

1. Imię i Nazwisko: Lena Daria Ruzik

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

10.2007 Uzyskanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk chemicznych w dyscyplinie chemia

Rozprawa doktorska pt. *"Badanie transportu miedzi(II) przez membrany modelujące warstwę rogową naskórka"*, wyróżniona przez Radę Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej. Opiekun pracy - prof. PW dr hab. inż. Mirosław Mojski

2003 – 2007 Studia doktoranckie w dziedzinie chemii analitycznej, Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny

2002 – 2003 Studium pedagogiczne na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej

1998-2003 Studia magisterskie na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej (kierunek: technologia chemiczna, specjalność: materiały i technologie przyjazne środowisku).

Praca magisterska wykonana w Zakładzie Chemii Fizycznej pt. *„Wpływ anionów soli 1,3-dialkiloimidazoli na właściwości cieczy jonowych i ich oddziaływań z rozpuszczalnikami”*. Opiekun pracy - prof. dr hab. inż. Urszula Domańska-Żelazna

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Wydział Chemiczny Politechniki Warszawskiej - adiunkt (od grudnia 2007)

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Jednotematyczny cykl publikacji pt.:

„Analiza specjacyjna i ocena bioprzyswajalności metali i metaloidów występujących w żywności pochodzenia naturalnego”

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

* autor korespondencyjny

- ❖ [H1] E. Lipiec, **L. Ruzik**, Y. Zhou, M. Jarosz, K. Połec-Pawlak*, *Study of chicken egg protein influence on bioavailability of vitamin B12 by SEC-ICP MS and ESI MS*, J. Anal. Atom. Spectrom., 26 (2011) 608-612

Mój udział w tej pracy polegał na udziale w opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części doświadczeń, współpracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu części tekstu do opublikowania.

Mój wkład określam na 40%

IF(2011) = 3,220; CI= 9

- ❖ [H2] **L. Ruzik***, *Speciation of challenging elements in food by atomic spectrometry*, Talanta, 93 (2012) 18-31

Mój wkład polegał na przygotowaniu i napisaniu całego tekstu.

Mój wkład określam na 100%

IF(2012) = 3,498; CI= 22

- ❖ [H3] E. Lipiec, O. Warowicka, **L. Ruzik***, Y. Zhou, M. Jarosz, K. Pawlak, *Investigation of iodine bioavailability from chicken eggs versus iodized kitchen salt with in vitro method*, Eur. Food Res. Tech., 234 (2012) 913-919

Mój udział w tej pracy polegał na wiodącym udziale w opracowaniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu doświadczeń, współpracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu części tekstu do opublikowania oraz korespondencji z redaktorem.

Mój wkład określam na 50%

IF(2012) = 1,436; CI= 8

- ❖ [H4] J. Rybak, **L. Ruzik***, *Application of chromatography and mass spectrometry to the characterization of cobalt, copper, manganese and molybdenum in Morinda Citrifolia*, J. Chromatogr. A, 1281 (2013) 19-25

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu doświadczeń, tekstu do opublikowania oraz korespondencji z redaktorem.

Mój wkład określam na 90%

IF(2013) = 4,258; CI= 10

- ❖ [H5] J. Wojcieszek, K. Witkoś, **L. Ruzik**, K. Pawlak*, *Comparison of copper and zinc in vitro bioaccessibility from cyanobacteria rich in proteins and a synthetic supplement containing gluconate complexes: LC-MS mapping of bioaccessible copper complexes*, Anal. Bioanal. Chem., 408 (2016) 785-795

Mój udział w tej pracy polegał na przeprowadzeniu części doświadczeń, współpracowaniu otrzymanych wyników oraz przygotowaniu części tekstu i rysunków do opublikowania.

Mój wkład określam na 40%

IF(2016) = 3,431; CI= 0

- ❖ [H6] J. Wojcieszek, **L. Ruzik***, *Enzymatic extraction of copper complexes with phenolic compounds from açai (Euterpe oleracea Mart.) and bilberry (Vaccinium myrtillus L.) fruits*, Food Anal. Met., 9 (2016) 2105-2114

Mój udział w tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu doświadczeń, opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu tekstu do opublikowania oraz korespondencji z redaktorem.

Mój wkład określam na 60%

IF(2016) = 2,038; CI= 1

- ❖ [H7] J. Wojcieszek, D. Popowski, **L. Ruzik***, *Ionic liquids as a key medium for efficient extraction of copper complexes from chia seeds (Salvia hispanica L.)*, Talanta, 152 (2016) 482-488

Mój udział w tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu doświadczeń, opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu tekstu do publikacji oraz korespondencji z redaktorem.

Mój wkład określam na 60%

IF(2016) = 4,162; CI= 2

- ❖ [H8] J. Wojcieszek, P. Kwiatkowski, **L. Ruzik***, *Speciation analysis and bioaccessibility evaluation of trace elements in goji berries (Lycium Barbarum, L.)*, J. Chromatogr. A, 1492 (2017) 70-78

Mój udział w tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu doświadczeń, opracowaniu otrzymanych wyników, przygotowaniu tekstu do publikacji oraz korespondencji z redaktorem.

Mój wkład określam na 60%

IF(2017) = 3,716; CI= 3

- ❖ [H9] **L. Ruzik***, P. Kwiatkowski, *Application of CE-ICP-MS and CE-ESI-MS/MS for identification of Zn-binding ligands in goji berries extracts*, Talanta, 183 (2018) 102–107

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, przygotowaniu planu doświadczeń, przygotowaniu tekstu do publikacji oraz korespondencji z redaktorem.

Mój wkład określam na 85%

IF(2017) = 4,244; CI= 1

- ❖ [H10] N. Osowska, **L. Ruzik***, *New potentials in the extraction of trace metal using natural deep eutectic solvents (NADES)*, Food. Anal. Met., (2019) doi: 10.1007/s12161-018-01426-y

Mój wkład w powstawanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy, zaplanowaniu doświadczeń, przygotowaniu tekstu do publikacji oraz korespondencji z redaktorem.

Mój wkład określam na 90%

IF(2017) = 2,245, CI=0

Sumaryczny impact factor jednotematycznego cyklu publikacji wchodzącego w skład rozprawy habilitacyjnej według listy Journal Citation Reports, zgodnie z rokiem opublikowania:

IF₅ = 32,248

W **8 artykułach** z tego cyklu jestem autorem korespondencyjnym.

ResearcherID: T-1944-2018

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9184-1849>

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Żywność funkcjonalna, czyli produkty spożywcze, które wykazują korzystny wpływ na zdrowie człowieka, jest odpowiedzią producentów na poszukiwanie żywności mającej na celu wzbogacenie diety człowieka w składniki odżywcze niezbędne dla organizmu. W Polsce najczęściej wybieranymi produktami, zaliczanymi do tej kategorii, są jagody goji (*Lycium barbarum* L.), szalwia hiszpańska chia (*Salvia hispanica* L.), jagody açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), miechunka (*Physalis Peruviana* L.), jarmuż (*Brassica oleracea* L.), papaja (*Carica papaya* L.), czosnek (*Allium sativum* L.), jaja oraz algi, m.in. spirulina (*Spirulina Platensis*). Charakteryzują się one dużą zawartością przeciwutleniaczy, nienasyconych kwasów tłuszczowych, białek, błonnika pokarmowego, niezbędnych dla człowieka aminokwasów, jak również składników mineralnych (związki Zn, Cu, Se, I, Mn oraz Fe) oraz witamin (np. A, C, B1, B2, B6, B12).

Istotą poszukiwania nowej żywności jest nie tylko odnalezienie produktów naturalnych z dużą zawartością związków czynnych, ale również bogatych w związki, które są dobrze przyswajalne przez organizm człowieka. Badania nad bioprzyswajalnością dostarczają informacji na temat całkowitej zawartości pierwiastków i co najważniejsze, pozwalają na identyfikację związków wchłanianych przez ludzki organizm.

Pomimo dużego zainteresowania działaniem zdrowotnym mikroelementów i metali śladowych na organizm człowieka, nadal podstawowym narzędziem jego badania jest oznaczanie całkowitej zawartości metali. Z tego powodu, ważne jest poszerzenie metodologii określania bioprzyswajalności metali przez organizm człowieka. Aktualność tej problematyki potwierdza rosnąca liczba publikacji dotyczących określania bioprzyswajalności metali oraz zainteresowanie konsumentów jakością spożywanych produktów.

Problem badawczy będący przedmiotem przedkładanego cyklu publikacji dotyczy: (1) opracowania metodyk pozwalających na wydajną ekstrakcję związków metali z bioligandami z żywności pochodzenia roślinnego, jak również (2) wykorzystania technik rozdzielania w połączeniu z technikami spektrometrii mas do analizy specjacyjnej wybranych metali, pozwalającej na określenie ich bioprzyswajalności przez organizm ludzki. Badania opisane w prezentowanych publikacjach dotychczas nie były prowadzone i dotyczyły zastosowania symulacji procesu trawienia w warunkach *in vitro*, tzn. odtworzeniem procesów hydrolizy enzymatycznej zachodzącej w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego. Zaproponowane zostały nowe rozpuszczalniki ekstrahujące połączenia metali ze związkami biologicznie aktywnymi w roślinach (flawonoidy, aminokwasy itp.), odpowiedzialne za ich lepszą bioprzyswajalność. W publikacjach, po raz pierwszy, została również wykazana różnica w bioprzyswajalności metali pochodzących z produktów syntetycznych (z dużą całkowitą zawartością metali) oraz z produktów pochodzenia naturalnego.

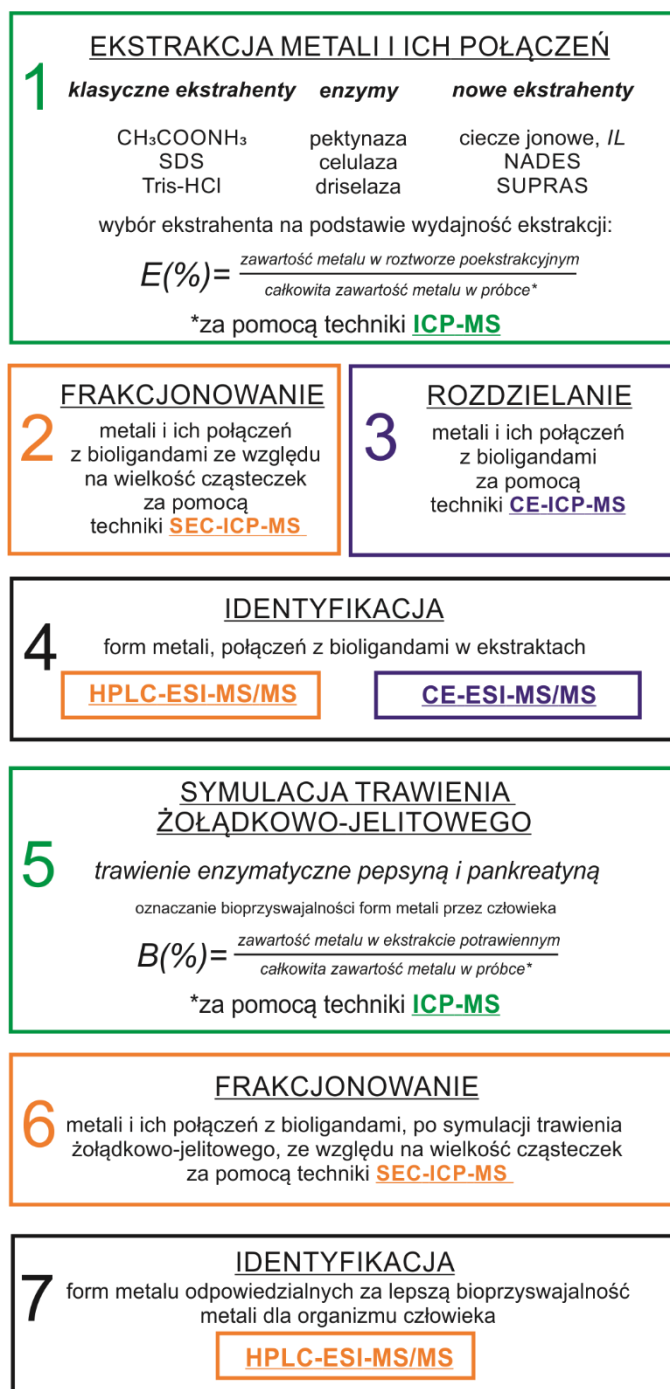
Celem moich badań, których wyniki zaprezentowałam w cyklu prac wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej pt. „*Analiza specjacyjna i ocena bioprzyswajalności metali i metaloidów występujących w żywności pochodzenia naturalnego*”, było zaproponowanie nowych, nieopisanych wcześniej rozpuszczalników stosowanych jako wydajne ekstrahenty metali połączonych z bioligandami występującymi w roślinach oraz opracowanie nowych metod analitycznych pozwalających na identyfikację form metali odpowiedzialnych za ich lepszą bioprzyswajalność przez organizm ludzki.

