

**UNIwersYTET W BIAŁYMSTOKU**  
**Wydział Biologiczno-Chemiczny**  
**INSTYTUT CHEMII**



15-245 Białystok, ul. Ciołkowskiego 1K, ☎ (-48-85) 7388086, fax: (-48-85) 7388099 e-mail: wit@uwb.edu.pl

---

Dr hab. Stanisław Witkowski, prof. UwB

Białystok, 18.09.2019

**R E C E N Z J A**

rozprawy doktorskiej Małgorzaty M. Gralec

**pt. „Badanie składu i właściwości antyoksydacyjnych owoców aronii  
z wykorzystaniem metod spektroskopowych”**

Przedłożona do recenzji rozprawa została przygotowana w Katedrze Farmacji Biofizycznej i Bioanalizy Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem prof. dr hab. Iwony Wawer. Promotor rozprawy, prof. Iwona Wawer jest uznaną specjalistką w zakresie metod spektroskopowych, głównie NMR i EPR, w zastosowaniu do badań strukturalnych związków biologicznie aktywnych, przede wszystkim pochodzenia roślinnego, a także leków. Od wielu lat swoje zainteresowania badawcze koncentruje również na naturalnych antyoksydantach jako istotnych składnikach żywności, suplementów diety i kosmetyków. W te właśnie zagadnienia wpisuje się tematyka pracy doktorskiej Małgorzaty Gralec, w której autorka podjęła się zbadania zmian składu chemicznego owoców aronii w różnych fazach rozwoju rośliny. A owoce tej rośliny są uważane są szczególnie materiał prozdrowotny o potencjalnym zastosowaniu w diecie oraz w suplementach diety. Prześledzenie zmian zawartości związków biologicznie czynnych w ekstraktach, pozyskanych z owoców w różnych fazach wegetacji rośliny jest ważne nie tylko z ogólnych względów poznawczych, ale przede wszystkim z użytkowego punktu widzenia. Ważne jest określenie, w jakiej fazie rozwoju należy dokonywać zbioru owoców o optymalnym składzie do późniejszego zastosowania w suplementach diety oraz standaryzowanych produktach specjalnego przeznaczenia medycznego. Istotne jest także ustalenie składu oraz jakie związki biologicznie czynne są ważne, a także wybór metod analitycznych odpowiednich do ich oznaczania. W przypadku aronii, brakuje tego celu odpowiednich standardów. W owocach występuje bardzo złożona mieszanina związków, co stanowi trudny problem analityczny. W pracy wykorzystano NMR-owskie metody spektroskopowe 1D i 2D, których, zwłaszcza w połączeniu technikami chemometrycznymi, nie używano dotychczas w analizie składu ekstraktów z aronii.

Praca doktorska zawiera 165 stron tekstu i jest rzetelnie udokumentowana od strony literaturowej (130 pozycji cytowanych).

Układ pracy jest w zasadzie typowy. Po części wstępnej, zawierającej spis treści i cel pracy, następuje krótka charakterystyka aronii, głównie w aspekcie jej uprawy oraz pozyskiwania odpowiedniej jakości owoców jako surowca. Następnie przedstawiony został przegląd literaturowy i dalej, część eksperymentalna oraz wyniki oznaczeń wybranych związków w owocach w aronii, aż wreszcie podsumowanie i wnioski oraz wykaz literatury cytowanej. W załączniku zawarte jest opracowanie statystyczne wyników pomiarów zawartości związków aktywnych w owocach aronii oraz ich pojemności antyoksydacyjnej.

W części literaturowej doktorantka opisała szerokie spektrum działania prozdrowotnego preparatów z aronii. Dotychczasowe badania przeprowadzone, głównie *in vitro*, wywierają pozytywny wpływ na układ sercowo-naczyniowy. Ponadto wykazują działanie przeciwnowotworowe, przeciwcukrzycowe, hepatoprotekcyjne, przeciwzapalne, promieniochronne. Tak korzystne właściwości ekstraktów z aronii związane są z bogactwem związków aktywnych biologicznie. Ich zawartość zależy od stopnia dojrzałości owoców, od stopnia nawożenia, a także czynników środowiskowych, takich jak temperatura, nasłonecznienie, nawodnienie.

Doktorantka dokonała przeglądu podstawowych informacji o najważniejszych grupach związków występujących w aronii: antocyjanach, fenolokwasach, flawonolach, procyanidynach, a także innych, takich jak cukry, kwasy organiczne, tłuszcze itd. Informacje te dotyczą m.in. występowania, budowy chemicznej, nazewnictwa oraz funkcji biologicznych.

