

Autoreferat

Przedstawiający opis dorobku i osiągnięć naukowych określonych w
art. 16 ust. 2 ustawy (w języku polskim)

Dr Anna Poliwoda

Katedra Chemii Analitycznej i Ekologicznej

Wydział Chemii

Uniwersytet Opolski

1. Imię i Nazwisko: Anna POLIWODA**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:**

- 2001** Magister chemii, specjalność agrobiochemia, Uniwersytet Opolski.
Praca magisterska pt. *Ekstrakcja peptydów za pomocą membran ciekłych z użyciem Aliquotu 336 jako przenośnika.*
Promotor: dr inż. Piotr Wieczorek
- 2006** Doktor nauk chemicznych, Uniwersytet Opolski
Rozprawa doktorska pt. *Wydzielanie i zatężanie peptydów za pomocą membran ciekłych.*
Promotor: dr hab. inż. Piotr Wieczorek

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- 01.10.2002 – 31.01.2007** Asystent, Instytut Chemii, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Uniwersytet Opolski
- 01.02.2007 – 30.09.2008** Adiunkt, Instytut Chemii, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Uniwersytet Opolski
- 01.10.2008 – obecnie** Adiunkt, Wydział Chemii, Uniwersytet Opolski

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:**

Metody separacyjne i spektralne w analizie związków biologicznie aktywnych.

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (* - autor korespondencyjny):

- H-1 A. Poliwoda***, M. Krzyżak, P. P. Wieczorek, **2010**,
Supported liquid membrane extraction with single hollow fiber for the analysis of fluoroquinolones from environmental surface water samples.
Journal of Chromatography A, 1217(22), 3590-3597.
IF₍₂₀₁₀₎ = 4,194; MNiSW₍₂₀₁₀₎ = 32

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy i zaplanowaniu części eksperymentalnej, współwykonaniu doświadczeń uwzględniających optymalizację warunków ekstrakcji analizowanych związków, a także analizę próbek rzeczywistych i walidację opracowanej metody analitycznej, których wyniki uwzględnionych na ryc. 3, 4, 5 i 6 oraz w Tabelach 2 i 3, napisaniu całości manuskryptu, opracowaniu zestawień tabelarycznych, opracowaniu wszystkich otrzymanych wyników i ich interpretacji, współredagowaniu

i przeprowadzeniu wspólnie ze współautorami korekty po uwagach recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 75 %.

- H-2** A. Poliwoda*, K. Zielińska, M. Halama, P. P. Wieczorek, 2014,
Determination of muscimol and ibotenic acid in mushrooms of Amanitaceae by capillary electrophoresis.
Electrophoresis, 35(18):2593-2599.
IF₍₂₀₁₄₎ = 3,028; MNiSW₍₂₀₁₄₎ = 30

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy i zaplanowaniu części eksperymentalnej, współwykonaniu doświadczeń uwzględniających opracowanie efektywnych warunków rozdziału elektroforetycznego oznaczanych związków, a także walidację opracowanej metody analitycznej, których wyniki przedstawiono na ryc. 2, 3 oraz 4, opracowaniu otrzymanych wyników i ich interpretacji, napisaniu manuskryptu, współredagowaniu i przeprowadzeniu wspólnie ze współautorami korekty po uwagach recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 75 %.

- H-3** A. M. Chrzanowska, A. Poliwoda*, P. P. Wieczorek, 2015,
Characterization of particle morphology of biochanin A molecularly imprinted polymers and their properties as a potential sorbent for solid-phase extraction.
Materials Science and Engineering C, 49, 793-798.
IF₍₂₀₁₅₎ = 3,420; MNiSW₍₂₀₁₅₎ = 25

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy i zaplanowaniu części eksperymentalnej oraz współwykonaniu doświadczeń uwzględniających opracowanie warunków syntezy otrzymanych polimerów z nadrukiem cząsteczkowym, wykonaniu analiz powierzchni otrzymanych materiałów sorpcyjnych za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego, a także opracowaniu warunków ekstrakcji do fazy stałej, opracowaniu otrzymanych wyników i ich interpretacji, napisaniu manuskryptu, współredagowaniu i przeprowadzeniu wspólnie ze współautorami korekty po uwagach recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 75 %.

- H-4** A. M. Chrzanowska, A. Poliwoda*, P. P. Wieczorek, 2015,
Surface molecularly imprinted silica for selective solid-phase extraction of biochanin A, daidzein and genistein from urine samples.
Journal of Chromatography A, 1392, 1-9.
IF₍₂₀₁₅₎ = 3,926; MNiSW₍₂₀₁₅₎ = 40

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy i zaplanowaniu części eksperymentalnej oraz współwykonaniu doświadczeń uwzględniających optymalizację warunków skutecznej modyfikacji powierzchni krzemionki polimerem z nadrukiem cząsteczkowym oraz na zbadaniu potencjału aplikacyjnego otrzymanych materiałów sorpcyjnych w ekstrakcji analizowanych fitoestrogenów z próbek moczu, wykonaniu analiz powierzchni otrzymanych materiałów sorpcyjnych za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego, a także opracowaniu wszystkich otrzymanych wyników i ich interpretacji,

napisaniu manuskryptu, współredagowaniu i przeprowadzeniu wspólnie ze współautorami korekty po uwagach recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 75 %.

H-5 P. P. Wieczorek*, D. Witkowska, I. Jasicka-Misiak, **A. Poliwoda**, M. Oterman, K. Zielińska, **2015**,

Bioactive alkaloids of hallucinogenic mushrooms.

Studies in Natural Products Chemistry: Elsevier B.V.; 5, 133-168.

IF₍₂₀₁₅₎ = 0,000; MNiSW₍₂₀₁₅₎ = 5

Praca przeglądowa. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy oraz napisaniu części manuskryptu dotyczącego, wstępu, opisu podziału alkaloidów grzybowych oraz metod analitycznych stosowanych w analizie tych związków w materiale grzybowym oraz próbkach biologicznych, współredagowaniu ostatecznej wersji maszynopisu i przeprowadzeniu wspólnie ze współautorami korekty po uwagach recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 50 %.

H-6 O. Zhuk, I. Jasicka-Misiak*, **A. Poliwoda**, A. Kazakova, V. V. Godovan, M. Halama, P. P. Wieczorek, **2015**,

Research on acute toxicity and the behavioral effects of methanolic extract from psilocybin mushrooms and psilocin in mice.

Toxins, 7(4), 1018-1029.

IF₍₂₀₁₅₎ = 3,571, MNiSW₍₂₀₁₅₎ = 30

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na współtworzeniu koncepcji, opracowaniu metody izolacji i rozdzielu UHPLC oraz warunków detekcji za pomocą spektrometru mas ekstraktów grzybowych stosowanych następnie w badaniach farmakologicznych na myszach, określeniu składu chemicznego analizowanych ekstraktów grzybowych, interpretacji i dyskusji wyników badań z analiz LC-MS oraz z eksperymentów aktywności biologicznej, napisaniu manuskryptu oraz współredagowaniu i przeprowadzeniu wspólnie ze współautorami korekty po uwagach recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 45 %.

H-7 S. Ncube, **A. Poliwoda**, H. Tutu, P. Wieczorek, L. Chimuka*, **2016**,

Multivariate optimization of the hollow fibre liquid phase microextraction of muscimol in human urine sample.

Journal Chromatography B, 1033-1034, 372-381. IF₍₂₀₁₆₎ = 2,603, MNiSW₍₂₀₁₆₎ = 40

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji, zaplanowaniu części eksperymentalnej, oraz przeprowadzeniu wstępnych eksperymentów z zakresu optymalizacji warunków ekstrakcji badanych substancji halucynogennych oraz analizy próbek moczu za pomocą techniki HF-LPME, interpretacji otrzymanych wyników, a także napisaniu fragmentu manuskryptu dotyczącego treści opisanych we wstępie oraz w dyskusji wyników, współredagowaniu i przeprowadzeniu wspólnie ze współautorami korekty po uwagach recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 50 %

- H-8** A. Poliwoda*, M. Mościpan, P. P. Wieczorek, 2016,
Application of molecular imprinted polymers for selective solid phase extraction of Bisphenol A.

Ecological Chemistry and Engineering S, 23(4), 651-664.

IF₍₂₀₁₆₎ = 0,717, MNiSW₍₂₀₁₆₎ = 15

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na tworzeniu koncepcji pracy i zaplanowaniu doświadczeń oraz współwykonaniu eksperymentów uwzględniających syntezę materiałów sorpcyjnych na bazie polimerów z nadrukiem cząsteczkowym, wykonaniu analizy powierzchni z użyciem mikroskopu skaningowego oraz na zbadaniu potencjału aplikacyjnego otrzymanych materiałów sorpcyjnych w ekstrakcji próbek środowiskowych, opracowaniu otrzymanych wyników i ich interpretacji, napisaniu manuskryptu, współredagowaniu i przeprowadzeniu wspólnie ze współautorami korekty po uwagach recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 75 %.

- H-9** B. Żyszka-Haberecht, A. Poliwoda, J. Lipok*, 2018,
Biocatalytic hydrogenation of the C=C bond in the enone unit of hydroxylated chalcones—process arising from cyanobacterial adaptations.

Applied Microbiology and Biotechnology, 102(16), 7097-7111.

IF₍₂₀₁₈₎ = 3,340, MNiSW₍₂₀₁₈₎ = 35

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy dotyczącej opracowania sposobu ekstrakcji i analizy jakościowej oraz ilościowej produktów biotransformacji hydroksychalkonów z komórek cyjanobakterii, zaplanowaniu doświadczeń, wykonaniu eksperymentów uwzględniających ekstrakcję SPE i analizę LC-MS badanych związków w komórkach cyjanobakterii, opracowaniu otrzymanych wyników, ich interpretacji i dyskusji, napisaniu fragmentu manuskryptu dotyczącego w/w treści, współredagowaniu i przeprowadzeniu wspólnie ze współautorami korekty po uwagach recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 45 %.

- H-10** B. Żyszka-Haberecht, A. Poliwoda, J. Lipok*, 2019,
Structural constraints in cyanobacteria-mediated whole-cell biotransformation of methoxylated and methylated derivatives of 2'-hydroxychalcone.

Journal of Biotechnology, 293, 36-46, IF₍₂₀₁₉₎ – 2,533; MNiSW₍₂₀₁₈₎ - 35 pkt

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na stworzeniu koncepcji pracy dotyczącej opracowania sposobu ekstrakcji i analizy jakościowej oraz ilościowej produktów biotransformacji analogów strukturalnych 2'-hydroksychalkonu z komórek sinic, zaplanowaniu części eksperymentalnej, wykonaniu doświadczeń uwzględniających ekstrakcję SPE i analizę LC-MS badanych ekstraktów komórkowych, opracowaniu otrzymanych wyników, ich interpretację i dyskusję, napisaniu fragmentu manuskryptu dotyczącego w/w treści, współredagowaniu i przeprowadzeniu wspólnie ze współautorami korekty po uwagach recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 45 %.

