

Autoreferat

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

dr Izabela Jasicka-Misiak

Katedra Chemii Analitycznej i Ekologicznej

Wydział Chemii

Uniwersytet Opolski

1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

- 1995** Magister chemii, specjalność agrobiochemia, Uniwersytet Opolski.
Praca magisterska pt. *Wpływ różnego sposobu uprawy marchwi na występowanie szkodliwej i pożytecznej entomofauny*,
Promotor: dr hab. Kazimierz Wiech
- 2005** Doktor nauk chemicznych, Uniwersytet Opolski. Rozprawa doktorska
pt. *Allelochemia marchwi jadalnej *Daucus carota* L.*,
Promotor: prof. dr hab. inż. Paweł Kafarski

2. Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 1995 - 2005** Asystent, Instytut Chemii, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii,
Uniwersytet Opolski
- 2005 - 2008** Adiunkt, Instytut Chemii, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii,
Uniwersytet Opolski
- 2008 – obecnie** Adiunkt, Wydział Chemii, Uniwersytet Opolski

3. Osiągnięcia wynikające 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:

Autentykacja miodów nektarowych

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

- H1** I. Jasicka-Misiak*, P. Kafarski,
Chemiczne markery miodów odmianowych, **2011**,
Wiadomości Chemiczne, 65, 821-837.
Praca przeglądowa. Wkład własny w powstanie tej pracy polegał na napisaniu części manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

IF = 0; MNiSW = 7

- H2** I. Jasicka-Misiak*, A. Poliwoda, M. Dereń, P. Kafarski, **2012**,
Phenolic compounds and abscisic acid as potential markers for the floral origin of two Polish unifloral honeys, *Food Chemistry*, 31, 1149-1156; Elsevier.
Wkład własny w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń, współuczestnictwie w przeprowadzeniu analiz oraz napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

IF = 3,334; IF_{5 years} = 4,072; MNiSW = 40

- H3** Ł. Zieliński*, S. Deja, **I. Jasicka-Misiak**, P. Kafarski, **2014**,
Chemometrics as a tool of origin determination of Polish monofloral and multifloral honeys, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 2973-2981; ACS.
Wkład własny w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu części prac, współudziale w interpretacji widm NMR wykonanych przez Łukasza Zielińskiego w ramach pracy doktorskiej, którego byłam promotorem pomocniczym. Udział własny oceniam na 30%.

IF = 2,912; IF_{5 years} = 3,154; MNiSW = 45

- H4** **I. Jasicka-Misiak***, E. Makowicz, N. Stanek, **2017**,
Polish yellow sweet clover (*Melilotus officinalis* L.) honey, chromatographic fingerprints, and chemical markers, *Molecules*, 22 (1), 138; MDPI.
Wkład własny w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, współuczestnictwie w wykonaniu analiz chromatograficznych oraz interpretacji wyników badań, napisaniu manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

IF = 2,465; IF_{5 years} = 2,988; MNiSW = 30

- H5** **I. Jasicka-Misiak***, S. Gruyaert, A. Poliwoda, P. Kafarski, **2017**,
Chemical profiling of polyfloral Belgian honey: ellagic acid and pinocembrin as antioxidants and chemical markers, *Journal of Chemistry*, 2017, Article ID 5393158, <https://doi.org/10.1155/2017/5393158>; Hindawi.
Wkład własny w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń, wyborze metodyki, nadzorowaniu i współuczestnictwie w analizach chromatograficznych, wykonanych przez Stevena Gruyaert'a, w ramach pracy magisterskiej, której byłam promotorem. Ponadto konsultowałam interpretację wyników badań oraz napisałam manuskrypt. Mój udział procentowy szacuję na 70%.

IF = 1,3; MNiSW = 20

- H6** **I. Jasicka-Misiak***, E. Makowicz, N. Stanek, **2018**,
Chromatographic fingerprint, antioxidant activity and colour characteristic of Polish goldenrod (*Solidago virgaurea* L.) honey and flower. *European Food Research and Technology*, 244(7), 1169–1184; Springer.
Wkład własny w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń, nadzorowaniu i współuczestnictwie w analizach chromatograficznych wykonanych przez doktorantki Ewę Makowicz i Natalię Stanek, będących pod moją opieką naukową/techniczną oraz interpretacji wyników badań, napisaniu manuskryptu. Ponadto dokonałam korekty pracy po recenzjach. Mój udział procentowy oceniam na 60%.

IF = 1,664; IF_{5 years} = 1,854; MNiSW = 25

- H7** N. Stanek, **I. Jasicka-Misiak***, 2018,
HPTLC phenolic profiles as useful tools for the authentication of honey, *Food Analytical Methods*, doi: 10.1007/s12161-018-1281-3, Springer.
Wkład własny w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, konsultacji i współuczestnictwie w analizach chromatograficznych wykonanych przez doktorantkę Natalię Stanek, będącą pod moją opieką naukową/techniczną oraz interpretacji wyników badań, napisaniu części manuskryptu. Ponadto dokonałam korekty pracy po recenzjach. Mój udział procentowy oceniam na 70%.
IF = 2,038; IF_{5 years} = 1,982; MNiSW = 30
- H8** E. Makowicz, **I. Jasicka-Misiak***, D. Teper, P. Kafarski, 2018,
HPTLC fingerprinting as an efficient method for the differentiation of honeys of different botanical origin based on the composition of the volatile fractions, *Molecules*, 23, 1811; DOI 10.3390/molecules23071811, MDPI.
Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu pracy, współudziale w interpretacji analiz chromatograficznych wykonanych przez Ewę Makowicz w ramach pracy doktorskiej, której byłam promotorem pomocniczym, napisaniu manuskryptu oraz dokonaniu korekty pracy po recenzjach. Udział własny oceniam na 50%.
IF = 3,098; IF_{5 years} = 3,268; MNiSW = 30
- H9** E. Makowicz, P. Kafarski, **I. Jasicka-Misiak***, 2018,
Chromatographic fingerprint of volatile fraction of rare *Hedera helix* honey and biomarkers identification, *European Food Research and Technology*, DOI 10.1007/s00217-018-3127-z, Springer.
Wkład własny w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu doświadczeń, nadzorowaniu i współuczestnictwie w analizach chromatograficznych wykonanych przez doktorantkę Ewę Makowicz będącą pod moją opieką naukową/techniczną oraz na interpretacji wyników badań i napisaniu części manuskryptu. Mój udział procentowy oceniam na 55%.
IF = 1,919; IF_{5 years} = 1,854; MNiSW = 25

* - autor korespondencyjny

Sumaryczny współczynnik oddziaływania *Impact Factor (IF)* prac składających się na osiągnięcie, obliczony na podstawie bazy danych Journal Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania wynosi: **18,73** przy liczbie 58 cytowań

Suma punktów uzyskanych za cykl publikacji (dane z roku wydania) – **252 pkt MNiSW**

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

WPROWADZENIE

Miód jest naturalnym, słodkim produktem wytwarzanym przez pszczołę miodną (*Apis mellifera* L.) z nektaru kwiatowego bądź spadzi występującej na różnych gatunkach roślin. Pszczoły pobierają pożytek języczkiem i dodają do niego wydzieliny swoich gruczołów ślinowych. Po powrocie do ula przekazują go młodszym pszczołom, które wciągają kropelkę nektaru do wola miodowego i wyrzucają pobraną ciecz na języczek. Czynność tę powtarzają kilka razy. Wymieszany ze śliną nektar umieszczają w jednej z dolnych komórek plastra, gdzie następuje częściowe odparowanie wody. Po pewnym czasie miód, częściowo już zagęszczony, zostaje przeniesiony do górnej części plastra. Po wypełnieniu komórek plastra rozpoczyna się proces dojrzewania, podczas którego następuje dalsza utrata wody. Do odparowywania wody pszczoły używają prądu powietrza wytwarzanego za pomocą skrzydeł. Odparowanie wody zapobiega fermentacji tego słodkiego produktu. Komórki zawierające całkowicie dojrzały miód są zasklepiane przez pszczoły wieczkiem woskowym [1, 2]. Powstały miód jest produktem o zróżnicowanym składzie chemicznym, który kształtuje się pod wpływem wielu czynników. Zależy między innymi od pochodzenia botanicznego i geograficznego, warunków abiotycznych, jak również od technik pozyskiwania (wirowania, filtracji), sposobu pakowania i warunków przechowywania.

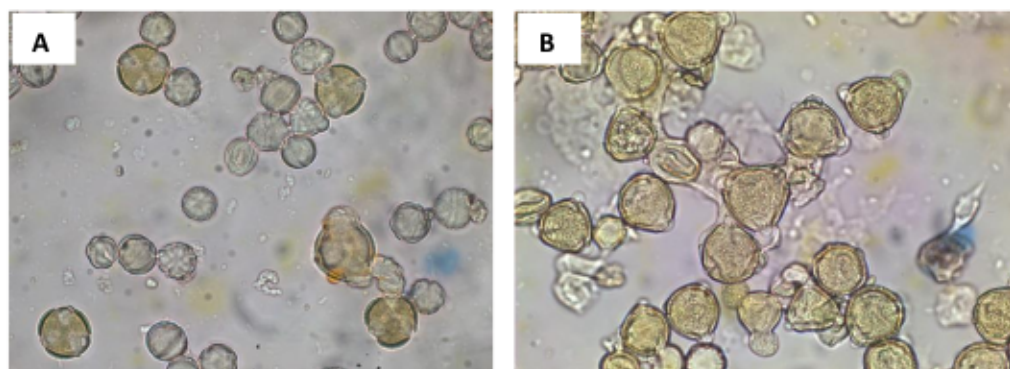
Obecnie produkty pochodzenia naturalnego cieszą się dużą popularnością jako źródło związków biologicznie czynnych. Od wieków surowce naturalne znane są bowiem ze swych właściwości prozdrowotnych, np. przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych, przeciwzapalnych czy przeciwnowotworowych. Dziś, gdy ich działanie, w wielu przypadkach poparte jest badaniami naukowymi, na nowo budzą zainteresowanie.

Od tysiącleci naturalny miód pszczeli ceniony jest na całym świecie jako składnik diety, kosmetyków naturalnych oraz produkt o znaczeniu terapeutycznym [3-5]. Powszechnie, stosowany jest w medycynie ludowej i niekonwencjonalnej, ale na rynku dostępne są także, i wykorzystywane w leczeniu szpitalnym, nowe preparaty i opatrunki przeciwbakteryjne zawierające np. nowozelandzki miód manuka.

Rozwój apiterapii i coraz większa świadomość konsumentów sprawia, że także w Polsce, w codziennej diecie wzrasta znaczenie miodów, głównie miodów odmianowych (nektarowych, jednokwiatowych). Polscy pszczelarze słyną z produkcji miodów wysokiej jakości, zatem zainteresowanie rodzimymi miodami odmianowymi wzrasta nie tylko w naszym kraju, ale także w krajach Unii Europejskiej. W Polsce, średnia roczna produkcja miodu w latach 2009 – 2016 wynosiła około 19 tys. ton, a w rekordowym 2017 roku wyniosła 24,3 tys. ton (według danych Instytutu Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej oraz Instytutu Ogrodnictwa i Zakładu Pszczelnictwa w Puławach). Mimo tak dużej produkcji na krajowym rynku wciąż odnotowuje się udział tanich miodów, charakteryzujących się gorszą jakością. Firmy handlowe sprowadzają do Polski miód z Chin, Ameryki Łacińskiej i Europy

Wschodniej, w konkurencyjnych cenach często, nie spełniający wymagań co do określonego składu i właściwości. Firmy te, sprzedając importowany miód o obniżonych parametrach jakościowych, po niższych cenach (i często jako miód krajowy), wprowadzają w błąd konsumentów oraz konkurują w nieuczciwy sposób. Nie ulega zatem wątpliwości, że miód pszczeli podobnie jak inne produkty spożywcze, powinien spełniać ściśle określone wymagania dotyczące właściwości organoleptycznych i fizykochemicznych. W tym zakresie, przed akcesją do UE, w Polsce obowiązywała Polska Norma PN-88/A-77626 Miód pszczeli [6]. Po tym wydarzeniu, wymagania zostały sprecyzowane w standardzie krajowym oraz w normach międzynarodowych. Najważniejsze z nich to Norma Światowa, opracowana i zatwierdzona w 2001 r. przez Komisję Kodeksu Żywnościowego (Codex Alimentarius: Draft revised standard for honey 2001) [7], oraz Dyrektywa 2001/110 UE z późniejszymi zmianami [8-10]. Kraje członkowskie UE, zobowiązane są akceptować tę dyrektywę i wprowadzać w życie zasady, przepisy i postanowienia administracyjne niezbędne do jej stosowania. Dokumenty te poddawane są okresowej aktualizacji, która uwzględnia najnowsze metody badań, a co za tym idzie, wprowadzane są nowe wymagania jakościowe. W dalszym ciągu istnieją jednak różnice między prawodawstwem europejskim a zmienionymi standardami *Codex Alimentarius* odnoszące się głównie do deklaracji pochodzenia geograficznego produktu, oceny jakości miodu wyrażanej wskaźnikiem aktywności diastazowej oraz definicji miodu przemysłowego (tzw. miodu piekarniczego).

