



AUTOREFERAT
PRZEDSTAWIAJĄCY OPIS DOROBKU I OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH

Agnieszka Viapiana

Katedra i Zakład Chemii Analitycznej
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 2018

I. Informacje o kandydacie

1. Agnieszka Viapiana (poprzednie nazwisko – Arceusz)

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

Dyplom magistra chemii uzyskany 22 czerwca 2001 roku na podstawie obronionej pracy magisterskiej pt.: „*Witaminy - ich rola, budowa i wpływ na organizm*” wykonanej w Zakładzie Dydaktyki Chemii, Wydział Chemii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Gdańskiego. Promotor pracy: Prof. dr hab. Romuald Piosik.

Stopień doktora nauk farmaceutycznych w specjalności chemia analityczna nadany 20 listopada 2007 uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie: Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej pt. „*Bor – zawartość, rozmieszczenie i wzajemne relacje z innymi biopierwiastkami w surowcach roślinnych stosowanych w lecznictwie*” wykonanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Analitycznej. Promotor pracy: Prof. dr hab. n. farm. Marek Wesołowski, recenzenci pracy: Prof. dr hab. n. farm. Ryszard Kocjan, Prof. dr hab. n. farm. Renata J. Ochocka.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

W Katedrze i Zakładzie Chemii Analitycznej Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie: Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) pracuję od 01.09.2001 roku, początkowo na stanowisku asystenta, a od 01.02.2011 roku na stanowisku adiunkta.

II. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Ocena jakości handlowych produktów roślinnych na podstawie zawartości związków polifenolowych, właściwości antyoksydacyjnych i przeciwbakteryjnych

2. Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

H.1. Viapiana A.*, Konopacka A., Waleron K., Wesołowski M. *Cistus incanus* L. commercial products as a good source of polyphenols in human diet. *Industrial Crops and Products*, 2017, 107, 297-304 (IF: 3,181; MNiSW: 40)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń i przeprowadzeniu analiz chromatograficznych, interpretacji wyników, oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

H.2. Viapiana A.*, Wesołowski M. The phenolic contents and antioxidant activities of infusions of *Sambucus nigra* L. *Plant Food for Human Nutrition*, 2017, 72, 82-87 (IF: 2,368; MNiSW: 35)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń i przeprowadzeniu analiz chromatograficznych, interpretacji wyników, oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

H.3. Viapiana A.*, Struck-Lewicka W., Koniecznyński P., Wesołowski M., Kaliszan R. An approach based on HPLC-fingerprint and chemometrics to quality consistency evaluation of *Matricaria chamomilla* L. commercial samples. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7(1561), 1-11 (IF: 4,298; MNiSW: 40)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń i przeprowadzeniu analiz chromatograficznych, interpretacji wyników, oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

H.4. Viapiana A., Wesołowski M. HPLC fingerprint combined with quantitation of phenolic compounds and chemometrics as an efficient strategy for quality consistency evaluation of *Sambucus nigra* berries. *Natural Product Communications*, 2016, 11, 1449-1454 (IF: 0,773; MNiSW: 20)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń i przeprowadzeniu analiz chromatograficznych, interpretacji wyników, oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

H.5. Arceusz A., Wesołowski M., Ulewicz-Magulska B. Flavonoids and phenolic acids in methanolic extracts, infusions and tinctures from commercial samples of lemon balm. *Natural Product Communications*, 2015, 10, 977-981 (IF: 0,884; MNiSW: 20)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń i przeprowadzeniu analiz chromatograficznych, interpretacji wyników, oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

H.6. Arceusz A., Wesołowski M. Quality consistency evaluation of *Melissa officinalis* L. commercial herbs by HPLC fingerprint and quantitation of selected phenolic acids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, 83, 215-220 (IF: 2,829; MNiSW: 30)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń i przeprowadzeniu analiz chromatograficznych, interpretacji wyników, oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

H.7. Arceusz A., Wesołowski M., Koniecznyński P. Methods for extraction and determination of phenolic acids in medicinal plants: a review. *Natural Product Communications*, 2013, 8, 1821-1829 (IF: 0,924; MNiSW: 20)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu doświadczeń i przeprowadzeniu analiz chromatograficznych, interpretacji wyników, oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 90%.

* prace w których byłam autorem korespondencyjnym

Sumaryczny współczynnik oddziaływania Impact Factor (IF) publikacji wytypowanych do cyklu w postępowaniu habilitacyjnym wynosi 15,257, zaś punkty MNiSW – 205.

3. Wprowadzenie w tematykę badawczą

Surowce roślinne towarzyszyły człowiekowi od zarania dziejów, a historia ich stosowania jest bezpośrednio związana z historią żywienia człowieka. Przez wiele tysięcy lat człowiek pierwotny, prowadząc koczowniczy tryb życia, zmuszony był żywić się roślinami znajdującymi się na trasie jego wędrówki. Były to różne rośliny, które spożywał w całości lub tylko ich

określone części. Dostyć szybko przekonał się także, iż nie wszystkie rośliny można spożywać, ponieważ część z nich działa trująco, halucynogennie lub może powodować alergie.

W miarę gromadzenia z pokolenia na pokolenie doświadczeń powstała niezwykła wiedza o właściwościach roślin. Początkowo, przekazywana ustnie jedynie w wąskim gronie osób, stanowiła atrybut władzy oraz stawała się przedmiotem obrzędów i kultów religijnych. Dopiero po pewnym czasie zaczęto ją spisywać, a pierwsze pisane doniesienia o użytkowaniu roślin leczniczych zostały odnalezione na sumeryjskich tablicach glinianych z Nagpur, których wiek szacuje się na około 5000 lat [Kelly, 2009].

Ziołami i ich zastosowaniem w lecznictwie zajmowali się nie tylko kapłani, ale także filozofowie i uczeni. Za ojca medycyny i farmacji uważa się greckiego uczonego Hipokratesa, który w swoim dziele *Corpus Hippocraticum* opisał około 300 leków pochodzenia roślinnego, zwierzęcego i mineralnego. Drugim wielkim dziełem jest *De materia medica*, napisana przez Dioskorydesa w I wieku p.n.e., w którym przedstawił ponad 1200 gatunków roślin leczniczych [Thorwald, 1991]. Większość stanowią surowce o łagodnym działaniu, jednakże nie brakuje również roślin o silnym działaniu terapeutycznym, takich jak np. mak, jaskier czy lulek czarny. Oba dzieła, przetłumaczone na łacinę, stanowiły przez piętnaście stuleci podstawową wiedzę o ziołach i ich zastosowaniu w medycynie europejskiej.

Od starożytności, aż do XIX wieku, leki były prawie wyłącznie wytwarzane z surowców naturalnych. Podczas gdy dawne ludy stosowały rośliny lecznicze przede wszystkim w formie naparów, wywarów i maceratów, od średniowiecza, a zwłaszcza między XVI a XVIII wiekiem, wzrosło zapotrzebowanie na leki złożone. Skład ich obejmował nie tylko surowce roślinne, ale także te pochodzenia zwierzęcego i mineralnego.

Przełom XIX i XX wieku zaowocował rozwojem nauk chemicznych i odkryciem złożonych procesów syntezy organicznej, co doprowadziło do masowej produkcji leków syntetycznych i rozwoju przemysłu farmaceutycznego. Wiązało się to także z częściową eliminacją roślin leczniczych z terapii. Pozyskiwane syntetycznie, w czystej postaci alkaloidy i glikozydy, coraz częściej wypierały te izolowane z surowców roślinnych. Wkrótce jednak udowodniono, iż pomimo, że działanie syntetycznych alkaloidów jest szybsze, działanie alkaloidów pochodzenia roślinnego jest skuteczniejsze i długotrwałe. Na początku XX wieku zaproponowano metody stabilizacji świeżych roślin leczniczych, zwłaszcza tych o nietrwałych składnikach aktywnych.