C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Złożoność otaczającego nas środowiska sprawia, że codziennie niezliczone ilości związków chemicznych wywołują określony efekt biologiczny na organizmy żywe w nim funkcjonujące. Dotyczy to zarówno tych substancji, które są niezbędne do prawidłowego rozwoju i wzrostu (np. mikro- i makroelementy, witaminy, aminokwasy, węglowodany, białka, tłuszcze itp.), tych które pełnią funkcje ochronne, przeciwbakteryjne czy antyutleniające (np. karotenoidy, flawonoidy, alkaloidy, itp.), oraz tzw. substancji obcych (ksenobiotyków), do których zaliczamy głównie syntetyczne związki chemiczne (np.: farmaceutyki, pestycydy), dostające się do środowiska wskutek działalności człowieka. W tym przypadku, nie stanowi zatem zaskoczenia fakt, że od lat istotnym wyzwaniem w chemii analitycznej jest poszukiwanie technik i metod umożliwiających skuteczne i efektywne oznaczanie różnorodnych analitów, w próbkach materiałów, często o nieznanym składzie i pochodzeniu. Dotyczy to chociażby izolacji i oznaczania produktów naturalnych pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego o szerokim spektrum aktywności biologicznej, związków prozdrowotnych, powstałych na przykład w procesach biotransformacji prowadzonych przez mikroorganizmy, oraz licznych zanieczyszczeń (ksenobiotyków), zwykle wywołujących niepożądany efekt biologiczny, a nawet śmierć organizmów żywych poddanych ich działaniu. W tym ostatnim przypadku, monitorowanie losów wprowadzanych do ekosystemu ksenobiotyków (ich obecności, stężenia, w jaki sposób są w nim metabolizowane i przekształcane) służy opracowywaniu i wprowadzaniu odpowiednich uregulowań oraz norm prawnych, określających najwyższe dopuszczalne stężenie związków szkodliwych, w poszczególnych elementach środowiska.

Różnorodność struktury chemicznej związków biologicznie aktywnych oraz złożoność materiału próbki (matrycy) stanowi najczęściej nie lada wyzwanie. W próbkach tych oprócz, interesujących nas związków, występujących często w ilościach śladowych (stężenie < 0,01% (100 ppm)), obecna jest duża liczba innych substancji przeszkadzających – tzw. interferentów, które zwykle uniemożliwiają przeprowadzenie bezpośredniej analizy chemicznej. Istnieje, co prawda, grupa dostępnych, bezpośrednich technik analizy chemicznej, ale ich liczba jest bardzo ograniczona. Dlatego należy podkreślić, że przed przeprowadzeniem właściwej analizy, konieczne jest wcześniejsze, odpowiednie przygotowanie próbki, które zwykle obejmuje etap wydzielenia z matrycy analitu (-ów), jego (-ich) oczyszczenia oraz wzbogacenia. Z reguły etap ten zabiera średnio nawet około 60% całkowitego czasu poświęconego na analizę próbki i ciągle bywa obciążony dużą niepewnością. Ważnym zagadnieniem jest również poszukiwanie skutecznych sposobów umożliwiających wykrycie i oznaczenie badanych związków, a w ostatnich latach, szczególnym impulsem wymagającym opracowywanie nowych strategii badań analitycznych, jest rozwój nauk biologicznych, których przedmiotem jest wyjaśnianie przebiegu procesów metabolizmu, zarówno na poziomie pojedynczej komórki jak i całego organizmu.

Przy wyborze rodzaju stosowanej techniki przygotowywania próbek oraz oznaczania i identyfikacji analitów należy uwzględnić kilka istotnych aspektów, w tym charakter analizowanych związków, rodzaj matrycy, oraz typ stosowanej techniki detekcji. Do najczęściej wykorzystywanych aktualnie technik wydzielenia i wzbogacania analitów należą bez wątpienia techniki ekstrakcyjne. Szczególnie dominującą rolę odgrywa tutaj ekstrakcja do fazy stałej (SPE, *solid phase extraction*) oraz ekstrakcja rozpuszczalnikowa dedykowana analizie składników próbek stałych. W pierwszym przypadku dostępność materiałów sorpcyjnych o bardzo zróżnicowanych właściwościach, a w drugim możliwość zastosowaniu czynników wspomagających (np. promieniowania mikrofalowego oraz ultradźwięków) decyduje o ich popularności. Również, możliwość miniaturyzacji oraz automatyzacji, determinuje ich szeroki potencjał aplikacyjny. W tym miejscu należy również wspomnieć o tzw. membranowych technikach ekstrakcyjnych, które łącząc w sobie zalety procesu membranowego i ekstrakcyjnego, od wielu lat znajdują liczne zastosowania w etapie przygotowywania próbek. Równoległe obok metod dedykowanych izolowaniu i wzbogacaniu analitów istotne miejsce zajmują techniki chromatograficzne i elektroforetyczne umożliwiające analizę jakościową i ilościową.

Cel badań realizowanych w ramach habilitacji

Nadrzędnym celem moich badań naukowych opisanych w pracach zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego [H-1-H-10] było przygotowanie „narzędzi” umożliwiających skuteczną i efektywną analizę związków biologicznie aktywnych z grupy ksenobiotyków, w tym pozostałości leków fluorochinolonowych [H-1] i substancji endokrynologicznie czynnych w matrycach środowiskowych i fizjologicznych (mocz) [H-3, H-4, H-8], a także naturalnie występujących grzybowych substancji halucynogennych [H-2, H-5, H-6, H-7] w materiale biologicznym, oraz produktów biotransformacji przez cyjanobakterie wybranych hydroksychalkonów ważnych z punktu widzenia ich aktywności biologicznej [H-9-H-10]. W efekcie prowadzonych prac opracowałam metody z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w połączeniu z detektorami UV (HPLC-UV) oraz z matrycą diodową (HPLC-PDA, HPLC-DAD). Prowadzone badania rozszerzyłam poprzez zastosowanie spektrometru mas, jako bardziej selektywnej i/lub czulej metody detekcji w połączeniu z ultra-sprawną chromatografią cieczową (UHPLC-MS/MS) oraz elektroforezy kapilarnej z detektorem z matrycą diodową (CE-DAD). Ważnym zagadnieniem było opracowanie metod izolacji i wzbogacania analitów w próbkach środowiskowych i biologicznych z wykorzystaniem ekstrakcji membranowej, ekstrakcji do fazy stałej oraz ekstrakcji rozpuszczalnikowej. W realizacji badań dużą rolę odegrały projekty badawcze, w których pełniłam rolę głównego wykonawcy.

Mając na uwadze powyższe zagadnienia podjęte przeze mnie cele badawcze dotyczyły następujących zagadnień:

1. Zastosowania techniki ekstrakcji membranowej z użyciem immobilizowanych membran ciekłych w konfiguracji pojedynczego włókna do wydzielania i zatężania antybiotyków z grupy fluorochinolonów z próbek środowiskowych [H-1] oraz związków izoksazolowych i indolowych [H-7] z płynów fizjologicznych.
2. Zastosowania zaawansowanych technik separacyjnych w badaniach nad oznaczaniem ilościowym i jakościowym grzybowych substancji halucynogennych oraz ich analogów strukturalnych [H-2, H-5 oraz H-6].
3. Opracowanie skutecznych metodyk analitycznych bazujących na zastosowaniu w etapie przygotowania próbki polimerów z nadrukiem cząsteczkowym w analizie substancji endokrynologicznie czynnych (fitoestrogenów oraz alkilofenoli) [H-3, H-4 i H-8]
4. Zastosowanie techniki ekstrakcji SPE oraz chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas do określenia charakteru przemian hydroksychalkonów przez cyjanobakterie [H-9, H-10]

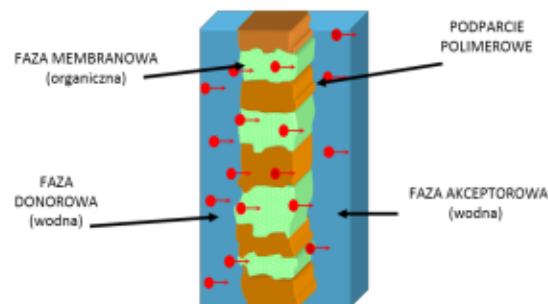
Ad. 1 Zastosowania techniki ekstrakcji membranowej z użyciem immobilizowanych membran ciekłych w konfiguracji pojedynczego włókna do wydzielania i zatężania antybiotyków z grupy fluorochinolonów z próbek środowiskowych [H-1] oraz związków izoksazolowych i indolowych [H-7] z płynów fizjologicznych.

Technika ekstrakcji membranowej łączy w sobie elementy procesu ekstrakcyjnego oraz membranowego. Dotyczy to zarówno zastosowania hydrofobowych membran do rozdziału faz w procesie ekstrakcji oraz membran zawierających fazę organiczną (tzw. membrany ciekłe). Istotne miejsce w analityce znajdują właśnie membrany ciekłe, a szczególnie immobilizowane membrany ciekłe (SLM), w których wykorzystuje się najbardziej optymalny układ trójfazowy.

W skrócie, membrana ciekła to najczęściej odrębna faza ciekła, która jako selektywna bariera rozdziela dwa roztwory – roztwór fazy donorowej, który stanowi analizowana próbka, od roztworu fazy akceptorowej. W większości przypadków roztwory donora i akceptora są roztworami wodnymi, natomiast właściwą membranę stanowi hydrofobowa ciecz organiczna. Istotnym warunkiem powstania takiej membrany jest niezdolność mieszania się tych ciekłych faz między sobą. Substancje chemiczne znajdujące się w roztworach wodnych przylegających do membrany, mogą przez nią przenikać, jeśli rozpuszczają się w warstwie hydrofobowej lub odwracalnie reagują ze znajdującym się w niej przenośnikiem. W przypadku membran ciekłych, w których stosuje się dodatek przenośnika,

rozdział analitów następuje w wyniku procesów reakcyjno-dyfuzyjnych, a w przypadku membran ciekłych bez użycia przenośnika, w wyniku procesów dyfuzyjnych.

W immobilizowanych membranach ciekłych faza organiczna (membranowa) jest unieruchomiona siłami kapilarnymi w mikroporowatym nośniku – folii polimerowej, stanowiącym podparcie membrany (Rys. 1). Użycie takiego polimeru znacznie redukuje objętość fazy membranowej, a w konsekwencji i grubość membrany, w rezultacie powodując pożądany wzrost współczynnika powierzchni aktywnej do objętości, oraz współczynnika objętości fazy donorowej do membranowej. Wartości tych współczynników zależą od geometrii stosowanych membran, do których zaliczamy płaskie arkusze (ang. *flat sheet*), włókna kapilarnej (ang. *hollow fiber*) oraz arkusze zwijane (ang. *spiral wounds*). Wzrost obu współczynników następuje odpowiednio, w kolejności płaskie arkusze < arkusze zwijane < włókna kapilarne.



