p</i> -kumaroyl	-H
20	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OGlc(2→1) GluA-2-O-feruloyl	-H
22	-H	-OH	-H	-OGluA(2→1) GluA(3→1)GluA	-H
23	-OCH <sub>3</sub>	-OGlc	-OCH <sub>3</sub>	-OGluA	-H
<b>Flawonole</b>					
1	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OGlc	-OGlc	-OGlc
8	-OH	-OH	-H	-OH	-Orutynozyd
21	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OGlc	-H	-OGlc

Pełną strukturę tego związku ustalono na podstawie analizy przesunięć chemicznych <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR. Związek ten zidentyfikowano jako 3,5'-diglukopiranozyd larycytryny. Został on wyizolowany wcześniej również z innego gatunku *Medicago* (*Medicago arborea* L.) [Torck i in.1983]. Natomiast związek **1** posiadał jon molekularny o masie 817. Zwiększenie masy związku o 162 jednostki w



porównaniu do flawonoidu **21**, sugerowało obecność dodatkowej cząsteczki heksozy. Przeprowadzenie kochromatografii potwierdziło, że związek **1** to 3,7,5'-triglukopiranozyd larycytryny.

**Tab. 1.** Magnetyczny rezonans jądrowy  $^1\text{H}$  NMR wyizolowanych po raz pierwszy flawonoidów ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) - związek 4, 11, 13 i 14.

Związek	$\delta$
<b>4</b>	7,60 (1H, d, $J = 1,2$ i 8,5 Hz, H-6'); 7,59 (1H, d, $J = 1,2$ i 8,5 Hz, H-6'); 6,99 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5'); 6,88 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-8); 6,71 (1H, s, H-3); 6,54 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-6); 5,40 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1GluA <sub>1</sub> ); 4,72 (1H 2d, $J = 7,5$ Hz, H-1GluA <sub>2</sub> ); 4,01 (s, OCH <sub>3</sub> ); 4,00 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-5GluA <sub>1</sub> ); 3,80 (1H, dd, $J = 9,0$ , i 9,0 Hz, H-3GluA <sub>1</sub> ); 3,80 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-5GluA <sub>2</sub> ); 3,79 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2GluA <sub>1</sub> ); 3,67 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-4GluA <sub>1</sub> ); 3,47 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-3GluA <sub>2</sub> ); 3,47 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-4GluA <sub>2</sub> ); 3,32 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2GluA <sub>2</sub> )
<b>11</b>	7,83 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2',H-6'); 7,40 (1H, d, $J = 16$ Hz, H- $\beta$ kwas synapinowy); 6,98 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3', H-5'); 6,70 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-8); 6,60 (2H, s, H-2, H-6, kwas synapinowy); 6,49 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-6); 6,43 (1H, s, H-3); 6,13 (1H, d, $J = 16$ Hz, H- $\alpha$ kwas synapinowy); 5,50 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1GluA <sub>1</sub> ); 5,18 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1GluA <sub>2</sub> ); 4,95 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2GluA <sub>2</sub> ); 4,00 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-5GluA <sub>1</sub> ); 3,90 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-3GluA <sub>2</sub> ); 3,89 (1H, d, $J = 9$ Hz, H-5GluA <sub>2</sub> ); 3,80 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2GluA <sub>1</sub> ); 3,74 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-4GluA <sub>2</sub> ); 3,73 (s, 2xOCH <sub>3</sub> , kwas synapinowy); 3,73 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-3GluA <sub>1</sub> ); 3,65 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-4GluA <sub>1</sub> )
<b>13</b>	7,61 (1H, d, $J = 16$ Hz, H- $\beta$ kwas <i>p</i> -kumarowy); 7,58 (1H, dd, $J = 1,2$ i 8,5 Hz, H-6'); 7,57 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-2'); 7,43 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2, H-6, kwas <i>p</i> -kumarowy); 6,97 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5'); 6,81 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-8); 6,78 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3, H-5 kwas <i>p</i> -kumarowy); 6,67 (1H, s, H-3); 6,51 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-6); 6,35 (1H, d, $J = 16$ Hz, H- $\alpha$ kwas <i>p</i> -kumarowy); 5,43 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1GluA <sub>1</sub> ); 5,12 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1GluA <sub>2</sub> ); 5,10 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2GluA <sub>2</sub> ); 4,50 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1GluA <sub>3</sub> ); 4,08 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-5GluA <sub>1</sub> ); 4,01 (s, OCH <sub>3</sub> ); 4,00 (2H, m, H-3 GluA <sub>2</sub> , H-5GluA <sub>2</sub> ); 3,83 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-5GluA <sub>3</sub> ); 3,76 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2GluA <sub>1</sub> ); 3,74 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-4GluA <sub>2</sub> ); 3,69 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-3GluA <sub>1</sub> ); 3,67 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-4GluA <sub>1</sub> ); 3,49 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-4GluA <sub>3</sub> ); 3,32 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-3GluA <sub>3</sub> ); 3,24 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2GluA <sub>3</sub> )
<b>14</b>	7,61 (1H, d, $J = 16$ Hz, H- $\beta$ kwas <i>p</i> -kumarowy); 7,26 (2H, s, H-2',H-6'); 7,42 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2, H-6, kwas <i>p</i> -kumarowy); 6,74 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-8); 6,78 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3, H-5 kwas <i>p</i> -kumarowy); 6,58 (1H, s, H-3); 6,50 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-6); 6,35 (1H, d, $J = 16$ Hz, H- $\alpha$ kwas <i>p</i> -kumarowy); 5,42 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1GluA <sub>1</sub> ); 5,11 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1GluA <sub>2</sub> ); 5,10 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2GluA <sub>2</sub> ); 4,50 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1GluA <sub>3</sub> ); 4,06 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-5GluA <sub>1</sub> ); 4,02 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-3GluA <sub>2</sub> ); 4,00 (s, 2x OCH <sub>3</sub> ); 4,00 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-5GluA <sub>2</sub> ); 3,83 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-5GluA <sub>3</sub> ); 3,75 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2GluA <sub>1</sub> ); 3,74 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-4GluA <sub>2</sub> ); 3,70 (1H, dd, $J = 9,0$ and 9,0 Hz, H-3GluA <sub>1</sub> ); 3,67 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-4GluA <sub>1</sub> ); 3,49 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-4GluA <sub>3</sub> ); 3,32 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-3GluA <sub>3</sub> ); 3,24 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2GluA <sub>3</sub> )

**Tab. 2.** Magnetyczny rezonans jądrowy  $^1\text{H}$  NMR wyizolowanych po raz pierwszy flawonoidów ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – związek 15, 20, 22 i 23.

Związek	$\delta$
<b>15</b>	7,90 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2',H-6'); 7,56 (1H, d, $J = 15,9$ Hz, H- $\alpha$ kwas ferulowy); 7,09 (1H, d, $J = 1,7$ Hz, H-2 kwas ferulowy); 6,98 (1H, dd, $J = 1,7$ i 8,3 Hz, H-6 kwas ferulowy); 6,96 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3', H-5'); 6,74 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-8); 6,72 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H-5 kwas ferulowy); 6,58 (1H, s, H-3); 6,50 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-6), 6,30 (1H, d, $J = 15,9$ Hz, H- $\alpha$ kwas ferulowy); 5,37 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1Glc); 5,16 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1GluA <sub>1</sub> ); 5,10 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2GluA <sub>1</sub> ); 4,48 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1GluA <sub>2</sub> ); 4,00 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-3GluA <sub>1</sub> ); 3,99 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-5GluA <sub>1</sub> ); 3,90 (1H, dd, $J = 2,5$ i 12,0 Hz, H-6Glc); 3,85 (s, $\text{OCH}_3$ , kwas ferulowy); 3,78 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-5GluA <sub>2</sub> ); 3,74 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-4GluA <sub>1</sub> ); 3,71 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2Glc); 3,70 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-3Glc); 3,70 (1H, dd, $J = 5,0$ i 12,0 Hz, H-6Glc); 3,54 (m, H-5Glc); 3,48 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-4GluA <sub>2</sub> ); 3,44 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-4Glc); 3,30 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-3GluA <sub>2</sub> ); 3,23 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2GluA <sub>2</sub> )
<b>20</b>	7,49 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H- $\alpha$ kwas ferulowy); 7,27 (2H, s, H-2', H-6'); 6,97 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-2 kwas ferulowy); 6,89 (1H, dd, $J = 1,2$ i 8,5 Hz, H-6 kwas ferulowy); 6,76 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-8); 6,66 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5 kwas ferulowy); 6,59 (1H, s, H-3); 6,51 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-6); 6,20 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H- $\alpha$ kwas ferulowy); 5,44 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1Glc); 5,16 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1GluA); 4,94 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2GluA); 4,0 ( $\text{OCH}_3 \times 2$ ); 3,96 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-5GluA); 3,92 (1H, dd, $J = 2,5$ i 12,0 Hz, H-6Glc); 3,79 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-3Glc); 3,79 ( $\text{OCH}_3$ , kwas ferulowy); 3,74 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2Glc); 3,72 (1H, dd, $J = 5,0$ i 12,0 Hz, H-6Glc); 3,71 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-3GluA); 3,64 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-4GluA <sub>2</sub> ); 3,60 (m, H-5Glc); 3,48 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-4Glc)
<b>22</b>	7,95 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2',H-6'); 6,96 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-3', H-5'); 6,82 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-8); 6,67 (1H, s, H-3); 6,51 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-6); 5,38 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1GluA <sub>1</sub> ); 4,79 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1GluA <sub>2</sub> ); 4,70 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1GluA <sub>3</sub> ); 4,05 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-5GluA <sub>1</sub> ); 3,88 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-5GluA <sub>2</sub> ); 3,78 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2GluA <sub>1</sub> ); 3,78 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-3GluA <sub>1</sub> ); 3,76 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-5GluA <sub>3</sub> ); 3,74 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-3GluA <sub>2</sub> ); 3,70 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-4GluA <sub>1</sub> ); 3,62 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-4GluA <sub>2</sub> ); 3,52 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2GluA <sub>2</sub> ); 3,48 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-4GluA <sub>3</sub> ); 3,47 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-3GluA <sub>3</sub> ); 3,34 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2GluA <sub>3</sub> )
<b>23</b>	7,37 (2H, s, H-2', H-6'); 6,98 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-8); 6,86 (1H, s, H-3); 6,58 (1H, d, $J = 1,2$ Hz, H-6); 5,19 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1GluA); 5,13 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1Glc), 4,01 ( $2 \times \text{OCH}_3$ ); 3,94 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-5GluA); 3,79 (1H, dd, $J = 2,0$ i 12,0 Hz, H-6Glc); 3,71 (1H, dd, $J = 4,5$ i 12,0 Hz, H-6Glc); 3,62 (2H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-3,H-4GluA); 3,61 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2GluA); 3,57 (1H, dd, $J = 7,5$ i 9,0 Hz, H-2Glc); 3,52 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-3Glc); 3,50 (1H, dd, $J = 9,0$ i 9,0 Hz, H-4Glc), 3,29 (m, H-5Glc)

**Tab. 3.** Magnetyczny rezonans jądrowy  $^{13}\text{C}$  NMR nowo wyizolowanych aglikonów flawonoidów ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )-dane uzyskano w eksperymentach HSQC i HMBC.

Węgiel	4	11	13	14	15	20	22	23
2	166,9	166,5	166,0	166,4	166,4	166,6	166,5	165,7
3	104,3	103,6	103,8	103,9	103,9	104,0	103,5	105,6
4	183,3	184,0	183,4	184,3	184,3	184,2	184,0	183,9
5	162,7	162,7	162,6	163,0	162,6	163,2	162,6	162,1
6	100,3	100,4	100,2	100,3	100,1	100,3	100,7	100,9
7	164,6	164,2	163,6	164,4	163,9	164,6	164,2	164,8
8	95,9	95,6	95,9	95,6	95,9	95,9	95,8	96,1
9	158,6	158,5	158,4	158,7	158,5	158,8	158,7	158,4
10	106,8	106,7	106,7	106,7	106,5	106,8	106,7	106,7
1'	123,6	122,6	123,2	122,8	122,6	122,6	122,6	128,1
2'	111,0	129,3	110,4	105,0	129,2	105,0	129,4	105,5
3'	149,8	116,6	149,3	149,3	116,9	149,6	116,6	154,3
4'	153,0	162,5	151,6	141,0	162,7	141,1	162,7	138,8
5'	116,4	116,6	116,3	149,3	116,9	149,6	116,6	154,3
6'	121,7	129,3	121,2	105,0	129,2	105,0	129,4	105,5
OMe	56,5		56,5			56,7(x2)		56,9(x2)

**Tab. 4.** Magnetyczny rezonans jądrowy  $^{13}\text{C}$  NMR cukrów i acylowanych kwasów fenolowych ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) - dane uzyskano w eksperymentach HSQC i HMBC.

Węgiel	4	11	13	14	15	20	22	23
<b>Cukry</b>								
1''	99,5	99,3	99,2	99,2	98,4	98,0	99,7	100,7
2''	83,5	83,4	82,0	82,4	82,4	82,0	83,6	73,6
3''	76,4	75,8	76,0	76,0	76,1	75,3	76,2	77,0
4''	72,1	72,9	72,6	72,4	70,9	70,6	72,3	72,9
5''	76,0	76,0	76,0	75,9	77,6	77,4	76,0	76,7
6''	172,0	172,0	172,0	172,0	61,9	61,9	172,2	172,1
1'''	105,2	103,0	101,7	102,3	101,2	100,1	105,0	103,9
2'''	75,0	75,3	73,4	73,5	73,6	74,6	74,7	75,0
3'''	77,0	75,8	83,9	83,8	83,5	75,5	86,0	77,2
4'''	72,8	73,4	71,7	71,5	71,6	72,9	71,5	70,7
5'''	76,6	76,0	76,2	76,0	76,1	75,4	76,3	77,9
6'''	172,0	172,1	172,0	172,0	172,2	172,1	172,0	61,7
1''''			104,4	104,8	104,3		104,9	
2''''			74,3	73,9	74,0		74,9	
3''''			76,8	77,0	76,9		77,0	
4''''			72,9	72,7	72,6		72,8	
5''''			76,0	75,8	75,8		75,8	
6''''			172,2	172,5	172,2		172,2	
<b>Kwas fenolowy</b>								
1		126,0	126,6	127,1	122,9	127,7		
2		107,2	130,6	131,2	111,2	110,7		
3		149,5	116,3	117,1	148,7	149,1		
4		139,2	161,0	161,0	150,1	150,3		
5		149,5	116,3	117,1	115,6	116,2		
6		107,2	130,6	131,2	124,0	123,6		
$\alpha$		116,7	114,7	115,4	114,4	115,0		
$\beta$		146,5	146,6	146,6	146,7	146,7		
<b>C=O</b>		167,3	168,1	168,8	168,1	168,9		
<b>OMe</b>		57,0 (x2)			56,4	55,8		

Ze względu na budowę aglikonu wyizolowane flawony można podzielić na cztery grupy: glikozydy apigeniny (5,7,4'-trihydroksy flawon), luteoliny (5,7,3',4'-tetrahydroksy flawon), trycyny (5,7,4'-trihydroksy-3',5'-dimetoksy flawon) oraz chryzoeriolu (5,7,4'-trihydroksy-3'-metoksy flawon).

Związki **3**, **7**, **9**, **11**, **15**, **22**, mające w pozycji R<sub>1</sub> podstawiony wodór są, glikozydami apigeniny. Analiza widm ESI/MS/MS tych związków wykazała obecność pików o m/z 269, charakterystycznego dla apigeniny. Na podstawie spektrum UV uzyskano dodatkowe dane na temat budowy tych związków. Flawonoidy **7**, **11** i **15** wykazywały zasadniczo wzrost absorbancji w zakresie UV-B, w porównaniu ze związkami **3**, **9** i **22**, ze względu na acylację kwasami hydroksycynamonowymi [Stochmal i Oleszek 2007].

Widmo masowe związku **9** charakteryzowało się obecnością jonu molekularnego o m/z 943. Ponadto w widmie tym stwierdzono występowanie jonów m/z 797 [M-H-kwas kumarowy]<sup>-</sup>, 445 [M-H-kwas kumarowy-2GluA]<sup>-</sup> i 269 [M-H-kwas kumarowy-3GluA]<sup>-</sup>, powstałe po utracie odpowiednio dwóch i trzech cząsteczek kwasu glukuronowego. Pełną strukturę związku ustalono jako: 7-O-{2-O-p-kumaroylo-[β-D-glukuronopiranozylo(1→3)]-O-β-D-glukuronopiranozylo(1→2)-O-β-D-glukuronopiranozyd} apigeniny. Związek ten okazał się być identyczny z wzorcem posiadanym w Zakładzie Biochemii i Jakości Plonów IUNG-PIB, który po raz pierwszy został wyizolowany z części nadziemnych *Medicago sativa* [Stochmal i in. 2001a].

Wstępna analiza danych spektralnych związku **3** wykazała obecność jonu molekularnego o m/z 621 i dwóch innych jonów o m/z 445 i 269. Pierwszy z nich powstał po odszczepieniu cząsteczki kwasu uronowego, natomiast drugi jest charakterystyczny dla aglikonu. W oparciu o analizę spektrometrii mas wykazano, że związek ten posiada dwie cząsteczki kwasu glukuronowego przyłączone do aglikonu apigeniny. Analiza korelacji dalekiego zasięgu HMBC pomiędzy H-1 GluA<sub>1</sub> (δ = 5,44) i C-7 aglikonu (δ = 164,1) wskazywała na przyłączenie cząsteczki dwucukru do apigeniny w pozycji C-7. Związek ten okazał się być 7-O-[β-D-glukuronopiranozylo(1→2)-O-β-D-glukuronopiranozydem apigeniny i został po raz pierwszy wyizolowany z *M. sativa* [Stochmal i in. 2001a].