W części eksperymentalnej autorka opisała sposób pozyskania materiału do badań. Dla celów porównawczych, zebrane zostały owoce aronii w dwóch kolejnych latach: 2012 i 2013 (w okresie czerwiec-grudzień) oraz w roku 2016, w całym okresie wegetacji, od drobnych zielonych owoców (czerwiec) do w pełni dojrzałych (wrzesień). Zgodnie z przyjętymi zasadami, zebrany materiał był przechowywany w -15 °C, a bezpośrednio przed eksperymentami liofilizowany, mielony i ekstrahowany. Otrzymane ekstrakty były poddawane analizie fitochemicznej, mającej na celu monitorowanie stężenia wybranych składników w różnych fazach rozwoju owoców aronii. Otrzymane wyniki stanowią ciekawą i wartościową część pracy.

W przypadku związków polifenolowych ich poziom wyraźnie się zmienia w miarę dojrzewania owoców. Najwyższe stężenie: 18-20 g/100 g suchej masy (w ekwiwalentach kwasy galusowego) występuje w owocach zielonych w czerwcu, po czym w owocach dojrzałych obniża się i ustala na poziomie 9 g/100 g suchej masy na początku sierpnia. Ale proces ten jest uzależniony m.in. od warunków pogodowych, ponieważ spadek stężenia polifenoli w ekstraktach z owoców zebranych w roku 2013 następował szybciej. Niższe stężenia polifenoli występowały także w ekstraktach uzyskanych ze zbiorów w 2016 roku, kiedy to średnia temperatura w sierpniu była niższa o 2-3°C. Tym należy tłumaczyć, że wyniki uzyskane przez doktorantkę różniły się znacząco od tych, opisanych przez autorów z krajów bałkańskich (Tolic i wsp.).

Zawartość antocyjanów została oznaczona przy pomocy spektrofotometrii UV-Vis. Widma zarejestrowane przy wartości pH = 1 dla ekstraktów z owoców dojrzałych różniły się od tych, uzyskanych z niedojrzałych, intensywnym pasmem charakterystycznym dla antocyjanów w zakresie 480-520 nm. Należy

zauważyć, że stężenie monomerycznych antocyjanów wzrasta szybko wraz z dojrzewaniem owoców i ustala się na poziomie 2-3 g/ 100 g suchej masy. Podobny trend jest w przypadku sumy antocyjanów. Antocyjanów polimerycznych, związanych z taninami jest mniej niż monomerycznych i nie zmienia się podczas dojrzewania, natomiast zmienia się ich udział w całkowitej zawartości antocyjanów. Poziom antocyjanów zależy od warunków pogodowych. Przykładowo w 2012 roku średnia temperatura była niższa niż w 2013 o 1-2°C, co skutkowało obniżeniem zawartości antocyjanów, a w 2016 roku tendencja ta zaznaczyła się jeszcze bardziej.

Ciekawą obserwacją jest, że zawartość flawonoidów jest najwyższa w owocach zielonych i spada do stałego poziomu podczas dojrzewania. Podobnie, ilość tanin jest najwyższa w owocach niedojrzałych (10-12 g/100 g suchej masy) i spada wraz z dojrzewaniem (do 3-4 g/100 g suchej masy), co tłumaczy funkcję obronną tanin przed szkodnikami roślin.

Doktorantka dokonała pomiarów aktywności antyoksydacyjnej stosując metodę tłumienia rodnika DPPH oraz metodę ORAC. Wyniki z obu technik, wyrażone w równoważnikach Troloksu (TE) w mmolach na 100 g suchej masy, wykazują podobny trend. Największą zdolność antyrodnikową wykazują ekstrakty z owoców zielonych, która stopniowo obniża się wraz z procesem dojrzewania owoców.

Należy zauważyć, że doktorantka z sukcesem zastosowała jedno- i dwuwymiarowe techniki NMR ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR oraz COSY, HSQC i HMBC) do analizy zliofilizowanych ekstraktów z owoców aronii zebranych w latach 2012 i 2013. Zastosowanie technik NMR-owskich znacznie poszerza możliwości analityczne i pozwala na lepszą ocenę, zarówno jakościową, jak i ilościową, zawartości ekstraktów z owoców aronii. Badania były prowadzone, rozpoczynając od momentu, kiedy owoce były zielone, aż do pełnej dojrzałości przez okres pięciu miesięcy. Analiza zmienności pozwoliła na wyodrębnienie czterech okresów podczas dojrzewania owoców. Dla poszczególnych próbek zostały zarejestrowane i zinterpretowane widma  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR dla wybranych związków aktywnych w ekstrakcie. Na podstawie uzyskanych danych doktorantka ustaliła profil ich zmienności w trakcie dojrzewania owoców. Zaobserwowała różnice: największe w próbkach z czerwca i lipca oraz września i października. W widmach protonowych analizowała zakresy: 5.5-10.0 ppm, charakterystyczny dla protonów aromatycznych polifenoli, zakres 3.0 - 5.5 ppm charakterystyczny dla protonów CH i CH<sub>2</sub> w cukrach oraz alifatyczny zakres (poniżej 3 ppm) pochodzący od grup CH<sub>2</sub> kwasów karboksylowych. Analogiczne trzy zakresy: 180 - 100 ppm, 110 - 40 ppm oraz 90 - 15 ppm zostały wyodrębnione w widmach węglowych.