W świecie roślin najbardziej rozpowszechnionymi metabolitami wtórnymi są związki fenolowe [Skrovankova i wsp., 2012]. Produkowane są one w odpowiedzi na stres, uszkodzenia, infekcje grzybowe czy promieniowanie ultrafioletowe, a ich właściwości prozdrowotne związane są przede wszystkim z aktywnością przeciwutleniającą [Asensi i wsp., 2011; Maurya i wsp., 2010]. Jako antyoksydanty mogą działać na wiele sposobów, m.in. poprzez bezpośrednią

reakcję z wolnymi rodnikami, ich neutralizację, nasilenie dysmutacji wolnych rodników do związków o znacznie mniejszej reaktywności, hamowanie lub wzmacnianie działania wielu enzymów [Ramos, 2008], czy chelatowanie metali prooksydacyjnych [Biesaga, 2011]. Ponadto, mogą wzmacniać działanie innych antyoksydantów, np. witamin rozpuszczalnych w tłuszczach i niskocząsteczkowych substancji rozpuszczalnych w wodzie. Obecnie, związki fenolowe są szczegółowo badane także ze względu na swoje właściwości przeciwnowotworowe i cytoprotekcyjne [Fresco i wsp., 2010; Ramos, 2008]. Polifenole działają też jako czynniki przeciwzapalne i stabilizują system odpornościowy organizmu hamując angiogenezę konieczną dla wzrostu nowotworu [Tabrez i wsp., 2013]. Badania naukowe wykazały, iż określony związek fenolowy w niskim stężeniu, w obecności innych polifenoli, może znacząco poprawiać chemioprotekcję [Fantini i wsp., 2015; De Kok i wsp., 2008]. Wykazano bowiem, że niektóre polifenole wyekstrahowane w wysokich stężeniach, działają w przeciwnym kierunku, tzn. zamiast zapobiegać nowotworom, przyczyniają się do ich rozwoju i postępów choroby [Lambert i Elias, 2010; Khan i wsp., 2008].

Największą i najlepiej dotąd poznaną grupą związków fenolowych, występujących powszechnie zarówno w świecie roślin jak i w żywności, są flawonoidy. Obecnie, w literaturze naukowej opisano ponad 9000 związków należących do tej grupy metabolitów [Wang i wsp., 2011]. Charakteryzujące się wysoką aktywnością przeciwutleniającą flawonoidy pełnią funkcję wspomagającą w terapii chorób układu sercowo-naczyniowego, alergii [Castell i wsp., 2014], kruchości naczyń krwionośnych [Alqurashi i wsp., 2016; Terao, 2017], chorobach neurodegeneracyjnych związanych z wiekiem [Beking i Vieira, 2010], cukrzycy [Zamora i wsp., 2014], czy infekcjach wirusowych i bakteryjnych [Boubakeur i wsp., 2015]. Oprócz tego, wykazują działanie przeciwzakrzepowe i wykorzystywane są jako środki chemioterapeutyczne [Biesaga, 2011]. Spośród flawonoidów, kwercetyna odgrywa istotną rolę ze względu na właściwości przeciwnowotworowe [Tabrez i wsp., 2013]. Oprócz kwercetyny, także inne flawonoidy, jak np. kemferol, luteolina, apigenina czy hesperydyna, działają hamująco na wzrost komórek nowotworowych jelita, prostaty, wątroby, żołądka i szyjki macicy [Kampa i wsp., 2007]. Często wykorzystywanym źródłem mirycetyny są napary z rumianku [Lall i wsp., 2015]. Badania wskazały na jej potencjał terapeutyczny wobec choroby Alzheimera, ponieważ hamuje tworzenie zarówno fibryli A β , jak i NFT [Choi i wsp., 2014; Ono i wsp., 2012]. Z kolei apigenina, ze względu na właściwości przeciwutleniające, antymutageniczne, przeciwzapalne i przeciwwirusowe, jest badana pod kątem wpływu na efekt chemoprewencyjny [Lall i wsp., 2015]. Flawonoidem, który wyróżnia się pod względem właściwości przeciwbakteryjnych jest rutyna. Badania wykazały, że właściwości przeciwbakteryjne kwercetyny, mirycetyny, fizetyny i

kemferolu wobec bakterii *Salmonella enteritidis* są silniejsze w obecności rutyny [Arima i wsp., 2002].

Drugą główną grupą związków fenolowych są kwasy fenolowe. Usztywniają ściany komórkowe roślin wchodząc w skład białek i polisacharydów, hamują wiele szlaków metabolicznych i odgrywają ważną rolę w dojrzewaniu roślin. Kwasy fenolowe wykazują działanie przeciwbakteryjne [Eom i wsp., 2016; Kim i Je, 2015; Chatterjee i wsp., 2015; Alves i wsp., 2013] oraz wspomagające w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych [Daglia i wsp., 2014], układu krwionośnego, czy cukrzycy [Molinari i wsp., 2009; Bahadoran i wsp., 2013].

Kwasy takie jak galusowy, chlorogenowy, kawowy, elagowy i ferulowy mają zdolność blokowania związków kancerogennych tworzących się w efekcie przemian metabolicznych [Carocho i wsp., 2013; Roleira i wsp., 2015]. Kwasy hydroksycynamonowe zapobiegają utlenianiu się frakcji cholesterolu LDL oraz innych lipidów, przeciwdziałając rozwojowi miażdżycy [Cheng i wsp., 2007; Wu i wsp., 2007; Srinivasan i wsp., 2007]. Ponadto, wykazują zdolność hamowania rozwoju nowotworów i tworzenia się związków mutagennych. Kwas galusowy jest środkiem ściągającym, ma oprócz tego właściwości bakteriostatyczne, przeciwutleniające oraz przeciwnowotworowe [Kim, 2007]. Kwasy rozmarynowy, kawowy i chlorogenowy są określane jako inhibitory chorób nowotworowych [Matejczyk i wsp., 2018; Carocho i wsp., 2013]. Ponadto, kwas kawowy przeciwdziała oksydacji lipoprotein i recyrkulacji α -tokoferolu do formy aktywnej, chroni także komórki endotelium przed uszkodzeniami wywołanymi przez utlenioną frakcję LDL i wspólnie z kwasem ferulowym działa przeciwdrobnoustrojowo wobec bakterii patogenicznych i grzybów [Alves i wsp., 2013]. Z kolei kwas syryngowy wykazuje właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne oraz hepatoprotekcyjne [Itoh i wsp., 2010], zaś kwas *p*-kumarowy, oprócz właściwości przeciwutleniających wykazuje także działanie przeciwnowotworowe wobec linii komórkowych raka piersi (MCF7) i jelita grubego (HCT15) [Heleno i wsp., 2014].

Wzrost zainteresowania związkami bioaktywnymi jest związany z potencjalnymi możliwościami wykorzystania ich jako środków chemicznych, farmaceutycznych czy dodatków do żywności [Skrovankova i wsp., 2012]. Analiza jakościowa preparatów roślinnych jest wyjątkowo trudna i skomplikowana ze względu na złożoność składu chemicznego [Dejaegher i wsp., 2010]. Produkty roślinne zawierają zazwyczaj kilkaset różnych składników, które występują w bardzo małych ilościach [Li i wsp., 2010]. Brak możliwości identyfikacji wszystkich związków obecnych w materiale roślinnym można zastąpić techniką *fingerprint* [Dejaegher i wsp., 2010]. Jest to technika rekomendowana przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków (FDA), Europejską Agencję Leków (EMA) oraz Chińską Agencję Żywności i Leków (SFDA). Badania typu *fingerprint* stanowią element kontroli jakości surowców roślinnych. Ponadto,

wykorzystywane są w poszukiwaniu nowych gatunków roślin o potencjale leczniczym zbliżonym do tych cenionych pod względem medycznym oraz mogą stanowić podstawę do badań chemotaksonomicznych.

Technika *fingerprint* może być również wykorzystana do wykrywania zafałszowań [Dejaegher i wsp., 2010]. Na podstawie profilu zanieczyszczeń analiza *fingerprint* umożliwia ustalenie pochodzenia związku, tzn. czy jest on pochodzenia naturalnego czy został otrzymany syntetycznie. Metoda ta jest również użyteczna w przypadku rozróżniania gatunków roślin pochodzących z tej samej rodziny. Jest to szczególnie ważne w przypadku roślin, z których jedna jest trująca, a druga nie wykazuje takiego działania.

Metoda *fingerprint* może być stosowana także do przewidywania właściwości badanej próbki, np. antyoksydacyjnych, cytotoksycznych czy przeciwbakteryjnych, lub do wskazania substancji, które prawdopodobnie będą odpowiadały za te właściwości. Metoda ta posiada jednak kilka ograniczeń, tj. nie zapewnia bezpośrednich danych o aktywności przeciwutleniającej ekstraktu oraz nie zapewnia kontroli ogólnej produktów roślinnych, ponieważ nie dostarcza informacji o zawartości aktywnych składników [Dumarey i wsp., 2010]. Dlatego też opracowano metody kombinowane łączące analizę *fingerprint* z analizą ilościową bioaktywnych składników badanych produktów roślinnych.