Rysunek 1. Schemat immobilizowanych membran ciekłych

Wodny charakter fazy akceptorowej immobilizowanych membran ciekłych jest kompatybilny z chromatografią cieczą w odwróconym układzie faz oraz elektroforezą kapilarną. Począwszy od lat 90-tych, technika SLM znalazła szerokie zastosowanie w etapie wydzielenia i wzbogacania bardzo różnorodnej grupy związków z próbek o złożonym i skomplikowanym składzie matrycy. Tak szeroki wachlarz zastosowań wynika z wielu zalet. W porównaniu z powszechnie stosowanymi technikami ekstrakcyjnymi (SPE, czy ciecz-ciecz (LLE)), atutem SLM jest przede wszystkim zużycie niewielkich ilości rozpuszczalników organicznych, stanowiących fazę membranową (zwykle kilka μl). Dzięki temu technika ta jest przyjazna dla środowiska, a koszty inwestycyjne i operacyjne są niewielkie. Dodatkowo, możliwość zmiany właściwości fazy membranowej, głównie jej hydrofobowości, a także rodzaju stosowanego przenośnika pozwala na uzyskanie wysokiej selektywności procesu. Odpowiedni dobór warunków procesu (skład fazy donorowej, membranowej i akceptorowej) umożliwia transport wbrew gradientowi stężeń, co pozwala na znaczne zatężenie fazy akceptorowej w wydzielany analit. Również, możliwość pełnej automatyzacji procesu, w przypadku SLM, stanowi olbrzymią zaletę tej techniki. Trwałość większości opisanych w literaturze układów ekstrakcyjnych z użyciem immobilizowanych membran ciekłych wynosi od tygodnia do miesiąca. W tym czasie, wykonywanie wielokrotnych

ekstrakcji nie powoduje spadku efektywności i powtarzalności procesu separacji, co w przypadku zastosowań analitycznych stanowi nie lada zaletę.

Biorąc pod uwagę moje doświadczenie zdobyte w trakcie realizacji pracy doktorskiej, która dotyczyła zagadnień związanych z zastosowaniem ekstrakcji membranowej w etapie wydzielenia i zatężania krótkich peptydów, i mój późniejszy udział w realizacji projektu badawczego pt. *Nowe standardowe procedury analityczne przeznaczone do badania poziomu zanieczyszczenia ekosystemów wodnych przez ksenobiotyki należące do grupy farmaceutyków i związków endokrynnych* (grant rozwojowy N 0536/R/T02/2007/03, 2007-2010), sprawił że po doktoracie rozpoczęłam badania mające na celu określenie możliwości użycia techniki ekstrakcyjnej SLM w analizie antybiotyków fluorochinolonowych z próbek środowiskowych [H-1]. Antybiotyki są związkami biologicznie aktywnymi, od wielu lat powszechnie stosowane w medycynie oraz w weterynarii. Ich źródłem w środowisku są przede wszystkim pacjenci leczeni antybiotykami, którzy wydalają je, zarówno w formie niezmetabolizowanej jak i zmetabolizowanej oraz zwierzęta hodowlane, którym w celu uzyskania jak najwyższej wydajności podaje się często zawyżone dawki antybiotyków. Konsekwencją częstego lub niewłaściwego leczenia ludzi i zwierząt antybiotykami, a także nieodpowiednia utylizacja przeterminowanych leków jest niepożądane pojawienie się ich w środowisku naturalnym. Niestety, ciągle, utrzymujące się na poziomie poniżej inhibicji, stężenia antybiotyków w środowisku, może powodować zmiany w obecnej tam biocenozie i w konsekwencji prowadzić do powstania rezerwuarów oporności, przesuwając równowagę między mikroorganizmami w kierunku tych antybiotykoopornych. Rozprzestrzenianie się oporności na antybiotyki jest uznawane za coraz większe zagrożenie zarówno dla równowagi środowiska, jak i możliwości leczenia licznych chorób zwierząt i ludzi. Dlatego tak istotne jest monitorowanie obecności i stężenia tej grupy związków, w tym również fluorochinolonów (FQ) (fluoropodstawionych pochodnych kwasów 7-piperazyńlo-4-chinolono-3-karboksyłowych), należących do grupy chinolonów II generacji. Te chemioterapeutyki pojawiły się stosunkowo późno w grupie leków przeciwbakteryjnych. Udowodniły jednak swoją skuteczność terapeutyczną i obecnie znajduje się coraz więcej wskazań do ich stosowania, zarówno w medycynie jak i weterynarii. Niestety, szerokie zastosowanie FQ nie uchroniło naturalnych ekosystemów przed ich skażeniem. Nadużycia spowodowały akumulację fluorochinolonów w zasobach wodnych i glebach oraz wzrost i namnażania bakterii opornych na nie. Zaobserwowano, że odporność bakterii na fluorochinolony jest wyższa w ściekach szpitalnych niż w przypadku oczyszczalni ścieków. Liczne doniesienia literaturowe od wielu już

lat, wykazują wzrost stężenia FQ w środowisku wodnym, nawet do poziomu kilkuset $\mu\text{g}/\text{l}^1$. Dlatego też w świetle tych obaw i dla lepszego zrozumienia występowania oraz losów fluorochinolonów w naturalnym układzie wodnym istnieje niezaprzeczalny wymóg ich oznaczania w różnych matrycach środowiskowych.

W tym projekcie grupę analizowanych fluorochinolonów stanowiła mieszanina zawierająca odpowiednio ciprofloksacynę (CIPR), norfloksacynę (NORF), enrofloksacynę (ENRO) oraz danofloksacynę (DANO), a do ich ekstrakcji zastosowano układ immobilizowanych membran ciekłych (SLM) o geometrii pojedynczego włókna (HF-SLM, *hollow fiber supported liquid membrane* lub HF-LPME, *hollow fiber liquid phase membrane extraction*). Otrzymane ekstrakty SLM analizowano za pomocą samodzielnie opracowanej metody rozdziału z użyciem techniki HPLC-DAD. Jako polimerowe podparcie użyto włókna kapilarne o objętości akceptora zaledwie 57 μl . Optymalizacja warunków ekstrakcji HF-SLM obejmowały m.in. dobór pH fazy donorowej, składu fazy akceptorowej i membranowej, czasu ekstrakcji oraz zasolenia próbki. Na podstawie otrzymanych wyników udowodniłam, że wybór rozpuszczalnika organicznego do przygotowania membrany decyduje o stabilności i skuteczności wzbogacania stosowanego systemu SLM. Użycie wyłącznie rozpuszczalników organicznych takich jak eter di-n-heksylový (DHE) lub fosforan tri-(2-etyloheksylový) (TEHP) skutkowało uzyskaniem bardzo niskich wartości współczynnika wzbogacania dla wszystkich analitów (poniżej 1). Dopiero dodatek do fazy membranowej kationowego przenośnika D_2EHPA (kwasu di-(2-etyloheksylový) fosforowego), nawet w niewielkim stężeniu, w istotny sposób wpływała na efektywność transportu analitów przez hydrofobową membranę ciekłą, osiągając maksimum dla 20%_(w/w) stężenia przenośnika. Biorąc pod uwagę fakt, iż siłą napędową mechanizmu transportu stanowił gradient protonów, w badaniach stosowano jako fazę akceptorową kwas solny o stężeniu 0,1 mol L^{-1} . Co prawda większą efektywność wzbogacania analitów obserwowano wraz ze zwiększaniem się stężenia HCl w akceptorze, jakkolwiek fakt, iż ekstrakty SLM po ekstrakcji były analizowane za pomocą HPLC stosowanie zbyt wysokiego pH fazy akceptorowej nie było korzystne. Opracowana metoda przygotowania próbek z zastosowaniem immobilizowanych membran ciekłych pozwoliła na uzyskanie wysokich wartości wydajności ekstrakcji (powyżej 70%), przy wartości współczynnika wzbogacania powyżej 100. Potencjał aplikacyjny opracowanej metody zweryfikowałam podczas analizy próbek rzeczywistych wód powierzchniowych, wzbogaczanych w znane, ściśle określone ilości oznaczanych substancji. A stopień efektywności ekstrakcji fluorochinolonów oceniono porównując wielkość sygnałów pochodzących z prób kontrolnych (ślepych) oraz prób wzbogaconych substancjami wzorcowymi. Opracowana metoda

¹ Gothwal R, Shashidhar. Occurrence of High Levels of Fluoroquinolones in Aquatic Environment due to Effluent Discharges from Bulk Drug Manufacturers. *Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste*. 2017;21(3):05016003.

w przypadku analizy próbek środowiskowych, charakteryzowała się szeroki zakresem liniowości (od $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ do $4 \mu\text{g L}^{-1}$), a także wysoką precyzją nie przekraczającą 10%. Granice wykrywalności analizowanych fluorochinolonów w próbkach rzeczywistych wynosiły od $0,01$ do $0,02 \mu\text{g L}^{-1}$, i były lepsze w porównaniu do metod, opisanych w literaturze, w których stosowano ekstrakcję SPE. Otrzymane wyniki potwierdziły, że efektywność równowagowego procesu ekstrakcji membranowej wzrasta wraz ze zmniejszaniem się stężenia badanych analitów w próbkach roztworów donorowych, co jest niezwykle ważne, w punktu widzenia analitycznego, ponieważ wzbogacanie jest potrzebne tylko wtedy, kiedy analizowane substancje występują w badanych próbkach w niskich stężeniach.

Zaletę techniki SLM, jako metody skutecznie stosowanej do ekstrakcji średnio polarnych i polarnych związków, postanowiłam wykorzystać również w izolacji i wzbogacaniu muscymolu, tryptofanu i tryptaminy [H-7]. Ta tematyka, związana była z moim udziałem, jako głównego wykonawcy w projekcie pt. „Wykrywanie substancji halucynogennych”, finansowanym ze środków UE w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, w latach 2009 – 2014. W momencie realizacji niniejszego projektu aktualny stan wiedzy na temat wydzielania, wzbogacania i oznaczania grzybowych substancji psychoaktywnych i/lub ich analogów strukturalnych w materiale biologicznym był niewielki i w głównej mierze ograniczony do związków odurzających wymienionych w ustawie o Przeciwdziałaniu Narkomanii (w tym przypadku dotyczy to psylocybiny i psylocyny). Dostępne doniesienia literaturowe koncentrowały się głównie na zastosowaniu w etapie przygotowania próbek klasycznej ekstrakcji rozpuszczalnikowej wspomaganiej (lub nie) ultradźwiękami (ang. *ultrasound-assisted extraction*, UAE) lub ekstrakcji SPE, co szczegółowo zostało opisane i scharakteryzowane w pracy przeglądowej, której jestem współautorem [H-5]. O ile ekstrakcja rozpuszczalnikowa jest skuteczna do wydzielania analitów w przypadku próbek stałych materiału grzybowego, o tyle do analizy próbek płynów fizjologicznych już nie. Tutaj zdecydowanie efektywniejsza okazuje się być technika ekstrakcji do fazy stałej. Niemniej jednak, opisane w literaturze metody, dotyczyły przede wszystkim oznaczania halucynogennych alkaloidów indolowych, czyli psylocybiny i psylocyny, czasem również bufoteniny. Niejednokrotnie, w przypadku oznaczania tych analitów w próbkach płynów fizjologicznych, aby uzyskać satysfakcjonujące odzyski, ekstrakcja SPE była niewystarczająca, i wymagała użycia dodatkowych procedur etapu przygotowania próbek (hydrolizy enzymatycznej i/lub procedury wytrącania białek). Podkreślenia wymaga fakt, że zdecydowanie nieliczną grupę dostępnych procedur analitycznych stanowiły prace dotyczące możliwości izolacji i wzbogacania związków z grupy alkaloidów izoksazolowych, czyli kwasu ibotenowego i muscymolu, powszechnie występujących w grzybach z rodzaju *Amanita sp.* Szczególnie w przypadku analizy próbek moczu, niska sprawność stosowanych kolumniek SPE utrudniała uzyskanie zadawalającego stopnia rozdzielania, powodując koelucję składników przeszkadzających i analitów, szczególnie tych o zbliżonych właściwościach

fizykochemicznych, co wymuszało konieczność zastosowania w etapie przygotowania próbek, aż dwóch technik ekstrakcyjnych (LLE i SPE).