Jon molekularny w widmie masowym związku **22** wynosił 797 jednostek masy. Ponadto w widmie tym stwierdzono występowanie trzech innych jonów o m/z 527 [3×GluA-H]<sup>-</sup>, 351 [2×GluA-H]<sup>-</sup> i 269 [M-3GluA-H]<sup>-</sup> odpowiadających odpowiednio trzem i dwóm cząsteczkom kwasu uronowego oraz aglikonowi. Analiza

porównawcza przesunięć  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR potwierdziła, iż związek ten posiada trzy cząsteczki kwasu glukuronowego, a jego aglikonem jest apigenina. W wyniku eksperymentu 1D-TOCSY zostały otrzymane przesunięcia dla protonów anomerycznych kwasu glukuronowego. Na podstawie eksperymentów 1D-TOCSY i DQF-COSY zostały przypisane wszystkie protony tych trzech grup cukrowych, natomiast miejsca glikozylacji przy węglu C-2 kwasu uronowego ustalono na podstawie HSQC. Biorąc pod uwagę powyższe dane oraz analizę korelacji dalekiego zasięgu HMBC pomiędzy: H-1 GluA<sub>1</sub> ( $\delta = 5,38$ )  $\rightarrow$  C-7 aglikonu ( $\delta = 164,2$ ); H-1 GluA<sub>2</sub> ( $\delta = 4,79$ )  $\rightarrow$  C-2 GluA<sub>1</sub> ( $\delta = 83,6$ ) i H-1 GluA<sub>3</sub> ( $\delta = 4,70$ )  $\rightarrow$  C-3 GluA<sub>2</sub> ( $\delta = 86,0$ ) związek **22** zidentyfikowano jako 7-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 3)-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozyd apigeniny. Związek ten jest nowy i nie był dotychczas opisany w literaturze.

Związek **11** posiadał jon molekularny o  $m/z$  827 i cztery dodatkowe jony o  $m/z$  621 [M-206-H]<sup>-</sup>, 557 [(2 $\times$ 176)+206-H]<sup>-</sup>, 351 [(2 $\times$ 176)-H]<sup>-</sup> i 269 [M-(2 $\times$ 176)-206-H]<sup>-</sup>. Jony 557 i 351 odpowiadały części cukrowej z (176+176+206-H) i bez (176+176-H) grupy acylowej. Utrata 206 jednostek z masy jonu molekularnego odpowiadała odpięciu kwasu synapinowego. Przez porównanie widm  $^1\text{H}$  NMR związków **3** i **11** stało się jasne, że flawonoid **11** zawiera dodatkowo singlet dla dwóch protonów ( $\delta = 6,60$  s), wskazujący na trzy pozycje zawierające tlen w części fenolowej, razem z sygnałem odpowiadającym dwóm grupom metoksyłowym ( $\delta = 3,73$  s) oraz sygnałom o przesunięciu chemicznym równym 7,40 ppm (d,  $J = 16,0$  Hz) i 6,13 ppm (d,  $J = 16,0$  Hz), typowym dla wiązania podwójnego *trans*. Ten dowód, wraz z danymi pochodzącymi z widma  $^{13}\text{C}$  NMR, potwierdził obecność kwasu synapinowego, który znajdował się w pozycji C-2 GluA<sub>2</sub>. Wynika to z eksperymentu korelacyjnego HMBC pomiędzy H-2 GluA<sub>2</sub> i grupą karbonylową (C=O) części synapinowej. Na podstawie uzyskanych danych flawonoid **11** zidentyfikowano jako 7-*O*-[2'-*O*-synapoylo- $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozyd] apigeniny. Związek ten został wyizolowany po raz pierwszy.

Wyizolowany związek **7** posiadał jon molekularny o masie 973 różniący się od jonu molekularnego flawonoidu **22** o 176 jednostek, co sugerowało, że związki te

różnią się pomiędzy sobą jedną cząsteczką kwasu glukuronowego lub acylacją kwasem ferulowym. Wzrost absorbancji pasma I spektrum UV związku **7** w porównaniu do spektrum flawonoidu **22** potwierdził acylację związku **7** kwasem ferulowym. Obecność jonu o  $m/z$  703 wskazywała na liniowe połączenie trzech cząsteczek kwasu glukuronowego i jednej cząsteczki kwasu ferulowego. Na podstawie analizy widma rozpadu MS/MS związku **7** oraz porównując czasy retencji z dostępnym standardem tego flawonoidu został on zidentyfikowany jako 7-*O*-{2-*O*-*p*-feruloylo- $[\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 3)]-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozyd} apigeniny. Związek ten został po raz pierwszy wyizolowany z części nadziemnych lucerny siewnej przez Stochmal [2001a].

Jon molekularny  $m/z$  959 związku **15** okazał się być mniejszy o 14 jednostek od tego, jaki przypisano dla flawonoidu **7**. W wyniku fragmentacji jonu molekularnego uzyskano sygnały o  $m/z$  689 i 269. Sygnał o  $m/z$  689 ( $3 \times 176 + 162$ ) wskazywał na zastąpienie jednostki kwasu glukuronowego flawonoidu **7** przez cząsteczkę heksozy w związku **15**. Analiza widma  $^{13}\text{C}$  NMR wykazała obecność dwóch cząsteczek kwasu glukuronowego, cząsteczki kwasu ferulowego i sześciu węgli charakterystycznych dla cząsteczki glukozy. Na podstawie eksperymentu 1D-TOCSY i DQF-COSY wszystkie protony tych trzech grup cukrowych zostały przypisane. Analiza widm dalekiego zasięgu HMBC zależności pomiędzy: H-1Glc ( $\delta = 5,37$ )  $\rightarrow$  C-7 aglikonu ( $\delta = 163,9$ ); H-1 GluA<sub>1</sub> ( $\delta = 5,16$ )  $\rightarrow$  C-2 Glc ( $\delta = 82,4$ ); H-1GluA<sub>2</sub> ( $\delta = 4,48$ )  $\rightarrow$  C-3 GluA<sub>1</sub> ( $\delta = 83,5$ ) oraz H-2 GluA<sub>1</sub> ( $\delta = 5,10$ )  $\rightarrow$  C=O części ferulowej ( $\delta = 168,1$ ) pozwoliła stwierdzić, że związek **15** różni się od flawonoidu **7** tylko zastąpieniem jednostki kwasu glukuronowego związanej z aglikonem przez cząsteczkę glukozy. Zatem, flawonoid **15** został zidentyfikowany jako 7-*O*-{2-*O*-feruloylo- $[\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 3)]-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozyd} apigeniny. Związek ten nie był dotychczas opisany w literaturze.

Wszystkie wyizolowane glikozydy apigeniny zawierały dwie (**3**, **11** i **15**) lub trzy cząsteczki kwasu glukuronowego (**7**, **9** i **22**). Jeden z tych związków dodatkowo, oprócz kwasu glukuronowego, zawierał także cząsteczkę glukozy (**15**). Ponadto cztery glikozydy apigeniny z łańcuchami cukrowymi przyłączonymi w pozycji C-7 pierścienia A acylowane były kwasem ferulowym, kumarowym lub synapinowym (**7**,

**9, 11 i 15**). Glikozydy: **11, 15** oraz **22** są związkami nowymi, nieopisanymi dotychczas w literaturze światowej.

Aglikonem flawonów, które w pozycji R<sub>1</sub> mają podstawioną grupę hydroksylową jest luteolina. Analiza widm rozpadu MS/MS związków **2** i **5** wykazała obecność pików o m/z 285, charakterystycznego dla luteoliny. Różnica mas pomiędzy jonami molekularnymi tych związków wynosiła 176 jednostek, co odpowiada jednej cząsteczce kwasu glukuronowego. Sygnał o m/z 351, powstały w wyniku fragmentacji związku **2**, wskazywał na obecność liniowo przyłączonych dwóch cząsteczek kwasu glukuronowego (2×176-H). Analiza widm NMR wykazała, że związki **2** i **5** to odpowiednio 7-O-[β-D-glukuronopiranozylo(1→2)-O-β-D-glukuronopiranozyd luteoliny i 7-O-β-D-glukuronopiranozyd luteoliny. Zostały one wcześniej wyizolowane z *Aloysia triphylla* i *Verbena officinalis* [Darnat i in. 1995]. Obecność flawonoidu **5** potwierdzono w badaniach nad *M. sativa* [Stochmal i in. 2001a].

Najliczniejszą grupę zidentyfikowanych flawonów stanowiły mniej polarne glikozydy trycyny, mające w pozycji R<sub>1</sub> oraz R<sub>3</sub> podstawione grupy metoksyłowe. Analiza widm rozpadu MS/MS tych związków wykazała obecność pików o m/z 329, charakterystycznego dla trycyny. Wśród nich możemy wyróżnić: związki nieacylowane (**6, 17** i **23**) oraz acylowane kwasami hydroksycynamonowymi (**12, 14, 16** i **18-20**).

Różnica mas pomiędzy jonami molekularnymi związków **6** i **17** wynosiła 176 jednostek, co odpowiada jednej cząsteczce kwasu glukuronowego. Analiza widm UV tych związków nie wykazała acylacji kwasami hydroksycynamonowymi. Widmo MS/MS związku **6** zawierało jon o m/z 351 wskazujący na obecność dwóch cząsteczek kwasu glukuronowego. Związek **6** został zidentyfikowany jako 7-O-[β-D-glukuronopiranozylo(1→2)-O-β-D-glukuronopiranozyd trycyny, natomiast związek **17** okazał się być 7-O-β-D-glukuronopiranozydem trycyny. Flawonoidy te były wykryte po raz pierwszy przez Harborne i Hall [1964], a ich obecność została potwierdzona w późniejszych badaniach nad lucerną siewną [Stochmal i in. 2001b].

W wyniku fragmentacji jonu molekularnego (m/z 667) związku **23**, uzyskano sygnały o m/z 505, 491 i 329 odpowiadające utracie z cząsteczki heksozy (162 j.m.), kwasu glukuronowego (176 j.m.). Jon m/z 329 odpowiadał cząsteczce aglikonu. Brak



sygnału o m/z 337 (heksoza + kwas glukuronowy – H) wskazywał, że te dwie cząsteczki cukru były umiejscowione w dwóch różnych pozycjach. Glukoza podstawiona była przy węglu C-4' pierścienia B. Widmo korelacyjne 1D-TOCSY, uzyskane przez selektywne napromieniowanie anomerycznego protonu o  $\delta = 5,19$  ukazało obecność systemu spinowego dla jednostki kwasu glukuronowego. Widmo korelacyjne 1D-TOCSY uzyskane dla sygnału protonu o  $\delta = 5,13$  dało wynik w postaci systemu spinowego dla jednostki glukozowej. Analiza powyższych danych, jak również eksperymenty korelacyjne HMBC pomiędzy H-1 GluA ( $\delta = 5,13$ )  $\rightarrow$  C-4' ( $\delta = 138,8$ ) oraz H-1 GluA ( $\delta = 5,19$ )  $\rightarrow$  C-7 ( $\delta = 164,8$ ) pozwoliła zidentyfikować związek **23** jako 7-O- $\beta$ -D-glukuronopiranozylo-4'-O- $\beta$ -D-glukopiranozyd trycyny. Związek ten jest nowy i nie był jeszcze opisany w literaturze.

Związki **16**, **18** i **19** posiadały jony molekularne wyższe odpowiednio o 206, 176 i 146 jednostek od związku **6**. Ponadto analiza ich widm UV wskazywała na acylację kwasami hydroksycynamonowymi. Obecność sygnałów o m/z 557 [(2 $\times$ 176)+206-H]<sup>-</sup> w związku **16**, 527 [(3 $\times$ 176)-H]<sup>-</sup> w **18** i 497 [(2 $\times$ 176)+146-H]<sup>-</sup> w **19** sugerowała, że wszystkie trzy związki były acylowane odpowiednio kwasem synapinowym, ferulowym i kumarowym. Zatem flawonoid **16** zidentyfikowano jako 7-O-[2'-O-synapoylo- $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glukuronopiranozyd] trycyny, związek **18** jako 7-O-[2'-O-feruloylo- $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glukuronopiranozyd] trycyny, a związek **19** jako 7-O-[2'-O-kumaroylo- $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glukuronopiranozyd] trycyny. Flawonoidy te zostały po raz pierwszy wyizolowane przez Stochmal [2001b] z części nadziemnych *M. sativa*.

Flawonoid **20** posiadał jon molekularny o m/z 843, który był mniejszy o 14 jednostek masowych od jonu molekularnego uzyskanego dla związku **18**. Dwa dodatkowe jony o m/z 513 i 329 odpowiadały, odpowiednio, utracie (2 $\times$ 176+162) jednostek cukrowych i aglikonowi. Jon o m/z 513 sugerował obecność liniowej struktury łańcucha cukrowego, a widmo UV wskazywało na acylację tego flawonoidu kwasem hydroksycynamonowym. Z analizy widma MS/MS wynikało, iż związek ten posiada łańcuch cukrowy złożony z heksozy, kwasu glukuronowego i ferulowego.

Obecność kwasu ferulowego została potwierdzona za pomocą widma  $^1\text{H}$  NMR, w którym zaobserwowano sygnały o  $\delta = 6,97$  (1H, d,  $J = 1,2$  Hz);  $\delta = 6,89$  (1H, dd,  $J = 1,2$  i  $8,5$  Hz) i  $\delta = 6,66$  (1H, d,  $J = 8,5$  Hz) odpowiadające 1,3,4-podstawionemu pierścieniowi aromatycznemu, razem z singletem pochodzącym od grupy metoksyowej  $\delta = 3,85$  oraz sygnałami  $\delta = 7,49$  (1H, d,  $J = 16,0$  Hz) i  $\delta = 6,20$  (1H, d,  $J = 16,0$  Hz), typowymi dla wiązania podwójnego *trans*. Rodzaj jednostki heksozowej i jej położenie w łańcuchu cukrowym określono z analizy widm NMR. Analiza widm dalekiego zasięgu HMBC zależności pomiędzy: H-1Glc ( $\delta = 5,44$ )  $\rightarrow$  C-7 ( $\delta = 164,6$ ); H-1 GluA ( $\delta = 5,16$ )  $\rightarrow$  C-2 Glc ( $\delta = 82,0$ ) oraz H-2 GluA ( $\delta = 4,94$ )  $\rightarrow$  C=O części ferulowej ( $\delta = 168,9$ ) pozwoliła stwierdzić, że związek **20** różni się od flawonoidu **18** tylko zastąpieniem jednostki kwasu glukuronowego przez cząsteczkę glukozy, która była przyłączona przy węglu C-7. Zatem, flawonoid **20** został zidentyfikowany jako 7-*O*-[2'-*O*-feruloylo- $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozyd] trycyny. Związek ten nie był dotychczas opisany w literaturze.

Widmo masowe związku **12** charakteryzowało się obecnością jonu molekularnego o  $m/z$  1033, natomiast widmo UV wskazywało na acylację kwasem hydroksycynamonowym. Ponadto w widmie masowym stwierdzono występowanie jonu o  $m/z$  703 odpowiadającego trzem cząsteczkom kwasu glukuronowego i grupy acylowej (kwas ferulowy). Z powyższych danych wynika, że związek ten różni się od flawonoidu **18** posiadaniem dodatkowej cząsteczki kwasu glukuronowego i okazał się on być identyczny z wzorcem stanowiącym 7-*O*-{2'-*O*-*p*-feruloylo-[ $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 3)]-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozyd} trycyny. Flawonoid ten został wyizolowany po raz pierwszy z *M. sativa* [Stochmal i in. 2001b].

Widmo masowe związku **14** zawierało jon molekularny o  $m/z$  1003, ponadto w widmie tym stwierdzono występowanie jonów  $m/z$  857 [ $\text{M}-146\text{-H}$ ] $^-$ , 673 [(3 $\times$ 176)+146-H] $^-$  i 329 [ $\text{M}-(3\times 176)-146\text{-H}$ ] $^-$ . Widmo  $^1\text{H}$  NMR charakteryzowało się obecnością dwóch sygnałów  $\delta = 7,42$  (2H, d,  $J = 8,5$  Hz) i  $\delta = 6,78$  (2H, d,  $J = 8,5$  Hz) wskazujących na podstawienie w pozycji 1 i 4 pierścienia aromatycznego, wraz z sygnałami  $\delta = 7,61$  (1H, d,  $J = 16,0$  Hz) i  $\delta = 6,35$  (1H, d,  $J = 16,0$  Hz) typowymi dla

wiązania podwójnego *trans*. Analiza 1D i 2D NMR wykazała występowanie trzech cząsteczek kwasu glukuronowego. Eksperyment korelacyjny pomiędzy: H-1 GluA<sub>1</sub> ( $\delta = 5,42$ )  $\rightarrow$  C-7 ( $\delta = 164,4$ ); H-1 GluA<sub>2</sub> ( $\delta = 5,11$ )  $\rightarrow$  C-2 GluA<sub>1</sub> ( $\delta = 82,4$ ); H-1 GluA<sub>3</sub> ( $\delta = 4,50$ )  $\rightarrow$  C-3 GluA<sub>2</sub> ( $\delta = 83,8$ ) i H-2 GluA<sub>2</sub> ( $\delta = 5,10$ )  $\rightarrow$  C=O fragmentu *p*-kumarowego ( $\delta = 168,8$ ) pozwolił związek **14** zidentyfikować jako 7-*O*-{2'-*O*-*p*-kumaroylo- $[\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 3)]-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozyd} trycyny. Flawonoid ten jest nowy i nie był dotychczas opisany w literaturze.

Wszystkie wyizolowane glikozydy trycyny zawierały jedną (**17**, **20** i **23**), dwie (**6**, **16**, **18** i **19**) lub trzy cząsteczki kwasu glukuronowego (**12** i **14**). Dwa z tych związków dodatkowo, oprócz cząsteczek kwasu glukuronowego, zawierały także cząsteczkę glukozy (**20** i **23**). Glikozydy: **14**, **20** oraz **23** są związkami nowymi, nie opisanymi dotychczas w literaturze światowej.

Aglikonem ostatniej zidentyfikowanej grupy flawonów był chryzoeriol, który w pozycji R<sub>1</sub> miał podstawioną grupę metoksyłową, a w pozycji R<sub>3</sub> wodór. Analiza widm MS/MS wyizolowanych glikozydów chryzoeriolu (**4**, **10** i **13**) wykazała obecność charakterystycznego piku o *m/z* 299, odpowiadającego cząsteczce chryzoeriolu.

