

Ocena pracy doktorskiej wykonanej przez
magister farmacji Małgorzatę Gralec
pt.: „Badanie składu i właściwości antyoksydacyjnych owoców aronii
z wykorzystaniem metod spektroskopowych”
w Katedrze Farmacji Fizycznej i Bioanalizy Zakładzie Chemii Fizycznej
Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
pod kierunkiem Promotora prof. dr hab. Iwony Wawer

Przedstawiona do recenzji monografia obejmuje 180 stron maszynopisu (łącznie z załącznikami) z rozdziałami: Cel pracy, Część teoretyczna, chociaż nie została ona nazwana (36 stron) i Część eksperymentalna (105 stron), Podsumowanie i Wnioski (5 stron). W pracy zamieszczono 93 ryciny i 47 tabel, chociaż liczne ryciny obejmują po dwa lub cztery widma, co zwielokrotnia liczbę rycin. Piśmiennictwo (brak w spisie treści) jest obszerne, obejmuje 130 pozycji w tym nieliczne opracowania podręcznikowe (brak w cytowaniu wydawnictwa), ale w większości prace oryginalne z zamieszczeniem ich tytułów, właściwie dobrane, opublikowane w czasopismach o międzynarodowym zasięgu, głównie anglojęzyczne.

Cel pracy jest wielokierunkowy i obejmuje: badania zmian składu chemicznego owoców aronii w trakcie dojrzewania, co mogłoby pomóc w ustalaniu terminu zbioru; wykazanie obecności związków o właściwościach prozdrowotnych, a głównie wykorzystanie spektroskopii NMR (technik 1D i 2D) w badaniach złożonych mieszanin związków obecnych w ekstraktach z owoców aronii. Celem pracy było też wykonanie dla tych wyciągów testów antyoksydacyjnych z wykorzystaniem spektroskopii EPR i spektrofluorymetrii wraz z analizą zależności aktywności antyoksydacyjnej od zawartości związków polifenolowych.

Część teoretyczna jest wielowątkowa, rozpoczyna się od zagadnień ogólnych, związanych z pochodzeniem i historią uprawy krzewów aronii w Polsce, poprzez właściwości prozdrowotne owoców aronii, a następnie opis biosyntezy związków fenolowych, co jest uzasadnione, gdyż planując badania składu owoców w różnych stadiach dojrzałości, można się było spodziewać różnych ich metabolitów. Część teoretyczną kończy omówienie grup związków opisanych dotychczas w aronii.

Część doświadczalna obejmuje badania wyciągów z owoców aronii zbieranych w latach 2012, 2013 od czerwca do grudnia i w 2016 roku, od zielonych do w pełni dojrzałych.

Odmiana Nero /Eggert, której owoce posłużyły do badań, mogła być wymieniona w rozdziale „Materiał roślinny”, a nie dopiero w rozdziale „Podsumowanie i wnioski”.

Sposób przygotowania surowca i ekstraktów słusznie uwzględniał fakt, że obecne w nich antocyjany są nietrwałe (suszenie owoców i ekstraktów za pomocą liofilizacji, zastosowanie ultradźwięków do ekstrakcji, stosowanie zakwaszonego rozpuszczalnika).

Oznaczenie całkowitej zawartości polifenoli i flawonoidów, przeprowadzono, korzystając z ogólnie przyjętych metod (Folin Ciocalteu, Christa-Millera). Podrozdział „oznaczenie zawartości tanin”, można było zatytułować „oznaczenie katechin i proantocyjanidyn”, gdyż oznaczano tylko tą podgrupę tanin. Nie znalazłam w pracy odnośników literaturowych do metod oznaczenia zawartości kwasu chlorogenowego oraz zawartości całkowitej antocyjanów w tym monomerycznych i związanych z garbnikami, nie ma też wzmianki, że było to własne opracowanie lub modyfikacja znanej metody.