W związku z powyższym, aby uprościć procedurę analityczną zainicjowałam pomysł na realizację badań dotyczących zastosowania opisanej wcześniej techniki HF-SLM do ekstrakcji muscimolu, halucynogennego produktu dekarboksylacji kwasu ibotenowego, oraz tryptofanu i tryptaminy [H-7]. Muscimol bowiem, uważany jest za główną substancję odpowiedzialną za wywołanie efektu halucynogennego po spożyciu grzybów z rodzaju *Amanita*, a tryptofan i tryptamina to analogi indolowe - prekursorzy psylocyny. W ekstrakcji użyłam tego samego polimerowego podparcia, jak w przypadku ekstrakcji fluorochinolonów, ale o mniejszej objętości fazy akceptorowej 22,6 μL . Optymalne warunki wydzielania i wzbogacania mieszaniny analitów uzyskano stosując jako fazę membranową również 20% D₂EHPA w DHE, a jako akceptor 200 mM roztwór kwasu solnego. Całkowity czas ekstrakcji wynosił 60 min. Próbkę moczu przed ekstrakcją wymagały jedynie rozcieńczenia (1:4) i ustalenia pH równego 4. Wartość współczynnika wzbogacania silnie determinowała polarność analizowanych związków. Współczynnik ten, w przypadku próbek moczu wzbogaczanych dodatkiem wzorców wyniósł odpowiednio dla muscimolu, tryptofanu i tryptaminy 4,1; 19,7 i 24,1. Szczególnym osiągnięciem, w tym przypadku było uzyskanie, w przypadku muscimolu, granicy wykrywalności 0,0052 $\mu\text{g mL}^{-1}$, czyli czułości porównywalnej z detekcją za pomocą spektrometru mas. Ponadto, opracowana metoda była przyjazna dla środowiska (niewielkie ilości stosowanych rozpuszczalników), łatwa i przede wszystkim nie wymagała stosowania etapu derywatywacji, oraz zaawansowanych i kosztownych technik analizy instrumentalnej (tj. CE-ME). W Tabeli 1 zaprezentowano zestawienie otrzymanych wyników w porównaniu z danymi prezentowanymi w literaturze.

Tabela 1. Porównanie skuteczności metod ekstrakcji muscimolu z próbek moczu opisanych w literaturze.

STOSOWANA METODA	GRANICA WYKRYWALNOŚCI	Literatura
HF-LPME z HPLC-UV	0,0052 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[H-7]
Spektroskopia NMR-NOESY	13 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2
CE-MS	0,0005 $\mu\text{g mL}^{-1}$	3
Złoże kationowymienne SPE (Dowex®50W X8), derywatywacja chloromrówczanem etylu i analiza GC-MS	1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	4

² Deja S, Jawień E, Jasicka-Misiak I, et al. Rapid determination of ibotenic acid and muscimol in human urine. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2014. doi: 10.1002/mrc.4104.

³ Ginterová P, Sokolová B, Ondra P, et al. Determination of mushroom toxins ibotenic acid, muscimol and muscarine by capillary electrophoresis coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2014 7/1;125(0):242-247.

⁴ Støibrný J, Sokol M, Merová B, et al. GC/MS determination of ibotenic acid and muscimol in the urine of patients intoxicated with *Amanita pantherina*. *International Journal of Legal Medicine*. 2012;126(4):519-524.

Ad. 2. Zastosowania zaawansowanych technik separacyjnych w badaniach nad oznaczaniem ilościowym i jakościowym grzybowych substancji halucynogennych oraz ich analogów strukturalnych [H-2, H-5 oraz H-6].

Biorąc pod uwagę fakt rosnącego zjawiska narkotyzowania się grzybami halucynogennymi uzasadnionym jest konieczność opracowywania metod standardowego oraz prostego oznaczania tych składników nie tylko w próbkach płynów fizjologicznych, ale przede wszystkim w materiale grzybowym. Niestety normy prawne w Polsce nie określają jednoznacznie, które gatunki grzybów zawierają składniki halucynogenne. Jedynie wspomniana psylocybina i psylocyna są wymieniane, spośród grzybowych substancji halucynogennych, w wykazie środków psychotropowych Ustawy „O przeciwdziałaniu narkomanii” z dnia 29 lipca 2005 r. i jej nowelizacja z 20 lipca 2018 r. Dlatego też, w następnych latach pogłębiałam tematykę związaną z opracowaniem skutecznych metod oznaczania składników aktywnych ekstraktów grzybowych.

Jak już uprzednio wspomniałam, w celu wyodrębnienia substancji halucynogennych z materiału grzybowego stosuje się najczęściej ekstrakcję rozpuszczalnikową wspomaganą ultradźwiękami. Czasami używa się także ekstrakcji w aparacie Soxhleta, ale zdecydowanie technika UAE jest w tym przypadku procedurą efektywniejszą. Uzyskane w ten sposób ekstrakty grzybowe po przesączeniu i odwirowaniu poddaje się z reguły analizie za pomocą technik chromatograficznych, w tym chromatografii gazowej i cieczowej. Niestety, aby móc korzystać z techniki GC-MS, konieczne jest w tego rodzaju analizach, przeprowadzenie etapu konwersji chemicznej analitów w ich lotne pochodne. Ten proces zwykle jest pracochłonny i znacznie wydłuża etap przygotowania próbek. Dlatego, zdecydowanie częściej, w analizie grzybowych substancji halucynogennych stosuje się wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) w układzie z różnymi detektorami, w tym UV-VIS, diodowym, fluorescencyjnym, oraz najbardziej popularnym spektrometrem mas. Technika ta w przeciwieństwie do wcześniej wspomnianej chromatografii gazowej, zwykle nie wymaga konwersji chemicznej analitów, co w znaczny sposób upraszcza całą procedurę analityczną. Aczkolwiek, o ile układ sprzężonych pierścieni (pirolowego oraz benzenowego) w strukturze indolowych halucynogenów wywołuje absorpcję i emisję światła o większym natężeniu, i dzięki temu determinuje wysoką czułość i niskie granice LOD i LOQ opracowanych procedur analitycznych, szczególnie tych z zastosowaniem techniki HPLC z detekcją UV, DAD oraz fluorescencyjną, to w przypadku izoksazolowych alkaloidów, uzyskanie pożądanej czułości już takie proste nie jest i wymaga zastosowania dużo kosztowniejszej techniki detekcji (spektrometru mas), albo konwersji chemicznej analitu, np. w pochodne dansylowe.

W związku z tym, w kolejnym kroku podjęłam tematykę związaną z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej (CE) z detektorem diodowym do opracowania skutecznego sposobu rozdziału i oznaczania

muscymolu i kwasu ibotenowego w ekstraktach grzybowych z rodzaju *Amanita* [H-2]. Elektroforeza kapilarna jako technika komplementarna do chromatografii cieczowej, cechuje się wieloma zaletami, w tym wysoką efektywnością rozdzielania, krótkim czasem analizy oraz przede wszystkim niewielkim zużyciem rozpuszczalników organicznych. Podstawą rozdzielania jest różnica w prędkościach migracji cząstek obdarzonych ładunkiem przy zastosowaniu stałego, wysokiego napięcia. W trakcie realizacji tego projektu, równoległe prowadzone były eksperymenty mające na celu optymalizację warunków rozdzielania elektroforetycznego badanych analitów oraz również warunków ekstrakcji rozpuszczalnikowej wspomaganą ultradźwiękami używanej w etapie przygotowania próbek stałych. W przypadku analiz za pomocą CE zbadalam wpływ rodzaju i pH buforu rozdzielającego (BGE) oraz dodatku modyfikatora organicznego na efektywność rozdzielania. Siła jonowa oraz pH elektrolitu nośnego determinowały wielkość przepływu elektroosmotycznego oraz formę jonową analitów. Ze względu na charakter chemiczny muscymolu i kwasu ibotenowego, a szczególnie wartości pKa uzasadnionym było zastosowanie BGE o charakterze kwasowym. Dodatek organicznego modyfikatora, poprzez zmianę stałej dielektrycznej BGE oraz jego lepkości, poprawiał w znaczny sposób sprawność stosowanego układu CE. Skuteczność opracowanej procedury analitycznej za pomocą CE-PDA sprawdziłam analizując próbki rzeczywiste grzybów halucynogennych zebranych na terenie Polski. Warunki rozdzielania elektroforetycznego wymusiły zmodyfikowanie opisanych wcześniej metod ekstrakcji rozpuszczalnikowej wspomaganą ultradźwiękami. W tym przypadku zastosowanie mieszaniny metanolu i 1 mM buforu fosforanowego o pH 3 (1:1_{v/v}) okazało się być skuteczne i efektywne. Łącznie zanalizowałam próbki pochodzące z 41 grzybów z rodzaju *Amanita* (w tym *Amanita muscaria*, *Amanita citrina* oraz *Amanita pantherina*). Zawartość muscymolu mieściła się w zakresie od 46 µg g⁻¹ do 1362 µg g⁻¹, a kwasu ibotenowego w zakresie 182 µg g⁻¹ do 2983 µg g⁻¹. Wśród przebadanych grzybów były również próbki w których nie stwierdzono obecności kwasu ibotenowego, oraz takie w których nie wykryto obu składników. Tak zróżnicowana zawartość izoksazolowych alkaloidów halucynogennych w przebadanym materiale grzybowym wynikała z faktu, że na obecność metabolitów grzybowych wpływa między innymi stadium rozwoju grzyba, warunki pogodowe, ekosystem w którym rośnie oraz część grzyba poddana analizie (kapelusz, trzon) co zaobserwowano również i opisano w publikacji Deja i in.⁵ gdzie jako technikę oznaczania zastosowano magnetyczny rezonans jądrowy (NMR, ang. *Nuclear Magnetic Resonance*). Opracowaną procedurę analityczną za pomocą UAE i CE-PDA poddałam procesowi walidacji, którego celem było określenie zakresu jej przydatności oraz wiarygodności. W tym celu określiłam granicę wykrywalności i oznaczalności, precyzję, dokładność, odtwarzalność oraz zakres liniowości i efekt matrycy. Wysokie wartości liczbowe współczynników determinacji (R²) wykazały