Cykl publikacji obejmuje prace przedstawiające wyniki badań w trzech głównych obszarach:

- ❖ poszukiwanie nowych, nieopisanych dotychczas, wydajnych ekstrahentów do wydzielania metali i metaloidów z żywności pochodzenia roślinnego [H6, H7 i H10];
- ❖ analiza specjacyjna metali i metaloidów występujących w żywności pochodzenia roślinnego. Identyfikacja połączeń metali z bioligandami [H2, H3, H4 i H9];

- ❖ określanie bioprzyswajalności wybranych metali z żywności. Identyfikacja bioligandów zwiększających przyswajalność metali przez organizm ludzki [H1, H3, H5 i H8].

Badania prowadzono zgodnie ze schematem przedstawionym na rysunku 1.



Rysunek 1 Schemat badań prowadzonych w ramach rozprawy habilitacyjnej

Poszukiwanie nowych związków wydajnie ekstrahujących metale i metaloidy z żywności pochodzenia roślinnego

Związki ekstrahujące, oprócz zdolności do wydajnej ekstrakcji wybranych analitów powinny: (1) zapewniać trwałość/niezmiennność form badanych związków podczas procesu wydajnego ługowania/ekstrakcji; (2) selektywnie ekstrahować, wydzielając ściśle zdefiniowane grupy związków o określonych właściwościach fizykochemicznych. Selektywna ekstrakcja pozwala na charakteryzowanie właściwości chemicznych kompleksów metali z ligandami, występujących w roślinach oraz na określanie stopnia związania metali w tkance. Fakt, że związki są uwalniane za pomocą „delikatnych” ekstrahentów, pozwala na badanie kompleksów, które nie ulegały rozpadowi, z użyciem selektywnych metod rozdzielania połączonych z czułymi technikami detekcyjnymi.

Badania, mające na celu znalezienie związków pozwalających na wydajną ekstrakcję metali i ich połączeń z bioligandami z żywności pochodzenia roślinnego, opierały się na oznaczaniu zawartości wybranych metali w roztworach poekstrakcyjnych za pomocą techniki ICP-MS (spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej). Ekstrakty były poddawane mineralizacji wspomaganą mikrofalowo za pomocą kwasu azotowego(V) oraz roztworu nadtlenu wodoru (30%). Korzystając ze wzoru (1) określone zostały wydajności ekstrakcji.

$$\text{wydajność ekstrakcji, } E(\%) = \frac{\text{zawartość metalu w roztworze poekstrakcyjnym}}{\text{całkowita zawartość metalu w próbce}}$$

Wzór 1. Wydajność ekstrakcji

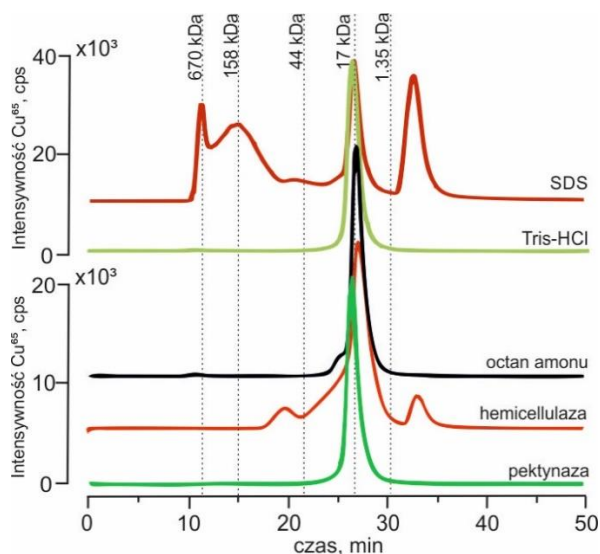
Porównane zostały profile chromatograficzne ekstraktów, otrzymane za pomocą techniki SEC-ICP-MS (chromatografii wykluczania połączonej ze spektrometrem mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie), umożliwiające wstępne frakcjonowanie związków metali z bioligandami ze względu na masę cząsteczkową rozdzielanych związków. Działanie to umożliwiło po raz pierwszy, ustalenie grupy związków odpowiedzialnych za wiązanie wybranych metali w roślinach.

W procesie ekstrakcji metali z materiałów pochodzenia roślinnego stosowano ekstrahenty o zróżnicowanych właściwościach, odpowiednich dla poszczególnych grup ekstrahowanych związków. W pierwszej kolejności była stosowana woda, podstawowy, powszechnie występujący w życiu codziennym ekstrahent związków organicznych z materiałów biologicznych. Woda ma zdolność rozpuszczania znacznej grupy substancji ze względu na tworzenie wiązań wodorowych i zjawisko hydrolizy. Grupę tę można znacznie poszerzyć, stosując w charakterze ekstrahentów roztwory wodne odpowiednich związków.

Inną klasę ekstrahentów szeroko stosowaną do wydzielenia substancji obecnych w materiale roślinnym tworzą alkohole i ich wodne roztwory. W tej grupie najczęściej używane są metanol i etanol. Ze względu na ich polarność mniejszą od wody, posiadają zdolność do oddziaływania ze związkami o bardziej zróżnicowanej polarności.

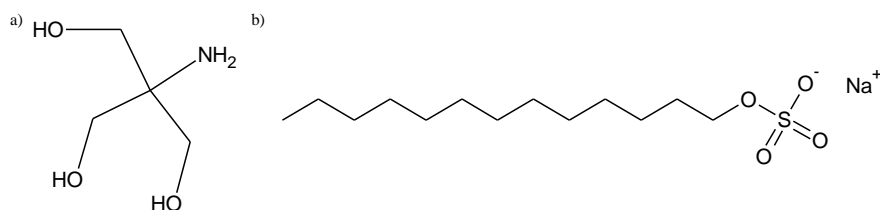
Kolejnym ekstrahentem był wodny roztwór octanu amonu – soli słabego kwasu i słabego wodorotlenku, używany do wydzielenia połączeń metali z wielocukrami i kwasami organicznymi, a także z białkami hydrofilowymi o niewielkiej masie cząsteczkowej (około 17 kDa).

W badaniach stosowana także **wodny roztwór buforowy** tris(hydroksymetylo)aminometanu (Tris) (Rysunek 3a). Tris zmienia przepuszczalność membran biologicznych, będących elementem zewnętrznym komórek (oddziaływanie opisane na przykładzie komórek bakterii *Escherichia coli*), co powoduje zwiększenie dostępu medium ekstrahującego do wnętrza komórki. Zastosowanie go pozwoliło na wyekstrahowanie połączeń metali z bioligandami występującymi wewnątrz komórki, a także hydrofilowych białek [H6].



Rysunek 2 Chromatogramy SEC-ICP-MS różnych ekstraktów czarnej jagody

W przeprowadzonych badaniach sprawdzono skuteczność działania roztworu dodecylosiarczanu sodu (SDS, SLS,) (Rysunek 3b) - **związku powierzchniowo czynnego**. Dodecylosiarczan sodu, ze względu na amfifilowy charakter, oddziałuje zarówno ze związkami polarnymi, jak i niepolarnymi [H6]. Ważną właściwością SDS w procesie ekstrakcji jest zdolność do lokalnej zmiany struktury błon fosfolipidowych komórek, dzięki czemu możliwe jest uwalnianie białek hydrofobowych do roztworu. Skutkuje to uzyskiwaniem dużych wydajności ekstrakcji frakcji białek wielkocząsteczkowych w porównaniu do omawianych poprzednio ekstrahentów. Wadą SDS jest zdolność do rozrywania wiązań niekowalencyjnych pomiędzy białkami i jonami metali. Proces ten nie zachodzi w przypadku wiązań kowalencyjnych białko - metal, np. w selenoproteinach.

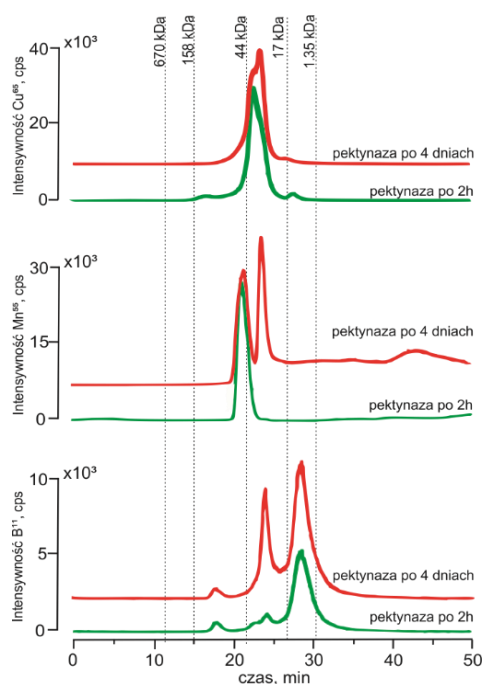


Rysunek 3 Wzory strukturalne: a) tris(hydroksymetylo)aminometan (Tris), b) dodecylosiarczan sodu (SDS)

W ekstrakcji enzymatycznej wykorzystywano aktywne białka enzymatyczne (proteazy, lipazy, glikozydazy i inne hydrolazy), które powodują rozrywanie łańcuchów białek, wielocukrów i lipidów. Umożliwia to wydajniejszą ekstrakcję analitów z matryc biologicznych. Jednym z zastosowanych **enzymów** była driselaza, której działanie enzymatyczne pozwalało na uwalnianie peptydów związanych ze ścianą komórkową owoców noni. W kolejnych badaniach, w celu degradacji struktury wielocukrów (pektyn i hemicelulozy), znajdujących się w ścianach komórkowych roślin, zastosowano inne enzymy - pektynazę i hemicelulazę [H6]. Przeprowadzone doświadczenia potwierdziły możliwość rozerwania ściany komórkowej w roślinie i poprawiły wydajność ekstrakcji jonów miedzi z jagód (Tabela 1).