4. Cel podjętych badań

Celem podjętych przeze mnie badań naukowych, których efektem jest cykl publikacji składający się na osiągnięcie habilitacyjne, była ocena jakości handlowych produktów roślinnych z wykorzystaniem techniki *fingerprint*, połączonej z analizą ilościową związków polifenowych w tych produktach oraz oceną uzyskanych wyników za pomocą zaawansowanych metod wielowymiarowej analizy statystycznej, tj. analizy głównych składowych i analizy klasterowej. Badania ukierunkowane były głównie na związki polifenolowe, takie jak flawonoidy i kwasy fenolowe.

Szczegółowe cele badań:

- zastosowanie analizy *fingerprint* do oszacowania jakości wybranych surowców roślinnych na podstawie ich profilu chromatograficznego, po wcześniejszej optymalizacji metody ekstrakcji i techniki HPLC stosowanej w badaniach
- oznaczenie zawartości wybranych związków polifenolowych w handlowych produktach roślinnych z wykorzystaniem uprzednio zoptymalizowanej i zwalidowanej techniki HPLC

- ocena aktywności przeciwutleniającej i przeciwbakteryjnej wybranych handlowych produktów roślinnych
- walidacja metod analitycznych stosowanych w badaniach zawartości związków polifenolowych

5. Szczegółowe omówienie osiągnięcia naukowego

- 5.1. Zastosowanie analizy *fingerprint* do oszacowania jakości wybranych surowców roślinnych na podstawie ich profilu chromatograficznego, po wcześniejszej optymalizacji metody ekstrakcji i techniki HPLC stosowanej w badaniach (publikacje **H.3.**, **H.4.** i **H.6.**).

Analiza *fingerprint*, rekomendowana przez wiele instytucji międzynarodowych, jest jednym z podstawowych elementów prowadzących m.in. do oszacowania/kontroli jakości surowca roślinnego. Pod pojęciem *fingerprint* należy rozumieć charakterystyczny profil/wzorzec, który chemicznie reprezentuje próbkę. Celem prac związanych z analizą *fingerprint* jest uzyskanie chromatogramów dających jak najwięcej informacji o badanej próbce. Dąży się do uzyskania na chromatogramach jak największej liczby pików, dobrze rozdzielonych i o dużych polach powierzchni. Następnym etapem jest porównanie otrzymanych chromatogramów. W przypadku oceny próbek o podobnych profilach chromatograficznych stosuje się porównanie chromatogramu próbki z chromatogramem wzorca danego surowca roślinnego. Ocenę uzyskanego obrazu można dokonać poprzez zwyczajną ocenę wizualną albo też korzystając z technik przetwarzania obrazu, m.in. analizy głównych składowych i analizy klasterowej. Zastosowanie tych ostatnich umożliwia chemometryczną analizę zgromadzonych danych, tym samym pozwalając na statystyczną ocenę różnic i podobieństw między analizowanymi próbkami.

Przygotowanie próbek do badań zależy od celu zastosowania analizy *fingerprint*. W sytuacji, gdy zamierzamy dokonać kontroli jakości surowca, próbki powinny być przygotowane w takiej formie, która jest w największym stopniu zbliżona do formy, w jakiej surowiec jest powszechnie stosowany. W przypadku, gdy chcemy określić całkowity skład chemiczny próbki, wówczas typ ekstrakcji i rodzaj użytego rozpuszczalnika należy tak dobrać, aby uzyskać największy odzysk oznaczanych analitów. Najczęściej stosowanymi technikami przygotowania próbek do analizy jest ekstrakcja ciecz-ciecz przez wytrząsanie oraz ekstrakcja przy użyciu łaźni ultradźwiękowej, zaś najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami są mieszaniny metanolu lub etanolu z wodą w różnych stosunkach objętościowych. Oprócz rozpuszczalnika, należy dobrać również odpowiednią temperaturę i czas procesu ekstrakcji, a ponadto stosunek masy próbki do objętości rozpuszczalnika.

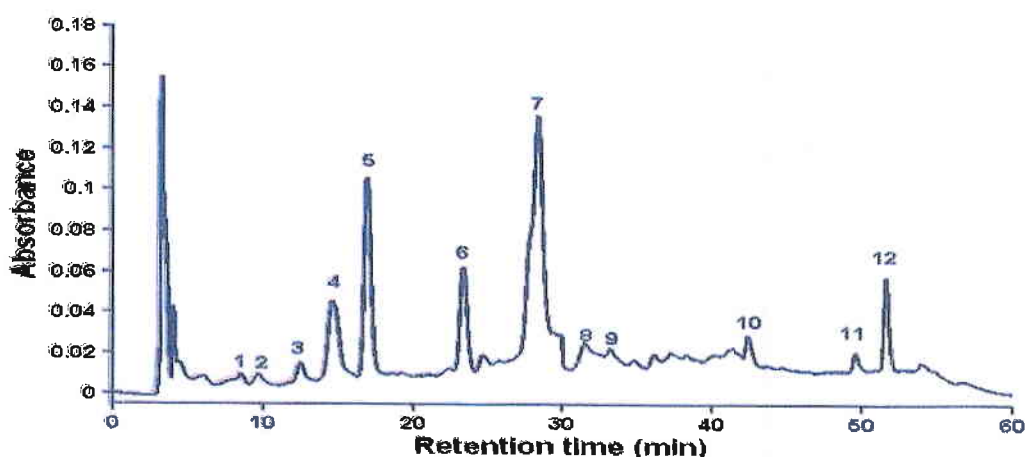
Najlepsze warunki rozdziału chromatograficznego otrzymuje się w wyniku testowania istotnych czynników wpływających na selektywność tego procesu, tj. typ stosowanej kolumny, skład fazy ruchomej, jej pH, oraz rodzaj i stężenie modyfikatora organicznego. Najczęściej wybierana jest kolumna C18 w HPLC-RP. Testowana jest także temperatura kolumny, najczęściej 20, 25 i 30 °C. Jako faza ruchoma powszechnie używany jest metanol, acetonitryl lub ich mieszaniny z dodatkiem modyfikatora organicznego, np. kwasów octowego, fosforowego lub trifluorooctowego, przy czym częściej stosowana jest elucja gradientowa niż izokratyczna. Spośród metod analitycznych najczęściej stosowane są techniki chromatograficzne (TLC, HPTLC, HPLC, UHPLC), spektroskopowe (FTIR, MS, NMR) i elektroforeza kapilarna (CE), przy czym w przypadku techniki HPLC, w zależności od metody detekcji, stosując detektor UV/Vis należy zwrócić szczególną uwagę na długość fali, przy której prowadzona jest analiza. Zazwyczaj wybierana jest $\lambda = 254$ nm, natomiast w przypadku analizy flawonoidów $\lambda = 280$ nm.

W publikacjach **H.3.**, **H.4.** i **H.6.** przedstawiono wyniki analiz 19 próbek rumianku pospolitego (*Matricaria Chamomilla* L.), 13 próbek bzu czarnego (*Sambucus nigra* L.) oraz 19 próbek melisy lekarskiej (*Melissa officinalis* L.). Celem prac było oszacowanie jakości produktów handlowych tych surowców, dostępnych w sklepach zielarskich i aptekach na terenie Polski. Pierwszym etapem badań była optymalizacja sposobu ekstrakcji i techniki rozdzielczej HPLC, wykorzystanej w kolejnym etapie do analizy ilościowej związków fenolowych. Spośród technik ekstrakcyjnych, wybrano ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami (UAE), która w porównaniu z tradycyjnymi metodami ekstrakcji jest szybsza i wymaga mniejszej objętość rozpuszczalników. W celu optymalizacji ekstrakcji testowano rodzaj rozpuszczalnika (metanol, etanol), jego stężenie w wodzie (mieszaniny metanol:woda i etanol:woda w stosunku objętościowym 40:60, 60:40 i 80:20), a także czas ekstrakcji (30, 60, 90 i 120 min). Przeprowadzone badania wykazały, że najlepszym ekstrahentem, zarówno dla próbek melisy lekarskiej jak i rumianku pospolitego, okazała się być mieszanina metanol:woda (80:20, v/v), którą ekstrahowano oba surowce przez 30 min. W przypadku próbek bzu czarnego, metanol okazał się być najlepszym ekstrahentem, zaś czas ekstrakcji wynosił 45 min. Dla próbek melisy lekarskiej i bzu czarnego lepszą wydajność procesu ekstrakcji uzyskano prowadząc ekstrakcję w temperaturze pokojowej, podczas gdy próbki rumianku pospolitego ekstrahowano w temp. 35 °C.

