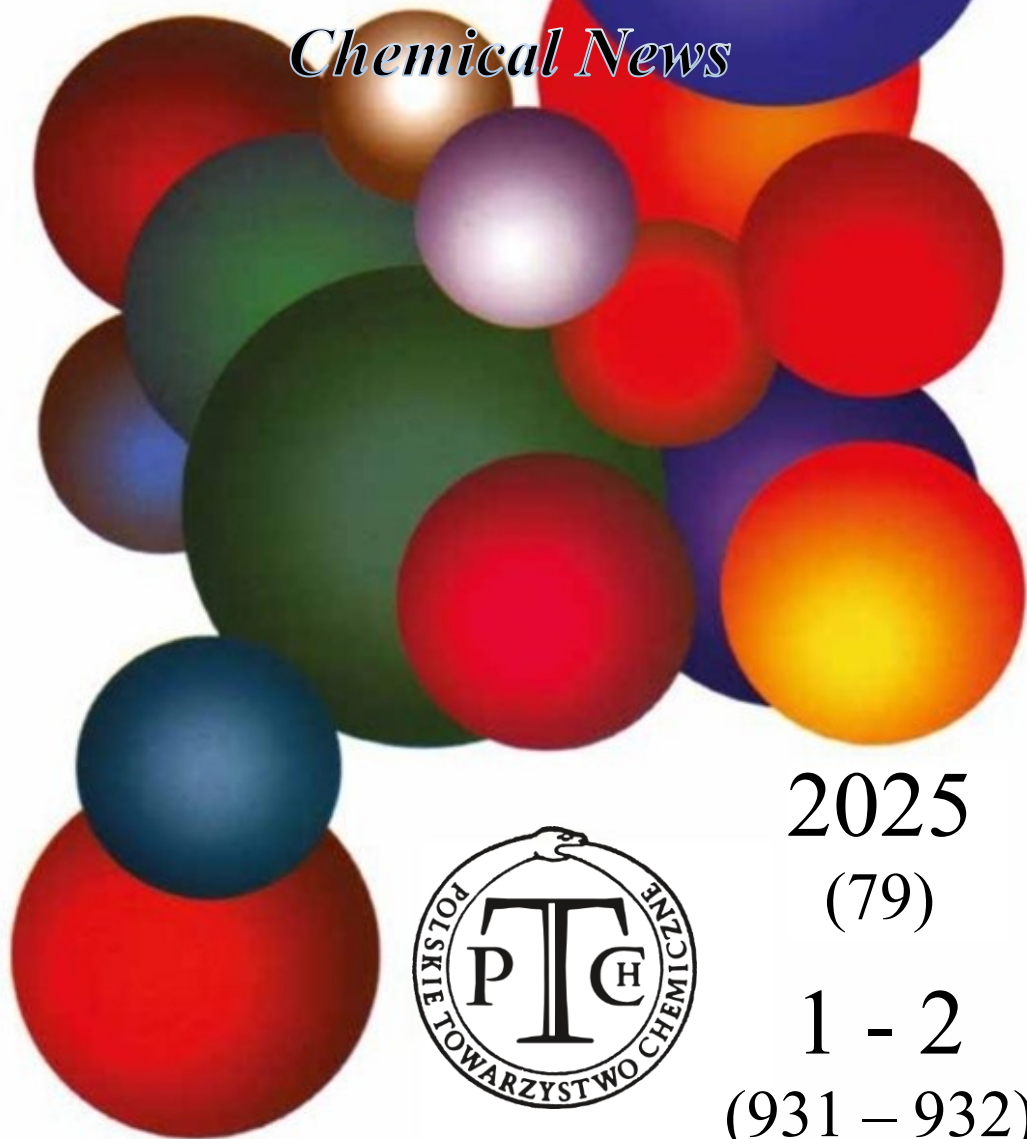


# WIADOMOŚCI *chemiczne*

*Chemical News*



2025

(79)

1 - 2

(931 – 932)

ISSN 0043-5104

eISSN 2300-0295

# **CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO**

## **RADA REDAKCYJNA**

IRENA BARANOWSKA, ANDRZEJ BARAŃSKI, BOGUSŁAW BUSZEWSKI  
(PRZEWODNICZĄCY), TADEUSZ GÓRECKI, MIETEK JARONIEC,  
ANATÓL KOJŁO, TADEUSZ M. KRYGOWSKI,  
JERZY LESZCZYŃSKI, KRZYSZTOF MATYJASZEWSKI, PIOTR PANETH,  
JANUSZ PAWLISZYN, K. MICHAŁ PIETRUSEWICZ, DARIUSZ POGOCKI,  
MAREK POTRZEBOWSKI, SŁAWOMIR RUBINSZTAJN, GRZEGORZ SCHROEDER,  
ANDRZEJ W. SOKALSKI, ARTUR P. TERZYK

## **KOMITET REDAKCYJNY**

MARCIN DRAĞ, ADAM JEZIERSKI, LESZEK KĘPIŃSKI,  
LUDWIK KOMOROWSKI, WITOLD RYBA-ROMANOWSKI, SŁAWOMIR SZAFERT,  
ANDRZEJ TROCHIMCZUK, KAZIMIERA WILK

## **REDAKTOR NACZELNY**

PIOTR J. CHMIELEWSKI

## **P. O. SEKRETARZA REDAKCJI**

DAGMARA JACEWICZ

e-mail: [czasopisma@ptchem.pl](mailto:czasopisma@ptchem.pl)

BIURO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO (FINANSE)

e-mail: [biuro@ptchem.pl](mailto:biuro@ptchem.pl)

MARTA PAWLAK (KOLPORTAŻ)

e-mail: [kolportaz@ptchem.pl](mailto:kolportaz@ptchem.pl)

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

e-mail: [czasopisma@ptchem.pl](mailto:czasopisma@ptchem.pl)

ADRES STRONY INTERNETOWEJ

<https://ptchem.pl/pl/chem-news>

©Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

Warszawa 2019

pISSN 0043-5104

eISSN 2300-0295

Obsługa artykułów:

Joanna Drzeżdżon

Skład i przygotowanie do druku:

Mateusz Drzeżdżon

Druk:

Sowa Sp. z o.o.

ul. Raszyńska 13, 05-500 Piaseczno

Tel.: +48(22) 431 81 40

Fax. +48(22) 431 81 50

e-mail: [sowadruk@sowadruk.pl](mailto:sowadruk@sowadruk.pl)

**Laureaci nagrody ufundowanej przez Altium  
(dawnej Perlan Technologies) za najlepszą pracę  
związaną z rozwojem technik rozdzielania**

---

---





**ZASTOSOWANIE TECHNIK  
CHROMATOGRAFICZNYCH W BADANIACH  
METABOLITÓW W SCHORZENIACH  
ZWIĄZANYCH Z OŚRODKOWYM UKŁADEM  
NERWOWYM**

APPLICATION OF CHROMATOGRAPHIC  
TECHNIQUES IN THE STUDY OF METABOLITES  
IN DISEASES RELATED TO THE CENTRAL NERVOUS  
SYSTEM

**Paulina Gątarek\*, Joanna Kałużna-Czaplińska\*\***

*Institut Chemii Ogólnej i Ekologicznej, Wydział Chemiczny,  
Politechnika Łódzka, ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź*

\*e-mail: [paulina.gatarek@p.lodz.pl](mailto:paulina.gatarek@p.lodz.pl)

\*\*e-mail: [joanna.kaluzna-czaplinska@p.lodz.pl](mailto:joanna.kaluzna-czaplinska@p.lodz.pl)

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Badania metabolomiczne z wykorzystaniem technik chromatograficznych
2. Metabolity w autyzmie
3. Metabolity w chorobie Parkinsona

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---



**Dr inż. Paulina Gaćarek** studiowała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, gdzie w 2012 roku uzyskała tytuł zawodowy licencjata. Od 2012 roku związana z Wydziałem Chemicznym Politechniki Łódzkiej, gdzie w 2015 roku uzyskała tytuł inżyniera, następnie w 2016 roku tytuł magistra, kontynuując naukę na studiach doktoranckich, uzyskując w 2023 roku tytuł doktora nauk chemicznych. Pracę doktorską pt. „*Oznaczanie wybranych metabolitów w płynach ustrojowych z wykorzystaniem technik chromatograficznych*” zrealizowała w Instytucie Chemii Ogólnej i Ekologicznej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Joanny Kałużnej-Czaplińskiej. Praca została nagrodzona w konkursie Komitetu Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk za najlepszą rozprawę doktorską z chemii analitycznej w 2024 r. Obecnie

zatrudniona na stanowisku adiunkta na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej. Jest współautorką m.in. dziewiętnastu publikacji o zasięgu międzynarodowym oraz trzech rozdziałów w monografiach naukowych. Zainteresowania naukowe skupia głównie na badaniach związanych z poszukiwaniem i identyfikacją potencjalnych markerów diagnostycznych i prognostycznych w chorobach związanych z ośrodkowym układem nerwowym z zastosowaniem technik chromatograficznych oraz wielowymiarowej analizy statystycznej.



<https://orcid.org/0009-0006-3825-522X>



**Prof. dr hab. inż. Joanna Kałużna-Czaplińska** - w 1989 roku ukończyła XII Liceum Ogólnokształcące im. S. Wyspiańskiego w Łodzi w klasie o profilu matematyczno-fizycznym. W tym samym roku podjęła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej, a po pięciu latach uzyskała tytuł magistra inżyniera chemii. Od 1994 roku związana jest z Instytutem Chemii Ogólnej i Ekologicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej. W 1999 roku uzyskała stopień doktora nauk chemicznych. Stypendystka Fundacji Pamięci Prof. dr hab. B. Jeżowskiej - Trzebiatowskiej dla wybitnych młodych uczonych. Stopień doktora habilitowanego otrzymała w 2012 roku na podstawie rozprawy habilitacyjnej nt. „*Oznaczenia metabolitów z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas*”. Zainteresowania naukowe prof. Joanny Kałużnej-Czaplińskiej dotyczą

wykorzystania technik łączonych z chromatografią w badaniach próbek środowiskowych, klinicznych i archeologicznych. Była kierownikiem i głównym wykonawcą projektów krajowych finansowanych przez NCN, MNiSW oraz w ramach Funduszy Europejskich. Od kilku lat uznawana jest jako najczęściej cytowany autor na świecie według Wydawnictwa Elsevier. Pełni funkcję kierownika zespołu badawczego Poland Chemistry and Nutrition Research Group, Grupa ta jest częścią Międzynarodowego Stowarzyszenia - Council for Nutritional and Environmental Medicine (CONEM). Jest członkiem Komitetu Chemii Analitycznej PAN i Komisji Analizy Chromatograficznej i Technik pokrewnych Komitetu Chemii Analitycznej PAN, Polskiego Towarzystwa Metabolomicznego. Jest współautorką ponad 90 publikacji w czasopiśmie z listy JCR, monografiach naukowych i podręczników: „*Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych*” oraz „*Biochromatografia*”. Pełni rolę recenzenta w czasopiśmie naukowym o zasięgu międzynarodowym. Nowe kierunki jej badań naukowych obejmują analizy metabolomiczne oraz wpływ diety i suplementacji na organizm człowieka.



<https://orcid.org/0000-0002-5106-4667>

## ABSTRACT

The search for biomarkers which would be helpful in diagnosing or predicting the course of diseases of unknown etiology, such as autism or Parkinson's disease (PD), is challenging due to the complex nature of these conditions and their diverse biochemical backgrounds. With help comes metabolomics. Metabolomics studies allow qualitative and quantitative analysis of metabolites which can act as disease markers. Traditional biochemical methods are not always sensitive enough to detect metabolites present at very low concentrations in body fluids. Therefore, chromatographic techniques, especially gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), along with other detection options, are often used in metabolomic studies. The high sensitivity of both methods allows detection of metabolites even in trace amounts, which is crucial for diagnosing neurological diseases, where biochemical changes can be subtle and difficult to detect. Metabolomics research into autism and PD contributes to a better understanding of mechanisms of their development at cellular and molecular levels. Identifying biomarkers may help uncover metabolic changes affecting central nervous system (CNS) functions, such as neurotransmitters, which may be related to communication and social impairments in autism. Similarly, metabolites linked to dopaminergic neuronal degeneration or oxidative stress are being sought in Parkinson's disease. Examples of potential biomarkers include specific fatty acids, products of lipid peroxidation, or compounds related to energy metabolism, which may be indicative of ongoing neurodegenerative processes in the brain. However, more specific diagnostic indicators are still needed, making metabolomic studies together with bioinformatics analysis a valuable tool for the development of personalized diagnostics, but also for monitoring the course of disease and therapeutic strategies in diseases of the CNS. This article presents metabolites which can be considered potential prognostic and diagnostic markers in autism and Parkinson's disease.

Keywords: metabolity, techniki łączone z chromatografią, autyzm, choroba Parkinsona

Słowa kluczowe: metabolites, coupled techniques with chromatography, autism, Parkinson's disease

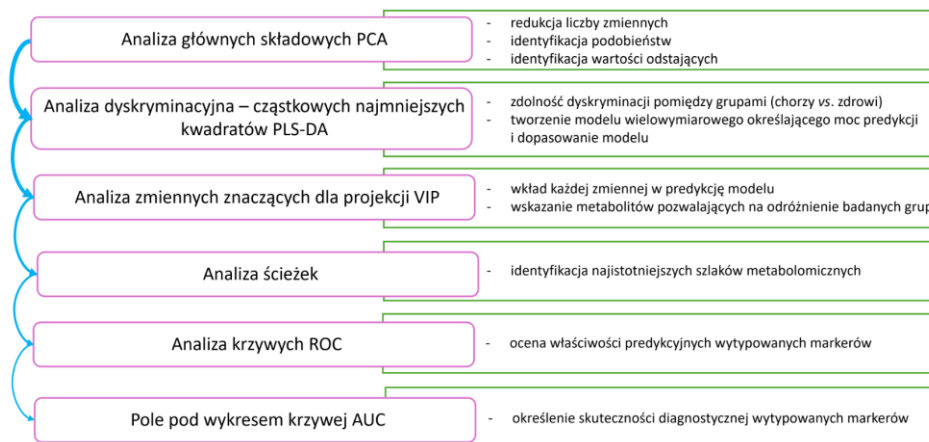
---

## WPROWADZENIE

Choroby cywilizacyjne często są definiowane jako te związane ze stylem życia i sposobem odżywiania. Do chorób cywilizacyjnych zaliczają się m.in.: choroby serca, cukrzyca typu 2, otyłość, choroby nowotworowe, choroby układu oddechowego oraz zaburzenia o podłożu psychicznym i neurologicznym. Wiele z tych chorób wiąże się z niewłaściwą dietą, brakiem aktywności fizycznej, stresem, paleniem tytoniu i nadmiernym spożywaniem alkoholu często prowadzącym do przewlekłego zmęczenia, ograniczenia zdolności do wykonywania codziennych czynności, wpływając tym na jakość życia całego społeczeństwa a także przyczyniając się do zwiększenia liczby zgonów oraz w dużej mierze do rozwoju niepełnosprawności. Obecnie szczególnie trudnym zagadnieniem są neurologiczne choroby cywilizacyjne. Najczęściej definiowane jako schorzenia i zaburzenia, które w coraz większym stopniu dotyczą społeczeństwo i są ściśle powiązane z ośrodkowym układem nerwowym (OUN). Ośrodkowy układ nerwowy odgrywa kluczową rolę w regulacji funkcji życiowych, procesów myślowych, ruchowych, związanych z emocjami, ma także kluczowe znaczenie w odczuwaniu bólu, reakcjach na bodźce, równowagę hormonalną oraz oddychanie i trawienie. Dlatego neurologiczne choroby cywilizacyjne mają poważne konsekwencje dla zdrowia publicznego, a wczesna diagnostyka oraz działania prewencyjne są istotnymi elementami w walce z tymi schorzeniami. Analiza metabolitów w przypadku OUN może pomóc w identyfikacji biomarkerów chorób neurologicznych, takich jak na przykład choroba Parkinsona (ang. *Parkinson's disease* – PD), czy zaburzenie jakim jest autyzm. Badania metabolitów związanych z OUN są istotne dla zrozumienia wielu aspektów funkcjonowania ludzkiego mózgu oraz patologii neurodegeneracyjnych. Metabolity, takie jak neurotransmitery, kwasy tłuszczowe, czy produkty metabolizmu glukozy, odgrywają kluczową rolę w komunikacji neuronów i regulacji procesów energetycznych. Badania metabolomiczne umożliwiają wczesną diagnozę oraz prognozowanie przebiegu choroby poprzez zidentyfikowanie markerów predykcyjnych, hamowanie rozwoju choroby czy wybór i dopasowanie najefektywniejszego leczenia. Stąd też w badaniach metabolomicznych istotne jest zastosowanie czułych, selektywnych i komplementarnych technik analitycznych, aby możliwe było oznaczenie metabolitów o różnych właściwościach fizykochemicznych, często występujących na bardzo niskich poziomach stężeń. W tym celu w tych badaniach szeroko wykorzystywane są techniki łączone m.in.: chromatografia gazowa (ang. *gas chromatography* – GC) czy cieczowa (ang. *liquide chromatography* – LC) sprzężone ze spektrometrią mas (ang. *mass spectrometry* – MS). Zastosowanie łączonych technik chromatograficznych pozwala na jakościową i ilościową analizę metabolitów mogących pełnić funkcję markerów chorobowych.

Ciągle istnieje potrzeba poszukiwania nowych, bardziej specyficznych wskaźników diagnostycznych. Analiza metabolitów zapewnia wgląd w odpowiedź organizmu wywołaną bodźcami zewnętrznymi. Na ich podstawie można obserwować zmiany w szlakach metabolicznych związanych z chorobą i jej rozwojem. Badania metabolomi-

czne przy wsparciu zaawansowanego modelowania bioinformatycznego stanowią potężne narzędzie diagnostyczne umożliwiające holistyczne podejście do zrozumienia regulowanych odpowiedzi na różnych poziomach biologicznych. Przykładowy schemat postępowania statystycznego w badaniach związanych z poszukiwaniem nowych biomarkerów zaprezentowano na Rysunku 1.



Rysunek 1. Przykładowy schemat postępowania statystycznych w badaniach metabolomicznych

Figure 1. An example of a scheme of statistical procedures in metabolomics research

## 1. BADANIA METABOLOMICZNE Z WYKORZYSTANIEM TECHNIK CHROMATOGRAFICZNYCH

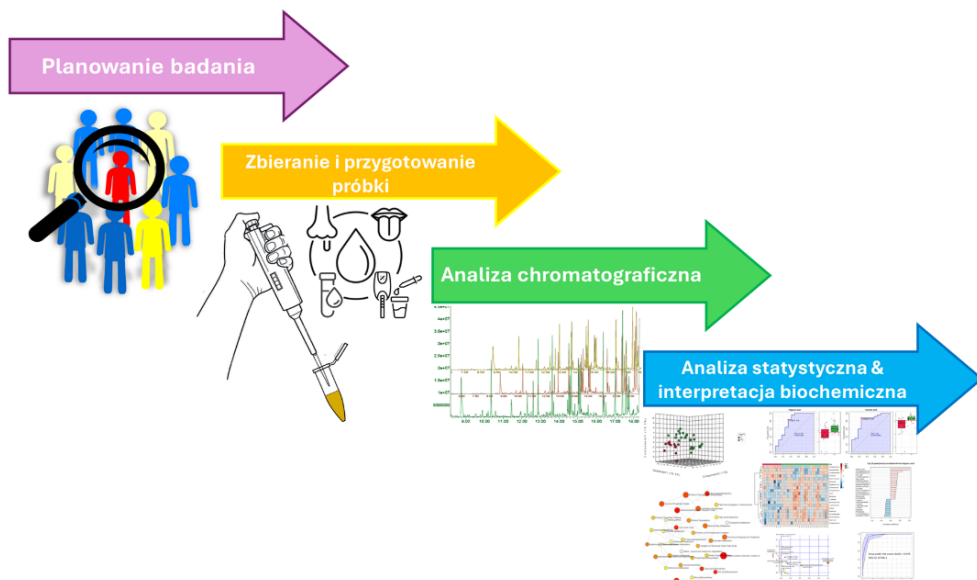
Etiologia wielu chorób i zaburzeń, w tym także choroby Parkinsona i autyzmu, nadal pozostaje przedmiotem dyskusji. Pomocne mogą okazać się nowe narzędzia diagnostyczne, które skupiają się na analizie metabolomu, czyli pełnego zestawu metabolitów, zmieniający się w zależności od fizjologii, rozwoju lub stanu patologicznego komórek czy tkanek. Badania nad metabolitami w chorobie Parkinsona i autyzmie mogą pomóc w identyfikacji nowych biomarkerów do wczesnej diagnostyki oraz w opracowywaniu nowych strategii terapeutycznych. Ponadto, badania metabolomiczne umożliwiają wczesną diagnozę poprzez zidentyfikowanie markerów predykcyjnych, prognozowanie przebiegu choroby, hamowanie rozwoju choroby czy wybór i dopasowanie najefektywniejszej suplementacji i leczenia.

W badaniach metabolomicznych stosowane są różne podejścia analityczne, takie jak:

1. metabolomiczny odcisk palca (ang. *metabolic fingerprinting*) polegający na analizie jakościowej wszystkich związków obecnych w próbce [1,2],

2. badanie profili metabolicznych (ang. *metabolite profiling*), które polega na analizie określonej grupy metabolitów o podobnych właściwościach [3,4],
3. celowana analiza metabolomiczna (ang. *metabolite target analysis*), która skupia się na analizie określonego odcinka metabolomu poprzez analizę wybranych metabolitów [5,6].

Przykładowy schemat postępowania metabolomicznego został zaprezentowany na Rysunku 2.



Rysunek 2. Postępowanie metabolomiczne w poszukiwaniu biomarkerów

Figure 2. Metabolomic procedure in the search for biomarkers

Badania metabolomiczne skupiające się na identyfikacji markerów chorobowych często są utrudnione m.in.: ze względu na złożony skład matrycy, czyli płynów fizjologicznych lub tkanek, najczęściej stosowanych w tego typu badaniach. Dodatkowo nie bez znaczenia pozostają poziomy i zakresy stężeń metabolitów w próbkach biologicznych. Oznaczone metabolity występują na niskich poziomach stężeń, rzędu mikro-, nano- czy pikogramów. Często wykonywanie tych oznaczeń jest skomplikowane i czasochłonne, a proces przygotowania próbki wymagający i wieloetapowy. Te wszystkie trudności można wyeliminować stosując techniki chromatograficzne głównie w połączeniu ze spektrometrią mas. Sprzężenie tych technik gwarantuje rozdzielenie złożonej mieszaniny na poszczególne składniki i ich identyfikację. Wiele metabolitów z próbek biologicznych charakteryzujących się złożonym składem matrycy może być zidentyfikowanych w wyniku pojedynczej analizy z wykorzystaniem m.in.: chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią

mas (ang. *gas chromatography-mass spectrometry* – GC-MS) [7,8]. Sprzężenie to jest jedną z najczęściej stosowanych technik do oznaczania lotnych i niepolarnych metabolitów. Przed zadozowaniem próbki do kolumny chromatograficznej jest przekształcana w pochodne o odpowiednich właściwościach umożliwiających ich oznaczenie (zwiększenie lotności czy stabilności termicznej, zmianę polarności, zwiększenia czułości i/lub specyficzności oznaczenia). Do zalet tego połączenia należą wysoka czułość, możliwość jednoznacznej identyfikacji analizowanych związków oraz szeroki wachlarz możliwości zastosowania [8-11]. Inną szybką i dokładną metodą rozdzielania składników mieszaniny wraz z identyfikacją jest chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. *liquid chromatography-mass spectrometry* – LC-MS). W tym przypadku proces przygotowania próbki do analizy nie jest aż tak wymagający i długotrwały, jak dla GC-MS. Technika ta charakteryzuje się wysoką czułością i specyficznością. Stosowana jest głównie do oznaczania związków polarnych, nielotnych oraz wrażliwych na temperaturę [12].

## 2. METABOLITY W AUTYZMIE

Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization* – WHO) definiuje autyzm jako zaburzenie rozwoju psychicznego charakteryzujące się opóźnieniem lub upośledzeniem rozwoju funkcji mózgu bezpośrednio związanych z biologicznym dojrzewaniem ośrodkowego układu nerwowego. Charakterystycznymi cechami diagnostycznymi autyzmu są obecność zaburzonego lub nieprawidłowego rozwoju dziecka ujawniającego się przed ukończeniem trzeciego roku życia, a także nieprawidłowe funkcjonowanie we wszystkich obszarach psychopatologii: wzajemnych interakcji społecznych, komunikacji i ograniczonych, powtarzalnych, stereotypowych zachowań. Oprócz tych specyficznych cech powszechny jest szereg innych, niespecyficznych problemów, takich jak upośledzenie zdolności językowych oraz koordynacji ruchowej, napady złości i autoagresja, fobie czy zaburzenia snu oraz odżywiania [13].

Badania metabolomiczne z wykorzystaniem technik chromatograficznych są użytecznym i czułym narzędziem w identyfikacji specyficznych ścieżek biologicznych, badaniach wielu chorób w celu poprawy jej diagnostyki czy wprowadzenia nowych lub optymalizowanie standardowych strategii terapeutycznych. Ponadto podejścia te w połączeniu z jedno- i wieloczynnikową analizą statystyczną umożliwiają identyfikowanie różnic w zawartościach małocząsteczkowych metabolitów zapewniając specyficzny i spersonalizowany profil biochemiczny badanych osób. Sprzężenie technik chromatograficznych ze spektrometrią mas oferuje identyfikację i oznaczenie niskich poziomów stężeń metabolitów w płynach ustrojowych oraz tkankach. Zapewnia także odpowiednią

selektywność i wysoką czułość analiz [14]. Badania metabolomiczne u dzieci autystycznych mają potencjał do odkrywania nie tylko nowych biomarkerów, ale są istotne w zrozumieniu mechanizmów choroby i wspierania bardziej zindywidualizowanego podejścia do terapii.

W Tabeli 1 zaprezentowane zostały potencjalne biomarkery autyzmu, które obecnie są oznaczane w płynach ustrojowych osób dotkniętych tym zaburzeniem z wykorzystaniem technik chromatograficznych.