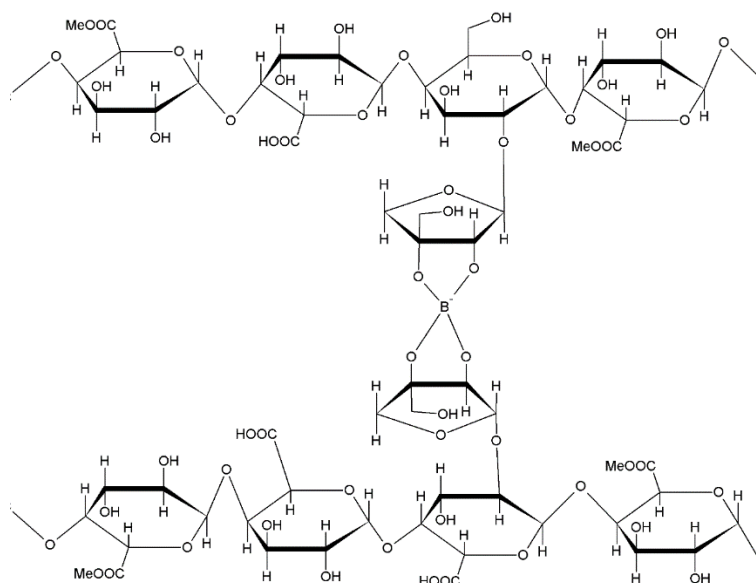
Tabela 1. Wydajności ekstrakcji prowadzonej za pomocą różnych ekstrahentów na przykładzie owoców z rodziny jagód

	czarna jagoda	jagoda acai	jagoda goji
całkowita zawartość Cu, $\mu\text{g g}^{-1}$	5,021	23,952	6,147
ekstrahent	wydajność ekstrakcji, %		
10 mM octan amonu, pH 7.4	35,5 \pm 0,2	48,0 \pm 0,5	53,5 \pm 0,7
30 mM Tris-HCl pH 7.4	20,5 \pm 0,4	47,1 \pm 0,3	56,1 \pm 1,7
2% (w/v) SDS w wodzie	74,6 \pm 1,1	88,2 \pm 0,8	63,8 \pm 1,1
7% pektynaza	20,4 \pm 0,2	71,7 \pm 0,6	93,6 \pm 3,1
5% hemicellulaza	45,7 \pm 0,8	67,5 \pm 1,8	70,2 \pm 2,8
HEPES	-	-	54,4 \pm 0,8
ciecz jonowa	-	-	61,3 \pm 1,8
woda	-	-	59,7 \pm 1,1



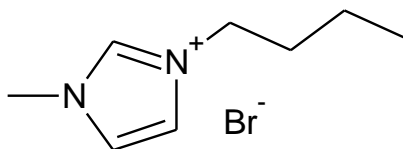
Rysunek 4 Chromatogramy SEC-ICP-MS ekstraktów z jagód goji

Aby ustalić zależność wydajności ekstrakcji z zastosowaniem enzymu od czasu jej trwania przeprowadzono frakcjonowanie za pomocą techniki SEC-ICP-MS (Rysunek 4). Wraz z upływem czasu, na chromatogramie można zaobserwować pojawienie się nowych sygnałów odpowiadających innym formom jonów manganu i miedzi. Związane jest to ze zdolnością pektynazy do rozrywania ściany komórkowej rośliny, poprzez niszczenie obecnego w niej wielocukru (ramnogalakturonan II, RG II), który charakteryzuje się rozgałęzioną budową (Rysunek 5). Zjawisko to potwierdzono obserwując izotop boru, gdyż RG II, występuje w ścianach komórkowych jako dimer połączony (pomiędzy resztami apiozy w łańcuchach bocznych A dwóch monomerów RG II) za pomocą wiązań kowalencyjnych z diestrami kwasu borowego.



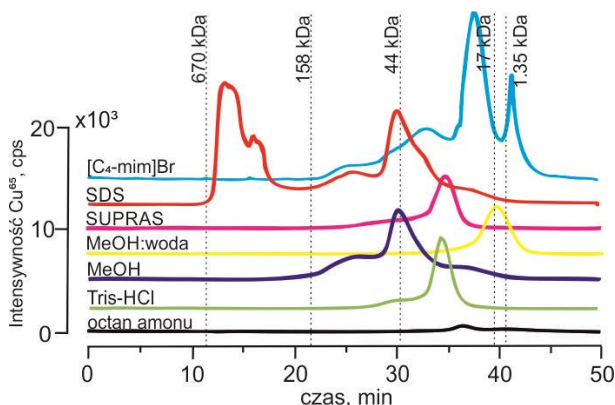
Rysunek 5 Fragment cząsteczki dimeru boranowego ramnogalakturonanu II

Obiecującą grupą badanych ekstrahentów okazały się **ciecze jonowe (IL)**. Są to związki o budowie jonowej, charakteryzujące się temperaturami topnienia o wartości mniejszej niż 100°C. Ciecze jonowe zbudowane są dużych, zazwyczaj niesymetrycznych, organicznych kationów i małych organicznych lub nieorganicznych anionów (Rysunek 6). Możliwość wykorzystania cieczy jonowych w charakterze ekstrahentów wynika z ich zdolności do solwatacji wielu grup związków, co związane jest z możliwością tworzenia różnych oddziaływań międzycząsteczkowych: kulombowskich, dipol-dipol, π - π , n - π , wiązań wodorowych, sił van der Waals'a. Dotychczas badania z wykorzystaniem cieczy jonowej do wyekstrahowania metali połączonych z bioligandami nie były prowadzone.



Rysunek 6 Struktura chemiczna cieczy jonowe - bromku 1-n-butylo-3-metyloimidazolu [C₄-MIM]Br

Optymalizacja procesu ekstrakcji za pomocą cieczy jonowej [C₄-MIM]Br została dokonana na przykładzie ekstrakcji jonów miedzi i jej form obecnych w szatwii hiszpańskiej *chia*. Podczas analizy SEC-ICP-MS ekstraktu uzyskanego z wykorzystaniem cieczy jonowej jako ekstrahenta zaobserwowano 3 sygnały związków o masach cząsteczkowych pomiędzy 1,35 a 44 kDa (Rysunek 7) [H7]. Dla porównania przeprowadzono ekstrakcję jonów miedzi za pomocą innych ekstrahentów.

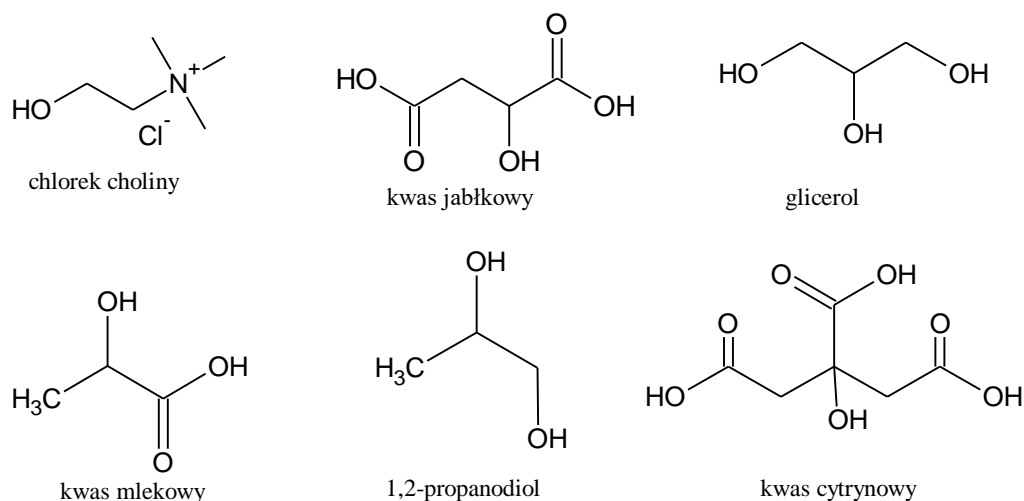


Rysunek 7 Chromatogramy SEC-ICP-MS różnych ekstraktów szatwii hiszpańskiej

Przeprowadzone badania wykazały, że jakkolwiek przy użyciu SDS możliwe jest wydzielenie wielocząsteczkowych kompleksów miedzi i cynku (158-670 kDa), będących prawdopodobnie połączeniami metalu z białkami hydrofobowymi, to zastosowanie cieczy jonowej pozwala na uzyskanie większej wydajności ekstrakcji i wydzielenie większej liczby związków.

Rozpuszczalniki supramolekularne (SUPRAS) to grupa rozpuszczalników, które posiadają zdolność do uporządkowywania się w struktury nanowymiarowe. Ich tworzenie się przebiega dwuetapowo. W pierwszym powstają trójwymiarowe agregaty, które w drugim etapie łączą się w większe, zazwyczaj nierozpuszczalne w wodzie, struktury. Uzyskanie ich wymaga koacerwacji i użycia techniki ekstrakcji w punkcie zmętnienia. Struktura cząsteczek amfifilowych, tworzących agregaty tzw. SUPRAS, zawiera strefy o różnej polarności, odpowiedzialne za różnorodne oddziaływania pomiędzy SUPRAS a niepolarnymi i polarnymi analitami. W przeprowadzonych badaniach jako rozpuszczalnik supramolekularny użyto roztworu kwasu kaprynowego w mieszaninie tetrahydrofuranu z wodą, i pierwszy raz zastosowany został do ekstrakcji metali [H7].

Sukces w zastosowaniu cieczy jonowych do ekstrakcji metali i ich połączeń z bioligandami skłonił do poszukiwania możliwości zastosowania innych rozpuszczalników o właściwościach eutektycznych. **Naturalne rozpuszczalniki o właściwościach eutektycznych (NADES)** stały się alternatywą dla rozpuszczalników organicznych, które są lotne oraz toksyczne i z łatwością przedostają się do atmosfery. NADES, w porównaniu do innych ekstrahentów, charakteryzują się mniejszą toksycznością oraz lepszą biodegradowalnością. W ich skład zazwyczaj wchodzi dwie lub trzy substancje, pochodzące z grup cukrów, alkoholi, kwasów organicznych, aminokwasów i pochodnych cholin (Rysunek 8). Pomiedzy cząsteczkami tych składników tworzą się wiązania wodorowe, dzięki czemu temperatura topnienia otrzymanego związku jest niższa w porównaniu do temperatur topnienia substratów. Z powodzeniem zostały zastosowane do ekstrakcji związków z grup antocyjaninów, fenoli, flawonoidów, izoflawonów oraz DNA, białek i cukrów.



Rysunek 8 Przykładowe związki wchodzące w skład naturalnych rozpuszczalników o właściwościach eutektycznych (NADES)

Dotychczas badania z wykorzystaniem NADES do ekstrakcji metali i ich połączeń z bioligandami nie były prowadzone. Wydajność ekstrakcji ekstrahentami z tej grupy określono badając sproszkowany młody jęczmień. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w tabeli 2 [H10].

Tabela 2 Naturalne rozpuszczalniki o właściwościach eutektycznych stosowane do ekstrakcji połączeń metali oraz wydajność ich ekstrakcji z młodego jęczmienia

składniki		stosunek molowy		wydajność ekstrakcji, %			
akceptor wiązań wodorowych	donor wiązań wodorowych			Mn	Cu	Zn	Mo
chlorek choliny	glicerol	woda	1:2:8	9,55	nd	26,65	42,93
chlorek choliny	glikol etylenowy	woda	1:4:8	11,14	30,48	80,92	40,73
chlorek choliny	glikol etylenowy	betaina	1:2:1:8*	10,35	nd	65,08	39,08
Kwasy organiczne				25,54	7,55	24,16	51,71
chlorek choliny	kwask jabłkowy	woda	1:1:6	28,91	4,43	28,06	50,17
chlorek choliny	kwask cytrynowy	woda	1:1:6	30,81	1,02	2,23	64,45
Cukry				15,50	nd	43,16	53,58
chlorek choliny	fruktoza	woda	1:1:10	21,51	24,16	116,40	49,84
kwask cytrynowy	fruktoza	woda	1:1:10	29,86	6,95	26,93	53,47
chlorek choliny	glukoza	woda	1:1:10	9,73	nd	41,83	39,85
Aminokwasy				9,73	nd	51,72	42,16
kwask jabłkowy	β-alanina	woda	1:1:10	18,04	nd	43,52	108,75

