



UNIwersytet
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

KATEDRA CHEMII ANALITYCZNEJ I SPEKTROSKOPII STOSOWANEJ

**NOWE PROCEDURY OZNACZANIA WYBRANYCH SKŁADNIKÓW ŻYWNOŚCI
O WŁAŚCIWOŚCIACH PRO- I ANTYZDROWOTNYCH**

Autoreferat

Aneta Jastrzębska

Obszar nauk ścisłych

Dziedzina: nauk chemicznych

Dyscyplina naukowa: chemia

Załącznik numer 2

Spis treści

	Str.
1. Informacje o autorze	3
1.1 Dane osobowe	3
1.2 Wykształcenie	3
1.3 Zatrudnienie w jednostkach naukowych	3
1.4 Zainteresowania naukowe	3
2. Wskazanie osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę wniosku habilitacyjnego	4
2.1 Tytuł osiągnięcia naukowego	4
2.2 Cykl publikacji wchodzących w skład osiągnięcia	4
2.3 Omówienie celu i najważniejszych wyników osiągnięcia naukowego	7
2.3.1 Badania przed uzyskaniem stopnia doktora	7
2.3.2 Cel badań	9
2.3.3 Opracowanie nowych metod oznaczania fosforanów(V) w żywności	9
2.3.4 Analiza amin biogennych w żywności	17
2.3.5 Elementy nowości, wkład do dyscypliny i podsumowanie osiągnięcia naukowego	26
2.3.6 Literatura	28
3. Nazwy związków chemicznych stosowane w załączniku numer 2	32
4. Akronimy stosowane w załączniku numer 2	33

1. Informacje o autorze

1.1. Dane osobowe

Imię i nazwisko **Aneta Jastrzębska**
Data i miejsce urodzenia 19.03.1971 w Toruniu
Miejsce pracy: Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Chemii
Katedra Chemii Analitycznej i Spektroskopii Stosowanej
ul. Gagarina 7
87-100 Toruń
e-mail: aj@umk.pl

1.2. Wykształcenie

2000 doktor nauk chemicznych w dziedzinie chemii; tytuł rozprawy doktorskiej:
Ekoanalitka wybranych ksenobiotyków za pomocą biowskaźników;
promotor prof. dr hab. Bogusław Buszewski
1995-2000 studia doktoranckie na Wydziale Chemii UMK w Toruniu
1990-1995 studia magisterskie na Wydziale Chemii UMK w Toruniu, tytuł pracy
magisterskiej „Siarka całkowita w igłach sosny zwyczajnej – optymalizacja
warunków analizy metodą spalania do SO₂ i kulometrycznej detekcji”;
promotor prof. dr hab. Bogusław Buszewski

1.3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

marzec 2014 - obecnie	starszy wykładowca	Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Chemii, Katedra Chemii Analitycznej i Spektroskopii Stosowanej
kwiecień 2002 – luty 2014	adiunkt	Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Chemii, Katedra Chemii Analitycznej i Spektroskopii Stosowanej
marzec 2000 – marzec 2002	asystent	Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Chemii, Zakład Chemii Analitycznej

1.4. Zainteresowania naukowe

Chemia analityczna, chemia żywności, techniki elektromigracyjne, techniki chromatograficzne, spektroskopia, składniki żywności, techniki przygotowania próbek

2. Wskazanie osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę wniosku habilitacyjnego

2.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

NOWE PROCEDURY OZNACZANIA WYBRANYCH SKŁADNIKÓW ŻYWNOŚCI O WŁAŚCIWOŚCIACH PRO- I ANTYZDROWOTNYCH

2.2. Cykl publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Publikacje [H1-H12] wchodzące w skład jednotematycznego cyklu prac stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego pochodzą z czasopism znajdujących się na liście Journal Citation Reports. Jestem autorem do korespondencji dla publikacji H3-H12. W publikacjach H1 - H12 mój wkład w autorstwo wynosił od 40% do 100%. Kopie publikacji wraz z oświadczeniami współautorów o indywidualnym wkładzie w powstanie poszczególnych prac stanowią odpowiednio załączniki nr 4 i 5. W tabeli podałam Impact Factor (IF) odnoszący się do roku wydania publikacji, 5-letni IF, punktacje MNiSW odnoszące się do roku wydania publikacji oraz za lata 2013-2016 (z dnia 26.01.2017). Liczba cytowań Web of Science i Scopus na dzień 25.01.2018.

Nr	Publikacja	IF/ IF 5- letni	MNiSW/ MNiSW 2017	Liczba cytowań Web of Science/ Scopus
H1	A. Jastrzębska, B. Brudka, T. Szymański, E. Szłyk*, <i>Determination of phosphorus in food samples by X-ray fluorescence spectrometry and standard spectrophotometric method</i> , Food Chemistry, 83 (2003) 463-467 Wkład w autorstwo 70% Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, zaplanowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i wykonaniu części analiz (pomiar spektrofotometryczne), dyskusji uzyskanych wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, końcowej redakcji całości.	1,204/ 4,498	12/40	31/32
H2	E. Szłyk*, A. Jastrzębska, B. Brudka, <i>Determination of total phosphorus in soya food samples by capillary isotachopheresis (cITP)</i> , Talanta, 63 (2004) 575-580 Wkład w autorstwo 80% Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, zaplanowaniu koncepcji	2,532/ 3,841	20/40	9/10

	pracy, zaplanowaniu i wykonaniu części analiz (pomiar izotachforetyczne), dyskusji uzyskanych wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu, końcowej redakcji całości.			
	A. Jastrzębska*, <i>Determination of sodium tripolyphosphate in meat samples by capillary zone electrophoresis with on-line isotachophoretic sample pretreatment</i> , Talanta 69 (4) (2006) 1018-1024	2,810/		
H3	Wkład w autorstwo 100% Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu pomiarów, analizie wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości, korespondencji z redaktorem czasopisma i recenzentami.	3,841	20/40	22/24
	A. Jastrzębska*, A. Hol, E. Szłyk, <i>Simultaneous and rapid determination of added phosphorus(V) compounds in meat samples by capillary isotachophoresis</i> , LWT-Food Science and Technology, 41 (2008) 2097-2103	1,887/		
H4	Wkład w autorstwo 70% Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, zaplanowaniu koncepcji pracy, przygotowaniu próbek do analiz, wykonaniu analiz spektrofotometrycznych, analizie wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości, korespondencji z redaktorem czasopisma i recenzentami.	2,929	20/40	13/14
	A. Jastrzębska*, <i>Modifications of spectrophotometric methods for total phosphorus determination in meat samples</i> , Chemical Papers, 63 (2009) 47-54	0,791/		
H5	Wkład w autorstwo 100% Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu pomiarów, analizie wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości, korespondencji z redaktorem czasopisma i recenzentami.	1,194	10/20	7/8
	A. Jastrzębska*, <i>Capillary isotachophoresis as rapid method for determination of orthophosphates, pyrophosphates, tripolyphosphates and nitrites in food samples</i> , Journal of Food Composition and Analysis, 24 (2011) 1049-1056	2,079/		
H6	Wkład w autorstwo 100% Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu pomiarów, analizie wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości, korespondencji z redaktorem czasopisma i recenzentami.	3,076	40/35	13/13
H7	A. Jastrzębska*, M. Kurzawa, A. Piasta, E. Szłyk, <i>Determination of histamine in some foods by</i>	1,969/	30/30	7/11

	<i>isotachophoretic method with simple sample preparation</i> , Food Analytical Methods, 5 (2012) 1079–1087	1,982		
	Wkład w autorstwo 65% Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu pomiarów izotachoforetycznych, dyskusji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości, korespondencji z redaktorem czasopisma i recenzentami.			
H8	A. Jastrzębska*, <i>A comparative study for determination of biogenic amines in meat samples by capillary isotachopheresis with two electrolyte systems</i> , European Food Research and Technology, 235 (2012) 563-572	1,436/ 1,778	30/30	10/10
	Wkład w autorstwo 100% Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu pomiarów, analizie wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości, korespondencji z redaktorem czasopisma i recenzentami.			
H9	A. Jastrzębska*, A. Piasta, E. Szłyk, <i>Simultaneous determination of selected biogenic amines in beverages samples by isotachophoretic and chromatographic methods</i> , Food Additives and Contaminants, Part A, 31 (2014) 83-92	1,802/ 2,194	30/30	5/6
	Wkład w autorstwo 75% Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, zaplanowaniu koncepcji pracy, wykonaniu pomiarów izotachoforetycznych, dyskusji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości, korespondencji z redaktorem czasopisma i recenzentami.			
H10	A. Piasta, A. Jastrzębska*, M.P. Krzemiński, T.M. Muzioł, E. Szłyk, <i>New procedure of selected biogenic amines determination in wine samples by HPLC</i> , Analytica Chimica Acta, 834 (2014) 58–66	4,513/ 4,667	45/45	17/17
	Wkład w autorstwo 40% Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu koncepcji pracy, dyskusji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości, korespondencji z redaktorem czasopisma i recenzentami.			
H11	A. Jastrzębska*, A. Piasta, S. Kowalska, M. Krzemiński, E. Szłyk, <i>A new derivatization reagent for determination of biogenic amines in wines</i> , Journal of Food Composition and Analysis, 48 (2016) 111-119	2,752/ 3,076	35/35	6/5
	Wkład w autorstwo 45% Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, zaplanowaniu koncepcji pracy, dyskusji uzyskanych wyników, przygotowaniu			

manuskryptu, redakcji całości, korespondencji z redaktorem czasopisma i recenzentami.				
A. Jastrzębska*, S. Kowalska, E. Szłyk, <i>Studies of levels of biogenic amines in meat samples in relation to the content of additives</i> , Food Additives and Contaminants, Part A, 33 (2016) 27-40				
				2,047/
H12	Wkład w autorstwo 65%			2,194
	Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na dokonaniu przeglądu literaturowego, zaplanowaniu koncepcji pracy, dyskusji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu, redakcji całości, korespondencji z redaktorem czasopisma i recenzentami.		30/30	2/2

* - autor do korespondencji

PODSUMOWANIE

Publikacje tworzące osiągnięcie habilitacyjne wykazują następujące wskaźniki bibliometryczne:

- sumaryczny współczynnik oddziaływania IF: **25,82 (5-letni 35,27)**
- średnia wartość IF: **2,15 (2,94)**
- sumaryczna punktacja MNiSW: **322 (za lata 2013-2016: 415)**
- średnia liczba punktów MNiSW: **26,83 (za lata 2013-2016: 34,58)**
- całkowita liczba cytowań na dzień 25.01.2018 (Web of Science/Scopus): **142/150**
- średni udział % habilitantki: **70% (od 40% do 100%)**

2.3. Omówienie celu i najważniejszych wyników osiągnięcia naukowego

2.3.1. Badania przed uzyskaniem stopnia doktora

W 1995 roku ukończyłam studia na kierunku chemia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu uzyskując tytuł zawodowy magistra. Praca dyplomowa, pod kierunkiem prof. dr hab. Bogusława Buszewskiego, dotyczyła opracowania warunków analizy siarki całkowitej w igłach sosny z wykorzystaniem detekcji kulometrycznej. Jej rezultaty zostały opublikowane w pracy [1]. W tym samym roku zostałam słuchaczem Studium Doktoranckiego na Wydziale Chemii, UMK. Rozprawę doktorską, przygotowaną pod kierunkiem prof. dr hab. Bogusława Buszewskiego, zatytułowaną „*Ekoanalitka wybranych ksenobiotyków za pomocą biowskaźników*”, obroniłam 12.01.2000 roku. Podczas realizacji rozprawy doktorskiej podjęłam próbę opisu procesów sorpcji i akumulacji wybranych zanieczyszczeń w różnych typach gleby i roślin. Jednym z głównych moich

osiągnąć było zaproponowanie równania opisującego te procesy w glebie i zastosowanie go do dalszych badań [2-5].