Według polskiej normy rozróżnia się trzy typy miodu: miód nektarowy, wytwarzany z nektaru roślin, wydzielanego z nektarników kwiatowych lub pozakwiatowych; miód spadziowy, wytworzony ze spadzi zebranej z pędów roślin, oraz miód nektarowo-spadziowy, wytworzony przez pszczoły częściowo z nektaru, a częściowo ze spadzi. Polska norma wyróżnia ponadto następujące odmiany miodu: nektarowy rzepakowy, nektarowy akacjowy, nektarowy lipowy, nektarowy gryczany, nektarowy wrzosowy, nektarowy wielokwiatowy, nektarowo-spadziowy, spadziowy ze spadzi liściastej i spadziowy ze spadzi iglastej. Każdy miód zawiera swoiste świadectwo swego botanicznego i geograficznego pochodzenia w postaci zawieszonych w nim setek tysięcy ziaren pyłku roślin, z nektaru których powstał. Za miód odmianowy uznaje się tylko taki, w którym procent pyłku przewodniego jest równy lub przekracza minimalny procentowy udział pyłku dla danego miodu odmianowego określony w Polskiej Normie. Klasyfikacji miodu jako odmianowego dokonuje się poprzez analizę melisopalinologiczną (tzw. analiza pyłkowa). Analiza pyłkowa jest klasycznym badaniem pozwalającym na określenie botanicznego pochodzenia miodu, czyli gatunków roślin, z nektaru których powstał miód. Metoda ta polega na mikroskopowej ocenie jakościowej i ilościowej, zawieszonych w próbce miodu ziaren pyłku roślin (Fot. 1.).



Fot. 1. Obraz pyłkowy miodu faceliowego (A), bluszczowego (B); (autor: D. Teper).

Minimalne procentowe zawartości pyłku przewodniego dla pięciu odmian najbardziej popularnych polskich miodów zostały określone w Polskiej Normie „Miód pszczelej” (PN–88/A–77626) (Tabela 1.). W Tabeli 1. ujęto również dane dotyczące innych, wybranych państw europejskich. Biorąc pod uwagę fakt, że w Europie opisano dotąd około 100 miodów odmianowych (nektarowych), dane legislacyjne nie kształtują się optymistycznie [11].

Tabela 1. Wytyczne dotyczące zawartości pyłku przewodniego w miodach krajowych (PN–88/A–77626) oraz w miodach wybranych państw europejskich [11].

Typ pyłku	Kraj					
	Polska	Chorwacja	Grecja	Niemcy	Włochy	Serbia
<i>Fagopyrum esculentum</i> (gryka)	45	-	-	-	-	-
<i>Citrus spp.</i> (cytrus)	-	10	3	20	10	-
<i>Brassica napus</i> (rzepak)	45	60	-	80	-	-
<i>Calluna vulgaris</i> (wrzos)	45	20	-	-	-	20
<i>Erica spp.</i> (wrzosiec)	-	-	45	45	-	-
<i>Castanea sativa</i> (kasztan)	-	85	87	90	-	85
<i>Robinia pseudoacacia</i> (robinia akacjowa)	30	20	-	-	-	20
<i>Lavandula spp.</i> (lawenda)	-	10	-	-	-	-
<i>Tilia spp.</i> (lipa)	20	25	-	20	-	25
<i>Phacelia tanacetifolia</i> (facelia)	-	60	-	-	-	-

W celu identyfikacji pochodzenia botanicznego i/lub geograficznego miodów stosuje się również metody fizyczne, chemiczne oraz biologiczne polegające między innymi na pomiarze wilgotności, zawartości popiołu, przewodności elektrycznej, kwasowości i aktywności

enzymatycznej [12, 13]. Na przykład, przewodność właściwa miodów nektarowych oraz nektarowo-spadziowych mieści się w granicach 0,45–0,8 mS/cm. Miody spadziowe charakteryzuje znacznie wyższa wartość przewodności, która wynosi powyżej 0,8 mS/cm, a dla spadzi iglastej powyżej 1,2 mS/cm. W przypadku miodów pochodzących z drzewa truskawkowego (*Arbutus unedo* L.), wrzośca (*Erica* spp.), lipy (*Tilia* spp.), wrzosu pospolitego (*Calluna vulgaris* L. Hull) czy drzewa herbacianego (*Melaleuca* spp.) nie określa się przewodności właściwej [12, 14].

Wymienione metody posiadają wiele ograniczeń zależnych zarówno od sposobu pozyskiwania miodu przez pszczelarzy, jak i procedur przygotowania próbek do poszczególnych analiz i są niestety niewystarczające, aby jednoznacznie określić jakość oraz botaniczne i geograficzne pochodzenie miodu. Nie ulega jednak wątpliwości, że miód, a także pozostałe produkty pszczele, powinny być precyzyjnie charakteryzowane pod kątem właściwości fizycznych i chemicznych. Zatem procedury autentykacji miodu posiadają kluczowe znaczenie dla określenia jego cennych właściwości odżywczych i terapeutycznych. Dlatego też, prowadzone przeze mnie badania wpisują się w nurt tworzenia precyzyjnego systemu ustalania pochodzenia i oceny jakości miodu, określanych przez jakość i ilość substancji charakterystycznych (markerowych) dla danego gatunku miodu.

WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE I SKŁAD CHEMICZNY MIODU

Dojrzały miód jest gęstą, higroskopijną cieczą o ciężarze właściwym w granicach od 1,38 do 1,45 g/cm³. Miody posiadają konsystencję płynną (patok), lepka, częściowo lub całkowicie skryształizowaną (krupiec) [14]. Poszczególne odmiany miodów różnią się barwą, zapachem, smakiem oraz konsystencją. Miody nektarowe mają zazwyczaj barwę od białej (lipowy, rzepakowy) do ciemnobursztynowej (wrzosowy, gryczany) i są bardzo aromatyczne, a ich zapach jest zbliżony do aromatu nektaru. Miody spadziowe natomiast są ciemne i mogą posiadać odcień zielonkawy lub szary. Charakteryzuje je intensywny zapach przypominający zapach żywicy lub igliwia. O intensywności kolorów miodu decydują w dużej mierze barwniki roślinne znajdujące się w nektarze. Należą do nich głównie karotenoidy i flawonoidy, które są również odpowiedzialne za właściwości przeciwutleniające miodu [15, 16].

Zgodnie z obowiązującymi dyrektywami unijnymi [7-10] zawartość wody w dojrzałym miodzie nie powinna przekraczać 20%. Wyjątkiem jest miód wrzosowy, dla którego dopuszczalna zawartość wody wynosi 23%. Większość miodów zawiera 17–18% wody. Zależy to od wielu czynników, takich jak stopień dojrzałości miodu, sezon i pora zbioru, a także warunki klimatyczne [17]. Grupę związków chemicznych o największym udziale procentowym w miodzie stanowią cukry (średnio 77%). Zawartość węglowodanów w rodzimych miodach nektarowych i spadziowych waha się od 68 do 78%, przy czym przeważają cukry proste. Średnia zawartość glukozy wynosi 30%, a fruktozy 38%. We frakcji dwucukrów dominuje sacharoza. Sacharoza występuje w miodach odmianowych w granicach od 0,8% (miód wrzosowy i gryczany) do 7,7% (miód akacjowy). Innym cukrem jest melitoza, której zawartość kształtuje się na poziomie 5,4%. W miodach spadziowych znajduje

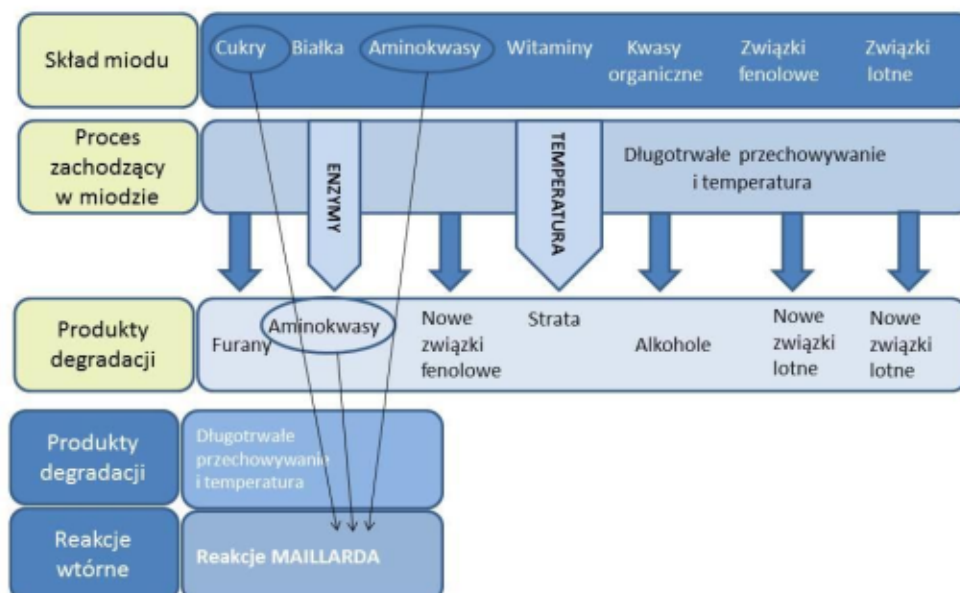
się też trisacharyd melecytoza, której zawartość może być znaczna, bo aż do 28%. W różnych typach i odmianach miodu stwierdzono niewielkie ilości 22 innych cukrów: między innymi melibiozy, trehalozy, izomaltozy, i gencjobiozy [18, 19]. Charakterystycznym związkiem zawartym w miodzie powstającym na skutek kwasowego rozkładu cukrów prostych (głównie fruktozy) jest 5-hydroksymetylofurfural. Zawartość tego związku rośnie wraz z wiekiem miodu, a także w trakcie jego podgrzewania. Bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na wartość i smak oraz w znacznej mierze decydującym o dojrzałości miodu jest zawartość kwasów karboksylowych. W największej ilości występują kwasy: glukonowy, jabłkowy, cytrynowy, mlekowy, bursztynowy, winowy, szczawiowy, masłowy, propionowy, mrówkowy i octowy. Ponadto w miodzie spotyka się ponad 15 innych kwasów, w tym kwasy benzoesowy i pirogronowy [19-21]. Obecność tych substancji sprawia, że odczyn miodu jest kwaśny, i to niezależnie od geograficznego pochodzenia tego produktu. Na przykład, wartość pH miodów polskich i hiszpańskich wynosi od 3,6 do 5,0; indyjskich od 3,7 do 4,4, a miodów z Algierii od 3,4 do 4,5 [22]. Najwyższą kwasowością cechują się miody gryczane, najniższą miody nawłociowe, akacje i rzepakowe.