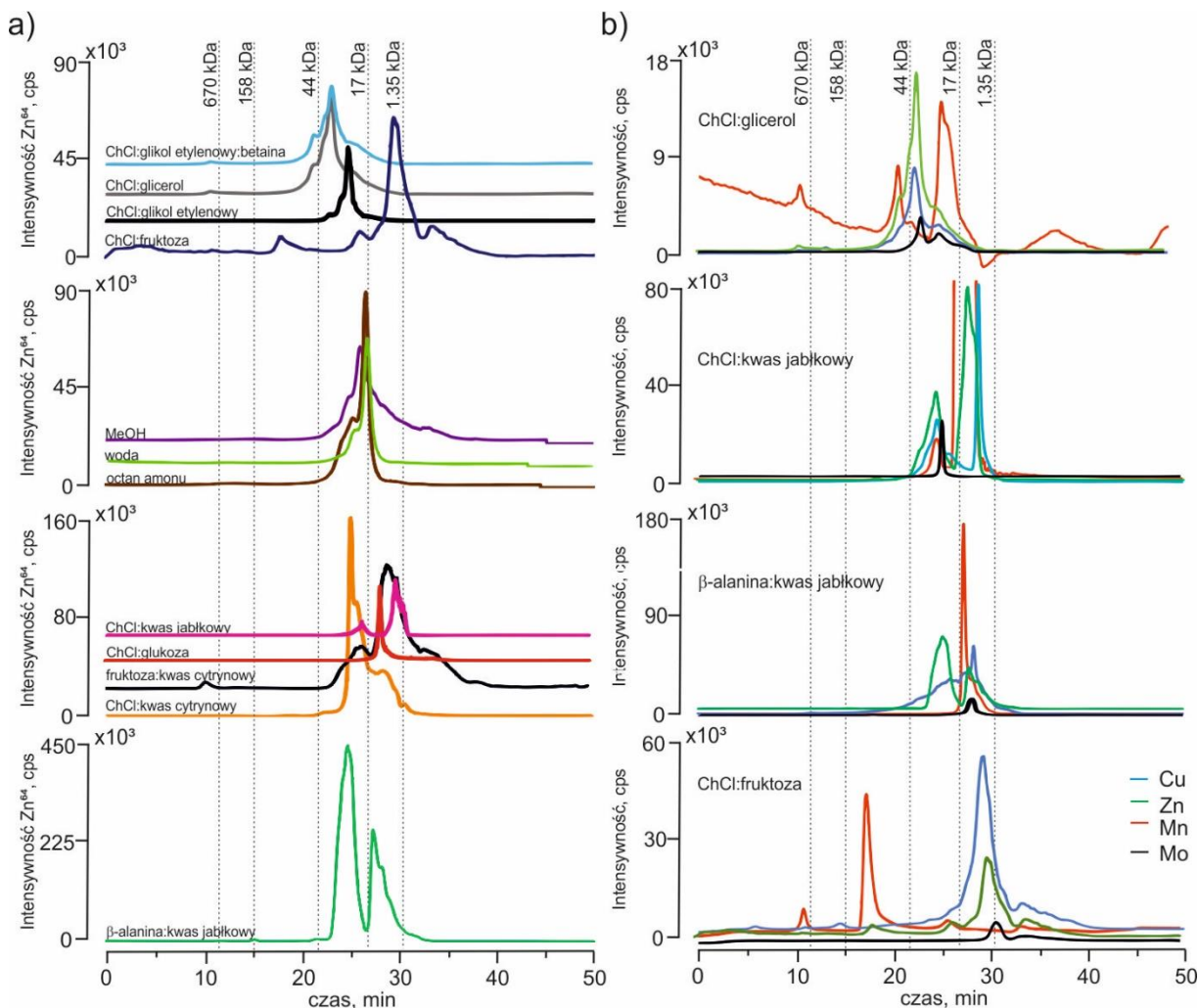
nd - < LOD, *woda

Sygnaty zarejestrowane przy użyciu techniki SEC-ICP-MS wskazują na różnorodne właściwości ekstrakcyjne grup NADES. NADES oparte na roztworze chlorku choliny z kwasem cytrynowym, kwasem jabłkowym lub glukozą mogą być stosowane do ekstrakcji związków metali o średniej masie cząsteczkowej, natomiast połączenia β-alaniny z kwasem jabłkowym wykazują zdolność ekstrakcji frakcji związków o dużej i małej masie cząsteczkowej.

Na chromatogramie SEC-ICP-MS ekstraktów z młodego jęczmienia uzyskanych za pomocą ekstrakcji z użyciem NADES zaobserwowano sygnaty związków o średniej masie cząsteczkowej (Rysunek 9). Na chromatogramach ekstraktów otrzymanych przy użyciu NADES na bazie chlorku choliny z glikolem etylenowym, glicerolem i glikolem etylenowym oraz ekstraktów z betainą

zarejestrowano sygnały o czasach retencji charakterystycznych dla związków o większej masie cząsteczkowej (44-17 kDa).

NADES cukrowe (fruktoza, glukoza) mają zdolność ekstrakcji kompleksów metali z małymi bioligandami, na przykład z kwasami organicznymi. Na chromatogramach otrzymanych techniką SEC-ICP-MS ekstraktów uzyskanych przy użyciu roztworów fruktozy można zaobserwować sygnał o czasie retencji około 35 min, co może wskazywać na obecność związków o małej masie cząsteczkowej.



Rysunek 9 Chromatogramy SEC-ICP-MS ekstraktów z młodego jęczmienia: a) izotopów Zn^{66} w wybranych NADES; b) izotopów metali w wybranych NADES

Z przedstawionych badań wynika, że zastosowanie różnych NADES umożliwia ekstrakcję różnych metali z jednej próbki. Ponadto zastosowanie różnych naturalnych rozpuszczalników eutektycznych pozwala na ekstrakcję różnych form tego samego metalu. Różnice te stwarzają możliwość zaplanowania odpowiedniej sekwencyjnej ekstrakcji metali i ich związków z roślin, a także pozwalają na analizę specjacyjną związków, które są związane z nierozpuszczalnymi częściami roślin. Dodatkowo zastosowanie sekwencyjnej ekstrakcji łączącej NADES z cieczami jonowymi daje możliwość wydajnej ekstrakcji metali w celu specjacyjnej analizy materiałów biologicznych i medycznych [H10].

Za największą wartość tej części badań uważam wykazanie, iż w zależności od zastosowanych ekstrahentów, przeznaczonych do ekstrakcji wybranych połączeń, możemy wyekstrahować selektywnie grupy związków metali z bioligandami. Zastosowanie: (1) wodnych roztworów buforowych

(tj. Tris) umożliwia wydzielenie peptydów znajdujących się w wakuoli i cytozolu komórki, (2) enzymów (driselaza, pektynaza, hemicelulaza) pozwala na wydzielenie peptydów i związków fenolowych związanych ze ścianą komórkową rośliny; (3) związków powierzchniowo czynnych (SDS) - na wydzielenie hydrofobowych białek, (4) roztwór octanu amonu – na ekstrakcję kwasów organicznych; (5) cieczy jonowych – na ekstrakcję związków o małej masie cząsteczkowej, tj. flawonoidów, aminokwasów lub związków antrachinonowych.

Analiza specjacyjna metali i metaloidów z żywności pochodzenia roślinnego.
Identyfikacja nowych połączeń metali z bioligandami obecnymi w roślinie

W skład organizmów żywych wchodzi głównie pierwiastki, które określa się mianem makroelementów, takie, jak C, H, O, N, Ca, Mg, P, Na, K, S oraz Cl. Są one składnikami budulcowymi białek, tłuszczów, węglowodanów, nukleotydów oraz układu kostnego i szkieletu zewnętrznego zwierząt. Pierwiastki nie należące do tej grupy określane są mianem mikroelementów. Pełnią one głównie funkcje regulujące metabolizm organizmów żywych, wchodząc w skład m.in. enzymów, hormonów czy witamin. Do tej grupy należy B, Br, Co, Cu, F, Fe, I, Mn, Mo, Ni, Si, Se, V i Zn. Codzienne zapotrzebowanie organizmu na poszczególne pierwiastki jest wysoce zróżnicowane. Zarówno niedobór, jak i nadmiar mikroelementów nie jest stanem pożądanym, dlatego konieczna staje się kontrola ich zawartości w żywności.

Należy podkreślić, że duża całkowita zawartość pierwiastka w produkcie spożywczym nie musi iść w parze z jego biodostępnością, czyli zdolnością do uczestniczenia w procesie wchłaniania i metabolizmu przez organizm człowieka. Jednym z czynników warunkujących biodostępność jest forma chemiczna, w której dany pierwiastek występuje w pożywieniu. W celu jej ustalenia wskazane jest przeprowadzenie analizy specjacyjnej. Należy zauważyć, że zainteresowanie badaniem form mikroelementów stale wzrasta, co potwierdza rosnąca liczba publikacji dotyczących analizy specjacyjnej metali w ostatnich latach.

W kolejnym etapie badań, w celu dokonania analizy specjacyjnej metali i metaloidów pochodzących z żywności pochodzenia roślinnego, przeprowadzono ekstrakcję różnych form metali za pomocą wybranych ekstrahentów w zoptymalizowanych warunkach, określonych w pierwszym etapie badań.

W prezentowanym cyklu prac przedstawiono badania dotyczące: (1) pierwiastków monoizotopowych tj. **kobaltu** (izotop ^{59}Co), występującego w żywności głównie w formie nieorganicznej lub w postaci witaminy B12, **jodu** (izotop ^{127}I), występującego w postaci związków nieorganicznych; **manganu** (izotop ^{55}Mn), występującego głównie w formie nieorganicznej lub w postaci kompleksu z anionami cytrynianowymi; oraz (2) pierwiastków wieloizotopowych – **cynku** (izotopy ^{64}Zn , ^{66}Zn i ^{68}Zn), występującego głównie w formie nieorganicznych połączeń (np. z kwasem jabłkowym) i połączeń ze związkami o większych masach cząsteczkowych oraz **miedzi** (^{63}Cu i ^{65}Cu), występującej zarówno w formie związków nieorganicznych, jak i organicznych (połączenia z białkami, związkami małowcząsteczkowymi, np. flawonoidami).

Pierwszym etapem badań było oznaczenie całkowitej zawartości wybranych metali w żywności (Tabela 3), a następnie przeprowadzenie analizy specjacyjnej wybranych metali za pomocą techniki sprzężonej SEC-ICP-MS.

Tabela 3 Całkowita zawartość wybranych metali w żywności

	Cu	Zn	Co	Mn	I
materiał	całkowita zawartość, µg/g				
<i>spirulina</i>	14,61	47,06	4,055	104,60	-
<i>owoc noni</i>	2,20	4,83	0,047	6,11	-
<i>szałwia chia</i>	14,50	81,12	0,350	57,44	-
<i>jagody goji</i>	6,15	10,60	0,461	9,86	-
<i>jagody acai</i>	23,95	108,10	0,348	657,50	-
<i>jagody czarne</i>	5,02	71,57	0,082	145,41	-
<i>białko jaja</i>	-	-	0,281	-	0,22
<i>żółtko jaja</i>	-	-	0,120	-	0,99

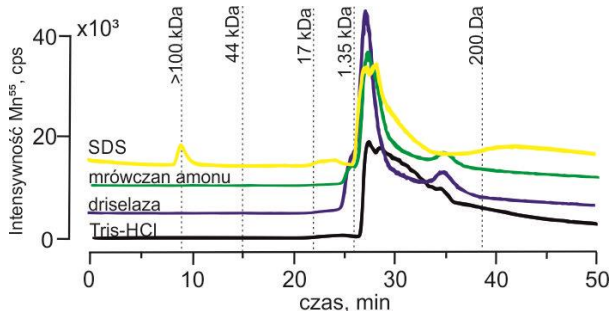
Próbki analizowanych materiałów poddawano ekstrakcji z użyciem wybranych roztworów ekstrakcyjnych. Do rozdzielania składników otrzymanych ekstraktów używano kolumny rozmiarów wykluczających Superdex 75 10/30, stosowanej do rozdzielania białek. W celu sprawdzenia powtarzalności wyników, każdą z próbek poddano procesowi rozdzielania trzykrotnie, uzyskując RSD dla czasów retencji w przedziale 3% – 5%.

Przed przystąpieniem do analizy ekstraktów przeprowadzono kalibrację kolumny chromatograficznej pozwalającą na szacowanie wielkości cząsteczek rozdzielanych związków. Wyznaczono zależność czasów retencji od mas cząsteczkowych analizowanych związków. W charakterze mieszaniny kalibracyjnej użyto roztworu substancji: tyreoglobulina (670 kDa), globulina (150 kDa), konalbumina (77 kDa), albumina wołowa (66 kDa), albumina kurza (45 kDa), mioglobina (17 kDa) i cyjanokobalamina (1,35 kDa) i metionina (0,15 kDa).

Następnie, wykorzystując technikę spektrometrii mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (ESI-MS), zidentyfikowano grupy związków odpowiedzialnych za wiązanie metali w żywności. Technika ESI zaliczana jest do „miękkich” sposobów jonizacji, dzięki czemu powoduje minimalne zmiany w strukturze związków przed ich identyfikacją.

Mangan w owocach *Morinda Citrifolia* (owoce noni) [H4]

Analizę specyficzną manganu w owocach noni (*Morinda citrifolia* L.) prowadzono za pomocą techniki SEC-ICP-MS. Na chromatogramach ekstraktów owocu noni zarejestrowano obecność sygnałów odpowiadających małowielkościowym formom manganu (Rysunek 10).



Rysunek 10 Chromatogramy SEC-ICP-MS ekstraktu z owoców noni

Pierwszy sygnał na chromatogramach ekstraktów buforowych (Tris-HCl) obserwowanych przy czasie retencji $t_r=11$ min, nie został zidentyfikowany, gdyż związek wymywany był z kolumny w czasie martwym, co oznacza, że przekraczał zdolności rozdzielcze kolumny (> 70 kDa). Kolejny sygnał rejestrowany przy czasie retencji 27 min. W oparciu o kalibrację kolumny, można oszacować, że jest to sygnał związku o masie cząsteczkowej nie większej niż $1,5 \pm 1,0$ kDa.