W roku 2000 zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Zakładzie Chemii Analitycznej Wydziału Chemii UMK. Doświadczenie zdobyte podczas studiów doktoranckich oraz uczestnictwo w kursie przygotowawczym nowoczesnych technik analitycznych „*Advances in Analytical Chemistry*” na Technical University w Eindhoven (Holandia) w ramach programu Tempus, pozwoliło mi na podjęcie nowego kierunku pracy badawczej. W konsekwencji przeglądu literaturowego oraz obserwowanego w środowisku naukowym zainteresowania szeroko pojętą analizą żywności przenieśliam swoje badania w tym kierunku. W latach 2002-2004 uczestniczyłam w realizacji grantu JM Rektora UMK (*Opracowanie nowych metodyk oznaczania makroelementów w formie kationowej i anionowej w żywności*), który umożliwił mi skompletowanie niezbędnego warsztatu badawczego pozwalającego na realizację założonych celów. W tym czasie skoncentrowałam się na wykorzystaniu nowej dla mnie metody analitycznej – izotachoforezy kapilarnej (ITP, cITP) zaliczanej do technik elektromigracyjnych, które wykorzystują zjawisko elektroforezy do rozdzielania cząsteczek obdarzonych ładunkiem, w stałym polu elektrycznym [6-8].

Czynnikami, które zdecydowały o wybraniu izotachoforezy kapilarnej, jako głównej metody pomiarowej były jej zalety, takie jak: uproszczona procedura przygotowania próbki, specyficzność i mała szkodliwość odpadów dla środowiska. Ponadto ITP cechuje się czułością oraz dokładnością na poziomie ppm, jest niskonakładowa i tym samym łatwa do zastosowania w laboratoriach naukowych i przemysłowych. Dzięki odpowiednim rozwiązaniom technicznym możliwa jest praca w układzie jednokolumnowym i dwukolumnowym (ITP-ITP; cITP-cITP) oraz połączenie z elektroforezą kapilarną (ITP-CZE; cITP-CZE) [9, H3]. Metoda ta znajduje coraz więcej zastosowań w analizie żywności [10], a możliwość jej łączenia, w różnych konfiguracjach, pozwala analizować większość kationów i anionów występujących w żywności.

Przeprowadzone studia literaturowe zwróciły moją uwagę na konieczność kompleksowego spojrzenia na problemy analizy żywności, a w szczególności zawartości składników, które decydują o jej bezpieczeństwie. Realizując założenia rozprawy habilitacyjnej skoncentrowałam się na opracowaniu procedur oznaczania wybranych amin biogennych oraz fosforanowych dodatków funkcjonalnych, których ilość w żywności powinna być rozpatrywana w kontekście pozytywnych i negatywnych efektów dla jakości żywności. Ich obecność w artykułach spożywczych (naturalna lub celowo dodana) jest

pożądana ze względu na udział w procesach fizjologicznych, kształtowanie cech sensorycznych, wpływ na jakość żywności, wartość odżywczą czy w przypadku związków fosforu(V) okres przydatności do spożycia. Ponadto analiza zawartości amin biogennych w żywności może stanowić wskaźnik jej czystości mikrobiologicznej, stąd opracowanie metod ich oznaczania jest istotne.

2.3.2 Cel badań

Przedstawione powyżej fakty pozwoliły na określenie celu badawczego - **poszukiwania nowych procedur oznaczania wybranych składników naturalnych lub dodanych w żywności**, które byłyby alternatywą do opisanych w literaturze, bądź normowanych przez prawo żywnościowe. Cel ten wymagał wykonania zadań badawczych, które określiłam poniżej:

1. opracowanie nowych metod oznaczania jonów fosforanowych(V) oraz fosforu całkowitego w żywności;
2. opracowanie nowych metod oznaczania amin biogennych w żywności.

2.3.3. Opracowanie nowych metod oznaczania fosforanów(V) w żywności

Popularność związków fosforu(V) stosowanych w przemyśle spożywczym wynika z ich wielostronnego działania. Mają one wpływ na: kształtowanie pH produktu, oddziaływanie na fizykochemiczne cechy układów koloidalnych, zwiększanie wodochłonności, poprawianie emulgowania tłuszczu i barwy produktu oraz działanie stabilizujące [11]. Związki fosforu stosowane jako dodatki funkcjonalne do żywności są prawie całkowicie wchłaniane w przewodzie pokarmowym co może powodować, m.in. uszkodzenia naczyń krwionośnych czy indukowanie procesów starzenia się organizmu [12]. Pomimo trendu do obniżania zawartości tych związków w produktach spożywczych problem jest wciąż aktualny. Wobec powyższego poszukiwania nowych metod analizy ilościowej fosforanowych dodatków do żywności są istotne z punktu widzenia kontroli jakości produkcji. W oznaczaniu fosforanów(V) stosuje się metody: spektroskopowe [13,14, **H5**], chromatograficzne [15,16] oraz elektromigracyjne [17,18]. Określenie całkowitej zawartości tych związków w żywności nie daje informacji o ryzyku spowodowanym ich obecnością. Dopiero znajomość stężenia form anionowych mogących brać udział w przemianach biochemicznych daje pełen obraz ryzyka. Poszukując najlepszych metod oznaczania związków fosforu(V) przetestowałam znaczną część z nich, co pozwoliło na znalezienie najlepszych rozwiązań analitycznych.

Opracowanie procedury oznaczania zawartości fosforu całkowitego

Badania literaturowe zwróciły moją uwagę na walory metody spektroskopii fluorescencji rentgenowskiej (XRF) [H1, 19], która nie niszczy matrycy, charakteryzuje się krótkimi czasami analizy, prostym etapem przygotowaniem próbki i możliwością oznaczania wielu pierwiastków w próbce. Pomimo dużej uniwersalności fluorescencja rentgenowska jest w porównaniu do innych metod stosunkowo rzadko stosowana w analizie żywności. Wykorzystałam metodę fluorescencyjnej spektrometrii rentgenowskiej z rozpraszaniem długości fali (WD-XRF) do oznaczania fosforu całkowitego w żywności sojowej (zawierającej ziarna soi genetycznie zmodyfikowanej oraz niepoddawanej modyfikacjom) i wybranych produktach przemysłu mleczarskiego [H1]. Do kalibracji zastosowałam standaryzowane popioły (*BCR 176; SRM2690 i ASCR-010*), co jednocześnie pozwoliło zminimalizować efekty matrycowe. Jako metodę odniesienia wykorzystałam metodę spektrofotometryczną (procedura tworzenia błękitu molibdenofosforowego z zastosowaniem siarczanu hydrazyny jako reduktora). Biorąc pod uwagę inną metodę przygotowania próbek (suszenie w 200⁰C dla XRF i mineralizacja sucha dla metody błękitu molibdenofosforowego) uzyskana korelacja pomiędzy metodami (współczynnik determinacji, $R^2=0,9285$) była satysfakcjonująca. Dokładność zaproponowanej procedury testowałam za pomocą analizy materiału odniesienia o certyfikowanej zawartości fosforu (*NIST-non FAT milk powder*). Uzyskane wyniki dla badanych próbek oraz materiału odniesienia i ich parametry statystyczne potwierdziły, że zaproponowana procedura oznaczania fosforu metodą WD-XRF jest czuła, precyzyjna i dokładna, a dodatkowo charakteryzuje się krótkim czasem analizy.

Ze względu na te zalety, opracowaną procedurę zastosowałam również do określenia zawartości fosforu w próbkach mięsa oraz mięsa wzbogacanego znaną ilością jonów di- i trifosforanowych oraz poddanych różnym sposobom przygotowania do analizy [19]. Była to pierwsza próba wykorzystania tej metody do ilościowych analiz w tak skomplikowanych matrycach, jakimi są próbki mięsa. Uzyskane wyniki potwierdziły opisywane wcześniej zalety WD-XRF w analizie ilościowej przy znacznym skróceniu procedury przygotowania próbek (suszenie w 105⁰C, sproszkowanie) [19].

Warto zwrócić uwagę na badane w pracy [H1] próbki żywności sojowej, której głównym komponentem było ziarno soi poddane modyfikacjom genetycznym. W pracy [H1] wykazałam istotne różnice zawartości fosforu całkowitego w produktach sojowych zawierających w składzie genetycznie zmodyfikowane ziarna oraz niepoddawane modyfikacjom, które mogły wynikać z różnych technik produkcyjnych, rodzaju

zastosowanego ziarna lub zmian wynikających z modyfikacji. Problem dotyczący opracowania szybkiej procedury oznaczania fosforu całkowitego w produktach pochodzenia sojowego kontynuowałam dalej w pracy [H2]. Przedmiotem badań były sojowe półprodukty spożywcze oznaczone jako niemodyfikowane genetycznie (*IP NON GMO certificate*) oraz ziarno sojowe (*Clear Hilium*). Jako metodę analityczną zastosowałam izotachoforezę kapilarną, która po raz pierwszy została zaproponowana do oznaczania tego pierwiastka w produktach sojowych. Kolejnym elementem nowości było zastosowanie procedury zieleni malachitowej (MG)¹, opartej na reakcji tworzenia asocjatów jonowych kwasu molibdenofosforowego z zielenią malachitową, jako metody odniesienia. Dla lepszego porównania jakości wyników uzyskanych dla obu procedur analizowałam zawartość fosforu w materiale odniesienia (*NIST-non FAT milk*), a uzyskane wartości wykazały lepszą dokładność proponowanej metody w stosunku do metody spektrofotometrycznej. Procedura ITP charakteryzowała się lepszymi parametrami statystycznymi dla uzyskanych zawartości badanego pierwiastka (powtarzalność, dokładność) oraz zdecydowanie krótszym czasem analizy. Uzyskane wyniki opisałam w pracy [H2].