Optymalizacja rozdziału analitów techniką HPLC polegała na dobraniu składu fazy ruchomej, długości fali detektora oraz temperatury kolumny. Spośród rozpuszczalników mogących pełnić rolę fazy ruchomej testowano metanol i acetonitryl z dodatkiem kwasów fosforowego, octowego lub trifluorooctowego jako modyfikatorów. Analizy prowadzono przy długości fali 254, 280, 320 i 370 nm w różnych temp. 20, 25, 30 i 35 °C. Dla próbek melisy lekarskiej (publikacja **H.6.**) najlepszą fazą ruchomą okazał się metanol z dodatkiem kwasu trifluorooctowego (0,05%), a

analizy prowadzono przy $\lambda = 254$ nm w temp. 30 °C. W przypadku próbek rumianku pospolitego (publikacja H.3.), lepszą fazą ruchomą był acetonitryl z dodatkiem kwasu trifluorooctowego (0,05%), zaś analizy przeprowadzono w temp. 35 °C przy $\lambda = 254$ nm. Jeszcze inną fazą ruchomą wybrano dla próbek bzu czarnego (publikacja H.4.). Był to metanol z dodatkiem kwasu octowego (1%), natomiast analizy prowadzono w temp. 35 °C przy $\lambda = 280$ nm.

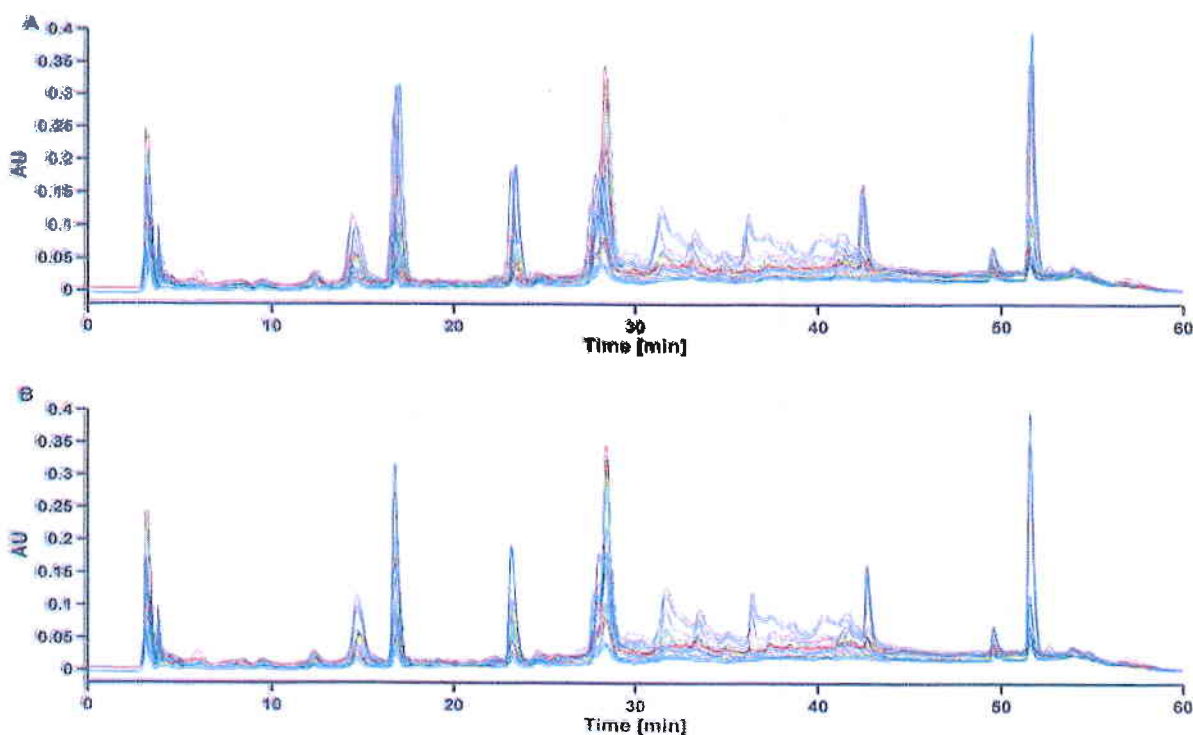
W wyniku analizy HPLC ekstraktów badanych surowców roślinnych otrzymano w sumie 50 pików na chromatogramach próbek melisy lekarskiej (publikacja H.6.), przy czym z tej liczby wyodrębniono 12 tzw. charakterystycznych pików. Dla próbek rumianku pospolitego (publikacja H.3.), otrzymano około 60 pików, z których 12 wyróżniono jako charakterystyczne piki, odznaczające się dużym polem powierzchni oraz dobrym rozdziałem, zaś dla próbek bzu czarnego (publikacja H.4.) wyodrębniono około 60 pików, z których 14 stanowiło charakterystyczne piki. W przypadku melisy lekarskiej, spośród 12 charakterystycznych pików, sześć zostało zidentyfikowanych jako kwasy fenolowe: galusowy, chlorogenowy, syringowy, kawowy, ferulowy oraz rozmarynowy, i oznaczonych ilościowo. Pik związany z kwasem rozmarynowym miał największe pole powierzchni i względem niego obliczano względny czas retencji i względne pola powierzchni pozostałych charakterystycznych pików. Spośród 12 charakterystycznych pików rumianku pospolitego (Rys. 1), zidentyfikowano i oznaczono cztery: kwas kawowy (pik nr 4), syringowy (pik nr 5) i ferulowy (pik nr 6) oraz kwercetynę (pik nr 10), natomiast spośród 14 charakterystycznych pików próbek bzu czarnego zidentyfikowano cztery jako kwas kawowy, syringowy, mirycetyna i kwercetyna.



Rys. 1. Chromatograficzny *fingerprint* ekstraktu rumianku pospolitego przy $\lambda = 254$ nm.

W publikacjach H.4. i H.6. po raz pierwszy zastosowano program Matlab 9.1. do obliczenia wartości współczynnika podobieństwa w obrębie analizowanych próbek melisy lekarskiej i bzu czarnego. Dla melisy lekarskiej uzyskane wartości współczynnika podobieństwa mieściły się w

przedziale od 0,8939 do 0,9985, zaś współczynnik korelacji pomiędzy analizowanymi próbkami wynosił 0,96. Dla bzu czarnego wartości współczynnika podobieństwa mieściły się w przedziale od 0,7443 do 0,9589. Spośród 19 próbek melisy lekarskiej, trzy miały najniższe wartości współczynnika podobieństwa (0,8939; 0,9286 i 0,9293), co świadczy o odróżniającym się składzie chemicznym tychże surowców względem pozostałych. W przypadku bzu czarnego, próbki były jeszcze w większym stopniu zróżnicowane pomiędzy sobą. W publikacji **H.3.**, wykonanej we współpracy z Katedrą Biofarmacji i Farmakodynamiki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, zastosowano metodę nadzorowanego wyrównania pików (SA – *Supervised Alignment*), gdyż podczas analizy następuje niewielkie przesunięcie ich czasów retencji (Rys. 2). W pracy przedstawiono chromatogramy próbek przed i po wyrównaniu pików, oraz obliczono podobieństwo pomiędzy próbkami rumianku pospolitego dla tych dwóch przypadków. Wartości podobieństwa mieściły się w granicach 0,834-0,976 przed i 0,868-0,990 po wyrównaniu pików. Wartości te pokazują niewielkie różnice w składzie chemicznym pomiędzy próbkami rumianku pospolitego.



Rys. 2. Chromatogramy ekstraktów rumianku pospolitego (A) przed wyrównaniem i (B) po wyrównaniu pików.