Widmo masowe związku **4** zawierało trzy dominujące sygnały o *m/z* 651, 351 i 299 charakterystyczne odpowiednio dla jonu molekularnego, części cukrowej i aglikonu. Obecność jonu o *m/z* 351 wskazywała, iż część cukrowa tego związku jest taka sama jak flawonoidu **2**, **3** i **6**, co zostało potwierdzone analizą widm <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR. Związki te różnią się jedynie rodzajem aglikonu. Biorąc pod uwagę powyższe dane związek **4** zidentyfikowano jako 7-*O*- $[\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozyd] chryzoeriolu. Flawonoid ten został wyizolowany po raz pierwszy i nie był dotychczas opisany w literaturze.

Związek **10** posiadał jon molekularny o *m/z* 1003. Wstępna analiza danych spektralnych tego związku wskazywała na duże podobieństwo strukturalne do flawonoidu **12**. Związki te charakteryzowały się identyczną fragmentacją cząsteczki, w wyniku której w części cukrowej zidentyfikowano dwie cząsteczki kwasu glukuronowego i jedną cząsteczkę kwasu ferulowego. Związek **10** został

zidentyfikowany jako 7-*O*-{2'-*O*-*p*-feruloylo-[ $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 3)]-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozyd} chryzoeriolu. Flawonoid ten został wykryty po raz pierwszy w lucernie siewnej [Stochmal i in. 2001b].

Jon molekularny związku **13** wynosił 973. Obecność jonu 673 wskazywała na występowanie w części cukrowej tego związku trzech cząsteczek kwasu glukuronowego (3 $\times$ 176) i jednej cząsteczki kwasu kumarowego (146), tak samo jak w związku **14**. Analiza widm NMR potwierdziła, że związki **13** i **14** różnią się między sobą rodzajem aglikonu. Na podstawie tych danych flawonoid **13** zidentyfikowano jako 7-*O*-{2'-*O*-*p*-kumaroylo-[ $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 3)]-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozyd} chryzoeriolu. Związek ten został wyizolowany po raz pierwszy.

Z trzech oznaczonych glikozydów chryzoeriolu jeden, nieacylowany, był dwuglukuronidem (**4**), natomiast trójglukuronowe glikozydy acylowane były kwasem ferulowym (**10**) i kumarowym (**13**). Związki **4** i **13** zostały po raz pierwszy opisane w światowej literaturze naukowej.

Biorąc pod uwagę powyższe dane można stwierdzić, że wyizolowane flawonoidy *M. truncatula* wykazywały wysoki stopień podobieństwa do flawonoidów *M. sativa*. W obu gatunkach dominującymi związkami były glikozydy trycyny. Jedenaście flawonoidów występowało w obu gatunkach (**3**, **5-7**, **9**, **10**, **12**, **16-19**). Osiem spośród wyodrębnionych glikozydów *M. truncatula* okazało się być związkami nowymi (**4**, **11**, **13-15**, **20**, **22** i **23**). Zarówno część glikozydów *M. truncatula*, jak i *M. sativa* było acylowanych kwasem ferulowym, kumarowym lub synapinowym. Zasadniczą cechą, która różniła oba gatunki był rodzaj związku tworzącego część cukrową. W *M. sativa* jedynym składnikiem cukrowym występującym we wszystkich flawonoidach był kwas glukuronowy, natomiast w *M. truncatula* obok kwasu glukuronowego w trzech glikozydach (**15**, **20** i **23**) występowała cząsteczka glukozy. Ponadto z części nadziemnych *M. truncatula* wyizolowano trzy flawonole (rutynę i dwa glukozydy larycytryny). Określenie struktur związków flawonoidowych uzupełnia poznaną dotychczas wiedzę na temat metabolitów wtórnych *M. truncatula* i daje możliwość rozwoju badań nad genomiką funkcjonalną rodziny roślin bobowatych, której rośliną modelową jest właśnie *M. truncatula*.

Dla wszystkich wyizolowanych pojedynczych flawonów i flawonoli określono długość fali światła ultrafioletowego, przy której następuje maksymalna absorbancja, a dla wszystkich nowo opisanych związków wykonano badania spektroskopii masowej wysokiej rozdzielczości (Tab.5).

### **3. Analiza flawonoidów *M. truncatula* metodą chromatografii ciekowej**

Posiadanie wyizolowanych 23 wzorców związków flawonoidowych z części nadziemnych *M. truncatula* sprawiło, że stało się możliwe opracowanie metody ilościowego oznaczania zawartości tych związków w próbach roślinnych. W celu wykonania takich oznaczeń dotychczas w Zakładzie Biochemii i Jakości Plonów stosowano wysokociśnieniowy chromatograf ciekowy (HPLC). Analizy uzyskiwane metodą HPLC były jednak długotrwałe (około 60-75 minut) i charakteryzowały się zużyciem dużej ilości eluentów. Zakupienie do Zakładu ultrasprawnego chromatografu ciekowego (UPLC) pozwoliło na opracowanie bardzo nowoczesnej metody ilościowego oznaczania zawartości związków, która skróciła czas analizy do kilkunastu minut i do 1/3 ograniczyła ilość zużywanych rozpuszczalników.

Dla każdego wzorca wykonano oddzielną analizę UPLC celem określenia czasów retencji poszczególnych związków (Tab. 6). W celu przygotowania ekstraktów roślinnych do analizy UPLC wykorzystano metodę wstępnego oczyszczania za pomocą ekstrakcji do fazy stałej na mikrokolumnach Sep-Pak C18. Procedura ta pozwoliła usunąć z ekstraktu cukrowce, saponiny i barwniki (chlorofil), co znacznie oczyszcza ekstrakty przed wstrzyknięciem ich na kolumnę chromatograficzną. Przykład uzyskiwanych rozdziałów przedstawia rysunek 10. Na podstawie czasów retencji otrzymanych w rozdzielach wzorców oraz widm absorpcyjnych rozpoznawano piki charakteryzujące związki w rozdzielach ekstraktów roślinnych. Pomimo wielokrotnych prób opracowania optymalnych warunków metody nie udało się rozseparować wszystkich związków; zawartość flawonoidów **7** i **8** oraz **12** i **13** podawana jest sumarycznie. Ponadto związki **21**, **22** i **23** występowały w śladowych ilościach i integracja ich pików okazała się być niemożliwa. Określone

czasy retencji tych związków wynosiły: dla flawonoidu **21** – 3,00 min., dla **22** – 3,24 min. a dla **23** – 4,56 min.

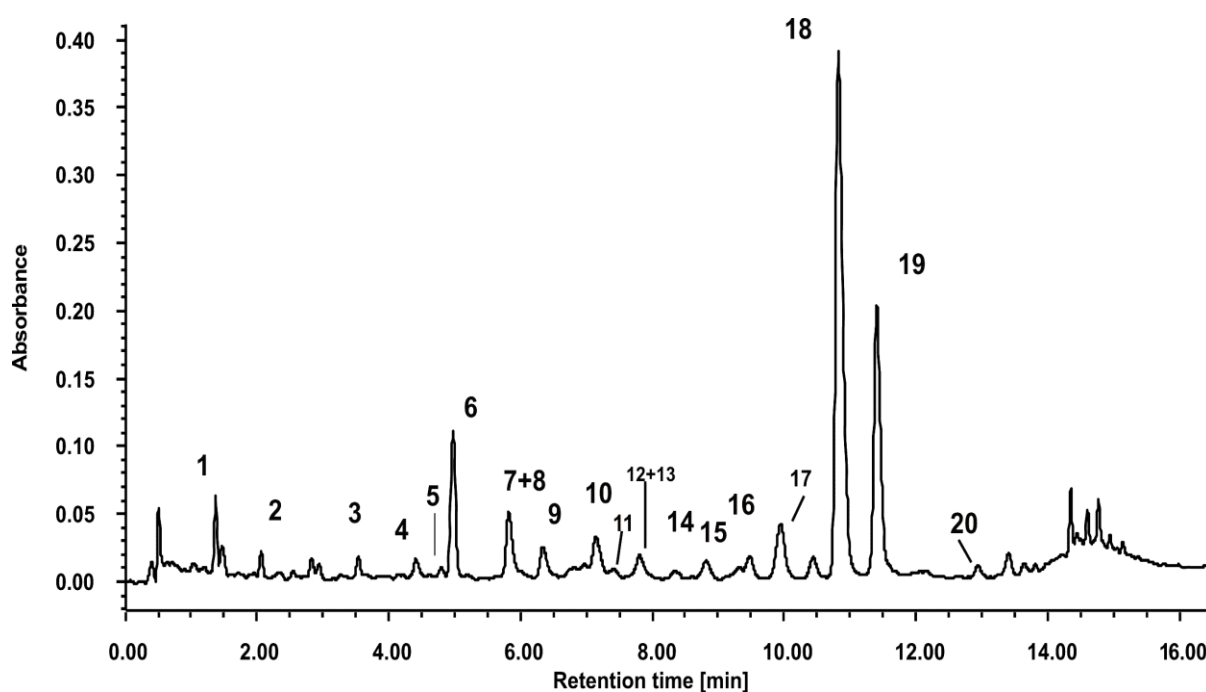
**Tab. 5.** Charakterystyka związków flawonoidowych *M. truncatula*

Związek	Ilość związku [mg]	ESI-HRMS <i>m/z</i>	FAB-MS (jon ujemny) <i>m/z</i>	Długość fali maksymalnej absorbancji [nm]
<b>1</b>	10,80		817 [M-H] <sup>-</sup> , 655 [M-162-H] <sup>-</sup> , 493 [M-(2x162)-H] <sup>-</sup> , 331 [M-(3x162)-H] <sup>-</sup>	251, 351
<b>2</b>	0,63		637 [M-H] <sup>-</sup> , 461 [M-176-H] <sup>-</sup> , 251 [2 x 176] <sup>-</sup> , 285 [M-(2 x 176)-H] <sup>-</sup>	254, 347
<b>3</b>	2,30		621 [M-H] <sup>-</sup> , 351 [2x176-H] <sup>-</sup> , 269 [M-(2x176)-H] <sup>-</sup>	265, 336
<b>4</b>	1,45	651,1253	651 [M-H] <sup>-</sup> , 351 [2x176-H] <sup>-</sup> , 299 [M-(2x176)-H] <sup>-</sup>	251, 346
<b>5</b>	3,06		461 [M-H] <sup>-</sup> , 285 [M-176-H] <sup>-</sup>	253, 347
<b>6</b>	80,80		681 [M-H] <sup>-</sup> , 351 [2x176-H] <sup>-</sup> , 299 [M-(2x176)-H] <sup>-</sup>	351
<b>7</b>	11,20		973 [M-H] <sup>-</sup> , 797 [M-176-H] <sup>-</sup> , 703 [4 x 176-H] <sup>-</sup> , 269 [M(4 x 176)-H] <sup>-</sup>	268, 331
<b>8</b>	0,93		609 [M-H] <sup>-</sup> , 463 [M-146-H] <sup>-</sup> , 301 [M-146-162-H] <sup>-</sup>	255, 353
<b>9</b>	1,00		943 [M-H] <sup>-</sup> , 797 [M-H-kwas kumarowy] <sup>-</sup> , 445 [M-H- kwas kumarowy- 2GluA] <sup>-</sup> , 269 [M-H- kwas kumarowy -3GluA] <sup>-</sup>	271, 323
<b>10</b>	74,50		1003 [M-H] <sup>-</sup> , 827 [M-176-H] <sup>-</sup> , 651 [M-(2 x176)-H] <sup>-</sup> , 475 [M-(3 x 176) -H] <sup>-</sup> , 299 [M-(4 x 176)-H] <sup>-</sup>	249, 337
<b>11</b>	0,76	827,2435	827 [M-H] <sup>-</sup> , 621 [M-206-H] <sup>-</sup> , 557 [(2x176)+206-H] <sup>-</sup> , 351 [(2x176)-H] <sup>-</sup>	267, 334
<b>12</b>	1,40		1033 [M-H] <sup>-</sup> , 857 [M-176-H] <sup>-</sup> , 703 [(4x176)-H] <sup>-</sup> , 329 [M-(4x176)-H] <sup>-</sup>	338
<b>13</b>	6,6	973,1851	973 [M-H] <sup>-</sup> , 673 [(3x176)+145-H] <sup>-</sup> , 299 [M-673-H] <sup>-</sup>	269, 324
<b>14</b>	2,1	1003,2071	1003 [M-H] <sup>-</sup> , 857 [M-146-H] <sup>-</sup> , 673 [(3x176)+146-H] <sup>-</sup> , 329 [M-(3x176)-146-H] <sup>-</sup>	270, 322
<b>15</b>	2,00	959,2065	959 [M-H] <sup>-</sup> , 689 [(3x176)+162-H] <sup>-</sup> , 269 [M-(3x176)-162-H] <sup>-</sup>	268, 331
<b>16</b>	2,00		887 [M-H] <sup>-</sup> , 557 [(2x176)+206-H] <sup>-</sup> , 329 [M-(2x176)-206-H] <sup>-</sup>	341
<b>17</b>	2,00		505 [M-H] <sup>-</sup> , 329 [M-162-H] <sup>-</sup>	351
<b>18</b>	25,00		857 [M-H] <sup>-</sup> , 527 [(3x176)-H] <sup>-</sup> , 329 [(3x176)-H] <sup>-</sup>	269, 331
<b>19</b>	29,00		827 [M-H] <sup>-</sup> , 497 [(2x176)+146-H] <sup>-</sup> , 329 [M-(2x176)-146-H] <sup>-</sup>	270, 322
<b>20</b>	3,00	843,1999	843 [M-H] <sup>-</sup> , 513 [(2x176)+162-H] <sup>-</sup> , 329 [M-(2x176)-162-H] <sup>-</sup>	338
<b>21</b>	1,50		655 [M-H] <sup>-</sup> , 493 [M-162-M] <sup>-</sup> , 331 [M-(2x162)-H] <sup>-</sup>	252, 351
<b>22</b>	1,00	797,1492	797 [M-H] <sup>-</sup> , 527 [3 x GluA-H] <sup>-</sup> , 351 [2 x GluA-H] <sup>-</sup>	265, 336
<b>23</b>	3,00	667,1590	667 [M-H] <sup>-</sup> , 505 [M-162-H] <sup>-</sup> , 491 [M-176-H] <sup>-</sup> , 329 [M-162-176-H] <sup>-</sup>	269, 326

**Tab. 6.** Czasy retencji wzorców flawonoidów części nadziemnych *M. truncatula*

Związek	Czas retencji [min.]	Związek	Czas retencji [min.]
1	1,35	13	7,76
2	2,32	14	8,32
3	3,54	15	8,90
4	4,43	16	8,91
5	4,83	17	9,56
6	4,98	18	10,28
7	5,81	19	10,77
8	5,63	20	12,59
9	6,78	21	3,00
10	7,08	22	3,24
11	7,10	23	4,56
12	7,66		

**Rys. 10.** Rozdział UPLC ekstraktu części nadziemnych *M. truncatula*



W celu wykonania oznaczeń ilościowych wyznaczono dla poszczególnych flawonoidów krzywe wzorcowe zależności pola powierzchni piku od stężenia danego

związku w granicach stężeń 50,00 – 3,13 µg/ml (Tab. 7). Limit detekcji poszczególnych związków wahał się między 0,16 a 1,00 µg/ml.

**Tab. 7.** Krzywe kalibracyjne wzorców *M. truncatula* odmiany Jemalong A17

Związek	Równanie regresji	R <sup>2</sup>	Limit detekcji (µg/ml)
1	$y = 0,77 \cdot 10^{-4}x - 0,21$	0,9992	0,46
2	$y = 3,64 \cdot 10^{-4}x - 0,40$	0,9993	0,58
3	$y = 0,83 \cdot 10^{-4}x - 0,18$	0,9996	0,17
4	$y = 1,25 \cdot 10^{-4}x - 0,17$	0,9964	0,28
5	$y = 2,69 \cdot 10^{-4}x - 0,66$	0,9967	0,28
6	$y = 1,08 \cdot 10^{-4}x + 0,64$	0,9945	0,17
7	$y = 3,77 \cdot 10^{-4}x + 0,07$	0,9974	0,46
8	$y = 1,96 \cdot 10^{-4}x - 1,06$	0,9924	0,52
9	$y = 2,40 \cdot 10^{-4}x - 0,71$	0,9893	1,00
10	$y = 5,04 \cdot 10^{-4}x - 0,48$	0,9997	0,63
11	$y = 3,26 \cdot 10^{-4}x + 0,02$	0,9991	0,88
12	$y = 3,47 \cdot 10^{-4}x - 0,04$	0,9999	0,71
13	$y = 1,06 \cdot 10^{-4}x - 0,43$	0,9978	0,35
14	$y = 2,35 \cdot 10^{-4}x - 0,03$	0,9983	0,93
15	$y = 1,69 \cdot 10^{-4}x - 0,19$	0,9995	0,43
16	$y = 1,12 \cdot 10^{-4}x - 0,92$	0,9977	0,29
17	$y = 4,13 \cdot 10^{-4}x + 0,08$	0,9997	0,76
18	$y = 0,87 \cdot 10^{-4}x + 0,76$	0,9870	0,19
19	$y = 1,05 \cdot 10^{-4}x + 0,46$	0,9991	0,39
20	$y = 0,87 \cdot 10^{-4}x - 0,21$	0,9989	0,16
21	$y = 3,12 \cdot 10^{-4}x + 0,24$	0,9994	0,33
22	$y = 2,91 \cdot 10^{-4}x + 0,51$	0,9949	0,42
23	$y = 0,15 \cdot 10^{-4}x - 0,23$	0,9995	0,44

y – stężenie związku

x – pole powierzchni piku

R<sup>2</sup> – współczynnik determinacji

Korzystając z materiału roślinnego *M. truncatula* odmiany Jemalong A17 oszacowano wpływ ekstrakcji do fazy stałej i dokładność aparatu na rozrzut wyników (Tab. 8). Wykazano, że dla n = 15 odchylenie standardowe dla pojedynczych związków wynosiło średnio dla liści 17%, a dla łodyg 21%. To relatywnie wysokie



odchylenie standardowe wynika z faktu, iż analizowany był materiał roślinny, w którym trudno jest uzyskać wysoką jednorodność.