Metody spektrofotometryczne w analizie związków fosforu(V) z wykorzystaniem reakcji tworzenia błękitu fosforomolibdenowego czy molibdenowanadofosforowego są wciąż popularne, a dodatkowo często stanowią metody normowane – np.: procedura oznaczania fosforu całkowitego w mięsie [PN-ISO 13730, 1999]. Jej główną wadą jest czułość i dokładność. Opisana w pracy [H2] procedura tworzenia asocjatów jonowych pomiędzy błękitem molibdenofosforanowym a zielenią malachitową (MG) polepszyła te dwa istotne parametry. Biorąc pod uwagę czułość metody oraz jej możliwości aplikacyjne do oznaczania zawartości fosforu w produktach mięsnych postanowiłam porównać ją z procedurami opartymi na tworzeniu błękitu molibdenofosforowego z wykorzystaniem trzech reduktorów: kwasu askorbinowego (AA), siarczanu hydrazyny (HS) i mieszaniny hydrochinonu z siarczanem hydrazyny (HHS) [H5]. Proces walidacji prowadziłam określając: liniowość, czułość (wartość molowego współczynnika absorpcji), granice wykrywalności i oznaczalności oraz zakres pomiarowy, powtarzalność, precyzję pośrednią oraz dokładność z wykorzystaniem materiałów odniesieniach o certyfikowanej zawartości fosforu (*SMRD 2000; RF 8414, NIST-1568A i NIST-1549*). Testowane metody wykorzystałam do oznaczania całkowitej zawartości fosforu w próbach mięsa po mineralizacji mokrej. Pod względem

¹ W autoreferacie zastosowano zwyczajowe nazwy związków chemicznych - nazwy IUPAC/systematyczne zebrano w rozdziale 3.

czułości najlepsze okazały się procedury z AA oraz MG, dla których wartość molowego współczynnika absorpcji wynosiła odpowiednio: $1,19 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ oraz $8,98 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$. Jednak pozostałe wyniki analiz oraz obliczeń statystycznych [H5] porównujących testowane procedury z PN-ISO 13730, 1999 sugerują, że metoda z wykorzystaniem błękitu molibdenofosforowego, przy zastosowaniu jako reduktora mieszaniny hydrochinonu z siarczanem hydrazyny, charakteryzowała się najlepszymi parametrami analitycznymi. Na uwagę zasługuje również fakt, że była to jedyna procedura, dla której zaobserwowano stałość absorbancji w czasie do 120 minut. Pozwoliło to na sformułowanie wniosku, że biorąc pod uwagę: prostotę, dokładność, czułość, stabilność wartości absorbancji procedura ta może stanowić alternatywną metodę oznaczania fosforu całkowitego w próbkach żywnościowych w odniesieniu do zalecanej wówczas metody normowanej.

Opracowanie metody analizy fosforanów(V) w próbkach żywności

Opracowane powyżej przeze mnie procedury, podobnie jak większość powszechnie stosowanych (wg standardów PN lub EU), spełniają wymagania stawiane metodom oznaczania całkowitej zawartości fosforu lub fosforanów(V). W literaturze brak było natomiast metody, która umożliwiałaby bezpośrednią analizę anionów fosforanowych(V) dodanych do żywności w procesie technologicznym. Biorąc pod uwagę opisane wcześniej zalety metody izotachoforezy kapilarnej, postanowiłam w dalszej części mojej działalności naukowej opracować nowe procedury oznaczania jonów fosforanowych(V).

W pracy [H3] zaproponowałam trzy kombinacje izotachoforezy kapilarnej (ITP): jednokolumnową (*one-dimensional* ITP); dwukolumnową (*two-dimensional* ITP-ITP) oraz izotachoforezę kapilarną w połączeniu z elektroforezą kapilarną (ITP-CZE) do oznaczania trifosforanu pentasodowego (STPP) w próbkach przetworów mięsnych. Jako metodę odniesienia do oznaczania całkowitej zawartości fosforu wykorzystałam metodę normowaną [PN-ISO 13730, 1999], a próbki poddawałam mineralizacji suchej. Ponieważ normowana metoda oznaczania STPP w żywności nie została zdefiniowana, uzyskane wyniki porównałam z metodą Kjeldahl'a.

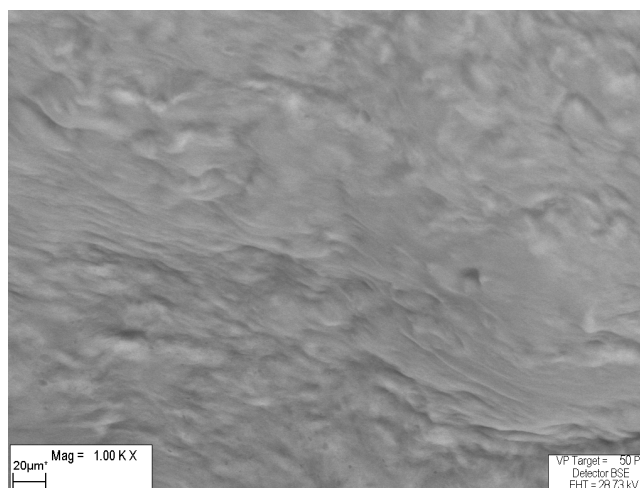
Warto podkreślić, że była to nowatorska praca, ponieważ w tym czasie tematykę oznaczania polifosforanów za pomocą ITP opisywały nieliczne prace [20, 21]. Jako pierwsza opisałam połączenie izotachoforezy z elektroforezą kapilarną do analizy jonów trifosforanowych(V) w złożonych matrycach, jakimi były próbki produktów mięsnych. Techniki elektromigracyjne są szczególnie podatne na wpływ matrycy, z uwagi

na oddziaływanie składników próbki na proces rozdzielania analitu. Dlatego problem ten każdorazowo należy rozwiązywać poprzez optymalizowanie procedury dla indywidualnych analiz, co zostało przedyskutowane w pracy [H3] w kontekście STPP. Kolejnym problemem była hydroliza trifosforanów(V) w roztworach wodnych oraz w matrycy badanych próbek żywnościowych. Dlatego, na etapie przygotowania prób zaproponowałam dodatek buforu boranowego do otrzymanych ekstraktów. Uzyskane wyniki, zarówno parametrów walidacyjnych metody oraz oznaczania STPP w próbkach żywnościowych, pozwalają na sformułowanie wniosku o przydatności metody ITP-CZE do założonego celu. Zastosowanie izotachoforezy jako pierwszego etapu analizy pozwala na eliminację wpływu matrycy i zapewnia selektywne zateżanie STPP, co skutkuje lepszymi parametrami statystycznymi. Do zalet zaproponowanej procedury ITP-CZE zaliczyć można czułość, powtarzalność, dokładność, niskie koszty eksploatacji oraz brak konieczności stosowania etapu oczyszczania próbki. Pozwala to na wykorzystanie tej metody do analizy ilościowej związków jonowych występujących w śladowych ilościach w obecności innych, dominujących składników próbek mięsa.

Problematykę poszukiwania metod oznaczania związków fosforu(V) w mięsie za pomocą izotachoforezy kapilarnej kontynuowałam w pracy [H4]. Przetestowałam proces rozdzielania następujących soli podczas jednego cyklu pomiarowego: $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$ (TTP), $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ (STP), $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (SHP), $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (PP), KH_2PO_4 (OP). Głównym celem pracy było opracowanie parametrów izotachoforetycznej procedury (skład elektrolitów, warunki analizy, sposób przygotowania próbek), które skróciłyby czas trwania analizy oraz uprościły analizę ilościową w bardzo złożonej matrycy. Materiał badawczy stanowiły próbki mięsa, do których wprowadziłam badane związki fosforu(V). Testowałam trzy sposoby przygotowania prób do analizy: ekstrakcję z 1 mM NaOH (analiza rozpuszczalnych fosforanów(V)), ekstrakcję połączoną z kwaśną hydrolizą (analiza fosforanów nieorganicznych w przeliczeniu na fosforany(V)) oraz mineralizację suchą (całkowita zawartość fosforu). Jako metodę odniesienia wykorzystałam metodę normowaną [PN-ISO 13730, 1999]. Warto podkreślić, że była to pierwsza praca podchodząca tak kompleksowo do oznaczania związków fosforu(V) w próbkach żywnościowych.

Opisana w pracy [H4] procedura jednoczesnego oznaczania fosforanów(V), difosforanów(V) i trifosforanów(V) wykorzystywała prosty układ elektrolitów (LE: 5 mM HCl + β -alanina do pH = 4,5 oraz TE: 5 mM kwas glutaminowy). Strefy dla jonów orto-, di- i trifosforanów(V) były wyraźnie rozdzielone, co potwierdziły wartości parametru

jakościowego – wysokość strefy pochodzącej od oznaczanego składnika do linii podstawowej (Relative Step Height, RSH). Zaproponowaną procedurę poddałam walidacji testując: precyzję, precyzję pośrednią pomiarów parametru jakościowego (RSH), liniowość krzywych kalibracji badanych jonów, granice wykrywalności i oznaczalności oraz dokładność. Uzyskane wyniki porównywałam z metodą odniesienia, a wykonane testy statystyczne (test t-Studenta i F-Snedecora) potwierdziły porównywalną precyzję i dokładność obu metod. Wykorzystałam materiał odniesienia z certyfikowaną zawartością fosforu (*SMRD 2000, fresh pork*) do oceny dokładności zaproponowanej procedury. Ponieważ zakup materiału odniesienia o skomplikowanej matrycy żywnościowej i certyfikowanej zawartości polifosforanów był niemożliwy, więc zastosowałam materiał badawczy spreparowany w warunkach laboratoryjnych. Badane związki fosforu dodawałam pojedynczo do próbek mięsa wieprzowego, które następnie rozcierałam dążąc do uzyskania jednorodnej matrycy. W celu potwierdzenia, że metoda bezpośredniego wprowadzania soli fosforanowych(V) do badanych materiałów żywnościowych jest odpowiednia wykonałam zdjęcia skaningowym mikroskopem elektronowym (SEM) z detektorem elektronów wtórnych powierzchni badanej próbki (opisaną częściowo w pracy mojego współautorstwa [22]). Stąd jednym z rezultatów rozprawy habilitacyjnej jest opracowanie metody wytwarzania, w warunkach laboratoryjnych, materiału odniesienia zawierającego związki fosforu (Rys. 1).