⁵ Deja S, Wieczorek PP, Halama M, et al. Do differences in chemical composition of stem and cap of *Amanita muscaria* fruiting bodies correlate with topsoil type? PLoS ONE. 2014;9(12).

liniowość krzywych kalibracyjnych w badanych zakresach stężeń, odpowiadających zawartości analitów w próbkach rzeczywistych. Uzyskany odzysk analitów w przypadku opracowanej metody ekstrakcji z matrycy grzybowej mieścił się w zakresie od 87% do 95%. Precyzja metody, wyznaczona na podstawie względnego odchylenia standardowego (RSD) była poniżej 7%. Uzyskane granice wykrywalności dla muscymolu ($1,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) i dla kwasu ibotenowego ($1,8 \mu\text{g ml}^{-1}$) były satysfakcjonujące i porównywalne z metodami chromatograficznymi opisanymi w literaturze, szczególnie z tymi w przypadku których stosowano detekcję MS. Co istotne, w pracy [H-2] po raz pierwszy opisana została możliwość oznaczania halucynogennych izoksazoli w materiale grzybowym z użyciem elektroforezy kapilarnej. Podkreślenia wymaga też fakt, że opracowana procedura analityczna charakteryzuje się wysoką selektywnością i czułością, i przede wszystkim nie wymaga przeprowadzenia konwersji chemicznej analitów oraz dodatkowego etapu ekstrakcji (SPE), pomimo że do detekcji stosowano mniej czuły i selektywny detektor z matrycą diodową.

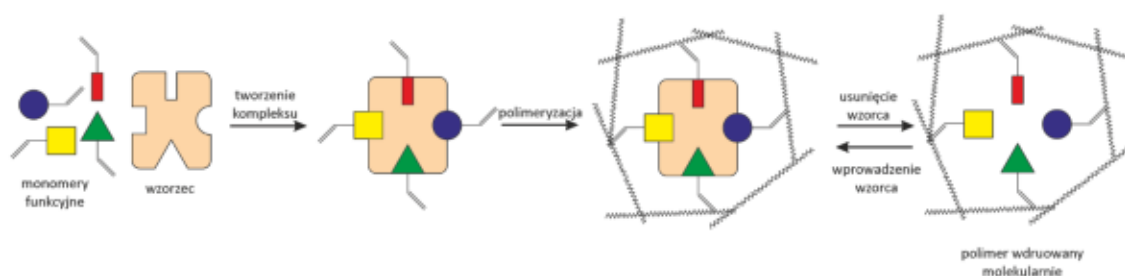
W ramach prowadzonych badań z zakresu substancji halucynogennych podjęłam również tematykę związaną z oceną toksyczności ostrej i efektów farmakologicznych psylocyny syntetycznej oraz suchych pozostałości metanolowych ekstraktów grzybowych gatunków *Pholiotyna cyanopus* i *Psilocybe semilanceata*. Realizacja tego projektu była możliwa dzięki współpracy z prof. dr hab. Olgą Zhuk z Instytutu Biotechnologii Wydziału Przyrodniczo-Technicznego Uniwersytetu Opolskiego oraz grupy badawczej z Katedry Farmakologii Ogólnej i Klinicznej na Uniwersytecie Medycznym w Odessie. Jako współautor pracy opublikowanej w 2015 w *Toxins* [H-6] brałam udział nie tylko w części dotyczącej opracowania skutecznej procedury izolacji analitów oraz metody UHPLC-MS/MS umożliwiającej określenie składu chemicznego używanych w badaniach farmakologicznych ekstraktów grzybowych, ale również we współtworzeniu koncepcji badań farmakologicznych, ich zaplanowaniu, interpretacji i dyskusji otrzymanych wyników. Analiza LC-MS metanolowych ekstraktów *Pholiotina cyanopus* i *Psilocybe semilanceata* potwierdziła znacząco zawartość psylocybiny (około pięciokrotnie wyższą w porównaniu do zawartości jej głównego metabolitu – psylocyny). Generalnie zawartość psylocyny i psylocybiny w analizowanych ekstraktach była dominująca w porównaniu do innych zidentyfikowanych indolowych związków halucynogennych. Poza psylocyną i psylocybiną analizowane ekstrakty zawierały również baeocystynę, norbaeocystynę oraz aeruginascynę. Co istotne, w czasie realizacji tego projektu dane literaturowe wskazywały, że indolowe halucynogeny (w tym psylocyna) należą do niespecyficznych agonistów receptorów serotoniny (5-HT), które wiążą się z receptorami 5-HT_{2C} z różnym stopniem powinowactwa. Jednym ze sposobów pozwalających na ocenę efektów halucynogennych u zwierząt laboratoryjnych jest wykorzystanie reakcji drgnięcia głowy (HTR, *head-twitch response*). Te doniesienia literaturowe potwierdzały fakt, że HTR zachodzi przez aktywację

receptora 5-HT_{2c}. Przeprowadzone eksperymenty na myszach wykazały porównywalny efekt biologiczny biorąc pod uwagę czystą, syntetyczną psylocynę oraz mieszaninę alkaloidów indolowych obecnych w testowanych ekstraktach grzybowych. Efekt toksyczny badanych ekstraktów był zdecydowanie silniejszy w odniesieniu do czystej psylocyny, pomimo tego, że łączna zawartość indolowych alkaloidów w nich była dziesięciokrotnie mniejsza, co potwierdza istnienie efektu synergistycznego. W tym przypadku, halucynogeny jako stymulanty centralnego układu nerwowego (CNS) mogą być interesujące ze względu na możliwość ich wykorzystania jako potencjalnych terapeutyków. Stymulacja centralnych receptorów serotoniny jest możliwa przez wprowadzenie prekursora serotoniny - 5-hydroktryptofany (5-HTP), który obecny w organizmach myszy w znacznych dawkach wywołuje spontaniczne i nieregularne drgnięcia głowy. Przeprowadzone eksperymenty potwierdziły założenie o potencjalnej antydepresyjnej aktywności psylocyny oraz halucynogennych indolowych alkaloidów. Oddziaływanie psylocyny i badanych ekstraktów grzybowych na efekt kiwnięcia głowy myszy wywołany 5-HTP demonstruje zależność od czasu rejestracji oraz wiarygodność hamowania efektu behawioralnego 5-HTP więcej niż o 60%. Te rezultaty świadczą o występowaniu wyraźnego przeciwdepresyjnego efektu badanych substancji.

Ad. 3. Opracowanie skutecznych metodyk analitycznych bazujących na zastosowaniu w etapie przygotowania próbki polimerów z nadrukiem cząsteczkowym w analizie substancji endokrynologicznie czynnych (fitoestrogenów oraz alkilofenoli) [H-3, H-4 i H-8].

Interesującą grupę substancji biologicznie aktywnych stanowią wspomniane wcześniej ksenobiotyki, a szczególnie te zaliczane do związków endokrynologicznie czynnych (EDC, *endocrine disrupting compounds*). Ich obecność, w otaczającym nas środowisku ma związek, w większości przypadków, z działalnością człowieka, a ściślej z coraz większym postępem gospodarczym i rozwojem przemysłu, itp. Niestety związki EDC ze względu na swoje podobieństwo do naturalnych hormonów endogennych, już w niewielkich stężeniach mogą mieć wpływ na ich prawidłowe działanie, a przez to zaburzać funkcjonowanie układu dokrewnego. Na podstawie wielu przeprowadzonych badań oraz obserwacji populacji zwierząt, zamieszkujących mocno zanieczyszczone ekosystemy, zaobserwowano że związki te mogą przyczynić się między innymi do niepłodności oraz rozwoju chorób nowotworowych. Istnieją dowody wskazujące na wystąpienie tych niepożądanych zmian również u ludzi. Dlatego też istnieje niezaprzeczalna potrzeba opracowywania wiarygodnych metod analitycznych do monitorowania ich obecności w otaczającym nas środowisku. Ze względu na niewielkie stężenie tych analitów w analizowanych próbkach i złożoność matrycy, oznaczanie ich wymaga często użycia czasochłonnych i pracochłonnych etapów przygotowania próbek. Dominującą rolę pełni tutaj ekstrakcja do fazy stałej, z użyciem komercyjnie dostępnych złożeń, które często nie są wystarczająco selektywne co skutkuje tym,

że wraz z analitami współekstrahowane są również inne substancje, obecne w badanym materiale próbki (szczególnie tych ze złożonym składem matrycy), które zwykle utrudniają zarówno jakościowe, jak i ilościowe oznaczenie badanych związków. W tym przypadku ciekawą alternatywę stanowi zastosowanie w procesie ekstrakcji do fazy stałej polimerów z odciskiem molekularnym (MIP, *molecularly imprinted polymers*). Otóż polimery z nadrukiem cząsteczkowym charakteryzuje pożądana, wysoka selektywność. Powstające podczas procesu polimeryzacji trójwymiarowe wnęki są komplementarne kształtem, wielkością i rodzajem wiązań względem związku, który został użyty jako cząsteczka wzorca. Dzięki temu otrzymany polimer z nadrukiem cząsteczkowym może selektywnie wiązać cząsteczki identyczne (oraz analogi strukturalne) do tych użytych podczas syntezy (Rys. 2).



Rysunek 2. Schemat wdrogowania cząsteczkowego

Selektywne miejsca wiązania, które powstają podczas procesu polimeryzacji naśladują miejsca wiążące systemów bimolekularnych – przeciwciał i enzymów. Jednak w przeciwieństwie do nich, zaletą MIPów jest wysoka stabilność chemiczna, termiczna i mechaniczna oraz prostota otrzymywania. Można je tworzyć dla wielu różnych związków oraz są zdecydowanie trwalsze i tańsze niż naturalne przeciwciała. Ponadto ich przechowywanie (nawet przez kilka lat), nie wpływa na utratę „zdolności zapamiętywania”. Dla potwierdzenia efektywności sorpcyjnej otrzymanych MIPów, syntezuje się równocześnie polimery kontrolne bez nadruku cząsteczkowego (NIP, *non-imprinted polymers*).