**Tab. 8.** Powtarzalność metody izolacji (n = 15) pojedynczych flawonoidów części nadziemnych *M. truncatula* odmiany Jemalong A17

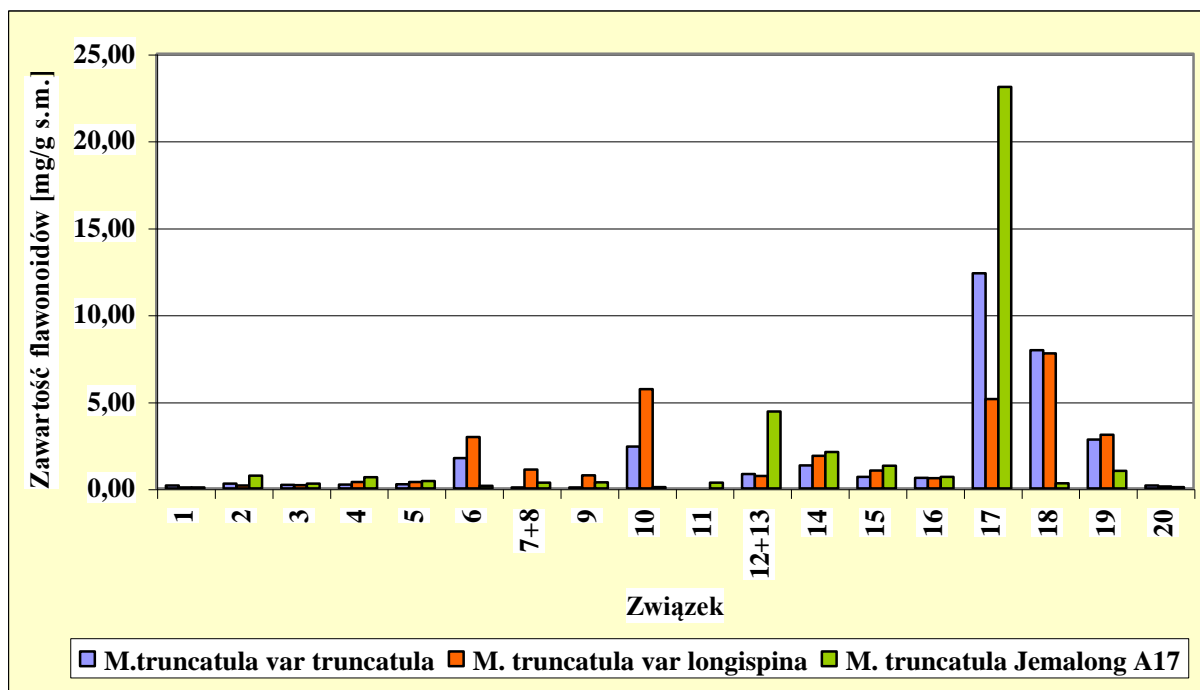
Związek	Liście			Łodygi		
	Średnia zawartość [mg/g s.m.]	Odchylenie standardowe (n = 15)	Odchylenie standardowe (%)	Średnia zawartość [mg/g s.m.]	Odchylenie standardowe (n = 15)	Odchylenie standardowe (%)
1	0,07	0,01	7,50	0,05	0,01	15,84
2	0,87	0,13	14,75	0,72	0,18	25,57
3	0,16	0,02	15,26	0,37	0,08	21,90
4	0,77	0,13	17,31	0,54	0,09	17,22
5	0,41	0,07	18,20	0,79	0,10	12,79
6	0,04	0,01	31,18	0,08	0,01	16,74
7+8	0,34	0,04	11,91	0,17	0,04	21,55
9	0,43	0,09	20,85	0,23	0,07	30,81
10	0,04	0,01	27,66	0,04	0,01	27,66
11	0,53	0,09	16,20	0,37	0,06	17,07
12+13	7,35	0,58	7,95	4,89	0,47	9,68
14	0,04	0,01	27,66	0,04	0,01	27,66
15	0,56	0,11	19,25	0,49	0,12	25,69
16	0,37	0,08	20,64	0,32	0,08	25,69
17	23,92	0,59	2,47	11,15	0,96	8,60
18	0,51	0,07	13,24	0,41	0,11	27,84
19	1,15	0,15	13,15	0,48	0,10	21,88
20	0,10	0,02	19,96	0,05	0,01	23,22

#### 4. Oznaczanie zawartości związków flawonoidowych w częściach nadziemnych badanych odmian *M. truncatula*

W opisanych w literaturze badaniach zawartości metabolitów wtórnych lucerny zamieszczone są dane dotyczące całych pędów części nadziemnych. Opracowanie krótkiej metody UPLC oznaczania zawartości związków flawonoidowych pozwoliło na wykonanie znacznie większej ilości analiz. Dzięki temu próbki części nadziemnych zbierane w trzech sezonach wegetacyjnych, w latach 2005-2007, podzielono na liście i łodygi, a następnie prześledzono w nich koncentrację

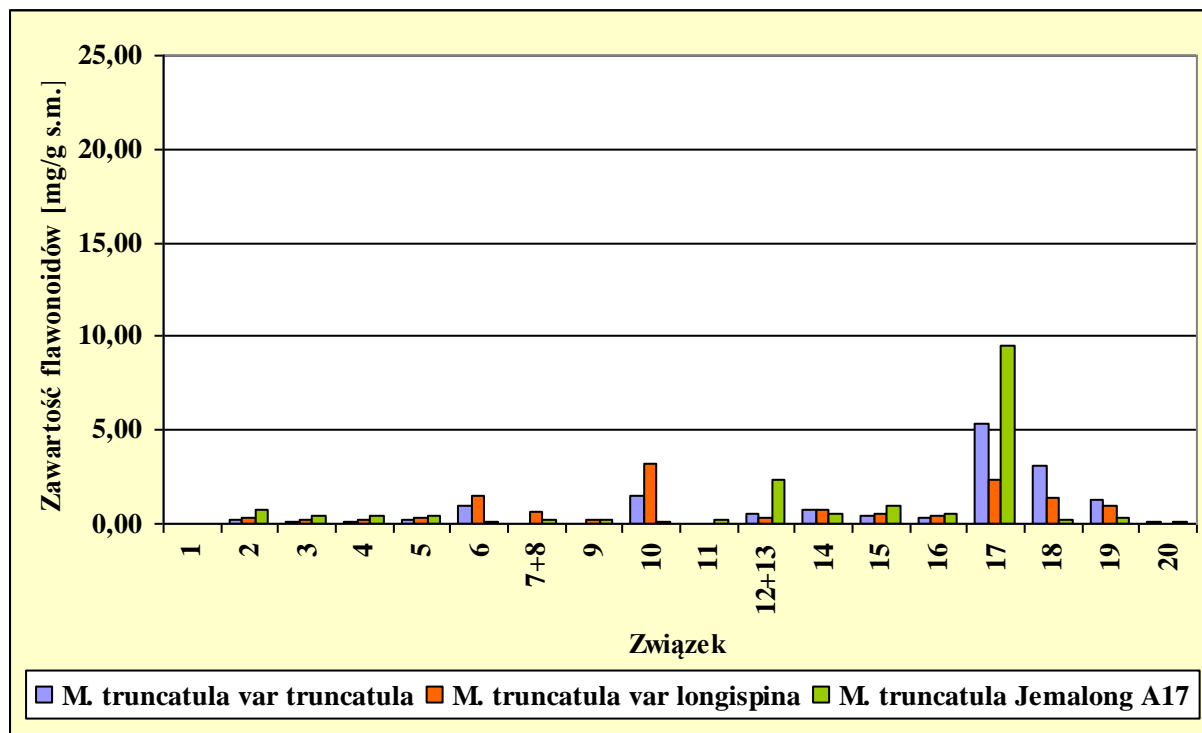
pojedynczych związków flawonoidowych. Zawartość poszczególnych flawonoidów przedstawia rysunek 11 i 12.

**Rys. 11.** Zawartość poszczególnych związków flawonoidowych (średnia z lat 2005-2007) w liściach *M. truncatula*



W liściach i łodygach badanych odmian *M. truncatula* dominującymi flawonoidami były: 7-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozyd trycyny - **17**, 7-*O*-[2'-*O*-feruloylo- $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozyd] trycyny - **18** i 7-*O*-[2'-*O*-kumaroylo- $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozyd] trycyny - **19**. Duże ilości 7-*O*-{2-*O*-*p*-feruloylo-[ $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 3)]-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozydu} chryzoeriolu - **10** występowały w odmianach *M. truncatula* var *truncatula* i *M. truncatula* var *longispina*, natomiast 7-*O*-{2-*O*-*p*-feruloylo-[ $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 3)]-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozydu} trycyny - **12** oraz 7-*O*-{2-*O*-*p*-kumaroylo-[ $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 3)]-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozylo(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozydu} chryzoeriolu - **13** w odmianie *M. truncatula* Jemalong A17.

**Rys. 12.** Zawartość poszczególnych związków flawonoidowych (średnia z lat 2005-2007) w łodygach *M. truncatula*

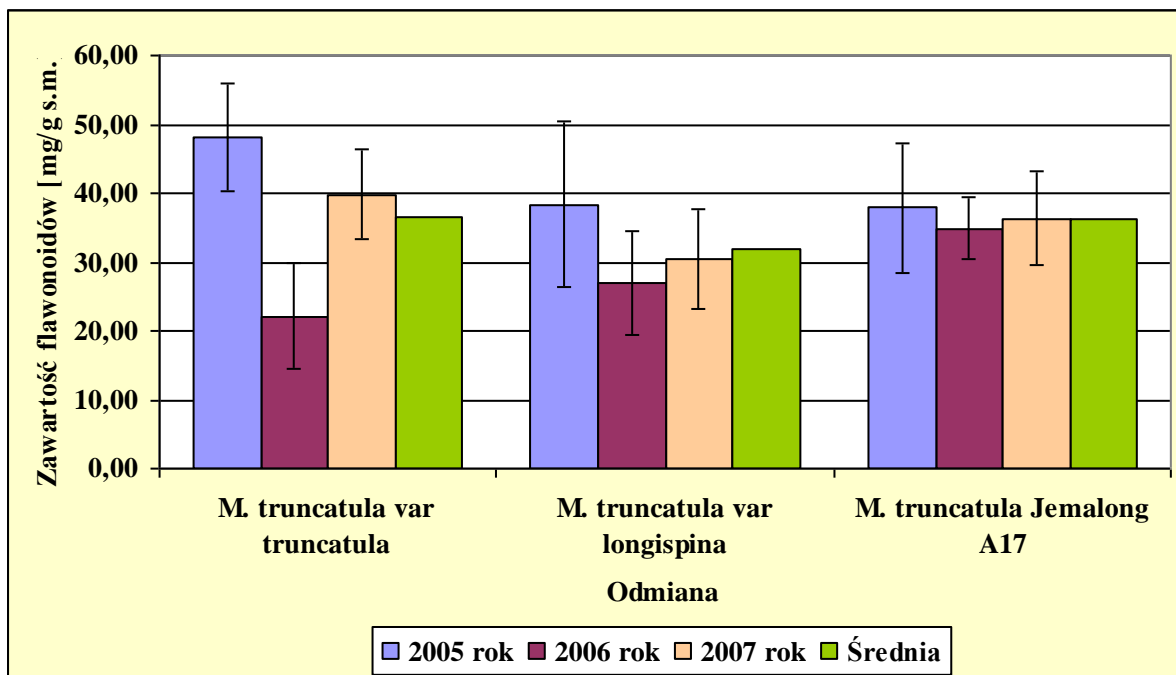


Zawartość poszczególnych związków flawonoidowych w liściach była znacznie wyższa niż w łodygach i wynosiła od 0,01 mg/g s.m. do 22,25 mg/g s.m., podczas gdy maksymalna zawartość dominującego flawonu w łodygach wynosiła 9,77 mg/g s.m. Odmiana Jemalong A17 charakteryzowała się występowaniem zarówno w liściach, jak i w łodygach jednego związku w znacznych ilościach; glukuronopiranozyd trycyny w liściach stanowił 63% sumarycznej zawartości flawonoidów, a w łodygach 52%. Ten dominujący związek w odmianach *M. truncatula* var *truncatula* i *M. truncatula* var *longispina* stanowił tylko od 18 do 39%. Wcześniejsze badania przeprowadzone na dziesięciu odmianach *M. sativa* (lucerna siewna) wykazały, że dla wszystkich odmian dominującym związkiem był również 7-*O*- $\beta$ -D-glukuronopiranozyd trycyny, którego maksymalne stężenie wynoszące 8,67 mg/g s.m. oznaczono w odmianie Magali [Stochmal 2007]. W zawartości poszczególnych flawonoidów rejestrowano bardzo duże zróżnicowanie. Oprócz związków występujących w znacznych ilościach, w ekstraktach roślinnych każdej z

odmian występowało też od pięciu do siedmiu związków, których zawartość była mniejsza niż 0,1 mg/g s.m. W odmianach *M. truncatula* var *truncatula* i *M. truncatula* var *longispina* w tak małych ilościach występowały glukuronidy apigeniny, natomiast w *M. truncatula* Jemalong A17 głównie glukuronidy trycyny. We wszystkich odmianach w ilościach nie przekraczających 0,1 mg/g s.m. występował flawonol triglukozyd larycytryny.

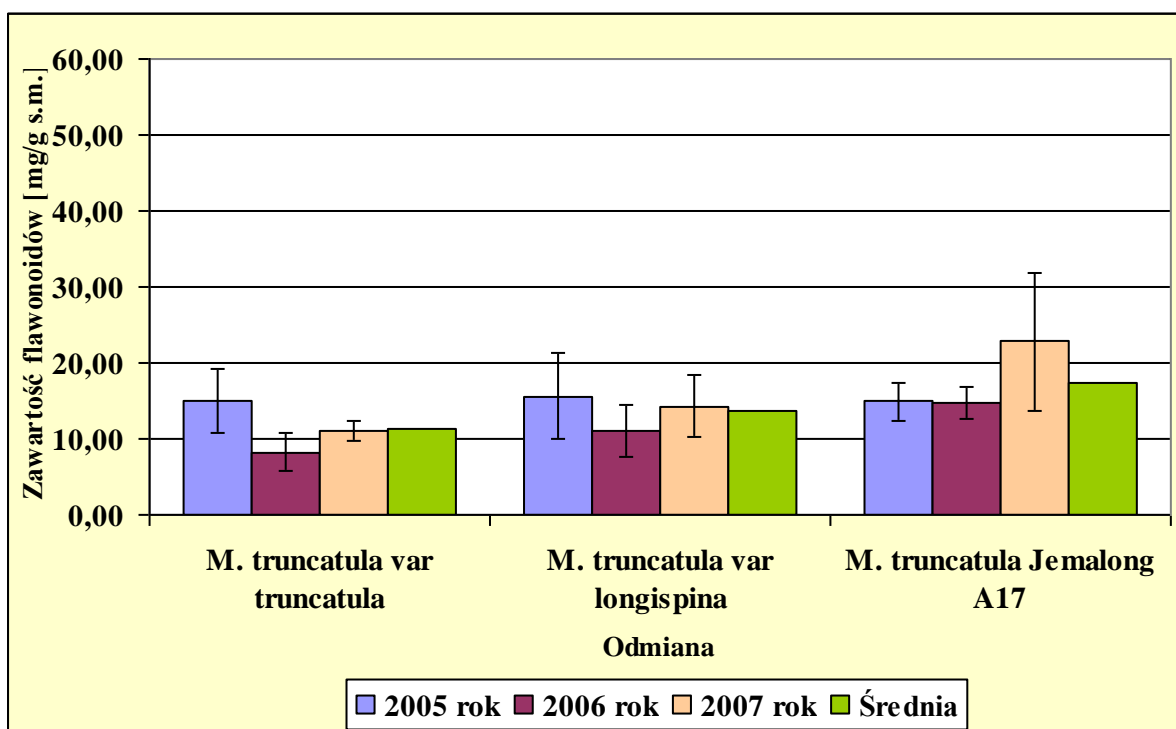
Podczas izolacji związków z mocno skoncentrowanego ekstraktu części nadziemnych odmiany Jemalong A17 udało się oczyścić związki: 3,5'-digluko-3-metylomrycetyna – **21**, 7-O-β-D-glukuronopiranozylo(1→3)-O-β-D-glukuronopiranozylo(1→2)-O-β-D-glukuronopiranozyd apigeniny – **22** i 7-O-β-D-glukuronopiranozylo-4'-O-β-D-glukopiranozyd] trycyny – **23**, które w ekstraktach roślinnych poszczególnych odmian występowały w tak małych ilościach, że możliwości detekcyjne aparatu nie pozwalały na oznaczenie ich zawartości.

Zsumowanie zawartości poszczególnych związków w latach uprawy 2005 – 2007 pozwoliło na określenie ich zawartości w liściach i łodygach. Zawartość związków flawonoidowych w liściach trzech odmian *M. truncatula* była bardzo wysoka i wynosiła średnio około 3,5% s.m (Rys. 13). W roku 2005 zawartość związków flawonoidowych w liściach *M. truncatula* var *truncatula* osiągnęła nawet wartość 4,8% s.m. W przypadku odmiany Jemalong A17 stwierdzono wysoką stabilizację syntezy związków flawonoidowych w kolejnych latach uprawy. Zawartość związków flawonoidowych w łodygach (Rys. 14) była niższa niż w liściach i wynosiła średnio 1,5% s.m. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy odmianami i w poszczególnych latach uprawy. Uzyskane wyniki badań są porównywalne z równie dużą zawartością flawonoidów stwierdzoną w częściach nadziemnych dziesięciu odmian lucerny siewnej, a wahającą się na poziomie 2,5-3,0% suchej masy. W badanych roślinach *M. truncatula* zupełnie inaczej zachodzi synteza drugiej grupy metabolitów wtórnych – glikozydów triterpenowych. Kapusta [2006] stwierdził, iż w tym czasie, kiedy w częściach nadziemnych nagromadzane są duże ilości związków flawonoidowych zawartość saponin jest wielokrotnie mniejsza i wynosi 0,22% s.m. dla *M. truncatula* var *truncatula* i *M. truncatula* var *longispina* oraz 0,15% s.m. dla *M. truncatula* Jemalong A17.