Rys. 1. Obraz SEM fragmentu próbki mięsa z dodatkiem $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ [22]

Warto podkreślić, że zaproponowana przeze mnie procedura wzbogacania próbek mięsa w związki fosforu(V), ekstrakcja z 1 mM NaOH i ekstrakcja w połączeniu z kwaśną hydrolizą oraz procedura izotachforetycznego oznaczania jonów fosforanowych(V) pozwoliła również na obserwację procesu hydrolizy tych związków w mięsie. Próbkę badałam po wymieszaniu

z dodanymi związkami (1h) oraz podczas kolejnych 5 dni, co pozwoliło mi na określenie dynamiki zmian zachodzących w badanej matrycy [H4]. Ciekawym spostrzeżeniem był fakt, że po 5 dniach obserwacji oznaczona zawartość jonów fosforanowych(V) oraz pozostałych polifosforanów w badanych próbkach była na zbliżonym poziomie bez względu na rodzaj dodanego do próbki związku fosforu(V).

Praca [H6] stanowi podsumowanie badań nad wykorzystaniem izotachoforezy kapilarnej do oznaczania zawartości dodatków funkcjonalnych w żywności. Zaproponowałam w niej dwa systemy elektrolitów do jednoczesnego oznaczania jonów trifosforanowych(V), difosforanowych(V), azotanowych(III) i (V) w próbkach żywnościowych (9 produktów mięsnych oraz 6 próbek „owoców morza”). Dodatkowo oznaczyłam zawartość fosforu całkowitego metodą normowaną po mineralizacji utleniającej wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym oraz białka i fosforu fizjologicznego metodą Kjeldahla. Pozwoliło to na wyznaczenie z różnicy pomiędzy fosforem całkowitym a fizjologicznym zawartości fosforu dodanego w procesie produkcyjnym, co wykorzystałam do porównania wyników dla polifosforanów oznaczonych metodą ITP.

Oba testowane układy A (LE: 10 mM HCl + 3 mM bis-tris-propan + 0,2% hydroksyetyloceluloza, HEC + β -alanina do pH = 3,6; TE: 5 mM kwas cytrynowy) i B (LE: 10 mM HCl + 0,02% HEC + glicyna do pH = 3; TE: 10 mM kwas fosforowy(V)) charakteryzowały się satysfakcjonującą zdolnością rozdzielania podczas jednego cyklu pomiarowego oraz parametrami statystycznymi (precyzja, odzysk) dla wszystkich badanych jonów. Sugerowały to wartości współczynników parametru jakościowego (RSH) oraz precyzja i precyzja pośrednia ich wyznaczania. Jednak analizując uzyskane dla układu elektrolitów A wyniki analizy próbek zwróciłam uwagę na duży wpływ matrycy próbki na rozdzielanie izotachoforetyczne badanych anionów i mieszanie się stref pochodzących od jonów difosforanowych(V) i trifosforanowych(V). Dlatego zaproponowałam układ elektrolitów B, który polepszył proces rozdzielania tych anionów.

Bazując na wynikach przedstawionych w pracy [H6] mogę stwierdzić, że oba zaproponowane układy elektrolitów charakteryzowały się satysfakcjonującymi parametrami analizy jakościowej, wybranymi parametrami walidacyjnymi metody oraz krótkimi czasami analizy. Ponadto oba układy mogą znaleźć zastosowanie jako szybkie metody oznaczania wybranych dodatków funkcjonalnych żywności w laboratoriach zajmujących się tego typu analizami.

Podsumowując, opracowane przeze mnie procedury charakteryzuje duża uniwersalność, przy jednoczesnych możliwościach rozdzielania wielu analitów w jednym cyklu pomiarowym, precyzja oraz dokładność wymagana w analizie żywności, a także skrócony czas analizy. Dodatkową zaletą opracowanych procedur jest uproszczony etap przygotowania próbek oraz stosowanie odczynników przyjaznych środowisku, co w połączeniu z łatwością eksploatacji powoduje, że opracowane procedury spełniają warunki, jakie stawiane są metodom o dużym potencjale aplikacyjnym. Tym samym można przyjąć, że zaproponowane procedury analizy fosforowych dodatków funkcjonalnych (ITP oraz ITP-CZE) stanowią alternatywę do istniejących. Wymienione cechy sugerują możliwość ich zastosowania w badaniach naukowych, laboratoriach kontroli jakości żywności producenta i państwowych jednostek kontroli jakości żywności. Ponadto opracowane w ramach osiągnięcia naukowego procedury oznaczania fosforanów(V), difosforanów(V) oraz trifosforanów(V) w różnych grupach żywności za pomocą izotachoforezy kapilarnej (jedno- lub dwukolumnowej), pozwalają na śledzenie przemian tych związków w roztworze oraz w matrycy stałej.

Efekty naukowe

1. Zmodyfikowałam metody oznaczania zawartości fosforu całkowitego w żywności poprzez opracowanie nowych procedur z wykorzystaniem fluorescencyjnej spektrometrii rentgenowskiej z rozpraszaniem długości fali, izotachoforezy kapilarnej oraz spektrofotometrii - oznaczanie fosforu za pomocą błękitu fosforomolibdenowego w obecności mieszaniny hydrochinonu z siarczanem hydrazyny jako reduktora.
2. Opracowałam procedurę oznaczania jonów trifosforanowych(V) za pomocą jedno – i dwukolumnowej izotachoforezy kapilarnej oraz izotachoforezy w połączeniu z elektroforezą kapilarną.
3. Opracowałam nowe procedury jednoczesnego oznaczania fosforanów(V), difosforanów(V) i trifosforanów(V) w obecności innych jonów metodą izotachoforezy kapilarnej.
4. Opracowałam sposób oraz warunki etapu przygotowania próbek żywnościowych do ich analizy pod kątem zawartości fosforu całkowitego oraz związków fosforu(V).

Efektem realizacji założeń tej części rozprawy habilitacyjnej jest sześć publikacji wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej [H1-H6]. O jakości uzyskanych wyników świadczy liczba cytowań prac [H1] (31, Web of Science) oraz [H3] (22, Web of Science). Ponadto wyniki badań prezentowałam osobiście w formie: 5 komunikatów ustnych

na konferencjach krajowych, 6 posterów na konferencjach międzynarodowych i 5 na konferencjach krajowych oraz jako współautor w formie: 3 posterów na konferencjach międzynarodowych, 6 wystąpień ustnych oraz 5 posterów na konferencjach krajowych.

Realizując założenia tej części osiągnięcia naukowego współpracowałam z dr Tomaszem Szymańskim (WD XRF), doktorantką mgr Bożeną Brudką (Wydział Chemii UMK) oraz doktorantką programu Tempus Aysen Hol (Faculty of Science and Art, Pamukkale University, Turcja - opieka naukowa nad stażystką 04.10. 2006 do 6.02.2007). Ponadto część badań dotyczących metod oznaczania związków fosforu była przedmiotem 3 prac magisterskich, których byłam promotorem oraz 10 prac magisterskich, których byłam opiekunem naukowym.

2.3.4. Analiza amin biogennych w żywności

Drugą grupą analitów, badanych w ramach prac w kierunku osiągnięcia habilitacyjnego, były aminy biogenne (AB). Związki te mogą potencjalnie występować w każdym produkcie żywnościowym zawierającym białka lub wolne aminokwasy, który narażony zostanie na działanie bakterii lub procesów biochemicznych. Z reguły są pożądanymi związkami o dużej aktywności biologicznej i w niewielkich ilościach nie stanowią zagrożenia dla zdrowia człowieka. Niestety zbyt duże stężenie AB w żywności może powodować negatywne skutki fizjologiczne oraz przyczyniać się do zatruć (histamina, tyramina) i nietolerancji pokarmowych [23,24]. Ma to niewątpliwie wpływ na duże zainteresowanie ich analizą [25,26]. Oznaczanie AB w żywności wciąż należy do trudnych zadań analitycznych ze względu na ich budowę chemiczną, małą zawartość w produktach żywnościowych oraz złożoność badanych matryc. Dlatego realizując założenia osiągnięcia habilitacyjnego jako jednym z postawionych celów było opracowanie prostej i szybkiej metody analizy AB w żywności.

Opracowanie warunków ekstrakcji i rozdzielania izotachforetycznego w oznaczaniu amin biogennych

Kiedy rozpoczęłam swoje badania w kierunku opracowania nowych procedur oznaczania amin biogennych, dostępne były tylko dwa doniesienia literaturowe dotyczące izotachforetycznego oznaczania histaminy (Him), kadaweryny (Kad), putrescyny (Put) i tyraminy (Tyr) w różnych grupach żywności [27] oraz histaminy w rybach i przetworach z ryb [28]. Realizację założeń osiągnięcia naukowego rozpoczęłam od izotachforetycznego oznaczania zawartości histaminy w produktach żywnościowych [H7] korzystając z układu

elektrolitów opisanego w pracy [27]. Szczególną uwagę poświęciłam opracowaniu odpowiedniej metody ekstrakcji histaminy z prób żywności. Ze względu na różnorodność badanych prób (mięso, produkty mięsne, wędzone ryby oraz sery) konieczne było przetestowanie różnych ekstrahentów. Bazując na przeglądzie literaturowym, do tego celu zaproponowałam kwas chlorowodorowy (0,05M-1M), azotowy(V) (1%-5%), octowy (0,01%-2%) i trichlorooctowy (1%-5%). Do oceny skuteczności zaproponowanych ekstrahentów wykorzystałam własne materiały odniesienia (próby mięsa o znanej zawartości amin biogennych) przygotowane zgodnie z opracowaną przeze mnie wcześniej procedurą (punkt 2.3.3). Najlepsze rezultaty (pod względem precyzji i dokładności) uzyskałam dla 2% kwasu trichlorooctowego, który zastosowałam do ekstrakcji prób żywnościowych w pracach [H7] i [H8].