Grupę badanych przeze mnie związków wykazujących efekt endokrynnny stanowiły związki fenolowe, w tym naturalnie występujące w przyrodzie flawonoidy (fitoestrogeny) oraz syntetyczne alkilofenole wprowadzone do środowiska wskutek działalności człowieka (w tym popularny bisfenol A). W ramach prowadzonych przeze mnie badań udało mi się zoptymalizować warunki syntezy polimerów z nadrukiem cząsteczkowym stosując różne techniki polimeryzacji, w których jako cząsteczkę wzorca użyto biochaninę A – jeden z najczęściej występujących naturalnych fitoestrogenów [H-3, H-4]. oraz bisfenol A [H-8]. We wszystkich przypadkach określono wpływ rodzaju i ilości zastosowanych reagentów oraz warunków prowadzenia syntezy na właściwości fizykochemiczne otrzymanych sorbentów polimerowych. Przeprowadziłam również charakterystykę fizykochemiczną otrzymanych materiałów sorpcyjnych, analizę powierzchni za pomocą techniki spektroskopii w podczerwieni i skaningowej spektroskopii elektronowej, oraz analizę porowatości i powierzchni właściwej metodą

niskotemperaturowej adsorpcji azotu. Otrzymane polimery zastosowałam jako potencjalne materiały sorpcyjne w ekstrakcji SPE do wydzielania i wzbogacania badanych ksenobiotyków. Zoptymalizowane procedury ekstrakcji stosowano następnie w analizie próbek rzeczywistych.

W rezultacie, w pracy [H-8] opracowałam efektywną metodę izolacji i wzbogacania bisfenolu A oraz innych wybranych alkilofenoli (2-fenylofenolu (2-PP), 4-*tert*-oktylofenolu (t-OP) i nonylofenolu (4NP)) w oparciu o zastosowanie polimerów z nadrukiem cząsteczkowym. Polimery te (MIPy), przygotowane w obecności BPA jako wzorca, otrzymywano stosując monomery funkcyjne różniące się charakterem chemicznym (kwas metakrylowy, 4-winylopirydyna, oraz akrylamid) oraz wykorzystując różne rozpuszczalniki porotwórcze (acetonitryl, chlorek metylenu, toluen, chloroform). Dla poszczególnych polimerów z odciskiem molekularnym i odpowiadającym im polimerom niewdrukowanym różniących się zastosowanymi do syntezy reagentami określiłam zdolność wiązania bisfenolu A jako cząsteczki matrycowej. Wartości współczynnika wdrukowania, zdefiniowanego jako stosunek odzysku bisfenolu A uzyskanego przy zastosowaniu polimeru wdrukowanego oraz polimeru kontrolnego w testach adsorpcyjnych, były zbliżone do jedności, co wynikało z faktu, że do wiązania cząsteczek analitów dochodzi nie tylko w utworzonych wnękach wiążących, ale także w sposób niespecyficzny na całej powierzchni sorbentu. Nie zaobserwowałam istotnego wpływu rodzaju zastosowanego monomeru funkcyjnego oraz rozpuszczalnika porogennego na efektywność wiązania cząsteczek wzorca. Dopiero eksperymenty w których określiłam zdolność selektywnego rozpoznawania bisfenolu A jako cząsteczki matrycowej z wodnych mieszanin zawierających badany analit oraz inne analogi strukturalne (alkilofenole), wykazały znaczenie rodzaju stosowanego monomeru funkcyjnego. W tym przypadku najodpowiedniejszym monomerem w syntezie MIPów z wdrukowaną cząsteczką bisfenolu A okazał się akrylamid, gwarantujący otrzymanie sorbentów zdolnych do selektywnego wiązania wzorca w obecności innych ksenobiotyków (analogów strukturalnych). Niestety, we wszystkich przypadkach 2-fenylofenol, ze względu na znaczne podobieństwo struktury chemicznej do bisfenolu A, był wiązany przez sorbent z praktycznie taką samą efektywnością. W żadnym przypadku, pożądana selektywność ukierunkowana tylko na cząsteczki wzorca (bisfenolu A) nie była obserwowana. Niemniej jednak, obecność w strukturze 4-*tert*-oktylofenolu i nonylofenolu długiego łańcucha alifatycznego utrudniała efektywne „dopasowanie” do trójwymiarowej wnęki wiążącej stosowanych do ekstrakcji MIP-ów, co decydowało z kolei o selektywności procesu ekstrakcji. Przeprowadzone eksperymenty potwierdziły również, że w trakcie analizy próbek mieszaniny analitów na złożu MIP, w eluatach otrzymanych po etapie nanoszenia próbki nie wykryto obecności żadnego z analizowanych związków. Podczas gdy w przypadku analogicznych eksperymentów, ale ze złożem NIP, bisfenol A był obecny. Te obserwacje potwierdziły przypuszczenia, że oddziaływanie pomiędzy BPA a MIP-em, w przypadku wodnych roztworów było silne ale

niespecyficzne. Dlatego też aby wyeliminować niepożądane niespecyficzne wiązanie analitów z sorbentem SPE, przeprowadzono optymalizację procedury ekstrakcji pod kątem doboru rozpuszczalnika wymywającego, zdolnego do selektywnej desorpcji 2-fenylofenolu i pozostałych alkilofenoli, stanowiących analogi strukturalne BPA. Okazało się, że zastosowanie toluenu jako rozpuszczalnika wymywającego, znacznie zwiększa selektywność procesu ekstrakcji bisfenolu A z mieszaniny zawierającej ten związek oraz inne alkilofenole. Uzyskane wyniki wykazały, że toluen użyty w etapie wymywania procedury MISPE (*molecularly imprinted solid phase extraction*) może w pewnym stopniu wpływać nie tylko na oddziaływania z analitami, ale również i na strukturę sieci polimerowej, co związane jest z odpowiednim rozmieszczeniem grup funkcyjnych we wnękach i możliwością efektywniejszego wiązania wzorca, przy jednoczesnym obniżeniu dostępności miejsc rozpoznawania dla cząsteczek innych substancji. W tym przypadku użycie określonej ilości toluenu umożliwiło nawet praktycznie całkowite wyeliminowanie z powierzchni MIPów analogów strukturalnych (alkilofenoli), a przez to uzyskanie wysokiego odzysku dla bisfenolu A (ponad 80% przy selektywności BPA do pozostałych analitów 8:1). Potencjał aplikacyjny opracowanej procedury analitycznej wykazałam podczas analizy próbek rzeczywistych wód powierzchniowych rzeki Odry. W przypadku zastosowania etapu wymywania w procedurze MISPE możliwie było tylko i wyłącznie selektywne ekstrakowanie bisfenolu A. Natomiast pozostałe alkilofenole mogły być wykrywane tylko wówczas, kiedy nie stosowano etapu wymywania z toluenem.

Dla porównania w pracach [H-3] i [H-4] opisano procedury służące wydzielaniu innych związków fenolowych - fitoestrogenów: biochaniny A (BCA), genisteiny (GEN) i daidzeiny (Da). W tym celu zsyntezowano polimery z nadrukiem cząsteczkowym dwoma technikami: polimeryzacji blokowej oraz na nośniku techniką zol-żel. Podczas każdej z syntez poszukiwano takiego składu oraz ilości poszczególnych reagentów mieszaniny polimeryzacyjnej, które pozwoliłyby na otrzymanie materiału sorpcyjnego o jak najlepszych właściwościach, czyli umożliwiającego selektywne rozpoznawanie określonego związku lub typu związków. W przypadku polimeryzacji blokowej parametrami, które miały największy wpływ na jakość otrzymanych MIPów były rodzaj monomeru funkcyjnego oraz czynnika porotwórczego. Najlepszym monomerem funkcyjnym okazał się kwas metakrylowy a odczynnikiem porotwórczym acetonitryl. W przypadku modyfikowanej krzemionki optymalizowanym parametrem była ilość oraz charakter stosowanego jako podparcie silikażelu. Analiza porowatości wykazała, że wszystkie polimery z nadrukiem cząsteczkowym, otrzymane obiema technikami, posiadały większe powierzchnie właściwe oraz większą objętość porów w porównaniu z polimerami bez nadruku. Natomiast średnica porów była nieco mniejsza dla MIPów, co miało związek najprawdopodobniej z obecnością wzorca w mieszaninie polimeryzacyjnej, który wpływał na powstawanie selektywnych wnęk, co miało z kolei bezpośredni wpływ na ich powierzchnię oraz

porowatość. Zdjęcia otrzymane za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego potwierdziły różnice w morfologii poszczególnych sorbentów. Polimery otrzymane na drodze polimeryzacji blokowej posiadały dość zwartą, nieregularną strukturę. Natomiast krzemionka modyfikowana powierzchniowo zarówno warstwą MIP-u jaki i NIP-u miała dobrze rozwiniętą trójwymiarową strukturę, a główną różnicą pomiędzy MIP-em i NIP-em była wielkość otrzymanych ziaren. W każdym przypadku analiza FTIR potwierdziła skuteczność wdrukowania cząsteczkowego.

W przypadku polimeryzacji blokowej o selektywności procesu decydował w dużym stopniu dobór odpowiedniej mieszaniny rozpuszczalników stosowanych podczas etapu wymywania. Selektywność wiązania względem biochaniny A można było uzyskać poprzez zastosowanie 1% $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ w 10% MeOH – wtedy odzyski dla BCA, Gen oraz Da wynosiły odpowiednio: 100,2%; 17,0% oraz 9,3%. Gdy używano 0,025% $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ w 10% MeOH odzyski wynosiły: 94,1%; 93,2% i 91,5%. Etap ten pozwolił na wyeliminowanie niespecyficznych oddziaływań analitów na powierzchni MIP-u (bez ingerowania w wiązania utworzone we wnękach), a poprzez możliwość zmiany jego składu stanowił istotny aspekt w kwestii kontrolowania stopnia selektywności otrzymanego polimeru (albo tylko w odniesieniu do cząsteczki wzorca, albo również w kierunku analogów strukturalnych). Z kolei modyfikowana powierzchniowo krzemionka, otrzymana techniką zol-żel, umożliwiła otrzymanie wysokich odzysków dla każdego z analitów, a różnica w selektywności pomiędzy poszczególnymi MIP-ami i NIP-ami była bardzo wysoka, co świadczyło o obecności wnęk wiążących. W porównaniu jednak do polimeryzacji blokowej, w żadnym przypadku nie udało się znaleźć skutecznego układu rozpuszczalników pozwalających na skuteczne wymycie analogów biochaniny A. Było to przypuszczalnie związane z tym, iż w otrzymanym materiale polimerowym, wiązania tworzone pomiędzy grupami aminowymi monomeru funkcyjnego (APTES, (3-aminopropylo) –trietoksyilanu) a grupami hydroksylowymi genisteiny i daidzeiny, były na tyle silne i trwałe, że nawet dodatek silnie zasadowego wodnego roztworu amoniaku nie powodował zerwania tych wiązań.