Korzystniej byłoby wydzielić rozdział: „Oznaczenie aktywności biologicznej” z podrozdziałami, dotyczącymi dwóch testów na aktywność antyoksydacyjną, gdyż w pracy obie metody są umieszczone pomiędzy oznaczeniami związków w ekstraktach.

Do analizy ekstraktów z owoców aronii Doktorantka zastosowała jedno- i dwuwymiarowe techniki ^1H i ^{13}C NMR (COSY, HSQC i HMBC). Widma ^1H i ^{13}C NMR dla poszczególnych próbek zostały zinterpretowane, udało się przypisać sygnały większości związków obecnych w ekstraktach. Na tej podstawie Doktorantka ustaliła profil ich zmienności w trakcie dojrzewania owoców.

Wykonano również widma spektrometrii mas (MS) z wykorzystaniem techniki ESI (Electrospray), potwierdzając obecność związków, zarówno tych wcześniej obserwowanych na widmach NMR, jak i występujących w mniejszych ilościach, poniżej progu detekcji NMR. Sygnały pochodzące od powyższych związków zostały zaznaczone na widmach MS.

W owocach aronii stwierdzono obecność antocyjanów pochodnych cyjanidyny: 3-galaktozydu, 3-glukozydu, 3-ksylozydu i 3-arabinozydu, a także epikatechiny i procyanidyny B; kwasów: jabłkowego, cytrynowego, izocytrynowego; cukrów: sorbitolu, glukozy i fruktozy. Określenie całkowitej konfiguracji dwóch ostatnich cukrów, wymagałoby dodatkowych badań, ale techniki HSQC i HMBC umożliwiły przypisanie sygnałów obu anomerów i określenie stosunku ilościowego anomerów α/β .

Dzięki technikom 2D NMR (COSY, HSQC i HMBC) doktorantka przypisała sygnały kwasów chlorogenowego i neochlorogenowego w ekstraktach z owoców aronii. Obecność tych kwasów została stwierdzona zarówno w dojrzewających, jak i w dojrzałych owocach.

Po raz pierwszy Doktorantka stwierdza w owocach aronii obecność *trans*-resweratrolu. Sygnały, odpowiadające resweratrolowi obserwowane są na widmach ^1H NMR wyciągów z niedojrzałych owoców aronii, podczas, gdy na widmach ^{13}C NMR, sygnały pochodzące od

resweratrolu obserwowano zarówno w wyciągach z niedojrzałych jak i dojrzałych owoców aronii. Niewątpliwie badania powinny być kontynuowane w kierunku wyizolowania resweratrolu i przeprowadzenia analiz identyfikacyjnych pojedynczego związku, a nie tylko w mieszaninie, tym bardziej, że nie wszystkie sygnały pochodzące od resweratrolu można było zaobserwować skutkiem nakrywania się sygnałów w widmie.

Pozostałe związki określone na podstawie sygnałów masowych i fragmentacyjnych Doktoranka przedstawiła w tabelach rozdzielnie dla niedojrzałych i dojrzałych owoców aronii. Korzystniejsze byłoby połączenie tych tabel, lub przedstawienie związków w tej samej kolejności w obu tabelach, łatwiej wtedy byłyby widoczne różnice; szkoda, że nie zaznaczono odpowiednich sygnałów na widmach, np. numerami, brak też podania numeru ryciny widma na którym obecne są sygnały tych związków.

Najwyższą zawartość związków polifenolowych metodą Folin- Ciocalteu Doktoranka oznaczyła w ekstraktach z zielonych owoców, niezależnie od roku zbioru, a na obserwowane różnice mogły mieć wpływ odmienne warunki środowiskowe w obu latach zbioru owoców. Podobnie w owocach zielonych było najwięcej flawonoidów, podczas, gdy wahania w stężeniu kwasu chlorogenowego były mniej wyraźne. Obserwowano też korelację pomiędzy zawartością polifenoli, a właściwościami antyoksydacyjnymi.

Zawartość antocyjanów jako związków barwnych została oznaczona przy pomocy spektrofotometrii UV-Vis, a widma ekstraktów charakteryzowało intensywne pasmo antocyjanów w zakresie 480-520 nm.