Wyniki dla procedury izotachforetycznej porównałam z wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC) z detekcją UV-Vis uzyskując lepszą dokładność (metoda dodatku wzorca) i precyzję uzyskanych wyników dla metody ITP [H7]. Generalnie, uzyskane zawartości Him w badanych próbach były wyższe dla metody HPLC (od 1,13 mg·100g⁻¹ do 8,00 mg·100g⁻¹) jednak korelacja pomiędzy metodami była satysfakcjonująca, co potwierdziły testy statystyczne. Podsumowując, zaproponowana procedura bazująca na prostym przygotowaniu stałych próbek żywnościowych oraz izotachforetycznej analizie zawartości histaminy okazała się konkurencyjna do metody chromatograficznej.

Następnie skoncentrowałam się na poszukiwaniach najlepszego układu elektrolitów do oznaczania w jednym cyklu pomiarowym najważniejszych amin biogennych (AB): kadaweryny, putrescyny, histaminy, spermine (Sperm), spermidyny (Sperd), tyraminy, tryptaminy (Trypt) oraz 2-feniloetyloaminy (Fenyl) [H8, H9] obecnych w żywności.

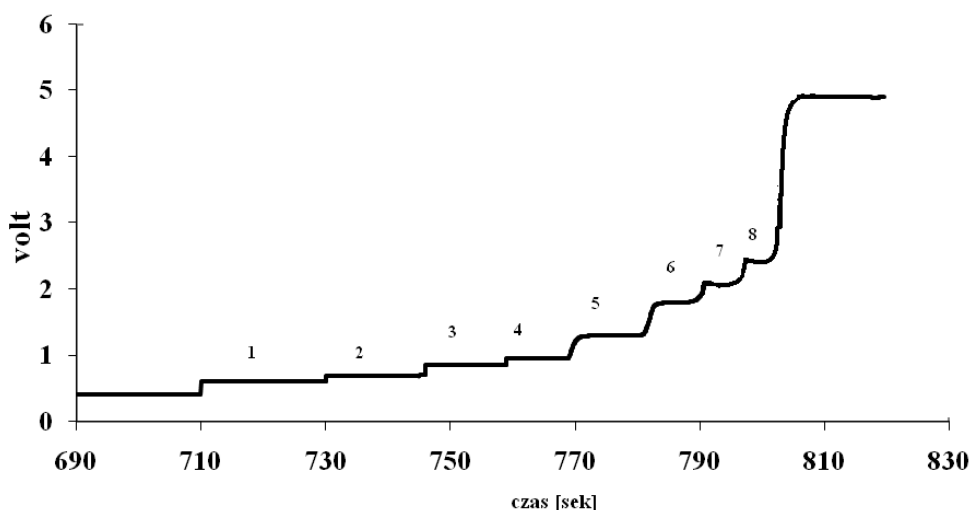
Podczas realizacji tego etapu przetestowałam:

1. rodzaj jonów wiodących oraz ich stężenie w zakresie od 1 mM do 20 mM (KOH; Ba(OH)₂; NaOH; CH₃COOK),
2. obecność przeciwjonów elektrolitu wiodącego oraz wartość pH w zakresie 7-11 (walina; kwas 2-(n-morfolino)etanosulfonowy; glutamina; kwas octowy; histydyna, glicyl-glicyna; kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazylo]etanosulfonowy),
3. rodzaj jonów kończących oraz ich stężenie w zakresie od 1 mM do 20 mM (tris(hydroksymetylo)aminometan; kwas 6-aminoheksanowy; β-alanina; histamina).

Dobierając układy elektrolitów zwróciłam uwagę na ich zdolność rozdzielania badanych amin, parametry analizy: selektywność, precyzję i precyzję pośrednią,

odtwarzalność, liniowość, granice wykrywalności i oznaczalności oraz dokładność. Powyższe cechy metody testowałam zarówno dla parametru ilościowego ITP (długości stref dla oznaczanych AB), jak i jakościowego (wysokość względna strefy, RSH).

Najlepsze rezultaty uzyskałam stosując KOH i Ba(OH)₂ jako jony wiodące, zaś najlepszą stabilność pH dla waliny i glicyny (pH 8-9). Dla elektrolitu kończącego najlepsze parametry procesu rozdzielania badanych amin biogennych uzyskałam dla tris(hydroksymetylo)aminometanu (Tris) przy pH 8-9. Reasumowując, najlepsze parametry procesu jednoczesnego rozdzielania wybranych AB spełniał, zmodyfikowany przeze mnie układ elektrolitów, zaproponowany przez Rubach i współ. [28] do oznaczania histaminy w rybach. Zmiana wartości pH elektrolitu wiodącego oraz zastosowanie 1% hydroksyetylocelulozy (HEC) jako dodatku konwekcyjnego pozwoliło na jednoczesne oznaczanie 8 amin biogennych (Kad, Put, Him, Sperm, Sperd, Tyr, Trypt oraz Fenyl) w czasie 15 minut (Rys. 2).



Rys. 2. Izotachoforegram mieszanki amin biogennych uzyskany dla LE: 5 mM Ba(OH)₂ + 15 mM walina + 1% HEC, pH=8,5, TE: 20mM Tris + 0,1 M HCl, pH= 8,3; gdzie 1- Sperd; 2 - Sperm; 3 - Kad; 4 - Put; 5 – Fenyl; 6 – Him; 7 – Trypt; 8 - Tyr

Opracowany układ wykorzystałam do oznaczania AB w próbach mięsa [H8] oraz napojach alkoholowych [H9]. Dodatkowo w pracy [H8] zaproponowałam nowy elektrolit kończący (TE: 20 mM histamina), który znacząco polepszył parametry procesu rozdzielania czterech poliamin: kadaweryny, putrescyny, spermidyny i sperminy w skomplikowanej matrycy jaką jest mięso. Oba zaproponowane układy elektrolitów charakteryzowała

satysfakcjonująca precyzja, precyzja pośrednia oraz dokładność. Ponadto wykonane testy statystyczne potwierdziły brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy uzyskanymi dla Sperm, Sperd, Put i Kad wynikami.

Kolejnym elementem pracy [H8] była ocena zmian zawartości badanych amin biogennych w mięsie podczas przechowywania w temperaturze 4⁰C w czasie 5 dni. Pozwoliło to na zaproponowanie wskaźników jakości mięsa, jakimi okazały się putrescyna i kadaweryna oraz określenie zmian zachodzących w mięsie jakie implikuje rosnąca zawartość tych poliamin.

Warto podkreślić, że jako pierwsza wykorzystałam zalety metody ITP do rozdzielania tak znacznej liczby AB w żywności. Zaproponowane przeze mnie procedury pozwalają na szybką analizę omawianych amin biogennych, bez konieczności stosowania etapu tworzenia pochodnych oraz przy wykorzystaniu prostego sposobu przygotowania próbek, opartego na procesie ekstrakcji, bez konieczności oczyszczania czy zateżania próbek. Dodatkowo możliwość jednoczesnej analizy badanych analitów przez układ dwóch kolumn pozwala na znaczne rozszerzenie zakresów stężeń oraz zateżenie próbek podczas etapu analizy.

Badania nad wykorzystaniem procedury ITP do oznaczania amin biogennych kontynuowałam w pracy [H9] do oznaczania: kadaweryny, putrescyny, sumy spermidyny i sperminy, histaminy, tyraminy, tryptaminy i 2-feniloetylaminy w próbkach napojów alkoholowych. Uzyskane wyniki porównałam z metodą HPLC z detekcją UV-Vis stosując przedkolumnową konwersję amin za pomocą chlorku 5-(dimetylamino)nafaleno-1-sulfonylu (chlorku dansyl). Dla procedury przekształcania AB w pochodne testowałam stężenie i pH stosowanego buforu, ilość chlorku dansylu, obecność rozpuszczalników organicznych oraz czas i temperaturę reakcji. Dobór odpowiednich warunków pozwolił na chromatograficzną analizę tryptaminy, kadaweryny, histaminy, tyraminy, sumy sperminy i spermidyny oraz sumy 2-feniloetyloaminy i putrescyny. Porównanie uzyskanych wyników dla obu metod pokazało zalety wykorzystania ITP w stosunku do HPLC, takie jak: brak etapu przekształcania amin w pochodne, lepsze parametry procesu rozdzielania (możliwość analizy 2-feniloetyloalaniny i putrescyny). Ponadto dzięki procesowi zateżania podczas przepływu w pierwszej kolumnie, oznaczałam aminy biogenne na poziomach stężeń niemożliwych do osiągnięcia dla HPLC, a dokładność oraz precyzja uzyskanych wyników była porównywalna do HPLC. Przeprowadzone badania pokazały, że aminą najczęściej występującą w badanych napojach alkoholowych była putrescyna. Dodatkowo we wszystkich

badanych próbkach piw stwierdziłam obecność tyraminy. Należy również podkreślić, że opracowana przez mnie procedura izotachoforetycznego oznaczania amin biogennych wpisuje się w założenia „zielonej chemii analitycznej”.

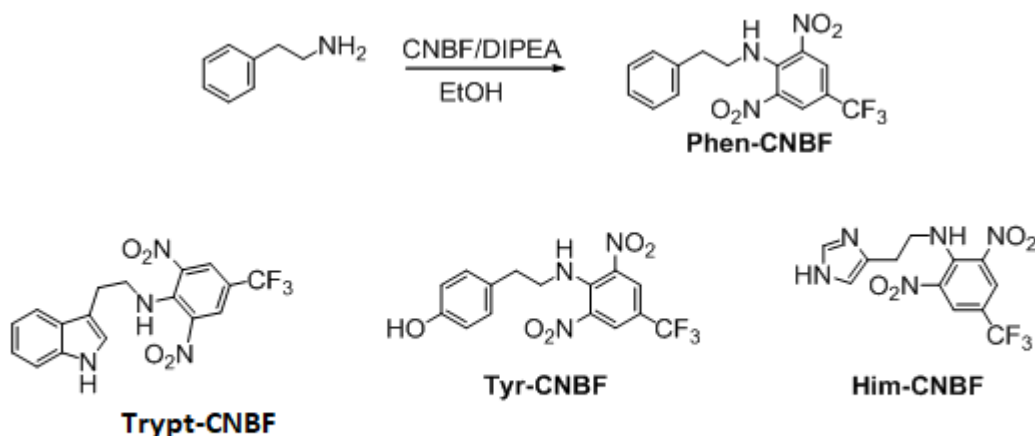
Aplikacyjny charakter opracowanej procedury oznaczania AB za pomocą ITP oraz jej duże możliwości zastosowań ilustrują wyniki zebrane w pracy [H12]. Opisaną w pracy [H8] procedurę wykorzystałam do oceny zmian zachodzących podczas przechowywania mięsa zawierającego odpowiednie dodatki funkcjonalne. Wykorzystałam fakt, że zawartość AB w mięsie i jego produktach można wykorzystać jako wskaźnik świeżości lub niewłaściwego przechowywania mięsa. Próby mięsa przygotowywano poprzez nastrzykiwanie pojedynczych związków należących do grupy konserwantów: azotan(III) sodu, disiarczan(IV) sodu, chlorek sodu, sorbinian potasu; przeciwutleniaczy: α -tokoferol, kwas askorbinowy, galusan propylu, butylowany hydroksyanizol; regulatorów kwasowości i emulgatorów: kwas cytrynowy, kwas mlekowy, diwodorodifosforan(V) sodu. Była to pierwsza praca opisująca korelacje pomiędzy zawartością bakterii a obecnością amin biogennych pojawiających się w mięsie w zależności od rodzaju zastosowanego dodatku funkcjonalnego. Przeprowadzone badania wykazały wzrost zawartości kadaweryny i putrescyny we wszystkich badanych próbkach bez względu na rodzaj zastosowanego dodatku, co sugeruje, że proces ich powstawania (bądź w wyniku dekarboksylacji lizyny i ornityny bądź w wyniku procesów rozpadu białka) jest trudny do zatrzymania.