Sygnał przy czasie retencji 35 minut został zidentyfikowany jako odpowiadający połączeniu manganu z ligandem o masie cząsteczkowej około 0,4 kDa, charakterystycznym dla małowielkościowych kompleksów manganu.

Podjęto próbę identyfikacji rozdzielonych związków. W tym celu zebrano odpowiednie frakcje eluatu z kolumny SEC, które zateżono, zliofilizowano, a następnie poddano analizie za pomocą ESI-MS. Przeprowadzone badania pozwoliły na identyfikację połączeń jonów manganu w ekstraktach z owoców noni: (1) z flawonoidami - rutyną i mirycetyną; (2) ze związkami z grupy antrachinonów – alizaryną; oraz (3) z glikozydami kwasu asperulozydowego i kwasu salicylowego.

Jod w jajku kurzym [H3]

W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę specyficzną jodu w jajku kurzym. W ekstraktach z białka/żółtka jaja kurzego stwierdzono obecność małowielkościowej formy jodu. Na podstawie analizy chromatograficznej (SEC-ICP-MS) roztworów wzorcowych, zawierających jony jodkowe i jodanowe(V) oraz po zastosowaniu metody dodatku wzorca do próbki, zidentyfikowano tę formę jodu jako anion jodkowy.

Zastosowanie chromatografii wykluczania pozwoliło na rozdzielanie anionów jodkowych i jodanowych(V) pomimo niewielkich różnic w ich masach cząsteczkowych; wynikało to najprawdopodobniej z występowania oddziaływań jonowych, towarzyszących podstawowemu mechanizmowi rozdzielania w chromatografii wykluczania.

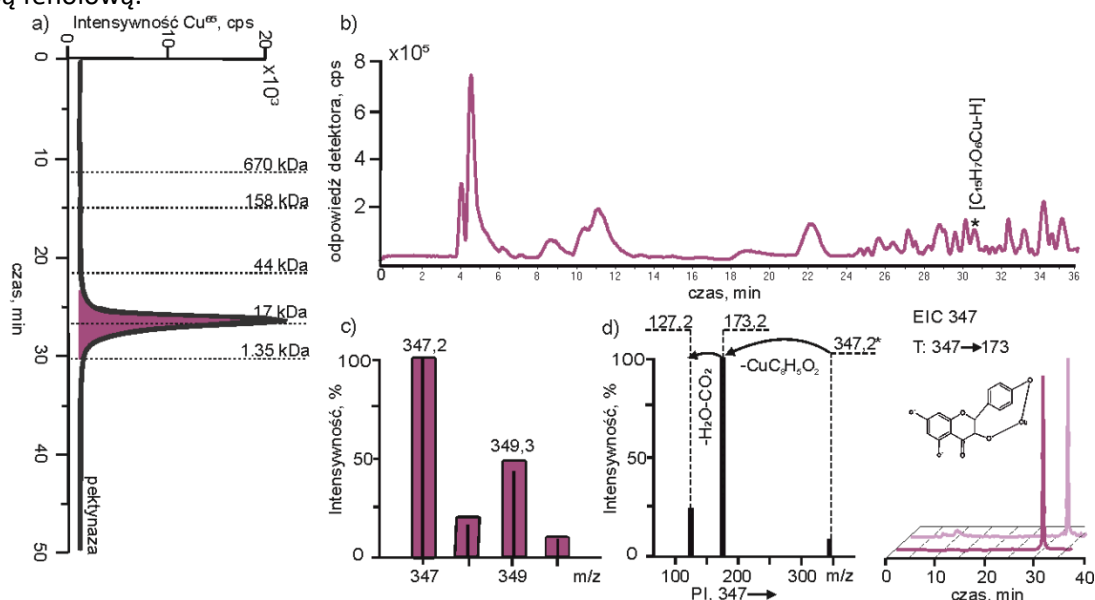
Na chromatogramie zatężonego ekstraktu z żółtek zarejestrowano również sygnał wielkocząsteczkowej formy jodu, stanowiącej 6% zawartości związków jodu w żółtku kurzym. Nie podjęto próby jej identyfikacji, gdyż eluowała w czasie martwym kolumny, przekraczając jej zdolności rozdzielcze (> 70 kDa), niemniej w literaturze znajdują się doniesienia o zdolności wiązania jodu przez wielkocząsteczkowe związki, występujące w biologicznych matrycach.

Miedź w jagodach czarnych i acai [H6]

W obszarze badań specjacji miedzi w ekstraktach z czarnych jagód oraz jagód acai połączenia miedzi wydzielano za pomocą pektynazy, hemicelulazy oraz roztworu octanu amonu. Ekstrakty rozdzielano za pomocą techniki kapilarnej chromatografii cieczowej w połączeniu z detektorem tandemowej spektrometrii mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (μ -HPLC-ESI-MS/MS).

Na chromatogramach ekstraktów z jagód (Rysunek 11), otrzymanych za pomocą techniki μ -HPLC-ESI-MS, zaobserwowano cztery grupy sygnałów pochodzących od: (1) hydrofilowych związków w czasie retencji około 4-10 minut dla wszystkich ekstraktów (octan amonu, enzymy); (2) hydrofilowych związków w czasie retencji 10-14 minut dla ekstraktów enzymatycznych; (3) związków hydrofobowych w czasie retencji 20-27 min dla ekstraktów enzymatycznych (hemicelulaza i pektynaza); oraz (4) kolejnej grupy związków hydrofobowych w czasie retencji 27-40 min dla ekstraktów uzyskanych za pomocą roztworu octanu amonu i wymienionych enzymów.

Otrzymane widma, zarejestrowane w trybie skanowania (Rysunek 11), przeanalizowano w celu odnalezienia sygnałów jonów molekularnych o profilu izotopowym charakterystycznym dla związków miedzi. W efekcie wytypowano sygnały o poszukiwanym profilu izotopowym we wszystkich ekstraktach. Profil izotopowy w widmie pozwala na określenie liczby jonów miedzi związanych z każdą grupą fenolową.



Rysunek 11 Wyniki otrzymywane w kolejnych etapach postępowania: a) chromatogram SEC-ICP-MS dla wybranych ekstraktów, b) chromatogram RPLC-ESI-MS (tryb skanowania) dla wybranej frakcji z kolumny SEC, c) widmo mas profilu izotopowego wraz z teoretycznym; d) widmo jonów potomnych dla jonu macierzystego przy m/z 347, proponowana struktura Cu-luteolin oraz chromatogram EIC jonu macierzystego

Większość sygnałów zarejestrowanych na widmach ESI-MS/MS uzyskanych w trybie skanowania pochodziła od pojedynczych naładowanych jonów skompleksowanych z jednym jonem miedzi (Tabela 4). Otrzymane widma jonów cząsteczkowych MS/MS kompleksów miedzi umożliwiły identyfikację fragmentów jonów (Tabela 4).

Tabela 4 Zidentyfikowane związki miedzi w ekstraktach jagód acai i czarnych za pomocą μ -HPLC ESI MS/MS

Material	Ekstrahent	Wzór cząsteczkowy kompleksu	Ligand	[M+H] ⁺ m/z	[M-H] ⁻ m/z	MS/MS
jagody acai	octan amonu	[C ₇ H ₄ O ₅ Cu-H]	kwask gallusowy		231	117 [C ₈ H ₅ O], 145
		[C ₁₅ H ₈ O ₇ Cu+Na]	kwercetyna	387		151 [C ₇ H ₃ O ₄], 231* (151+H ₂ O)Cu
		nieznany	415		171* [C ₆ H ₄ O ₂ Cu]	
	pektynaza	nieznany	399		286 [C ₁₅ H ₁₀ O ₆]	
		[C ₁₅ H ₈ O ₇ Cu+Na]	kwercetyna	387		151 [C ₇ H ₃ O ₄]
jagody czarne	octan amonu/ hemicelulaza	[C ₉ H ₈ O ₅ Cu-H]	kwask syringowy		259	171* [C ₆ H ₄ O ₂ Cu]
		[C ₁₅ H ₈ O ₆ Cu-H]	kaempferol		347	173 [C ₇ H ₃ O ₄]Na
		nieznany	415		171* [C ₆ H ₄ O ₂ Cu]	
		[C ₂₇ H ₂₈ O ₁₆ Cu-H]	peonidyna 3-rutynozyd		671	401* [C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁ Cu+3H ₂ O]
		nieznany	467		137 [C ₈ H ₉ O ₂]	
	[C ₁₅ H ₇ O ₆ Cu-H]	luteolina		347	285 [C ₁₅ H ₁₀ O ₆]	
	[C ₁₅ H ₈ O ₇ Cu – H]	kwercetyna		363	151 [C ₇ H ₃ O ₄], 231* (151+H ₂ O)Cu	
pektynaza	[C ₁₅ H ₇ O ₆ Cu-H]	luteolina		347	285 [C ₁₅ H ₁₀ O ₆]	

* sygnał odpowiadający cząsteczkom zawierającym metal

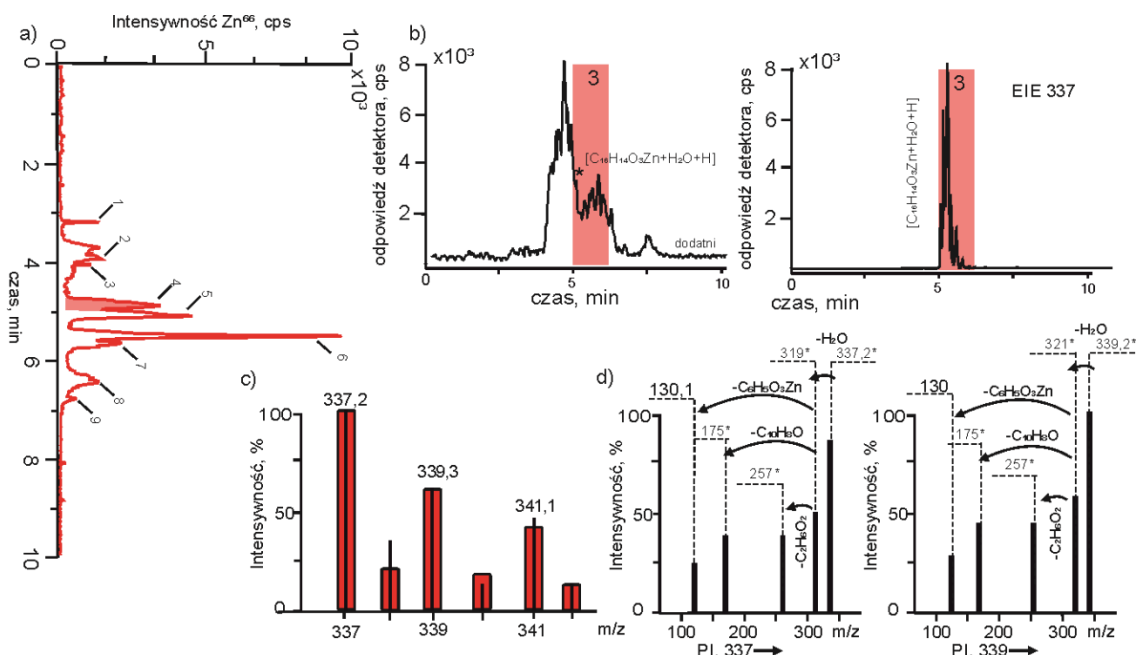
Zastosowanie enzymatycznej ekstrakcji przy użyciu pektynazy pozwoliło na identyfikację związków fenolowych jako ligandów wiążących jony miedzi w owocach roślin, dotychczas takie badania nie były prowadzone. Flawonoidy i kwasy fenolowe (mocno związane w skórce owoców z wielocukrami ściany komórkowej, poprzez oddziaływania hydrofobowe i/lub wiązania wodorowe) oraz antocyjaniny (związane z nierozpuszczalnymi wielocukrami w kompleksy fenol-białko), po enzymatycznym działaniu pektynazy i hemicelulazy, uwalniają kompleksy miedzi. Pektynaza, rozrywając ścianę komórkową, uwalnia kompleksy metali ze skórki owoców i miąższu.