W kolejnym etapie przeprowadziłam eksperymenty z analizą próbek rzeczywistych – moczu ludzkiego. Na początku analizie poddano nierozcieńczone próbki moczu. Niestety, złożoność matrycy powodowała szybkie zanieczyszczenie złoża upakowanego w kolumnie SPE, co sprawiało że stawało się ono niezdatne do dalszego użytku. Dopiero kilkukrotne rozcieńczenie próbki (pięciokrotne w przypadku polimerów otrzymanych z polimeryzacji blokowej - dane nieopublikowane) pozwoliło na uzyskanie satysfakcjonujących rezultatów. W tym przypadku, otrzymane wyniki potwierdziły skuteczność zsyntezowanego materiału sorpcyjnego w etapie wzbogacania badanych analitów, niestety efektywność eliminacji substancji przeszkadzających z matrycy próbki rzeczywistej była ograniczona. Analogiczną sytuację zaobserwowano, w przypadku stosowania w etapie ekstrakcji próbek moczu, krzemionki modyfikowanej powierzchniowo polimerem z nadrukiem cząsteczkowym.

Tutaj trzykrotne rozcieńczenie przyniosło zamierzony efekt i było wystarczające żeby biochaninę A. Niestety, niska efektywność oczyszczania matrycy nie pozwoliła na skuteczne oznaczanie genisteiny i daidzeiny. Dopiero wprowadzenie dodatkowego etapu przygotowania próbki – hydrolizy enzymatycznej z użyciem enzymów β -glukuronidazy i sulfatazy (otrzymanej z *Helix Pomatia*) umożliwiło otrzymanie wysokich odzysków dla wszystkich analizowanych fitoestrogenów, i były one lepsze w porównaniu do tych, które otrzymano dla sorbentów zsyntezowanych metodą blokową. Dodatkowo, analiza chromatogramów próbek ślepych potwierdziła w nich obecność daidzeiny i genisteiny, oraz niewielką ilość biochaniny A, co świadczyło o efektywności zaproponowanej metody.

4. Zastosowanie techniki ekstrakcji SPE oraz chromatografii cieczowej sprzężonej z spektrometrią mas do określenia charakteru przemian hydroksychalkonów przez cyjanobakterie [H-9, H-10]

Dwie ostatnie publikacje przedłożone jako osiągnięcie naukowe mojego wniosku habilitacyjnego dotyczą zagadnień związanych z podjęciem badań związanych z opracowaniem skutecznej metody analitycznej umożliwiającej śledzenie przemian transformacji flawonoidów przez cyjanobakterie, ważnych z punktu widzenia ich aktywności biologicznej. Jako mikroorganizmy fotoautotroficzne, o szerokim zakresie tolerancji wobec czynników środowiskowych, okazują się one być efektywnymi biokatalizatorami modyfikującymi cząsteczki chalkonów (biogenetycznych prekursorów wszystkich pozostałych grup flawonoidów), w celu nadania korzystnych właściwości produktom biotransformacji. Wiedza na temat tego rodzaju przemian wciąż jest rzadko opisywana w literaturze, a prezentowane prace należą do jednych z pierwszych [H-9, H-10]. Moim zadaniem, w trakcie realizacji tego projektu było znalezienie sposobu pozwalającego na monitorowanie charakteru przemian biotransformacji zróżnicowanych strukturalnie hydroksychalkonów i ich pochodnych prowadzonych przez różne szczepy cyjanobakterii. W tym celu konieczne było, opracowanie kompleksowej, nowej metody analitycznej, umożliwiającej ich skuteczne wydzielenia z komórek cyjanobakterii, oraz doborze warunków ich oznaczania oraz identyfikacji w otrzymanych ekstraktach.

Ze względu na charakter prowadzonych badań do oznaczania w/w związków zastosowałam chromatografię cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas w trybie monitorowania wybranych reakcji MRM (*multiple reaction monitoring*) lub SRM (*single reaction monitoring*). Główne zalety wynikające z połączenia tych dwóch technik to wysoka rozdzielczość, selektywność i specyficzność określania struktury chemicznej (masa i fragmentacja)) co determinuje wiarygodność identyfikowanych analitów. W procesie doboru warunków pomiaru LC-MS z jonizacją ESI (*electrospray ionization*) uwzględniłam optymalizację parametrów źródła jonów (np. wartości napięcia przyłożonego do poszczególnych elementów optyki jonowej, ciśnienia gazów (np. osłonowego i wspomagającego rozpylanie), temperatury źródła jonów, itp.) oraz warunków rozdziału chromatograficznego (rodzaju

stosowanej fazy stacjonarnej i składu fazy ruchomej). Analizy MS/MS prowadzono w trybie rejestracji zarówno jonów dodatnich oraz ujemnych, w zależności od intensywności jonów fragmentacyjnych oznaczanych związków. Rozdział UHPLC prowadzono za pomocą kolumny Gemini-NX C18 stosując elucję gradientową. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu i wody zawierająca dodatek kwasu mrówkowego (0,1% v/v). Analizie LC-MS/MS poddano ekstrakty komórkowe testowanych cyjanobakterii, pozyskane z kultury eksperymentalnej, w której obserwowano hamowanie wzrostu pod wpływem obecności odpowiednio 2'-hydroksychalkonu, 2''-hydroksychalkonu i 4''-hydroksychalkonu [H-9] oraz ich metoksylowych i metylowych pochodnych [H-10].

Równolegle optymalizowane były również warunki etapu przygotowania próbek. W celu wyizolowania analitów z komórek mikroorganizmów zastosowano dwukrotną ekstrakcję rozpuszczalnikową z metanolem wspomaganą ultradźwiękami. Połączone ekstrakty następnie odparowywano do sucha w strumieniu azotu i dodatkowo poddawano ekstrakcji SPE, w celu wyeliminowania z matrycy próbki chlorofili i karotenoidów przeszkadzających w analizie chromatograficznej. Spośród komercyjnie dostępnych sorbentów najefektywniejszym do tego typu zastosowań okazało się złożo jonowymienne OASIS®MCX. Do elucji SPE również użyto metanolu, a otrzymane ekstrakty ponownie odparowywano w strumieniu azotu. Otrzymaną suchą pozostałość roztwarzano w mieszaninie metanol : mrówczan amonu (3:2 v/v) i analizowano za pomocą opracowanej metody UHPLC-MS/MS. Otrzymane w ten sposób wyniki potwierdziły, że w efekcie transformacji 2'-hydroksychalkonu przez testowane cyjanobakterie otrzymywano dwa produkty; flawanon (częściej i w wyższym stężeniu) oraz 2'-hydroksydihydrochalkon. W przeciwieństwie do 2'-hydroksychalkonu, produktem przemian 2''-hydroksychalkon był tylko i wyłącznie 2''-hydroksydihydrochalkon. Zaś efektem transformacji 4''-hydroksychalkonu przez cyjanobakterie było utworzenie trzech metabolitów: 4''-hydroksydihydrochalkonu, 4''-hydroksy-1,3-difenylopropan-1-olu i 4'',x-dihydroksydihydrochalkonu. Testowane szczepy cyjanobakterie transformowały również metoksylowe pochodne 2'-hydroksychalkonu (2'',5'-dimetoksy-2'-hydroksychalkon i 4'',4'-dimetoksy-2'-hydroksychalkon), poprzez uwodorniającą bioredukcję, tworząc odpowiednie hydroksydihdropochodne. Zaobserwowano zależność efektywności biouwodornienia badanych chalkonów od lokalizacji podstawnika metoksylowego oraz, w mniejszym stopniu, od szczepu biokatalizatora. 2'-hydroksy-4''-metylochalkon był także przekształcany przez cyjanobakterie do różnych produktów, spośród których najbardziej interesującymi były pochodne 2'-etoksylowe. We wszystkich przypadkach na podstawie otrzymanych danych z analiz MS/MS zaproponowano ścieżki fragmentacji. Przeprowadzone eksperymenty analiz UHPLC-MS/MS wykazały, że cyjanobakterie stanowią efektywny katalizator (wysoce wydajny) do prowadzenia przemian chemoselektywnej redukcji nienasyconych związków karbonylowych, w łagodnych warunkach, w środowisku wodnym. Taka transformacja prowadzi do

utworzenia dihydrochalkonów, które ze względu na słodki smak i naturalne pochodzenie są poszukiwane przez producentów wieloskładnikowych, niskokalorycznych słodzików. Z kolei właściwości przeciwutleniające i ochrona przed promieniowaniem UV, czynią dihydrochalkony substancjami interesującymi dla przemysłu farmaceutycznego i kosmetycznego.

PODSUMOWANIE

Przedstawiony cykl dziesięciu publikacji stanowi kompleksowe opracowanie procedur przygotowywania próbek rzeczywistych oraz oznaczania w nich związków biologicznie aktywnych – z grupy związków fenolowych (alkilofenoli, fitoestrogenów, hydroksychalkonów), fluorochinolonów oraz alkaloidów izoksazolowych i indolowych. Uzyskane w toku przeprowadzonych badań wyniki, stanowiące moje osiągnięcie habilitacyjne, pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

- ✓ Opracowałam selektywne i efektywne metody przygotowywania próbek rzeczywistych o zróżnicowanym charakterze matrycy (próbek środowiskowych i biologicznych) z zastosowaniem technik SPE, HF-SLM, USA oraz MISPE pod kątem izolacji substancji biologicznie aktywnych o różnych właściwościach fizyko-chemicznych.
- ✓ Przeprowadziłam kompleksowe i systematyczne badania wpływu poszczególnych parametrów ekstrakcji na efektywność i selektywność zastosowanych przeze mnie technik izolacji i wzbogacania analitów. Dobór tych warunków pozwolił na uzyskanie zadawalających odzysków oznaczanych związków i skutecznego oczyszczenia matrycy, przez co zaproponowane procedury analityczne stanowiły istotną alternatywę w porównaniu do metod opisanych w literaturze.
- ✓ Opracowałam sposoby syntezy nowych materiałów sorpcyjnych typu MIP do ekstrakcji wybranej grupy ksenobiotyków. Porównałam zdolność sorpcji poszczególnych analitów i selektywność tego procesu w zależności od sposobu wytwarzania polimerów z nadrukiem cząsteczkowym oraz warunków ekstrakcji MISPE (szczególnie etapu wymywania).
- ✓ Stworzyłam zestaw efektywnych metod rozdzielania i oznaczania jakościowego oraz ilościowego zróżnicowanej grupy związków biologicznie aktywnych z zastosowaniem zaawansowanych technik analizy instrumentalnej w tym chromatografii cieczowej z detektorem spektrofotometrycznym oraz tandemowym spektrometrem mas z jonizacją przez elektrorozpylanie, a także elektroforezy kapilarnej z detektorem z matrycą diodową. W tym przypadku, systematyczne badania nad doбором warunków rozdzielania chromatograficznego i elektroforetycznego zaowocowały otrzymaniem nowych układów separacyjnych o dużej sprawności i rozdzielczości, często po raz pierwszy umożliwiającymi skuteczną analizę danych analitów.