Opisane w pracy [H12] badania potwierdzają uniwersalność i elastyczność opracowanej procedury oznaczania AB. Można ją wykorzystać do różnorodnych matryc białkowych bez konieczności uciążliwego oczyszczania próbek od składników przeszkadzających. Należy również podkreślić selektywność procedury w stosunku do oznaczanych amin biogennych - ich satysfakcjonujący proces rozdzielania był możliwy bez względu na obecne w próbkach związki chemiczne, czy pojawiające się podczas procesu starzenia się mięsa nowe struktury białkowe.

Zastosowanie ITP do analizy amin biogennych w różnorodnych produktach żywnościowych (stałych i ciekłych) wymagało opracowania metod przygotowania próbek. Dla ciekłych próbek wystarczające okazało się ich odgazowanie, odwirowanie ewentualnego osadu (w przypadki win) i rozcieńczenie w wodzie dejonizowanej [H9]. Próbki stałe wymagały doboru optymalnych parametrów procesu ekstrakcji. Stosowany sposób ekstrakcji w dużym stopniu zależał od rodzaju badanej matrycy, jednak najlepsze parametry uzyskałam dla 2% kwasu trichlorooctowego [H7, H8, H12].

Modyfikacje chromatograficznych procedur oznaczania amin biogennych

Techniki chromatograficzne, w tym chromatografia cieczowa, należą do najczęściej wykorzystywanych w oznaczaniu zawartości amin biogennych w skomplikowanych matrycach [29,30]. W dalszym ciągu analiza amin biogennych w żywności stanowi wyzwanie analityczne ze względu na brak grupy chromoforowej i ich niskie zawartości. Przeprowadzanie amin biogennych w pochodne stosuje się nie tylko w celu redukcji ich polarności, lecz również zmiany ich właściwości pod kątem reaktywności, zwiększenia lotności, bądź nadania im innych cech korzystnych analitycznie. Badania nad poszukiwaniem nowych procedur rozpoczęłam od wykorzystania opisanego w literaturze odczynnika jakim jest chlorek dansylu, a procedura przekształcania amin w pochodne i ich analizy została opisana w pracy [H9]. Następnie zajęłam się poszukiwaniem optymalnej procedury przekształcania amin biogennych w pochodne przed ich analizą metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconym układem faz (RP-HPLC). Przetestowałam, między innymi, procedury z aldehydem ftalowym, chlorkiem fluorenylometoksykarbonylu, izotiocyjanianem fluoresceiny czy 1,2-naftochinono-4-sulfonianem sodu. Jednak dopiero zastosowanie 2-chloro-1,3-dinitro-5-trifluorometylobenzenu (CNBF) pozwoliło na uzyskanie stabilnych pochodnych amin biogennych, które wykazują zadowalającą absorpcję w zakresie UV. CNBF reaguje z aminami z wytworzeniem trwałych pochodnych, a nadmiar odczynnika jest hydrolizowany do odpowiedniego fenolu. Został on opisany jako odczynnik do chemicznej konwersji amin biogennych i aminokwasów po raz pierwszy przez Tang i współ. [31] oraz Shi i współ. [32]. Jednak zaproponowana przez tych Autorów [31,32] procedura skutkowała powstawaniem zbyt dużej liczby produktów ubocznych a obecność wody powodowała hydrolizę CNBF. Aby uzyskać czyste pochodne i odpowiednie rozdzielanie chromatograficzne, opracowałam modyfikację syntezy amin z 2-chloro-1,3-dinitro-5-trifluorometylobenzenem przedstawioną na poniższym schemacie (Rys. 3).



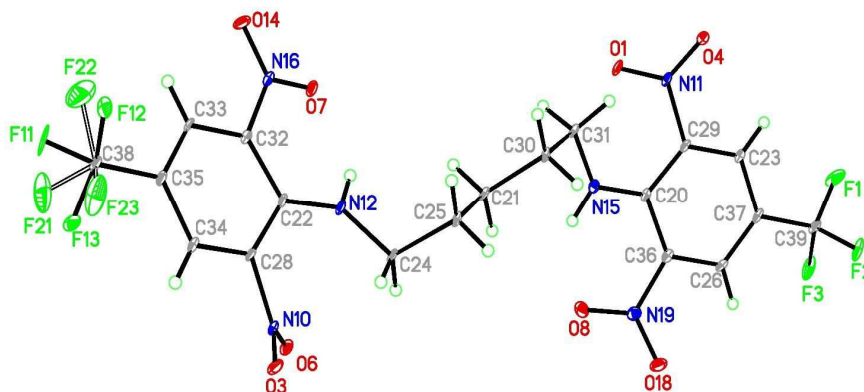
Rys. 3. Schemat procedury przekształcania AB w pochodne z CNBF, gdzie: Phen-CNBF - *N*-(2-fenyletylo)-2,6-dinitro-4-(trifluorometylo)anilina; Trypt-CNBF - *N*-(2-(1*H*-indol-3-ilo)etylo)-2,6-dinitro-4-(trifluorometylo)anilina; Tyr-CNBF - 4-(2-(2,6-dinitro-4-(trifluorometylo)fenyloamino)etylo)fenol; Him-CNBF - *N*-(2-1*H*-imidazol-4-ilo)etylo-2,6-dinitro-4-(trifluorometylo)anilina [H10]

Reakcje przeprowadzałam pod chłodnicą zwrotną w etanolu, w obecności *N,N*-diizopropyletyloaminy przez 2 h, a uzyskane pochodne ekstrahowałam octanem etylu. Czystość otrzymanych pochodnych charakteryzowałam za pomocą spektroskopii ^1H , ^{13}C , ^{19}F NMR. Opracowana metoda została opisana w pracy [H10] i zastosowana do oznaczania zawartości histaminy, tyraminy, tryptaminy i 2-fenyletyloaminy w winach ziołowych oraz gazowanych pochodzących od lokalnych producentów.

Należy podkreślić, że była to pierwsza praca, w której otrzymano zdefiniowane strukturalnie i czyste pochodne badanych amin, a na chromatogramach nie obserwowano pików od zanieczyszczeń pochodzących z próbek, produktów ubocznych czy półproduktów syntezy, co znacznie uprościło identyfikację badanych związków w skomplikowanych matrycach. Istotnym osiągnięciem tej pracy był fakt uzyskania kryształów dla wszystkich pochodnych, których struktury rozwiązano za pomocą analizy rentgenowskiej. Ponadto zaproponowałam nową procedurę ekstrakcji badanych próbek. Oprócz wyżej wymienionych zalet metoda ta charakteryzowała się dobrymi parametrami statystycznymi (liniowość, precyzja, dokładność, niskie granice wykrywalności i oznaczalności) i lepszą selektywnością oraz specyficznością w porównaniu do innych metod oznaczania AB opisanych w literaturze. Pracą nad wykorzystaniem CNBF w analizie amin biogennych rozpoczęłam współpracę

z dr. hab. Markiem Krzemińskim z Katedry Chemii Organicznej Wydziału Chemii UMK, która zaowocowała 3 publikacjami w czasopismach z Listy A MNiSW.

Obecnie rozszerzyłam badania nad wykorzystaniem CNBF w analizie AB w próbkach żywnościowych do analizy kadaweryny, putrescyny, sperminy i spermidyny. Na Rys. 4 przedstawiłam strukturę pochodnej kadaweryny z CNBT.



Rys. 4. Struktura pochodnej Kad-CNBF (grupa CF_3 wykazuje rotacyjne nieuporządkowanie)

Oprócz licznych zalet metody należy wymienić niedogodność jaką był czas analizy i etap podwójnej ekstrakcji pochodnych amin biogennych. Dlatego kontynuowałam badania nad opracowaniem szybkiej i prostej metody przekształcania AB w pochodne. Swoją uwagę zwróciłam na następnego odczynnik - 1-fluoro-2-nitro-4-trifluorometylobenzen (FNBT). Związek ten reaguje z pierwszorzędowymi aminami i poliamidami, a produktami tej reakcji są N-2'-nitro-4-trifluorometylofenylopoliaminy, które wykazują maksima absorpcji przy 242 i 410 nm. Związek ten wykorzystywany był głównie do syntezy pochodnych poliamin (sperminy, spermidyny, putrescyny) przed ich chromatograficzną analizą lub jako materiał startowy do syntezy związków biologicznie czynnych. Po raz pierwszy został zaproponowany przeze mnie jako odczynnik do chromatograficznego oznaczania tyraminy, histaminy, 2-fenyletyloaminy i tryptaminy ekstrahowanych z żywności [H11]. Opisałam i porównałam dwie procedury tworzenia pochodnych AB z FNBT – jedną opartą na procedurze z CNBF (synteza i podwójna ekstrakcja) oraz innowacyjną, znacznie szybszą z zastosowaniem pojedynczej ekstrakcji pochodnych. Obie procedury zastosowałam do oznaczania histaminy, tyraminy, tryptaminy i 2-fenyletyloaminy w próbkach win, a uzyskane wyniki porównałam ze sobą oraz z metodą z CNBF [H10]. Zaproponowane w pracach [H10] i [H11] metody zakładają uzyskanie czystych produktów, których struktury potwierdziłam analizą ^1H , ^{13}C , ^{19}F

NMR oraz dla *N*-(2-fenyletylo)-2,6-dinitro-4-(trifluorometylo)aniliny rentgenowską analizą strukturalną monokryształu [H11].