Zastosowanie analizy *fingerprint* w powyższych badaniach pozwoliło na oszacowanie jakości analizowanych roślinnych surowców leczniczych. Zarówno warunki procesu ekstrakcji, jak i procedury analizy chromatograficznej zostały tak zoptymalizowane, aby uzyskać jak najwięcej

pików dobrze rozdzielonych i o dużych polach powierzchni. Analiza podobieństwa, którą zastosowano w badaniach wskazała, na podstawie profilu chromatograficznego próbek, w jakim stopniu analizowane surowce są do siebie podobne pod względem składu chemicznego. Duże wartości współczynników podobieństwa świadczą o niskim zróżnicowaniu próbek w obrębie tego samego rodzaju surowców roślinnych.

- 5.2. Oznaczenie zawartości wybranych związków polifenolowych w handlowych produktach roślinnych z wykorzystaniem uprzednio zoptymalizowanej i zwalidowanej techniki HPLC (publikacje **H.1.**, **H.2.**, **H.3.**, **H.4.**, **H.5.**, **H.6.** i **H.7.**).

Całkowitą zawartość polifenoli (TPC), flawonoidów (TFC) oraz kwasów fenolowych (TPAC) oznaczono w handlowych produktach czystka siwego (publikacja **H.1.**) i bzu czarnego (publikacja **H.2.**), przy czym w przypadku wodnych i wodno-metanolowych wyciągów z czystka siwego dodatkowo oznaczono także zawartość kwasu L-(+)askorbinowego (AA). Badania wykazały, że w porównaniu z wodno-metanolowymi ekstraktami czystka siwego, jego wodne ekstrakty odznaczają się nieznacznie wyższymi wartościami TPC, TFC, TPAC i AA. Stwierdzono ponadto, że ekstrakty sporządzone z suplementów diety zawierających czystka siwego, niezależnie od użytego rozpuszczalnika, są najuboższe w związki polifenolowe (publikacja **H.1.**). W pracy wykorzystano ponadto analizę korelacji w celu zbadania relacji pomiędzy TPC, TFC, TPAC i AA. Uzyskane dane wskazały na wysoką, dodatnią ($r > 0,90$) korelację pomiędzy TPC a TPAC w wodnych ekstraktach czystka siwego, oraz w układzie par TFC-AA i TPAC-AA w wodno-metanolowych ekstraktach. W przypadku ekstraktów z bzu czarnego, całkowita zawartość polifenoli zmieniała się w zależności od części morfologicznej rośliny. I tak wodne ekstrakty sporządzone z kwiatostanów bzu czarnego charakteryzowały się wyższymi wartościami TPC, TFC i TPAC niż ekstrakty z jego owoców (publikacja **H.2.**).

Zawartości najbardziej rozpowszechnionych w surowcach roślinnych kwasów fenolowych i flawonoidów oznaczono techniką HPLC wyposażoną w detektor UV/Vis. W przypadku melisy lekarskiej oznaczono kwasy fenolowe, takie jak galusowy, chlorogenowy, kawowy, syryngowy, ferulowy i rozmarynowy (publikacja **H.6.**). Uzyskane wyniki wskazały, które z kwasów fenolowych występują w najwyższych ilościach, a które w najniższych. I tak, melisa lekarska okazała się być bogata w kwas rozmarynowy, podczas gdy kwasy galusowy i chlorogenowy występowały w niskim stężeniu. Oprócz wyżej wymienionych kwasów fenolowych, w handlowych produktach bzu czarnego (publikacje **H.2.** i **H.4.**) i rumianku pospolitego (**H.3.**), oraz naparach, nalewkach i metanolowych ekstraktach melisy lekarskiej (**H.5.**) oznaczono dodatkowo kwas *p*-kumarowy oraz flawonoidy, takie jak rutyna, mirycetyna, kwercetyna oraz

kemferol. Surowce te odznaczały się wysoką zawartością flawonoidów w porównaniu z kwasami fenolowymi. Wodne ekstrakty kwiatostanów i owoców bzu czarnego różniły się istotnie statystycznie pod względem zawartości kwasu *p*-kumarowego, rutyny, kwercetyny i kemferolu, przy czym kwiatostany były bogatsze w mirycetynę, kwas chlorogenowy i *p*-kumarowy, podczas gdy owoce bzu czarnego charakteryzowały się wyższym stężeniem kwercetyny, rutyny, kemferolu i kwasu galusowego (publikacja **H.2.**). Metanolowe ekstrakty bzu czarnego zawierały niskie stężenia związków polifenolowych (publikacja **H.4.**), przy czym kwas kawowy oznaczono w najniższych stężeniach, zaś kemferol w najwyższych. Wodno-metanolowe ekstrakty rumianku pospolitego odznaczały się wysoką zawartością kwasu syringowego i kwercetyny, zaś niską kwasu galusowego i *p*-kumarowego oraz rutyny (publikacja **H.3.**). Ponadto, na podstawie analizy współczynników korelacji stwierdzono, iż pomiędzy kwasami kawowym i ferulowym a syringowym oraz mirycetyną i kwercetyną występuje dodatnia korelacja ($r > 0,7$). W przypadku wodnych, wodno-etanolowych i metanolowych ekstraktów melisy lekarskiej (publikacja **H.5.**), najbogatsze w związki polifenolowe okazały się metanolowe ekstrakty, zaś nalewki (wodno-etanolowe ekstrakty) zawierały najniższe stężenia analizowanych związków (poniżej 550 $\mu\text{g/g}$ suchej masy). Także i w tych badaniach zastosowano analizę korelacji, która wykazała zależności pomiędzy analizowanymi związkami. Najwyższe, dodatnie korelacje stwierdzono dla par kwasów: chlorogenowy – *p*-kumarowy, chlorogenowy – syringowy, chlorogenowy – kawowy oraz kawowy – *p*-kumarowy ($r > 0,7$). Istotne statystyczne, jednakże ujemne korelacje znaleziono dla par związków: kemferol – kwas kawowy i kemferol – kwas *p*-kumarowy ($r < -0,4$)

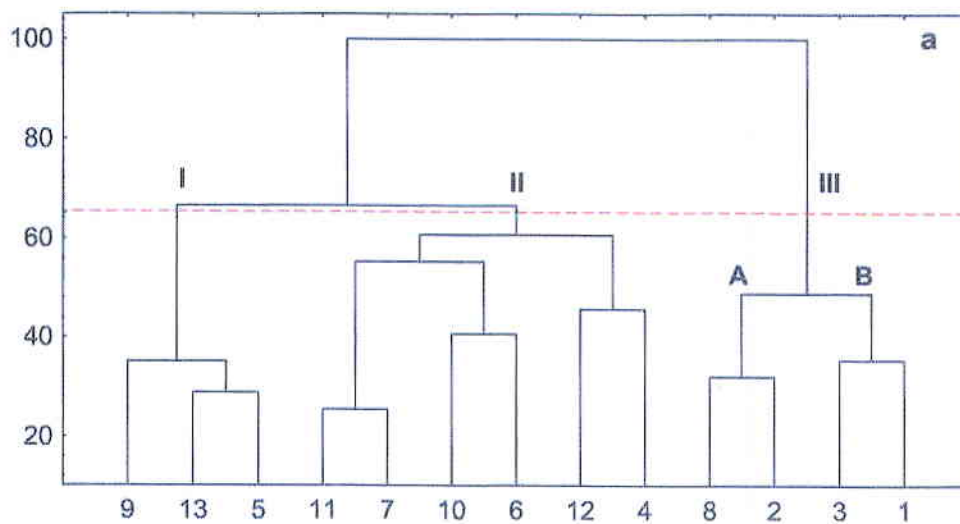
Ostatnio na rynku polskim pojawiło się dużo handlowych produktów czystka siwego. Jest to jeden z gatunków należących do rodziny czystkowatych (Cistaceae), odznaczający się wysoką zawartością związków polifenolowych. Ze względu na dużą popularność tych produktów, postanowiono określić w nich zawartość związków fenolowych (publikacja **H.1.**). Badano 15 handlowych produktów czystka siwego, wśród których trzy stanowiły suplementy diety, zaś pozostałe były przeznaczone do użycia jako herbatki. Z tego materiału roślinnego przygotowano wodne i wodno-metanolowe ekstrakty, a następnie za pomocą techniki HPLC zidentyfikowano i oznaczono ilościowo kwasy fenolowe (galusowy, chlorogenowy, kawowy, wanilinowy, syringowy, *p*-kumarowy, ferulowy i elagowy) oraz flawonoidy (rutynę, mirycetynę, kwercetynę, izokwercetynę, kemferol i glukozyd-7-luteoliny). Uzyskane wyniki wskazały na różnice w zawartości związków fenolowych w badanych próbkach w zależności od użytego do ekstrakcji rozpuszczalnika. Wodne ekstrakty czystka siwego były bogate w izokwercetynę, kwercetynę i mirycetynę, ich zawartość wynosiła ponad 800 $\mu\text{g/g}$ suchej masy. Stwierdzono niskie stężenia kwasu elagowego i *p*-kumarowego, natomiast stężenia kwasów chlorogenowego, ferulowego i

syryngowego znajdowały się poniżej granicy oznaczalności stosowanej metody. Z kolei wodno-metanolowe ekstrakty czystka siwego odznaczały się wysoką zawartością kwasów ferulowego i kawowego oraz rutyny i glukozydu-7-luteoliny, natomiast kemferol i kwas wanilinowy występowały w niskich stężeniach, poniżej 100 µg/g suchej masy.