Organiczne połączenia azotu występują w miodzie w niewielkich ilościach - około 0,6%, przy czym są to głównie białka, których zawartość nie przekracza 0,5%. Wśród białek dominują albuminy i globuliny. Wiele spośród białek obecnych w miodach to białka enzymatyczne. Pochodzą one głównie z wydzieliny gruczołów ślinowych pszczoł, ale niewielkie ich ilości mogą pochodzić z ziaren pyłku kwiatowego oraz ze spadzi. W miodzie stwierdzono obecność enzymów takich jak: α - i β -amylazy, katalazy, inwertazy, maltazy, melacytazy, glukooksydazy, fosfatazy oraz lizozym [12]. α -Amylaza (diastaza) jest enzymem, który odpowiada za proces hydrolitycznego rozpadu cukrów złożonych. W celu wykrycia przegrzania, fałszowania miodów lub innych niedozwolonych zabiegów, ustalono skalę Schade, która określa aktywność diastazy [21]. Miód zawiera również niewielkie ilości wolnych aminokwasów (do 0,03%), a w różnych jego odmianach zidentyfikowano od 11 do 21 (miód wrzosowy) różnych aminokwasów [23]. Związki mineralne występują w miodach w niewielkich ilościach i zależą od jego rodzaju. W miodach nektarowych substancje te stanowią 0,05–0,5%, natomiast w miodach spadziowych około 1%. Miód zawiera zaskakująco niewielką ilość witamin, a ich zawartość jest zmienna i zależy głównie od obecności pyłku kwiatowego i mleczka pszczelego. Są to głównie witaminy z grupy B: tiamina (B1), ryboflawina (B2), kwas nikotynowy (B3), kwas pantotenowy (B5), pirydoksyna (B6), biotyna (B8 lub H) i kwas foliowy (B9) oraz witamina C. Stabilność tych witamin obecnych w miodzie jest zachowana ze względu na niskie pH miodu [15].

W różnych typach i odmianach miodu zidentyfikowano ponad 600 składników należących do kilkunastu grup chemicznych, przy czym większość z nich występuje w nieznacznych ilościach [15]. Jedną z bardziej interesujących grup związków chemicznych w miodach, odpowiadającą między innymi za bukiet smakowy i aromatyczny, są związki tworzące frakcję lotną. Związki te mogą pochodzić bezpośrednio z nektaru rośliny miododajnej lub są produktami przekształceń enzymatycznych prowadzonych przez pszczoły w ich organizmach. Dotychczas oznaczono ponad 50 substancji tworzących aromat miodu, wśród których

najważniejszymi są mono- i seskwiterpeny, wyższe alkohole alifatyczne, aldehydy, ketony, estry i związki polifenolowe. Skład chemiczny miodu ulega zmianom w trakcie procesu dojrzewania. Na zmiany składu substancji lotnych w miodzie wpływa wiele czynników. Są to przede wszystkim sposób obróbki (wirowanie, dekrystalizacja czyli upłynnianie w wysokiej temperaturze) oraz warunki przechowywania (Rys. 1.) [15, 24, 25].

Kolejną grupę związków, odpowiedzialnych między innymi za barwę, ale przede wszystkim za właściwości antyoksydacyjne miodu stanowią związki fenolowe. Ta liczna i niejednorodna chemicznie grupa, to około 10 000 związków syntezowanych w tkankach roślin. Dzieli się je dwie klasy: kwasy fenolowe i flawonoidy (flawony, flawonole, flawanony, flawanole, antocyjanidyny, izoflawony i chalkony) [26]. Kwasy fenolowe, głównie pochodne kwasu hydroksybenzoesowego i hydroksycynamonowego, występują niemalże we wszystkich organach roślin, w nasionach, korzeniach, liściach, korze i w kwiatach. Związki te zabezpieczają rośliny przed działaniem mikroorganizmów i owadów, a w połączeniach z polisacharydami usztywniają ściany komórkowe [27]. Pszczoły miodne, zbierając nektar, mogą przenieść te bioaktywne związki z nektaru roślin do miodu [28]. Fenolokwasy i flawonoidy występują w miodach w ilościach od 0,1 do kilkudziesięciu mg/100 g. Zawartość związków fenolowych jest różna dla miodów poszczególnych odmian. Wyniki badań dotyczące składu frakcji fenolowej miodów pokazują, że najczęściej w miodach występują kwasy fenolowe, takie jak kwas wanilinowy, kwas kawowy, 3-kwas hydroksybenzoesowy, kwas chlorogenowy, kwas 4-hydroksybenzoesowy, kwas rozmarynowy, kwas galusowy, kwas syringinowy, *p*-kwas kumarowy, kwas ferulowy, kwas elagowy oraz flawonoidy: kwercetyna, kemferol, mirycetyna, pinobanksyna, pinocembryna, chryzyna, galangina i hesperetyna. Flawonoidy znacząco przyczyniają się do aktywności antyoksydacyjnej miodu i przynoszą korzyści dla zdrowia ludzkiego [29, 30]. Aktywność antyoksydacyjna flawonoidów w większości przypadków zależy od liczby i pozycji grup hydroksylowych i innych podstawników oraz glikozylacji cząsteczek. Obecność grup hydroksylowych w określonych pozycjach pierścienia flawonoidów wzmacnia aktywność przeciwutleniającą, z kolei glikozylacja flawonoidów tę aktywność osłabia w porównaniu do odpowiednich aglikonów [31].



Rys. 1. Związki obecne w miodzie i procesy, które wpływają na stabilność miodu [15].

AUTENTYKACJA MIODU – CEL BADAŃ

W obecnej, globalnej produkcji żywności, autentykacja produktów spożywczych jest ważną sferą działań zapewniających lepszą jakość oferowanych produktów. Konsumenci dokonujący wyboru żywności kierują się informacjami o jej jakości. Ponieważ wybór żywności zależy od względów zdrowotnych, żywieniowych, a także od stylu życia i przekonań religijnych, oznakowanie żywności powinno być rzetelne i dokładne [15, 25, 32].

Miód naturalny jest produktem od dawna powszechnie fałszowanym na całym świecie. Najczęstszym sposobem jest dodawanie sacharozy; może to mieć miejsce już na etapie dokarmiania pszczoł cukrem. Jego nadmiar nie zostaje przez nie przerobiony i dlatego zawartość sacharozy powyżej 5% może być uważana za fałszerstwo [33]. Innym sposobem fałszowania tego artykułu jest dodatek wysoko słodkiego syropu glukozowo-fruktozowego wytwarzanego ze skrobi, inwertowanego cukru trzcinowego lub buraczanego [34]. Jako rodzaj fałszerstwa należy traktować także nadanie produktowi nazwy sugerującej, że jest on otrzymywany z określonej rośliny, gdy faktycznie będzie to np. miód stanowiący mieszaninę wielu różnych miodów [34].

W ostatnich latach intensywnie poszukuje się metod analitycznych, które mogą stanowić alternatywę bądź uzupełnienie mikroskopowej analizy pyłkowej w określaniu geograficznego i botanicznego pochodzenia miodu [12, 35, 36]. Badania prowadzone są w trzech kierunkach: (i) poszukiwanie związków charakterystycznych (markerów) dla konkretnej odmiany i pochodzenia geograficznego miodu, (ii) konstruowanie profili chemicznych w oparciu o konkretne klasy związków (najczęściej flawonoidów lub kwasów fenolowych), które stanowią

„odcisk palca” poszczególnych miodów odmianowych, czy też (iii) stosowanie technik metabolomicznych do różnicowania, autentykacji odmian i definiowania miejsca pochodzenia miodów [H1].

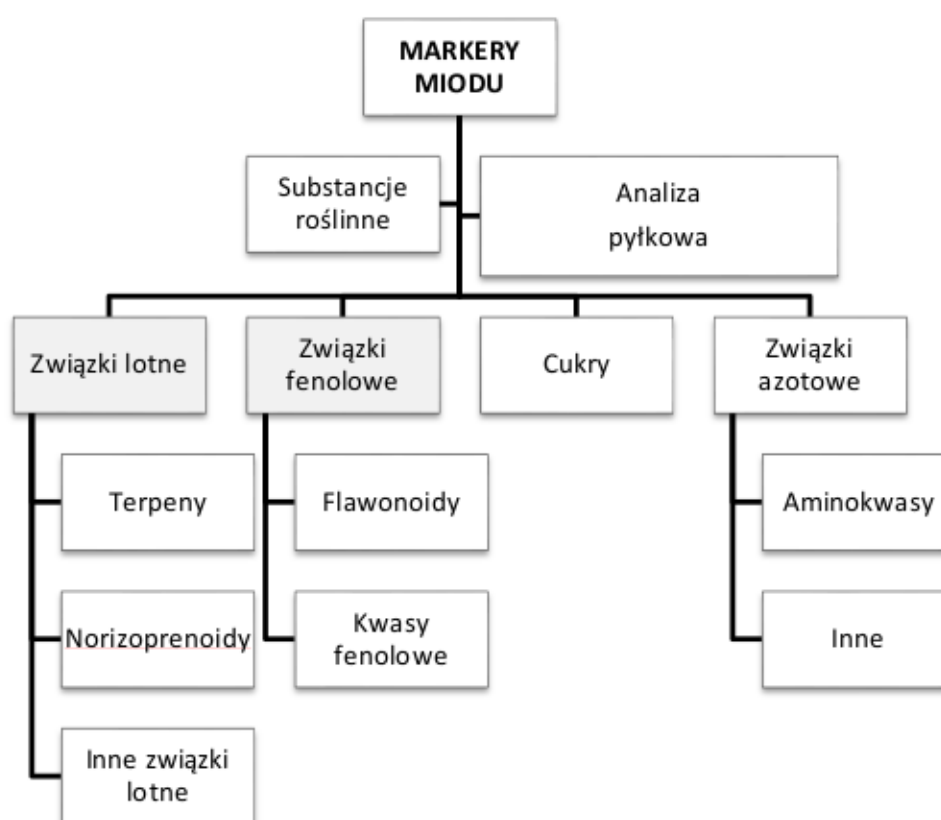
Celem prowadzonych przeze mnie badań była izolacja frakcji związków lotnych i fenolowych z miodów o różnym pochodzeniu botanicznym z zastosowaniem wybranych technik ekstrakcji, ocena jakościowa i ilościowa związków zawartych w tych frakcjach oraz konstruowanie profili chemicznych tworzących swoisty „odcisk palca” tych miodów. Do badań polegających na poszukiwaniu związków przydatnych jako chemiczne markery pochodzenia botanicznego wytypowano rzadziej występujące miody o potencjalnej aktywności biologicznej: z nawłoci pospolitej (*Solidago virgaurea* L.), nostryka żółtego (*Melilotus officinalis* L.), facelii (*Phacelia tanacetifolia* Benth.) i bluszczu (*Hedera helix* L.). Oznaczono również wybrane parametry fizykochemiczne, w tym kolor i aktywność antyoksydacyjną, zarówno dla wcześniej wspomnianych, jak i popularnych miodów z nektaru gryki (*Fagopyrum esculentum* Moench), lipy (*Tilia* spp.), akacji (*Robinia pseudoacacia* L.), rzepaku (*Brassica napus* L.) i wrzosu (*Calluna vulgaris* L.). Ponadto, badania miodu nawłociowego poszerzono o analizę składu chemicznego nektaru kwiatów nawłoci pospolitej, w celu stwierdzenia, które substancje obecne w pożytku przenoszone są do miodów. Identyfikacja markerów botanicznych (kwiatowych) uzupełniła dane potwierdzające botaniczne pochodzenie miodu.