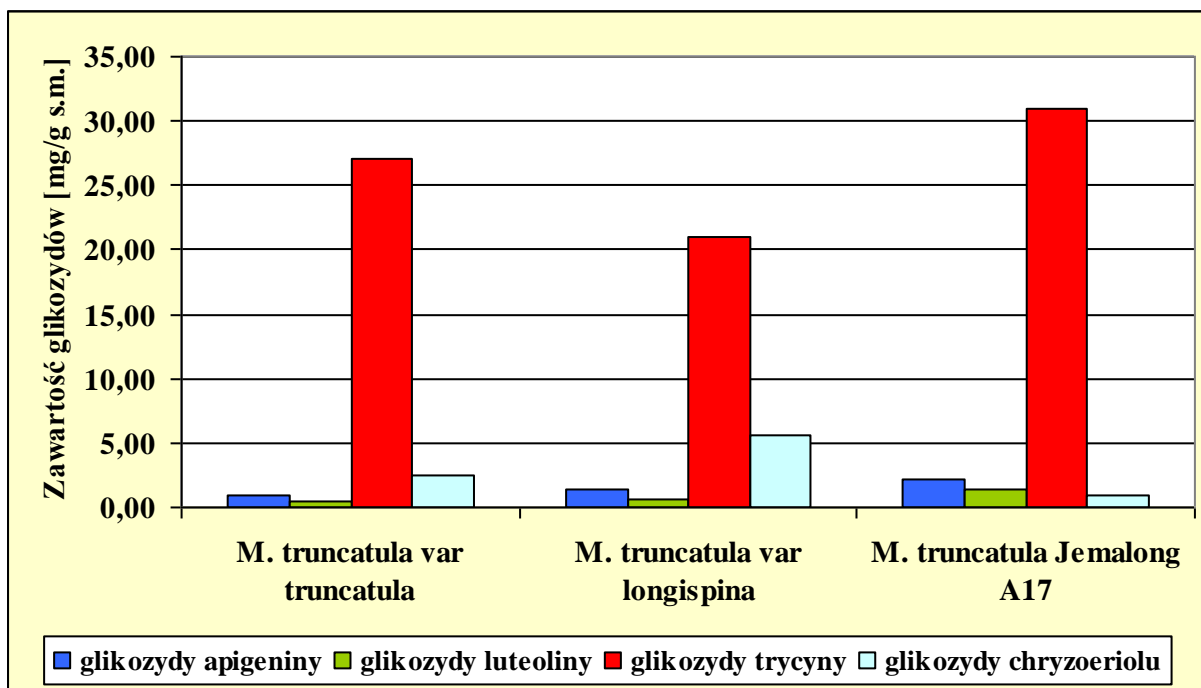
Rys. 13. Sumaryczna zawartość flawonoidów w liściach *M. truncatula*

Rys. 14. Sumaryczna zawartość flawonoidów w łodygach *M. truncatula*

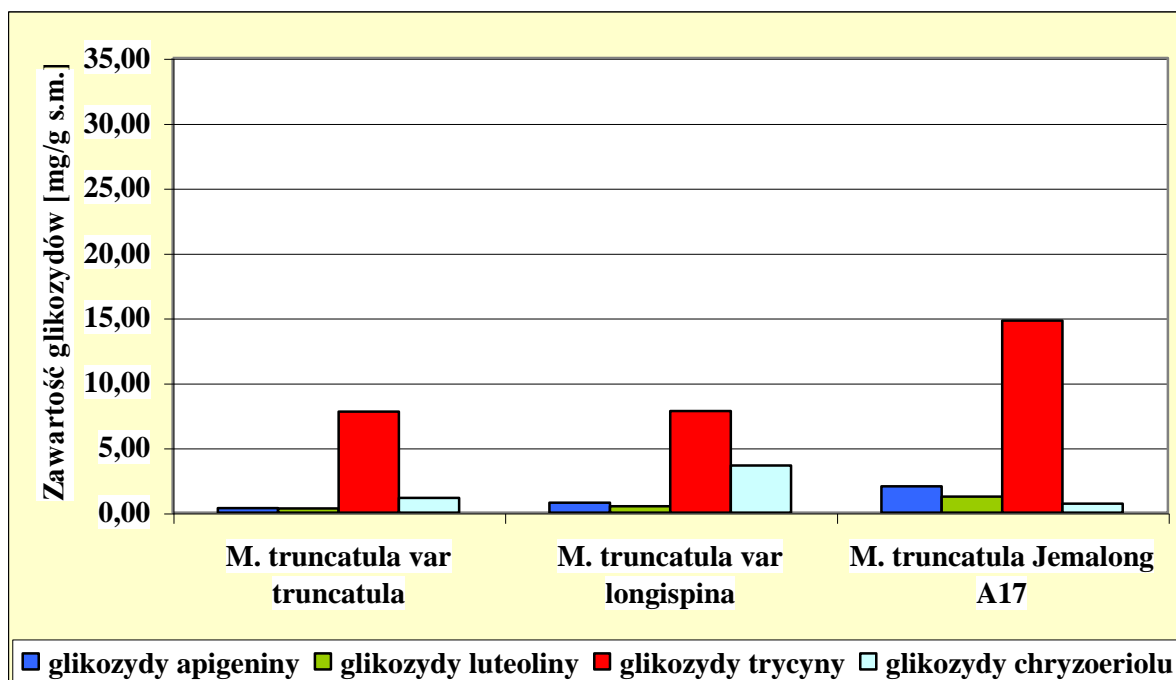


Flawony wyizolowane z części nadziemnych *M. truncatula* ze względu na budowę aglikonu można podzielić na cztery grupy: mniej polarne glikozydy apigeniny i luteoliny oraz o większej polarności glikozydy trycyny i chryzoeriolu (Rys. 15 i 16). Stwierdzono statystycznie istotną różnicę pomiędzy zawartością glikozydów trycyny i pozostałych grup związków zarówno w przypadku liści, jak i łodyg wszystkich badanych odmian *M. truncatula*. W odmianach *M. truncatula* var *truncatula*, *M. truncatula* var *longispina*, *M. truncatula* Jemalong A17 procentowy udział glikozydów trycyny w stosunku do ogólnej zawartości flawonów wynosił w liściach odpowiednio: 88, 73 i 87%, a w łodygach: 81, 61 i 79%. Procentowa zawartość pozostałych glikozydów wahała się od 1% do 12%; tylko w przypadku odmiany *M. truncatula* var *longispina* wyższa była zawartość glikozydów chryzoeriolu; dla liści wynosiła 20%, a dla łodyg 28%.

**Rys. 15.** Zawartość poszczególnych glikozydów w liściach badanych odmian *M. truncatula*



Rys. 16. Zawartość poszczególnych glikozydów w łodygach badanych odmian *M. truncatula*



Dane uzyskane w tej pracy nad *M. truncatula*, jak również wcześniejsze badania prowadzone nad *M. sativa* wskazują, że związkami dominującymi były glikozydy trycyny. W ostatnim czasie wzrosło zainteresowanie tą grupą związków ze względu na ich właściwości antynowotworowe. Zdolność trycyny do hamowania cyklu komórkowego oraz wzrostu komórek rakowych stwierdzono w badaniach na linii komórek raka piersi (MDA-MB-468) i na nagich myszach. Związki trycyny wykazują także zdolność do hamowania aktywności cyklooksygenaz oraz modulowania zależnej od nich syntezy prostaglandyn, co wpływa na jej chemoprewencyjną skuteczność w zapobieganiu nowotworom jelita i prostaty [Cai i in. 2004]. Dane uzyskane w tej pracy wskazują, że *M. truncatula* stanowi dobre źródło tych związków (Tab. 9). Stwierdzono około trzykrotnie wyższą zawartość glikozydów trycyny w liściach niż w łodygach poszczególnych odmian, niezależnie od roku zbioru. Średnie stężenie tych związków w liściach *M. truncatula* var *truncatula*, *M. truncatula* var *longispina* i *M. truncatula* Jemalong A17 wynosiło odpowiednio 2,88; 2,19 i 2,96% suchej masy, a w łodygach 0,80; 0,75 i 1,26% suchej masy. Podobną zawartością glikozydów trycyny charakteryzowały się całe pędy *M. sativa*. Zależnie od badanej odmiany sumaryczna zawartość tych związków wynosiła od 1,40 do 1,70% suchej masy. Liście *M. truncatula* Jemalong A17 i *M. truncatula* var *truncatula* mogą być dobrym materiałem do izolacji naturalnych związków trycyny.

**Tab. 9.** Zawartość glikozydów trycyny w liściach i łodygach trzech odmian

*M. truncatula* [mg/g s.m.]

Odmiana Rok zbioru	<i>M. truncatula</i> var <i>truncatula</i>		<i>M. truncatula</i> var <i>longispina</i>		<i>M. truncatula</i> Jemalong A17	
	liście	łodygi	liście	łodygi	liście	łodygi
<b>2005</b>	32,29	8,55	23,69	7,11	33,41	11,69
<b>2006</b>	17,64	6,22	18,63	6,38	26,31	10,10
<b>2007</b>	36,50	9,30	23,26	9,13	29,02	15,90
<b>średnia</b>	28,81	8,02	21,86	7,54	29,58	12,56

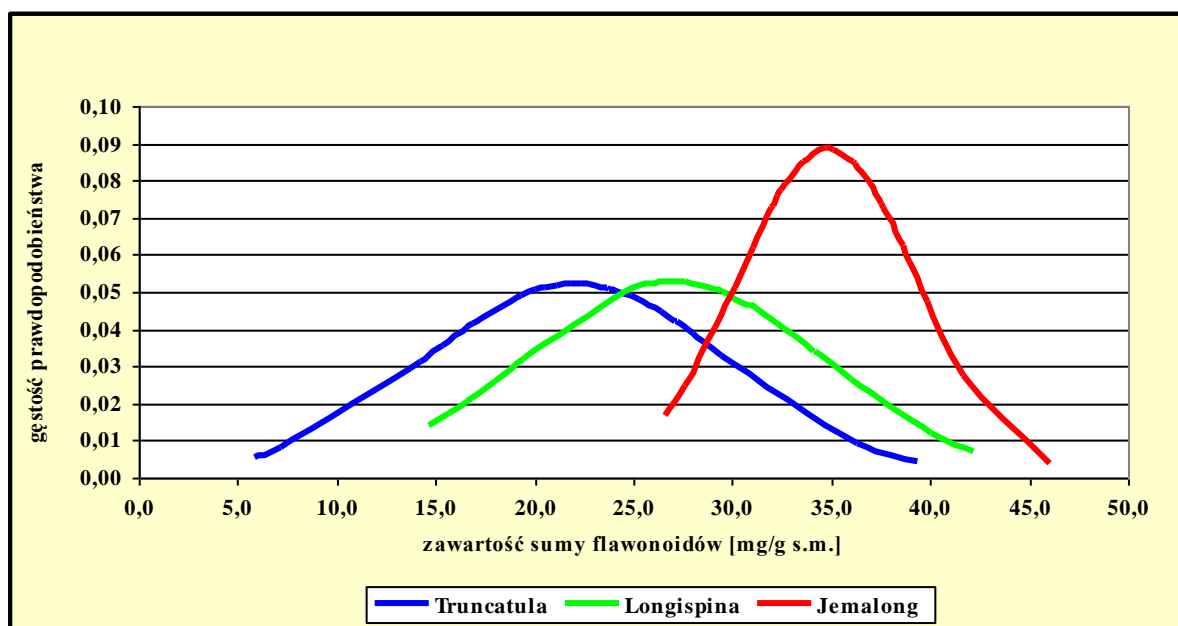


Poznanie naturalnej zmienności populacyjnej w obrębie gatunku jest niezbędne dla dalszego badania metabolomiki, gdyż jak wskazują wcześniejsze badania prowadzone nad *M. sativa*, naturalna zmienność populacyjna w zawartości saponin była bardzo duża i wynosiła od 0,1 do 2,0% suchej masy [Oleszek 1998].

Zmienność populacyjną zawartości flawonoidów badano w materiale pobranym z 25 roślin każdej odmiany *M. truncatula* (Rys. 17 i 18). Średnia zawartość flawonoidów w liściach *M. truncatula* var *truncatula*, *M. truncatula* var *longispina* i *M. truncatula* Jemalong A17 wynosiła odpowiednio: 22,07; 27,04 i 34,84 mg/g s.m., natomiast w łodygach 8,17; 11,14 i 14,72 mg/g s.m. W populacji odmian *M. truncatula* var *truncatula* i *M. truncatula* var *longispina* występowały rośliny o bardzo małej i dużej zawartości flawonoidów w liściach (odchylenie standardowe wynosiło odpowiednio: 7,67 i 7,56). Znacznie mniejsze różnice zawartości badanych związków rejestrowano w liściach roślin *M. truncatula* Jemalong A17 (odchylenie standardowe 4,51). Badanie polimorfizmu występowania flawonoidów w łodygach wykazało, że podobnym rozproszeniem wyników charakteryzowały się odmiany *M. truncatula* var *truncatula* i *M. truncatula* Jemalong A17 (odchylenia standardowe wynosiły 2,51 i 2,16).

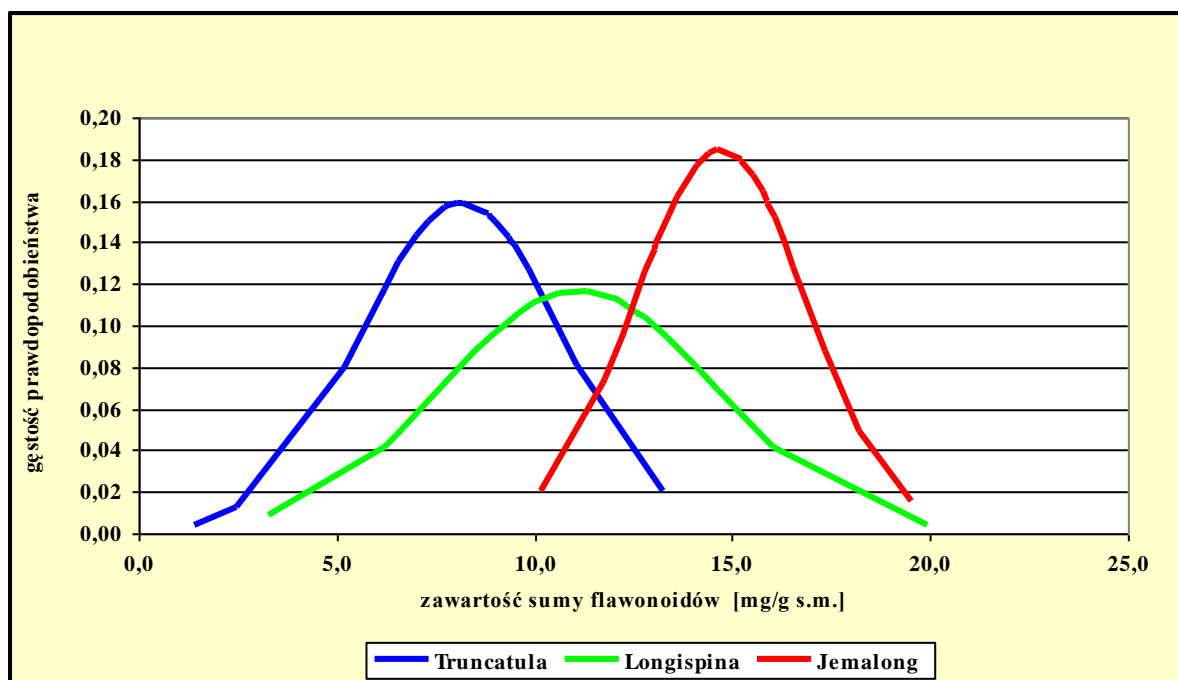
**Rys. 17.** Polimorfizm występowania związków flawonoidowych w liściach

*M. truncatula*



**Rys. 18.** Polimorfizm występowania związków flawonoidowych w łodygach

*M. truncatula*

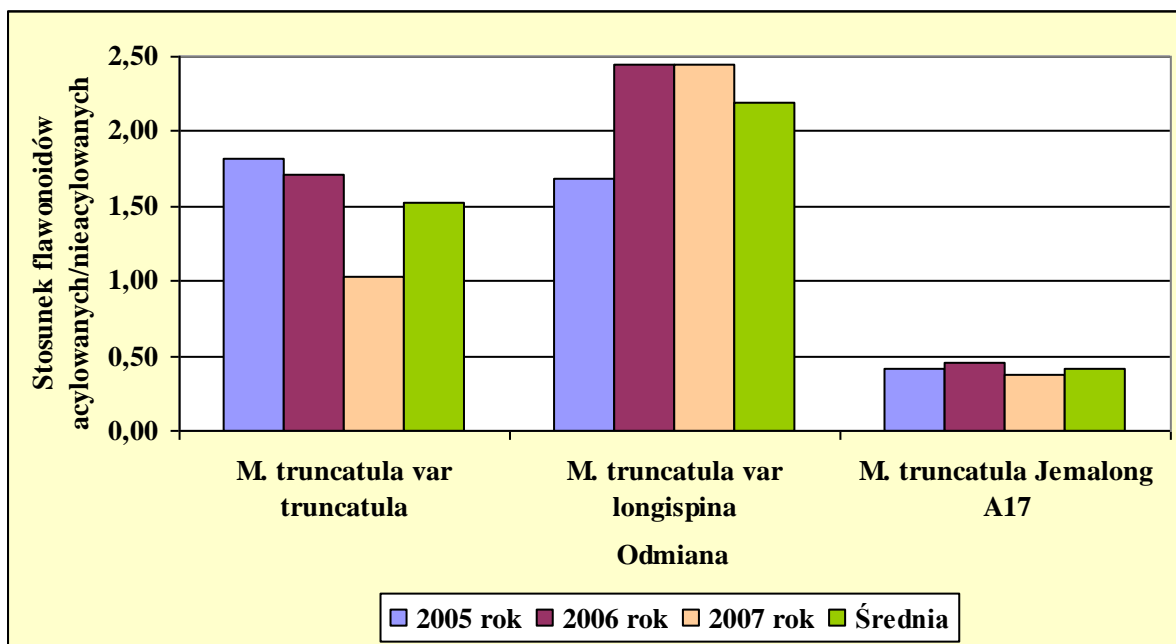


*M. truncatula* Jemalong A17 jest linią wyhodowaną z jednego nasiona i badania polimorfizmu występowania flawonoidów wykazały, że jest ona bardzo spójna pod względem tej cechy. Populacja charakteryzuje się występowaniem osobników o ustabilizowanej, wysokiej zawartości flawonoidów i może stanowić dobry materiał do ewentualnej dalszej selekcji ukierunkowanej na wyhodowanie odmiany syntetyzującej dużą ilość tych związków, a w szczególności wspomnianych wyżej, znajdujących zastosowanie w medycynie, flawonów trycyny.