Tabela 1. Potencjalne biomarkery autyzmu oznaczane w płynach ustrojowych osób badanych z wykorzystaniem technik chromatograficznych

Table 1. Potential biomarkers of autism spectrum disorder determined in body fluids of subjects using chromatographic techniques

L.p.	Metabolity	Matryca	Przygotowanie próbek do analizy	Stosowana technika chromatograficzna	Parametry walidacyjne/statystyczne	Lit.
1	<i>kwasy:</i> 2-oksoglutarynowy, cytrynowy, izocytrynowy, 4-hydroksybenzoesowy, 4-hydroksyfenylooctowy, hipurowy, adypinowy, suberynowy	mocz	ekstrakcja rozpuszczalnikowa octan etylu:eter dietylowy (1:1, w/v), derywatywacja: silylacja	GC-MS	$p < 0,05$	[15]
2	<i>kwasy:</i> $\alpha$ - i $\beta$ -hydroksymasłowy, szczawiowy, bursztynowy, $\alpha$ -hydroksyglutarynowy, 4-hydroksyfenylooctowy, winowy, cytrynowy, treonowy, 3-hydroksybenzoesowy, propionowy, fosforowy, butanowy, sebacynowy; <i>aminokwasy:</i> homocysteina, tyrozyna, seryna, tryptofan; cukry: mannitol, arabinitol	mocz	ekstrakcja rozpuszczalnikowa MeOH, derywatywacja: metoksylacja, silylacja	GC-MS	$p < 0,05$ AUC ROC 0,775	[16]
3	retinol, 5-HT	surowica krwi	odbiałczanie i ekstrakcja rozpuszczalnikowa heksanem	HPLC	$p < 0,001$	[17]
4	metionina, fenyloalanina, walina, tryptofan, leucyna, izoleucyna	mocz	derywatywacja: EtOH, Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> , aldehid ftalowy, tetraboran sodu (Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> )	HPLC	R <sup>2</sup> 0,9939– 0,9995 LOD 0,01– 0,04 µg/mL LOQ 0,05– 0,2 µg/mL Odzysk 86,6– 107,5% $p < 0,05$	[18]
5	tyrozyna, kreatyna, kwas 2-hydroksybutyrowy, kwas glutaminowy	mocz	odwirowanie, rozcieńczenie	NMR LC-MS	R <sup>2</sup> 0,90 Q <sup>2</sup> 0,77 AUC ROC 0,877	[19]



						p < 0,05	
6	7-metyloguanozyna, 1-metyloadenozyna, 1-metyloguanina, 7-metyloguanina, 3-metyloadenina	mocz	ekstrakcja rozpuszczalnikowa ACN	LC-MS/MS	R <sup>2</sup> > 0,995 CV 0,8-4,9% p < 0,05	[20]	
7	<i>kwasy:</i> 3-hydroksyzowalerianowy, HVA, adypinowy, suberynowy, indoloctowy	mocz	ekstrakcja rozpuszczalnikowa HCl i octan etylu, derywatywacja: silylacja	GC-MS	p < 0,0001	[21]	
8	<i>kwasy:</i> 3-metyloglutakonowy, 3-hydroksyzomasłowy, 3-hydroksyzowalerianowy, 4- hydroksyfenylopirogronowy, bursztynowy, 3-hydroksy-3- metylowalerianowy, akonitowy, octowy	mocz	hydroliza, ekstrakcja rozpuszczalnikowa octan etylu, derywatywacja: silylacja	GC-MS LC-MS/MS	p < 0,05	[22]	
9	<i>kwasy:</i> 9-(9Z-oktadecenoyloksy)- oktadekanowy, DL-2- hydroksystearynowy, 7(S),17(S)-dihydroksy- 8(E),10(Z),13(Z),15(E),19(Z)- dokozapentanowy	osocze	ekstrakcja rozpuszczalnikowa ACN:MeOH	LC-MS/MS	R <sup>2</sup> 0,945 Q <sup>2</sup> 0,78 p < 0,005	[23]	
10	1-metyloguanidyna, N $\alpha$ -acetylo-L-arginina, siarczan indoksyli, kwas 3-indoloctowy	mocz	odwirowanie, rozcieńczenie	LC-MS/MS	R <sup>2</sup> > 0,999 zakres liniowości: 20-48000 ng/ml LOQ 20-480 ng/ml LOD 1,9- 15,8 ng/ml	[24]	

GC-MS – chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas; p – wartość prawdopodobieństwa testowego; MeOH – alkohol metylowy; AUC ROC – pole pod wykresem krzywej ROC; 5-HT – 5-hydroksytryptamina; HPLC – wysokosprawną chromatografię cieczową; EtOH – alkohol etylowy; R<sup>2</sup> – współczynnik determinacji; Q<sup>2</sup> – współczynnik korelacji; LOD – granica wykrywalności; LOQ – granica oznaczalności; NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego; LC-MS – chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas; LC-MS/MS – chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas; CV – współczynnik zmienności; HVA – kwas homowaniliny.

### 3. METABOLITY W CHOROBIE PARKINSONA

W 1817 roku James Parkinson opisał charakterystyczne objawy tej choroby, takie jak drżenie spoczynkowe, pochylona postawa ciała, a także sztywność i zwiększone napięcie mięśni oraz bradykinezja [25,26]. Choroba Parkinsona jest chorobą neurodegeneracyjną ośrodkowego układu nerwowego charakteryzującą się postępującą utratą neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej i wytwarzaniem ciałek Lewy'ego [27-29], a także agregacją  $\alpha$ -synukleiny, która wywołuje neuroto-

toksyczność neuronów dopaminergicznych. Neurony dopaminergiczne są podatne na degenerację ze względu na rozległe rozgałęzienia i znaczną ilość energii potrzebną do przekazywania sygnałów nerwowych [30]. Ich utrata powoduje postępujące upośledzenie kontroli motorycznej, co jest podstawową cechą kliniczną tej choroby. Typowe objawy ruchowe pojawiają się w momencie, gdy degradacji ulegnie ponad 60% komórek dopaminergicznych [29]. Nie ma testu pozwalającego na wczesne rozpoznanie choroby, jeszcze przed pojawieniem się objawów [31]. Rozpoznanie stawia się najczęściej na podstawie obecności lub braku charakterystycznych objawów ruchowych. Ze względu na postępującą neurodegenerację u pacjentów z chorobą Parkinsona obserwuje się objawy niemotoryczne, takie jak zaburzenia czucia i snu, zmiany zachowania, otępienie, depresja, psychoza, lęk i zmęczenie [29]. Na Rysunku 3 schematycznie przedstawiono charakterystykę choroby Parkinsona.

Rozróżnia się idiopatyczną postać choroby Parkinsona oraz zespoły parkinsonowskie. Idiopatyczną formę choroby o nieznannej przyczynie obserwuje się u około 90% pacjentów. Charakteryzuje się ona spowolnieniem ruchowym, drżeniem spoczynkowym, sztywnością mięśni i zaburzeniami postawy. Rozpoznanie tej formy potwierdza dobra i długotrwała odpowiedź pacjenta na leczenie dopaminergiczne, jak również występowanie dyskinez płasawicznych w przebiegu leczenia preparatami L-dopy. Zespoły parkinsonowskie mogą wykazywać niektóre cechy kliniczne idiopatycznej formy choroby Parkinsona, w tym bradykinezę i sztywność. Charakteryzują się szybszą dynamiką narastania objawów, nieobecnością dyskinez i brakiem lub słabą odpowiedzią pacjenta na stosowane leczenie dopaminergiczne. Z tego względu dla tej formy choroby nie ma skutecznego leczenia. Obserwuje się nieprawidłowości w zakresie presynaptycznego białka  $\alpha$ -synukleiny lub białka tau. Zespoły parkinsonowskie są spowodowane przez nieznanne procesy neurodegeneracyjne, uszkodzenia naczyniowe, czynniki genetyczne, toksyny, zaburzenia metaboliczne lub leki [32-34].



Rysunek 3. Charakterystyka choroby Parkinsona  
Figure 3. Characteristics of Parkinson's disease

Do dziś etiologia choroby Parkinsona nie jest dobrze poznana. Do głównych mechanizmów patologicznych choroby zalicza się utratę neuronów dopaminergicznych, występowanie dysfunkcji mitochondriów, stres oksydacyjny związany z uszkodzeniem mechanizmów antyoksydacyjnych, jak również aktywacji mikrogleju i synukleinopatii, które przyczyniają się do śmierci komórek nerwowych [35]. Coraz częściej wskazuje się na różnego rodzaju interakcje pomiędzy wiekiem, czynnikami środowiskowymi i genetycznymi w rozwoju choroby [36]. Wymienia się również dysbiozę mikrobiomu jelitowego, która jest zaangażowana w rozwój choroby poprzez oś mikrobiom-jelita-mózg [36-39].

Odkrywanie nowych markerów diagnostycznych czy prognostycznych odbywa się dzięki zastosowaniu technik „omics”, głównie genomiki, metabolomiki, proteomiki i lipidomiki. Techniki te wykorzystywane są także do diagnozowania, wyjaśniania i dążenia do lepszego zrozumienia mechanizmów patofizjologicznych danej choroby czy zaburzenia [36]. Obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania wykorzystaniem technik metabolomicznych w badaniach nad chorobą Parkinsona. Badania te umożliwiają głębsze zrozumienie choroby poprzez szersze spojrzenie na indukowane przez nią zmiany biochemiczne zachodzące w organizmie. Ponadto umożliwiają diagnozę choroby we wczesnym jej stadium, przed wystąpieniem pierwszych, charakterystycznych objawów, a także mogą być pomocne w odkrywaniu potencjalnych markerów. Poszukiwanie nowych markerów biologicznych do wczesnego rozpoznania, ale także do przewidywania przebiegu choroby, oceny skuteczności leczenia możliwe jest dzięki wykorzystaniu technik separacyjnych stosowanych w badania metabolomicznych [29]. W Tabeli 2 zostały

zestawione najczęściej oznaczane wskaźniki diagnostyczne w chorobie Parkinsona z zastosowaniem technik chromatograficznych.

Tabela 2. Potencjalne biomarkery choroby Parkinsona oznaczane w płynach ustrojowych osób badanych z wykorzystaniem technik chromatograficznych

Table 2. Potential biomarkers of Parkinson's disease determined in body fluids of study subjects using chromatographic techniques

L.p.	Metabolity	Matryca	Przygotowanie próbek do analizy	Stosowana technika chromatograficzna	Parametry walidacyjne /statystyczne	Lit.
1	L-3-metoksytyrozyna, kwas akonitowy, L-metionina, 13-docosenamid, kwas hipurowy, kwas linolowy	osocze	ekstrakcja rozpuszczalnikowa a ACN:ISO:H <sub>2</sub> O (3:3:2, v/v/v), derywatywacja: metoksylacja, silylacja	GC-TOFMS	p < 0,05 AUC 0,975	[40]
2	O-metyloguanozyna, N6-metylo-2'-deoksyadenozyna, 1-metyloguanozyna, 1-metyloguanina, 7-metyloguanina, 3-metyloguanina, 7-metyloguanozyna	mocz	ekstrakcja rozpuszczalnikowa a ACN	LC-MS/MS	p < 0,05 R <sup>2</sup> > 0,995 LLOQ 0,5 – 100 ng/ml CV 0,2 – 4,3%	[41]
3	kwas 3, 4 – dihydroksyfenylooctowy, HVA	tkanki mózgu	jednoczesna ekstrakcja i derywatywacja: ACN, chlorek sulfonowy rodaminy B, bromobenzen	LC-MS/MS	kwas 3, 4 – dihydroksyfenylooctowy LOD 0,003 nmol/l LOQ 0,010 nmol/l CV 4,7 – 7,7% HVA LOD 0,004 nmol/l LOQ 0,015 nmol/l CV 4,0 – 7,5%	[42]
4	kwas kynureninowy, 5-HIAA, kwas glutaminowy, kwas γ-aminobutanowy	surowica krwi	odbiałczanie i ekstrakcja rozpuszczalnikowa TFA	LC-MS/MS	LOD 2,64 nmol/l LOQ 5,29 nmol/l	[43]
5	LPA, hipoksantyna, kwas ferulowy	surowica krwi	ekstrakcja rozpuszczalnikowa ACN, H <sub>2</sub> O/ACN (1:1, v/v)	LC-ESI-QTOF	R <sup>2</sup> 0,73 Q <sup>2</sup> 0,54 p < 0,05	[44]
6	L-ornityna, N-acetylo-putrescyna, N-acetylo-kadaweryna	płyn mózgowo-rdzeniowy	odbiałczanie MeOH	LC-MS/MS	AUC ROC 0,897	[45]
7	kwas octowy, kwas propionowy, kwas 2,3,4-trihydroksybutanowy	osocze	ekstrakcja rozpuszczalnikowa MeOH, derywatywacja: metoksylacja, silylacja	GC-MS	AUC ROC 0,981 p < 0,001	[46]

8	kwasy dekanowy (FFA 10:0), kwasy laurynowy (FFA 12:0), kwasy 3-indolooctowy, fenyloacetylo-L-glutamina	osocze	odbiałczanie MeOH/H <sub>2</sub> O (1:3, v/v)	LC-MS	R <sup>2</sup> 0,758 Q <sup>2</sup> 0,594 AUC ROC 0,981 p < 0,001	[47]
9	kwasy palmitynowy, kwasy oleinowy, kwasy stearynowy, mioinozytol, sorbitol, kwasy chinolinowy	osocze	odbiałczanie MeOH/EtOH (1:1, v/v)	LC-MS/MS	AUC ROC > 0,7 p < 0,05	[48]
10	kwasy 3-indolooctowy	mocz	odbiałczanie MeOH, zateżnienie	LC-MS/MS	zakres pomiarowy 150-200 ng/ml R <sup>2</sup> 0,991 p < 0,05 LOD 1,0 ng/ml LOQ 5,0 ng/ml	[49]

ACN – acetonitryl; ISO – alkohol izopropylowy; GC-TOFMS – chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas i analizatorem czasu przelotu; LC-MS/MS – chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas; p – wartość prawdopodobieństwa testowego; R<sup>2</sup> – współczynnik determinacji; LLOQ – dolna granica oznaczalności; CV – współczynnik zmienności; HVA – kwas homowanilinowy; LOD – granica wykrywalności; LOQ – granica oznaczalności; 5-HIAA – kwas 5-hydroksyindolooctowy; TFA – kwas trifluorooctowy; LPA – kwas lizofosfatydowy; LC-ESI-QTOF – chromatograf cieczowy sprzężony z analizatorem typu kwadrupol – analizator czasu przelotu z jonizacją przez elektrorozpraszanie; Q<sup>2</sup> – współczynnik korelacji; MeOH – alkohol metylowy; AUC ROC – pole pod wykresem krzywej ROC.

## UWAGI KOŃCOWE

Analiza metabolitów staje się kluczowym narzędziem w naukach przyrodniczych i medycznych, umożliwiającym zrozumienie nie tylko metabolizmu, ale także poznanie wpływu metabolitów na zdrowie oraz powiązanie ich z różnymi chorobami. Wśród nich niewątpliwie znajdują się choroby i zaburzenia neurologiczne, takie jak choroba Parkinsona czy autyzm. Na całym świecie trwają nieustanne badania koncentrujące się na wyjaśnieniu nieprawidłowości zachodzących w ludzkim organizmie, które mogą być pośrednią, bądź bezpośrednią przyczyną rozwoju zaburzeń i chorób. Działania te prowadzą w kierunku typowania nowych markerów oraz rozwijania nowoczesnych procedur analitycznych, które pozwalają na ich skuteczną identyfikację oraz ilościowe oznaczenie. Poszukiwanie nowych wskaźników diagnostycznych staje się możliwe dzięki zastosowaniu technik chromatograficznych, które stanowią potężne narzędzie w badaniach nad chorobami neurocywilizacyjnymi, umożliwiając identyfikację biomarkerów, analizę neuroprzekazników oraz badania nad skutecznością stosowanych terapii. Ich zastosowanie przyczynia się do lepszego zrozumienia patogenezы tych chorób oraz do opracowywania nowych strategii diagnostycznych i terapeutycznych.

## PODZIĘKOWANIE

Współautorka dr inż. Paulina Gałarek składa podziękowania Komitetowi Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk oraz Firmie Altium International Sp. z o.o. za przyznanie nagrody w konkursie za najlepszą pracę doktorską z zakresu chemii analitycznej w kategorii najlepsza praca doktorska związana z rozwojem technik rozdzielania (edycja 2023).

## PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] A.K. Kosmides, K. Kamisoglu, S.E. Calvano, S.A. Corbett, I.P. Androulakis, *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, 2013, **41(3)**, 205.
- [2] Q. Liang, C. Wang, B. Li, A-H. Zhang, *Pharmacogn. Mag.*, 2015, **11(43)**, 586.
- [3] E.J. Want, I.D. Wilson, H. Gika, G. Theodoridis, R.S. Plumb, J. Shockcor, E. Holmes, J.K. Nicholson, *Nat. Protoc.*, 2010, **5(6)**, 1005.
- [4] P. Emond, S. Mavel, N. Aïdoud, L. Nadal-Desbarats, F. Montigny, F. Bonnet-Brilhault, C. Barthélémy, M. Merten, P. Sarda, F. Laumonier, P. Vourc'h, H. Blasco, C.R. Andres, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, **405**, 5291.
- [5] B. Dieme, S. Mavel, H. Blasco, G. Tripi, F. Bonnet-Brilhault, J. Malvy, C. Bocca, C.R. Andres, L. Nadal-Desbarats, P. Emond, *J. Proteome Res.*, 2015, **14(12)**, 5273.
- [6] T. Bitar, S. Mavel, P. Emond, L. Nadal-Desbarats, A. Lefèvre, H. Mattar, M. Soufia, H. Blasco, P. Vourc'h, W. Hleihel, C.R. Andres, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 2018, **152**, 57.
- [7] J. Kałużna-Czaplińska, J. Józwik, *Med. Rodz.*, 2013, **2**, 63.
- [8] J.M. Holler, S.P. Vorce, J.L. Knittel, B. Malik-Wolf, B. Levine, T.Z. Bosy, *J. Anal. Toxicol.*, 2014, **38**, 295.
- [9] Y. Tikunov, A. Lommen, C.H.R. de Vos, H.A. Verhoeven, R.J. Bino, R.D. Hall, A.G. Bovy, *Plant Physiol.*, 2005, **139**, 1125e1137.
- [10] H. Kaspar, K. Dettmer, W. Gronwald, P.J. Oefner, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2008, **870**, 222.
- [11] M.M. Acanski, D.N. Vujčić, *Food Chem.*, 2014, **145**, 743.
- [12] H.G. Gika, I.D. Wilson, G.A. Theodoridis, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2014, **966**, 1-6.
- [13] International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, ICD-10. World Health Organization, 2009.
- [14] F. Gevi, A. Belardo, L. Zolla, *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis. Dis.*, 2020, **1866(10)**, 165859.
- [15] J. Kałużna-Czaplińska, *Clin Biochem.*, 2011, **44(8-9)**, 686.
- [16] J. Kałużna-Czaplińska, E. Żurawicz, W. Struck, M. Markuszewski, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, 2014, **966**, 70.
- [17] M. Guo, J. Zhu, T. Yang, X. Lai, X. Liu, J. Liu, J. Chen, T. Li, *Brain Res Bull.*, 2018, **137**, 35.
- [18] C. Li, K. Shen, L. Chu, P. Liu, Y. Song, X. Kang, *J Clin Neurosci.*, 2018, **54**, 45.
- [19] T. Bitar, S. Mavel, P. Emond, L. Nadal-Desbarats, A. Lefèvre, H. Mattar, M. Soufia, H. Blasco, P. Vourc'h, W. Hleihel, C.R. Andres, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2018, **152**, 57.
- [20] B. Bobrowska-Korczak, P. Gałarek, A. Rosiak, J. Giebułtowicz, J. Kałużna-Czaplińska, *Anal. Biochem.*, 2019, **571**, 62.
- [21] Z.U.N. Khan, P. Chand, H. Majid, S. Ahmed, A.H. Khan, A. Jamil, S. Ejaz, A. Wasim, K.A. Khan, L. Jafri, *BMC Neurol.*, 2022, **22(1)**, 101.

- [22] E. Sertoglu, A.R. Balik, U.G. Duman, M.E. Mavis, M. Arslan, Y. Yildiz, J. Batu, A. Olgac, Ö. Hekim, *Res. Autism Spectr. Disord.*, 2023, **106**, 102198.
- [23] J. Liu, Y. Tan, F. Zhang, Y. Wang, S. Chen, N. Zhang, W. Dai, L. Zhou, J-C. Li, *MedComm.*, 2020, **5(3)**, e488.
- [24] D. Olesova, J. Galba, J. Piestansky, H. Celusakova, G. Repiska, K. Babinska, D. Ostatnikova, S. Katina, A. Kovac, *Metabolites.*, 2020, **10(11)**, 443.
- [25] J. Parkinson, *Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, 2002, **14**, 223.
- [26] B. Hurwitz, *Int. Rev. Neurobiol.*, 2017, **133**, 3.
- [27] X. Chen, C. Xie, L. Sun, J. Ding, H. Cai, *PLoS ONE.*, 2015, **10(8)**, e0136612.
- [28] P. Gątarek, M. Pawełczyk, K. Jastrzębski, A. Głąbiński, J. Kałużna-Czaplińska, *Trends Anal. Chem.*, 2019, **118**, 292.
- [29] C. Gonzalez-Riano, J. Saiz, C. Barbas, A. Bergareche, J.M. Huerta, E. Ardanaz, M. Konjevod, E. Mondragon, M.E. Erro, M.D. Chirlaque, E. Abilleira, F. Goñi-Irigoyen, P. Amiano, *NPJ Park. Dis.*, 2021, **7**, 73.
- [30] M. Mamelak, *Neurol.*, 2018, **7**, 5.
- [31] P. Maher, *Food Funct.*, 2017, **8**, 3033.
- [32] D.W. Dickson, *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.*, 2012, **2**, a009258.
- [33] P. Srivanitchapoom, Y. Pitakpatapee, A. Suengtaworn, *Neurol. India.*, 2018, **66(7)**, 15.
- [34] L. Marsili, G. Rizzo, C. Colosimo, *Front Neurol.* 2018, **9**, 156.
- [35] M. Lemieszewska, A. Zabłocka, J. Rymaszewska, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2019, **73**, 256.
- [36] X. Li, X. Fan, H. Yang, Y. Liu, *Mol. Neurobiol.*, 2022, **59(2)**, 1041.
- [37] F. Zhu, C. Li, J. Gong, W. Zhu, L. Gu, N. Li, *Dig. Liver Dis.*, 2019, **51(1)**, 38.
- [38] M. Elfil, S. Kamel, M. Kandil, B.B. Koo, S.M. Schaefer, *Mov. Disord.*, 2020, **35(6)**, 921.
- [39] V. Metta, V. Leta, K.R. Mrudula, L.K. Prashanth, V. Goyal, R. Borgohain, G. Chung-Faye, K.R. Chaudhuri, *Neurol.*, 2022, **269(3)**, 1154.
- [40] P. Gątarek, J. Sekulska-Nalewajko, B. Bobrowska-Korcza, M. Pawełczyk, K. Jastrzębski, A. Głąbiński, J. Kałużna-Czaplińska, *Biomedicines.*, 2022, **10(12)**, 3005.
- [41] P. Gątarek, J. Kałużna-Czaplińska, M. Pawełczyk, K. Jastrzębski, J. Giebułtowicz, A. Głąbiński, B. Bobrowska-Korcza, *Molecules.*, 2020, **25(21)**, 4959.
- [42] Y. He, X-E Zhao, S. Zhu, N. Wei, J. Sun, Y. Zhou, S. Liu, Z. Liu, G. Chen, Y. Suo, J. You, *J Chromatogr A.*, 2016, **1458**, 70.
- [43] L.S. Wang, M-D Zhang, X. Tao, Y-F Zhou, X-M Liu, R-L Pan, Y-H Liao, Q. Chang, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, 2019, **1112**, 24.
- [44] W.T. Santos, A. Katchborian-Neto, G.S. Viana, M.S. Ferreira, L.C. Martins, T.C. Vale, M. Murgu, D.F. Dias, M.G. Soares, D.A. Chagas-Paula, A.C.C. Paula, *ACS Chem. Neurosci.*, 2024, **15(17)**, 3168.
- [45] P.A. LeWitt, J. Li, K-H Wu, M. Lu, *Neurobiol. Dis.*, 2023, **177**, 105962.
- [46] A. Qi, L. Liu, J. Zhang, S. Chen, S. Xu, Y. Chen, L. Zhang, C. Cai, *Mol Neurobiol.*, 2023, **60(5)**, 2619.
- [47] Y. Shao, T. Li, Z. Liu, X. Wang, X. Xu, S. Li, G. Xu, W. Le, *Mol Neurodegener.*, 2021, **16(1)**, 4.
- [48] M. Konjevod, J. Sáiz, C. Barbas, A. Bergareche, E. Ardanaz, J.M. Huerta, A. Vinagre-Aragón, M.E. Erro, M.D. Chirlaque, E. Abilleira, J.M. Ibarluzea, P. Amiano, *Front Neurol.*, 2022, **13**, 844841.
- [49] S.H. Chung, D. Yoo, T-B Ahn, W. Lee, J. Hong, *Pharmaceuticals (Basel).*, 2023, **16(10)**, 1495.





**Laureaci nagrody ufundowanej przez Anchem  
za najlepszą rozprawę doktorską w dziedzinie  
spektrometrii mas**

---

---



## ANALIZA LIPIDOMICZNA W DIAGNOSTYCE GUZÓW MÓZGU

### LIPIDOMIC ANALYSIS IN BRAIN TUMOR DIAGNOSIS

**Joanna Bogusiewicz<sup>1</sup>, Katarzyna Burlikowska<sup>1</sup>,  
Bogumiła Kupcewicz<sup>2</sup>, Kamil Łuczykowski<sup>1</sup>, Karol  
Jaroch<sup>1</sup>, Paulina Zofia Goryńska<sup>1</sup>, Krzysztof Goryński<sup>1</sup>,  
Marcin Birski<sup>4</sup>, Jacek Furtak<sup>3,4</sup>, Dariusz Paczkowski<sup>4,5</sup>,  
Marek Harat<sup>3,4</sup>, Janusz Pawliszyn<sup>6</sup>, Barbara Bojko<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>*Katedra Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu*

<sup>2</sup>*Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu*

<sup>3</sup>*Wydział Medyczny, Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich*

<sup>4</sup>*Klinika Neurochirurgii, 10 Wojskowy Szpital Kliniczny z Polikliniką w Bydgoszczy*

<sup>5</sup>*Klinika Neurochirurgii i Neurologii, Szpital Uniwersytecki nr 2 im dr. Jana Biziela w Bydgoszczy*

<sup>6</sup>*Wydział Chemii, Uniwersytet w Waterloo, Ontario, Kanada*

\*e-mail: [bbojko@cm.umk.pl](mailto:bbojko@cm.umk.pl)

---

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

Przestrzenne profilowanie ludzkiej tkanki mózgowej in vivo

Uwagi końcowe

Podziękowanie


Piśmiennictwo cytowane

---

---


**Dr Joanna Bogusiewicz** – absolwentka analityki medycznej na Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Aktualnie pracownik Katedry Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej tejże uczelni. Tytuł doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne uzyskała w 2023r. Zainteresowania naukowe obejmują opracowywanie nowych protokołów analitycznych opartych o mikroekstrakcję do fazy stałej do analizy próbek biologicznych w celu poszukiwania metabolitów mogących pełnić rolę biomarkerów w neuroonkologii.