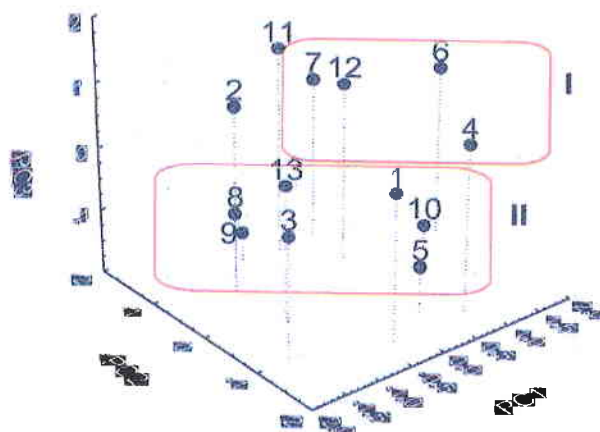
Do interpretacji uzyskanych danych wykorzystano jednowymiarową analizę wariancji (ANOVA), która pozwoliła wskazać parametry różnicujące próbki. W przypadku bzu czarnego, za pomocą analizy wariancji sprawdzono czy konsystencja (część próbek była paczkowana w formie sypkiej, a część w postaci saszetek) i miejsce pochodzenia (surowce pochodziły z Polski i Serbii), wpływają istotnie na skład chemiczny handlowych produktów bzu czarnego (publikacja **H.2.**). Przeprowadzone obliczenia potwierdziły wpływ tych czynników. Biorąc pod uwagę konsystencję, próbki różniły się istotnie statystycznie pod względem zawartości kwasu kawowego ($p = 0,002143$) i *p*-kumarowego ($p = 0,0122276$), natomiast ze względu na pochodzenie próbek bzu czarnego, istotne statystycznie różnice dotyczyły stężenia mirycetyny ($p = 0,021365$). W przypadku próbek rumianku pospolitego, wzięto pod uwagę takie czynniki, jak kolor próbek, ich konsystencję, miejsce pochodzenia oraz zawartość związków fenolowych (publikacja **H.3.**), zaś dla metanolowych ekstraktów bzu czarnego wzięto pod uwagę dystrybutora (publikacja **H.4.**). Analiza wariancji wskazała na brak istotnie statystycznych różnic zarówno w obrębie próbek rumianku pospolitego, jak i bzu czarnego. W celu potwierdzenia różnic pomiędzy próbkami, wynikających z zawartości związków fenolowych, wykorzystano analizę głównych składowych (*Principal Component Analysis*) oraz analizę klasterową (*Cluster Analysis*). Macierz danych w obu metodach stanowiła zawartość oznaczonych związków fenolowych. Na podstawie wyników obliczeń przeprowadzonych za pomocą analizy głównych składowych, próbki czystka siwego zostały podzielone na dwie grupy (publikacja **H.1.**). W pierwszej grupie znajdowały się próbki o niskiej zawartości związków fenolowych, zaś drugą grupę stanowiły próbki o wysokiej zawartości polifenoli. Ponadto, próbki znajdujące się w drugiej grupie zostały zróżnicowane pod kątem miejsca pochodzenia. I tak próbki czystka siwego pochodzące z Albanii stanowiły jedną podgrupę, zaś z Turcji i Cypru drugą. Podobny rozkład próbek czystka siwego, uwarunkowany zawartością związków fenolowych, uzyskano na podstawie wyników analizy klasterowej. W przypadku próbek melisy lekarskiej (publikacja **H.6.**), analiza głównych składowych zróżnicowała je nie tyle pod względem zawartości związków fenolowych, co z uwagi na wartości współczynnika podobieństwa charakteryzującego poszczególne próbki. Wyodrębniono trzy główne skupienia - A, B i C. Skupienie B obejmowało próbki o największym współczynniku podobieństwa, podczas gdy skupienia A i C zawierały próbki o wartościach współczynnika podobieństwa nieznacznie różniących się (0,8939-0,9364).

Dane uzyskane dla wodno-metanolowych ekstraktów rumianku pospolitego (publikacja **H.3.**) poddano analizie głównych składowych. W obliczeniach uwzględniono A) pola powierzchni wszystkich pików na chromatogramach próbek przed ich wyrównaniem (tzw. *raw data*), B) pola powierzchni wszystkich pików na chromatogramach po ich wyrównaniu (tzw. *aligned data*), C) pola powierzchni 12 charakterystycznych pików oraz D) zawartość związków fenolowych. Wyniki analizy wskazały, iż tylko zawartość związków fenolowych umożliwiła grupowanie się próbek rumianku pospolitego. I tak, próbki o wysokich stężeniach związków fenolowych grupowały się w tym samym klasterze, zaś próbki o niskich stężeniach tworzyły drugą grupę. W celu uwiarygodnienia wyników analizy głównych składowych przeprowadzono także analizę klasterową, biorąc do obliczeń te same dane. Analiza klasterowa potwierdziła wyniki otrzymane metodą analizy głównych składowych.

Analizę głównych składowych oraz analizę klasterową przeprowadzono także dla danych uzyskanych dla metanolowych ekstraktów bzu czarnego (publikacja **H.4.**). W obliczeniach uwzględniono zawartość oznaczonych związków polifenolowych. Analiza klasterowa (Rys. 3a) podzieliła próbki bzu czarnego na trzy grupy. W pierwszej grupie znajdowały się próbki o niskich wartościach współczynnika podobieństwa, ubogie w związki polifenolowe. Grupę drugą natomiast stanowiły próbki o wysokich wartościach współczynnika podobieństwa, bogate w związki polifenolowe. Analiza głównych składowych potwierdziła te wyniki (Rys. 3b).



b



Rys. 3. Dendogram (a) oraz wykres PC1, PC2 i PC3 (b) dla metanolowych ekstraktów bzu czarnego.

Zajmując się oznaczaniem związków polifenolowych, szczególnie ważnym zagadnieniem okazał się sposób przygotowania próbek roślinnych do analizy i wybór metody analitycznej. Wiedzę zdobytą w tym zakresie wykorzystałam opracowując pracę przeglądową na temat metod ekstrakcji i technik oznaczania kwasów fenolowych w materiale roślinnym (publikacja H.7). Dane literaturowe wskazały, że ekstrakcja w aparacie Soxhleta oraz ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami są często stosowane podczas izolacji związków polifenolowych z materiału roślinnego, jednakże w ostatnim czasie ekstrakcja dwutlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym (SFE - *supercritical fluid extraction*) i przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem (ASE - *accelerated solvent extraction*) znajdują szersze zastosowanie. Spośród metod instrumentalnych, do analizy ilościowej kwasów fenolowych najczęściej wykorzystywana jest technika chromatografii cieczowej (LC - *liquid chromatography*) i gazowej (GC - *gas chromatography*), obie techniki połączone ze spektrometrią mas, oraz elektroforeza kapilarna (CE - *capillary electrophoresis*). Ta ostatnia technika wyróżnia się krótkim czasem analizy i małą objętością elektrolitów, ponadto umożliwia analizę z wykorzystaniem detektorów UV, MS i amperometrycznego.

5.3. Ocena aktywności przeciwutleniającej i przeciwbakteryjnej wybranych handlowych produktów roślinnych (publikacje H.1., H.2. i H.3.).