Do głównych zalet procedury z FNBT zaliczyć można dużą reaktywność odczynnika derywatyzującego, co znacznie skraca czas i pozwala na syntezę w temperaturze pokojowej. Ponadto w porównaniu do CNBF możliwe jest oznaczanie AB przy niższych poziomach stężeń. Procedura syntezy eliminuje interakcje pomiędzy AB i innymi związkami obecnymi w matrycy, jest szybka, więc może być wykorzystana do analizy amin w złożonych matrycach żywnościowych. Poniżej zestawiałam porównanie obu opisanych odczynników do przekształcania AB w pochodne.

Tabela 2. Porównanie parametrów syntezy nowych pochodnych amin biogennych z zaproponowanymi odczynnikami

	FNBT	CNBF
Rozpuszczalnik	etanol (bezwodny)	
Substancja wiążąca uboczny produkt nieorganiczny	diizopropyletyloamina (DIPEA)	
Czas syntezy	2 h	2 h
Temperatura syntezy	pokojowa	wrzenia
Procedura syntezy	synteza; odparowanie rozpuszczalnika; rozpuszczenie osadu w metanolu	synteza; podwójna ekstrakcja uzyskanych pochodnych octanem etylu; odparowanie rozpuszczalnika; rozpuszczenie osadu w metanolu
Przygotowanie próbek	odgazowanie; zalkalizowanie NaOH, dwukrotna ekstrakcja mieszaniną n-heksan:eter dietylowy:octan etylu (2:1:40 v/v/v); osuszanie; usunięcie rozpuszczalnika; rozpuszczenie suchej pozostałości w etanolu	

Podsumowując, opracowane metody syntezy pochodnych amin biogennych pozwalają na ich oznaczanie z satysfakcjonującą dokładnością i precyzją. Ponadto umożliwiają uzyskanie czystych i dobrze zdefiniowanych związków, łatwych do identyfikacji. Nowością naukową jest także charakterystyka spektroskopowa uzyskanych pochodnych. Opracowane procedury pozwalają na oznaczanie histaminy, tyraminy, tryptaminy oraz 2-fenyletyloaminy na niskich poziomach stężeń nawet w skomplikowanych matrycach żywnościowych, zaś ich duża reaktywność sugeruje rozszerzenie zastosowania do analizy pozostałych amin oraz ich prekursorów. O jakości uzyskanych wyników, wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego, świadczy liczba cytowań pracy [H10] (17 od 2014, Web of Science).

Efekty naukowe

1. Opracowałam optymalne warunki procedury przygotowania próbek żywnościowych do oznaczania zawartości wybranych AB za pomocą izotachoforezy kapilarnej oraz chromatografii cieczowej.
2. Opracowałam optymalne składy elektrolitów (LE i TE) wraz z warunkami prądowo-czasowymi dla jedno- i dwukolumnowej izotachoforezy kapilarnej, które pozwalają na analizę amin biogennych w żywności.
3. Opracowałam nowe metody oznaczania amin biogennych za pomocą RP-HPLC z zastosowaniem pochodnych AB z CNBF oraz FNBT, które wykorzystałam do oznaczania amin biogennych w różnych grupach żywności.

Efektom realizacji założeń tej części rozprawy habilitacyjnej jest sześć publikacji wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej [H7-H12]. Ponadto wyniki badań prezentowałam osobiście w formie: **6** komunikatów ustnych na konferencjach krajowych, **3** posterów na konferencjach międzynarodowych i **5** na konferencjach krajowych oraz jako współautor w formie: **3** posterów na konferencjach międzynarodowych, **7** wystąpień ustnych oraz **10** posterów na konferencjach krajowych. Realizując założenia tej części osiągnięcia naukowego współpracowałam z dr hab. Markiem Krzemińskim (synteza organiczna, spektroskopowa charakterystyka pochodnych), dr Tadeuszem Muziołem (analiza rentgenowska), dr Marzanną Kurzawą (pomiary HPLC) oraz byłam opiekunem naukowym mgr Anny Piasta i mgr Sylwii Kowalskiej (Wydział Chemii UMK w Toruniu), kończącymi obecnie prace nad rozprawami doktorskimi. Ponadto część omawianej tematyki była przedmiotem 14 prac magisterskich oraz 6 prac licencjackich, których byłam promotorem.

2.3.5. Elementy nowości, wkład do dyscypliny i podsumowanie osiągnięcia naukowego

Rezultaty uzyskane w cyklu dwunastu prac pozwalają na wykazanie następujących najważniejszych efektów naukowych:

1. Opracowałam nowe procedury oznaczania związków fosforu(V) oraz fosforu całkowitego w oparciu o metody spektralne (spektroskopia UV-Vis, WD-XRF). Otrzymane wyniki sugerują możliwość zastosowania ich w rutynowych analizach prowadzonych w laboratoriach naukowo-badawczych.

2. Opracowałam procedurę oznaczania jonów trifosforanowych(V) za pomocą izotachoforezy kapilarnej (jedno – i dwuwymiarowej) oraz izotachoforezy kapilarnej w połączeniu z elektroforezą kapilarną.
3. Opracowałam nowe metodyki oznaczania jonów fosforu(V) za pomocą izotachoforezy kapilarnej. Uzyskane wyniki osiągnięcia naukowego sugerują, że opracowane metodyki pozwalają na jednoczesną analizę trifosforanów(V), difosforanów(V) oraz fosforanów(V) w obecności innych dodatków funkcjonalnych w różnych grupach żywności. Opracowane procedury charakteryzuje duża uniwersalność, selektywność, specyficzność, satysfakcjonująca dokładność oraz precyzja, prostota oraz krótki czas analizy co czyni je szczególnie atrakcyjnymi w odniesieniu do analiz prób żywności.
4. Opracowałam nowe warunki oznaczania amin biogennych za pomocą izotachoforezy kapilarnej jedno- i dwukolumnowej. Uzyskane rezultaty sugerują, że zmodyfikowane procedury analizy za pomocą izotachoforezy kapilarnej pozwalają na szybkie oznaczanie amin biogennych w różnych grupach żywności i mogą stanowić alternatywę do istniejących procedur analizy tych związków. Główne zalety tej metody, w stosunku do technik chromatograficznych, to: krótki i prosty etap przygotowania próbek żywnościowych, brak konieczności tworzenia pochodnych, brak długiego etapu oczyszczania i wielokrotnej filtracji uzyskanych ekstraktów, możliwość zateżnienia analitów w układzie dwukolumnowym i jednoczesnego oznaczania na różnych poziomach stężeń. Ponadto do zalet opisywanych metod zaliczyć można selektywność, akceptowalną dokładność oraz precyzję porównywalną z HPLC. Izotachoforeza kapilarna, ze względu na jej możliwości analityczne, może stanowić alternatywne narzędzie do innych powszechnie stosowanych metod analizy żywności. Ponadto dzięki swojej ekonomiczności oraz braku toksycznych rozpuszczalników zawiera elementy „zielonej chemii”.
5. Opracowałam innowacyjne procedury chromatograficznego oznaczania amin biogennych poprzez syntezę nowych pochodnych AB z CNBF oraz FNBT i wykorzystałam je do oznaczania zawartości amin biogennych w różnych grupach żywności. Dzięki zastosowaniu opracowanych procedur możliwe było oznaczenie histaminy, tyraminy, tryptaminy i 2-feniloetyloaminy w żywności bez konieczności oczyszczania próbek.

Wkład do dyscypliny

1. Zastosowanie po raz pierwszy niedestrukcyjnej metody WD-XRF do oznaczania zawartości fosforu całkowitego w próbkach żywnościowych bez konieczności przenoszenia oznaczanych jonów do roztworu.

2. Opracowanie nowych procedur analitycznych i znaczne rozszerzenie zastosowania metody izotachoforezy kapilarnej do oznaczania analitów w próbkach żywnościowych.
3. Opracowanie syntezy nowych pochodnych amin biogennych i ich zastosowanie do oznaczania tych związków w żywności.

Podsumowanie

Osiągnięcie habilitacyjne dotyczy tematyki analizy żywności i wnosi wkład w rozwinięcie procedur analitycznych do analizy form jonowych fosforanów(V) oraz amin biogennych w różnych matrycach żywnościowych. Z prac osiągnięcia habilitacyjnego wynikają nowe możliwości analityczne dla metod rzadko używanych w analizie żywności, między innymi: XRF. Ponadto dzięki zaproponowaniu syntezy nowych pochodnych amin biogennych powstały oryginalne i nowatorskie rozwiązania analityczne do chromatograficznego oznaczania tych związków.

Realizacja powyższych badań była możliwa dzięki uzyskiwaniu odpowiednich środków finansowych. Zasadnicza część badań była finansowana z projektów **Granty MNiSW na lata 2006-2009** (Analiza specyjna związków fosforu(V) w żywności za pomocą łączonych technik elektromigracyjnych) oraz **2011-2014** (Oznaczanie zawartości wybranych amin biogennych i ich prekursorów w żywności przetworzonej metodą izotachoforezy kapilarnej), w których pełniłam funkcję głównego wykonawcy oraz **Granty WCh UMK** w latach 2005; 2007 oraz 2009, gdzie pełniłam funkcję kierownika. Za prowadzone badania naukowe w latach 2008-2014 regularnie uzyskiwałam nagrody lub wyróżnienia zespołowe JM Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika.

2.3.6. Literatura

- [1] A. Jastrzębska, L. Szablewski, B. Buszewski, *Zastosowanie igieł sosny jako bioindykatora w monitoringu skażenia środowiska lotnymi związkami siarki*, Ekologia i Technika, 6 (1995) 14-17.
- [2] A. Jastrzębska, B. Buszewski, *Biomonitoring zanieczyszczeń atmosfery. Modele sorpcji zanieczyszczeń w matrycach środowiskowych*, Ekoanalitika w chemii środowiska, B. Buszewski (red. nauk), wyd. SAR „Pomorze” Bydgoszcz (1998) 207-224.
- [3] T. Kowalkowski, A. Jastrzębska, J. Mierzwa, B. Buszewski, *Sorption and migration Pb and Zn in various soil matrices*, Toxicological and Environmental Chemistry, 78 (2000) 199-212.