 <https://orcid.org/0000-0003-4429-6854>


**Dr inż. Katarzyna Burlikowska** – absolwentka Wydziału Zootechnicznego Akademii Techniczno-Rolniczej w Bydgoszczy (obecnie Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich). Stopień doktora nauk rolniczych uzyskała w 2005. Od 2017 roku kieruje Zwierzętarnią należącą do Katedry Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK w Toruniu.



 <https://orcid.org/0000-0001-8030-6226>


**Dr hab. Bogumiła Kupcewicz, prof. UMK** – absolwentka chemii na UMK w Toruniu, uzyskała tytuł doktora i doktora habilitowanego nauk farmaceutycznych na Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Od 2002 r. pracuje na Wydziale Farmaceutycznym, a od 2019 pełni funkcję kierownika Katedry Chemii Nieorganicznej i Analitycznej. Jej zainteresowania naukowe to m. in. wykorzystanie metod statystycznych i chemometrycznych w analizie danych uzyskanych w badaniach metabolomicznych i lipidomicznych m.in. guzów mózgu czy endometriozy, oraz badania zależności jakościowych i ilościowych struktura-aktywność biologiczna (SAR i QSAR) oraz struktura-właściwości fizykochemiczne (QSPR) związków z różnych grup chemicznych.



 <https://orcid.org/0000-0002-4480-7338>


**Mgr Kamil Łuczykowski** - absolwent Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu na kierunku analityka medyczna. Aktualnie pracownik Katedry Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej CM UMK. Zainteresowania naukowe obejmują opracowywanie nowych protokołów analitycznych opartych na mikroekstrakcji do fazy stałej do analizy próbek biologicznych w celu poszukiwania metabolitów mogących pełnić rolę biomarkerów oceny jakości organów przeznaczonych do transplantacji



 <https://orcid.org/0000-0001-7254-0864>

**Dr hab. Karol Jaroch, prof. UMK** - absolwent Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu na kierunkach Farmacja oraz Biotechnologia Medyczna. Aktualnie pracownik Katedry Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej CM UMK. Zainteresowania naukowe obejmują stosowanie technik mikroekstrakcyjnych, głównie mikroekstrakcji do fazy stałej, w analizie hodowli komórkowych *in vitro* oraz badania cytotoksyczności nowych związków o potencjale przeciwnowotworowym.



 <https://orcid.org/0000-0003-0189-2509>

---

**Dr Marcin Birski** – absolwent Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi. Obecnie ordynator w Klinice Neurochirurgii 10 Wojskowego Szpitala Klinicznego w Bydgoszczy. Zainteresowania naukowe obejmują głównie małoinwazyjne metody diagnostyki i leczenia chorób mózgu oraz choroby naczyń mózgu.



<https://orcid.org/0000-0001-6011-7559>

---

**Dr hab. Jacek Furtak, prof. PBS** – absolwent Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi. Aktualnie Kierownik Kliniki Neurochirurgii 10 Wojskowego Szpitala Klinicznego w Bydgoszczy. Zainteresowania naukowe obejmują głównie neuroonkologię i aspekty genetyczne chorób nowotworowych mózgu.



<https://orcid.org/0000-0001-9599-4156>

---

**Dr Dariusz Paczkowski** – Ordynator Oddziału Neurochirurgii Dziecięcej w Wojewódzkim Szpitalu Dziecięcym w Bydgoszczy. Wieloletni pracownik Kliniki Neurochirurgii 10 Wojskowego Szpitala Klinicznego z Polikliniką w Bydgoszczy.

---

**Prof. dr hab. Marek Harat** – neurochirurg, wieloletni kierownik Kliniki Neurochirurgii 10 Wojskowego Szpitala Klinicznego z Polikliniką w Bydgoszczy. Główne zainteresowania badawcze Profesora Harata dotyczą neuroonkologii i neurochirurgii funkcjonalnej. W neuroonkologii ostatnie publikacje związane są z diagnostyką glejaka wielopostaciowego na podstawie skanowania PET.



<https://orcid.org/0000-0002-4043-2567>

---

**Prof. Janusz Pawliszyn** – absolwent Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. Profesor Pawliszyn jest twórcą techniki mikroekstracji do fazy stałej oraz jest liderem grupy naukowej na Uniwersytecie Waterloo w Waterloo, Ontario w Kanadzie. Zainteresowania badawcze Profesora Pawliszyna związane są z ulepszeniem technologii opartych o mikroekstrację do fazy stałej, poszerzeniem portfolio jej zastosowań a także rozwojem ekologicznych rozwiązań analitycznych na etapie preparatyki oraz analizy próbki.

---

**Prof. dr hab. Barbara Bojko** - absolwentka analityki medycznej na Śląskim Uniwersytecie Medycznym i wieloletni pracownik tej uczelni. W latach 2009-2015 związana z University of Waterloo w Kanadzie, gdzie pracowała w grupie prof. Janusza Pawliszyna. Po powrocie do Polski została kierownikiem Katedry Farmakodynamiki i Farmakologii Molekularnej CM UMK. Praca naukowa Profesor Bojko związana jest przede wszystkim z aplikacją metod mikroekstracyjnych w diagnostyce medycznej i badaniach biomedycznych.



<https://orcid.org/0000-0003-3971-9816>

---

**ABSTRACT**

---

Fast and accurate diagnosis of brain tumors is a critical step in effective patient therapy. However, challenges arise due to the complex anatomy of the brain and the late manifestation of symptoms, making diagnosis often difficult. Therefore, interdisciplinary research at the intersection of analytical chemistry, medical diagnostics, and chemical engineering is essential to develop new diagnostic approaches that facilitate the analysis of neoplastic changes in the brain. One of many promising technologies is solid-phase microextraction (SPME), also known as chemical biopsy. This method allows for the extraction of compounds from biological samples and solid ones such as tumors. However, selecting potential biomarkers is equally important to developing and optimizing appropriate analytical tools. Lipids have recently gained attention for their significant roles in cancer processes. Thus, the applicability of SPME probes in the analysis of brain tumor lipidome was assessed.

Chemical biopsy was used in the analysis of brain tumors, revealing that the lipidomic profiles of benign meningiomas significantly differed from those obtained from malignant lesions, such as gliomas. Furthermore, it was proven that sampling using the SPME probe was reliable. Studies focusing on gliomas demonstrated that the lipidome of these brain tumors varied depending on the grade of malignancy and the status of IDH1/2 mutations. Moreover, it was also proven that acylcarnitines, which take part in lipid oxidation, were altered. Their content in neoplastic tissue increased along with a worse clinical prognosis, specifically in lesions with a higher degree of malignancy and in samples without mutations in the IDH1/2 gene.

It was also reported that SPME probes could be a helpful method for probing brain during neurosurgical procedures from two brain structures in replicates simultaneously. As a result, extracting a set of metabolites with a wide range of physicochemical properties was possible. Most of them were lipids with interesting patterns in studied structures. However, due to the small cohort of patients and high diversity of samples, a detailed discussion on the biological role and implications to the spatial distribution was not conducted.

To sum up, solid-phase microextraction probes were useful in brain tumors lipidomic and acylcarnitine profiling of meningiomas and gliomas, considering malignancy degree and genotype. It has also been observed that chemical biopsy can serve as a valuable tool in *in vivo* brain research, indicating future directions for studies of brain tumors during neurosurgical procedures.

**Keywords:** solid-phase microextraction, brain tumor, diagnostics, lipidomics, mass spectrometry

**Słowa kluczowe:** mikroekstrakcja do fazy stałej, guz mózgu, diagnostyka, lipidomika, spektrometria mas

---

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

CACT	– <i>ang. Carnitine-acylcarnitine translocase</i> , Translokaza karnityno-acylokarnitynowa
CBS-MS	– <i>ang. Coated blade spray mass spectrometry</i>
CPT	– <i>ang. Carnitine palmitoyltransferase</i> , Palmitoilotransferaza karnitynowa
CT	– <i>ang. Computed tomography</i> Tomografia komputerowa
DESI-MS	– <i>ang. Desorption electrospray ionization mass spectrometry</i> , Desorpcyjna jonizacja przez elektrorozpylanie połączona ze spektrometrią mas
ESI	– <i>ang. Electrospray Ionization</i> , Jonizacja przez elektrorozpylenie
FA	– <i>ang. Fatty acids</i> , Kwasy tłuszczowe
FAO	– <i>ang. Fatty acids oxidation</i> , Utlenianie kwasów tłuszczowych
HGG	– <i>ang. High grade glioma</i> , Wysoko-złośliwy glejak
HILIC	– <i>ang. Hydrophilic interaction liquid chromatography</i> , Chromatografia oddziaływań hydrofilowych
HLB	– <i>ang. Hydrophilic-lipophilic balance</i> , Równowaga hydrofilowo-lipofilowa
HRMS	– <i>ang. High resolution mass spectrometry</i> , Wysokorozdzielcza spektrometria mas
IDH	– <i>ang. Isocitrate dehydrogenase</i> , Dehydrogenaza izocytrynianowa
IDHm	– <i>ang. IDH mutant</i> , Mutacja w IDH
IDHw	– <i>ang. IDH wildtype</i> , IDH typu dzikiego
LC	– <i>ang. Liquid chromatography</i> Chromatografia cieczowa
LCAC	– <i>ang. Long chains acylcarnitines</i> , Acylokarnityny o długim łańcuchu acylowym
LCAD	– <i>ang. Long-chain acylcarnitines dehydrogenase</i> , Dehydrogenaza długołańcuchowych acylo-coA
LGG	– <i>ang. Low grade glioma</i> , Nisko-złośliwy glejak
LPC	– <i>ang. Lysophosphatidylcholine</i> , Lisofofosfatydylocholina
MOI-MS	– <i>ang. Microfluidic open interface mass spectrometry</i>
MRI	– <i>ang. Magnetic resonance imaging</i> , Obrazowanie rezonansem magnetycznym
MS	– <i>ang. Mass spectrometry</i> , Spektrometria mas
PC	– <i>ang. Glycerophosphocholine</i> , Fosfatydylocholina
PE	– <i>ang. Glycerophosphoethanolamine</i> , Fosfatydyloctanoloamina
PET	– <i>ang. Positron emission tomography</i> , Pozytonowa tomografia emisyjna
PG	– <i>ang. Glycerophosphoglycerol</i> , Fosfatydyloglicerol
PS	– <i>ang. Glycerophosphoserine</i> , Fosfatydyloseryna
REIMS	– <i>ang. Rapid evaporative ionization mass spectrometry</i> , Szybka ewaporacyjno-jonizacyjna spektrometria mas
RPLC	– <i>ang. Reversed phase liquid chromatography</i> , Chromatografia odwróconych faz
SCAC	– <i>ang. Short acylcarnitine chains</i> Acylokarnityny o krótkim łańcuchu acylowym
SPME	– <i>ang. Solid phase microextraction</i> , Mikroekstrakcja do fazy stałej
WHO	– <i>ang. World Health Organization</i> , Światowa Organizacja Zdrowia

## WPROWADZENIE

Złośliwe pierwotne guzy mózgu są zmianami nowotworowymi o jednym z najwyższych współczynników śmiertelności [1]. Większość z nich jest sklasyfikowana jako glejaki, wśród których wyróżnia się wiele podtypów różnicowanych na podstawie badań histopatologicznych oraz występowania zmian genetycznych, takich jak mutacja w genie kodującym dehydrogenazę izocytrynianową 1/2 (IDH1/2) lub kodelecja chromosomu 1p/19q [2]. Leczenie guzów mózgu w większości przypadków opiera się na usunięciu zmiany nowotworowej z odpowiednimi marginesami. Podejście to często jest uzupełniane chemio- i/lub radioterapią. Rokowanie kliniczne pacjenta różni się w zależności od typu guza i stopnia jego złośliwości, jeśli jednak u pacjenta występuje glejak wielopostaciowy to czas przeżycia pacjenta wynosi kilka-kilkanaście miesięcy [3,4]. Niski współczynnik przeżycia i wysoki odsetek nawrotów są bezpośrednio związane z brakiem skutecznych metod diagnostycznych [5]. Wczesne wykrycie guzów mózgu stanowi wyzwanie ze względu na niespecyficzne objawy choroby oraz ich późną manifestację. W związku z tym ważne jest zbadanie nowych możliwości oferowanych przez badania translacyjne, które łączą medycynę, chemię analityczną i inżynierię chemiczną.

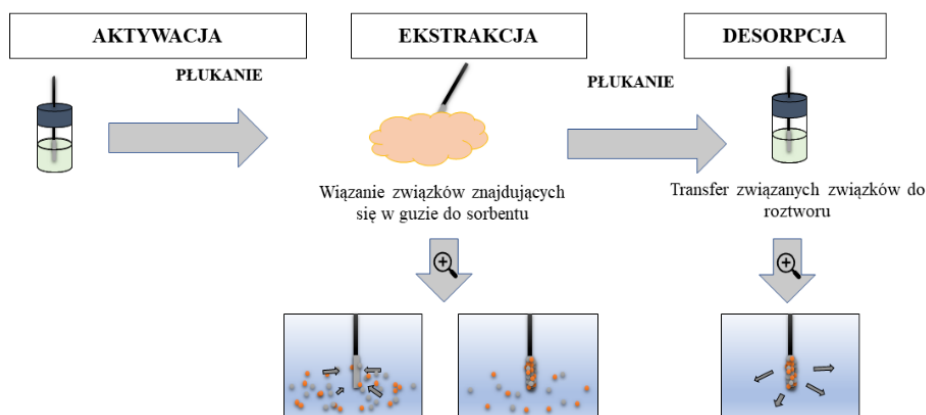
Zastosowanie „nauk omicznych”, takich jak genomika, metabolomika i lipidomika, może zapewnić użyteczne narzędzie do określania biomarkerów, które potencjalnie pomoże w wyborze i monitorowaniu zastosowanego podejścia terapeutycznego [6]. Lipidomika zajmuje się badaniem profilu lipidów, ich interakcji oraz funkcji w komórkach i tkankach [7]. Związki lipidowe pełnią różne istotne funkcje w komórce, tkance, organizmie, które mogą zmieniać się w trakcie karcynogenezy [7,8]. Do analizy tych zmian wykorzystywane są różnorodne platformy analityczne, w tym techniki oparte o spektrometrię mas, która umożliwia ich identyfikację. Należy jednak zauważyć, że próbki stałe, takie jak tkanki, wymagają odpowiedniego przygotowania przed analizą, co zazwyczaj wiąże się z procesami homogenizacji i ekstrakcji analitów z próbki badanej [9]. Te procedury są nie tylko czasochłonne, ale również utrudniają dalsze badania ze względu na trwałą modyfikację pobranego materiału biologicznego. W odpowiedzi na te wyzwania naukowcy pracują nad nowymi metodami, które eliminują konieczność homogenizacji [9]. Jedną z proponowanych technologii jest mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME), która w rzeczywistości umożliwia analizę tkanek bez wcześniejszego przygotowania.

Sonda SPME składa się z sorbentu opłaszczonego na najczęściej tytanowo-niklowym włóknie. Średnica sondy wynosi około 200  $\mu\text{m}$ , co czyni ją znacznie cieńszą od klasycznej igły do biopsji mózgu (ok. 1,8 mm) [10–12]. Zasada metody SPME opiera się na interakcji między analitami znajdującymi się w próbce a sorbentem aż do ustalenia się stanu równowagi, a czas ten jest różny w zależności od właściwości fizykochemicznych badanych analitów (Rys. 1). W przypadku badań biomedycznych optymalizacja czasu ekstrakcji powinna stanowić kompromis pomiędzy możliwym do zastosowania czasem a wydajnością ekstrakcji. W badaniach biomedycznych istotne jest także, że pobranie analitów z wykorzystaniem sond SPME nie powoduje zużycia próbki stąd też technika ta nazywana jest „biopsją chemiczną” [13]. Oprócz minimalnej inwazyjności podczas pobierania próbek, włókna SPME oferują kilka innych kluczowych



cech, które są przydatne w aplikacjach biomedycznych. Po pierwsze, biopsja chemiczna jest metodą niezubożającą, co oznacza, że w danych warunkach pobiera się tylko nieznaczną część wolnej frakcji analitów dzięki czemu nie dochodzi do zaburzenia szlaków metabolicznych w badanej tkance i możliwe jest wielokrotne pobieranie próbek w punktach czasowych [13]. Dodatkowo poprzez oddziaływanie analitu z sorbentem zahamowywany zostaje udział danego związku w przemianach biochemicznych regulowanych przez enzymy tkankowe, co umożliwi analizę nawet niestabilnych substancji [14]. Zwrócić uwagę także należy, że protokół biopsji chemicznej jest prosty i szybki. Podczas pobierania próbek sondę wprowadza się bezpośrednio do tkanki/narządu na określony czas, a następnie płucze wodą, aby usunąć potencjalne resztki tkanki lub płynów biologicznych, które mogą być niespecyficznie związane z sorbentem. Sondę można następnie przetransportować do laboratorium i przechowywać lub bezpośrednio poddać analizie instrumentalnej [10,15].

Opierając się o role lipidów w kancerogenezie oraz o doniesienia dotyczące aplikacji sond SPME w diagnostyce guzów mózgu celem niniejszego przeglądu literatury jest ocena użyteczności sond mikroekstrakcyjnych w lipidomicznej diagnostyce guzów mózgu.



Rysunek 1. Protokół mikroekstrakcji do fazy stałej.

Figure 1. Protocol of solid-phase microextraction.

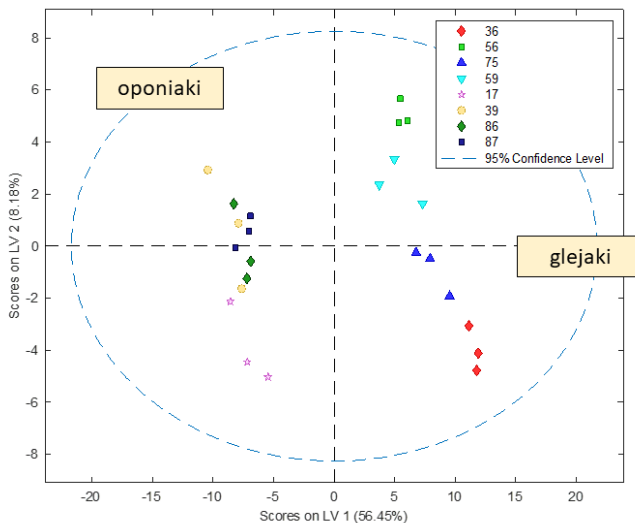
## 1. ANALIZA LIPIDOMU GUZÓW MÓZGU

Opracowanie szybkiej i precyzyjnej metody śródoperacyjnej do różnicowania zmian nowotworowych wciąż stanowi wyzwanie w medycynie laboratoryjnej. Kluczowe jest znalezienie i optymalizacja prostej oraz skutecznej platformy analitycznej, która umożliwi wybór związków charakterystycznych dla konkretnego rodzaju guza, jego stopnia złośliwości oraz genotypu [5]. Sondy SPME zostały zaproponowane jako przydatne narzędzie w profilowaniu metabolomicznym jak i lipidomicznym [16,17]. Ze względu na udział lipidów w wielu procesach biochemicznych dotyczących sygnalizacji komórkowej, funkcjonalności błony komórkowej, zapotrzebowania energetycznego szczególnie uwaga została poświęcona tym związkom [7,17].

Analizę lipidomiczną guzów mózgu z wykorzystaniem sond SPME raportowała Bogusiewicz i wsp. [17] Analizę instrumentalną przeprowadzono przy użyciu chromato-

grafii cieczerwowej połączonej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (LC-HRMS). W pierwszym etapie wykonano eksperyment, który miał na celu ocenę wiarygodności poboru próbek z heterogennej tkanki nowotworowej oraz przydatności zaproponowanej platformy analitycznej do różnicowania histologicznie różnych guzów, takich jak oponiaki i glejaki. Następnie przeprowadzono szczegółową analizę glejaków, koncentrując się na profilach lipidomicznych tych zmian w kontekście stopnia złośliwości, statusu mutacji w genie IDH1/2 oraz obecności kodelecji 1p/19q.

Zmiany nowotworowe charakteryzują się dużym zróżnicowaniem zarówno międzyosobniczym jak i wewnątrz guza na wielu poziomach, np. histologicznym, metabolomicznym, epigenetycznym [4]. Heterogenność ta stanowi poważny problem w badaniach, w których analizowane są jedynie niewielkie fragmenty zmian, co może wpływać na wiarygodność uzyskanych wyników i małą reprezentatywność wyniku. W związku z tym Bogusiewicz i wsp. podjęli się weryfikacji analiz wykonanych z wykorzystaniem sond SPME, które mają średnicę zaledwie 200  $\mu\text{m}$  i pozwalają na ekstrakcję analitów z wybranego, ograniczonego obszaru wokół włókna. Wprowadzono po 3 sondy do 8 guzów mózgu – 4 oponiaków i 4 glejaków [17]. Zaobserwowano, że profile lipidowe pobrane z danej zmiany są podobne i grupują się w zestawy odpowiadające określonemu typowi guza (Rys.2). Wyniki te sugerują, że uzyskany profil lipidowy z włókien wprowadzonych do konkretnego guza jest charakterystyczny dla tej zmiany, a profile analitów pobrane z danego guza wykazują ze sobą korelację. Wybór sondy z odpowiednio długim sorbentem, np. 7 mm wydaje się zatem korzystny do ekstrakcji związków z całej zmiany, co pozwala na uzyskanie uśrednionego profilu lipidomicznego. Dodatkowo należy wspomnieć, że w razie konieczności długość sorbentu na sondzie można dopasować do celu badania – długie pokrycie w ocenie uśrednionego lipidomu całej zmiany, a krótsze, gdy celem jest ocena składu lipidowego w różnych częściach zmiany.



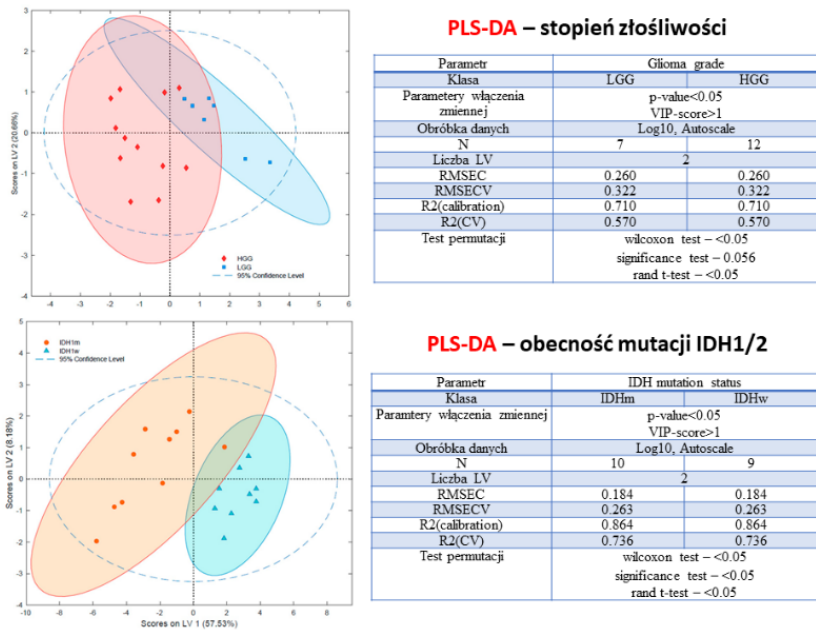
Rysunek 2. PCA dla oponiaków i glejaków z których pobierane były próbki w teście oceny wiarygodności wyników [17].

Figure 2. PCA for meningiomas and gliomas sampled in the outcome assessment test [17].

W pierwszej kolejności w celu przetestowania badanej platformy analitycznej do różnicowania tkanek idealnym byłoby różnicowanie tkanki zdrowej i nowotworowo zmienionej. Niestety ze względu na brak możliwości wycięcia zdrowej tkanki z mózgu pacjenta wstępne badania przedstawione przez Bogusiewicz i wsp. [17] opierały się o różnicowanie histologicznie różnych zmian: łagodnych oponiaków i złośliwych glejaków. Zaobserwowano, że lipidomy tych zmian nowotworowych różnił się co sugeruje, że testowana platforma analityczna może być użyteczna w ocenie guzów mózgu.

Prowadząc szczegółowe badania glejaków Bogusiewicz i wsp. [17] zaobserwowali, że guzy o różnym stopniu złośliwości posiadały różne profile lipidomiczne (Ryc. 3). Lizofosfolipidy (LPC), takie jak LPC P-16:0, LPC P-18:0 oraz LPC 18:2, były obecne w glejakach wysokozłośliwych (HGG) w ponad dwukrotnie wyższej ilości niż w glejakach niskozłośliwych (LGG). Zauważono również, że ilość SM 42:1;O2 była mniejsza w bardziej złośliwych zmianach. Analizy chemometryczne pozwoliły na wyselekcjonowanie tylko czterech potencjalnych związków lipidowych, z czego dla dwóch z nich udało się potwierdzić strukturę podczas fragmentacji (analiza MS/MS). Wśród tych związków znalazł się LPC P-16:0, którego poziom w HGG był dwa razy wyższy niż w LGG, oraz SM 42:1;O2, który był niższy w bardziej złośliwych zmianach. We wspomnianym doniesieniu na temat analizy lipidomicznej guzów mózgu raportowano także zróżnicowanie lipidomów glejaków o różnym statusie mutacji IDH1/2 (Ryc.3). Guzy bez mutacji charakteryzowały się znacznie zwiększoną ilością lizofosfolipidów niższym poziomem fosfatydylocholin (np. PC 32:1, PC 32:0, PC 36:1). Istotne było również to, że poziom fosfatydyloetanolamin był niższy w próbkach bez mutacji w genie IDH1/2 (IDHw) w porównaniu do tych z obecnością mutacji (IDHm). Sfingolipidy nie wykazywały większych zmian w zależności od statusu mutacji IDH1/2, jedynie SM 43:4;O2 oraz LacCer 42:2;O2 były obecne w wyższych stężeniach w próbkach bez mutacji IDH1/2. Dodatkowo, w analizie chemometrycznej udało się wyselekcjonować zestaw 16 potencjalnych związków lipidowych, które mogą być użyte do różnicowania glejaków na podstawie statusu mutacji IDH 1/2. Nie wykazano natomiast, aby profile lipidowe guzów mózgu o różnych statusach kodelekcji 1p/19q różniły się analizach chemometrycznych. Parametry walidacyjne dla takiego modelu były niesatysfakcjonujące. W związku z tym nie uzyskano zestawu lipidów, który umożliwiłby dyskryminację guzów w zależności od statusu kodelekcji 1p/19q.