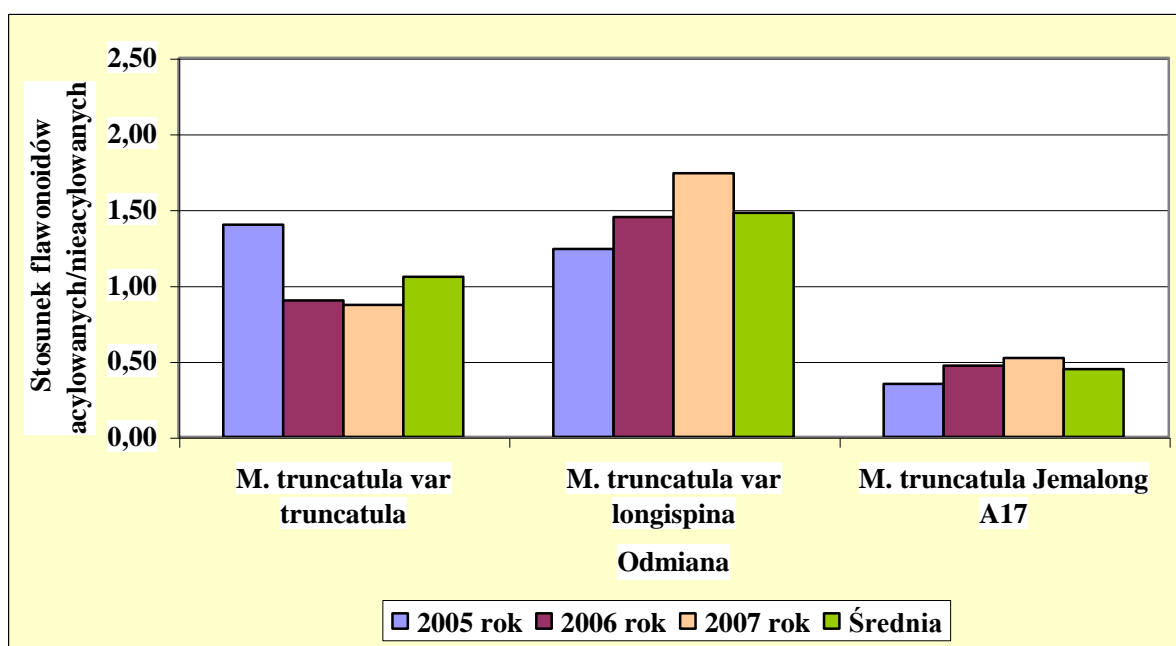
Tylko jeden procent promieniowania słonecznego emitowany jest w postaci UV-B, jednakże jest ono przedmiotem szczególnego zainteresowania i zaniepokojenia naukowców ze względu na to, że uszkadza ono kod DNA komórek biologicznych oraz ogranicza wzrost roślin. Rośliny wystawione na oddziaływanie silniejszego UV-B, broniąc się przed jego szkodliwym działaniem, wytwarzają więcej fenoli. Związki te działają jak filtr słoneczny. W literaturze występuje coraz więcej dowodów na to, że funkcję obronną pełnią flawonoidy acylowane kwasami hydroksycynamonowymi [Schnitzler i in. 1996, Turunen i in. 1999, Stochmal 2007].

Dwanaście spośród wyizolowanych flawonoidów *M. truncatula* było acylowanych kwasem ferulowym, kumarowym lub synapinowym. Policzono zatem sumaryczną zawartość tych związków. Maksymalna zawartość acylowanych glukuronidów znajdowała się w liściach odmiany *M. truncatula* var *truncatula* w 2005 roku – 31,10 mg/g s.m., a minimalna w łodygach tej odmiany w 2006 roku – 3,86 mg/g s.m. Możliwość oznaczenia metodą UPLC zawartości pojedynczych związków sprawiła, że określono wzajemny stosunek ilościowy flawonoidów acylowanych do nieacylowanych (Rys. 19 i 20). Był on silnie uzależniony od odmiany. W odmianach *M. truncatula* var *truncatula* i *M. truncatula* var *longispina* zawartość flawonoidów nieacylowanych w liściach i łodygach była znacznie mniejsza niż flawonoidów acylowanych i średni stosunek tych związków, liczony z trzech lat uprawy, w liściach wynosił odpowiednio dla odmiany 1,52 oraz 2,19; a w łodygach 1,06 i 1,48. Zdecydowanie wyróżniała się odmiana *M. truncatula* Jemalong A17, w przypadku której zawartość glikozydów nieacylowanych dwukrotnie przewyższała zawartość związków acylowanych i stosunek ten dla liści wynosił 0,42; a dla łodyg 0,45. W badanych wcześniej całych pędach *M. sativa* ten stosunek wahał się zależnie od odmiany od 1,2 do 2,2.

**Rys. 19.** Stosunek zawartości flawonoidów acylowanych do nieacylowanych w liściach trzech odmian *M. truncatula*



Rys. 20. Stosunek zawartości flawonoidów acylowanych do nieacylowanych w łodygach trzech odmian *M. truncatula*



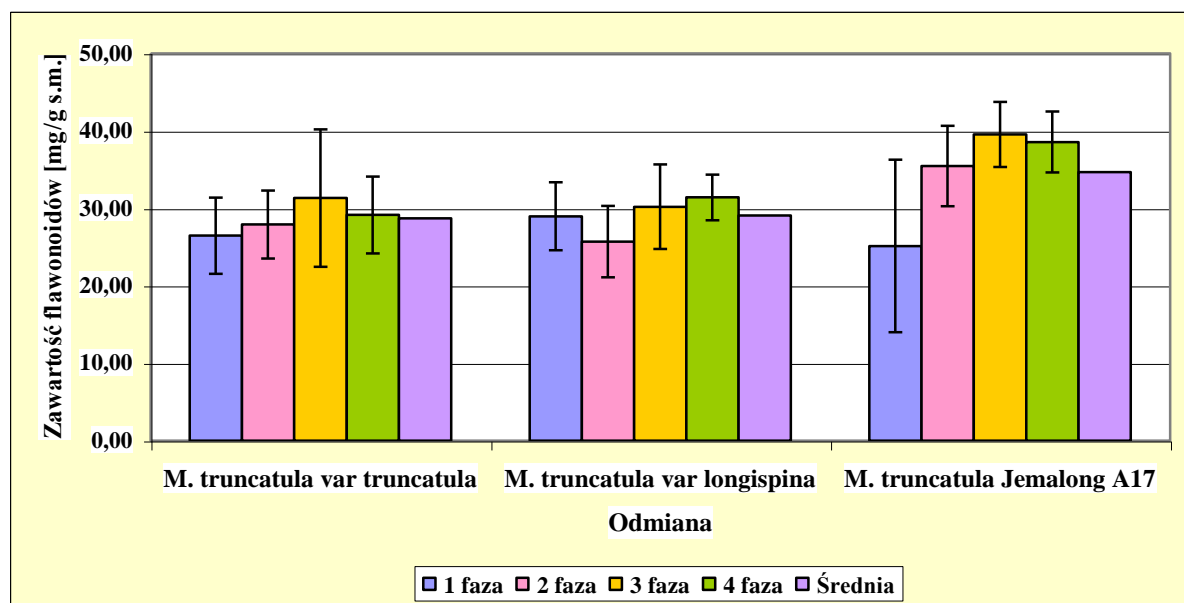
Charakterystycznym zjawiskiem w rozwoju roślin jest przemiana pokoleń, polegająca na regularnym, cyklicznym następowaniu po sobie faz rozwojowych. W celu określenia zróżnicowania stężenia związków flawonoidowych w częściach nadziemnych w trakcie rozwoju roślin wykonano oznaczenia tych związków w fazie:

1. wzrostu wegetatywnego

2. formowania się pąków kwiatowych
3. kwitnienia
4. przekwitania z jednoczesnym rozwojem nasion (Rys. 21).

Różnice w zawartości flawonoidów w różnych fazach rozwojowych roślin lucerny były statystycznie nieistotne. W odmianach *M. truncatula* var *truncatula* i *M. truncatula* Jemalong A17 zaobserwowano rosnący trend w zawartości tych związków do pełni kwitnienia. Może świadczyć to o tym, że roślina dążąc do wydania nasion i rozmnażania się wytwarza substancje mechanizmu wtórnego - flawonoidy, które zabezpieczają ją przed szkodliwym działaniem patogenów, owadów roślinożernych, promieniowania UV-B, a także takie, które korzystnie wpływają na jej wzrost (flawony luteoliny), poprzez indukowanie ekspresji genów brodawkowania. Proces syntezy flawonoidów zostaje spowolniony w momencie, gdy roślina więcej energii zużywa na wiązanie i rozwój nasion.

**Rys. 21.** Zawartość flawonoidów w fazach rozwojowych roślin trzech odmian *M. truncatula*



## V. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Z części nadziemnych *Medicago truncatula* odmiany Jemalong A17 wyizolowano technikami chromatografii preparatywnej dwadzieścia trzy

- związki flawonoidowe. Metodami spektralnymi określono strukturę trzech flawonoli oraz sześciu flawonów będących glikozydami apigeniny, dwóch luteoliny, dziewięciu trycyny i trzech chryzoeriolu.
2. Składnikiem cukrowym wszystkich flawonów *M. truncatula*, podobnie jak w *M. sativa*, był kwas glukuronowy (od 1 do 3 cząsteczek podstawionych w pozycjach C-7). W przypadku trzech glikozydów oprócz kwasu glukuronowego występowała także jedna cząsteczka glukozy przyłączona w pozycji C-7 lub C-4'. Część glikozydów (12) były to związki dodatkowo acylowane kwasem ferulowym (6), *p*-kumarowym (4) lub synapinowym (2).
  3. Osiem spośród wyizolowanych flawonoidów *M. truncatula* to struktury dotychczas nie znalezione w żadnym innym gatunku roślin i nieopisane w literaturze.
  4. Opracowano metodę chromatograficzną (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) ilościowego oznaczania flawonoidów w częściach nadziemnych *M. truncatula*. Metoda ta znacznie poprawia rozdzielność w porównaniu do dotychczasowych metod chromatograficznych i skraca je do kilku minut, co przy seryjnych oznaczeniach jest jej wielką zaletą.
  5. Oznaczono zawartość poszczególnych flawonoidów w liściach i łodygach trzech odmian *M. truncatula*.
  6. Dominujący zarówno w liściach, jak i łodygach 7-*O*-β-D-glukuronopiranozyd trycyny (**17**) stanowił w odmianie Jemalong A17 odpowiednio 63% i 52% ogólnej zawartości flawonoidów. Z wyizolowanych flawonoidów trzy związki występowały w ilościach śladowych, poniżej możliwości detekcji aparatu.
  7. Sumaryczna zawartość związków flawonoidowych w liściach trzech badanych odmian *M. truncatula* była wysoka i wynosiła średnio około 3,5% s.m., a w łodygach 1,5% s.m. Najliczniej występująca grupa glikozydów trycyny stanowiła 76% zawartości flawonoidów, zatem *M. truncatula* może być dobrym źródłem do pozyskiwania tych związków.
  8. Zmienność populacyjna zawartości flawonoidów w liściach wahała się od 0,6% s.m. do 4,6% s.m., a w łodygach od 0,1% s.m. do 2,0% s.m.

9. W odmianach *M. truncatula* var *truncatula* i *M. truncatula* var *longispina* zawartość flawonoidów acylowanych była większa niż nieacylowanych i ich stosunek wahał się od 1,06 do 2,19. Tylko w odmianie *M. truncatula* Jemalong A17 zawartość glikozydów nieacylowanych dwukrotnie przewyższała zawartość glikozydów acylowanych.
10. Począwszy od fazy wzrostu wegetatywnego do fazy kwitnienia roślin lucerny obserwowano tendencję zwykłą zawartości flawonoidów w częściach nadziemnych *M. truncatula*.

## VI. LITERATURA

1. **Aaby K., Skrede G., Wrolstad R.E.:** Phenolic composition and antioxidant activities in flash and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *J. Agric. Food Chem.* 53, 4032-4040, **2005**.

2. **Abranches R., Marcel S., Arcalis E., Altmann F., Fevereiro P., Stoger E.:** Plants as bioreactors: A comparative study suggests that *Medicago truncatula* is a promising production system. *Journal of Biotechnology* 120, 121-134, **2005**.
3. **Adlercreutz H., Mazur W.:** Phyto-estrogens and western diseases. *Ann. Med.* 29, 95-120, **1997**.
4. **Andreotti C., Costa G., Treutter D.:** Composition of phenolic compounds in pear leaves as affected by genetics, ontogenesis and environment. *Scientia Horticulture* 109, 130-137, **2006**.
5. **Aoki T., Akashi T., Ayabe S.:** Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity and biosynthesis. *Journal of Plant Research* 113, 475-488, **2000**.
6. **Arts I.C., Hollman P.C.:** Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 317-325, **2005**.
7. **Asfar S., Abdeen S., Dashti H., Khoursheed M., Al-Sayer H., Mathew T., Al-Bader A.:** Effects of green tea in the prevention and reversal of fasting-induced intestinal mucosal damage. *Nutr.* 19, 536-540, **2003**.
8. **Asirvatham V.S., Watson B.S., Sumner L.W.:** Analytical and biological variances associated with proteomic studies of *Medicago truncatula* by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proteomics* 2, 960-968, **2002**.
9. **Asres K., Seyoum A., Veeresham C., Bucar F., Gibbons S.:** Naturally derived anti-HIV agents. *Phytother Res* 19, 557-581, **2005**.
10. **Barker D.G., Bianchi S., Blondon F., Dattee Y., Duc G., Essad S., Gallusci P., Genier G., Guy P., Muel X., Tourneur J., Denarie J., Huguet T.:** *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol. Reporter* 8, 40-49, **1990**.
11. **Barnes S., Kirk M., Coward L.:** Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-Mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2466-2474, **1994**.
12. **Bayard V., Chamorro F., Motta J., Hollenberg N.K.:** Does flavanol intake influence mortality from nitric oxide-dependent processes? Ischemic heart



- disease, stroke, diabetes mellitus and cancer in Panama. *International Journal of Medical Sciences* 4(1), 53-58, **2007**.
13. **Bell J.C., Dixon R. A., Farmer A.D., Flores R., Inman J., Gonzales R.A., Harrison M.J., Paiva N.L., Scott A.D., Weller J.W., May G.D.:** The *Medicago* Genome Initiative: a model legume database. *Nucleic Acids Research*. 29, 114-117, **2001**.
  14. **Berhow M.A., Vaughn S.F.:** Higher plant flavonoids: biosynthesis and chemical ecology. W: *Principles and Practices of Plant Ecology*. CRC Press LLC 423-438, **1999**.
  15. **Berleth T.:** Towards the systems biology of auxin-transport-mediated patterning. *Trends Plant Sci.* 12, 151-159, **2007**.
  16. **Blaim H., Jurzysta M., Nowacki E.:** Polimorfizm biochemiczny w populacjach roślin uprawnych. *Hod. Rośl. i Nas.* 3, 7-12, **1972**.
  17. **Bonin I., Huguet T., Gherardi M., Prosperi J.M., Olivieri L.:** High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species, *Medicago truncatula* (Leguminosae), shown using RAPD markers. *American Journal of Botany*, 83, 7, 843-855, **1996**.
  18. **Bonin I., Prosperi J.M., Olivieri I.:** Genetic markers and quantitative genetic variation in *Medicago truncatula* (Leguminosae): A comparative analysis of population structure. *Genetics* 143, 1795-1805, **1996**.
  19. **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., 409-468, **1996**.
  20. **Bors W., Michel C., Stettmaier K.:** Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors* 6, 399-402, **1997**.
  21. **Bosetti C., Spertini L., Parpinel M., Gnagnarella P., Legiou P., Nergi E., Franceschi S., Montella M., Peterson J., Dwyer J., Giacosa A., La Vecchia C.:** Flavonoids and breast cancer risk in Italy. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14, 805-808, **2005**.