Analizie poddane zostały widma protonowe ekstraktów z owoców niedojrzałych, dojrzewających, dojrzałych oraz przejrzałych. Dzięki temu w niedojrzałych owocach można zauważyć intensywne sygnały w aromatycznym i olefinowym zakresie widma, malejące w okresie dojrzewania, i nieznacznie zwiększające intensywność w widmach próbek z owoców dojrzałych. Z kolei zróżnicowanie sygnałów protonów pochodzących od cukrów są znacznie mniejsze w owocach zielonych niż dojrzałych, ponieważ zawartość cukrów wzrasta wraz z procesem dojrzewania. Z kolei sygnały poniżej 3 ppm nie są zbyt skomplikowane,

jakkolwiek dużą różnicę w intensywności widać w zakresie 2.6 -2.9 ppm; niewielką dla owoców zielonych, a większą dla próbek uzyskanych w pozostałych fazach rozwoju.

Dzięki technikom NMR (COSY, HSQC i HMBC) autorka przypisała sygnały kwasom: chlorogenowemu i neochlorogenowemu w ekstraktach owoców dojrzałych. Za pomocą tych technik porównała widma ekstraktów z owoców zebranych w czerwcu w 2012 i 2013 roku. Ich obecność została stwierdzona zarówno w dojrzewających, jak i owocach dojrzałych.

Należy stwierdzić, że doktorantka wykazała się dużą sprawnością w korzystaniu z jedno- i dwuwymiarowych technik NMR. Analiza widm COSY pozwoliła na korelację protonów aromatycznych w antocyjanach: cyjanidyno-3-galaktozydzie i 3-arabinozydzie (protony przy C4, C6, C8 oraz C2', C5' i C6'). Z kolei technika HSQC umożliwiła przypisanie sygnałów atomom węgla: C6 i C8 oraz C2', C5' i C6'. Ponadto, na podstawie integracji sygnałów protonów H4 i H2' autorka zbadala relacje ilościowe w ekstraktach obu antocyjanów. Stwierdziła, że ich zawartość w okresie dojrzałości (sierpień-październik) nie ulega zmianie. Sygnały HSQC są mało intensywne i wymagają rejestracji widm uwzględniając długie czasy relaksacji. Tabela 22 zawiera pełne przypisanie sygnałów  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  w aglikonach obu antocyjanów.

W ekstraktach z dojrzałych owoców aronii autorka zaobserwowała sygnały sorbitolu, związku występującego także w licznych owocach np. w gruszkach, śliwkach, morelach, a w mniejszych ilościach także w jagodach i czarnych porzeczkach. W widmie  $^{13}\text{C}$  NMR ekstraktu z października 2012 roku daje się doskonale zaobserwować 6 charakterystycznych sygnałów sorbitolu w zakresie 64-76 ppm. Przypisanie sygnałów protonów możliwe było przy użyciu widm HSQC.

Oprócz sorbitolu doktorantka wykryła w owocach dojrzałych aronii dwa heksopiranozydy: glukozę i fruktozę. Do pełnej interpretacji wykorzystala techniki HSQC i HMBC. Techniki te okazały się przydatne przy określeniu konfiguracji centrum anomerycznego i określeniu stosunku ilościowego anomerów  $\alpha/\beta$ . Należy dodać, że konfiguracja tego centrum ma wpływ na smak owocu. Tabele 24 i 25 zawierają pełne przypisanie sygnałów protonów i atomów węgla odpowiednio w  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukopiranozie oraz  $\alpha$ - i  $\beta$ -fruktofuranozie. Również i w tym przypadku autorka mogła zarejestrować i załączyć widma łatwo dostępnych wzorców cukrów, jakkolwiek odpowiednie dane są dostępne w bazie HMDB.