Miedź i cynk w jagodach goji [H9]

Zastosowanie w charakterze ekstrahenta pektynazy oraz cieczy jonowej: bromek 1-n-butylo-3-metyloimidazolu [C4mim]Br pozwoliło na identyfikację grupy związków odpowiedzialnych za wiązanie miedzi oraz cynku w jagodach goji.

W celu poprawy parametrów analitycznych opracowanej metodyki, zastosowano połączenie techniki rozdzielania – elektroforezy kapilarnej (CE) z techniką detekcji ICP-MS. Taka konfiguracja pozwoliła na zoptymalizowanie metody rozdzielania badanych związków w połączeniu bezpośrednio techniki elektroforezy kapilarnej z tandemową spektrometrią mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (ESI-MS/MS). W zaproponowanym rozwiązaniu sprzężenie elektroforezy kapilarnej ze spektrometrem mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie, pozwoliło na rozdzielanie izotopów cynku związanych w kompleksy ze względu na ich wielkość i ładunek oraz identyfikację dziewięciu związków zawierających profil izotopowy cynku.

Ekstrahenty buforowe Tris-HCl zostały wybrane ze względu na dużą wydajność ekstrakcji cynku. Otrzymany elektroferogram zawiera kilka sygnałów rejestrowanych przy różnym czasie migracji (Rysunek 12).



Rysunek 12 Wyniki otrzymywane w kolejnych etapach postępowania: a) elektroferogram CE-ICP-MS dla wybranych ekstraktów, b) elektroferogram CE-ESI-MS (tryb skanowania) oraz elektroferogram EIE jonu m/z 337, c) widmo mas profilu izotopowego wraz z teoretycznym; d) widmo jonów potomnych dla jonu macierzystego przy m/z 337 oraz 339

Sygnaly obserwowane przy czasie migracji 3,3-4,3 min odpowiadają związkom o najmniejszej masie cząsteczkowej. Cząsteczki te migrują najszybciej ze względu na małe rozmiary i względnie duży ładunek - w połączeniu z kationem cynku. Druga grupa sygnałów (5,0-6,0 min) odpowiada kompleksom cynku o znacząco różnej masie cząsteczkowej, ale podobnej ruchliwości elektroforetycznej. Ostatnią grupę sygnałów (6,5–7,0 min) tworzą związki wielkocząsteczkowe lub jony o małym ładunku. Sygnaly o tym czasie migracji mogą odpowiadać kompleksom wolniej migrującym w kapilarze, np. kompleksom z wielocukrami. Należy pamiętać, że w trakcie etapu przygotowywania próbek, zastosowano filtry oddzielające związki o masach cząsteczkowych większych niż 10 kDa od pozostałych. Zastosowanie techniki sprzężonej CE-ICP-MS dostarczyło informacji o obecności różnych połączeń cynku w badanych ekstraktach.

W celu identyfikacji kompleksów cynku dokonano za pomocą elektroforezy kapilarnej połączonej z ESI-MS/MS analizy ekstraktu buforowego Tris-HCl z jagód goji. Ekstrakty przygotowano identycznie jak poprzednio. Rozdzielanie składników ekstraktów było prowadzone w takich samych warunkach, jak w przypadku połączenia CE z ICP-MS.

Ekstrakty buforowe Tris-HCl analizowano w trybie skanowania jonów dodatnich i ujemnych, w celu potwierdzenia obecności sygnałów, występujących na elektroferogramach otrzymanych za pomocą CE-ICP-MS. Na elektroferogramach CE-ESI-MS zarejestrowano więcej sygnałów o mniejszej rozdzielczości, co jest związane z obecnością w ekstrakcie dużo większej liczby kompleksów (Rysunek 12) w stosunku do obserwowanego na elektroferogramie CE-ICP-MS izotopu cynku. W zakresie czasów migracji 3,0–7,0 min obserwowano sygnały które występowały na elektroferogramach CE-ICP-MS i były zidentyfikowane jako odpowiadające jonom zawierającym cynk.

W celu potwierdzenia obecności jonów cynku w kompleksach, wyselekcjonowano sygnały, w których można było zaobserwować charakterystyczne profile dla izotopu cynku. Po raz pierwszy zidentyfikowano dziewięć ligandów związanych z jonami tego metalu. Były to przede wszystkim połączenia z aminokwasami, flawonoidami, stilbenoidami, kwasami fenolowymi oraz karotenoidami. Wynika to najprawdopodobniej ze struktury tych ligandów - związki zawierające w swojej budowie donory elektronów mogą łatwo brać udział w wiązaniu jonu metalu.

Zastosowanie techniki CE-ICP-MS dostarczyło informacji o obecności cynku w ekstraktach oraz podstawowych informacji o frakcjonowaniu cynku. Wyniki badań otrzymane przy zastosowaniu techniki CE-ESI-MS/MS umożliwiły identyfikację ligandów odpowiedzialnych za wiązanie cynku. Zaproponowane rozwiązanie wykorzystujące możliwość zmiany detektorów bez zmiany techniki rozdzielania, pozwoliło na zastosowanie tej samej, zoptymalizowanej metody rozdzielania oraz na identyfikację ligandów wiążących cynk w krótszym czasie.

Podsumowując tę część badań należy stwierdzić, że zastosowanie technik łączonych czyli technik rozdzielania (HPLC i/lub CE) połączonych z technikami detekcji specyficznych pierwiastkowo (ICP-MS) oraz cząsteczkowo (ESI-MS/MS), pozwala na przeprowadzenie analizy specjacyjnej metali, które znajdują się w badanym materiale (produkty żywnościowe pochodzenia roślinnego) w ilościach śladowych oraz na identyfikację ligandów odpowiedzialnych za ich wiązanie w roślinie (Rysunek 13). Identyfikacja grup ligandów wiążących metale w roślinach umożliwiło dalsze badania, prowadzące do określenia ich wpływu na biodostępność wiązanych metali.

^{53}I iodium	anion jodkowy	^{30}Zn zincum	aminokwasy polifenole karotenoidy kwasy fenolowe
	^{29}Cu cuprum	polifenole kwasy fenolowe hydroksykwas	
^{25}Mn manganum	flawonoidy antrachinony	^{27}Co cobaltum	witamina B12 pochodne kobalaminy

Rysunek 13 Główne grupy ligandów wiążących metale w badanych produktach roślinnych

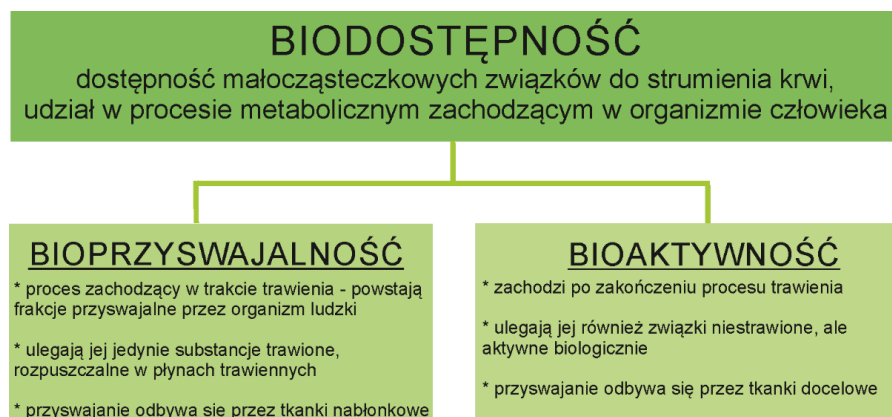
Badania bioprzyswajalności wybranych metali z żywności

Jak wykazano uprzednio, jony metali mogą być obecne w materiale roślinnym w postaci kompleksów z różnymi bioligandami. Najczęściej są to połączenia z aminokwasami, flawonoidami, kwasami fenolowymi, karotenoidami oraz wielocukrami. W związku z tym, że bioligandy wiążące metale mają prawdopodobnie pozytywny wpływ na biodostępność jonów metali do organizmu człowieka, celem kolejnego etapu badań było opracowanie metodyki analitycznej pozwalającej na określenie wpływu obecności bioligandów na biodostępność metali z żywności.

W tym obszarze opierano się na symulacji procesu trawienia w warunkach *in vitro* (odtworzenie procesów hydrolizy enzymatycznej zachodzącej w kolejnych odcinkach przewodu pokarmowego). Analiza specyjna metali obecnych w żywności oraz opracowanie metodyki analitycznej do określenia ich bioprzyswajalności dla organizmu człowieka przeprowadzono z użyciem technik łączonych.

Oznaczenie całkowitej zawartości pierwiastków nie jest równoznaczne z określeniem ich biodostępności, co wynika z faktu, że tylko część związków dostarczanych z pokarmem jest wchłaniana przez organizm ludzki. Dlatego poza oznaczaniem całkowitej zawartości, istotne jest poznanie formy chemicznej pierwiastków, które są absorbowane z przewodu pokarmowego, gdyż determinuje ona ich przyswajanie bądź toksyczność.

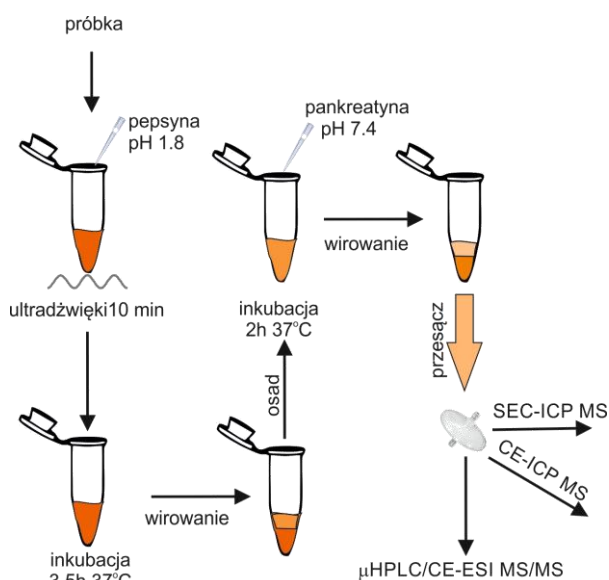
Biodostępność definiuje się jako obecność w układzie trawiennym małych cząsteczkowych związków, powstających w trakcie procesu trawienia, które mogą uzyskać dostęp do strumienia krwi i brać udział w procesach metabolicznych, zachodzących w organizmie ludzkim. Biodostępność jest pojęciem obejmującym bioprzyswajalność oraz bioaktywność, jednak ze względu na trudności praktyczne oraz etyczne pojawiające się podczas badania aktywności biologicznej składników pożywienia, biodostępność sprowadza się bardziej do określania bioprzyswajalności. Pomimo że terminy biodostępności oraz bioprzyswajalności często stosowane są zamiennie, należy pamiętać, że pojęcie biodostępności obejmuje dodatkowo bioaktywność (Rysunek 14). Określenie bioaktywności jest istotne w przypadku badań nad nietrawionymi składnikami pożywienia, np. wielocukrami oraz oligocukrami które, pomimo że nie są wchłaniane przez organizm, to mają korzystny wpływ na ludzkie zdrowie.



Rysunek 14 Biodostępność jako „suma” bioprzyswajalności oraz bioaktywności

Miarą bioprzyswajalności jest wielkość frakcji rozpuszczalnych w płynach trawiennych związków pierwiastków zdolnych do przenikania przez ściany jelita cienkiego, uwalnianych z matrycy produktu żywnościowego i obecnych w przewodzie pokarmowym człowieka. Rozpuszczalność związków pierwiastków w płynach trawiennych człowieka umożliwia ich absorpcję, tak więc bioprzyswajalność jest wskaźnikiem biodostępności. Badania bioprzyswajalności dostarczają informacji na temat zawartości oraz formy pierwiastków dostępnych oraz potencjalnie wchłanianych przez organizm ludzki i pomagają wykazać, czy składnik pożywienia jest efektywnie trawiony oraz przyswajany.