Do badań jakościowych miodów zastosowano m.in. techniki: wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC), wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem diodowym (HPLC-DAD) i chromatografii gazowej z detektorem masowym (GC-MS) oraz magnetyczny rezonans jądrowy (NMR); techniki ^1H i ^{13}C NMR. Analizę frakcji fenolowych pozyskanych z badanych miodów metodą ekstrakcji do fazy stałej z użyciem adsorbentów typu Amberlite przeprowadzono z użyciem HPTLC i HPLC. Z kolei, w celu uzyskania pełniejszego profilu związków lotnych, próbki przygotowywano komplementarnymi metodami: destylacji z parą wodną, ekstrakcji w aparacie Soxhleta, ekstrakcji cieczowej wspomaganiej ultradźwiękami (USE), z użyciem rozpuszczalników organicznych o odmiennej polarności, oraz metodą ekstrakcji z przestrzeni nadpowierzchniowej do fazy stałej (HS-SPME) na włókno pokryte różnymi typami adsorbentów, a następnie analizowano metodą GC-MS. Dodatkowo oznaczono barwę wybranych miodów, całkowitą zawartość fenoli z użyciem zmodyfikowanej metody Folin-Ciocalteu, zawartość związków flawonoidowych (tworzenie barwnych kompleksów z AlCl_3) oraz aktywność antyoksydacyjną w testach DPPH (rodnik 1,1-difenyl-2-pikryl hydrazylowy), ABTS (sól diamonowa 2,2'-azobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu) i FRAP (test siły antyoksydacyjnej redukującej jon żelaza(III)).

Chemiczne markery miodów odmianowych i metody ich identyfikacji

Rozwój metod analizy instrumentalnej charakteryzujących się wysoką czułością i niskim limitem oznaczalności poszczególnych związków wpłynął na intensyfikację badań,

których celem jest autentykacja produktów spożywczych, w tym produktów pszczelich. Badania te skupiają się na próbach identyfikacji markerów – substancji charakterystycznych dla danego gatunku miodu oraz konstruowaniu chemicznych profili miodów odmianowych. Obecny stan wiedzy wskazuje, że fitomarkery, czyli związki przenoszone bezpośrednio z nektaru bądź wraz z pyłkiem przez pszczoły, mają bardzo duży potencjał w opracowywaniu nowych i lepszych metod autentykacji miodów i pozostałych produktów pszczelich. Markerami odmian miodów mogą być: substancje lotne, produkty rozkładu fenyloalaniny, aromatyczne kwasy karboksylowe i ich estry, produkty degradacji karotenoidów, aromatyczne aldehydy, aminokwasy, związki heterocykliczne oraz związki fenolowe, nietypowe cukry, minerały i pierwiastki śladowe. Często związki te występują w miodzie, w bardzo niewielkich stężeniach (Rys. 2.) [H1, 15, 37].



Rys. 2. Podział substancji stanowiących potencjalne markery miodu.

Najbardziej obiecującymi klasami związków w kontekście poszukiwań markerów wydają się być substancje wchodzące w skład frakcji lotnej komponentów miodu oraz związki fenolowe. Substancje należące do tych grup w największym stopniu odpowiadają za takie właściwości organoleptyczne miodów jak aromat i smak, a także za właściwości terapeutyczne, głównie aktywność przeciwutleniającą.

Jako metody identyfikacji charakterystycznych składników miodów odmianowych z grupy substancji lotnych stosuje się spektrometrię masową i techniki chromatograficzne (chromatografia bibułowa, HPTLC, GC) [38-41]. Wyniki analiz przeprowadzanych głównie

metodami GC-MS próbek wybranych odmian miodów wskazują, iż produkty te zawierają różnorodne mono- i seskwiterpeny oraz benzaldehyd, furfural czy aldehyd izowalerianowy, tworzące właściwy aromat miodu [15]. Analiza tych pochodnych dokonana z zastosowaniem w miarę prostych technik analitycznych może stanowić zatem „odcisk palca” determinujący pochodzenie i jakość miodu. Ponieważ matryca jaką stanowi miód charakteryzuje się bardzo złożonym składem, a badane związki występują w relatywnie niskich stężeniach, niezmiernie ważne jest odpowiednie przygotowanie próbek.

Klasyczną techniką wydzielenia określonych frakcji związków z miodów jest ekstrakcja, którą prowadzi się w układach: wodny roztwór miodu/rozpuszczalnik organiczny (najczęściej: dichlorometan, octan etylu, *n*-pentan, heksan), często wspomagana ultradźwiękami (USE)[42]. Najczęściej w analizie miodu stosuje się ekstrakcję do fazy stałej (SPE – *Solid Phase Extraction*) polegającą na przeniesieniu analitów znajdujących się w próbce ciekłej do fazy stałej [43, 44]. Rozdzielenie związków zachodzi w oparciu o współczynnik podziału związków organicznych między wodę i stały sorbent. Uwolnienie analitów zachodzi z użyciem rozpuszczalnika o odpowiednio dobranym charakterze. W przypadku próbek miodu jako sorbenty stosuje się najczęściej żywice polimerowe (kopolimer polistyren/diwinylbenzen), a elucję związków lotnych prowadzi dichlorometanem lub octanem etylu [44].

Tylko sporadycznie stosuje się ekstrakcję miodu w podwyższonej temperaturze (np. ekstrakcja w aparacie Soxhleta, destylacja z parą wodną). Pod wpływem procesów cieplnych zachodzi bowiem szereg następujących po sobie reakcji pomiędzy cukrami redukującymi a aminokwasami, peptydami lub białkami zawierającymi wolną grupę aminową, które prowadzą do utworzenia licznej grupy nowych związków chemicznych (produkty reakcji Maillarda) [45, 46].

Stosując opisane metody ekstrakcji, po raz pierwszy dokonano analizy składu związków lotnych z dziewięciu miodów z nostryka żółtego (zebranych w sezonie 2014-2016 na terenie województwa podkarpackiego) [H4]. Wyniki badań wykazały, że wszystkie testowane miody zawierają w swym składzie lumichrom, związek, który może być traktowany jako wskaźnik botanicznego pochodzenia tych miodów. Ponadto, stosując destylację z parą wodną oraz ekstrakcję w aparacie Soxhleta, w miodzie nostrykowym zidentyfikowano kumarynę, której poziom w próbce zależał od wieku miodu [H4]. Związek ten zidentyfikowano wcześniej jako składnik miodu z wiśni wonnej [47] oraz z lawendy [48]. Podkreślić należy, że ekstrakty z ziela nostryka również zawierają kumaryny (np. 7-hydroksykumarynę i 6,7-dihydroksykoumarynę) i są stosowane w leczeniu zapalenia żył, w zapobieganiu zakrzepicy i kruchości naczyń [49] oraz w leczeniu żylaków i hemoroidów [50]. Ponadto wyciągi nostrykowe mają działanie uspokajające i przeciwskurczowe [50].

Wykorzystując podobne procedury ekstrakcji, dokonano analizy składu związków lotnych w miodach z nawłoci pospolitej, z sezonu wegetacyjnego 2014-2016. Miody te pozyskiwane były z małych przydomowych pasiek na terenie województw opolskiego i dolnośląskiego. Na podstawie analiz chromatograficznych badanych próbek ustalono, że miód ten cechuje się obecnością licznych pochodnych produktów przejściowych szlaku

kwasu szikimowego, terpenów i norizoprenoidów. Związkami charakterystycznymi dla miodu nawłociowego okazały się: hotrienol, tlenek nerolu oraz cynamonian benzylu [H6].

Poszukując związków markerowych z grupy substancji lotnych, badaniom poddano miód z bluszczu pospolitego pochodzący z Irlandii. Do izolacji mieszaniny substancji zastosowano opisane wcześniej metody ekstrakcyjne USE i SPE oraz dodatkowo mikroekstrakcję do fazy stałej (SPME) [H9]. Mikroekstrakcja do fazy stałej stanowi szybką, bezrozpuszczalnikową i niedrogą technikę pozwalającą na analizę związków lotnych zawartych w miodach [51-53]. Technika ta polega na stabilizacji próbki miodu umieszczonej w fiolce – ustala się wtedy równowaga pomiędzy fazą stałą i gazową. Następnie związki lotne adsorbowane są na włóknie szklanym. Po termicznej desorpcji z włókna mieszaninę tych substancji analizuje się za pomocą GC-MS.

Zastosowanie włókien polidimetylosiloksan-polidiwinylbenzen (PDMS/DVB) oraz polidimetylosiloksan-carboxen-polidiwinylbenzen (PDMS/CAR/DVB) umożliwiło selektywną izolację związków lotnych z miodu bluszczowego. Porównanie uzyskanych wyników wykazało jednak, że tylko nieliczne związki zostały zidentyfikowane we wszystkich ekstraktach pozyskanych różnymi metodami. Analiza porównawcza pozwoliła wskazać związki markerowe, którymi dla miodu bluszczowego okazały się: 4(1H)-chinolinon, myrtenal i fenyloacetonitryl [H9].

Opisane przykłady wyraźnie pokazują, że zastosowanie jednej, określonej metody izolacji nigdy nie pozwala na wydzielenie wszystkich substancji zawartych w miodach. Co więcej, rodzaj i skład mieszaniny jest silnie zależny od użytej metody. Dlatego też w różnych pracach poświęconych poszukiwaniom markerów miodów odmianowych znajdowane są często różne substancje pełniące tę funkcję dla tej samej odmiany miodu. Za marker powinno się uznać substancję występującą we wszystkich miodach danej odmiany na określonym terenie. Powinny one występować w znaczącym stężeniu w porównaniu z innymi związkami otrzymanymi po przygotowaniu próbki do pomiarów.

W bardzo nielicznych przypadkach można powiedzieć, że rolę markera pełni jedna substancja występująca wyłącznie w konkretnej odmianie miodu.

Inną, liczną klasą związków obecnych w miodach, której kompozycja jakościowa może stanowić wyznacznik identyfikacyjny poszczególnych odmian miodu, są pochodne fenolowe. Do najczęściej stosowanych obecnie metod, zarówno ilościowej, jak i jakościowej analizy tej klasy związków w próbkach różnych odmian miodów należy wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), skojarzona z różnymi systemami detekcji. Wykorzystując tę metodę, podejmuje się próby korelacji zawartości nielotnych składników zawartych w miodach, z pochodzeniem botanicznym lub geograficznym tych produktów [15]. Badania te obejmują głównie określenie zawartości kwasów fenolowych oraz flawonoidów. Niektóre z fenolowych związków wchodzących w skład miodów, zostały zaproponowane jako markery pochodzenia miodów. Przykładem jest kwas homogentyzynowy, specyficzny dla miodu pozyskiwanego z chrósticy jagodnej (*Arbutus unedo* L.) [54], czy glikozydy kemferolu zidentyfikowane jako markery miodów akacjowych (*Robinia pseudoacacia* L.) [55]. Z kolei mirycetyna, tricetyna, luteolina, kwercetyna i kemferol są flawonoidami charakterystycznymi dla miodów

pozyskiwanych z eukaliptusa [56]. Jako markery autentyczności miodów mogą być wykorzystane również aromatyczne kwasy karboksylowe: kofeinowy, *p*-kumarowy i ferulowy, które są związkami charakterystycznymi dla miodów pozyskiwanych z kasztanowca [57]. Kwasy te zidentyfikowano również jako związki charakterystyczne dla miodów australijskich, wytwarzanych przez pszczoły z nektaru zbieranego z kwiatów eukaliptusa [58]. Przygotowania próbki, do analizy związków fenolowych, polegają głównie na usunięciu cukrów i innych związków polarnych, czyli rozdzieleniu analitów od matrycy, a następnie zateżeniu badanych związków. W tym celu najczęściej stosuje się technikę ekstrakcji do fazy stałej [30, 31]. Polega ona na tym, że próbkę miodu nanosi się na sorbent umieszczony w kolumnie do SPE, a następnie tak utworzoną matrycę przemywa wodą celem usunięcia cukrów i innych związków polarnych. Mieszaniny badanych związków adsorbują się na nośniku, skąd wymywane są innym rozpuszczalnikiem, na przykład roztworem wodnym metanolu [59, 60]. W badaniach tych jako adsorbenta najczęściej używa się żywicy typu Amberlite [34, 61]. Oczywiście skład otrzymanej mieszaniny związków jest silnie zależny zarówno od zastosowanego adsorbenta, jak i rozpuszczalników użytych w procesie elucji próbki i jej odzysku z fazy stałej [62].