- [4] A. Jastrzębska, B. Buszewski, *Zastosowanie biomonitoringu w ekoanalizie*, Chemia i Inżynieria Ekologiczna, 6 (1999) 1121-1131.
- [5] L. Szablewski, A. Jastrzębska, B. Buszewski, *Microwave methods of samples preparation for the purposes of environmental analysis - review*, Polish Journal of Environmental Studies, 5 (1997) 13-18.
- [6] F.M. Everaerts, J.L. Beckers, Th.P.E.M. Verheggen, *Isotachophoresis. Theory, instrumentation and applications*, Journal of Chromatography Library, 6 (1976) 83- 103.
- [7] Z. Malá, P. Gebauer, P. Boček, *Review. Recent progress in analytical capillary isotachophoresis*, Electrophoresis, 36 (2015) 2–14.
- [8] R. Westermeier, *Electrophoresis in practice*, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim, 2005.
- [9] F. Kvasnička, *Determination of egg white lysozyme by on-line coupled capillary isotachophoresis with capillary zone electrophoresis*, Electrophoresis, 24 (2003) 860–864.
- [10] F. Kvasnička, *Application of isotachophoresis in food analysis*, Electrophoresis, 21 (2000) 2780-2787.
- [11] R.J. Winger, J. Uribarri, L. Lloyd, *Phosphorus containing food additives: An insidious danger for people with chronic kidney disease*, Trends in Food Science & Technology, 24 (2012) 92-102.
- [12] M.F. McCarty B.A., J.J. DiNicolantonio Pharm.D, *Bioavailable dietary phosphate, a mediator of cardiovascular disease, may be decreased with plant-based diets, phosphate binders, niacin, and avoidance of phosphate additives*, Nutrition, 30 (2014) 739–747.
- [13] B. Shyla, Mahadevaiah, G. Nagendrappa, *A simple spectrophotometric method for the determination of phosphate in soil, detergents, water, bone and food samples through the formation of phosphomolybdate complex followed by its reduction with thiourea*, Spectrochimica Acta, Part A, 78 (2011) 497–502.
- [14] N. Coşkun, S. Akman, *Direct determination of phosphorus in different food samples by means of solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry using Pd+Ca chemical modifier*, Spectrochimica Acta, Part B, 60 (2005) 415– 419.
- [15] V. Ruiz-Calero, M.T. Galceran, *Ion chromatographic separations of phosphorus species: a review*, Talanta, 66 (2005) 376–410.

- [16] Y. Sekiguchi, A. Matsunaga, A. Yamamoto, Y. Inoue, *Analysis of condensed phosphates in food products by ion chromatography with an on-line hydroxide eluent generator*, Journal of Chromatography A, 881 (2000) 639–644.
- [17] L. Wang, J. Li, L. Zhang, *Determination of polyphosphates in fish and shrimp muscles by capillary electrophoresis with indirect UV detection after phosphatase inhibition using high pressure pretreatment*, Food Chemistry, 185 (2015) 349–354.
- [18] P. Blatný, F. Kvasnička, *Application of capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis to the determination of inorganic ions in food and feed samples. Review*, Journal of Chromatography A, 834 (1999) 419–431.
- [19] A. Jastrzębska, M. Cichosz, E. Szłyk, *Simple and rapid determination of phosphorus in meat samples by WD-XRF method*, Journal of Analytical Chemistry, 65 (2010) 376–381.
- [20] M. Dušek, F. Kvasnička, L. Lukášková, J. Krátká, *Isotachophoretic determination of added phosphate in meat products*, Meat Science, 65 (2003) 765–769.
- [21] W. Arneith, B. Herold, G.E. Hammer, *Breakdown of di- and triphosphate in cooked sausage batter*, Fleischwirtschaft, 1 (2002) 78–80.
- [22] A. Jastrzębska, E. Szłyk *Application of ^{31}P NMR for added polyphosphates determination in pork meat*, Chemical Paper, 63 (2009) 414–419.
- [23] M.B.R. Rodriguez, C. da Silva Carneiro, M.B. da Silva Feijó, C.A.C. Júnior, S.B. Mano, *Bioactive amines: aspects of quality and safety in food*, Food and Nutrition Sciences, 5 (2014) 138–146.
- [24] J. Karovičova, Z. Kohajdova, *Biogenic amines in food*, Chemical Papers, 59 (2005) 70–79.
- [25] G.I. Mohammed, A.S. Bashammakh, A.A. Alsibaai, H. Alwael, M.S. El-Shahawi, *Critical overview on the chemistry, clean-up and recent advances in analysis of biogenic amines in foodstuffs*, Trends in Analytical Chemistry, 78 (2016) 84–94.
- [26] F.B. Erim, *Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples*, Trends in Analytical Chemistry, 52 (2013) 239–247.
- [27] J. Karovicova, Z. Kohajdov, P. Simko, D. Lukacova, *Using capillary isotachopheresis for the determination of biogenic amines*, Nahrung/Food, 47 (2003) 188 – 190.

- [28] K. Rubach, P. Offizorz, C. Breyer, *Determination of histamine in fish and canned fish by capillary isotachopheresis*, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung (European Food Research and Technology)*, 172 (1981) 351-354.
- [29] J.L. Ordóñez, A.M. Troncoso, M.D.C. García-Parrilla, R.M. Callejón, *Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages - A review*, *Analytica Chimica Acta*, 939 (2016) 10–25.
- [30] F.B. Erim, *Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. Review*, *Trends in Analytical Chemistry*, 52 (2013) 239–247.
- [31] T. Tang, T. Shi, K. Qian, P. Li, J. Li, Y. Cao, *Determination of biogenic amines in beer with pre-column derivatization by high performance liquid chromatography*, *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 507–512.
- [32] T. Shi, T. Tang, K. Qian, F. Wang, J. Li, Y. Cao, *High-performance liquid chromatographic method for determination of amino acids by precolumn derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride*, *Analytica Chimistry Acta*, 654 (2009) 154–161.

Obecnie prowadzone przeze mnie badania są rozszerzane o opracowanie procedur oznaczania w żywności poliamin biogennych, aminokwasów oraz wybranych witamin, które uczestniczą w działaniu neuroprzekazników. Główny nacisk położony jest na opracowanie nowych procedur ich oznaczania z wykorzystaniem izotachoforezy kapilarnej i technik chromatograficznych (HPLC-DAD, HPLC-MS/MS), nowych procedur przekształcania badanych związków w pochodne oraz sposobu przygotowania próbek żywnościowych do analizy.

3. Nazwy związków chemicznych stosowane w załączniku numer 2

Nazwa stosowana w autoreferacie	Nazwa IUPAC/ nazwa systematyczna
Aldehyd ftalowy	Benzeno-1,2-dikarbaldehyd
β -Alanina	Kwas 3-aminopropanowy
Bis-tris-propan	1,3-Bis(tris(hydroksymetylo)metyloamino)propanan
Chlorek dansylu	Chlorek 5-(dimetylamino)nafaleno-1-sulfonylu
Chlorek fluorenylometoksykarbonylu	Chloromrówczan (9H-fluoren-9-ylo)metylu
Galusan propylu	3,4,5-Trihydroksybenzoesan propylu
Glicyna	Kwas 2-aminoetanowy
Glicyl-glicyna	Kwas 2-[(2-aminoacetylo)amino]octowy
Glutamina	5-Hydroksy-5-imino-L-norwalina
Histamina	2-(1H-imidazol-4-ylo)-etanamina
Histydyna	L-histydyna / Kwas 2-amino-3-(imidazolo-4-ilo)propanowy
Hydrochinon	Benzeno-1,4-diol
Izotiocyjanian fluoresceiny	3',6'-Dihydroksy-6-izotiocyjaniano-3H-spiro[2- benzofurano-1,9'-ksanten]-3-on
Kadaweryna	1,5-Pentanodiamina
Kwas askorbinowy	(5R)-5-[(1S)-1,2-Dihydroksyetylo]-3,4-dihydroksy-2(5H)- furanon
Kwas cytrynowy	Kwas 2-hydroksy-1,2,3-propanotrikarboksylowy
Kwas glutaminowy	Kwas (2S)-2-aminopentanodiowy
Kwas mlekowy	Kwas 2-hydroksypropanowy
Lizyna	Kwas 2,6-diaminoheksanowy
1,2-Naftochinono-4- sulfonian sodu	Kwas 3,4-diokso-3,4-dihydro-1-naftalenosulfonowy
Ornityna	L-Ornityna / Kwas (S)-2,5-diaminopentanowy
Putrescyna	1,4-Butanodiamina
Sorbinian potasu	(2E,4E)-2,4-Heksadienian potasu

Spermina	<i>N,N'</i> -Bis-(3-aminopropylo)-1,4-butanodiamina
Spermidyna	<i>N</i> -(3-Aminopropylo)-1,4-butanodiamina
α -Tokoferol	(2 <i>R</i>)-2,5,7,8-Tetrametylo-2-[(4 <i>R</i> ,8 <i>R</i>)-4,8,12-trimetylotridecylo]-6-chromanol
Tryptamina	2-(1 <i>H</i> -Indol-3-ylo)etanoamina
Tyramina	4-(2-Aminoetylo)fenol
Walina	L-Walina / Kwas (<i>S</i>)-2-amino-3-metylobutanowy
Zieleń malachitowa	Chlorek 4- {[4-(dimetyloamino)fenylo](fenylo)metyleno} - <i>N,N</i> -dimetylo-2,5-cykloheksadieno-1-iminiowy

4. Akronimy stosowane w załączniku numer 2

AA	procedura oparta na tworzeniu błękitu molibdenofosforowego z kwasem askorbinowym
AB	aminy biogenne
CNBF	2-chloro-1,3-dinitro-5-trifluorometylobenzen
Fenyl	2-fenylloetyloamina
FNBT	1-fluoro-2-nitro-4-trifluorometylobenzen
HHS	procedura oparta na tworzeniu błękitu molibdenofosforowego z mieszaniny hydrochinonu z siarczanem hydrazyny
Him	histamina
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
HS	procedura oparta na tworzeniu błękitu molibdenofosforowego z siarczanu hydrazyny
ITP; cITP	izotachoforezy kapilarna
ITP-ITP; cITP-cITP	izotachoforezy kapilarna dwukolumnowa
ITP-CZE; cITP-CZE	izotachoforezy kapilarna połączona z elektroforezą kapilarną
Kad	kadaweryna
LE	elektrolit wodący
MG	procedura oparta na reakcji tworzenia asocjatorów jonowych kwasu molibdenofosforowego z zielenią malachitową

Put	putrescyna
RP-HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa z odwróconym układem faz
Sperd	spermidyna
Sperm	spermina
TE	elektrolit kończący
Trypt	tryptamina
Tyr	tyramina
WD-XRF	fluorescencyjna spektrometria rentgenowska z rozpraszaniem długości fali

Aneta Jastrzębska