Dzięki zastosowaniu spektroskopii NMR doktorantce udało się po raz pierwszy zaobserwować obecność w badanych ekstraktach *trans*-resweratrolu, silnego antyutleniacza, występującego także w winogronach, a w mniejszych ilościach m.in. w czarnej porzeczce. Identyfikacja była możliwa przez porównanie z widmem  $^1\text{H}$  NMR standardu, zarejestrowanym w tym samym rozpuszczalniku, jak ekstrakt aroniowy. Doktorantka dokonała ważnej obserwacji, że sygnały resweratrolu występują w ekstraktach z owoców niedojrzałych, natomiast nie pojawiają się w ekstraktach z owoców dojrzałych.

Ciekawym i ważnym wątkiem w dysertacji doktorskiej było przestudiowanie zmian poziomu antocyjanów: cyjanidyno-3-galaktozydu oraz cyjanidyno-3-arabinozydu, zachodzących w procesie dojrzewania owoców aronii.

Oznaczenia NMR-owskie związków zawartych w ekstraktach z aronii doktorantka potwierdziła za pomocą spektrometrii mas. Potwierdzona została obecność kwasu chlorogenowego i neochlorogenowego. W ekstraktach z dojrzałych owoców aronii wykryte zostały: cyjanidyno-3-galaktozyd i glukozyd oraz arabinozyd i ksylozyd. Z kolei w ekstraktach z owoców niedojrzałych wykryto: epikatechinę i procyanidynę B<sub>2</sub> oraz kwasy organiczne: jabłkowy oraz cytrynowy i izocytrynowy. Potwierdzony został również udział resweratrolu i sorbitolu, a także glukozy i fruktozy. Przez porównanie z danymi opisanymi przez Oszmiańskiego i Lachowicz zidentyfikowane zostały w ekstraktach z owoców niedojrzałych m.in. dwa kwasy fenolowe oraz glikozydy kwercetyny i izoramnetyny.

W załączniku do pracy znajduje się analiza statystyczna uzyskanych wyników: zawartości związków aktywnych w ekstraktach oraz pojemności antyoksydacyjnej. Dla poszczególnych ekstraktów wyniki można pogrupować w zależności od etapu dojrzewania owoców, a także od miesiąca, w którym dokonano zbioru. Analiza pokazuje, że w miarę dojrzewania owoców wzrasta stężenie antocyjanów i monosacharydów. Z kolei owoce niedojrzałe charakteryzuje większa zawartość kwasów organicznych, w tym chlorogenowego i neochlorogenowego.

Z obowiązków recenzenta zmuszony jestem przytoczyć zauważone w pracy błędy, głównie literowe i techniczne:

„Benzo[a]piran” zamiast benzo[a]piren, s. 11

„N-nitrozaminy” zamiast nitrozoaminy, s. 11

„Heptylulozo-” zamiast heptulozo-, s. 17

„Glucosa” – Rys.1, s.18

„Flawan-3,4-ole” zamiast flawan-3,4-diole, s.20

Na Rys. 5 błędy w oznaczeniu konfiguracji reszt cukrowych, s. 25

Błędy we wzorach katechiny i epikatechiny (Rys. 8, s. 36)

Błąd we wzorze procyanidyny B<sub>2</sub> (Rys. 9, s. 38)

„Fosfatydyloinozytol” zamiast fosfatydyloinozytol, „fosfatydyletanolamina” zamiast fosfatydyloetanoloamina, s. 41

„Kwas hydrocyjanowy” zamiast kwas cyjanowodorowy, pochodne „benzenowe”, s. 42

Absorbancja „molarna” zamiast molowa, s. 46

Masa „molekularna” zamiast molowa, s. 46

Błędy w schemacie na Rys. 11, s. 47

„Pirosiarczan” sodu zamiast pirosiarczyn, s. 47 i 48

Błędy na Rys. 13, s. 49

„Wodory H<sub>4</sub> i H<sub>7</sub>” zamiast protony, s. 53

„dwoma” zamiast dwiema, s. 72

„ph” zamiast pH, Rys. 23, s. 87

„jądra protonów”, s. 92

„Fruktofutanoza” zamiast fruktofuranoza, s. 124

„Procyjanicyny” zamiast procyjanidyny, s. 150

Pragnę zaznaczyć, że są to głównie błędy literowe, techniczne lub interpunkcyjne, które jednak nie umniejszają ogólnie pozytywnej oceny pracy.

Podsumowując, przedstawione w dysertacji wyniki należy uznać za interesujące i wartościowe. Praca jest ilustrowana licznymi widmami. Język pracy jest klarowny i zrozumiały.

Stwierdzam zatem, że praca spełnia wymogi ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U nr 65 poz. 595 wraz z późniejszymi uzupełnieniami) i wnoszę do Rady Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Małgorzaty M. Gralec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Stanisław W. Krawski