Stosując zoptymalizowaną procedurę analityczną, wydzielono frakcje związków fenolowych z 14 polskich miodów wrzosowych (*Calluna vulgaris* L.) z Borów Dolnośląskich, jednego niemieckiego miodu wrzosowego i 9 gryczanych (*Fagopyrum esculentum* L.) pochodzących z południa Polski. Na podstawie uzyskanych wyników analiz chromatograficznych HPLC wskazano marker miodów wrzosowych, którym okazał się kwas abscysynowy [H2]. Wyjaśnić należy, że związek ten należy do klasy izoprenoidów, ale podobnie jak kwasy fenolowe, wykazuje silną absorbancję UV przy $\lambda=290$ nm.

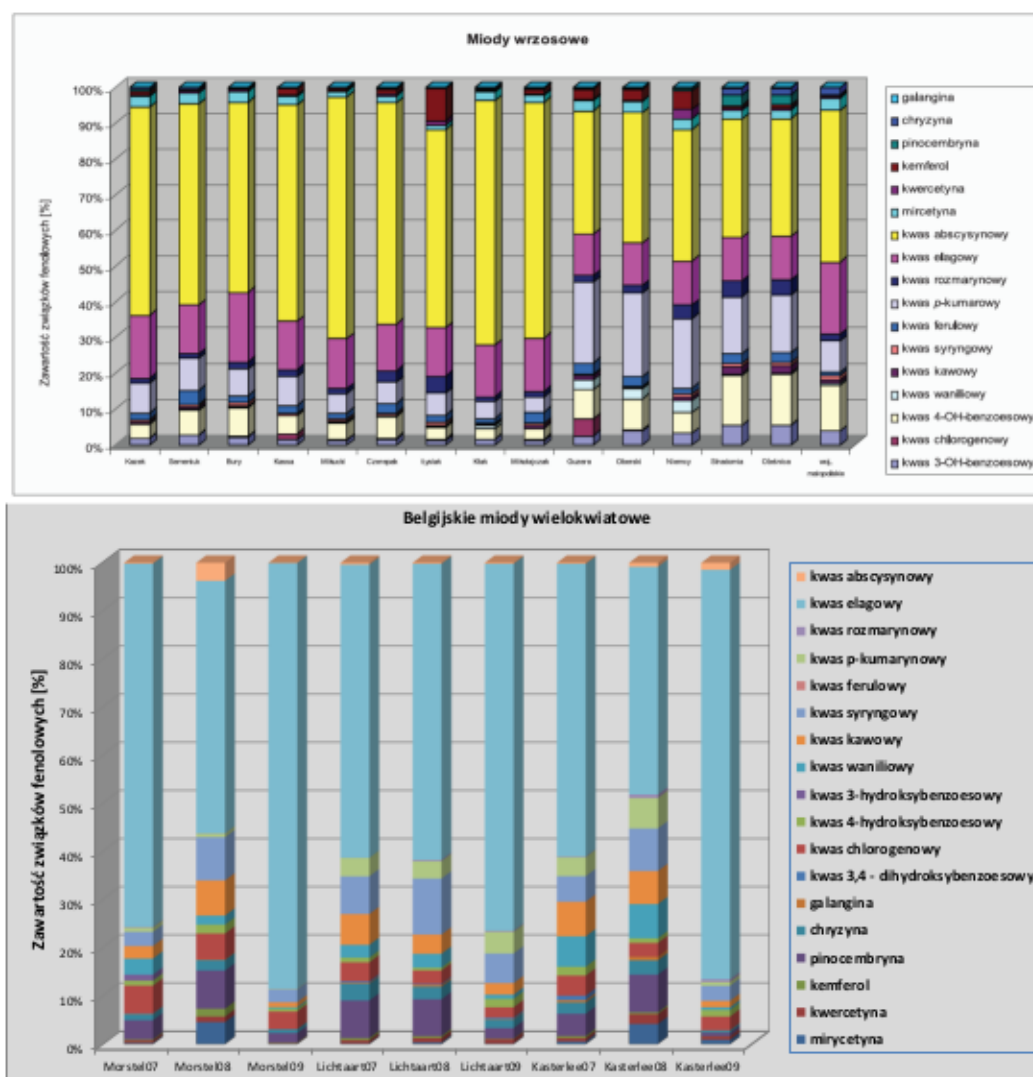
Z kolei w profilu fenolowym miodów z gryki dominowały kwasy: 3-hydroksybenzoesowy, ferulowy i rozmarynowy oraz mirycetyna należąca do flawonoli. Związki te wskazano jako niespecyficzne markery polskiego miodu gryczanego [H2].

Markerów z klasy fenoli poszukiwano również w miodach: nostrykowym i nawłociowym oraz w wielokwiatowych miodach z Belgii. Na podstawie wyników przeprowadzonych badań ustalono, że miód nostrykowy cechuje obecność (+)katechiny i kwasu galusowego [H4], natomiast miód nawłociowy można identyfikować na podstawie zawartości kwasu galusowego, 4-hydroksybenzoesowego i *p*-kumarowego [H6]. Interesujące wyniki otrzymano, analizując profil fenolowy miodów wielokwiatowych. Na podstawie analiz HPLC ustalono, że wszystkie miody wielokwiatowe pochodzące z trzech gospodarstw pasiecznych z okolic Antwerpii, z trzech kolejnych sezonów (2007-2009), zawierają znaczne ilości charakteryzującego się interesującymi właściwościami biologicznymi kwasu elagowego i pinocembryny. Wykazano, że związki te mogłyby stanowić o pochodzeniu geograficznym tych miodów [H5].

Profile związków chemicznych jako wskaźniki odmian miodów

Tworzenie profili chemicznych produktów żywnościowych jest stosunkowo nowym sposobem oceny ich jakości. Źródła informacji nie stanowi w tym przypadku obecność

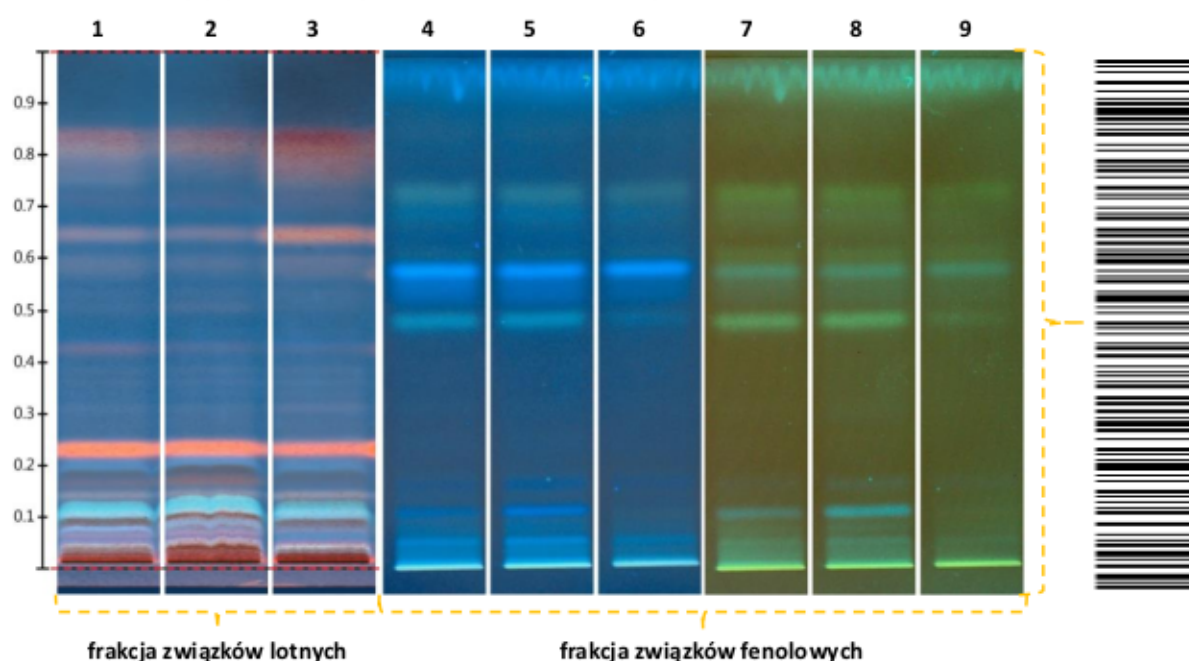
pojedynczych związków chemicznych, ale wzajemne relacje ilościowe składników frakcji wyodrębnionej z zastosowaniem określonej procedury. Klasyczne badania polegają na tym, że dokonuje się identyfikacji możliwie jak największej liczby substancji zawartej w badanej frakcji/mieszaninie, a następnie porównuje ich zawartości w określonych odmianach miodów. Konstrukcja profili polega na powiązaniu składu izolowanych frakcji związków chemicznych z botanicznym i geograficznym pochodzeniem miodu, za pomocą stosownych metod statystycznych. Przykładem mogą tu być profile chemiczne skonstruowane dla substancji fenolowych zidentyfikowanych z użyciem HPLC-DAD, zawartych w czterech polskich miodach: wrzosowym i gryczanym [H2], nostrzykowym [H4] oraz nawłociowym [H6]. Na przykładowych profilach (Rys. 3.) porównano relatywne stężenia zidentyfikowanych związków fenolowych. W badanych miodach wrzosowych z borów dolnośląskich widać, że oznaczając ich poziom, można łatwo odróżnić botaniczne pochodzenie miodów. Po raz pierwszy podjęto próby skonstruowania profili związków fenolowych dla wielokwiatowych miodów belgijskich z trzech gospodarstw pasiecznych rejonu Antwerpii. Okazało się, że zbudowane profile mogą stanowić o pochodzeniu geograficznym miodu [H5].



Rys. 3. Przykładowe profile związków fenolowych w badanych miodach.

Jedną z technik, która w ostatnim czasie znalazła zastosowanie w tworzeniu profili chemicznych substancji zidentyfikowanych zarówno we frakcjach fenolowych, jak i lotnych ekstraktów miodowych, jest technika HPTLC.

Uzyskane dane chromatograficzne miodów odmianowych: nawłociowego [H6], wierzbowego, wrzosowego, gryczanego, ze spadzi sosnowej i manuka [H7], malinowego, mniszkowego, nostrykowego, rzepakowego, koniczynowego, z ostropestu plamistego [H8] oraz miodu z nektaru bluszczu pospolitego [H9] wskazują, że analiza HPTLC jest bardzo precyzyjną, metodą wizualną, którą z powodzeniem można stosować do szybkiego i precyzyjnego różnicowania miodów. W oparciu o uzyskane wartości R_f i barwy prążków poszczególnych związków, dla każdej badanej próbki miodu generowane są obrazy przypominające kod kreskowy (paskowy) (Rys. 4). Jest to charakterystyczny, graficzny „odcisk palca” zawierający informacje o składzie chemicznym miodu.