Podsumowując, mimo ograniczonej grupy badanej, zauważono, że zarówno stopień złośliwości, jak i status mutacji IDH1/2 mogą wpływać na zmiany lipidomu guzów mózgu. Biopsja chemiczna może zatem być użytecznym narzędziem w ocenie tych zmian.



Rysunek 3. PLS-DA oraz parametry jego walidacji dla lipidomów glejaków o różnym stopniu złośliwości oraz statusie mutacji IDH1/2 (na podstawie [17])

Figure 3. PLS-DA and its validation parameters for glioma lipidomes with different malignancy grades and IDH1/2 mutation status (adapted from [17])

## 2. ANALIZA PROFILU ACYLOKARNITYN GUZÓW MÓZGU

Rozwój procesu nowotworowego wiąże się ze zwiększonym zapotrzebowaniem energetycznym komórek. W związku z tym wraz z rozwojem nowotworu dojść musi do zmian adaptacyjnych w szlakach metabolicznych aby dopasować je do zmieniającego się mikrośrodowiska [18]. Szeroko raportowaną modyfikacją metabolizmu jest efekt Warburga, polegający na nasilonej glikolizie w wyniku której dochodzi do wzrostu produkcji mleczanu nawet w warunkach tlenowych [19]. Najnowsze badania sugerują jednak, że zmiany w procesie utleniania kwasów tłuszczowych (FAO) mogą również odgrywać istotną rolę w gospodarce energetycznej komórek nowotworowych [19,20]. Oksydacja kwasów tłuszczowych regulowana jest przez enzymy odpowiedzialne za transport łańcuchów acylowych w mitochondriach, do białek tych zalicza się translokazę karnityno-acylokarnitynową (CACT), palmitoilotransferazę karnitynową 1 (CPT-1), palmitoilotransferazę karnitynową 2 (CPT-2) oraz dehydrogenazę długołańcuchowych acylo-CoA (LCAD) [19]. Aktywność i funkcje tych białek w nowotworach były szeroko badane, brakuje jednak nadal danych na temat profilowania metabolitów powstających w trakcie oksydacji lipidów czyli acylokarnityn [19].

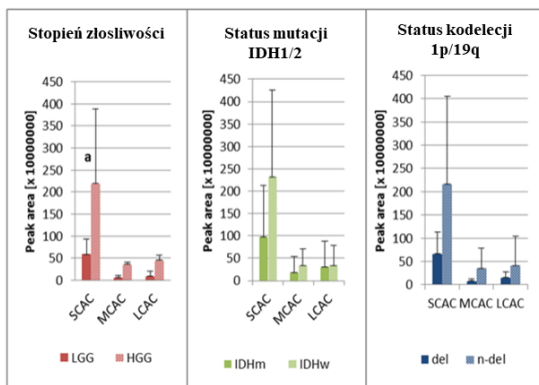
Badania przedstawione przez Bogusiewicz i wsp. [21] wykazały, że zastosowanie mikroekstrakcji do fazy stałej w połączeniu z platformą LC-HRMS umożliwiło wyekstrahowanie i analizę karnityny oraz jej 22 estrów. Acylokarnityny o

krótkim łańcuchu acylovym (SCAC) oraz acylokarnityny o długim łańcuchu acylovym (LCAC) utworzyły wyraźnie oddzielone klastry korelacji. Autorzy badań sugerują, że może to wskazywać na różne poziomy zależności od enzymów transportujących acylokarnityny w błonach mitochondrium. Związki o długim łańcuchu acylovym są ściśle uzależnione od aktywności m.in. CPT, CACT, LCAD, podczas gdy SCAC mogą być częściowo transportowane niezależnie od nich[20].

Zaprezentowane przez Bogusiewicz i wsp. [21] wyniki analizy statystycznej wykazały istotnie różne ( $p < 0,05$ ) poziomy AC C3:0, AC C9:0, AC C10:1, AC C14:2 oraz AC C20:3 między glejakami o wysokim stopniu złośliwości (HGG) a glejakami o niskim stopniu złośliwości (LGG), przy czym wartości pola powierzchni pod pikiem były ponad dwukrotnie wyższe dla guzów o wyższej złośliwości (Rys 4.). Dodatkowo, wyniki wykazały wyższy poziom AC C12:0 w próbkach IDHw w porównaniu do próbek z mutacją w IDH1/2, a także niższy poziom AC C16:1 (Rys 4.). Zaobserwowano, że powierzchnia piku dla AC C16:1 w próbkach bez kodekcji 1p/19q (n-del) była prawie dwukrotnie mniejsza ( $p < 0,05$ ) niż w próbkach z tą aberracją chromosomalną (del) (Rys 4).

Wyniki te sugerują, że ilości karnityny i acylokarnityn były zazwyczaj wyższe w guzach o wyższym stopniu złośliwości lub u pacjentów z gorszym rokowaniem klinicznym (np. pacjenci bez mutacji w genie IDH1/2).

Wykres poziomów grup acylokarnityn



AC	HGG: LGG	IDHw: IDHm	N-del: del
Wolna karnityna	4,21 <sup>a</sup>	3,91 <sup>b</sup>	3,37
AC C2:0	0,87	0,97	0,93
AC C3:0	2,89 <sup>a</sup>	1,68	1,68
AC C4:0	0,85	0,94	0,84
AC C5:1	0,95	0,78	0,83
AC C5:0	1,38	1,00	1,22
AC C6:0	0,66	0,91	1,11
AC C8:0	1,20	1,04	0,95
AC C9:0	29,98 <sup>a</sup>	2,12	1,37
AC C10:1	3,86 <sup>a</sup>	1,18	0,74
AC C10:0	1,53	1,09	0,93
AC C12:1	1,50	1,56	0,99
AC C12:0	1,34	1,66 <sup>b</sup>	1,22
AC C14:2	2,72 <sup>a</sup>	1,94	1,33
AC C14:1	1,06	1,19	1,02
AC C14:0	0,89	1,08	0,96
AC C16:1	0,82	0,60 <sup>b</sup>	0,59 <sup>c</sup>
AC C16:0	0,92	0,96	1,06
AC C18:2	1,05	0,79	0,86
AC C18:1	0,87	0,79	1,00
AC C20:4	2,43	1,77	1,73
AC C20:3	13,89 <sup>a</sup>	2,87	2,17
AC C20:1	0,71	1,25	11,19

Rysunek 4. Wykresy poziomów grup acylokarnityn oraz tabela współczynników dla poszczególnych acylokarnityn w guzach o różnym stopniu złośliwości, statusie mutacji IDH1/2 oraz kodekcji 1p/19q. średnia znormalizowana powierzchnia piku jest statystycznie istotna ( $p < 0,05$ ) dla porównia <sup>a</sup> LGG i HGG, <sup>b</sup> IDHw i IDHm, <sup>c</sup> n-del i del. (na podstawie [21])

Figure 4. Graphs of acylcarnitine group levels and a table of coefficients for individual acylcarnitines in tumors with different degrees of malignancy, IDH1/2 mutation status, and 1p/19q codeletion. The average normalized peak area is statistically significant ( $p < 0,05$ ) for comparing <sup>a</sup> LGG and HGG, <sup>b</sup> IDHw and IDHm, <sup>c</sup> n-del and del. (adapted from [21]).

Biochemiczna interpretacja uzyskanych danych jest jednak obarczona niepewnością, wynikającą z małej grupy badanej, dużej heterogenności wyników oraz braku możliwości odniesienia do danych uzyskanych metodami referencyjnymi (np.

immunochemia do oceny aktywności enzymatycznej). Mimo tych ograniczeń, przedstawione badania stanowią podstawę do wnioskowania, że dalsza, ukierunkowana analiza ilościowa acylokarnityn, wykorzystująca proponowany protokół pobierania próbek SPME oraz metodę LC-HRMS, jest uzasadniona i może stanowić cenne uzupełnienie innych testów stosowanych do oceny metabolizmu kwasów tłuszczowych.

### 3. PRZESTRZENNE PROFILOWANIE LUDZKIEJ TKANKI MÓZGOWEJ *IN VIVO*

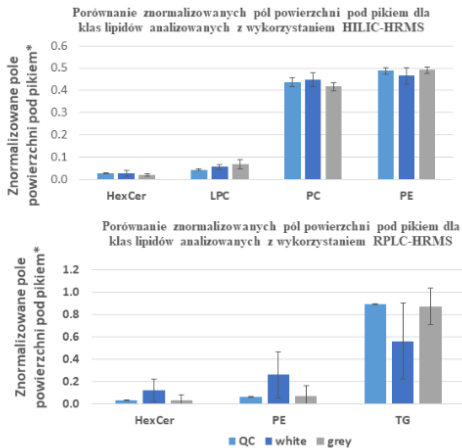
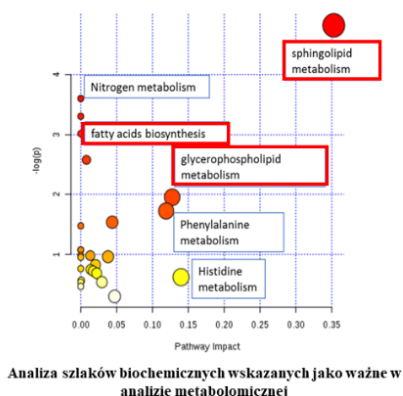
W praktyce klinicznej podstawowym narzędziem wykorzystywanym w diagnostyce guzów mózgu są techniki obrazowania, które jednak dostarczają ograniczonych informacji o składzie chemicznym. Wykonywanie analiz biochemicznych mózgu przyżyciowo, zwłaszcza u ludzi, jest niezwykle trudne z uwagi na ograniczony dostęp do tego narządu a także fakt, że nawet najmniejsze uszkodzenie może powodować zaburzenie złożonych funkcji istotnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Rozwój nowych technologii, szczególnie platform opartych o spektrometrię mas poszerzył możliwości diagnostyczne w neuroonkologii [9]. Jedną z takich technik jest mikroekstrakcja do fazy stałej. Opierając się na wcześniej przeprowadzonych badaniach *ex vivo* i *in vivo* na mózgach zwierząt, które wykazały bezpieczeństwo i wysoką użyteczność biopsji chemicznej postanowiono przetestować tę technologię w warunkach szpitalnych, u ludzi, w trakcie zabiegu neurochirurgicznego [13,14,22,23].

Doniesienia opublikowane przez Bogusiewicz i wsp. [13], według najlepszej wiedzy autorów, przedstawiają pierwszą aplikację SPME w badaniach przyżyciowych ludzkiego mózgu. W celu osiągnięcia kompromisu między potrzebami analitycznymi a użytecznością w trakcie zabiegu neurochirurgicznego zastosowane zostały modyfikacje sond mikroekstrakcyjnych. Niewralgicznym aspektem był czas ekstrakcji związków, który musiał być wystarczająco długi, aby zapewnić odpowiednią czułość i jakość danych, a jednocześnie na tyle krótki, by był bezpieczny i komfortowy dla pacjenta. Długość fazy ekstrakcyjnej na sondzie również miała znaczenie; większa powierzchnia sorpcyjna (dłuższa faza sorpcyjna) prowadziła do lepszego odzysku metabolitów. W związku z tym, w celu zwiększenia powierzchni sorpcyjnej, połączono cztery włókna, z których dwa były umiejscowione na innej wysokości niż pozostałe. Taka budowa sondy ma umożliwić w przyszłości jednoczesną analizę tkanki zdrowej i chorobowo zmienionej. Ze względu jednak na duże zróżnicowanie tkanki guzowej, testy Bogusiewicz i wsp. [13] zostały przeprowadzone na tkance zdrowej. Podjęto się bowiem różnicowania istoty białej i szarej mózgu. W tym celu zastosowano cztery 3 mm włókna, które wprowadzono wzdłuż zaplanowanej trajektorii igły biopsyjnej aby nie wprowadzać dodatkowych uszkodzeń i pozostawiono je w tkance na 4 min.

Nicelowana analiza metabolomiczna i lipidomiczna wykazała, że badane struktury mózgowia składały się głównie ze związków lipidowych (Rys. 5). Zaobserwowano także większe ilości lipidów w istocie białej. Ze względu jednak na małą grupę badaną analiza zmian biochemicznych i różnic między istotami nie została przeprowadzona. Interesującym jednak jest fakt, że biopsja chemiczna z powodzeniem została zastosowana do przestrzennej charakterystyki metabolomicznej ludzkiego mózgu *in vivo* przy użyciu szybkiej i mało inwazyjnej metody. Proponowana metoda nie zakłóca

rutynowych procedur medycznych, takich jak biopsja, i może być komplementarna wobec innych technik stosowanych w neurobiologii, jak mikrodializa czy metody elektrochemiczne [9]. W przypadku mikrodiализy sonda z półprzepuszczalną membraną umieszczana jest w mózgu pacjenta, a roztwór o odpowiednim składzie jest wpompowywany przez jedną z kapilar. Związki przechodzą do płynu dializacyjnego na zasadzie różnicy stężeń, co może być ograniczone przez interakcje z lipidami, prowadząc do zablokowania procesu dializy. Przy SPME tego problemu nie obserwuje się, a dodatkowo nie ma potrzeby wprowadzania kaniuli, jak ma to miejsce w przypadku mikrodiализy. SPME umożliwia ekstrakcję różnych rodzajów związków, od hydrofobowych lipidów po bardziej polarne metabolity, takie jak aminokwasy czy cukry. Mikrodializa z kolei umożliwia głównie analizę analitów polarnych [24].

Podsumowując zaprezentowane badania wskazują na użyteczność sond mikroekstrakcyjnych w badaniach śródoperacyjnych. Konieczne jednak byłoby skrócenie czasu analizy instrumentalnej – analiza chromatograficzna jednej próbki trwa zwykle około 20 min. Stąd też istotne wydaje się rozważenie zastosowania zminiaturyzowanych „mobilnych” spektrometrów mas, co umożliwiłoby szybszą i bardziej kompaktową analizę na miejscu [9]. Alternatywnie, detekcja fluorescencyjna lub spektroskopia Ramana mogłyby być skutecznymi metodami, pozwalającymi na uzyskanie dokładnych informacji o składzie chemicznym próbek [25]. Dodatkowo kombinacja mikroekstrakcji do fazy stałej bezpośrednio ze spektrometrem mas mogłaby znacząco skrócić czas analizy. Przykładowymi technikami mogłyby być MOI-MS lub CBS-MS [9].



Rysunek 5. Analiza szlaków biochemicznych wskazanych jako ważne w analizie metabolomicznej. Porównanie znormalizowanych pól powierzchni pod pikietm dla badanych klas lipidów (na podstawie [13]).

Figure 5. Analysis of biochemical pathways identified as important in metabolomic analysis. Comparison of normalized peak areas for lipid classes studied (adapted from [13]).

## UWAGI KOŃCOWE

Podsumowując, lipidomika może być przydatna w różnicowaniu guzów mózgu: niezłośliwych oponiaków od złośliwych glejaków, a także zmian pochodzenia glejowego

o różnym stopniu złośliwości oraz statusie mutacji IDH1/2. Na podstawie prezentowanych badań nie wykazano jednak aby możliwe było różnicowanie zmian o różnym statusie kodelecji 1p/19q. Grupa potencjalnych biomarkerów jakimi są acylokarnityny charakteryzowała się wyższymi wartościami w guzach o gorszym rokowaniu klinicznym- wyższy stopień złośliwości, brak mutacji IDH1/2. Przydatnym narzędziem do pobrania analitów z tkanki okazały się sondy mikroekstrakcyjne. Zastosowanie włókna z odpowiednio długim sorbentem umożliwia bowiem pobranie związków charakterystycznych dla całej zmiany nowotworowej, pomimo jej heterogennej struktury. Nadmienić także należy, że biopsja chemiczna umożliwia pobieranie próbek bezpośrednio w trakcie zabiegu neurochirurgicznego, w krótkim czasie (4 minuty), z dwóch struktur jednocześnie i bez dodatkowego uszkodzenia tkanki. Większość ekstrahowanych związków stanowiły lipidy, jednakże mała grupa badana pacjentów nie pozwoliła na dogłębną analizę statystyczną ze wskazaniem znaczących różnic w profilu lipidów w istocie białej i szarej.

### PODZIĘKOWANIE

Praca powstała dzięki finansowaniu uzyskanemu ze środków Narodowego Centrum Nauki; HARMONIA 7; nr 2015/18/M/ST4/00059 a także w ramach grantu ze środków Ministerstwa Obrony Narodowej; KOŚCIUSZKO, II edycja (506/2017/DA).

### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Q.T. Ostrom, L. Bauchet, F.G. Davis, I. Deltour, J.L. Fisher, C.E. Langer, M. Pekmezci, J.A. Schwartzbaum, M.C. Turner, K.M. Walsh, M.R. Wrensch, J.S. Barnholtz-Sloan, *Neuro Oncol*, 2014, **16**, 896.
- [2] D.N. Louis, A. Perry, P. Wesseling, D.J. Brat, I.A. Cree, D. Figarella-Branger, C. Hawkins, H.K. Ng, S.M. Pfister, G. Reifenberger, R. Soffietti, A. von Deimling, D.W. Ellison, *Neuro Oncol*, 2021, **23**, 1231.
- [3] D. Matias, J. Bałça-Silva, G.C. da Graça, C.M. Wanjiru, L.W. Macharia, C.P. Nascimento, N.R. Roque, J.M. Coelho-Aguiar, C.M. Pereira, M.F. Dos Santos, L.S. Pessoa, F.R.S. Lima, A. Schanaider, V.P. Ferrer, V. Moura-Neto, *Front Cell Neurosci*, 2018, **12**, 235.
- [4] A. Lauko, A. Lo, M.S. Ahluwalia, J.D. Lathia, *Semin Cancer Biol*, 2021, **82**, 162.
- [5] K. Aldape, K.M. Brindle, L. Chesler, R. Chopra, A. Gajjar, M.R. Gilbert, N. Gottardo, D.H. Gutmann, D. Hargrave, E.C. Holland, D.T.W. Jones, J.A. Joyce, P. Kearns, M.W. Kieran, I.K. Mellingshoff, M. Merchant, S.M. Pfister, S.M. Pollard, V. Ramaswamy, J.N. Rich, G.W. Robinson, D.H. Rowitch, J.H. Sampson, M.D. Taylor, P. Workman, R.J. Gilbertson, *Nat Rev Clin Oncol*, 2019, **16**, 509.
- [6] M. Gaca-Tabaszewska, J. Bogusiewicz, B. Bojko, *Cancers (Basel)*, 2022, **14**, 5041.
- [7] M. Pan, C. Qin, X. Han, *Adv Exp Med Biol*, 2021, **1316**, 1.
- [8] W. Szlasa, I. Zendran, A. Zalesińska, M. Tarek, J. Kulbacka, *J Bioenerg Biomembr*, 2020, **52**, 321.
- [9] J. Bogusiewicz, B. Bojko, *TrAC Trends Anal Chem*, 2023, **162**, 117043.
- [10] N. Reyes-Garcés, E. Gionfriddo, G.A. Gómez-Ríos, M.N. Alam, E. Boyacı, B. Bojko, V. Singh, J. Grandy, J. Pawliszyn, *Anal Chem*, 2018, **90**, 302.
- [11] J. Pawliszyn, *Handbook of Solid Phase Microextraction*, Elsevier, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada, 2012.
- [12] E. Cudjoe, B. Bojko, I. Delannoy, V. Saldivia, J. Pawliszyn, *Angew Chemie - Int Ed*, 2013, **52**, 12124.



- [13] J. Bogusiewicz, K. Burlikowska, K. Łuczykowski, K. Jaroch, M. Birski, J. Furtak, M. Harat, J. Pawliszyn, B. Bojko, *Sci. Rep.*, 2021, **11**, 19522.
- [14] A. Napylov, N. Reyes-Garcés, G. Gomez-Rios, M. Olkowicz, S. Lendor, C. Monnin, B. Bojko, C. Hamani, J. Pawliszyn, D. Vuckovic, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2020, **59**, 2392.
- [15] J. Bogusiewicz, P.Z. Goryńska, M. Gaca, K. Chmara, K. Goryński, K. Jaroch, D. Paczkowski, J. Furtak, M. Harat, B. Bojko, *J Vis Exp*, 2020, **2020**, 159.
- [16] P.Z. Goryńska, K. Chmara, B. Kupcewicz, K. Goryński, K. Jaroch, D. Paczkowski, J. Furtak, M. Harat, B. Bojko, *Cancers (Basel)*, 2022, **14**, 312.
- [17] J. Bogusiewicz, B. Kupcewicz, P.Z. Goryńska, K. Jaroch, K. Goryński, M. Birski, J. Furtak, D. Paczkowski, M. Harat, B. Bojko, *Int J Mol Sci*, 2022, **23**, 3518.
- [18] M. Strickland, E.A. Stoll, *Front Cell Dev Biol*, 2017, **5**, 43.
- [19] M.A.B. Melone, A. Valentino, S. Margarucci, U. Galderisi, A. Giordano, G. Peluso, *Cell Death Dis*, 2018, **9**, 228.
- [20] S. Kant, P. Kesarwani, A. Prabhu, S.F. Graham, K.L. Buelow, I. Nakano, P. Chinnaiyan, *Cell Death Dis*, 2020, **11**, 253.
- [21] J. Bogusiewicz, K. Burlikowska, K. Jaroch, P.Z. Goryńska, K. Goryński, M. Birski, J. Furtak, D. Paczkowski, M. Harat, B. Bojko, *Molecules*, 2021, **26**, 6112.
- [22] S.A. Hassani, S. Lendor, E. Boyaci, J. Pawliszyn, T. Womelsdorf, *J Neurophysiol*, 2019, **122**, 1649.
- [23] N. Reyes-Garcés, M. Diwan, E. Boyacl, G.A. Gómez-Ríos, B. Bojko, J.N. Nobrega, F.R. Bambico, C. Hamani, J. Pawliszyn, *Anal Chem*, 2019, **91**, 9875.
- [24] E. Boyaci, S. Lendor, B. Bojko, N. Reyes-Garcés, G.A. Gómez-Ríos, M. Olkowicz, M. Diwan, M. Palmer, C. Hamani, J. Pawliszyn, *ACS Chem Neurosci*, 2020, **11**, 3749.
- [25] B. Onat, H. Rosales-Solano, J. Pawliszyn, *Anal Chem*, 2020, **92**, 9379.

Praca wpłynęła do Redakcji 15 listopada 2024 r.



**Laureaci nagrody ufundowanej przez LGC Standards  
za wprowadzanie zasad metrologii w pomiarach  
chemicznych**

---

---



# ZASTOSOWANIE METOD CHEMOMETRYCZNYCH DO WOLTAMPEROMETRYCZNEGO PROFILOWANIA ŻYWNOŚCI

## APPLICATION OF CHEMOMETRIC METHODS FOR VOLTAMMETRIC PROFILING OF FOOD

**Szymon Wójcik<sup>1,\*</sup>, Filip Ciepela<sup>2</sup>,  
Bogusław Baś<sup>2</sup>, Małgorzata Jakubowska<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Katedra Chemii Krzemianów i Związków Wielkocząsteczkowych,  
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki,  
Akademia Górniczo – Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie,  
ul. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków*

<sup>2</sup>*Katedra Chemii Analitycznej i Biochemii,  
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki,  
Akademia Górniczo – Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie,  
ul. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków*

\*e-mail: szwojcik@agh.edu.pl

---

### Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wstęp

1. Wprowadzenie teoretyczne
  - 1.1. Woltamperometryczny elektroniczny język
  - 1.2. Profilowanie żywności
2. Elektrody pracujące
  - 2.1. Wieloelektrodowy czujnik woltamperometryczny
  - 2.2. Metaliczne elektrody czterodyskowe
  - 2.3. Elektrody pastowe
3. Procedura pomiarowa
4. Obiekty badań i rezultaty
  - 4.1. Profilowanie napojów alkoholowych z wykorzystaniem czujnika wieloelektrodowego oraz czterodyskowej elektrody irydowej
  - 4.2. Profilowanie soków jabłkowych z wykorzystaniem czterodyskowej elektrody irydowej
  - 4.3. Profilowanie miodów z wykorzystaniem czterodyskowej elektrody metalicznej oraz strategii computer vision
  - 4.4. Profilowanie napojów izotonicznych z wykorzystaniem czterodyskowych elektrod metalicznych oraz metaliczno - węglowych
  - 4.5. Profilowanie napojów roślinnych z wykorzystaniem piceinowej elektrody pastowej

Podsumowanie i wnioski

Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr inż. Szymon Wójcik** jest absolwentem Akademii Górniczo – Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie. W 2023 roku uzyskał tytuł doktora chemii, przedstawiając dysertację na temat nowych sensorów voltamperometrycznych i strategii uczenia maszynowego oraz głębokiego uczenia maszynowego do profilowania lokalnych produktów spożywczych. Oprócz zagadnień związanych z szeroko pojętym uczeniem maszynowym interesuje się także wykorzystaniem metod elektrochemicznych oraz spektroskopowych w chemii żywności. Jest autorem i współautorem wielu publikacji o zasięgu międzynarodowym.



<https://orcid.org/0000-0003-3124-3067>

**Dr inż. Filip Ciepela** jest absolwentem Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie. W 2012 roku obronił pracę doktorską uzyskując doktorat z nauk chemicznych. Obecnie pracuje w Katedrze Chemii Analitycznej i Biochemii Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH, gdzie prowadzi badania głównie z przetwarzania i analizy sygnałów uzyskiwanych w wyniku pomiarów chemicznych, biochemicznych oraz obrazów. Specjalizuje się w zastosowaniu głębokich sieci neuronowych.