W pracach H.1., H.2. i H.3. przedstawiono wyniki badań nad aktywnością przeciwutleniającą handlowych produktów czystka siwego (*Cistus incanus* L.), bzu czarnego (*Sambucus nigra* L.) i

rumianku pospolitego (*Matricaria chamomilla* L.). Oceniając aktywność przeciwutleniającą wykorzystano dwa testy - z użyciem odczynnika DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) oraz na podstawie zdolności redukcji jonów żelaza (FRAP). Test DPPH przeprowadzono w oparciu o zmodyfikowaną metodę Tuberoso i wsp. (2010), zaś test FRAP wykonano według metody Benzie i Strain'a (1996). W obu przypadkach korzystano z krzywej kalibracji, a uzyskane wyniki przeliczono na Troloks (metoda DPPH) lub żelazo(II) (metoda FRAP). Publikacja **H.1.** zawiera wyniki oceny aktywności przeciwutleniającej 15 wodno-metanolowych i 15 wodnych ekstraktów przygotowanych z handlowych produktów czystka siwego. Badania wykazały, iż wodno-metanolowe ekstrakty wyróżniają się większą aktywnością przeciwutleniającą, podczas gdy analiza wariancji wskazała, iż miejsce pochodzenia próbek czystka siwego jest głównym czynnikiem różnicującym je pod względem tej aktywności. Spośród 15 handlowych produktów czystka siwego, trzy stanowiły suplementy diety odznaczające się niską zawartością związków fenolowych oraz niską aktywnością przeciwutleniającą. Potwierdza to analiza korelacji, która wskazała na dużą współzależność pomiędzy właściwościami przeciwutleniającymi, a całkowitą zawartością polifenoli, flawonoidów i kwasów fenolowych ($r > 0,61$).

Poza określeniem właściwości przeciwutleniających, wodne ekstrakty czystka siwego badano także pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej. Badania przeprowadzono we współpracy z Katedrą i Zakładem Mikrobiologii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Najniższe stężenie hamujące (*Minimal Inhibitory Concentration* – MIC) oznaczono za pomocą techniki seryjnych rozcieńczeń. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż wodne ekstrakty czystka siwego wykazują aktywność przeciwbakteryjną, zwłaszcza wobec bakterii gram dodatnich - *Staphylococcus aureus* (wartości MIC w granicach od 0,5 do 8 mg/ml) i *Staphylococcus epidermidis* (wartości MIC w granicach od 0,25 do 4 mg/ml). W przypadku aktywności przeciwgrzybiczej, napary słabo działają hamująco na wzrost *Candida albicans* i *Candida glabrata* (publikacja **H.1.**).

Testy DPPH i FRAP przeprowadzono również dla naparów sporządzonych z 24 próbek bzu czarnego, przy czym 11 próbek stanowiły owoce bzu czarnego, zaś 13 jego kwiatostany (publikacja **H.2.**). Te ostatnie odznaczały się silniejszymi właściwościami antyoksydacyjnymi (DPPH i FRAP). Z kolei publikacja **H.3.** przedstawia wyniki badań nad aktywnością przeciwutleniającą 19 wodno-metanolowych ekstraktów z rumianku pospolitego. Również w tym przypadku, wysokie wartości DPPH i FRAP otrzymano dla próbek o bogatym składzie związków fenolowych.

W publikacjach **H.2.** i **H.3.** zastosowano analizę korelacji w celu określenia zależności pomiędzy wartościami testów DPPH i FRAP. Zarówno w przypadku ekstraktów z kwiatów, jak i z owoców bzu czarnego (publikacja **H.2.**), stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy całkowitą

zawartością polifenoli, a wartościami DPPH i FRAP, przy czym w ekstraktach z kwiatów bzu czarnego potwierdzono korelację pomiędzy całkowitą zawartością flawonoidów, a wartościami DPPH i FRAP. Również w ekstraktach z owoców bzu czarnego stwierdzono korelacje pomiędzy wartościami DPPH a kwercetyną oraz kwasem kawowym i *p*-kumarowym. Wysokie i dodatnie wartości współczynników korelacji pomiędzy wartościami DPPH i FRAP a zawartością związków fenolowych, takich jak kwasy kawowy, syringowy i ferulowy oraz mirycetyna i kwercetyna, otrzymano w przypadku ekstraktów rumianku pospolitego (publikacja H.3.). Ponadto, stwierdzono również wysoką korelację pomiędzy wartościami DPPH i FRAP ($r = 0,86$).

5.4. Walidacja metod analitycznych stosowanych w badaniach zawartości związków polifenolowych (publikacje H.1., H.2., H.3., H.4., H.5. i H.6.).

W celu potwierdzenia poprawności metod analitycznych wykorzystanych w badaniach przeprowadzono ich pełną walidację zgodnie z wytycznymi ICH (2005). Wyznaczono parametry walidacyjne, takie jak liniowość, zakres metody, granice wykrywalności i oznaczalności, specyficzność, precyzję i dokładność. Testy walidacyjne wykazały, że metody użyte w badaniach są precyzyjne, dokładne oraz umożliwiają oznaczenie zawartości analitów w granicach stężeń, w jakich występują w badanych surowcach roślinnych.

6. Podsumowanie wyników badań stanowiących podstawę habilitacji

Celem przedstawionych powyżej badań, stanowiących przedmiot mojej rozprawy habilitacyjnej, której wyniki zostały opublikowane w pracach H.1.-H.7., była ocena jakości handlowych produktów roślinnych z wykorzystaniem chromatograficznej analizy *fingerprint* oraz analizy ilościowej związków fenolowych w tychże produktach. Dodatkowo wykonano także badania aktywności biologicznej ekstraktów przygotowanych z badanych produktów roślinnych, tj. oznaczono właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze ekstraktów. Materiał do badań stanowiły popularne na rynku farmaceutycznym i zielarskim produkty melisy lekarskiej (*Melissa officinalis* L.), bzu czarnego (*Sambucus nigra* L.), rumianku pospolitego (*Matricaria chamomilla* L.) oraz czystka siwego (*Cistus incanus* L.).

Najważniejsze osiągnięcia poznawcze ww. cyklu publikacji to:

- Wykazanie, że lecznicze surowce roślinne odznaczają się silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi i są bogatym źródłem związków polifenolowych. Związki te wykazują szereg właściwości prozdrowotnych, a badania naukowe potwierdzają, że spożywanie

produktów roślinnych zasobnych w te związki wspomaga walkę z najczęściej występującymi chorobami cywilizacyjnymi.

- Dowiedzenie, iż chromatograficzna analiza *fingerprint* stanowi element kontroli jakości produktów roślinnych. W wyniku analizy *fingerprint* otrzymano profile chromatograficzne produktów handlowych melisy lekarskiej, bzu czarnego oraz rumianku pospolitego. W przypadku próbek melisy, profile HPLC tych surowców nie różniły się między sobą. Przeprowadzona analiza podobieństwa potwierdziła ten fakt (wartości współczynników podobieństwa były bliskie jedności), co świadczy o podobnym składzie chemicznym tychże produktów. Taka sama sytuacja wystąpiła w przypadku handlowych produktów rumianku pospolitego i bzu czarnego.
- Udokumentowanie silnych korelacji pomiędzy aktywnością antyoksydacyjną, a zawartością związków fenolowych. Zasadniczo, im większe są stężenia związków fenolowych w surowcu roślinnym, tym surowiec wykazuje wyższą aktywność antyoksydacyjną.
- Określenie właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych wodnych ekstraktów przygotowanych z handlowych produktów czystka siwego (*Cistus incanus* L.). Otrzymane wyniki potwierdziły właściwości przeciwbakteryjne wodnych ekstraktów czystka siwego, szczególnie wobec bakterii gram dodatnich, oraz słabe właściwości przeciwgrzybicze tychże ekstraktów. W przypadku suplementów diety zawierających czystka siwego, ich właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze okazały się słabsze niż handlowych produktów czystka przeznaczonych do sporządzania herbatek.
- Zoptymalizowanie warunków ekstrakcji i techniki rozdzielczej HPLC w celu opracowania metod oznaczenia związków fenolowych w ekstraktach sporządzonych z powszechnie dostępnych i popularnych wśród konsumentów produktów handlowych badanych surowców roślinnych.

Wyniki przeprowadzonych badań poszerzają wiedzę na temat zawartości związków fenolowych w handlowych produktach melisy lekarskiej (*Melissa officinalis* L.), bzu czarnego (*Sambucus nigra* L.), rumianku pospolitego (*Matricaria chamomilla* L.) oraz czystka siwego (*Cistus incanus* L.). Ponadto, współpracując z innymi zespołami badawczymi, wykazano działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze naparów z czystka siwego (*Cistus incanus* L.).