Postępowanie *in vitro*, które zostało wykorzystane w badaniach odwzorowuje procesy zachodzące podczas trawienia żołądkowego oraz jelitowego przy zastosowaniu roztworów enzymów trawiennych. W skład enzymów trawiennych wchodzi: pepsyna (powoduje wstępny rozkład wielkocząsteczkowych białek w żołądku), pankreatyna (obecna w jelicie cienkim mieszanina lipazy – trawienie tłuszczów, proteazy – trawienie białek, amylazy – trawienie cukrów), a także sole żółciowe (powodują emulgację tłuszczów i wspomagają ich wchłanianie w jelicie cienkim) oraz związki nieorganiczne.



Rysunek 15 Postępowanie analityczne przygotowywania próbek do symulacji trawienia żołądkowo-jelitowego

Warunki (temperatura, środowisko, czas prowadzenia poszczególnych etapów, wykorzystywane enzymy) stosowane podczas symulacji procesu trawienia były zbliżone do rzeczywistych warunków, w jakich zachodzą procesy trawienne w przewodzie pokarmowym człowieka. Próbki były inkubowane a następnie w celu symulacji procesu mieszania pokarmu - na każdym etapie ekstrakcji enzymatycznej wykorzystywane były techniki wytrząsania. Proces prowadzono w łaźni wodnej z łagodnym mieszaniem. Podczas procesu ekstrakcji próbki inkubowano w temperaturze ludzkiego ciała (Rysunek 15).

Bioprzyzwajalność jonów metali określano jako wydajność ekstrakcji enzymatycznej (korzystając ze wzoru 2).

$$\text{bioprzyzwajalność, } B(\%) = \frac{\text{zawartość metalu w ekstrakcie potrawiennym}}{\text{całkowita zawartość metalu w próbce}}$$

Wzór 2 Bioprzyzwajalność

Wyniki oznaczeń całkowitej zawartości jonów metali w ekstraktach po trawieniu żołądkowym, a następnie żołądkowo-jelitowym, pozwalały na określenie bioprzyzwajalności (Tabela 5). Oznaczenie całkowitej zawartości metali zostało przeprowadzone za pomocą techniki ICP-MS.

Tabela 5 Bioprzyzwajalność wybranych jonów metali określona na podstawie analizy ekstraktów potrawiennych wybranych produktów żywnościowych

	Trawienie żołądkowe					Trawienie jelitowe				
	Cu	Zn	Mn	Co	I	Cu	Zn	Mn	Co	I
	wydajność ekstrakcji, %									
noni	95,6	-	94,7	71,3	-	50,7	-	69,5	51,5	-
jagody goji	72,2	63,9	56,1	-	-	22,6	31,1	34,9	-	-
jagody acai	81,2	-	-	-	-	103,7	-	-	-	-
jagody czarne	62,6	-	-	-	-	18,7	-	-	-	-
spirulina	55,9	95,1	-	-	-	31,2	16,5	-	-	-
zincuprin	96,3	59,8	-	-	-	6,9	2,5	-	-	-
białko jaja	-	-	-	78,2	-	-	-	-	77,1	33,2
żółtko jaja	-	-	-	95,4	-	-	-	-	99,6	10,4

Przed analizą kolejnych frakcji obecne w nich związki metali rozdzielono za pomocą techniki SEC. Związki przyswajalne oddzielano od nieprzyswajalnych za pomocą wirowania oraz sączenia.

Frakcje uzyskane w wyniku symulacji trawienia poddawano procesom imitującym wchłanianie związków pierwiastków do organizmu człowieka - głównie ultrafiltracji z użyciem filtrów o odpowiedniej średnicy porów.

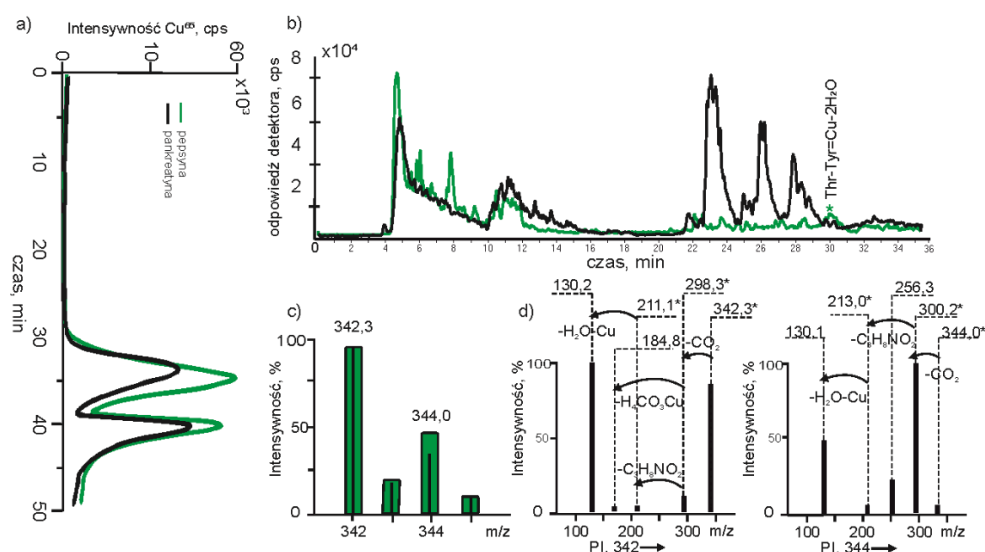
Bioprzyswajalność miedzi i cynku ze spiruliny i preparatu Zincuprin - porównanie [H5]

Celem badań było określenie bioprzyswajalności jonów metali oraz zidentyfikowanie bioligandów odpowiedzialnych za lepszą bioprzyswajalności miedzi i cynku z produktów naturalnych w porównaniu z produktami syntetycznymi. Produktem naturalnym była cyjanobakteria – *Spirulina platensis*, hodowaną przy użyciu unikatowej mieszanki świeżej wody pochodzącej z lasów tropikalnych oraz wody morskiej wzbogaconej w minerały – zawierającej około 90 pierwiastków śladowych. Jest to jedyny rodzaj cyjanobakterii hodowanej w warunkach tak bogatych w naturalnie występujące składniki odżywcze.

W celu określania bioprzyswajalności miedzi i cynku z produktu naturalnego, analizowane próbki poddawano działaniu składników płynów symulujących soki trawienne człowieka. Analizę produktów procesu symulacji prowadzono przy użyciu spektrometru mas (ICP-MS) oraz układu sprzężonego SEC-ICP-MS.

Bioprzyswajalność miedzi i cynku charakteryzowano za pomocą oznaczania całkowitej zawartości metalu w ekstraktach żołądkowo-jelitowych spiruliny oraz dostępnego handlowo preparatu syntetycznego Zincuprin (Tabela 5).

Opracowano nową metodę wykorzystującą technikę μ -RPLC-ESI-MS/MS do uzyskiwania specyficznych map peptydów obecnych w żołądku w celu identyfikacji kompleksów miedziowo-aminokwasowych w ekstraktach ze spiruliny po symulacji *in vitro* trawienia żołądkowego i żołądkowo-jelitowego (Rysunek 16). Analiza ekstraktów potrawiennych przy użyciu SEC-ICP-MS wykazała, że kompleksy cynku i miedzi mogą być tworzone przez białka pochodzące z cyjanobakterii oraz peptydów obecnych w trakcie procesu. Na chromatogramach otrzymanych przy użyciu μ -HPLC-ESI-MS/MS zidentyfikowano sygnały związków, które są najbardziej stabilne w ekstraktach potrawiennych - kompleksów miedzi z aminokwasami oraz peptydami. Peptydy te powstają w trakcie procesu trawienia w żołądku (z pepsyną w środowisku kwaśnym) z białek kompleksujących miedź w badanej cyjanobakterii.



Rysunek 16 Wyniki otrzymane w kolejnych etapach postępowania: a) chromatogram SEC-ICP-MS dla ekstraktów potrawiennych, b) chromatogram RPLC-ESI-MS (tryb skanowania) dla ekstraktów potrawiennych, c) widmo mas profilu izotopowego wraz z teoretycznym; d) widmo jonów potomnych dla jonu macierzystego przy m/z 342 oraz 344

Oprócz histydyny (tworzącej opisywane w literaturze kompleksy z miedzią), udało się również zidentyfikować aminokwasy odpowiedzialne za wiązanie miedzi - kwas asparaginowy, fenyloalaninę, prolinę i tyrozynę (Tabela 6).

Tabela 6 Kompleksy miedzi zidentyfikowane w spirulinie po symulacji trawienia żołądkowo-jelitowego za pomocą μ -HPLC-ESI-MS/MS

[M+H] ⁺ /[M-H] ⁻ m/z	pepsyna/pankreatyna	MS/MS
185 [*] /ND, 184 derHis=Cu	+/-	(ESI+) 69 (Imd), 127 (Imd + C ₃ H ₇ OH)
258 [*] /ND, 257,1 Asp-Gly=Cu+3H ₂ -2H ₂ O	+/-	(ESI+) 70 (C ₄ H ₇ N), 84 (C ₄ H ₅ NO), 129 (84+CH ₃ CH ₂ NH ₂), 130 (84+CH ₃ CH ₂ OH), 147 (129+H ₂ O or 130+NH ₃), 240 [*] (147+Cu+HCOH), 258 [*] (240 [*] + H ₂ O)
274 [*] /ND, 273,1 Pro-Pro=Cu-2H ₂ O	+/+	(ESI+) 72 (PrI), 173 [*] (Pro=Cu-3H ₂), 199 [*] (Pro-Cu-CO)
360 [*] /358 [*] , 359,1 Phe-Cu-Asp-H ₂ O	+/-	(ESI+) 86 (C ₄ H ₇ NO), 213 [*] (Phe-Cu-H ₂ O + H ₂), 247 [*] (Phe-Cu+H ₂ O)
332 [*] /330 [*] , 331,1 His-Asp=Cu-2H ₂ O	+/-	(ESI+) 86 (C ₄ H ₇ NO), 134 [*] (C ₃ H ₆ N ₂ =Cu), 201 [*] (His=Cu-H ₂ O+CH ₄), 314 [*] (His-Asp=Cu-H ₂ O)
330 [*] /328 [*] , 329,1 Ser-Tyr=Cu-2H ₂ O	+/-	(ESI-) 130 (C ₆ H ₉ NO ₃), 284 [*] (Ser-Tyr=Cu-CO ₂)
316 [*] /ND, 315,1 Val-His=Cu-2H ₂ O	+/+	(ESI+) 86 (C ₄ H ₇ NO), 132 (Val + H ₂ O-2H ₂), 157 [*] (C ₂ H ₃ NO=Cu+2H ₂ O), 185 [*] (His=Cu-2H ₂ O + 2H ₂), 203 [*] (His=Cu-H ₂ O+2H ₂)
344 [*] /342 [*] , 343,2 Thr-Tyr=Cu-2H ₂ O	+/-	(ESI-) 130 (C ₆ H ₉ NO ₃), 185 (300 [*] -H ₄ CO ₃ Cu), 211 [*] (300 [*] -C ₃ H ₈ NO ₂), 300 [*] (344 [*] -CO ₂)
374 [*] /372 [*] , 373,1 Met-Tyr=Cu-2H ₂ O	+/-	(ESI+) 243 [*] (Tyr=Cu-H ₂ O)

*sygnał odpowiadający izotopowi miedzi/cynku, ND – nie zidentyfikowano, derHis – histydyna pozbawiona tlenu, Imd – imidazol, PrI– pirolidyna

Bioprzyzwajalność kobaltu z jaja kurzego [H1]

Określono bioprzyzwajalność form kobaltu z jaja kurzego. Za pomocą techniki SEC-ICP-MS zanalizowano ekstrakty białka i żółtka, uzyskane w wyniku symulacji trawienia żołądkowego oraz żołądkowo-jelitowego. Po symulacji trawienia żołądkowego stwierdzono w ekstrakcie obecność wolnej formy witaminy B12 oraz połączenia kobaltu z białkiem (w tym samym czasie zarówno w ekstrakcie białka jak i żółtka). Otrzymane wyniki wskazują na to, że związki kobaltu mogą być tworzone po strawieniu białka jaja kurzego przez białko obecne w płynach enzymatycznych, glikoproteiną, która jest odporna na działanie enzymów trawiennych.