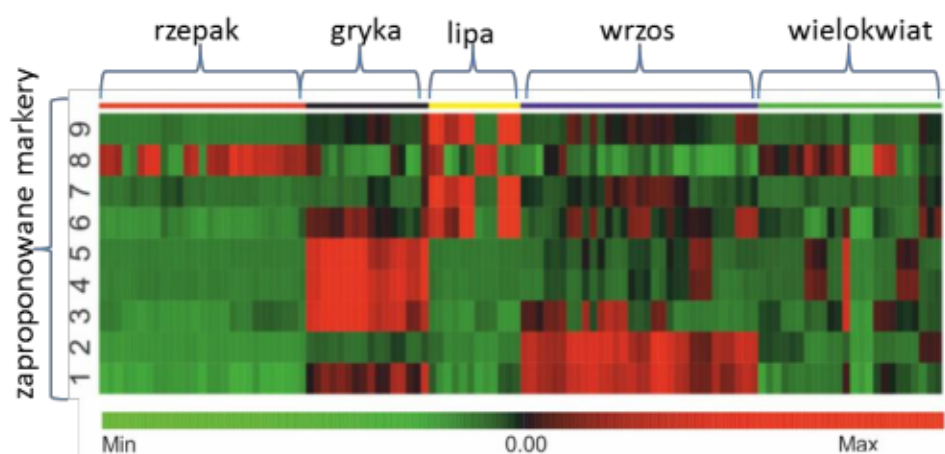


Rys. 4. Chromatogramy HPTLC frakcji fenolowej i lotnej miodu nawłociowego.

Techniką pozwalającą na bezpośrednie badanie miodu jest ^1H NMR. Jednakże ze względu na wysoką zawartość glukozy i fruktozy widma NMR są trudne do interpretacji. Jest to możliwe w zakresie widma, gdzie nie występują piki pochodzące od cukrów. Nie mniej jednak końcowa identyfikacja markera i tak wymaga bądź jego wydzielenia i zdefiniowania jego struktury chemicznej, bądź zastosowania indywidualnego związku jako wzorca wewnętrznego [63-66].

Wykonana w trakcie badań analiza ^1H NMR miodów: wrzosowych, gryczanych, lipowych (*Tilia L.*), rzepakowych (*Brassica napus L. var. napus*), akacjowych (*Acacia Mill.*) oraz wielokwiatowych pozwoliła na identyfikację charakterystycznych markerów (1-9) i skonstruowanie barwnej mapy (tzw. *heatmaps*) korelującej rodzaj metabolitu z jego stężeniem w konkretnej próbce miodu (Rys. 5). Mapy takie są podobne do systemu

znakowania towarów za pomocą kodu QR i mogłyby pełnić taką samą funkcję w definiowaniu pochodzenia miodu [H3].



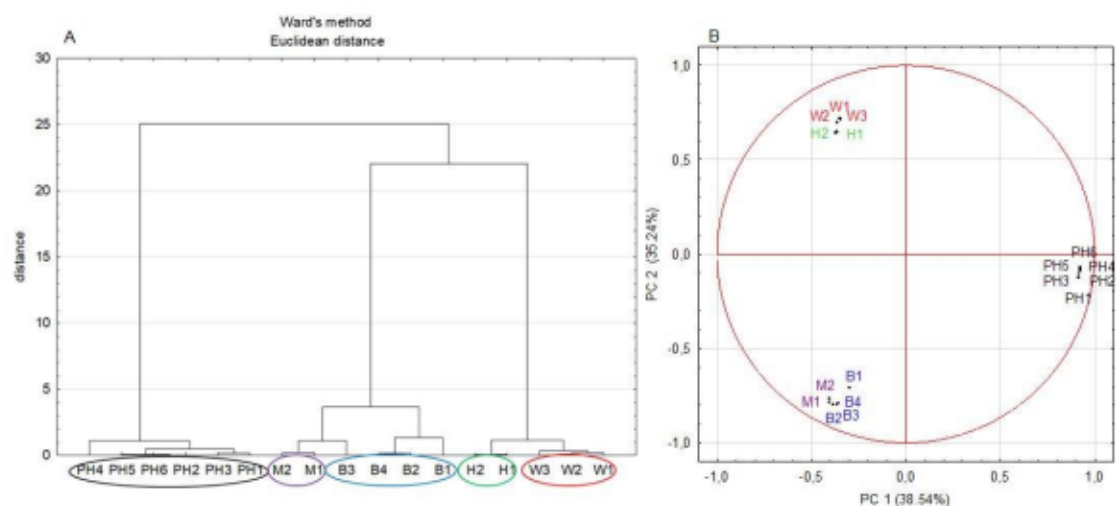
Rys.5. HeatMap-a powstała na podstawie wyników NMR.

Zastosowanie metod metabolomicznych

Konsekwencją analiz dotyczących specyficznych substancji stanowiących „odciski palca” konkretnych miodów są badania metabolomiczne. Technika ta polega na systematycznej identyfikacji i oznaczeniu poziomu wszystkich metabolitów oraz ksenobiotyków obecnych w analizowanej próbce za pomocą NMR, MS lub technik chromatograficznych (HPLC, HPTLC). Nadrzednym celem badań metabolomicznych jest identyfikacja specyficznych związków chemicznych, które powstają w badanym układzie jako jego odpowiedź na działanie określonego czynnika [67]. W przypadku miodów jest to dynamiczny zbiór związków chemicznych, które obrazują wpływ warunków życia pszczoł i roślin oraz stanu środowiska na jakość miodów. Badania metabolomiczne oparte o narzędzia chemometryczne i statystyczne do analizy gromadzonych danych i ekstrakcji użytecznych informacji pozwalają na zdefiniowanie botanicznego i geograficznego pochodzenia miodów [68-70].

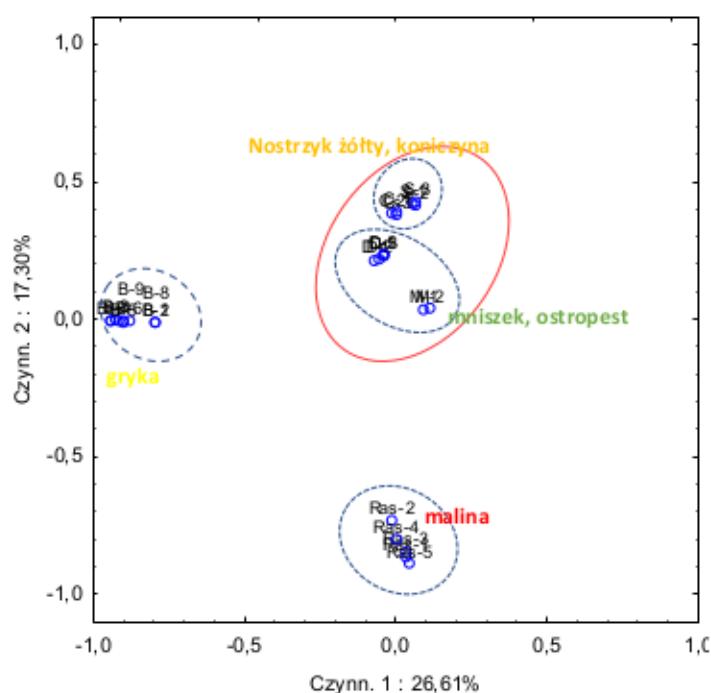
W celu sprawdzenia autentyczności pochodzenia botanicznego i geograficznego miodów, przeprowadza się wszechstronną i kompleksową ocenę chemometryczną przy użyciu kilku wysoce zaawansowanych technik (PCA, CA, LDA, KNN, SIMCA). Otrzymane wyniki analiz umożliwiają ocenę na wysokim poziomie istotności statystycznej, stopnia zróżnicowania pomiędzy próbkami wysokogatunkowych miodów odmianowych a miodami tańszymi i gorszej jakości [46, 71-73].

Użyteczności technik chemometrycznych dowiodły również wyniki analiz polskich miodów odmianowych oraz miodu manuka z Nowej Zelandii i Australii. W badaniach tych, do identyfikacji składników frakcji fenolowych, użyto metod chromatograficznych (HPTLC, HPLC). Otrzymane dane chromatograficzne poddano komputerowej analizie wielowariancyjnej (PCA, HCA), która okazała się pomocna w wykazaniu różnic pomiędzy próbkami reprezentującymi miody o różnym pochodzeniu botanicznym (Rys.6) [H7].



Rys. 6. Dendrogram hierarchiczny (a) i analiza głównych składowych (PCA) (b) badanych próbek miodu. W1-W3 miody wierzbowe, H1-H2 miody wrzosowe, B1-B4 miody gryczane, Ph1-Ph6 miody ze spadzi sosnowej, M1-M2 miody manuka.

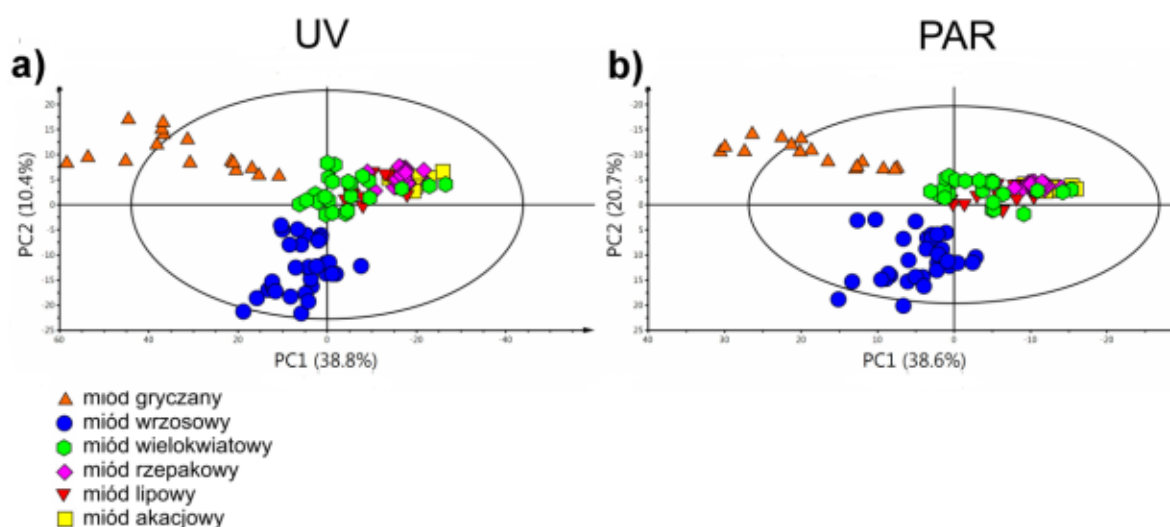
Dzięki zastosowaniu odpowiednich technik chemometrycznych, na podstawie zawartości składników frakcji lipofilowych możliwa była również klasyfikacja analizowanych siedmiu miodów nektarowych [H8]. Celem prowadzonych badań było wykazanie użyteczności techniki HPTLC do szybkiego różnicowania polskich miodów odmianowych (rzepakowych, gryczanych, koniczynowych, wierzbowych, z ostropestu plamistego, mniskowych, malinowych i z nostrzyka żółtego) w oparciu o zawartość związków o charakterze lipofilowym. Wyniki analizowane z użyciem technik chemometrycznych wyraźnie wskazują, że na podstawie uzyskanych wartości R_f badane miody zostały zgrupowane w oddzielne sekcje, zgodnie z ich botanicznym pochodzeniem (Rys. 7).



Rys. 7. Analiza głównych składowych (PCA).

Spośród nowoczesnych technik, także spektroskopia NMR okazuje się ważnym narzędziem do analizy mieszanin. Zastosowanie technik magnetycznego rezonansu jądowego w połączeniu z narzędziami chemometrycznymi, stworzyło możliwości bardziej precyzyjnego różnicowania i klasyfikacji próbek miodu [69,74-76]. Jednakże zastosowanie NMR w identyfikacji miodów wciąż traktuje się jako metody uzupełniające.

W celu autentykacji pięciu miodów nektarowych oraz miodów wielokwiatowych przeprowadzono wielowymiarową analizę danych chemometrycznych z wykorzystaniem analizy głównych składników (PCA) (Rys. 8) i ortogonalną analizę dyskryminacyjną metodą najmniejszych kwadratów (OPLS-DA). Analiza chemometryczna poparta analizą pyłkową ujawniła błędną klasyfikację miodów akacjowych przez producentów [H3].