22. **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.* 41, 631-636, **2003.**
23. **Brandsaeter L.O., Olsmo A., Tronsmo A.M., Fykse H.:** Freezing resistance of winter annual and biennial legumes at different developmental stages. *Crop Science* 42, 437-443, **2002.**
24. **Bruneton J.:** Flavonoids. W: *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants.* Lavoisier Pub. Inc. c/o Springer-Verlag, Paris, 265-301, **1995.**
25. **Brunt C., Read J., Sanson G.D.:** Changes in resource concentration and defence during leaf development in a tough-leaved (*Nothofagus moorei*) and soft-leaved (*Toona ciliate*) species. *Oecologia* 148, 583-592, **2006.**
26. **Burda S. Oleszek W.:** Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2774-2779, **2001.**
27. **Cai H., Hudson E.A., Mann P., Verschoyle R.D., Greaves P., Manson M.M., Steward W.P., Gescher A.J.:** Growth-inhibitory and cell cycle-arresting properties of the rice bran constituent triclin in human-derived breast cancer cells in vitro and in nude mice in vivo. *Br. J. Cancer* **2004.**
28. **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 Lett.* 119, 99-107, **1997.**
29. **Castelman M.:** The healing herbs: The ultimate guide to the curative power of nature's medicines. Emmaus, PA: Rodale Press, **1991.**
30. **Choi H.K., Kim D., Uhm T., Limpens E., Lim H., Mun J.H., Kalo P., Penmesta R.V., Seres A., Kulikova O., Roe B.A., Bisseling T., Kiss G.B., Cook D.R.:** A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. *Genetics* 166, 1463-1502, **2004a.**
31. **Choi H.K., Mun J.H., Kim D.J., Zhu H., Baek J.M., Mudge J.:** Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 15289-15294, **2004b.**

32. **Christensen A.B., Gregersen P.L., Schroder J., Collinge D.B.:** A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. *Plant Mol. Biol.* 37, 849-857, **1998**.
33. **Colebatch G., Trevaskis B., Udvardi M.:** Symbiotic nitrogen fixation research in the postgenomics era. *New Phytologist* 153, 37-42, **2002**.
34. **Commenges D., Scotet V., Renaud S., Jacqmin-Gadda H., Barberger-Gateau P., Dartiguez J.F.:** Intake of flavonoids and risk of dementia. *Europ. J. Epidemiol.* 16, 357-363, **2000**.
35. **Cook D.R.:** *Medicago truncatula* – a model in the making! *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 301-304, **1999**.
36. **Cooper J.E.:** Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. *Advances in Botanical Research* 41, 1-62, **2004**.
37. **Cooper-Driver G.A., Bhattacharya M.:** Role of phenolic in plant evolution. *Phytochemistry* 49, 1165-1174, **1998**.
38. **Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K., van Poel B., Pieters L., Vlietinck A.J., Berghe D.V.:** Structure – activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Natl. Prod.* 61, 71-76, **1998**.
39. **Cushman M., Nagarathnam D., Burg D.L., Geahlen R.L.:** Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activities of flavonoid analogues. *J. Med. Chem.* 34, 798-806, **1991**.
40. **Cuyckens F., Claeys M.:** Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* 39, 1-15, **2004**.
41. **Daday H.:** Gene frequencies in strains of *Trifolium repens* L. *Nature* 174, 521, **1954**.
42. **Darnat A., Cornat A.P., Chavignon O., Heitz A., Wylde R., Lamaison J.L.:** Luteolin 7-diglucuronide, the major flavonoid compound from *Aloysia triphylla* and *Verbena officinalis*. *Planta Med.* 61, 490-494, **1995**.
43. **De Rijke E., Out P., Niessen W.M.A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A.T.:** Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112, 31-63, **2006**.

44. **Denton M.D., Hill C.R., Bellotti W.D., Coventry D.R.:** Nodulation of *Medicago truncatula* and *Medicago polymorpha* in two pastures of contrasting soil pH and rhizobial populations. *Applied Soil Ecology* 35, 441-448, **2007**.
45. **Diplock A.T., Cherleux J.L., Crfozier-Willi G., Kok F.J., Rice-Evans C., Roberfroid M., Stahl W., Vina-Ribes J.:** Functional food science and defence against reactive oxygen species. *Br. J. Nutr.* 80, 77-112, **1998**.
46. **Dita M.A., Rispaill N., Prats E., Rubiales D., Singh K.B.:** Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica* 147, 1-24, **2006**.
47. **Dixon R.A.:** Isoflavonoids: biochemistry, molecular biology and biological functions. *Comprehensive Natural Products Chemistry* 1, 773-823, **1999**.
48. **Dixon R.A., Achnine L., Kota P., Liu C.J., Reddy M.S.S., Wang L.J.:** The phenylpropanoid pathway and plant defence – a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3, 371-390, **2002**.
49. **Dixon R.A., Paiva N.L.:** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085-1097, **1995**.
50. **Dixon R.A., Steele C.L.:** Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.* 4, 394-400, **1999**.
51. **Djemel N., Guedon D., Lechevalier A., Salon C., Miquel M., Prosperi J.M., Rochat C., Boutin J.P.:** Development and composition of the seeds of nine genotypes of the *Medicago truncatula* species complex. *Plant Physiol. Biochem.* 43, 557-566, **2005**.
52. **Doerge D.R., Chang H.C.:** Inactivation of thyroid peroxidase by soy isoflavones, in vitro and in vivo. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 777, 269-279, **2002**.
53. **Dragovic-Uzelac V., Levaj B., Mrkic V., Bursac D., Boras M.:** The contents of polyphenols and carotenoids in three apricots cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food chemistry* 102, 966-975, **2007**.
54. **Es-Safi N.E., Kerhoas L., Einhorn J., Ducrot P.H.:** Application of ESI/MS, CID/MS and tandem MS/MS to the fragmentation study of eriodictyol 7-O-

- glucosyl-(1→2)-glucoside and luteolin 7-*O*-glucosyl-(1→2)-glucoside. *International Journal of Mass Spectrometry* 247, 93-100, **2005**.
55. **Evans J., Dear B., O'connor G.E.:** Influence of an acid soil on the herbage yield and nodulation of five annual pasture legumes. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 30, 55-60, **1990**.
  56. **Farag M.A., Huhman D.V., Lei Z., Sumner L.W.:** Metabolic profiling and systematic identification of flavonoids and isoflavonoids in roots and cell suspension cultures of *Medicago truncatula* using HPLC-UV-ESI-MS and GC-MS. *Phytochemistry* 68, 342-354, **2007**.
  57. **Fiehn O., Kopka J., Dorman P., Altmann T., Trethewey R.N., Willmitzer L.:** Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology* 18, 1157-1161, **2000**.
  58. **Fitzgerald R.D.:** Evaluation of legumes for introduction into native grass pastures on the north-west slopes of New South Wales. *Journal of Experimental Agriculture* 34, 449-458, **1994**.
  59. **Franke A.A., Custer L.J., Arakaki C., Murphy S.P.:** Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis* 17, 1-35, **2004**.
  60. **Furusawa M., Tanaka T., Ito T., Nishikawa A., Yamazaki N., Nakaya K.:** Antioxidant activity of hydroxyflavonoids. *Journal of Health Sciences* 51(3), 376-378, **2005**.
  61. **Galikowska-Gula K.:** Młodość na długie lata – naturalnie! *Kosmetyka i Kosmetologia* 3-4, **2006**.
  62. **Gil B., Sanz M.J., terencio M.C., Ferrandiz M.L., Bustos G., Paya M., Gunasegaran R., Alcaraz M.J.:** Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipases A<sub>2</sub> and inflammatory responses in mice. *Life Sci.* 54, PL333-PL338, **1994**.
  63. **Glassbrook N., Ryals J.:** A systematic approach to biochemical profiling. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 186-190, **2001**.

64. **Glinka Ł., Ochocki J.:** Flawonoidy i ich systematyczne pochodne we współczesnej medycynie schorzeń układu sercowo naczyniowego i moczowego. *Pol. J. Cosmet.* 2, 70-80, **2004.**
65. **Graham P.H., Vance C.P.:** Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Res* 65, 93-106, **2000.**
66. **Graham P.H., Vance C.P.:** Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131, 872-877, **2003.**
67. **Gu L., Kelm M.A., Hammerstone J.F.:** Concentration of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J. Nutr.* 134, 613-617, **2004.**
68. **Guerin P.M., Stadler E., Buser H.R.:** Identification of host plant attractants for the carrot fly, *Psila roase*. *J. Chem. Ecol.* 9, 843-861, **1983.**
69. **Haleweish F., Kronberg S., Rice J.A.:** Rodent and ruminant digestive response to flavonoids in *Euphorbia esula*. *J. Chem. Ecol.* 29, 1073-1082, **2003.**
70. **Han Z., Wang G., Yao W., Zhu W.Y.:** Isoflavonic phytoestrogens – new prebiotic for farm animals: a review on research in China. *Curr. Issues Intest. Microbial.* 7, 53-60, **2006.**
71. **Hanasaki Y., Ogawa S., Fukui S.:** The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biol. Med.* 16, 845-850, **1994.**
72. **Harborne J.B.:** *Phytochemical Methods: A Guide to Modern techniques of Plant Analysis*, 2<sup>nd</sup> ed. Chapman & Hall, New York. **1984.**
73. **Harborne J.B.:** Interakcje biochemiczne pomiędzy roślinami wyższymi. W: *Ekologia biochemiczna*, PWN, Warszawa, 275-296, **1997a.**
74. **Harborne J.B.:** Związki metabolizmu wtórnego jako atraktanty pokarmowe. W: *Ekologia biochemiczna*, PWN, Warszawa, 160-169, **1997b.**
75. **Harborne J.B., Baxter H.:** *Handbook of Natural Flavonoids*, 2 vols. Wiley, Chichester. **1999.**
76. **Harborne J.B., Hall E.:** The occurrence of tricin and of glycoflavones in grasses. *Plant Polyphenols-XII.* 3, 421-428, **1964.**

77. **Harborne J.B., Williams C.A.:** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem.* 55, 481-504, **2000**.
78. **Harrison M.J., Dixon R.A.:** Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular arbuscular mycorrhizal association in root of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6, 643-654, **1993**.
79. **Havsteen B.H.:** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* 96, 67-202, **2002**.
80. **Heim K.E., Tagliferro A.R., Bobilya D.J.:** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572-584, **2002**.
81. **Hertog M.G.L., Feskens E.J., Kromhout D.:** Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *The Lancet* 349, 699-710, **1997**.
82. **Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., Venema D.P.:** Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1591, **1992**.
83. **Hill M.J., Donald G.E.:** Australia temperate pastures database [Computer file] (CSIRO) **1998**.
84. **Hollman P.C.H., Katan M.B.:** Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food and Chemical Toxicology* 37, 937-942, **1999**.
85. **Howieson J., Ballard R.:** Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia: some contemporary thoughts. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1261-1273, **2004**.
86. **Hrazdina G., Zobel A.:** Cytochemical localization of enzymes in plant cells. *Bot. Rev.* 129, 269-322, **1991**.
87. **Hughes M.A.:** The cyanogenic polymorphism in *Trifolium repens* L. (white clover). *Heredity* 66, 105-115, **1991**.
88. **Huffman D.V., Berhow M.A., Sumner L.W.:** Quantification of saponins in aerial and subterranean tissues of *Medicago truncatula*. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1914-1920, **2005**.

89. **Huhman D.V., Sumner L.W.:** Metabolic profiling of saponins in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* using HPLC coupled to an electrospray ion-trap mass spectrometer. *Phytochemistry* 59, 347-360, **2002**.
90. **Ielpo M.T.L., Basile A., Miranda R., Moscatiello V., Nappo C., Sorbo S.:** Immunopharmacological properties of flavonoids. *Fitoterapia* 71, S101-S109, **2000**.
91. **Ishige K., Schubert D., Sagara Y.:** Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology & Medicine*. 28, 1056-1067, **2001**.
92. **Jacobs M., Rubery P.H.:** Naturally occurring auxin transport regulators. *Science* 241, 346-349, **1988**.
93. **Jansen A.K.M., Gaba V., Greenberg B.M.:** Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Sci.* 3, 131-135, **1998**.
94. **Jovanovic S.V., Steenken S., Tosic M., Marjanovitz B., Simic M.G.:** Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 4846-4851, **1994**.
95. **Jurzysta M.:** Badania nad saponinami krajowych populacji lucerny mieszańcowej (*Medicago media pers.*). Praca habilitacyjna. **1982**.
96. **Justesen U., Knuthesen P., Leth T.:** Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr.* 799A, 101-110, **1998**.
97. **Kainulainen P., Tarhanen J., Tiilkkala K., Holopainen J.K.:** Foliar and emission composition of essential oil in two carrot varieties. *J. Food Chem.* 46, 3780-3784, **1998**.
98. **Kapusta I.:** Saponiny w częściach nadziemnych *Medicago truncatula* – wyodrębnianie i skład chemiczny. Praca doktorska **2006**.
99. **Kapusta I., Stochmal A., Perrone A., Piacente S., Pizza C., Oleszek W.:** Triterpene saponins from barrel medic (*Medicago truncatula*) aerial parts. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2164-2170, **2005**.
100. **Kazuno S., Yanagida M., Shindo N., Murayama K.:** Mass spectrometric identification and quantification of glycosyl flavonoids, including



- dihydrochalcones with neutral loss scan mode. *Analytical Biochemistry* 347, 182-192, **2005**.
101. **Kączkowski J.:** Biochemia roślin. Metabolizm wtórny. PWN, Warszawa **1985**.
  102. **Kehoe D.M., Villand P., Somerville S.:** DNA microarrays for studies of higher plants and other photosynthetic organisms. *Plant Science* 4, 38-41, **1999**.
  103. **Keli S.O., Hertog M.G.L., Feskens E.J.M., Kromhout D.:** Dietary flavonoids, antioxidant vitamins and incidence of stroke. *Arch. Intern. Med.* 154, 637-642, **1996**.
  104. **Kelm M.A., Hammerstone J.F., Schmitz H.H.:** Identification and quantitation of flavanols and proanthocyanidins in food: how good are the datas? *Clin. Dev. Immunol.* 12, 35-41, **2005**.
  105. **Kim D.H., Jin Y.H., Park J.B., Kobashi K.:** Silymarin and its components are inhibitors of beta-glucuronidase. *Biol. Pharm. Bull.* 17, 443-445, **1994**.
  106. **Knee E.M., Gong F.C., Gao M., Teplitski M., Jones A.R., Foxworthy A., Mort A.J., Bauer W.D.:** Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. *Mol Plant-Microbe Interact* 14, 775-784, **2001**.
  107. **Knekt P., Jarvinen R., Seppanen R., Heliovaara M., Teppo L., Pukkala E., Aromaa A.:** Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *American Journal of Epidemiology* 146, 223-230, **1997**.
  108. **Kohlmunzer S.:** Flawonoidy. W: *Farmakognozja*, PZWL, Warszawa, Wyd. 4, 112-130, **1993**.
  109. **Krajinski F., Frenzel A.:** Towards the elucidation of AM-specific transcription in *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* 68, 75-81, **2007**.
  110. **Kubasek W., Shitley B., McKillop A., Goodman H., Briggs W., Ausubel F.M.:** Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating Arabidopsis seedlings. *Plant Cell* 4, 1229-1236, **1992**.
  111. **Lamblin A.F., Crow J.A., Johnson J.E., Silverstein K.A.T., Kunau T.M., Kilian A., Benz D., Stromvik M., Endre G., VandenBosch K.A., Cook D.R., Young N.D., Retzel E.F.:** MtDB: a database for personalized data mining of the

- model legume *Medicago truncatula* transcriptome. *Nucleic Acids Research* 31, 196-201, **2003**.
112. **Lesins K. A., Lesins I.:** Genus *Medicago* (*Leguminosae*). In: Junk, W. (Ed.), *A Taxigenetic Study*. The Hague, The Netherlands, p.228, **1979**.
  113. **Leughton M.J., Evans P.J., Moroney M.A., Hoult J.R., Halliwell B.:** Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem. Pharmacol.* 42, 1673-1681, **1991**.
  114. **Liu B., Zhu Y.:** Extraction of flavonoids from flavonoid-rich parts in tartary buckwheat and identification of the main flavonoids. *Journal of Food Engineering* 78, 584-587, **2007**.
  115. **Liu Z.Q., Ma L.P., Zhou B., Yang L., Liu Z.L.:** Antioxidative effects of green tea polyphenols on free density lipoprotein. *Chemistry and Physics of Lipids* 106, 53-63, **2000**.
  116. **Lopez M., Martinez F., Del Valle C., Orte C., Miro M.:** Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.* 922, 359-363, **2001**.
  117. **Mak P., Leung Y.K., Tang W.Y., Harwood C., Ho S.M.:** Apigenin suppresses cancer cell growth through ER $\beta$ . *Neoplasia* 8(11), 896-904, **2006**.
  118. **Malińska D., Kiersztan A.:** Flavonoids – characteristics and significance for therapy. *Post. Biochem.* 50, 182-196, **2004**.
  119. **Manach C., Mazur A., Scalbert A.:** Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology* 16, 77-84, **2005**.
  120. **Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A., Remesy C.:** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans: I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81(Suppl), 230S-42S, **2005**.
  121. **Martyniuk S., Oroń J., Martyniuk M.:** Diversity and numbers of root-nodule bacteria (rhizobia) in polish soils. *Acta Soc. Bot. Polon.* 74, 83-86, **2005**.
  122. **Mathesius U., Keijzers G., Natera S.H.A., Weinman J.J., Djordjevic M.A., Rolfe B.G.:** Establishment of a root proteome reference map for the model

- legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. *Proteomics* 1, 1424-1440, **2001**.
123. **Mathney J.A., Buslig B.S.:** Flavonoids in the living system. *Plenum Press*, New York, **1998**.
  124. **Mauri P.L., Iemoli L., Gardana C., Riso P., Simonetti P., Porrini M., Pietta P.G.:** Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric characterization of flavonol glycosides in tomato extracts and human plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13, 924-931, **1999**.
  125. **Meng D.S., Wang S.L.:** Antitumor effect of quercetin. *Chin. Tradit. Herb. Drugs* 32, 186-188, **2001**.
  126. **Messina M.J.:** Legumes and soybean: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 439S-450S, **1999**.
  127. **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 and Hall, 619-652, **1994**.
  128. **Middleton E.J., Kandaswami C., Theoharides T.C.:** The effects of plant flavonoids on mammalian cells, implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52, 673-751, **2000**.
  129. **Miean K.H., Mohamed S.:** Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3106-3112, **2001**.
  130. **Mizutani J.:** Selected allalochemicals. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18(5), 653-671, **1999**.
  131. **Mol J., Grotewold E., Koes R.:** How genes paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci.* 3, 212-217, **1998**.
  132. **Mukai K., Mitani S., Ohara K., Nagaoka S.:** Structure-activity relationship of the tocopherol-regeneration by catechins. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 1243-1256, **2005**.
  133. **Nadrożna D., Mądrzak C.J.:** Geny roślinne kodujące niektóre enzymy szlaku metabolizmu fenyloprppanoidów. *Biotechnologia* 3, 154-168, **1999**.