W celu scharakteryzowania frakcji białkowej występującej w enzymatycznych ekstraktach białka i żółtka oraz ustalenia roli białek w wiązaniu kobaltu w jaju, wzorce witaminy B12 poddawano symulowanemu procesowi trawienia. Wyniki analiz ekstraktów enzymatycznych otrzymanych za pomocą SEC-ICP-MS potwierdziły możliwość wiązania analogów witaminy B12 z białkiem enzymatycznym (pepsyną i trypsyną). Odporną na działanie enzymów, w przeciwieństwie do pozostałych analogów witaminy (Ado-Cbl, Me-Cbl oraz OH-Cbl), okazała się być CN-Cbl.

W celu potwierdzenia obecności różnych form witaminy B12 w jaju kurzym oraz zidentyfikowania małowcząsteczkowych produktów ich trawienia podjęto próbę bezpośredniej analizy enzymatycznych ekstraktów wzorców witaminy B12 za pomocą ESI-MS. Przeprowadzona identyfikacja potwierdziła obecność kobalaminy (Cbl) oraz jej prekursora - kobinamidu (Cbn). Uzyskane wyniki potwierdzają doniesienia literaturowe o stabilizującej roli białek, wykazując, że zarówno w enzymatycznych ekstraktach białka, żółtka, jak i mieszaniny wzorców witaminy B12 z białkami (fosfityną i albuminą kurzą) nie występuje produkt degradacji kobalaminy - kobinamid.

Bioprzyswajalność jodu z jaja kurzego [H3]

Określono bioprzyswajalność jodu z jaja kurzego. Białko i żółtko jaja kurzego poddawano działaniu płynów symulujących soki trawienne człowieka. Analizy produktów procesu prowadzono przy użyciu spektrometru mas (ICP-MS) oraz układu sprzężonego SEC-ICP-MS.

Bioprzyswajalność jodu z jaja kurzego charakteryzują całkowite zawartości jodu w ekstraktach żołądkowo-jelitowych białka i żółtka. Wyniki analiz trzech niezależnych próbek białka i żółtka wykazały bioprzyswajalność jodu na poziomie $33\% \pm 5\%$ z białka oraz $10\% \pm 3\%$ z żółtka kurzego. Obserwowane małe wydajności ekstrakcji wskazują na obecność form jodu odpornych na działanie enzymów trawiennych.

W celu wykluczenia strat lotnych form jodu w warunkach ekstrakcji, pozostałości poekstrakcyjne poddawano mineralizacji i oznaczano całkowite zawartości jodu. Sumę zawartości jodu w ekstraktach enzymatycznych białka/żółtka oraz osadzie poekstrakcyjnym porównywano z całkowitymi zawartościami jodu w białku/żółtku kurzym. Na podstawie bilansu masowego stwierdzono straty jodu na poziomie $3\% - 4\%$.

Podczas symulacji trawienia żołądkowego zaobserwowano przekształcanie jonów jodanowych(V) w jony jodkowe. Analogiczne wyniki otrzymano dla analiz roztworów wzorców poddanych symulacji pełnego procesu trawienia. Analiza chromatograficzna próbek jaja kurzego poddanych trawieniu symulującemu warunki żołądkowe wykazała obecność jonów jodkowych w ekstraktach białka i żółtka, co świadczy o bioprzyswajalności jonów jodkowych.

Bioprzyswajalność manganu, miedzi i cynku z jagód goji [H8]

Określono bioprzyswajalność jonów manganu, miedzi oraz cynku z ekstraktów jagód goji, jak również zidentyfikowano grupę ligandów, których obecność poprawia ich bioprzyswajalność w porównaniu do wolnych form jonowych. Badania te prowadzono przy użyciu techniki SEC-ICP-MS oraz μ HPLC-ESI-MS/MS.

Na chromatogramach SEC-ICP-MS ekstraktów potrawiennych obserwowano sygnały odpowiadające kompleksom manganu z produktami trawienia białek. Sygnał o czasie retencji $t_r = 27,0$ min występowały tylko po symulacji trawienia żołądkowego, co świadczy o zdolności pankreatyny do trawienia jelitowego związków o mniejszej masie cząsteczkowej, łatwiej biologicznie dostępnej dla organizmu ludzkiego.

Na chromatogramach SEC-ICP-MS ekstraktów potrawiennych przy użyciu pepsyny, obserwowano trzy sygnały substancji zawierających miedź, o czasach retencji w zakresie charakterystycznym dla związków o małej masie cząsteczkowej. Na chromatogramach otrzymanych dla próbek po symulacji trawienia żołądkowo-jelitowego obserwowano pierwszy sygnał w zakresie czasów retencji związków o małej masie cząsteczkowej; drugi natomiast był znacząco wyższy w porównaniu z sygnałem dla ekstraktu uzyskanego po trawieniu żołądkowym. Oba sygnały odpowiadają prawdopodobnie produktom trawienia białek lub innych związków o dużej masie cząsteczkowej, występujących w jagodach goji. Sygnały o czasach retencji mieszczących się w zakresie czasów charakterystycznych dla związków o małej masie cząsteczkowej może wskazywać na obecność kompleksów jonów z produktami trawienia wielocukrów, co związane jest z działaniem amylazy (składnik enzymu używanego w trawieniu jelitowym), która jest odpowiedzialna za trawienie tych związków.

Otrzymane chromatogramy SEC-ICP-MS (rejestrowane dla jonów cynku) zawierały dwa sygnały ekstraktów po trawieniu żołądkowym i jeden sygnał dla ekstraktów po trawieniu żołądkowo-jelitowym, który może odpowiadać kompleksom cynku z białkami.

Podsumowując tę część badań należy stwierdzić, że zastosowanie technik ICP-MS, SEC-ICP-MS i HPLC-ESI-MS/MS do analizy roztworów po symulacji *in vitro* trawienia żołądkowo-jelitowego pozwala na skuteczną ocenę bioprzyswajalności wybranych jonów metali z żywności pochodzenia naturalnego. Wydajność ekstrakcji za pomocą enzymu żołądkowego (pepsyny), a co za tym idzie bioprzyswajalność

jonów metali jest większa w ekstrakcie żołądkowym w porównaniu z bioprzyswajalnością z ekstraktów po trawieniu żołądkowo-jelitowym. Wyniki badań wskazują, że wszystkie badane jony metali są dobrze dostępne dla organizmu człowieka. Dotychczas badania określające biodostępność ograniczało się do określenia stopnia wchłaniania związków, wykorzystanie technik łączonych w prezentowanych pracach, pozwoliło na identyfikację grup związków kompleksujących, odpowiedzialnych za lepszą bioprzyswajalność jonów metali (Rysunek 17). Dodatkowo zaproponowane, po raz pierwszy, postępowanie analityczne umożliwiło określenie bioprzyswajalności oraz identyfikację kompleksów metali z aminokwasami i peptydami w ekstraktach potrawiennych, których obecność wskazuje większą ich bioprzyswajalność niż bioprzyswajalność wolnych jonów metali.

^{53}I <i>iodium</i>	anion jodkowy	^{30}Zn <i>zincum</i>	aminokwasy białka
	^{29}Cu <i>cuprum</i>	aminokwasy białka	
^{25}Mn <i>manganum</i>	białka	^{27}Co <i>cobaltum</i>	witamina B12 w połączeniu z białkami

Rysunek 17 Grupy ligandów tworzących połączenia z metalami po symulacji trawienia żołądkowo-jelitowego

Podsumowanie

Opracowanie nowej metodyki badań pozwoliło na określanie bioprzyswajalności metali z żywności pochodzenia roślinnego oraz na identyfikację grup bioligandów wpływających na poprawienie ich dostępności; dodatkowo opracowana metodyka badań potwierdziła możliwość monitorowania i modyfikowania dostępności jonów metali dla organizmu człowieka.

Za najważniejsze osiągnięcia przedstawione w cyklu publikacji **H1-H10**, stanowiące istotny wkład w rozwój chemii analitycznej uważam:

- ❖ zastosowanie, po raz pierwszy, nowych związków ekstrahujących kompleksy metali z bioligandami obecnymi w żywności pochodzenia naturalnego, pozwalających na wydajną ich ekstrakcję (cieczce jonowe, rozpuszczalniki supramolekularne oraz o właściwościach eutektycznych)
- ❖ opracowanie dotychczas niestosowanej metodyki badań, pozwalającej na potwierdzanie obecności poprzez identyfikację grup bioligandów odpowiedzialnych za wiązanie jonów metali w roślinach (flawonoidów, aminokwasów, kwasów fenolowych, karotenoidów)
- ❖ wskazanie grup związków kompleksujących odpowiedzialnych za lepszą bioprzyswajalność metali z żywności pochodzenia naturalnego
- ❖ opracowanie dotychczas niestosowanej metody określania bioprzyswajalności w warunkach *in vitro* oraz identyfikacji bioligandów odpowiedzialnych za jej zwiększanie

Przedstawione wyniki w cyklu omawiającym osiągnięcia naukowe są istotne, gdyż mogą przyczynić się do rozwoju wiedzy na temat możliwości wykorzystania technik analitycznych łączących wysokosprawne techniki rozdzielania z systemami detekcji selektywnej pierwiastkowo i cząsteczkowo w szeroko rozumianej metalomice – jak również w analizie żywności oraz w kontroli jej jakości. Opracowana przeze mnie metodyka badań, umożliwić może, poza rozszerzeniem stosowalności nowych metodologii analitycznych, również projektowanie skutecznych sposobów upraw roślin dostarczających bezpieczną i bogatą w mikroelementy żywność.

Cele dalszych badań

Badania specjacji metali i określanie ich bioprzyswajalności okazało się tematyką interesującą i wielowątkową. Opracowane metody analityczne, pozwalające na identyfikację związków odpowiedzialnych za lepszą bioprzyswajalność jonów metali, okazały się skuteczne i w dalszych etapach pracy projektowane jest ich wykorzystanie do badań nad bioprzyswajalnością nanocząstek metali obecnych w roślinie. W następnym etapie prac badawczych będą poszukiwane nowe związki, wydajnie ekstrahujących nanocząstki metali z materiału roślinnego, pozwalające na oznaczanie ich zawartości i potwierdzanie ich obecności w ekstraktach potrawieniowych. Do tej części badań będą stosowane również nowe techniki – spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie z modułem pojedynczych cząstek (*single particle* ICP-MS).

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Poza pracami opatrzonymi symbolami **H1-H10**, jestem współautorką publikacji dotyczących wykorzystywania technik rozdzielania (wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC oraz chromatografii gazowej GC) w oznaczaniu składników związków zapachowych. Zastosowanie technik chromatograficznych pozwala na szybkie rozdzielanie wieloskładnikowych mieszanin produktów kosmetycznych i na jednoczesną ich analizę ilościową i jakościową [**P6, A4**].

Ponadto jestem współautorką dwóch rozdziałów angielskojęzycznych, napisanych dla wiodących wydawców na rynku naukowym, tj. Springer i Wiley, dotyczących zastosowanie nowych technik analitycznych w nieorganicznej i bionieorganicznej analizie specjacyjnej, omawiającej problemy i sposoby ich rozwiązania w metalomice, na przykładzie analizy śladowej arsenu i selenu [**R3, R5**].

W obszarze moich zainteresowań jest wykorzystanie techniki ICP-MS do poszukiwania potencjalnych zastosowań nanocząstek złota. Badania pozwoliły na poszerzenie wiedzy z zakresu zastosowania nanocząstek złota jako potencjalnego metalo-nanomateriału o działaniu teranostycznym **[P9, A5]**.

Biorę udział w projekcie, którego celem jest opracowanie metodologii pozwalającej na określenie metabolizmu nanocząstek metali (tlenku cynku), występujących w środowisku w roślinach jadalnych (sałacie i rzodkiewce) **[P10]**. Opracowane postępowanie analityczne ma na celu określenie lokalizacji nanocząstek w roślinie oraz identyfikację form i badanie ich stabilności chemicznej. Analityczne techniki łączone są stosowane do określania stopnia rozpuszczania (pochodzenia postaci jonowej) nanocząstek w trakcie pobierania/przyswajania. Opracowana metoda pozwoli na zaproponowanie mechanizmu akumulacji i transformacji nanocząstek oraz zidentyfikowanie form, w jakich występują w momencie pojawienia się w tkankach i komórkach roślin. Uzyskane wyniki będą podstawą do zaproponowania modelu metabolizmu nanocząstek metali w roślinach, a także zaproponowania form, w jakich mogą zostać przyswojone przez organizm człowieka.

Lena Ruzik