- ✓ Eksperymenty mające na celu sprawdzenie poprawności działania opracowanych metod analitycznych (w tym zakres liniowości, LOD, LOQ, precyzja, odzysk, itp.) potwierdziły ich efektywność i wymogi stawiane oznaczeniom ilościowym.
- ✓ Opracowane przeze mnie procedury analityczne z powodzeniem znalazły zastosowanie w analizie próbek rzeczywistych, pozwalając na potwierdzenie obecności i stężenia analizowanych substancji. Uzyskane granice wykrywalności były wyższe w porównaniu do metod opisanych w literaturze.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora można podzielić na następujące obszary tematyczne:

- a) **Kontynuacja tematyki mojej pracy doktorskiej z zakresy ekstrakcji peptydów**, która zaowocowała 3 publikacjami (w tym 1 przeglądowej).
- b) **Rozdział enancjomerów związków fosforoorganicznych i badanie ich czystości optycznej.**
Prostota wykonania i niski koszt analizy za pomocą strefowej elektroforezy kapilarnej był powodem zastosowania jej do rozdziału enancjomerów N-benzylokarboksylowych analogów kwasów fosfonowych i aminofosfonowych. Badania te realizowane były we współpracy z grupą prof. Pawła Kafarskiego z Politechniki Wrocławskiej, a ich rezultatem była praca opublikowana w czasopiśmie *Electrophoresis*.
- c) **Zastosowanie spektroskopii mas w identyfikacji nowo zsyntezowanych związków organicznych, oraz substancji wyizolowanych z produktów naturalnych.**
Uzyskanie w roku 2011 dofinansowanie, ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach programu RPO WO 2007-2013, na zakup spektrometru mas zainicjowało moją przygodę analityczną z tą zaawansowaną techniką spektroskopową. Od tego czasu w ramach współpracy z naukowcami, zarówno z rodzimego Wydziału, ale i również z innych krajowych i zagranicznych jednostek naukowych realizowałam wspólne projekty mające na celu potwierdzenie i wyjaśnienie struktury chemicznej zróżnicowanej grupy związków, używając techniki MS/MS. W ramach tych badań udało mi się określić między innymi strukturę:
 - ✓ biosurfaktantów z grupy ramnolipidów produkowanych przez wybrane szczepy bakterii rosnących na określonym podłożu. Ten projekt był realizowany wspólnie z prof. dr. hab. inż. Grażyną Płaza z Instytutu Ekologii Terenów Uprzemysłowionych w Katowicach w ramach projektu *Zastosowanie odpadów i ścieków z różnych gałęzi*

przemysłu spożywczego do produkcji biosurfaktantów. (Projekt badawczy własny Nr N N523 418237). W projekcie tym pełniłam rolę kierownika dwóch dedykowanych zadań badawczych;

- ✓ produktów polimeryzacji glicerolu w obecności homogenicznego katalizatora zasadowego –projekt realizowany we współpracy z prof. dr. hab. inż. Krystyną Czaja z Katedry Technologii Chemicznej i Chemii Polimerów mojego Wydziału;
- ✓ metabolitów *Cytisus villosus Pourr*, projekt realizowany we współpracy z dr Faridą Larit z Wydziału Chemii Uniwersytetu w Konstantin w Algierii (Département de Chimie, Faculté des Sciences Exactes, Université des Frères Mentouri, Constantine, Algeria);
- ✓ określenia struktury oksazolinowych kompleksów tytanu i wanadu stosowanych jako katalizatory do polimeryzacji etylenu – projekt prowadzony we współpracy z dr. hab. Wioletta Ochędzan-Siodłak z Katedry Technologii Chemicznej i Chemii Polimerów mojego Wydziału.

Efektem tej współpracy jest pięć publikacji w czasopismach znajdujących się w bazie JCR, których jestem współautorem.

d) **Zastosowanie chromatografii cieczowej do rozdziału mieszaniny analitów próbek o nieznanym składzie chemicznym.**

Chromatografia cieczowa w połączeniu z technikami spektroskopowymi (szczególnie w połączeniu ze spektrometrią mas) daje szerokie spektrum możliwości analizy wieloskładnikowych mieszanin bez ich uprzedniego frakcjonowania na pojedyncze składniki. Zdobyte w trakcie moje pracy doświadczenie właśnie z tą techniką zaowocowało moim udziałem w licznych projektach, w których tego rodzaju analiza okazała się być skutecznym narzędziem analitycznym. W ramach tych badań udało mi się między innymi:

- opracować efektywne metody HPLC do rozdziału związków fenolowych będących składnikami ekstraktów miodowych, oraz roślinnych *Salvia officinalis L*, *Salvia sclarea L.*, a także metody UHPLC-MS/MS do oznaczania składu ekstraktów kwiatowych z *Epipogium aphyllum Sw.* Ta tematyka wynikała między innymi ze współpracy z dr hab. Izabelą Jasicką-Misiak, oraz z grupą badawczą z Instytutu Olejków Eteryčných i Roślin Medycznych z Symferopola (Ukraina), a także z dr Anna Jakubską –Busse z Zakładu Botaniki Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Z tej współpracy ukazały się dotychczas łącznie 4 publikacje z bazy JCR, których jestem współautorem.

- Potwierdzić przebieg kinetyki reakcji izomeryzacji TFA-Gly-ZΔPhe do TFA-Gly-EΔPhe stosując technikę HPLC-UV-Vis – projekt realizowany we współpracy z dr Maciejem Makowskim z mojego wydziału oraz grupą badawczą z Politechniki Wrocławskiej (praca opublikowana w 2017 roku w Arkivoc)
- e) W ramach realizacji projektu dotyczącego wykrywania grzybowych substancji halucynogennych, oprócz dwóch prac, które uwzględnione są jako osiągnięcia w moim wniosku habilitacyjnym, opublikowane zostały jeszcze 4 inne prace z tego zakresu, których jestem współautorem. W tym przypadku dotyczy to między innymi prac z zakresu mykologii, których jestem współautorem, a w których dokonano charakterystyki nowych gatunków grzybów halucynogennych *Pholiotina cyanopus* oraz *Panaeolus antillarum* (zebranych na terenie Polski), a także atlas zatytułowany „*Grzyby neurotropowe*”, stanowiący swego rodzaju przewodnik, umożliwiający służbom kontrolującym wstępną identyfikację gatunków grzybów produkujących substancje halucynogenne. We wspomnianym atlasie oprócz szczegółowej analizy mikologicznej materiału grzybowego opisano również przeprowadzoną przeze mnie analizę składu chemicznego ekstraktów grzybowych analizowanych gatunków, używając do tego celu techniki takie jak CE-PDA i/lub UHPLC- MS/MS. Jednocześnie po zakończeniu tego projektu obroniona została praca doktorska z tej tematyki, w realizacji której pełniłam funkcję promotora pomocniczego.

6. Dalsze plany naukowo-badawcze:

W kolejnych etapach pracy naukowej chciałabym w dalszym ciągu realizować swoje zainteresowania związane z technikami wydzielenia i wzbogacania analitów z próbek o różnym pochodzeniu i składzie, a także opracowywaniu efektywnych sposobów ich oznaczania i detekcji. Szczególnie miejsce zajmuje w nich tematyka związana z polimerami z nadrukiem cząsteczkowym jako materiałów sorpcyjnych w ekstrakcji SPE, a szczególnie możliwością łączenia tej techniki w układzie z immobilizowanymi membranami ciekłymi o geometrii włókien kapilarnych (HF-SLM). W tym przypadku realizowany przeze mnie aktualnie projekt, we współpracy z grupą badawczą profesora Antonia Martin-Estebana z Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) z Madrytu (Hiszpania), potwierdza, że zastosowanie właśnie MIPów, ale jako składników fazy akceptorowej układu SLM determinuje wysoką selektywność otrzymanych układów ekstrakcyjnych, ale przede wszystkim wysoką efektywność oczyszczania matrycy. Aktualnie pierwsza praca z tego zakresu tematycznego otrzymała status „*Major revision*” w czasopiśmie *Journal of Chromatography A*.

Oprócz wspomnianych MIPów, tematyką dla mnie również istotną jest elektroforeza kapilarna i możliwością jej stosowania w rozdziale analitów, których oznaczanie za pomocą techniki HPLC jest utrudnione. Szczególnie dotyczy to związków nieposiadających w swojej strukturze ugrupowania chromoforowego i/lub fluoroforowego. Wówczas detekcja za pomocą stosowanych najczęściej detektorów UV-Vis i fluorescencyjnych wymusza konieczność wprowadzania etapu konwersji chemicznej, procesu długotrwałego i pracochłonnego. W tym przypadku, to właśnie elektroforeza kapilarna stanowi nie lada alternatywę, bo dzięki zastosowaniu tzw. detekcji pośredniej możliwe jest ominięcie etapu konwersji chemicznej i w rezultacie uproszczenie procedury analitycznej. Dlatego też w ramach moich badaniach próbuję opracować efektywny sposób na analizę związków fosforoorganicznych, a ściślej polifosfonianów, których analiza stanowi nie lada wyzwanie. Z tego zakresu została już obroniona praca doktorska, w której pełniłam rolę promotora pomocniczego i aktualnie są w opracowywaniu manuskrypty opisujące otrzymane wyniki.

Dodatkowym atutem elektroforezy kapilarnej jest fakt, że jest to technika, która oprócz oznaczania analitów, pozwala również na ich wzbogacanie, bezpośrednio w kapilarze (w układach *on-line*) lub przed kapilarą (np. zatężanie w kropli w układzie *in-line*), co skutkuje obniżeniem granicy wykrywalności i eliminuje etap przygotowania próbki do minimum. W tym miejscu szczególnie koncentruję się na zastosowaniu tego rodzaju technik do wydziałania, wzbogacania i oznaczania analitów z grupy alkaloidów halucynogennych i wspomnianych wcześniej polifosfonianów w próbkach biologicznych i środowiskowych. Ponadto, w moich planach jest rozwijanie zainteresowań w zakresie możliwości sprzęgania elektroforezy kapilarnej ze spektrometrią mas. Dostępność u nas w Katedrze wymaganej aparatury oraz zakup w zeszłym roku interfejsu zapoczątkował już rozpoczęcie przeze mnie badań oznaczania analitów fenolowych za pomocą właśnie techniki CE-MS.

7. Zestawienie dorobku naukowego i innych osiągnięć.

Stan na dzień 22.02.2019	Przed doktoratem	Po doktoracie	W tym do cyklu habilitacyjnego	Razem
Indeks H (Web of Science)	10			
Liczba publikacji z listy filadelfijskiej	4	27	9	31
Liczba publikacji spoza listy filadelfijskiej	3	2	1	5
IF sumaryczny	5,166	60,611	27,332	67,777
Liczba cytowań (We of Science)	62	217	78	279
Rola w publikacjach z cyklu habilitacyjnego				
✓ Pierwszy autor				3
✓ Autor korespondencyjny				5
✓ Drugi autor				5
✓ Inny				2
Liczba rozdziałów w książkach	1	3	1	4
Liczba wystąpień ustnych na konferencjach krajowych i zagranicznych:				
✓ jako autor referujący:				16
✓ jako współautor				27
Liczba prezentacji posterowych				78
Liczba realizowanych projektów w charakterze:				
✓ Kierownika				0
✓ Kierownik zadań				1
✓ Głównego wykonawcy (eksperta)				5