Rys. 8. Analiza PCA widma ^1H NMR badanych miodów odmianowych, dla dwóch metod normalizacji danych.

PODSUMOWANIE

Wyniki badań, opisane w cyklu 9 publikacji, dostarczyły nowej wiedzy na temat fitochemii, wybranych parametrów fizykochemicznych oraz aktywności przeciwutleniającej popularnych oraz rzadziej występujących miodów pszczelich.

Po raz pierwszy opisano profile chromatograficzne związków fenolowych popularnych polskich miodów wrzosowych i gryczanych, wskazując związki mogące pełnić rolę specyficznych markerów tych odmian. Skonstruowano również profile chromatograficzne frakcji lotnych i fenolowych pozyskanych z mniej popularnych miodów z nawłoci pospolitej, z nostryka żółtego oraz scharakteryzowano frakcję lotną irlandzkiego miodu z bluszczu pospolitego, opisując specyficzne markery tych miodów.

Dodatkowo oznaczono całkowitą zawartość związków fenolowych (zmodyfikowaną metodą Folina-Ciocalteu) oraz aktywność przeciwutleniającą wszystkich badanych odmian miodu. Zawartość fenoli dla różnych odmian była zróżnicowana i wyniosła średnio od 121,6

do 1173,8 mg GAE/kg. Dowiedziono, że wartości te korelują z barwą i aktywnością antyoksydacyjną miodów (testy DPPH, FRAP, ABTS). Miody ciemne, najbogatsze w związki fenolowe wykazywały najsilniejszą aktywność antyoksydacyjną.

Wykazano użyteczność wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC) jako szybkiej i precyzyjnej techniki do tworzenia profili chemicznych, a tym samym jednoznacznego określania pochodzenia botanicznego miodu. Profile konstruowane dla próbek wielu miodów tej samej odmiany cechują uderzające podobieństwa w obrębie tej samej grupy i zdecydowane różnice w stosunku do profili innych odmian miodów.

Potwierdzono, iż stosowanie narzędzi chemometrycznych w celu eksploracji dużych zbiorów danych jest bardzo użyteczne, gdyż pozwala w prosty i szybki sposób na uwidocznienie podobieństw pomiędzy próbkami i mierzonymi parametrami.

Podane przykłady wskazują również, iż tworzenie profili chemicznych bazujących na markerach charakterystycznych dla miodów odmianowych, może stanowić ciekawą alternatywę dla dotychczasowych metod identyfikacji pochodzenia miodów, oraz definiowania ich jakości i wartości użytkowych.

LITERATURA

- [1] B. Kędzia, E. Holderna-Kędzia, *Leczenie produktami pszczelimi*, Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa **1994**.
- [2] J. Lutowski, *Postępy Fitoterapii*, **2001**, 4, 2-5.
- [3] S. Bodganov, T. Jurendic, R. Sieber, P. Gallmann, *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 276, 677–689.
- [4] T. Nagai, R. Inoue, N. Kanamori, N. Suzuki, T. Nagashima, *Food Chem.*, **2006**, 97, 256–262.
- [5] A. Ajibola, J.P. Chamunorwa, K.H. Erlwanger, K.H., *Nutr. Metab.*, **2012**, 9, 1-12.
- [6] Polska Norma PN-88/A-77626 Miód pszczeli.
- [7] Codex (2001). Codex Alimentarius standard for honey 12-1981. Revised Codex standard for honey. Standards and standard methods (Vol. 11). Retrieved December, **2014**, <http://www.codexalimentarius.net>
- [8] Dyrektywa Rady 2001/110/WE odnosząca się do miodu z 20 grudnia 2001. Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich 12.1.2002 L10/47-52.
- [9] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011 z dnia 25 października 2011 r. Dziennik Unii Europejskiej L 304/18-63.
- [10] Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2014/63/UE dnia z 15 maja 2014 r. zmieniająca dyrektywę Rady 2001/110/WE odnoszącą się do miodu. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej Unia Europejska, L164, 1-5.
- [11] A. Thrasyvoulou, C. Tananaki, G. Goras, E. Karazafiris, M. Dimou, V. Liolios, D. Kanelis, S. Gounari, *J. Apic. Res.*, **2018**, 57, 88-96.
- [12] E. Anklam, *Food Chem.*, **1998**, 63, 549-562.
- [13] S. Popek, *Food Chem.*, 2002, **79**, 401-406.
- [14] T. Szczęśna, *Pasieka*, **2003**, 1, 38-41.
- [15] P.M. da Silva, C. Gauche, L. Valdemiro, A.C.O. Costa, R. Fett, *Food Chem.*, **2016**, 196, 309-323.
- [16] S. Soares, J.S. Amaral, M.B.P.P. Oliveira, I.A. Mafra, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **2017**, 16, 1072–1100.
- [17] S. Ouchemoukh, P. Schweitzer, M. Bachir Bey, H. Djoudad-Kadji, H. Louaileche, *Food Chem.*,

- 2010**, 121, 561-568.
- [18] E. Fuente, M.L. Sanz, I. Martinez-Castro, J. Sanz, *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1135, 212-218.
- [19] M. Wojtacki, *Produkty pszczele i przetwory miodowe*, PWRiL, Warszawa **1970**.
- [20] S. Suarez-Luquea, I. Mato, J.F. Huidobro, J.S. Simal-Lozano, M.T. Sancho, *J. Chromatogr. A*, **2002**, 955, 207-214.
- [21] I. Mato, J.F. Huidobro, J.S. Simal-Lozano, M.T. Sancho, *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 1541-1550.
- [22] S. Saxena, S. Gautam, A. Dharma, *Food Chem.*, **2010**, 118, 391-397.
- [23] L. Castro-Vázquez, M.S. Pérez-Coello, M.D. Cabezudo, *Chromatographia*, **2003**, 57, 227-233.
- [24] S. Ouchemoukh, P. Schweitzer, M. Bachir Bey, H. Djoudad-Kadji, H. Louaileche, *Food Chem.*, **2010**, 121, 561-568.
- [25] A. J. Siddiqui, S.G. Musharraf, M. Iqbal Choudhary, Atta-ur- Rahman, *Food Chem.*, **2017**, 217, 687-698.
- [26] Ø. M. Andersen, K. R. Markham, **2006**, *Flavonoids chemistry, biochemistry and applications*. W: Separation and quantification of flavonoids. New York: Taylor & Francis.
- [27] C. A. Challacombe, E. M. Abdel-Aal, K. Seetharamana, L. M. Duizer, *J. Cereal Sci.*, **2012**, 56, 181-188.
- [28] S. Silici, O. Sagdic, L. Ekici, *Food Chem.*, **2010**, 121, 238-243.
- [29] S. Trautvetter, I. Koelling-Speer, K. Speer, *Apidologie*, **2009**, 40, 140-150.
- [30] J. M. Alvarez-Suarez, F. Giampieri, A. M. González-Paramás, E. Damiani, P. Astolfi, G. Martinez-Sanchez i współ., *Food Chem. Toxicol.*, **2012**, 50, 1508-1516.
- [31] M. B. Sghaier, I. Skandrani, N. Nasr, M. D. Franca, L. Chekir-Ghedira, K. Ghedira, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **2011**, 32, 336-348.
- [32] S. Soares, J.S. Amaral, M.B.P.P. Oliveira, I.A., Mafra, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **2017**, 16, 1072-1100.
- [33] I. Mato, J.F. Huidobro, J.S. Simal-Lozano, M.T. Sancho, *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 1541-1550.
- [34] I. Martos, M. Cossentini, F. Ferreres, F.A. Tomás-Barberá, *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 2824-2829.
- [35] A. Wang, Q. Guo, L. Wang, L. Lin, H. Shi, H. Cao, B. Cao, *Food Chem.*, **2015**, 172, 669-674.
- [36] J. Louveaux, A. Maurizio, G. Vorwohl, *Bee World*, **1978**, 59, 139-157.
- [37] M. Oroian, S. Ropciuc, *Comput. Electron. Agric.*, **2017**, 138, 148-156.
- [38] V. Kaskoniene, P.R. Venskutonis, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **2010**, 9, 620-634.
- [39] I. Jerkovic, P.M. Kuš, *RSC Adv.*, **2014**, 4, 31710-31728.
- [40] C. Locher, J. Neumann, T. J. Sostaric, *Planar. Chromatogr.*, **2017**, 30, 57-62.
- [41] M.S. Azevedo, S.K.T. Seraglio, G. Rocha, C.B. Balderas, M. Piovezan, L.V. Gonzaga i współ. *Food Control*, **2017**, 78, 383-392.
- [42] E. Alissandrakis, P.A. Tarantilis, C. Pappas, P.C. Harizanis, M. Polissiou, *Eur. Food Res. Technol.*, **2009**, 229, 365-373.
- [43] L. Castro, M. Consuelo Díaz-Maroto Hidalgo, E. Guchu, M. Soledad Pérez-Coello, *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, 224, 27-31.
- [44] C.E. Manyi-Loh, R.N. Ndip, A.M. Clarke, *Int. J. Mol. Sci.*, **2011**, 12, 9514-9532;
- [45] E. Alissandrakis, P.A. Tarantilis, P.C. Harizanis, M. Polissiou, *J. Sci. Food. Agric.*, **2005**, 85, 91-97.
- [46] L.F. Cuevas-Glory, J.A. Pino, L.S. Santiago, L.F. Sauri-Duch, *Food Chem.*, **2007**, 103, 1032-1043.
- [47] I. Jerkovic, Z. Marijanovic, M.M. Staver, *Molecules*, **2011**, 16, 2507-2518.
- [48] C. Guyot-Declerck, *Food Chem.*, **2002**, 79, 453-459.
- [49] Chorepsima, S.; Tentolouris, K.; Dimitroulis, D.; Tentolouris, N. J. *Herb. Med.* 2013, 3, 81-86.

- [50] I. Matławska, *Postępy Fitoter.*, **2002**, 3–4, 70–74.
- [51] K.A. Aliferis, P. Tarantilis, P.C. Harizanis, E. Alissandrakis, *Food Chem.*, **2010**, 121, 856–862.
- [52] E. Majewska, A. Delmanowicz, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, **2007**, 5, 247–259.
- [53] A.C. Soria, J. Sanz, I. Martínez-Castro, *Eur. Food Res. Technol.*, **2009**, 228, 579–590.
- [54] B. Karačonji, K. Jurica, *J. AOAC Int.*, **2017**, 100, 889–892.
- [55] P. Truchado, F. Ferreres, L. Bortolotti, A.G. Sabatini, F.A. Tomás-Barberán, *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56, 8815–8824.
- [56] A. Cherchi, L. Spanedda, C. Tuberoso, P. Cabras, *J. Chromatogr. A*, **1994**, 669, 59–64.
- [57] L.H. Yao, K. Raymont, Y. Jiang, R. Singanusong, N. Datta, **2004**, *Food Chem.*, 86, 169–177.
- [58] L.H. Yao, Y. Jiang, R. Singanusong, N. Datta, K. Raymont, **2005**, *Food Res. Int.*, 38, 651–658.
- [59] N. Gheldof, X.-H. Wang, N. Engeseth, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 5870–5877.
- [60] K. Pyrżyńska, M. Biesaga, *Trends Anal. Chem.*, **2009**, 28, 893–902.
- [61] V.A. Isidorov, U. Czyżewska, E. Jankowska, S. Bakier, **Food Chem.**, **2011**, 124, 387–391.
- [62] A. Michałkiewicz, M. Biesaga, K. Pyrżyńska, *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1187, 18–24.
- [63] G. Beretta, E. Caneva, L. Regazzoni, B.N. Golbamaki, F.R. Maffei, *Anal. Chem. Acta*, **2008**, 620, 176–182.
- [64] P. Cabras, A. Angioni, C. Tuberoso, L. Floris, F. Reniero, C. Guillou, S. Ghelli, *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 4064–4067.
- [65] A.M. Gómez-Caravaca, M. Gómez-Romero, D. Arràez-Romàn, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**, 41, 1220–1234.
- [66] J.A. Donarski, S.A. Jones, M. Harrison, M. Driffield, A.J. Charlton, *Food Chem.*, **2010**, 118, 987–994.
- [67] G. J. Patti, O. Yanes, G. Siuzdak, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **2012**, 13, 263–269.
- [68] Y. Li, Y. Jin, S. Yang, W. Zhang, J. Zhang, W. Zhao i współ., *J. Chromatogr. A*, **2017**, 1499, 78–89.
- [69] E. Schievano, M. Stocchero, E. Morelato, C. Facchin, S. Mammi, *Metabolomics*, **2012**, 8, 679–690.
- [70] J. Zhou, L. Yao, Y. Li, L. Chen, L. Wu, Zhao J., *Food Chem.*, **2014**, 145, 941–949.
- [71] F. Rios, A.C. Sanchez, M. Lobo, L. Lupo, I. Coelho, I. Castanheira, N. Samman, *J. Chemometrics*, **2014**, 28, 834–843.
- [72] R. Consonni, L.R. Cagliani, *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56, 6873–6880.
- [73] J. F. Cotte, H. Casabianca, J. Lhéritier, C. Perrucchiotti, C. Sanglar, H. Waton, M. F. Grenier-Loustalot, *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 582, 125–136.
- [74] M.B. Wilson, M. Spivak, A.D. Hegelman, A. Rendahl, J. D. Cohen, *PLoS ONE*, **2013**, 8, e77512.
- [75] R. Consonni, L. R. Cagliani, C. Cogliati, *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, 60, 4526–4534.
- [76] G. del Campo, J. Zuriarrain, A. Zuriarrain, I. Berregi, *Food Chem.*, **2016**, 196, 1031–1039.