<https://orcid.org/0000-0001-7640-9169>

**Prof. dr hab. inż. Bogusław Baś** jest kierownikiem Katedry Chemii Analitycznej i Biochemii na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie. Jednocześnie pełni funkcję wiceprzewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny „Nauki Chemiczne” na AGH oraz wiceprzewodniczącego (z wyboru) Komitetu Chemii Analitycznej PAN i przewodniczącego zespołu Elektroanalizy KChA PAN. Tytuł profesora uzyskał w 2018 roku. W badaniach naukowych koncentruje się na projektowaniu, wytwarzaniu oraz aplikacji makro- i mikroczipów elektrochemicznych w elektroanalizie chemicznej próbek przemysłowych, środowiskowych i biologicznych. Projektował aparaturę badawczą, kontrolno-pomiarową i dydaktyczną, w tym potencjostaty oraz systemy przemysłowej i klinicznej analizy procesowej wdrożone do produkcji seryjnej m.in. przez firmę mtm-anko. Kierownik i wykonawca wielu projektów naukowo-badawczych finansowanych przez KBN, NCN, NCBiR i MNiSW. Współautor blisko 100 publikacji w czasopismach z bazy JCR, kilkudziesięciu rozdziałów w monografiach oraz 11 udzielonych patentów.



<https://orcid.org/0000-0002-5129-2942>

**Prof. dr hab. Małgorzata Jakubowska** jest absolwentem Wydziału Matematyki i Fizyki Uniwersytetu Jagiellońskiego. Stopień doktora nauk technicznych w dyscyplinie automatyka i robotyka uzyskała w roku 1999, doktora habilitowanego w dyscyplinie nauk chemicznych w roku 2007, zaś tytuł profesora w roku 2022. Obecnie pracuje w Katedrze Chemii Analitycznej i Biochemii Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH. Jej zainteresowania naukowe obejmują głównie zastosowania metod uczenia maszynowego w chemii analitycznej oraz inżynierii biomedycznej, a także zagadnienia przetwarzania sygnałów.



<https://orcid.org/0000-0002-0192-4083>

---

## ABSTRACT

The development of society and the rise in consumer awareness generate the need for rapid and precise analysis of food products to ensure their high quality. Consumers are increasingly paying attention to the origin, composition, and production processes of food. Heightened competition among producers and rising production costs lead to serious challenges, such as food product adulteration to lower prices and maximize profits.

This study presents results of analysis of a wide range of food products, including wines, whiskies, apple juices, honey, isotonic drinks, and plant-based milks. The research focused on profiling these samples and identifying potential issues, such as the presence of undesirable additives. The registration of voltammetric profiles was made possible through the use of modern working electrodes.

As a result of the conducted research, several innovative methods were developed, combining chemical analysis and machine learning strategies that effectively address the identified research problems. Research plans were created to detect adulteration in apple juices and honeys, and predictive models regarding the aging of young wines were defined. Procedures for profiling products such as wines, whiskies, honeys, isotonic drinks, and plant-based milks were also designed. For each of these procedures, a multi-stage optimization of voltammetric profile registration parameters was carried out, and the obtained data underwent advanced signal processing to ensure the highest possible quality of results.

Keywords: food profiling, voltammetric profiling, machine learning, deep machine learning, chemometrics, voltammetric electronic tongue

Słowa kluczowe: profilowanie żywności, uczenie maszynowe, głębokie uczenie maszynowe, chemometria, woltamperometryczny elektroniczny język

---

---

**WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

ATLD	– Naprzemienny rozkład trójliniowy
CWT	– Ciągła transformacja falkowa
DNN	– Głębokie sieci neuronowe
DPV	– Woltamperometria impulsowa różnicowa
DSSWV	– Podwójnie próbkowana woltamperometria fali prostokątnej
iPLS	– Metoda przedziałowa częściowych najmniejszych kwadratów
PCA	– Analiza głównych składowych
PCR	– Regresja głównych składowych
PLS	– Metoda częściowych najmniejszych kwadratów
PtDE	– Platynowa elektroda dyskowa
q-DIrE	– Czterodyskowa elektroda irydowa
q-DIrGCE	– Czterodyskowa elektroda irydowo - węglowa
q-DIrPtE	– Czterodyskowa elektroda irydowo – platynowa
q-DPtE	– Czterodyskowa elektroda platynowa
q-DPtGCE	– Czterodyskowa elektroda platynowo - węglowa
SVR	– Maszyna wektorów wspierających w wariacie regresyjnym
VET	– Woltamperometryczny elektroniczny język



## WSTĘP

Chemia, obok fizyki, stanowi jedną z kluczowych dyscyplin w obszarze nauk ścisłych i przyrodniczych, tworząc fundament dla innych gałęzi wiedzy. Początkowo badania chemiczne koncentrowały się na analizie składu i właściwości materii, jednak w miarę rozwoju nauki nastąpiła ekspansja różnych działów chemii. Jedną z nich jest chemia analityczna, która współcześnie korzysta z szerokiego spektrum metod instrumentalnych opartych na zasadach fizykochemicznych do badania materii.

W ramach tych metod wyniki analizy chemicznej najczęściej przyjmują formę jednowymiarowego sygnału, który definiuje się jako pomiar wielkości fizycznej (np. prądu, potencjału, masy lub objętości) w funkcji innej zmiennej. Najczęściej zmienną tą jest czas, jednak może to być również długość fali bądź napięcie [1]. Wraz z rosnącą złożonością uzyskiwanych wyników, konieczne stało się zastosowanie metod wielowymiarowych. Integracja narzędzi statystycznych i matematycznych w analizie danych chemicznych przyczyniła się do powstania nowej dyscypliny – chemometrii. Jej celem jest optymalizacja procedur pomiarowych w celu maksymalizacji informacji uzyskiwanych z danych pomiarowych [2,3].

Metody chemometryczne są również stosowane w klasyfikacji próbek na podstawie sygnałów analitycznych lub profili stężeń. W kontekście analizy żywności umożliwiają one m.in. rozróżnienie produktów oryginalnych od sfałszowanych oraz ich klasyfikację ze względu na typ czy pochodzenie. Pomimo dynamicznego wzrostu liczby publikacji dotyczących zastosowania uczenia maszynowego w chemii, wyzwania związane z dostępnością i odtwarzalnością wyników pozostają w dalszym ciągu przedmiotem zainteresowania [4].

### 1. Wprowadzenie teoretyczne

Znaczący wzrost świadomości konsumentów dotyczący jakości oraz pochodzenia produktów spożywczych, wpłynął na zmianę preferencji zakupowych, szczególnie w kontekście rynku lokalnego. Konsumenty coraz częściej decydują się na wybór lokalnych produktów, rezygnując z importowanych odpowiedników. Problem autentyczności i kontroli pochodzenia żywności stał się istotnym zagadnieniem zarówno dla producentów, jak i dla badaczy, stawiając nowe wyzwania w zakresie analityki chemicznej.

Z tego względu trwają intensywne poszukiwania metod charakteryzujących się niskimi kosztami, prostotą i wysoką efektywnością, które mogłyby sprostać wymaganiom rynku. W aktualnej literaturze zauważa się wzrost zainteresowania technikami elektrochemicznymi oraz metodami chemometrycznymi, które wydają się obiecującym narzędziem do rozwiązywania problemów związanych z identyfikacją pochodzenia i autentyczności żywności.

### 1.1. Voltamperometryczny elektroniczny język

Rozwój voltamperometrii w kierunku tworzenia nowych sensorów doprowadził do opracowania voltamperometrycznego elektronicznego języka (VET, ang. Voltammetric Electronic Tongue), który pełni rolę czujnika umożliwiającego ocenę składu próbki oraz pozyskiwanie jej profili elektrochemicznych [5,6]. Koncepcja VET opiera się na zasadach elektronicznego nosa, który służy do detekcji zapachów w próbkach gazowych oraz elektronicznego języka, stosowanego w próbkach ciekłych, mającego na celu odwzorowanie ludzkich zmysłów węchu i smaku przy użyciu metod analitycznych i chemometrycznych [7–9]. Konstrukcja VET bazuje na systemie czujników o niskiej selektywności, które generują wielowymiarowe dane, dostarczając wszechstronnych informacji o badanych próbkach.

Pod względem statystycznym sygnał voltamperometryczny stanowi wektor złożony z wielu punktów pomiarowych (np. próbek prądu). Dzięki zastosowaniu szerokiego okna pomiarowego można jednocześnie analizować różne składniki aktywne elektrochemicznie zawarte w roztworze. Taki voltamperogram stanowi unikalny odcisk palca próbki, co czyni VET wszechstronnym narzędziem w monitoringu środowiskowym, analizie żywności oraz w badaniach biomedycznych i farmaceutycznych.

Elektrody pracujące w systemach VET dostarczają informacji o reakcjach redoks zachodzących w roztworze. Parametry pomiaru mogą być modyfikowane poprzez zmianę okna potencjałów, elektrody pracującej, środowiska pomiarowego czy techniki analitycznej. W przypadku złożonych matryc, zawierających mieszaniny związków elektrochemicznie aktywnych, selektywność systemu może być niewystarczająca, co utrudnia rozdzielenie pojedynczych składników. Niemniej jednak, voltamperogramy tego typu zawierają cenne informacje analityczne, które mogą być wyodrębniane za pomocą metod analizy wielowymiarowej [10,11].

### 1.2. Profilowanie żywności

Profilowanie żywności jest procesem mającym na celu opracowanie systemów gwarantujących wysoką jakość produktów spożywczych oferowanych konsumentom. Pojęcie to jest ściśle związane z problematyką fałszowania żywności [12]. Współcześni konsumenci wykazują coraz większą świadomość i staranność w wyborze produktów spożywczych, co wyraża się m.in. w dokładnej analizie ich etykiet [13]. Coraz częściej preferowane są produkty pochodzenia naturalnego, pozbawione sztucznych dodatków. Wzrost świadomości społecznej w tym zakresie odgrywa istotną rolę [14], co znajduje również odzwierciedlenie w rosnącej liczbie badań dotyczących wpływu wysoko przetworzonej żywności na zdrowie człowieka [15–17].

W profilowaniu żywności stosuje się szeroki wachlarz technik analizy chemicznej, wspieranych przez różnorodne metody chemometryczne, co umożliwia budowanie skutecznych modeli analitycznych [18–20]. Jedną z najczęściej wykorzystywanych

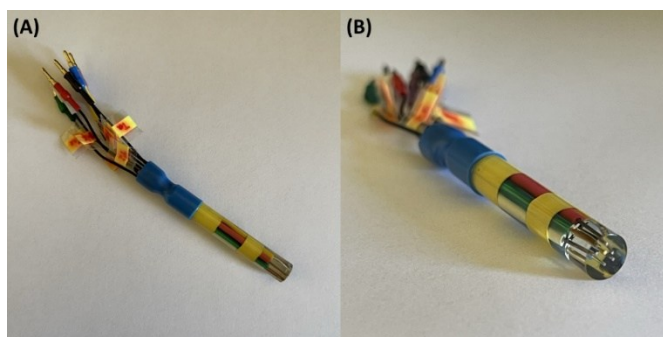
metod jest analiza głównych składowych (PCA, ang. Principal Component Analysis). Jako jedna z metod znalazła ona zastosowanie w klasyfikacji alkoholi [21–29], ocenie herbaty [30] oraz kawy [31–37], czy klasyfikacji geograficznej pochodzenia różnych produktów spożywczych [38–40].

## 2. Elektrody pracujące

Sensory woltamperometryczne są wytwarzane z różnych materiałów, w zależności od ich przeznaczenia. W szczególności elektrody dyskowe, wykonane z metali szlachetnych, metali nieszlachetnych oraz materiałów węglowych, zyskują na popularności ze względu na prostotę ich konstrukcji oraz możliwość adaptacji do różnorodnych zastosowań. Dodatkowo stanowią one solidną bazę do tworzenia sensorów typu VET, co czyni je istotnym elementem w rozwoju technologii analitycznych.

### 2.1. Wielelektrodowy czujnik woltamperometryczny

Skonstruowany na potrzeby tej pracy sensor składa się z siedmiu drutów o średnicy 0,5 mm, wykonanych z różnych metali: tantalu, hafnu, cyny, srebra, miedzi, złota oraz tytanu. Druty te zostały zamontowane w teflonowym uchwycie mocującym, który zapewnia utrzymanie stałych odległości między nimi, co umożliwia równomierne rozłożenie powierzchni roboczych. Uchwyt teflonowy, będący jednocześnie formą, został wypełniony chemoodporną, trójskładnikową żywicą epoksydową TRANSLUX D180 (AXON Technologies, Francja) w celu stworzenia korpusu elektrody. Po 24 godzinach wiązania i 48 godzinach kondycjonowania w temperaturze 45°C elektroda była gotowa do dalszej obróbki, w tym szlifowania i polerowania. Kontakt elektryczny drutów został zapewniony poprzez zastosowanie złączek elektrycznych typu pin. Schemat budowy wielelektrodowego czujnika woltamperometrycznego przedstawiono na rysunku 1.



Rysunek 1. Czujnik wielelektrodowy zastosowany w eksperymentach: (A) zdjęcie czujnika; (B) zbliżenie na powierzchnię pracującą

Figure 1. Multi-electrode sensor used in the experiments: (A) photo of the sensor; (B) enlarge image of the working surface

## 2.2. Metaliczne elektrody czterodyskowe

Koncepcja elektrod czterodyskowych, zarówno metalicznych, jak i metaliczno-węglowych, opiera się na próbie skonstruowania uniwersalnego woltamperometrycznego elektronicznego języka, który mógłby być używany w standardowych statywach elektrodowych. Sygnał uzyskiwany za pomocą tych sensorów stanowi sumę sygnałów generowanych przez pojedyncze elektrody w oddzielnych pomiarach woltamperometrycznych. Konstrukcja tego typu elektrod sprzyja eliminacji pęcherzyków wodoru powstających na powierzchni elektrody roboczej podczas elektrochemicznej aktywacji czujnika, a także pęcherzyków gazu odtleniającego roztwór, które mogą adsorbować się na powierzchni roboczej.

Rozmieszczenie powierzchni roboczych na bocznych płaszczyznach korpusu elektrody ułatwia również proces mechanicznego polerowania, co zwiększa powtarzalność i odtwarzalność wyników analizy. Dodatkowo poprawia to czułość i precyzję pomiarów poprzez ułatwiony transport konwekcyjny analitów do powierzchni elektrody w porównaniu do elektrod, których powierzchnia robocza znajduje się poziomo w dolnej części elektrody, przy zachowaniu tej samej powierzchni geometrycznej.

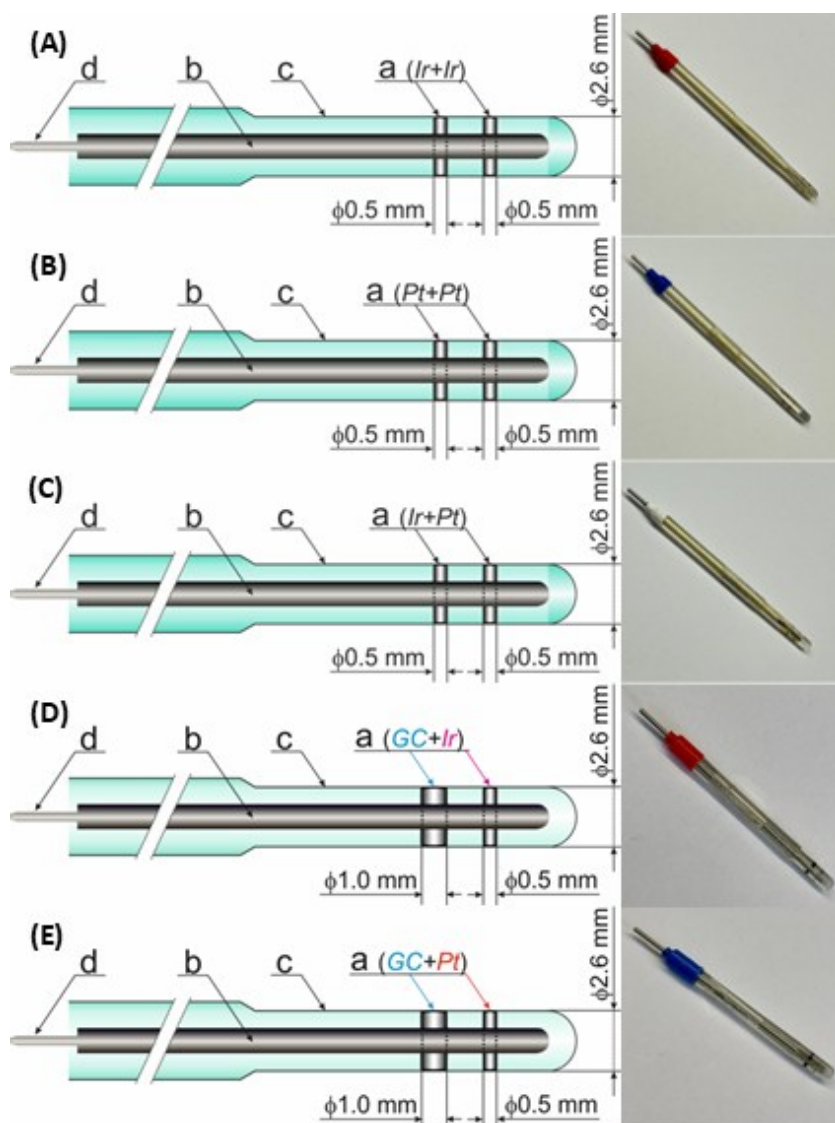
Ogólna konstrukcja tego typu elektrod jest podobna. Na rysunku 2 przedstawiono schemat budowy sensorów wykorzystanych w badaniach. W każdej z ilustracji (a) wskazuje rodzaj użytego materiału elektrodowego. Niezależnie od wyboru materiału, rdzeń (b) stanowi srebrny drut (Mennica Polska) o średnicy  $\phi = 1,6$  mm i długości  $l = 8$  cm, w którym wywiercono dwa otwory o średnicy odpowiadającej wymiarom użytych prętów, co umożliwi montaż drutów stanowiących właściwą powierzchnię roboczą elektrody. Aby uzyskać dokładne połączenie, druty z metali tworzących powierzchnię elektrody zostały umieszczone w przygotowanych otworach, a następnie ściśnięte w precyzyjnym imadle mechanicznym. Cała konstrukcja jest zabezpieczona chemoodporną trójskładnikową żywicą epoksydową (c) firmy TRANSLUX D180 (AXON Technologies, Francja), która również pełni funkcję korpusu elektrody. Niewielka, niepokryta żywicą część srebrnego pręta (d) stanowi elektryczny styk czujnika.

Pierwowzorem dla VET o wspólnym kontakcie elektrycznym była czterodyskowa elektroda irydowa (q-DIrE, ang. Quadruple Disk Iridium Electrode, rysunek 2A). W tej konstrukcji (a) oba druty, a co za tym idzie, wszystkie powierzchnie robocze, wykonane są z irydu (Alfa Aesar, Niemcy, 99,8%, nr 11430.BQ, CAS: 7439-88-5,  $\phi = 0,5$  mm).

Pierwszym z nowych wariantów elektrod czterodyskowych była czterodyskowa elektroda platynowa (q-DPtE, ang. Quadruple Disk Platinum Electrode, rysunek 2B), w której (a) oba druty wykonano z platyny (Alfa Aesar, Niemcy, 99,95%, nr 43288.BU, CAS: 7440-06-4,  $\phi = 0,5$  mm). Drugą innowacją była czterodyskowa elektroda irydowo-platynowa (q-DIrPtE, ang. Quadruple Disk Iridium – Platinum Electrode, rysunek 2C), w której jeden drut wykonany został z irydu, a drugi z platyny (a).

Pierwszą z nowych konstrukcji elektrod mieszanych jest czterodyskowa elektroda irydowa z węglem szklistym (q-DIrGCE, ang. Quadruple Disk Iridium – Glassy Carbon Electrode, rysunek 2D), w której (a) jeden z drutów wykonany jest z irydu, a drugi to pręt

z węgla szklanego (GoodFellow, Anglia, 99,95%, ultrafine 1-5  $\mu\text{m}$ , nr LS566678 AH, C-00-RD-000108, CAS: 7440-44-0,  $\phi = 1,0 \text{ mm}$ ). Natomiast drugą jest czterodyskowa elektroda platynowa z węglem szklanym (q-DPtGCE, ang. Quadruple Disk Platinum – Glassy Carbon Electrode, rysunek 2E), w której jeden z drutów wykonano z platyny, a drugi z węgla szklanego.



Rysunek 2. Schemat budowy czterodyskowych elektrod metalicznych oraz metaliczno - węglowych: (A) q-DIrE; (B) q-DPtE; (C) q-DIrPtE; (D) q-DIrGCE; (E) q-DPtGCE.

Figure 2. Diagram of the construction of quadruple-disk metallic and metallic-carbon electrodes: (A) q-DIrE; (B) q-DPtE; (C) q-DIrPtE; (D) q-DIrGCE; (E) q-DPtGCE

### 2.3. Elektrody pastowe

Stosowanie elektrod z pasty węglowej (CP, ang. Carbon Paste) wymaga odpowiedniego przygotowania materiału elektrodowego, co czyni je atrakcyjną podstawą do konstrukcji sensorów typu VET, ze względu na stosunkowo prostą modyfikację składu pasty. Najczęstsze modyfikacje obejmują zmianę rodzaju użytego węgla (np. grafit, nanorurki, grafen, sadza) oraz domieszkowanie substancji poprawiających przewodnictwo elektrody, zwiększających jej czułość lub selektywność wobec określonych związków chemicznych. Modyfikacja spoiwa pasty elektrodowej jest rzadziej spotykana, a najczęściej używa się do tego celu oleju mineralnego.

Jedną z zaproponowanych konstrukcji są elektrody węglowe, w których spoiwem była piceina (ROTH, Niemcy), będąca stałym, twardym woskiem, a składnikiem aktywnym proszek grafitowy (Arcos Organic, Belgia; CAS: 7782-42-5). Wielokrotne eksperymenty wykazały, że najlepszą pastę elektrodową otrzymuje się przy proporcji 1:1 grafitu do spoiwa. Dokładnie odważono po 1 g obu składników, które następnie przeniesiono do tygla kwarcowego i zalano około 5 ml eteru (Sigma-Aldrich, Niemcy; CAS: 60-29-7), co miało na celu rozpuszczenie wosku i homogenizację mieszaniny, a nie jej chemiczną modyfikację. Po około trzech godzinach częściowego odparowania rozpuszczalnika, mieszaninę ogrzewano w łaźni piaskowej w temperaturze 100°C, aż do całkowitego rozpuszczenia wosku.

Otrzymaną pastę, w stanie gorącym, umieszczono w korpusie teflonowym o wyciętym otworze ( $\phi = 3$  mm, głębokość = 8 mm), przez który przeprowadzono stalowy drut ( $\phi = 1,4$  mm) pełniący funkcję kontaktu elektrycznego. Po pierwszym wygładzeniu pasty, korpus pozostawiono na 24 godziny w temperaturze pokojowej, co pozwoliło na schłodzenie i utwardzenie pasty. Następnego dnia elektroda była szlifowana papierem ściernym o rosnącej gradacji ziarna, a następnie polerowana na płótnie polerskim z użyciem past z tlenkiem glinu o malejącej gradacji, w sposób analogiczny do przygotowania elektrod z węgla szklanego.

## 3. Procedura pomiarowa

Podczas rejestracji profili voltamperometrycznych we wszystkich badaniach zastosowano spójną strategię badawczą, której celem była optymalizacja procedur pomiarowych w celu uzyskania jak największej ilości wysokiej jakości danych. Pomiar przeprowadzono w szerokim oknie potencjałów, od -1000 mV do 1000 mV, co umożliwiło pełną charakterystykę procesów redoks. Rejestracja prądu odbywała się w sposób cykliczny, co pozwalało na analizę zarówno przebiegów anodowych, jak i katodowych, a także umożliwiało konkatencję danych, co zwiększało dokładność analiz.

Aby zwiększyć rozdzielczość rejestrowanego sygnału, zastosowano niski potencjał schodka, najczęściej wynoszący 2 mV, co pozwalało na zagęszczenie punktów pomiarowych. Pozostałe parametry, takie jak potencjał impulsu (50 mV) i czas trwania schodka potencjału (40 ms), przyjęły wartości typowe dla tego rodzaju badań. W związku

z pomiarami w ujemnych potencjałach, roztwory przed pomiarami intensywnie mieszano i poddawano odtlenieniu argonem przez 180 s.

W eksperymentach z wykorzystaniem wieloelektrodowych czujników (VET) o wspólnym kontakcie elektrycznym, kluczowe było zachowanie ścisłego reżimu czasowego podczas pomiarów. W tym celu wdrożono automatyczną procedurę pomiarową, która zapewniała powtarzalność wyników i minimalizowała wpływ operatora na proces. Procedura ta umożliwiała m.in. projektowanie poszczególnych etapów eksperymentu, kontrolowanie czasu odtleniania roztworu, akumulacji analitu, a także aktywacji elektrody. Pozwala również na automatyczne zapisywanie danych, programowanie przerw między rejestracjami oraz standaryzację dozowania i mieszania próbek, co zapewniało pełną kontrolę nad każdym etapem eksperymentu.

Dzięki ścisłej standaryzacji procedury pomiarowej warunki badawcze były idealnie powtarzalne dla każdej próbki, co pozwoliło zminimalizować wpływ operatora na końcowy wynik analizy.

#### 4. Obiekty badań oraz rezultaty

Przy doborze próbek do badań kierowano się głównie ich lokalnym i ekologicznym pochodzeniem, co pozwalało na analizę produktów odzwierciedlających współczesne trendy w odżywianiu. Próbki te stanowią jednocześnie reprezentatywne przykłady produktów spożywczych wytwarzanych na terenie Małopolski, co podkreśla ich związek z regionalnymi praktykami produkcji żywności.

##### 4.1. Profilowanie napojów alkoholowych z wykorzystaniem czujnika wieloelektrodowego oraz czterodyskowej elektrody irydowej

Problematyka profilowania napojów alkoholowych obejmowała trzy obszary badawcze. W pierwszym próbki stanowiły cztery wina komercyjnie dostępne w centrach handlowych. Były to dwa białe i dwa czerwone wina pochodzące z znanych obszarów winiarskich na świecie (Australia, Chile i USA). Do uzyskania profili woltamperometrycznych tych win zastosowano wieloelektrodowy czujnik woltamperometryczny oraz dedykowany temu czujnikowi statyw elektrodowy, który umożliwił rejestracji profili woltamperometrycznych w sposób quasi-równoległy. W tym przykładzie profil rejestrowany był z zastosowaniem techniki woltamperometrii impulsowej różnicowej (DPV). W przypadku tego eksperymentu konieczne było zastosowanie elektrolitu podstawowego, którym był  $0,1 \text{ mol/dm}^3$  KCl. Profile rejestrowano dla 100-krotnie rozcieńczonych próbek. W wyniku przeprowadzonych prac laboratoryjnych zarejestrowano 9 profili każdego z win (3 serie pomiarowe po 3 powtórzenia w każdej z serii). Dla każdej z siedmiu elektrod otrzymano profil składający się z 350 punktów pomiarowych. W celu analizy danych dokonano konkatenaacji wszystkich zarejestrowanych profili. W chemometrii bardzo istotnym etapem jest

wstępne przetwarzanie sygnału. W tym eksperymencie wygładzanie sygnału metodą Savitzky'ego – Golaya z zastosowaniem wielomianu II stopnia w 11 punktowym oknie, automatyczną korektę tła wielomianem I stopnia z 30 iteracjami, ciągłą transformacją falkową CWT (ang. Continuous Wavelet Transform) z dedykowaną falką macierzystą oraz logarytmowanie. Dla tak przygotowanych danych wykonano analizę PCA. Zauważono, że rzut danych na płaszczyznę drugiej oraz trzeciej głównej składowej dostarcza istotnych informacji o badanych obiektach. W wyniku analizy uzyskano podział punktów na 4 homogeniczne klasy, gdzie każda z grup znajduje się w różnych ćwiartkach układu. Wobec tego profilowanie tych win może być oparte wyłącznie o wartości drugiej i trzeciej głównej składowej.