134. **Nahrstedt A.:** Cyanogenesis and foodplants. *Proc. Phytoch. Soc. Eur.* 34, 107-129, **1993**.
135. **Natera S.H., Guerreiro N., Djordjevic, M.A.:** Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 995-1009, **2000**.
136. **Nicholson R.L., Hammerschmidt R.:** Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann. Rev. of Phytopathology* 30, 369-389, **1992**.
137. **Nunes C., de Sousa Araujo S., da Silva J.M., Fevereiro M.P.S., da Silva A.B.:** Physiological responses of the legume model *Medicago truncatula* cv. Jemalong to water deficit. *Environmental and Experimental Botany* 63, 289-296, **2008**.
138. **Okubo T., Oura A.:** In vivo effects of tea polyphenol intake on human intestinal microflora and metabolism. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 4, 588-591, **1992**.
139. **Oleszek W.:** Composition and quantitation of saponins in alfalfa (*Medicago sativa* L.) seedlings. *J. Agric. Food Chem.* 46, 960-962, **1998**.
140. **Oleszek W., Stochmal A.:** Triterpene saponins and flavonoids in the seeds of *Trifolium* species. *Phytochemistry* 61/2, 165-170, **2002**.
141. **Oleszek W., Stochmal A., Karolewski P., Simonet A.M., Macias F.A., Tava A.:** Flavonoids from *Pinus sylvestris* needles and their variation in trees of different origin grown nearly a century at the same area. *Bioch. System. Ecol.* 30/11, 1011-1022, **2002**.
142. **Penmetsa R.V., Cook D.R.:** Production and characterization of diverse developmental mutants of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 123, 1387-1397, **2000**.
143. **Peters N.K., Long S.R.:** Alfalfa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Plant Physiol.* 88, 396-400, **1988**.
144. **Peterson J.M.S., Dwyer J., & Dsc R.D.:** Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research* 18, 1995-2018, **1998**.
145. **Podstolski A.:** Interaction between chloroplast and cytoplasmic factors in the inhibition of L-phenylalanine ammonia-lyase activity. *Physiol. Plant,* 58, 107-113, **1983**.

146. **Ponce M., Scervino J., Erra-Balsells R., Ocampo J., Godeas A.:** Flavonoids from shoots and roots of *Trifolium repens* (white clover) grown in presence or absence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Phytochemistry* 65, 1925-1930, **2004**.
147. **Powles T.:** Isoflavones and women's health. *Breast Cancer Research* 6(3), 140-142, **2004**.
148. **Proestos C., Boziaris I.S., Nychas G.J.E., Komaitis M.:** Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry* 95, 664-671, **2006**.
149. **Ramos S.:** Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18, 427-442, **2007**.
150. **Reinli K., Block G.:** Phytoestrogen content of foods: a compendium of literature values. *Nutr. Cancer Int. J.* 26, 123-148, **1996**.
151. **Rhild R.B., Chabot S., Piche Y., Chenevert R.:** Isolation and identification of flavonoids from Ri T-DNA-transformed roots (*Daucus carota*) and their significance in vascular-arbuscular mycorrhiza. *Phytochemistry* 33, 1369-1371, **1993**.
152. **Rhodes M.:** The physiological significance of plant phenolic compounds. *Annu. Proc. Phytochem. Soc. Europe* 25, 99-118, **1985**.
153. **Riboli E., Norat T.:** Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 559S-569S, **2003**.
154. **Rice-Evans C.:** Wake up to flavonoids. *The Royal Society of Medicine Press Ltd.*, London 1-74, **2000**.
155. **Ross J.A., Kasum C.M.:** Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 19-34, **2002**.
156. **Scalbert A., Williamson G.:** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130, 2073S-2085S, **2000**.
157. **Schewe T., Kuhn H., Sies H.:** Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *J. Nutr.* 132, 1825-1829, **2002**.
158. **Schliemann W., Ammer C., Strack D.:** Metabolite profiling of mycorrhizal root of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* 69, 112-146, **2008**.

159. **Schnitzler J.P., Jungblut T.P., Heller W., Kofferlein M., Hutzler P., Heinzmann U., Schmelzer E., Ernst D., Langebartels C., Sandermann J.H.:** Tissue localization of UV-B-screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine seedlings. *New Phytol.* 132, 247-258, **1996**.
160. **Schreier P.:** Chemopreventive compounds in the diet. *Dev Ophthalmol* 38, 1-58, **2005**.
161. **Sehm J., Linder Mayer H., Dummer C., Treutter D., Pfaffl M.W.:** The influence of polyphenol rich pomace or red-wine pomace diet on the gut morphology in weaning piglets. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 90, 1-8, **2006**.
162. **Sheu S.Y., Lai C.H., Chiang H.C.:** Inhibition of xanthine oxidase by purpurogallin and silymarin group. *Anticancer Res.* 18, 263-267, **1998**.
163. **Shirley B.W.:** Flavonoids biosynthesis "new" function for an "old" pathway. *Trends Plant Sci* 1, 377-382, **1996**.
164. **Shirley B.W.:** Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Sci. Res.* 8, 415-422, **1998**.
165. **Siess M.H., Bon A.M., Canivenc-Lavier M.C., Martel P., Suschetet M.:** Potential role of flavonoids in cancer prevention. *Polyphenols in food.* 105-112, **1998**.
166. **Siess M.H., Leclerc J., Canivenc-Lavier M.C., Rat P., Suschetet M.:** Heterogenous effects of natural flavonoids on monooxygenase activities in human and rat liver microsomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 130, 73-78, **1995**.
167. **Silva E.M., Souza J.N.S., Rogez H., Rees J.F., Larondella Y.:** Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry* 101(3), 1012-1018, **2006**.
168. **Simons A.L., Renouf M., Hendrich S., Murphy P.A.:** Human gut microbial degradation of flavonoids: structure-function relationships. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4258-4263, **2005**.
169. **Somers D.A., Samac D.A., Olhoft P.M.:** Recent Advances in Legume Transformation. *Plant Physiology* 131, 892-899, **2003**.
170. **Spaink H.P.:** Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54, 257-288, **2000**.

171. **Stafford H.A.:** Flavonoid evolution: an enzymic approach. *Plant Physiol.* 96, 680-685, **1991**.
172. **Stern K.:** *Introductory Plant Biology*, 4<sup>th</sup> ed. W.C. Brown Publishers, Dubuque, IA, **1988**.
173. **Stobiecki M.:** Applications of separation techniques hyphenated to mass spectrometer for metabolic profiling. *Curr. Org. Chem.* 5, 89-111, **2001**.
174. **Stochmal A.:** Ekologiczne znaczenie związków cyjanogennych. W: Biochemiczne oddziaływania środowiskowe. W. Oleszek, K. Głowniak i B. Leszczyński (red.), Projekt Studio s.c. Lublin, 151-168, **2001**.
175. **Stochmal A.:** Flawonoidy lucerny siewnej (*Medicago sativa* L.) - budowa chemiczna, właściwości spektralne, zawartość w zależności od odmiany i terminu zbioru. Praca habilitacyjna. *Monografie i Rozprawy Naukowe* 18, **2007**.
176. **Stochmal A., Oleszek W.:** Temperatura a zawartość glikozydów cyjanogennych w krajowych odmianach koniczyny białej. W: Ekofizjologiczne aspekty reakcji roślin na działanie abiotycznych czynników stresowych. PAN- Kraków, 539-548, **1996**.
177. **Stochmal A., Oleszek W.:** Wykorzystanie HPLC do określania sezonowych zmian ogólnej zawartości flawonoidów w koniczynie białej. X Konferencja Chromatograficzna Nauka – Przemysł: Metody chromatograficzne w analizie żywności i ekotoksykologii. Lublin, p-32, **1999**.
178. **Stochmal A., Oleszek W.:** Acylated Flavonoid Glucuronides from Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Aerial Parts w: Biologically-active Phytochemicals in Food; Analysis, Metabolism, Bioavailability and Function, Pfannhauser, Fenwick G., Khokhar S. *The Royal Society of Chemistry* 61-64, **2002**.
179. **Stochmal A., Oleszek W.:** Effect of acylation of flavones with hydroxycinnamic acids on their spectral characteristics. *Nat. Prod. Commun.* 2, 5, 571-574, **2007**.
180. **Stochmal A., Oleszek W., Leitz R.E., DiPaola P.:** Saponin and flavonoid profiles of 47 alfalfa varieties of different origin. Book of Abstracts, Inf. Conf. *Saponina in food, Feedstuffs and medicinal plants*. Pulawy 31, **1999**.

181. **Stochmal A., Piacente S., Pizza C., De Riccadis F., Leitz R., Oleszek W.:** Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Flavonoids 1. Apigenin and Luteolin Glycosides from Aerial Parts. *J. Agric. Food Chem.* 48, 753-758, **2001a.**
182. **Stochmal A., Simonet A., Macias F., Oleszek W.:** Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Flavonoids. 2. Tricin and Chrysoeriol Glycosides from Aerial Parts. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5310-5314, **2001b.**
183. **Stochmal A., Simonet A., Macias F., Oliveira M., Abreu J., Nash R., Oleszek W.:** Acylated Apigenin Glycosides from Alfalfa (*Medicago sativa* L.) var. Artal. *Phytochemistry* 57, 1223-1226, **2001c.**
184. **Sturz A.V., Christie B.R., Matheson B.G., Nowak J.:** Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol. Fertil Soils* 25, 13-19, **1997.**
185. **Sumner L., Mendes P., Dixon R.A.:** Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 62, 817-836, **2003.**
186. **Suzuki H., Achnine L., Xu R., Matsuda S.P.T., Dixon R.A.:** A genomics approach to the early stages of triterpene saponins biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant J.* 32, 1033-1048, **2002.**
187. **Takabe W., Niki E., Uchida K., Yamada S., Satoh K., Noguchi N.:** Oxidative stress promotes the development of transformation: involvement of a potent mutagenic lipid peroxidation product, acrolein. *Carcinogenesis* 22, 935-941, **2001.**
188. **Taylor L.P., Grotewold E.:** Flavonoids as developmental regulators. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 317-323, **2005.**
189. **Teramura A.H., Sullivan J.H.:** Effects of UV-B radiation on photosynthesis and growth of terrestrial plants. *Photosynth. Res.* 39, 463-473, **1994.**
190. **Tevini M., Braun J., Fieser G.:** The protective function of the epidermal layer of rye seedlings against ultraviolet-B radiation. *Photochem. Photobiol.* 53, 329-333, **1991.**
191. **Torck M., Pinkas M., Jay M., Favre-Bonvin J.:** Flavonoid heterosides of *Medicago arborea* L. *Pharmazie* 38, 783-786, **1983.**



192. **Trethewey R.N., Krotzky A.J., Willmitzer L.:** Metabolic profiling: a Rosetta Stone for genomics? *Current Opinion in Plant Biology* 2, 83-85, **1999**.
193. **Trevisanto S.I., Kim Y.I.:** Tea and health. *Nutr. Review* 58, 1-10, **2000**.
194. **Trieu A.T., Burleigh S.H., Kardailsky I.V., Maldonado-Mendoza I.E., Varsaw W.K., Blaylock L.A., Shin H., Chiou T.J., Katagi H., Dewbre G.R., Weigel D., Harrison M.J.:** Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant Journal* 6, 531-542, **2000**.
195. **Trieu A.T., Harrison M.J.:** Rapid transformation of *Medicago truncatula*: regeneration via shoot organogenesis. *Plant Cell Rep.* 16, 6-11, **1996**.
196. **Tsai S.M., Phillips D.A.:** Flavonoids release naturally from alfalfa promote of symbiotic *Glomus* spores in vitro. *App. Environ. Microbiol.* 57, 1485-1488, **1991**.
197. **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.* 106, 219-228, **1999**.
198. **Valot B., Gianinazzi S., Eliane D.G.:** Sub-cellular proteomic analysis of *Medicago truncatula* root microsomal fraction. *Phytochemistry* 65, 1721-1732, **2004**.
199. **Wais R.J., Galera C., Oldroyd G., Penmetza R.V., Cook D.R., Gough C., Denarie J., Long S.R.:** Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proc. Nat. Acad. Scs. USA* 97, 13407-13412, **2000**.
200. **Wang S.P., Huang K.J.:** Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 1032, 273-279, **2004**.
201. **Watson B.S., Asirvatham V.S., Wang L., Sumner L.W.:** Mapping the proteome of Barrel Medic. *Plant Physiol.* 131, 1104-1123, **2003**.
202. **Weidenborner M., Jha H.C.:** Antifungal activity of flavonoids in relation to degree of hydroksylation, metoxylation and glycosilation. *Acta Horticul.* 381, 702-708, **1994**.

203. **Williams C.A., Grayer R.J.:** Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Products Reports* 21, 539-573, **2004**.
204. **Wilska-Jeszka J., Podsadek A.:** Bioflavonoids as natural antioxidants. *Wiadomości Chemiczne* 55, 987, **2001**.
205. **Wilson R.A., Handley B.A., Beringer J.E.:** Bacteriocin production and resistance in a field population of *Rhizobium leguminosarum* biovar.viciae. *Soil Biol. Biochem.* 30, 413-417, **1998**.
206. **Winkel-Shirley B.:** Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol.* 126, 485-493, **2001**.
207. **Winkel-Shirley B.S.J.:** The biosynthesis of flavonoids. *In The Science of flavonoids.* Springer 71-95, **2006**.
208. **Wollenweber E.:** Flavonoid aglycones in leaf exudate constituents in higher plants, W: L. Farkas, M. Gabor, F. Kalley (red.), *Studies in organic Chemistry: Flavonoids, Bioflavonoids,* Elsevier, Amsterdam, 155-169, **1986**.
209. **Wollenweber E., Dietz U.:** Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochemistry* 20, 869-932, **1981**.
210. **Xie D.Y., Sharma S.B., Dixon R.A.:** Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 422, 91-102, **2004**.
211. **Yamauchi K., Buwjoom T., Koge K., Ebashi T.:** Histological alterations of the intestinal villi and epithelial cells in chickens fed dietary sugar cane extract. *Br. Poult. Sci.* 47, 544-553, **2006**.
212. **Yu O., Jung W., Croes R.A., Fader G.M., McGonigle B., Odell J.T.:** Production of the isoflavones genistein and daidzenin in non-legume dicot and monocot tissues. *Plant Physiol.* 124, 781-793, **2000**.

## V. SPIS RYSUNKÓW I TABEL UMIESZCZONYCH W PRACY

– Rysunki

Nr rysunku	Nazwa	Strona
1	<i>Medicago truncatula</i> Gaertn.	6
2	Podstawowa struktura flawonoidów	11
3	Podstawowe klasy flawonoidów	12
4	Rośliny <i>M. truncatula</i> uprawiane na poletku doświadczalnym IUNG-PIB	25
5	Kolumna preparatywna	27
6	Spektrometr masowy LCQ Advantage Max (Thermo Finnigan) sprzężony z chromatografem cieczowym	28
7	Spektrometr NMR Bruker DRX-600	29
8	Ultrasprawy chromatograf cieczowy, typ Acquity™, firmy Waters	30
9	Schemat struktur wyizolowanych związków flawonoidowych części nadziemnych <i>M. truncatula</i>	32
10	Rozdział UPLC ekstraktu części nadziemnych <i>M. truncatula</i>	47
11	Zawartość poszczególnych związków flawonoidowych (średnia z lat 2005-2007) w liściach <i>M. truncatula</i>	50
12	Zawartość poszczególnych związków flawonoidowych (średnia z lat 2005-2007) w łodygach <i>M. truncatula</i>	51
13	Sumaryczna zawartość flawonoidów w liściach <i>M. truncatula</i>	53
14	Sumaryczna zawartość flawonoidów w łodygach <i>M. truncatula</i>	53
15	Zawartość poszczególnych glikozydów w liściach badanych odmian <i>M. truncatula</i>	54
16	Zawartość poszczególnych glikozydów w liściach badanych odmian <i>M. truncatula</i>	55
17	Polimorfizm występowania związków flawonoidowych w liściach <i>M. truncatula</i>	57
18	Polimorfizm występowania związków flawonoidowych w łodygach <i>M. truncatula</i>	57
19	Stosunek zawartości flawonoidów acylowanych do nieacylowanych w liściach trzech odmian <i>M. truncatula</i>	59
20	Stosunek zawartości flawonoidów acylowanych do nieacylowanych w łodygach trzech odmian <i>M. truncatula</i>	59
21	Zawartość flawonoidów w fazach rozwojowych roślin trzech odmian <i>M. truncatula</i>	60

– Tabele

Nr tabeli	Nazwa	Strona
1	Magnetyczny rezonans jądrowy $^1\text{H}$ NMR wyizolowanych po raz pierwszy flawonoidów ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – związek 4, 11, 13 i 14	33
2	Magnetyczny rezonans jądrowy $^1\text{H}$ NMR wyizolowanych po raz pierwszy flawonoidów ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – związek 15, 20, 22 i 23	34
3	Magnetyczny rezonans jądrowy $^{13}\text{C}$ NMR wyizolowanych aglikonów flawonoidów ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – dane uzyskane w eksperymentach HSQC i HMBC	35
4	Magnetyczny rezonans jądrowy $^{13}\text{C}$ NMR cukrów i acylowanych kwasów fenolowych ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) - dane uzyskano w eksperymentach HSQC i HMBC	36
5	Charakterystyka związków flawonoidowych <i>M. truncatula</i>	46
6	Czasy retencji wzorców flawonoidów części nadziemnych <i>M. truncatula</i>	47
7	Krzywe kalibracyjne wzorców <i>M. truncatula</i> odmiany Jemalong A17	48
8	Powtarzalność metody izolacji (n=15) pojedynczych flawonoidów części nadziemnych <i>M. truncatula</i> odmiany Jemalong A17	49
9	Zawartość glikozydów trycyny w liściach i łodygach trzech odmian <i>M. truncatula</i>	56