4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

Moje dotychczasowe zainteresowania i aktywność naukowa koncentrują się na izolacji i identyfikacji substancji pochodzenia naturalnego, głównie roślinnego, na ocenie ich aktywności biologicznej oraz możliwościach potencjalnego zastosowania w różnych gałęziach przemysłu, ze szczególnym uwzględnieniem wyrobów medycznych, suplementów diety czy też preparatów kosmetycznych.

Zainteresowania naukami przyrodniczymi rozwijałam studiując na kierunku chemia ze specjalnością agrobiochemia. Wybór tak interdyscyplinarnej specjalności, umożliwił mi korzystanie z metodologii grupy nauk przyrodniczych w analizowaniu i rozumieniu zjawisk zachodzących w przyrodzie. W 1995 pod kierunkiem dr hab. Kazimierza Wiecha obroniłam pracę magisterską pt. *Wpływ różnego sposobu uprawy marchwi na występowanie szkodliwej i pożytecznej entomofauny*. Po uzyskaniu stopnia magistra, zostałam zatrudniona w Zakładzie Ochrony Plonów Instytutu Chemii, obecnie Katedra Chemii Analitycznej i Ekologicznej Wydziału Chemii, na stanowisku asystenta. W początkowym okresie pracy włączyłam się w nurt badań obejmujących ocenę właściwości herbicydowych związków należących do grupy bisfosfonianów. Jednocześnie, pod kierunkiem dr hab. Pawła Kafarskiego, rozwijałam swoją wiedzę i umiejętności laboratoryjne związane z izolacją, oczyszczaniem i identyfikacją substancji roślinnych. Obiektem moich zainteresowań były substancje wchodzące w skład systemów obronnych roślin, szczególnie zaś allelozwiązki syntezowane w tkankach nasion marchwi. Zdobyte doświadczenie wykorzystałam prowadząc badania, jako główny wykonawca, w projekcie: Nowe agrochemikalia bezpieczne dla zdrowia i środowiska, zadanie badawcze Nr 37 pt. *Substancje allelopatycznie aktywne jako potencjalne biopestycydy*, grant zamawiany PBZ-KBN-060/T09/2001/37. Badania prowadzone w zakresie tego projektu dotyczyły ekstraktów roślinnych wykazujących działanie allelopatyczne w stosunku do innych gatunków roślin. Oddziaływania o takim charakterze związane są z obecnością w tkankach roślin określonych związków chemicznych, tzw. allelopatyn (allelozwiązków). Izolacja i identyfikacja tych substancji jest przydatna do opracowywania nowych, naturalnych i bezpiecznych środków ochrony roślin. Końcowy wynik tego projektu badawczego stanowiły trzy prace w czasopismach z bazy JCR oraz kilka rozdziałów w monografiach, których jestem współautorem.

Badania dotyczące poszukiwania substancji odpowiedzialnych za oddziaływania allelopatyczne rozwinęłam w ramach promotorskiego grantu MNiSW, *Allelochemia marchwi jadalnej (Daucus carota L.)*, Nr 4T09B 052 24 (03.2003-09.2005). W pracy wykazałam, że olej z nasion marchwi oraz jego seskwiterpenowe składniki (karotol, daukol) znacznie ograniczają kiełkowanie i wzrost innych gatunków roślin oraz ograniczają rozwój patogenicznych grzybów z rodzajów *Alternaria* i *Fusarium*. Efektem uzyskanych rezultatów była praca doktorska o tym samym tytule, którą obroniłam w 2005 roku oraz 2 artykuły w czasopismach znajdujących się w bazie JCR (o łącznym IF 3,495), a także kilka rozdziałów w monografiach.

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora nauk chemicznych i zatrudnieniu na stanowisku adiunkta, kontynuowałam badania związane z izolacją i identyfikacją substancji

roślinnych oraz oceną ich aktywności biologicznej. W tym zakresie współpracowałam z Zakładem Botaniki Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego, z Katedrą Technologii, Substancji Biologicznie Aktywnych, Farmacji i Biotechnologii Politechniki Lwowskiej oraz z Wydziałem Chemii Uniwersytetu w Konstantin w Algierii. Wynikiem tej współpracy są cztery publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie JCR. W tym samym okresie nawiązałam również współpracę z Polskim Związkiem Pszczelarskim oraz firmą Miody Polskie Sp. z o.o. i rozpoczęłam badania nad poszukiwaniem chemicznych markerów miodów nektarowych. Na tym etapie mojej pracy naukowej zajęłam się opracowaniem i optymalizacją procedur analitycznych, które umożliwiłyby identyfikację związków należących do frakcji lotnej oraz frakcji fenolowej w ekstraktach pozyskiwanych z miodów nektarowych. Równolegle, jako jeden z głównych wykonawców, w okresie od 12.2009–06.2014, prowadziłam badania w projekcie finansowanym ze środków UE w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (POIG 01.01.02-02-003/08) Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne, Zadanie badawcze nr I.2. *Wykrywanie substancji halucynogennych*.

Podstawowym efektem realizacji projektu był wydany atlas pt. *Grzyby neurotropowe*, swego rodzaju przewodnik, umożliwiający służbom kontrolującym wstępną identyfikację gatunków grzybów produkujących substancje halucynogenne, którego jestem współautorem. Opisana tam, szczegółowa analiza mykologiczna materiału grzybowego oraz analiza składu ekstraktów metodami instrumentalnymi, w tym z wykorzystaniem badań metabolomicznych, i z zastosowaniem technik genetycznych, umożliwiają jednoznaczne zdefiniowanie gatunków grzybów zawierających substancje o właściwościach halucynogennych. Zawarty w atlasie opis struktur nowo zidentyfikowanych związków o właściwościach psychoaktywnych, a zatem zmieniających metabolizm organizmu powinna przyczynić się do wypracowania nowych, efektywnych standardów leczenia zatruć tymi substancjami. Opracowane rozwiązania analityczne, również będące rezultatami projektu, umożliwiają standardowe oznaczanie zawartości składników odpowiedzialnych za efekty narkotyczne, zarówno w materiale grzybowym, jak i w płynach fizjologicznych (mocz, krew). Znaczna część otrzymanych w trakcie realizacji projektu wyników złożyła się na 14 publikacji naukowych w czasopismach znajdujących się w bazie JCR, siedmiu tych prac jestem współautorem.

Po zakończeniu projektu związanego z identyfikacją substancji halucynogennych w grzybach, zintensyfikowałam badania związane z autentykacją miodów nektarowych. Prace w dalszym ciągu były prowadzone we współpracy z firmą Miody Polskie Sp. z o.o. oraz Polskim Związkiem Pszczelarskim, które to jednostki dostarczały próbki polskich miodów odmianowych. Fragment prowadzonych badań był finansowany z projektu badawczego NCN (OPUS 8, Nr 2014/15/B/NZ9/02182), którego byłam wykonawcą.

Rezultaty tych badań stanowią podstawę osiągnięcia przedstawionego do oceny i omówione zostały w części pierwszej.

5. Zestawienie dorobku naukowego.

	Przed uzyskaniem stopnia doktora				Po uzyskaniu stopnia doktora				Łącznie			
	Liczba	IF	IF _{5 years}	Punkty MNiSW	Liczba	IF	IF _{5 years}	Punkty MNiSW	Liczba	IF	IF _{5 years}	Punkty MNiSW
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach z bazy Journal Citation Reports	4	4,425	5,643	45	21	33,712	35,118	470	25	38,137	40,761	515
Oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach spoza bazy Journal Citation Reports	5	-	-	-	7	-	-	-	12	-	-	-
Rozdziały w książkach	5	-	-	-	6	-	-	-	11	-	-	-
Razem publikacje	14	4,425		45	34	33,712		470	48	38,137	40,761	515
Wygłoszone referaty	11	-	-	-	7	-	-	-	18	-	-	-
Komunikaty konferencyjne (komunikaty + poster)	21	-	-	-	61	-	-	-	83	-	-	-

6. Dalsze plany naukowo-badawcze:

W kolejnych etapach pracy naukowej chciałabym w dalszym ciągu rozwijać swoje zainteresowania substancjami pochodzenia naturalnego. Z racji wiedzy, którą posiadam w trakcie realizacji projektu dotyczącego substancji halucynogennych oraz wstępnych wyników dotyczących metabolitów wtórnych grzybów, zamierzam zgłębić tematykę dotyczącą metabolizmu tych właśnie organizmów.

Grzyby wielkoowocnikowe, to żywe „bioreaktory” zdolne do syntezy ogromnej liczby metabolitów wtórnych o silnej i zróżnicowanej aktywności biologicznej, w tym farmakologicznej. Dotychczasowe badania składu chemicznego tych organizmów doprowadziły do identyfikacji wielu związków chemicznych odpowiedzialnych za poszczególne kierunki działania farmakologicznego. Związkom tym, należącym głównie do polisacharydów, terpenoidów, fenoli i lektyn, przypisano szereg efektów terapeutycznych, między innymi immunomodulujące, przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne, antywirusowe oraz przeciwutleniające. Wśród wielu gatunków grzybów szczególnie interesujące, jako źródło tzw. struktur wiodących, związków wyjściowych w poszukiwaniu nowych leków na drodze syntezy chemicznej, wydają się grzyby znane jako trujące lub halucynogenne. Dobrym przykładem takiego gatunku jest muchomor czerwony (*Amanita muscaria*).

W chwili obecnej, do otrzymywania preparatów leczniczych, zwłaszcza na terenie Unii Europejskiej, w tym Polski, używane są tylko niektóre gatunki Basidiomycetes (podstawczaki). Jednakże dynamiczny rozwój zarówno dziedziny biotechnologii, jak i technik analitycznych wspomaganych narzędziami chemometrycznymi sugeruje, że znaczenie tych organizmów dla przemysłu farmaceutycznego będzie wzrastać.

Rozwinięcie tych problemów badawczych wymaga nawiązania współpracy z grupami naukowymi zarówno na macierzystej uczelni, jak i poza nią. Taką współpracę zamierzam podjąć między innymi z Uniwersytetem Medycznym we Wrocławiu.