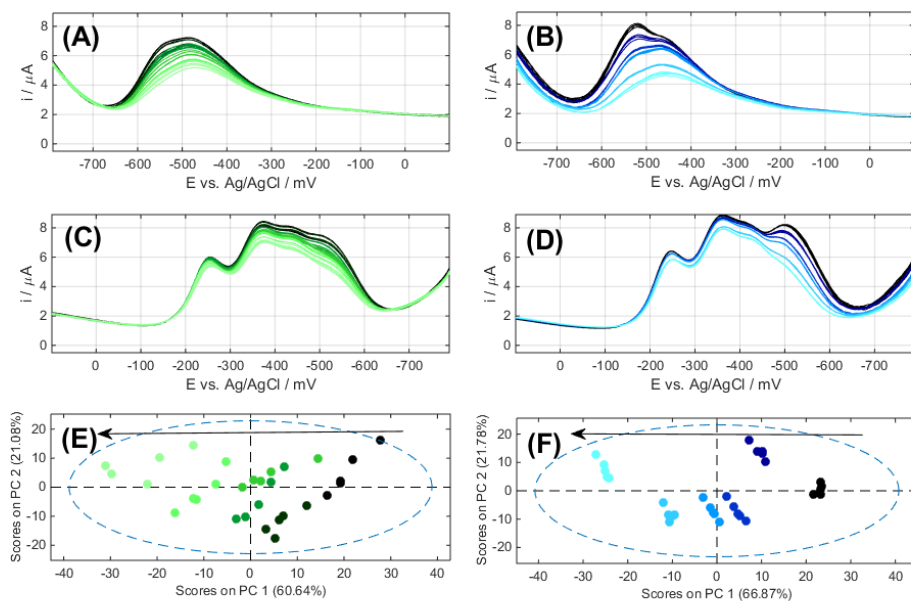
W drugim kroku wykorzystano oprócz poprzednich win również próbki 4 szkockich whisky tyłu blended. Do rejestracji profili voltamperometrycznych zastosowano również metodę DPV, wcześniej zoptymalizowany elektrolit podstawowy oraz elektrodę q-DIrE oraz PtDE. Do analizy profili voltamperometrycznych, zarówno win jak i whisky, wykorzystano wartości prądu rejestrowane z częstotliwością próbkowania wynoszącą 1kHz, badany zarówno w kierunku anodowym jak i katodowym. Do wstępnego przetwarzania sygnału wykorzystano algorytm naprzemiennego rozkładu trójliniowego ATLD (ang. Alternating Trilinear Decomposition), który umożliwił matematyczne odwzorowanie składowej faradajowskiej zarejestrowanych profili badanych napojów alkoholowych. Do analizy tak przygotowanych danych wykorzystano algorytm PCA. Dla każdego z rozpatrywanych przypadków najkorzystniejszy okazał się być rzut danych na płaszczyznę PC2/PC3. Obiekty rozłożone były w czterech różnych ćwiartkach układu danych, więc analiza mogła być prowadzona jedynie w oparciu o stosunek znaków tych zmiennych.

Natomiast w trzecim etapie wykorzystano cztery młode wina pochodzące z podkrakowskiej winnicy, z których próbki pobierano na różnych początkowych etapach produkcji. Do tego profilowania wykorzystano technikę DPV oraz q-DIrE jako elektrodę pracującą. Eksperyment prowadzono z zastosowaniem  $0,1 \text{ mol/dm}^3$  KCl jako elektrolitu podstawowego. Profilowanie obejmowało rejestracje 15 profili każdego z badanych win w 5 etapach. Czas badania obejmował pierwsze 230 dni od momentu rozpoczęcia produkcji, czyli wczesną fermentację, późną fermentację oraz wczesne dojrzewanie. Po wstępnej analizie PCA, zakończonej sukcesem, przystąpiono do budowy modeli regresyjnych z wykorzystaniem algorytmu częściowych najmniejszych kwadratów PLS (ang. Partial Least Squares). Cztery modele dedykowane każdemu z analizowanych win wykazały się zadowalającymi poziomami jakości dopasowania, niskim błędem predykcji i wysokim poziomem korelacji. Błędy oscylowały w granicach od 2 do 4 dni, w odniesieniu do 230 dni tj. całego okresu prowadzenia badań.



#### 4.2. Profilowanie soków jabłkowych z wykorzystaniem czterodyskowej elektrody irydowej

W eksperymencie dotyczącym soków jabłkowych wykorzystano 17 różnych rodzajów tych soków podzielonych na 6 grup (soki tłoczone, klarowane, klarowane dla dzieci, mieszany, domowe wyciskane oraz domowe wymrażane). Głównym celem eksperymentu było wykazanie możliwości oceny dodatku syropu glukozowo – fruktozowego do każdego z tych soków i zbudowanie uniwersalnego modelu do jego oceny. W tym celu z użyciem elektrody q-DIrE zarejestrowano profile każdego z soków w dwóch wariantach dodatków syropu: małych, czyli od 2% do 10% oraz dużych, od 10% do 50% (rysunek 3). W pierwszym etapie wykorzystano algorytm PLS do treningu modeli dla każdego z soków osobno. Uzyskane modele spełniały zwyczajowe kryteria jakości i mogą być one z powodzeniem wykorzystane do oceny dodatku syropu glukozowo – fruktozowego w tych sokach. W drugim etapie podjęto się próby budowy modelu uniwersalnego dla wszystkich soków. Zastosowano w tym celu algorytmy PLS, iPLS (przedziałowych częściowych najmniejszych kwadratów, ang. Interval Partial Least-Squares) oraz PCR (regresja głównych składowych (ang. Principal Components Regression)). Jednak żaden z modeli nie spełniał podstawowych kryteriów przydatności modeli. W związku z tym postanowiono wykorzystać w tym celu sieci neuronowe. Zaprojektowano 4 różne architektury sieci, a najsukuteczniejsza z nich wykazywała się zdolnością predykcji na poziomie 1,9 – 2,1% dodatku syropu glukozowo – fruktozowego przy dodatkach do 50%.

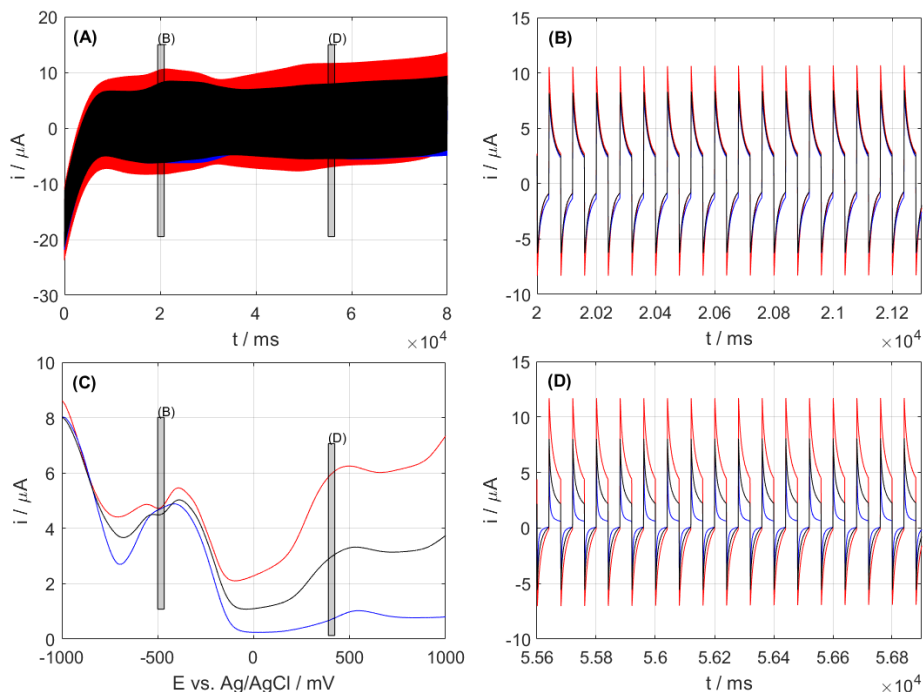


Rysunek 3. Przebiegi DPV w 0,1 mol/dm<sup>3</sup> KCl dla soków zafałszowanych różnymi dodatkami GFS: (A) przebiegi katodowe dla dodatków 0% - 10%; (B) przebiegi katodowe dla dodatków 0% - 50%; (C) przebiegi anodowe dla dodatków 0% - 10%; (D) przebiegi anodowe dla dodatków 0% - 50%. Rzuty danych na płaszczyznę PC1/PC2: (E) dla skanów anodowych, dodatki GFS 0% - 10%; (F) dla skanów katodowych, dodatki GFS 0% - 50%. Odcienie kolorów odpowiadają kolejnym dodatkom GFS, im jaśniejszy tym większy dodatek.

Figure 3. DPV signals in 0.1 mol/dm<sup>3</sup> KCl for juices adulterated with various GFS additives: (A) cathodic waveforms for 0% - 10% additives; (B) cathodic waveforms for additives 0% - 50%; (C) anodic waveforms for additives 0% - 10%; (D) anodic waveforms for additives 0% - 50%. Data projections to the PC1/PC2 plane: (E) for anodic scans, GFS 0% - 10% additives; (F) for cathodic scans, GFS additives 0% - 50%. The shades of colors correspond to the subsequent GFS additives, the lighter the larger the addition.

#### 4.3. Profilowanie miodów z wykorzystaniem czterodyskowych elektrod metalicznych oraz strategii computer vision

W pierwszym etapie eksperymentów dotyczących profilowania miodów wykorzystano 12 miodów pochodzących z jednej pasieki zbieranych przez cały okres miodobrania w sezonie 2021. Ich profile zarejestrowano z wykorzystaniem techniki DPV rejestrując prąd z częstotliwością 1 kHz (rysunek 4). Jako elektrody pracujące wykorzystano q-DIrE, q-DPtE oraz q-DIrPtE. W tym eksperymencie zrezygnowano z zastosowania elektrolitu podstawowego, ponieważ roztwór miodu zapewniał odpowiednie przewodnictwo prądu konieczne do przeprowadzenia tego eksperymentu. Dane z każdej serii pomiarów analizowano oddzielnie z wykorzystaniem algorytmu PCA. Dla danych uzyskiwanych z zastosowaniem elektrod q-DIrE oraz q-DPtE nie było możliwe uzyskanie modelu, który umożliwiłby uzyskanie jednorodnych grup dla każdego z miodów, natomiast w przypadku serii danych uzyskanych z zastosowaniem elektrody q-DIrPtE taka możliwość istnieje. Dla potwierdzenia możliwości profilowania miodów, zdefiniowano bardziej zaawansowane modele z wykorzystaniem konwolucyjnych sieci neuronowych o specjalnie zaprojektowanej architekturze. Dzięki temu działaniu uzyskano modele cechujące się 100% dokładnością klasyfikacji.



Rysunek 4. Anodowe profile miodów zarejestrowane dla miodu wrzosowego z zastosowaniem trzech elektrod: (A) sygnał zarejestrowany z częstotliwością 1kHz; (B) powiększenie fragmentu sygnału zaznaczonego na (A); (C) sygnał z (A) przedstawiony jako voltamperogram DPV; (D) drugie powiększenie fragmentu sygnału zaznaczonego na (A). Kolory voltamperogramów: czerwony to q-DIrE, niebieski q-DPtE, natomiast czarny to q-DIrPtE.

Figure 4. Honey anodic profiles recorded for heather honey using three electrodes: (A) signal recorded at a frequency of 1kHz; (B) enlarging the fragment of the signal marked on (A); (C) signal from (A) presented as a DPV voltammogram; (D) the second enlargement of the fragment of the signal marked on (A). The colors of the voltammograms: red is q-DIrE, blue is q-DPtE, and black is q-DIrPtE.

W drugim etapie wyselekcjonowano miód gryczany, który charakteryzował się najbardziej rozbudowanym profilem. Miód ten zmieszano z miodem sztucznym w 11 różnych proporcjach (od 5% do 50%, co 5%). Tak przygotowane próbki poddano analizie w celu możliwości oszacowania domieszkowania miodu naturalnego miodem sztucznym w dwóch wariantach: próbki nie poddane procesowi mineralizacji UV oraz te oddane mineralizacji UV. W pierwszym etapie wykorzystano technikę DPV oraz elektrodę q-DIrPtE do zarejestrowania odpowiednich serii pomiarowych. Uzyskane profile wykorzystano do budowy modeli regresyjnych z wykorzystaniem algorytmów PCR, PLS oraz SVR (maszyna wektorów wspierających w wariancie regresyjnym, ang. Support Vector Regression). Wytrenowane modele charakteryzowały się wysoką jakością, niskim błędem predykcji przy wysokiej wartości współczynnika korelacji. W najlepszym wariancie błąd średniokwadratowy predykcji wyniósł ok 0,25%. W drugim etapie do analizy dodatków miodu sztucznego do naturalnego wykorzystano strategię *computer*

*vision*. W tym celu smartphonem wykonywano zdjęcia próbek miodu wykorzystywanych w poprzedniej części eksperymentu. Do analizy tych danych zastosowano model sieci neuronowych o odpowiedniej architekturze. W najlepszym wariancie błąd średniokwadratowy predykcji wynosił ok 0,5%.

#### **4.4. Profilowanie napojów izotonicznych z wykorzystaniem czterodyskowych elektrod metalicznych oraz metaliczno-węglowych**

W kolejnym eksperymencie badano napoje izotoniczne i analizowano wpływ barwników na ich profil woltamperometryczny. W tym celu wyselekcjonowano 5 napojów izotonicznych, w składzie których występowały barwniki powszechnie stosowane w tego typu produktach, tj. E102 (tartrazyna), E110 (żółcień pomarańczowa) oraz E133 (błękit brylantowy). Do rejestracji profili woltamperometrycznych wykorzystano trzy elektrody typu VET o mieszanych powierzchniach pracujących: q-DIrPtE, q-DIrGCE oraz q-DPtGCE. Profile uzyskano z wykorzystaniem techniki woltamperometrii fali prostokątnej SWV (ang. Square Wave Voltammetry) oraz innowacyjnej techniki podwójnie próbkowanej woltamperometrii fali prostokątnej DSSWV (ang. Double Sampled Square Wave Voltammetry). Do ich interpretacji wykorzystano analizę skupień oraz cztery współczynniki wiarygodności grupowania, czyli indeks Calinskigo – Harabasa, indeks Daviesa – Bouldinga oraz indeks Silhouette, a także gap statistics. Obliczenie współczynników wiarygodności grupowania miało na celu wyselekcjonowanie optymalnego układu, czyli typu elektrody pracującej, rodzaju profilu i techniki interpretacyjnej. Za najkorzystniejszy układ uznano profile katodowe zarejestrowane z użyciem elektrody q-DIrPtE z wykorzystaniem techniki DSSWV. Dla potwierdzenia otrzymanego wyniku wykonano analizę PCA. Rzut danych na płaszczyznę pierwszych dwóch głównych składowych opisujących prawie 95% zmienności uwidacznia homogeniczne grupowanie obiektów.

#### **4.5. Profilowanie napojów roślinnych z wykorzystaniem piceinowej elektrody pastowej**

Ze względu na rosnącą popularność diet wykluczających produkty odzwierzęce, zamienniki tradycyjnego mleka krowiego są coraz częściej produkowane i kupowane. W pracy wykorzystano 9 komercyjnie dostępnych napojów roślinnych, z których żaden nie zawierał dodatku cukru. Napoje zostały dobrane tak, aby ich składniki reprezentowały wszystkie 5 grup roślin, z których wytwarza się te produkty. W celach porównawczych wykorzystano również dwa mleka krowie dostępne komercyjnie oraz 5 rodzajów mleka roślinnego uzyskanego w laboratoryjnych warunkach. Do rejestracji profili woltamperometrycznych wykorzystano technikę DPV z zastosowaniem elektroda z pasty węglowej ze spoiwem piceinowym PWPCE (ang. Picein Wax Carbon Paste Electrode) jako elektrody pracującej. W tym eksperymencie koniecznym okazało się zastosowanie elektrolitu podstawowego, którym był 0,1 mol/dm<sup>3</sup> bufor amonowy o pH=9,0. Profile rejestrowano w szerokim oknie potencjałów, czyli od -1200mV do 1000 mV. Dla każdej z próbek zarejestrowano 15 przebiegów cyklicznych (profile anodowe oraz katodowe).

Analizy widm dokonano w oparciu o analizę głównych składowych. W pierwszym etapie porównano widma napojów roślinnych dostępnych komercyjnie. Rzut danych na płaszczyznę PC1/PC2 opisującej ponad 61% zmienności pokazuje, że napoje grupują się w jednorodne homogeniczne zbiory, co można uznać za zadowalający efekt działania algorytmu. W drugim etapie porównano mleka roślinne dostępne komercyjnie z ich odpowiednikami uzyskanymi w warunkach laboratoryjnych. Rzut danych na płaszczyznę PC1/PC2 opisującej ponad 76% zmienności pokazuje, że istnieją wyraźne różnice w napojach uzyskanych w warunkach laboratoryjnych, a ich komercyjnymi odpowiednikami. Może to być spowodowane tym, że mleka wytworzone w laboratorium były przygotowywane bezpośrednio przed profilowaniem. Wobec czego mogły zawierać substancję, które w czasie mogą ulegać degradacji. W trzecim etapie porównano roślinne mleka komercyjne z mlekiem krowim. W wyniku profilowania stwierdzono, że profile mlek krowich wyraźnie różnią się od wszystkich profili mlek roślinnych. Dla potwierdzenia obserwacji wykonano analizę PCA. Analiza rzutu danych na płaszczyznę dwóch pierwszych składowych opisujących ponad 81% zmienności potwierdziła wcześniejsze obserwacje.

## PODSUMOWANIE I WNIOSKI

W pracy opisano możliwości wykorzystania technik voltamperometrycznych oraz metod chemometrycznych do profilowania produktów spożywczych. Każde z zagadnień porusza tematy związane z analizą wielowymiarową, od metod uczenia maszynowego nienadzorowanego, po zaawansowane algorytmy głębokiego uczenia, w tym sieci neuronowe. W badaniach szczególną uwagę poświęcono różnorodnym produktom spożywczym, analizując ich charakterystykę przy użyciu różnych elektrod oraz technik chemometrycznych.

Wyniki badań wskazują na wysoką efektywność voltamperometrycznego języka elektronicznego (VET) w identyfikacji pochodzenia i jakości produktów spożywczych. W szczególności, zastosowanie wieloelektrodowych sensorów metalicznych oraz węglowo-metalicznych, jak również algorytmów chemometrycznych, umożliwia skuteczne modelowanie wielowymiarowe. W analizie różnych produktów spożywczych, takich jak wina, soki, miody, czy mleka roślinne, zastosowanie zaawansowanych metod optymalizacji sygnału i strategii interpretacyjnych pozwoliło na uzyskanie precyzyjnych i powtarzalnych wyników, istotnych z punktu widzenia dalszych badań nad profilowaniem żywności.

Wyniki eksperymentów wskazują na znaczenie stosowania odpowiednich narzędzi analitycznych, takich jak zaawansowane sensory oraz techniki *machine learning*, zarówno nadzorowane, jak i nienadzorowane. Zastosowanie tych metod pozwala na precyzyjne modelowanie i przewidywanie parametrów jakościowych produktów spożywczych. Dodatkowo, strategie oparte na technikach *computer vision* stanowią

interesującą alternatywę dla tradycyjnych metod laboratoryjnych, umożliwiając analizę cech produktów bez konieczności przeprowadzania fizycznych eksperymentów.

## PODZIĘKOWANIE

Projekt badawczy finansowany ze środków programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” w AGH.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Wentzell, P.D.; Brown, C.D. Signal Processing in Analytical Chemistry. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; Wiley, 2000; pp. 9764
- [2] Brown, S.D.; Blank, T.B.; Sum, S.T.; Weyer, L.G. Chemometrics. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 315
- [3] Wold, S. Chemometrics; What Do We Mean with It, and What Do We Want from It? *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1995**, *30*, 109
- [4] Joshi, P.B. Navigating with Chemometrics and Machine Learning in Chemistry. *Artif. Intell. Rev.* **2023**, *56*, 9089
- [5] Cetó, X.; Pérez, S.; Prieto-Simón, B. Fundamentals and Application of Voltammetric Electronic Tongues in Quantitative Analysis. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2022**, *157*
- [6] Wei, Z.; Yang, Y.; Wang, J.; Zhang, W.; Ren, Q. The Measurement Principles, Working Parameters and Configurations of Voltammetric Electronic Tongues and Its Applications for Foodstuff Analysis. *J. Food Eng.* **2018**, *217*, 75
- [7] Leon-Medina, J.X.; Cardenas-Flechas, L.J.; Tibaduiza, D.A. A Data-Driven Methodology for the Classification of Different Liquids in Artificial Taste Recognition Applications with a Pulse Voltammetric Electronic Tongue. *Int. J. Distrib. Sens. Networks* **2019**, *15*, 155014771988160
- [8] Lu, L.; Hu, Z.; Hu, X.; Li, D.; Tian, S. Electronic Tongue and Electronic Nose for Food Quality and Safety. *Food Res. Int.* **2022**, *162*, 112214
- [9] Buratti, S.; Benedetti, S.; Scampicchio, M.; Pangerod, E.C. Characterization and Classification of Italian Barbera Wines by Using an Electronic Nose and an Amperometric Electronic Tongue. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *525*, 133
- [10] Bond, A.M.; Zhang, J.; Gundry, L.; Kennedy, G.F. Opportunities and Challenges in Applying Machine Learning to Voltammetric Mechanistic Studies. *Curr. Opin. Electrochem.* **2022**, *34*, 101009
- [11] Molinara, M.; Cancelliere, R.; Di Tinno, A.; Ferrigno, L.; Shuba, M.; Kuzhir, P.; Maffucci, A.; Micheli, L. A Deep Learning Approach to Organic Pollutants Classification Using Voltammetry. *Sensors* **2022**, *22*, 8032
- [12] Aslam, R.; Sharma, S.R.; Kaur, J.; Panayampadan, A.S.; Dar, O.I. A Systematic Account of Food Adulteration and Recent Trends in the Non-Destructive Analysis of Food Fraud Detection. *J. Food Meas. Charact.* **2023**, *17*, 3094
- [13] Ni Mhurchu, C.; Eyles, H.; Jiang, Y.; Blakely, T. Do Nutrition Labels Influence Healthier Food Choices? Analysis of Label Viewing Behaviour and Subsequent Food Purchases in a Labelling Intervention Trial. *Appetite* **2018**, *121*, 360
- [14] Danezis, G.P.; Tsagkaris, A.S.; Camin, F.; Brusci, V.; Georgiou, C.A. Food Authentication: Techniques, Trends & Emerging Approaches. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *85*, 123
- [15] Rauber, F.; Campagnolo, P.D.B.; Hoffman, D.J.; Vitolo, M.R. Consumption of Ultra-Processed Food Products and Its Effects on Children's Lipid Profiles: A Longitudinal Study. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2015**, *25*, 116
- [16] Rauber, F.; Da Costa Louzada, M.L.; Steele, E.; Millett, C.; Monteiro, C.A.; Levy, R.B. Ultra-Processed Food Consumption and Chronic Non-Communicable Diseases-Related Dietary Nutrient Profile in the UK (2008–2014). *Nutrients* **2018**, *10*, 587
- [17] Pagliai, G.; Dinu, M.; Madarena, M.P.; Bonaccio, M.; Iacoviello, L.; Sofi, F. Consumption of Ultra-Processed Foods and Health Status: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Br. J. Nutr.* **2021**, *125*, 308
- [18] Granato, D.; Santos, J.S.; Escher, G.B.; Ferreira, B.L.; Maggio, R.M. Use of Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) for Multivariate Association between Bioactive Compounds and Functional Properties in Foods: A Critical Perspective. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *72*, 83
- [19] Medina, S.; Perestrelo, R.; Silva, P.; Pereira, J.A.M.; Câmara, J.S. Current Trends and Recent