W pracy wykorzystano spektroskopię NMR, która umożliwiła identyfikację związków bez użycia substancji wzorcowych, których często brak, lub są one bardzo kosztowne. Metod 1D i 2D NMR, zwłaszcza w połączeniu z technikami chemometrycznymi, nie używano dotychczas w analizie składu ekstraktów z aronii. Otrzymane dane NMR mogą stanowić bazę informacji np. dla instytucji zajmujących się oceną jakości owoców jagodowych oraz produktów spożywczych i farmaceutycznych, zawierających ekstrakty z tych owoców.

Zastosowanie metod chemometrycznych, to nowy sposób badania złożonych mieszanin, pozwalający na uzyskanie użytecznych informacji z bardzo dużego zbioru danych pomiarowych oraz ich wizualizację. Doktoranka wykonała analizę głównych składowych (PCA – Principal Component Analysis) wykorzystując między innymi widma NMR rejestrowane dla próbek owoców w trakcie dojrzewania, intensywność i położenie sygnałów badanych związków w widmie NMR, aktywność przeciwutleniającą. Analiza PCA i grupowanie próbek pozwoliło zróżnicować zielone owoce od zebranych w innej fazie dojrzewania.

Nowoczesne prace z zakresu badań surowców roślinnych obejmują oprócz analizy składu chemicznego, również badania ich aktywności. W przypadku badania owoców aronii Doktorantka określiła aktywność antyoksydacyjną przy użyciu dwóch metod: wymiatania rodnika DPPH (DPPH/EPR), najczęściej stosowanego w tego typu badaniach, a także spektrofлуorymetryczną metodę ORAC wykorzystującą rodniki nadtlennkowe. Wykazała zróżnicowaną aktywność antyoksydacyjną ekstraktów z owoców w zależności od stopnia ich dojrzałości. Wyniki z obu technik, wyrażone w równoważnikach Troloksu (TE) w mmolach na 100 g suchej masy, pokazują, że największą pojemność przeciwutleniającą i zdolność wymiatania rodników wykazują ekstrakty z zielonych owoców, a nie z owoców dojrzałych.

O sile działania antyoksydacyjnego wyciągów z owoców aronii łatwiej byłoby mówić po przeprowadzeniu porównawczego badania ze związkiem o znanej aktywności antyoksydacyjnej (np. porównując z witaminą C).

Podsumowując, chciałabym podkreślić, że praca jest przykładem nowoczesnego sposobu badania materiału roślinnego. Praca wymagała od doktorantki zapoznania się z wieloma technikami stosowanymi w fitochemii, a także z badaniami działania biologicznego w zakresie aktywności antyoksydacyjnej. Dzięki wykorzystaniu specjalistycznej aparatury, możliwa była analiza związków z ich identyfikacją w zespole, bez ich wyizolowania. Doktorantka doskonale wykorzystała możliwości jedno- i dwuwymiarowych technik NMR do oceny składu ekstraktów z owoców aronii, a zastosowanie spektroskopii NMR poszerza możliwości analityczne, w stosunku do najczęściej stosowanej chromatografii cieczowej.

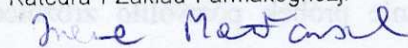
Przedstawioną do oceny monografię oceniam bardzo pozytywnie. Doktorantka zrealizowała postawiony na wstępie cel, a wymienione w trakcie recenzji uwagi do monografii, dotyczące głównie redakcji pracy, a których część można uznać jako dyskusyjne, nie umniejszają wartości rozprawy doktorskiej.

Recenzowana rozprawa doktorska **mgr Małgorzaty Gralec** spełnia wymagania stawiane pracom na stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych (ustawa 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).

Przedstawiam więc **Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego w Warszawie** wniosek o dopuszczenie **mgr farmacji Małgorzaty Gralec** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 2019-10-02

Katedra i Zakład Farmakognozji



Prof. dr hab. Irena Matkowska