7. Piśmiennictwo

- Alqurashi R.M., Galante L.A., Rowland I.R., Spencer J.P.E., Commane D.M. Consumption of a flavonoid-rich açai meal is associated with acute improvements in vascular function and a reduction in total oxidative status in healthy overweight men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2016, 104, 1227-1235.
- Alves M.J., Ferreira I.C.F.R., Froufe H.J.C., Abreu R.M.V., Martins A., Pintado M. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 115, 346-357.
- Arima H., Ashida H., Danno G.I. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2002, 66, 1009-1014.
- Asensi M., Ortega A., Mena S., Feddi F., Estrela J.M. Natural polyphenols in cancer therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2011, 48, 197-216.
- Bahadoran Z., Mirmiran P., Azizi F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 2013, 12, 1-9.
- Beking K., Vieira A. Flavonoid intake and disability-adjusted life years due to Alzheimer's and related dementias: a population-based study involving twenty-three developed countries. *Public Health Nutrition*, 2010, 13, 1403-1409.
- Benzie I.F., Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239, 70-76.
- Biesaga M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218, 2505-2512.
- Boubakeur B., Tirtouil A., Meddah B., Khadem H. The evaluation of the effect of synthetic flavonoids on growth of pathogenic and probiotic bacteria. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2015, 7, 228-236.
- Carocho M., Ferreira I.C.F.R. The role of phenolic compounds in the fight against cancer – a review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2013, 13, 1236-1258.
- Castell M., Perez-Cano F.J., Abril-Gil M., Franch A. Flavonoids on allergy. *Current Pharmaceutical Design*, 2014, 20, 973-987.
- Chatterjee N.S., Panda S.K., Navitha M., Asha K.K., Anandan R., Mathew S. Vanillic acid and coumaric acid grafted chitosan derivatives: improved grafting ratio and potential application in functional food. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52, 7153-7162.
- Cheng J.C., Dai F., Zhou B., Yang L., Liu Z.L. Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: mechanism and structure-activity relationship. *Food Chemistry*, 2007, 104, 132-139.

- Choi S.M., Kim B.C., Cho Y.H., Chang J., Park M.S., Kim J.K. Effects of flavonoids compounds on β -amyloid-peptide-induced neuronal death in cultured mouse cortical neurons. *Chonnam Medical Journal*, 2014, 50, 45-51.
- Daglia M., Di Lorenzo A., Nabavi S.F., Talas Z.S., Nabavi S.M. Polyphenols: well beyond the antioxidant capacity: gallic acid and related compounds as neuroprotective agents: you are what you eat! *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2014, 15, 362-372.
- De Kok T.M., Van Breda S.G., Manson M.M. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds. *European Journal of Nutrition*, 2008, 47, 51-59.
- Dejaegher B., Alaerts G., Mathijs N. Methodology to develop liquid chromatographic fingerprints for the quality control of herbal medicines. *Acta Chromatographica*, 2010, 22, 237-258.
- Dumarey M., Smets I., Vander Heyden Y. Prediction and interpretation of the antioxidant capacity of green tea from dissimilar chromatographic fingerprints. *Journal of Chromatography B*, 2010, 878, 2733-2740.
- Eom S.H., Kang S.K., Lee D.S., Myeong J.I., Lee J., Kim H.W., Kim K.H., Je J.Y., Jung W.K., Kim Y.M. Synergistic antibacterial effect and antibacterial action mode of chitosan-ferulic acid conjugate against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26, 784-789.
- Fantini M., Benvenuto M., Masuelli L., Frajese G.V., Tresoldi I., Modesti A., Bei R. *In vitro* and *in vivo* antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment. *The International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16, 9236-9282.
- Fresco P., Borges F., Marques M.P.M., Diniz C. The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis. *Current Pharmaceutical Design*, 2010, 16, 114-134.
- Helena S.A., Ferreira I.C.F.R., Ćirić A., Glamočlija J., Martins A., Queiroz M.J.R.P., Soković M. Coprinopsis atramentaria extract, organic acids, 25 synthesized glucuronated and methylated derivatives as antibacterial and antifungal agents. *Food & Function*, 2014, 5, 2521-2528.
- ICH (2005). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. International Conference on Harmonisation, Q2(R1).
http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UC_073384.pdf.
- Itoh A., Isoda K., Kondoh M., Kawase M., Watari A., Kobayashi M., Tamesada M., Yagi K. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl₄-induced liver injury. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2010, 33, 983-987.
- Kampa M., Nifli A.P., Notas G., Castanas E. Polyphenols and cancer cell growth. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 2007, 159, 79-113.

- Kelly K. *History of medicine*. New York: Facts on file, 2009, 29-50.
- Khan N., Afaw F., Mukhtar H. Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2008, 10, 475-510.
- Kim K., Kim K., Ryu J.H., Lee H. Chitosan-catechol: a polymer with long-lasting mucoadhesive properties. *Biomaterials*, 2015, 52, 161–170.
- Kim Y.J. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 30, 1052-1055.
- Lall R.K., Syed D.N., Adhami V.M., Khan M.I., Mukhtar H. Dietary polyphenols in prevention and treatment of prostate cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16, 3350–3376.
- Lambert J.D., Elias R.J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: aroleincancer prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010, 501, 65–72.
- Li Y., Zhu J., Wan L., Yu Q., Li X., Cheng Z., Guo C. Combinative method using HPLC fingerprint and quantitative analyses for quality consistency evaluation of an herbal medicinal preparation produced by different manufactures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, 52, 597-602.
- Matejczyk M., Swisłocka R., Golonkob A., Lewandowski W., Hawrylika E. Cytotoxic, genotoxic and antimicrobial activity of caffeic and rosmarinic acids and their lithium, sodium and potassium salts as potential anticancer compounds. *Advances in Medical Sciences*, 2018, 63, 14–21.
- Maurya D.K., Paul T., Devasagayam A. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48, 3369–3373.
- Molinari G. Natural products in drug discovery: present status and perspectives. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2009, 655, 13-27.
- Ono K., Li L., Tsaksmura Y., Yoshiike Y., Zhu L., Han F., Yamada M. Phenolic compounds prevent amyloid β -protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287, 14631-14643.
- Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2008, 52, 507–526.
- Roleira F.M., Tavares-da-Silva E.J., Varela C.L., Costa S.C., Silva T., Garrido J., Borges F. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. *Food Chemistry*, 2015, 183, 235–258.
- Skrovankova S., Misurcova L., Machu L. Antioxidant activity and protecting health effects of common medicinal plants. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2012, 67, 75-124.
- Srinivasan M., Sudheer A.R., Menon V.P. Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2007, 40, 92–100.

- Tabrez S., Priyadarshini M., Urooj M., Shakil S., Ashraf G.M., Khan M.S., Kamal M.A., Alam Q., Jabir N.R., Abuzenadah A.M., Chaudhary A.G., Damanhour G.A. Cancer chemoprevention by polyphenols and their potential application as nanomedicine. *Journal of Environmental Science and Health*, 2013, 31, 67-98.
- Terao J. Factors modulating bioavailability of quercetin-related flavonoids and the consequences of their vascular function. *Biochemical Pharmacology*, 2017, 139, 15-23.
- Thorwald J. *Power and knowledge of ancient physicians*. Zagreb: August Cesarec, 1991, 10-255.
- Tuberoso C.I.G., Rosa A., Bifulco E., Melis M.P., Atzeri A., Pirisi F.M., Dessì M.A. Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts. *Food Chemistry*, 2010, 123, 1242-1251.
- Wang Y., Chen S., Yu O. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2011, 9, 949-956.
- Wu W.M., Lu L., Long Y., Wang T., Liu L., Chen Q., Wang R. Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: a structure-activity insight. *Food Chemistry*, 2007, 105, 107-115.
- Zamora-Ros R., Farouhi N.G., Sharp S.J., Gonzalez C.A., Buijessse B., Guevara M., Wareham N.J. Dietary intakes of individual flavanols and flavonols are inversely associated with incident type 2 diabetes in European populations. *Journal of Nutrition*, 2014, 144, 335-343.

Agnieszka Viapiana

ADIUNKT

dr n.farm. Agnieszka Viapiana