- Advances on Food Authenticity Technologies and Chemometric Approaches. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *85*, 163
- [20] Semeniuć, C.A.; Mureşan, V. Spectroscopic, Chromatographic, and Chemometric Techniques Applied in Food Products Characterization. *Separations* **2023**, *10*, 55
- [21] Azcarate, S.M.; Martínez, L.D.; Savio, M.; Camiña, J.M.; Gil, R.A. Classification of Monovarietal Argentinean White Wines by Their Elemental Profile. *Food Control* **2015**, *57*, 268
- [22] Huang, X.-Y.; Jiang, Z.-T.; Tan, J.; Li, R. Geographical Origin Traceability of Red Wines Based on Chemometric Classification via Organic Acid Profiles. *J. Food Qual.* **2017**, *2017*, 1
- [23] Shand, C.A.; Wendler, R.; Dawson, L.; Yates, K.; Stephenson, H. Multivariate Analysis of Scotch Whisky by Total Reflection X-Ray Fluorescence and Chemometric Methods: A Potential Tool in the Identification of Counterfeits. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *976*, 14
- [24] Teodoro, J.A.R.; Pereira, H.V.; Sena, M.M.; Piccin, E.; Zacca, J.J.; Augusti, R. Paper Spray Mass Spectrometry and Chemometric Tools for a Fast and Reliable Identification of Counterfeit Blended Scottish Whiskies. *Food Chem.* **2017**, *237*, 1058
- [25] Tosato, F.; Correia, R.M.; Oliveira, B.G.; Fontes, A.M.; França, H.S.; Coltro, W.K.T.; Filgueiras, P.R.; Romão, W. Paper Spray Ionization Mass Spectrometry Allied to Chemometric Tools for Quantification of Whisky Adulteration with Additions of Sugarcane Spirit. *Anal. Methods* **2018**, *10*, 1952
- [26] Roullier-Gall, C.; Signoret, J.; Coelho, C.; Hemmler, D.; Kajdan, M.; Lucio, M.; Schäfer, B.; Gougeon, R.D.; Schmitt-Kopplin, P. Influence of Regionality and Maturation Time on the Chemical Fingerprint of Whisky. *Food Chem.* **2020**, *323*, 126748
- [27] Palmioli, A.; Alberici, D.; Ciarrelli, C.; Airoldi, C. Metabolomic Profiling of Beers: Combining 1H NMR Spectroscopy and Chemometric Approaches to Discriminate Craft and Industrial Products. *Food Chem.* **2020**, *327*, 127025
- [28] Forleo, T.; Zappi, A.; Gottardi, F.; Melucci, D. Rapid Discrimination of Italian Prosecco Wines by Head-Space Gas-Chromatography Basing on the Volatile Profile as a Chemometric Fingerprint. *Eur. Food Res. Technol.* **2020**, *246*, 1805
- [29] Rossi, L.; Foschi, M.; Biancolillo, A.; Maggi, M.A.; D'Archivio, A.A. Optimization of HS-SPME-GC/MS Analysis of Wine Volatiles Supported by Chemometrics for the Aroma Profiling of Trebbiano d'Abruzzo and Pecorino White Wines Produced in Abruzzo (Italy). *Molecules* **2023**, *28*, 1534
- [30] Ma, G.; Zhang, Y.; Zhang, J.; Wang, G.; Chen, L.; Zhang, M.; Liu, T.; Liu, X.; Lu, C. Determining the Geographical Origin of Chinese Green Tea by Linear Discriminant Analysis of Trace Metals and Rare Earth Elements: Taking Dongting Biluochun as an Example. *Food Control* **2016**, *59*, 714
- [31] Mehari, B.; Redi-Abshiro, M.; Chandravanshi, B.S.; Combrinck, S.; McCrindle, R.; Atlabachew, M. GC-MS Profiling of Fatty Acids in Green Coffee (<sc> Coffea Arabica </Scp> L.) Beans and Chemometric Modeling for Tracing Geographical Origins from Ethiopia. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 3811
- [32] Monteiro, P.I.; Santos, J.S.; Rodionova, O.Y.; Pomerantsev, A.; Chaves, E.S.; Rosso, N.D.; Granato, D. Chemometric Authentication of Brazilian Coffees Based on Chemical Profiling. *J. Food Sci.* **2019**, *84*, 3099
- [33] Marek, G.; Dobrzański, B.; Oniszczyk, T.; Combrzyński, M.; Ćwikła, D.; Rusinek, R. Detection and Differentiation of Volatile Compound Profiles in Roasted Coffee Arabica Beans from Different Countries Using an Electronic Nose and GC-MS. *Sensors* **2020**, *20*, 2124
- [34] Núñez, N.; Collado, X.; Martínez, C.; Saurina, J.; Núñez, O. Authentication of the Origin, Variety and Roasting Degree of Coffee Samples by Non-Targeted HPLC-UV Fingerprinting and Chemometrics. Application to the Detection and Quantitation of Adulterated Coffee Samples. *Foods* **2020**, *9*, 378
- [35] Abdelwareth, A.; Zayed, A.; Farag, M.A. Chemometrics-Based Aroma Profiling for Revealing Origin, Roasting Indices, and Brewing Method in Coffee Seeds and Its Commercial Blends in the Middle East. *Food Chem.* **2021**, *349*, 129162
- [36] Zou, Y.; Gaida, M.; Franchina, F.A.; Stefanuto, P.-H.; Focant, J.-F. Distinguishing between Decaffeinated and Regular Coffee by HS-SPME-GC×GC-TOFMS, Chemometrics, and Machine Learning. *Molecules* **2022**, *27*, 1806
- [37] Farag, M.A.; Mohamed, T.A.; El-Hawary, E.A.; Abdelwareth, A. Metabolite Profiling of Premium Civet Luwak Bio-Transformed Coffee Compared with Conventional Coffee Types, as Analyzed Using Chemometric Tools. *Metabolites* **2023**, *13*, 173
- [38] Yang, P.; Zhu, Y.; Yang, X.; Li, J.; Tang, S.; Hao, Z.; Guo, L.; Li, X.; Zeng, X.; Lu, Y. Evaluation of Sample Preparation Methods for Rice Geographic Origin Classification Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *J. Cereal Sci.* **2018**, *80*, 111
- [39] Coelho, I.; Matos, A.S.; Teixeira, R.; Nascimento, A.; Bordado, J.; Donard, O.; Castanheira, I. Combining Multielement Analysis and Chemometrics to Trace the Geographical Origin of Rocha Pear. *J. Food Compos. Anal.* **2019**, *77*, 1

- [40] Gazeli, O.; Bellou, E.; Stefas, D.; Couris, S. Laser-Based Classification of Olive Oils Assisted by Machine Learning. *Food Chem.* **2020**, *302*, 125329

Praca wpłynęła do Redakcji 18 listopada 2024 r.



**Laureaci nagrody ufundowanej przez MS Spektrum  
za najlepszą rozprawę doktorską z analitycznej  
spektrometrii**

---

---



**UKŁADY ŁĄCZONE OPARTE NA DETEKCJI PRZY  
UŻYCIU OPTYCZNEJ SPEKTROMETRII  
EMISYJNEJ W OZNACZANIU FORM  
METALI I METALOIDÓW**

**HYPHENATED SYSTEMS BASED ON DETECTION BY  
OPTICAL EMISSION SPECTROMETRY  
IN DETERMINATION OF METALS  
AND METALLOIDS SPECIES**

**Jędrzej Proch**

*Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama  
Mickiewicza w Poznaniu, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań  
e-mail: jedrzej.proch@amu.edu.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Wielokanałowy System Wprowadzenia Próbkki.
2. Wielokanałowy System Wprowadzania Próbek jako generator wodorków w układach łączonych
3. Wielokanałowy System Wprowadzania Próbek w układach łączonych jako konwecyjonalna komora mgielna
4. Wielokanałowy System Wprowadzania Próbek w trybie podwójnym jako interfejs w układach łączonych
5. Analiza specjacyjna yerba mate za pomocą opracowanych technik łączonych

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr Jędrzej Proch** ukończył studia licencjackie (2015) i magisterskie (2017) na kierunku chemia (specjalność: chemia kosmetyczna) na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w 2022 roku, a jego rozprawa została nagrodzona przez Komitet Chemii Analitycznej PAN w 2024 roku w konkursie na najlepszą rozprawę doktorską z analitycznej spektrometrii. Obecnie pracuje na stanowisku adiunkta na dwóch wydziałach UAM: Wydziale Chemii (Zakład Chemii Analitycznej) i Wydziale Archeologii. Realizowanie przez niego badania związane są z wielopierwiastkową analiza próbek różnego pochodzenia, badaniami specjacji metali, metaloidów i niemetalu, technikami łączonymi, archeometrią oraz badaniem yerba mate.



<https://orcid.org/0000-0003-0023-044X>

## ABSTRACT

Hydride generation (HG) has become a widely used technique for efficient analyte introduction in optical emission spectrometry, although only few hyphenated systems using this technique have been developed. It was decided to fill this gap using a modified spray chamber that allows with conventional nebulizer and/or as hydride generator, i.e. the Multi-mode Sample Introduction System (MSIS).

The MSIS unit was used as an interface between high-performance liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) or microwave induced plasma optical emission spectrometry (MIP OES). In this way, hyphenated techniques were designed, based on three modes of operation of the MSIS chamber: (1) hydride generation for the determination of metalloid species occurring as anions and forming volatile hydrides, (2) conventional sputtering for the determination of metal species occurring as cations, and (3) dual mode for the simultaneous determination of metal and metalloid species occurring as cations and anions.

The article is based on the doctoral dissertation of Jędrzej Proch entitled: "Hyphenated systems based on detection by optical emission spectrometry in determination of metals and metalloids species", distinguished by the Discipline Council of Chemical Sciences at Adam Mickiewicz University and awarded by the Committee of Analytical Chemistry of the Polish Academy of Sciences in 2024 in the competition for the best doctoral dissertation in analytical spectrometry, the prize funded by MS Spektrum.

**Keywords:** Multi-mode Sample Introduction System, hyphenated technique, high-performance liquid chromatography, inductively coupled plasma optical emission spectrometry, hydride generation

**Słowa kluczowe:** Wielokanałowy System Wprowadzania Próbek, technika łączona, wysokosprawna chromatografia cieczowa, optyczna spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w plazmie sprężonej indukcyjnie, generacja wodorków

---

---

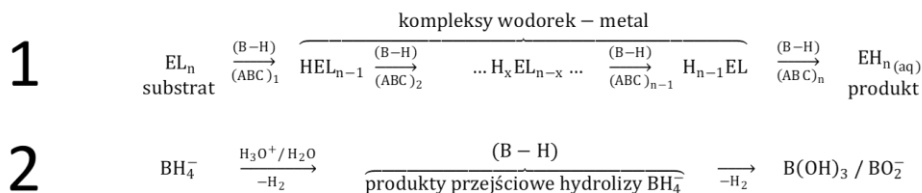
**WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

<b>AAS</b>	– atomowa spektrometria absorbcyjna (ang. atomic absorption spectrometry);
<b>CF</b>	– przepływ ciągły (ang. continuous flow);
<b>CVG</b>	– generowanie par chemicznych (ang. chemical vapor generation);
<b>DMA</b>	– dimetyloarseniany (ang. dimethylarsinate, cacodylate);
<b>DHGN</b>	– rozpylacz do bezpośredniego generowania wodorków (ang. direct hydride generation nebulizer);
<b>FI</b>	– przepływ wstrzykowy (ang. flow injection),
<b>FBMN</b>	– wielokanałowy rozpylacz <i>Flow Blurring®</i> ( <i>Flow Blurring®</i> Multi Nebulizer);
<b>HG</b>	– generowanie wodorków (ang. hydride generation);
<b>HPLC</b>	– wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. high performance liquid chromatography);
<b>SPE</b>	– ekstrakcja do fazy stałej (ang. solid phase extraction);
<b>ICP MS</b>	– spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie inductively coupled plasma mass spectrometry;
<b>ICP OES</b>	– optyczna spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ang. inductively coupled plasma optical emission spectrometry);
<b>LOD</b>	– granica wykrywalności (ang. limit of detection);
<b>MHGN</b>	– zmodyfikowany rozpylacz siatkowy Hildebranda (ang. modified Hildebrand grid nebulizer);
<b>MIP OES</b>	– optyczna spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej mikrofalowo (ang. microwave induced plasma optical emission spectrometry);
<b>MSIS</b>	– Wielokanałowy System Wprowadzenia Próbkki (ang. Multi-mode Sample Introduction System);
<b>PCA</b>	– analiza głównych składowych (ang. principal component analysis),
<b>RF</b>	– częstotliwość radiowa (ang. radio-frequency);
<b>SeMet</b>	– selenometionina (ang. selenomethionine);
<b>SVDV</b>	– synchroniczny pionowy podwójny podgląd plazmy (ang. Synchronous Vertical Dual View)
<b>μ-USN/QSC</b>	– mikroprzepływowy rozpylacz ultradźwiękowy z poczwórnym systemem mikrokapilarnym (ang. micro-flow ultrasonic nebulizer with quadruple-mode micro capillary system);

## WPROWADZENIE

Generowanie chemicznej pary (CVG) jest dalej rozwijane jako wydajny sposób wprowadzania próbki mimo, że od pierwszego użycia minęło prawie sześćdziesiąt lat [1]. Początkowo generowanie wodorków (HG) było łączone z atomową spektrometrią absorpcyjną (AAS), aby uniknąć trudności z atomizacją arsenu w palniku płomieniowym. Pomysł polegał na reakcji czynnika redukującego ze środowiskiem kwaśnym bezpośrednio przed wykonaniem pomiaru. W ten sposób, arsenowódor ( $\text{AsH}_3$ ) był generowany w reakcji cynku (Zn) z kwasem solnym (HCl) w pułapce z ciekłym azotem. Gdy pułapka została podgrzana,  $\text{AsH}_3$  był zbierany i przenoszony przez parę azotu do płomienia acetylenowo-powietrznego. Tę metodę nazwano „techniką próbkowania gazu” [2].

Z czasem zaprezentowano również inne procedury generowania lotnych wodorków, m.in. tetrahydroboran sodu ( $\text{NaBH}_4$ ) został po raz pierwszy zastosowany w 1972 r. jako roztwór redukujący [3]. Główną zaletą stosowania borowodorków była możliwość prostego dozowania odczynnika oraz automatyzacji całego procesu. W porównaniu do układu metal-kwas, redukcja pierwiastka w mieszaninie borowoderek-kwas była znacznie szybsza i wydajniejsza, a także pozwalała uzyskać niższe stężenie dla próby ślepej [4]. Ogólny model reakcji CVG/HG został niedawno przybliżony przez D’Ulivo (2019), dzięki czemu wiadomo, że powstawanie lotnych wodorków pierwiastków jest wynikiem dwóch konkurencyjnych ścieżek reakcji w mieszaninie borowoderek-kwas przedstawiono na Rysunku 1 [5].



Rysunek 1. Dwie konkurencyjne ścieżki reakcji CVG/HG: (1) derywatywacja, oraz (2) hydroliza anionu borowodorkowego. Podpisy: (E) pierwiastek zdolny do tworzenia lotnych wodorków; (L) ligand; (ABC) pośrednie związki kompleksowe analitu i boranu; (B-H) produkty pośrednie hydrolizy  $\text{BH}_4^-$  (zawierającymi co najmniej jedno wiązanie B-H). Rysunek inspirowany [5, 6].

Figure 1. Two competitive pathways of CVG/HG reaction: (1) derivatization and (2) hydrolysis of borohydride anion. Captions: (E) element available to form volatile hydrides; (L) ligand; (ABC) intermediates of analyte-borane complex; (B-H) intermediates of  $\text{BH}_4^-$  hydrolysis (containing at least one B-H bond). The figure based on ref. [5, 6].

Pierwsza ścieżka (1) obejmuje reakcje substratu ( $\text{EL}_n$ ) z anionami borowodorkowymi i/lub produktami pośrednimi (zawierającymi co najmniej jedno wiązanie B-H), które powstają podczas hydrolizy  $\text{BH}_4^-$  (ścieżka 2). Kompleks analit-boran (ABC) jest następnie formowany jako produkt pośredni, a atomy wodoru są przenoszone stopniowo z boranów do substratu ( $\text{EL}_n$ ), z utworzeniem kompleksów

wodorek–metal. W wyniku reakcji derywatywacji (ścieżka 1), produkt końcowy powstaje w fazie ciekłej ( $EH_{n(aq)}$ ). Jeśli  $EH_n$  ma wystarczającą stabilność termiczną (jak w przypadku  $AsH_3$  czy  $SbH_3$ ), wodorek jest przenoszony do fazy gazowej [5]. Powyższy mechanizm stanowi teoretyczną podstawę reakcji generowania wodorków (HG). W przypadku niektórych metali, np.  $Hg(II)$  i  $Cd(II)$ , produkt końcowy w fazie ciekłej ( $EH_{n(aq)}$ ) może zostać częściowo lub całkowicie rozłożony na wolne atomy ( $E^0$ ). Mechanizm ten stanowi podstawę reakcji generowania chemicznych par (CVG).

Wydajność reakcji CVG/HG w fazie ciekłej (Rysunek 1) jest związana z następującymi czynnikami: (1) stopień utlenienia pierwiastka, (2) rodzaj i stężenie roztworu reduktora, (3) rodzaj i stężenie kwaśnego środowiska, (4) pH roztworu, (5) rodzaj matrycy próbki, (6) obecność i stężenie pierwiastków zakłócających przebieg reakcji, (7) reaktywność pierwiastków tworzących wodorki, a także (8) technika CVG/HG [4]. Warto zaznaczyć, że optymalna technika CVG/HG powinna zapewnić wydajny transport związków lotnych, aby umożliwić rozkład termiczny stabilnych i lotnych wodorków po dotarciu do źródła atomizacji/wzbudzenia. Wśród sposobów na wprowadzenie próbki w technikach CVG/HG warto wyróżnić przepływ ciągły (CF) oraz przepływ wstrzykowy (FI). W technikach typu CF, wszystkie odczynniki (tj. roztwory próbki, kwasu i reduktora) są dostarczane oddzielnie przez pompę perystaltyczną do komory reakcyjnej, gdzie są mieszane. W następstwie tego formowane są lotne wodorki [7, 8]. W technikach typu FI, próbka jest wstrzykiwana przez zawór z pętlą do roztworu nośnego, który jest pompowany w sposób ciągły [9]. Oprócz wyżej wymienionych, na popularności zyskuje również łączenie technik CVG/HG z ekstrakcją w fazie stałej (SPE) [10, 11].

Niezależnie od techniki CVG/HG, istnieje potrzeba ciągłego rozwoju nowoczesnych i bardziej wydajnych generatorów, które doprowadzą m.in. do znacznego obniżenia granic wykrywalności (LOD) stosowanych metod. Przy projektowaniu prostej i powtarzalnej metody bazującej na CVG/HG, jednocześnie zapewniającej najkrótszy możliwy czas pojedynczej analizy, korzysta się z przepływu ciągłego. W ostatnich latach (2021–2024), większość systemów CF–CVG/HG korzysta z generatorów, które są zmodyfikowanymi komorami mgielnych [12–13], rozpylaczami koncentrycznymi [14], rozpylaczem zdolnym do bezpośredniego generowania wodorków, DHGN [15], wielokanałowym rozpylaczem Flow Blurring®, FBMN [16] oraz ultradźwiękowym, mikroprzepływowym rozpylaczem z poczwórnym systemem mikrokapilarnym,  $\mu$ –USN/QSC [17]. Poza tym, akcesoria zewnętrzne są dalej popularne, zarówno takie opracowywane w laboratoriach [18], jak również dostępne komercyjnie [19].

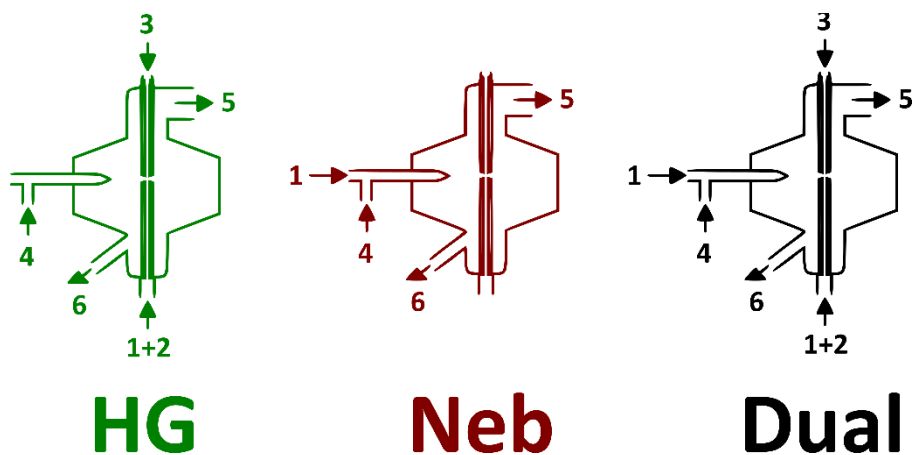
Niemniej, coraz częściej oznaczenie całkowitej zawartości pierwiastków jest niewystarczające. Aby sprostać kluczowym wyzwaniom współczesnej chemii analitycznej, należy sięgać po techniki łączone, tj. połączenie dwóch niezależnych aparatów, które razem zyskują nowe właściwości, np. chromatografia połączona ze spektrometrią atomową. W latach 2013–2020, zaprezentowano 43 systemy oparte na



CVG/HG w przepływie ciągłym, które bazowały na detekcji w optycznej spektrometrii emisyjnej, zarówno ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP) czy w plazmie indukowanej mikrofalowo (MIP) [6]. Co zaskakujące, większość ograniczała się jedynie do efektywnego wprowadzenia analitu, lecz niewiele z nich stanowiły układy łączone. Luka ta została wypełniona poprzez zaprojektowanie trzech układów łączonych zawierających najczęściej stosowany generator wodorków w latach 2013-2020, czyli Wielokanałowy System Wprowadzenia Próbkki (Multi-mode Introduction System, MSIS).

## 1. WIELOKANALOWY SYSTEM WPROWADZENIA PRÓBKKI

Wielokanałowy System Wprowadzenia Próbkki (dawniej Marathon Scientific, Canada, obecnie Agilent, USA), to zmodyfikowana komora mgielna, która ze względu na prostą konstrukcję i dostępność, przykuła uwagę wielu naukowców w ostatnich latach. Jej zaletą, w porównaniu z innymi typami generatorów, jest możliwość pracy w trzech wariantach (Rysunek 2).



Rysunek 2. Trzy tryby pracy Wielokanałowego Układu Wprowadzenia Próbkki: (HG) generowanie wodorków, (Neb) konwencjonalne rozpylanie, oraz (Dual) kombinacja trybów HG i Neb (tryb podwójny). Oznaczenia: (1) roztwór próbkki, (2) roztwór kwasu, (3) roztwór reduktora, (4) gaz nośny (rozpylacza), (5) do plazmy, (6) odprowadzenie

Figure 2. Three work modes of Multi-mode Sample Introduction System: (HG) hydride generation, (Neb) conventional nebulization, and (Dual) the combination of HG and Neb (dual-mode). Captions: (1) sample solution, (2) acid solution, (3) reductant solution, (4) carrier gas (nebulizer), (5) to the plasma, (6) drain.

W pierwszej konfiguracji (Rys. 2, HG), komora może generować wodorki w przepływie ciągłym dzięki zastosowaniu dwóch pionowych, stożkowatych kana-

łów, skierowanych ku sobie. W ten sposób można wprowadzić roztwory niezbędne do generowania chemicznych par lub wodorków. Borowoderek sodu (lub potasu) jest najczęściej dostarczany kanałem górnym, a dolnym – kwas chlorowodorowy wraz z roztworem próbki. Kiedy roztwory mieszają się na wyjściu tych kanałów w samym centrum komory, tworzące się lotne wodorki pierwiastków zostają wprowadzone do palnika przy wsparciu gazu nośnego (argonu, dostarczanego przez rozpylacz). W trybie HG, rozpylacz nie wprowadza roztworu, dostarcza jedynie gaz. W drugiej konfiguracji (Rys. 2, Neb), kanały wprowadzające roztwory kwasu i borowodorku nie są używane, a roztwór próbki wprowadzany jest przez rozpylacz, podobnie do konwencjonalnego układu wprowadzenia próbki stosowanego w optycznej spektrometrii emisyjnej. Z kolei, trzeci tryb pracy komory (Rys. 2, Dual) stanowi połączenie dwóch poprzednich, tj. pozwala na równoczesną pracę jednostki MSIS jako generator wodorków oraz komora mgielna z rozpylaczem koncentrycznym.

Pierwsze zastosowanie ciągłego przepływu HG–ICP OES przedstawiono już pod koniec lat 70. XX wieku, kiedy HG wykorzystano do wydajnego wprowadzania niektórych pierwiastków, np. As, Bi, Sb, Se i Te [20] do palnika plazmowego, stosując  $\text{NaBH}_4$  jako roztwór reduktora. Z kolei, pierwsze doniesienia o zastosowaniu Wielokanałowego Systemu Wprowadzenia Próbkę i jego trybów pracy pochodzą z 2002 r. [21]. Od tego czasu, komora MSIS została sprzężona z różnymi typami spektrometrów, np. spektrometrią mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP MS) [22], ICP OES [23], MIP OES [24] czy AAS [25]. Choć nowe metody, oparte na Wielokanałowym Systemie Wprowadzenia Próbkę, pozwoliły na oznaczenie coraz większej liczby pierwiastków (w tym metali szlachetnych [26]), większość z nich koncentrowała się na określeniu całkowitej zawartości pierwiastków. Metody oznaczania form pierwiastków były stosowane zazwyczaj w formie niechromatograficznej, opartej na dodatkowych procedurach przygotowania próbki (np. wstępnej redukcji) [27, 28]. Niemniej zaprezentowano też dwa układy łączone z detekcją w optycznej spektrometrii emisyjnej, korzystające z komory MSIS. W 2009 roku, opisano pierwsze zastosowanie MSIS w trybie HG jako interfejsu między wysokosprawną chromatografią cieczą (HPLC), a ICP OES do oznaczenia czterech form arsenu w glebach [29]. Z kolei w 2016 roku, zaprezentowano HPLC–MSIS–MIP OES (z  $\text{N}_2$  jako gazem plazmowym) w celu oznaczenia zawartości Se(IV) (w formie seleninów) i selenometioniny (SeMet) w biofortyfikowanych drożdżach [30].

Niestety w obu procedurach można dostrzec pewne ograniczenia lub niedociągnięcia: (1) długa procedura przygotowania próbki (24 h), (2) przepływ gradientowy HPLC, (3) przebadano wyłącznie gleby zanieczyszczone [29], (4) dodatkowa cewka reakcyjna pomiędzy HPLC i MSIS, (5) odczynniki postkolu-

mnowe do etapu wstępnego utleniania, a także (6) metoda została sprawdzona wyłącznie dla drożdży wzbogaconych w selen [30]. Podsumowując powyższe informacje, sprowadzenie komory MSIS do roli łącznika w układach łączonych, tj. pomiędzy wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC) oraz optyczną spektrometrią emisyjną (OES) okazało się tropem godnym rozwinięcia. W tym celu, podjęto badania wszystkich trzech trybów pracy komory:

- Najpierw zastosowano MSIS jako generator wodorków (HG), tworząc układ łączony do oznaczenia form pierwiastków występujących jako aniony oraz tworzących lotne wodorki [31].
- Następnie zastosowano MSIS jako konwencjonalną komorę mgielną (Neb), tworząc dwa układy łączone do oznaczenia form pierwiastków występujących jako kationy oraz nietworzące wodorków [32].
- Na końcu zastosowano MSIS w trybie podwójnym (Dual), łącząc metody z dwóch wcześniejszych prac [31-32] w jeden układ łączony zdolny do oznaczenia form pierwiastków występujących zarówno jako kationy i aniony [33].

## **2. WIELOKANAŁOWY SYSTEM WPROWADZANIA PRÓBEK JAKO GENERATOR WODORKÓW W UKŁADACH ŁĄCZONYCH**

Pierwszym etapem projektowania układów łączonych z komorą MSIS jako łącznikiem chromatografii i spektrometrii, była optymalizacja pracy komory w trybie generowania wodorków (HG). W tym przypadku chromatografia była reprezentowana przez anionowymienną HPLC, zaś spektrometria – przez ICP OES. System miał zostać wykorzystany do oznaczenia trzech form arsenu: arseninów [As(III)], arsenianów [As(V)] i kwasu dimetyloarsynowego (DMA) w próbkach środowiskowych oraz żywności. W porównaniu z systemami opisanymi wcześniej w literaturze, brakowało nowej techniki łączonej wykorzystującej MSIS (w trybie HG) jako interfejs między HPLC i ICP OES do określania niektórych form pierwiastków, bez żadnych odczynników pokolumnowych i dodatkowych cewek reakcyjnych. Ponadto, aplikacyjność musiała być szeroka (zaprezentowana na kilku grupach rzeczywistych próbek), poprzedzona prostą i krótkotrwałą procedurą przygotowania próbki. Dlatego zaletami nowej metody (HPLC–HG–ICP OES) były: powtarzalna konstrukcja (system opierał się wyłącznie na częściach dostępnych komercyjnie), uniknięcie odczynników pokolumnowych, prosta procedura przygotowania próbki i krótki czas analizy.

Opracowanie metody HPLC–HG–ICP OES składało się z etapu optymalizacji, walidacji i aplikacji. Optymalizacja komory MSIS w trybie HG przebiegała dwuetapowo. Najpierw przeprowadzono złożoną optymalizację bez połączenia HPLC (jako HG–ICP OES). Tutaj optymalizowanymi parametrami były długość

fali analitycznej (linii emisyjnej), przepływ gazu plazmowego, a także stężenia odczynników (Tabela 1). Po tym etapie, HPLC zostało połączone z układem HG–ICP OES (poprzez łącznik T, do dolnego kanału dostarczającego roztwór HCl), po czym zoptymalizowano stężenie fazy ruchomej (bufor fosforanowy). Aplikacja metody została zaprezentowana na trzech grupach próbek rzeczywistych: (1) glebie zlokalizowanej w pobliżu składowiska odpadów przemysłowych, (2) częściach 2–letnich dębów szypułkowych (*Quercus robur*) rosnących w roztworze wzbogaconym o formy arsenu oraz (3) yerba mate (*Ilex paraguariensis*), dostępnej na polskim rynku.

Zastosowanie Wielokanałowego Systemu Wprowadzenia Próbkę jako generatora wodorków i łącznika pomiędzy HPLC i ICP OES pozwoliło na zaprojektowanie nowej techniki łączonej, która opierała się wyłącznie na dostępnych komercyjnie częściach, unikając odczynników pokolumnowych. Trzy formy arsenu można było oznaczyć w stosunkowo krótkim czasie (do 400 s) przy znacznie niższych LOD i wysokiej precyzji. Wyniki były porównywalne z wynikami innych technik CVG/HG sprzężonych z OES na bazie plazmy. Podsumowując powyższe, badanie stało się pierwszym krokiem w ocenie MSIS jako interfejsu w technikach łączonych. Wyniki badań opublikowano w pierwszym artykule naukowym, wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej [31].

Tabela 1. Parametry badane podczas optymalizacji układu łączonego (HPLC–HG–ICP OES). Optymalne warunki pracy są podkreślone.

Table 1. Parameters studied during the optimization of the hyphenated system (HPLC–HG–ICP OES). Optimal operating conditions are underlined.

<b>HPLC–HG–ICP OES</b>	
Typ kolumny (model)	anionowymienna (Supelco LC–SAX–1)
Typ eluent (pH)	Bufor fosforanowy (6.0±0.2)
Kompozycja eluenta [mmol L <sup>-1</sup> ]	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (12.5, <u>25</u> , 50), Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1.25, <u>2.5</u> , 5.0)
Przepływ eluenta [mL min <sup>-1</sup> ]	<u>2.0</u>
MSIS (tryb pracy komory)	HG
Stężenie NaBH <sub>4</sub> [%, w/v]	0.10, 0.25, 0.50, 0.75, <u>1.00</u> , 1.25, 1.50
Stężenie HCl [mol L <sup>-1</sup> ]	0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.50, <u>5.00</u>
Moc generatora RF [kW]	1.45
Przepływ gazu plazmowego [L min <sup>-1</sup> ]	<u>12</u> , 15, 18
Podgląd plazmy	<u>osiowy</u>
Analityczna długość fali [nm]	As 188.980, As 193.696, As 197.198, <u>As 228.812</u> , As 232.984

### 3. WIELOKANALOWY SYSTEM WPROWADZANIA PRÓBEK W UKŁADACH ŁĄCZONYCH JAKO KONWENCJONALNA KOMORA MGIELNA

Z jednej strony, tryb podwójny i tryb HG komory MSIS dają pewne zalety w porównaniu z konwencjonalnym rozpylaniem, dlatego są częściej stosowane niż tryb Neb. Z drugiej strony, tryb podwójny nie może być skutecznie stosowany bez uprzedniej optymalizacji warunków pracy w trybie Neb. Ponadto udane połączenie HPLC i ICP OES poprzez MSIS skłoniło do próby bezpośredniego podłączenia wyjścia kolumny do rozpylacza. W ten sposób można było zaprojektować kolejną nową technikę łączoną. Ze względu na to, że większość pierwiastków występuje w roztworze jako kationy (np. żelazo), zmieniono również typ kolumny HPLC na kationowymienną.

Najciekawszym pierwiastkiem, występującym w kilku formach jako kation, okazało się żelazo (Fe), występujące w dwóch stabilnych formach,  $Fe^{2+}$  i  $Fe^{3+}$ . Ponadto żelazo jest czwartym najliczniejszym pierwiastkiem w skorupie ziemskiej, a cykl żelaza obserwowano w organizmach żywych, jak również w środowisku [34]. Zgodnie z tym analiza specjacyjna żelaza wydawała się być jednym z głównych wyzwań w chemii analitycznej lub środowiskowej. Niedobór nowych metod łączonych, służących do szybkiego oznaczania form żelaza, był zaskakujący wysoki w porównaniu z metaloidami (np. As, Sb, Se) czy innymi metalami (np. Al, Cr, Hg) [35].

Aby uzyskać optymalne warunki do rozdzielania form żelaza, kluczowe znaczenie miał skład fazy ruchomej. W 1995 roku kwas pirydyno-2,6-dikarboksyłowy (PDCA) został opisany jako składnik fazy ruchomej do rozdzielania metali przejściowych, w tym Fe(II) i Fe(III) [35]. W kolejnych latach najpopularniejszym składem eluentu była mieszanina PDCA, siarczanu potasu ( $K_2SO_4$ ), wodorotlenku potasu (KOH) i kwasu mrówkowego (HCOOH), którą po raz pierwszy zastosowano w 1997 roku. [36], a później wprowadzono na rynek. Co ciekawe, eluent ten był pierwotnie stosowany tylko w HPLC-UV [37-38]. Z jednej strony najbardziej pożądanym sposobem jest przeniesienie zalet skomercjalizowanego eluentu PDCA z HPLC-UV na HPLC-ICP OES, którego granice wykrywalności (LOD) są znacznie lepsze. Z drugiej strony, kilka problemów, takich jak zakłócenia wzbudzenia, niestabilność plazmy, wygaszanie plazmy, zatykanie nebulizatora i uszkodzenie palnika, może być spowodowanych przez wyższe obciążenie matrycą. Rozwiązaniem tego problemu było wprowadzenie MIP OES jako kolejnego detektora w projektowanych układach łączonych.

Po raz pierwszy, MIP OES zastosowano w 1965 roku [39], jednak do 2011 roku nie było spektrometru dostępnego komercyjnie. Jego główną zaletą jest możli-

wość wykorzystania azotu ( $N_2$ ) jako gazu roboczego, co pozwala na pozyskiwanie go bezpośrednio z powietrza atmosferycznego za pomocą zewnętrznego generatora (niższy koszt pojedynczej analizy). Wadami są system oparty na monochromatorze, który sekwencyjnie rejestruje sygnał analityczny, oraz niższa temperatura plazmy (ok. 5000 K), która generuje więcej zakłóceń sygnału w porównaniu z ICP OES. Niemniej jednak instrument stał się konkurencyjny i atrakcyjny. W ostatnich latach (2013-2020), komora MSIS często była łączona z MIP OES w celu obniżenia LOD w oznaczaniu pierwiastków tworzących lotne wodorki (rzadziej pierwiastków nietworzących wodorków) [6]. Jednakże nie opublikowano żadnych badań specjacji żelaza przy użyciu MIP OES, podczas gdy przedstawiono zadowalające wyniki w celu określenia jego całkowitej zawartości.

W literaturze, tylko dwa połączone systemy były używane do jednoczesnego oznaczania Fe(II) i Fe(III) w rzeczywistych próbkach [40, 41]. Jednakże stosowalność obu metod, HPLC–ICP OES [40] i HPLC–ICP MS [41], została przeprowadzona wyłącznie na określonych materiałach, odpowiednio tkankach mózgu szczura i płynie mózgowo–rdzeniowym, które zawierają znacznie mniej żelaza niż gleby, osady itp. W tym przypadku ICP MS jest nadmiernie wymagającym detektorem (wymagającym tysiąckrotnego rozcieńczenia). Zgodnie z tym, HPLC–MIP OES stała się metodą, która została zoptymalizowana i zastosowana równoległe z HPLC–ICP OES. Porównując ich cechy, dokonano oceny działania komory MSIS pracującego w trybie Neb, a wyniki badań opublikowano w drugim artykule naukowym wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej [32].

Celem tej pracy była ocena i zastosowanie Wielokanałowego Układ Wprowadzenia Próbkki, działającego jako konwencjonalna komora mgielna w trybie rozpylania (Neb), jako interfejsu w technikach łączonych. W tym przypadku ten sam system chromatograficzny (oparty na kolumnie kationowymiennej) został sprzężony z dwoma różnymi detektorami, MIP OES i ICP OES. Po raz pierwszy przeprowadzono równoległą optymalizację dwóch łączonych systemów, HPLC–ICP OES i HPLC–MIP OES. Badanymi parametrami były: zapłon plazmy, przepływ gazu plazmowego, przepływ roztworu próbki, długość fali analitycznej, skład fazy ruchomej i przebieg chromatograficzny (Tabela 2). Większość z tych parametrów przyjęto z poprzednich badań [31].

Tabela 2. Parametry badane podczas optymalizacji układów łączonych (HPLC–ICP OES, HPLC–MIP OES). Optymalne warunki pracy są podkreślone.

Table 2. Parameters studied during the optimization of the hyphenated systems (HPLC–ICP OES, HPLC–MIP OES). Optimal operating conditions are underlined.

	HPLC–ICP OES	HPLC–MIP OES
Typ kolumny (model)	kationowymienna (Dionex IonPac CS5A)	
Typ eluent (pH)	Eluent PDCA (4.2±0.2)	
Kompozycja eluenta [mmol L <sup>-1</sup> ]	PDCA (7.0), KOH (66), K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (5.6), HCOOH (74)	
Przepływ eluenta [ml min <sup>-1</sup> ]	0.5, 1.0, 1.5, <u>2.0</u>	
MSIS (tryb pracy komory)	Neb	
Stężenie NaBH <sub>4</sub> [%, w/v]	nie dotyczy	
Stężenie HCl [mol L <sup>-1</sup> ]	nie dotyczy	
Moc generatora RF [kW]	1.20	1.00
Przepływ gazu plazmowego [L min <sup>-1</sup> ]	12	20
Podgląd plazmy	synchroniczny pionowy podwójny (SVDV)	osiowy
Analityczna długość fali [nm]	Fe 234.350, <u>Fe 238.204</u> , Fe 259.940, Fe 261.382	Fe 259.940, <u>Fe 371.993</u>

Potencjał aplikacyjny obu układów został sprawdzony na pięciu grupach próbek rzeczywistych: (1) osady polodowcowe (Spitsbergen, Svalbard), (2) ceramika archeologiczna, (3) gleba zlokalizowana w pobliżu składowiska odpadów przemysłowych, (4) osady rzeczne (Mekong, Wietnam) oraz (5) yerba mate (*Ilex paraguariensis*). Dodatkowo zastosowano dwie procedury przygotowania próbki: ługowanie kwasem solnym (1–2) i ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami (3–5). Warto wspomnieć, że ekstrahenty te są mniej skuteczne w przypadku próbek nieorganicznych ze względu na obecność niektórych frakcji żelaza w krzemianach. Czynnikiem ograniczającym stosowalność metody HPLC–MIP OES było Fe(II), które w 3 próbkach było <LOD. Ponadto odnotowano następujące obserwacje: (1) obie metody były równie odpowiednie, niezależnie od tego, czy stosunek Fe(III)/Fe(II) wynosił 25 czy mniej, (2) MIP OES zalecano, gdy oczekiwano wysokiego stężenia (żelazo całkowite > 1% wt.), (3) ICP OES zalecano, gdy stosunek Fe(III)/Fe(II) wynosił 32 i więcej.

Zastosowanie komory MSIS w trybie konwencjonalnego rozpylania jako interfejsu między HPLC i OES pozwoliło na zaprojektowanie dwóch równoległych nowych technik łączonych. Obie metody opierały się wyłącznie na dostępnych w handlu częściach, unikając używania odczynników postkolumnowych. Dwie formy żelaza można było oznaczyć w znacząco krótkim czasie (do 300 s) przy niskich LOD i wysokiej precyzji. Kluczowymi parametrami w ocenie metody były: (1) wzajemny stosunek Fe(II) i Fe(III) oraz (2) założone całkowite stężenie Fe w materiale. Wyniki były porównywalne z wynikami technik opartych na HPLC połączonych z różnymi detektorami, jednak MIP OES w układach łączonych był

detektorem uzupełniającym (a nie alternatywnym). Podsumowując powyższe, badanie stało się drugim krokiem w ocenie MSIS jako interfejsu w technikach łączonych [32].

#### **4. WIELOKANALOWY SYSTEM WPROWADZANIA PRÓBEK W TRYBIE PODWÓJNYM JAKO INTERFEJS W UKŁADACH ŁĄCZONYCH**

W literaturze odnotowano również znaczące zastosowanie MSIS w trybie podwójnym (Dual) do jednoczesnego oznaczania pierwiastków nietworzących wodorków i pierwiastków tworzących lotne wodorki [22–24, 26]. Jednakże tryb ten nigdy nie był używany do oznaczania form pierwiastków. Chociaż wielopierwiastkowa analiza specjacyjna została przeprowadzona dla 9 oksyanionów z 6 pierwiastków [40], nigdy nie została przeprowadzona dla pierwiastków występujących jako kationy i aniony. Kombinacja trybów (Neb + HG = Dual) w analizie specjacyjnej nie powinna znacząco różnić się od oznaczenia całkowitej zawartości. Po opracowaniu dwóch pierwszych systemów [31, 32] możliwe było łatwe przyjęcie warunków projektowania nowego układu łącznikowego. Główną zaletą jest równoczesne rozdzielanie przez dwie różne kolumny HPLC anionów (np. trzech form arsenu) i kationów (np. dwóch form żelaza) w jednym przebiegu. Wprowadzenie analitów w dwóch różnych trybach komory MSIS, tj. Neb dla pierwiastków nietworzących wodorków oraz HG dla pierwiastków tworzących lotne wodorki, zminimalizowało wzajemnie interferencje. Ponadto założono, że wykrycie wszelkich nieznanymi form jest możliwe poprzez przeprowadzenie analizy próbek rzeczywistych. Zauważając ogromny potencjał w opisanym systemie, MSIS pracujący w trybie podwójnym został użyty jako interfejs między dwoma jednostkami HPLC i ICP OES i przedstawiony w trzecim artykule naukowym wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej [33].

Celem tej pracy było połączenie osiągnięć uzyskanych w poprzednich badaniach [31, 32] i zastosowanie MSIS pracującego w trybie dualnym jako interfejsu między dwoma różnymi systemami chromatograficznymi i ICP OES. Kolumna anionowymienna (tryb HG) została użyta do rozdzielania 5 form, podczas gdy kolumna kationowymienna (tryb Neb) została użyta do rozdzielania 13 form. W ten sposób 18 form 15 pierwiastków zostało jednocześnie określonych metodą HPLC–ICP OES. Po raz pierwszy łączony system oparty na detekcji w spektrometrii emisyjnej optycznej został zastosowany do jednoczesnego określenia pierwiastków występujących jako dwa kationy (żelazo) i trzy aniony (arsen). Zachowano główne zalety pierwszego i drugiego podstawowego osiągnięcia naukowego: powtarzalny projekt (oba systemy opierały się wyłącznie na częściach



dostępnych komercyjnie), uniknięcie odczynników pokolumnowych, prostą procedurę przygotowania próbki i stosunkowo krótki czas analizy.

Badanie obejmowało projektowanie, optymalizację, walidację i zastosowanie metody. Po krótkiej optymalizacji wybrano niższy przepływ eluentu ( $1 \text{ mL min}^{-1}$ ), dlatego czasy retencji (RT) wzrosły w porównaniu z poprzednimi badaniami [31–32], chociaż nadal były względnie krótkie (80–635 s). Badane parametry zostały wymienione w Tabeli 3.

Tabela 3. Parametry badane podczas optymalizacji układu łączonego (2 HPLC–MSIS–ICP OES). Optymalne warunki pracy są podkreślone.

Table 3. Parameters studied during the optimization of the hyphenated system (2 HPLC–MSIS–ICP OES) Optimal operating conditions are underlined.

Typ kolumny (model)	2 HPLC–MSIS–ICP OES	
	anionowymienna (Supelco LC–SAX–1)	kationowymienna (Dionex IonPac CS5A)
Typ eluent (pH)	Bufor fosforanowy ( $6.0 \pm 0.2$ )	PDCA eluent ( $4.2 \pm 0.2$ )
Kompozycja eluenta [ $\text{mmol L}^{-1}$ ]	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (2.5), $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (2.5)	PDCA (7.0), KOH (66), $\text{K}_2\text{SO}_4$ (5.6), HCOOH (74)
Przepływ eluenta [ $\text{mL min}^{-1}$ ]	1.0	1.0
MSIS (tryb pracy komory)	Dual	
Stężenie $\text{NaBH}_4$ [% w/v]	HG	Neb
Stężenie HCl [ $\text{mol L}^{-1}$ ]	1.00	N/A
Stężenie HCl [ $\text{mol L}^{-1}$ ]	5.00	N/A
Moc generatora RF [kW]	1.20	
Przepływ gazu plazmowego [ $\text{L min}^{-1}$ ]	12	
Podgląd plazmy	synchroniczny pionowy podwójny (SVDV)	
Analityczna długość fali [nm]	As 228.812, Cd 214.439, Co 238.892, Cu 327.395, Fe 234.350, Ge 209.426, Mn 257.610, Ni 231.604, Pb 220.353, Ru 240.272, Se 196.026, Sr 460.733, Tl 190.794, V 292.401, Zn 213.857	

Aplikacyjność metody 2 HPLC–MSIS–ICP OES przetestowano dla pięciu grup próbek rzeczywistych: (1) osady polodowcowe (Spitsbergen, Svalbard), (2) ceramika archeologiczna, (3) gleba znajdująca się w pobliżu składowiska odpadów przemysłowych, (4) osady rzeczne (Mekong, Wietnam) i (5) yerba mate (*Ilex paraguariensis*). Co ciekawe, w tej części badań wykryto kilka niezdefiniowanych form metali przejściowych. Zastosowanie MSIS w trybie podwójnym (Dual), jako interfejsu między dwoma HPLC i ICP OES pozwoliło na zaprojektowanie nowej techniki łączonej, która nie ma swojego odpowiednika. Metoda nadal opiera się tylko na dostępnych komercyjnie częściach, unikając odczynników pokolumnowych. W stosunkowo krótkim czasie (do 700 s pojedynczej analizy) można było oznaczyć ilościowo 18 form specyjalnych 15 pierwiastków.

## 5. ANALIZA SPECJACYJNA YERBA MATE ZA POMOCĄ OPRACOWANYCH TECHNIK ŁĄCZONYCH

Wdrożenie metody do regularnej pracy laboratoryjnej powinno być kolejnym etapem w rozwoju dowolnego systemu, w tym techniki łączonej. Poprzez opracowanie trzech systemów w ramach podstawowych osiągnięć naukowych [31–33], yerba mate (*Ilex paraguariensis*) została wybrana jako odpowiedni materiał do wykonania części aplikacyjnej z następujących powodów: (1) spożycie naparu yerba mate na świetle wzrasta [44], (2) materiał był z powodzeniem stosowany w optymalizacji procedur analitycznych [45], (3) nie są dostępne dla tego materiału wyniki analizy specjacyjnej. Uznano, że bardziej praktyczne jest zademonstrowanie dwóch metod niż jednej, dlatego analizę specjacyjną wykonano dwiema metodami jednopierwiastkowymi [31–32] zamiast wielopierwiastkowej [33]. Zaproponowana metodologia była pierwszą analizą pierwiastkową i specjacyjną yerba mate (*Ilex paraguariensis*) i pierwszym zastosowaniem HPLC–HG–ICP OES, jak i HPLC–ICP OES dla dużej serii próbek. Zauważając ten potencjał, praca jest przedstawiona w czwartym artykule naukowym wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej [46].

W ramach badań aplikacyjnych, wykonano analizy 58 próbek yerba mate, dostępnych na polskim rynku. Oprócz ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami, zastosowano mokry rozkład próbki kwasem azotowym wspomagany mikrofalami w celu oznaczenia całkowitej zawartości wybranych pierwiastków przy pomocy ICP OES. Wykorzystując metody opracowane w trakcie poprzednich badań [31, 32], oznaczono w nich również arseniny, arseniany, DMA oraz żelazo dwu- i trójwartościowe, jak również całkowitą zawartość tych i innych pierwiastków za pomocą ICP OES. Celem badań było oznaczenie form arsenu i żelaza w yerba mate oraz próba identyfikacji i/lub klasyfikacji próbek ze względu na ich pochodzenia, gatunek czy czystość.

W przypadku yerba mate, formy nieorganiczne żelaza czy arsenu stanowiły zazwyczaj niewielki procent w stosunku do całkowitej zawartości pierwiastków. Większość żelaza i arsenu pozostała w połączeniach organicznych (nazwaną frakcją nieekstrahowalną). Natomiast różnicę między całkowitymi zawartościami żelaza i arsenu, a sumą zawartości oznaczanych form w próbkach ekstrahowanych, określono mianem „nierozpoznanej frakcji ekstrahowalnej”. Poza arsenem i żelazem, oznaczono również całkowite zawartości 14 pierwiastków zarówno w próbkach zmineralizowanych jak również wyekstrahowanych. Próbowano zidentyfikować yerba mate ze względu na (a) kraj pochodzenia, (b) typ suszu oraz (c) stosowanie dodatków, stosując m. in. analizę głównych składowych (PCA). Niestety, podobnie jak w przypadku analizy specjacyjnej, nie odważono się na jednoznaczną klasyfikację próbek [46]. Niemniej, dzięki tej pracy udało się zade-

monstrować działanie dwóch z trzech układów łączonych na wybranym materiale.

## UWAGI KOŃCOWE

Zastosowanie Wielokanałowego Systemu Wprowadzenie Próbkę jako łącznika w układach łączonych umożliwiło opracowanie trzech systemów z detekcją w optycznej spektrometrii emisyjnej. W ten sposób, wypełniona została luka pomiędzy popularnością i dostępnością komory MSIS, a niewielką ilością technik łączonych ją wykorzystujących. Dzięki zastosowaniu trzech trybów pracy komory udało się przygotować narzędzia z zakresu analizy specjacyjnej, gotowe do rutynowej pracy.

W trakcie aplikacji wyżej wymienionych metod, poza oznaczanymi formami Mn, Cu, Fe czy Zn, zaobserwowano również inne, niezidentyfikowane formy tych metali w różnych matrycach próbek. To sugeruje zdolność układu łączonego do rozdzielania innych form pierwiastków w warunkach optymalnych dla rozdzielania żelaza dwu- i trójwartościowego. Choć te formy nie zostały jeszcze zidentyfikowane, stanowi to interesująca perspektywę i jest to istotny punkt wyjściowy w tworzeniu kolejnych aplikacji. Każdy pierwiastek wykryty w ogólnych warunkach opracowanych na potrzeby metody 2 HPLC–MSIS–ICP OES, może wymagać nieznacznie innych warunków, aby uzyskać optymalną separację niezdefiniowanych form bez utraty parametrów pracy detektora. Dlatego też kluczowe będzie opracowanie w przyszłości nowych procedur przygotowania próbek, które będą dedykowane do analizy specjacyjnej.

## PODZIĘKOWANIE

Jędrzej Proch pragnie serdecznie podziękować swojemu promotorowi i mentorowi Panu prof. dr hab. Przemysławowi Niedzielskiemu za możliwość rozwoju zawodowego, ogromne wsparcie i inspirację.

Autor wyraża również podziękowanie dla Komitetu Chemii Analitycznej PAN za nagrodzenie jego rozprawy doktorskiej w konkursie na najlepszą rozprawę doktorską z analitycznej spektrometrii (2024). Wyniki nagrodzonych badań naukowych stały się inspiracją dla niniejszego artykułu.

Badania te były finansowane ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój, grant nr POWR.03.02.00-00-I026/16.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] H. Brandenberger, H. Bader, *Helvetica Chimica Acta*, 1967, **50**(5), 1409.
- [2] W. Holak, *Analytical Chemistry*, 1969, **41**(12), 1712.
- [3] R. Braman, L. Justen, C. Foreback, *Analytical Chemistry*, 1972, **44**(13), 2195.
- [4] M. Ślachciński, *Applied Spectroscopy Reviews*, 2014, **49**(4), 271.
- [5] A. D'Ulivo, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2019, **34**(5), 823.
- [6] J. Proch, P. Niedzielski, *Talanta*, 2022, **243**, 123372
- [7] M. García, M. Aguirre, A. Canals, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, **409**(23), 5481.
- [8] A. Lima, M. Da Costa, D. Ferreira, E. Richter, et al. *Microchemical Journal*, 2015, **118**, 40.
- [9] L. Escudero, P. Pacheco, J. Gasquez, J. Salonia *Food Chemistry*, 2015, **169**, 73
- [10] A. Calvo Fomieles, A. García de Torres, E. Vereda Alonso, J. Cano Pavón, *Microchemical Journal*, 2016, **124**, 82.
- [11] A. Tyburska, K. Jankowski, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, **74**, 268.
- [12] J. Fujihara, N. Nishimoto, *Microchemical Journal*, 2020, **157**, 104992.
- [13] M. Welna, A. Szymczycha–Madeja, *Food Chemistry*, 2014, **159**, 414.
- [14] K. Jankowski, J. Giersz, M. Paprocka, *Microchemical Journal*, 2014, **113**, 17.
- [15] I. Rojas, M. Murillo, N. Carrión, J. Chirinos, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, **376**(1), 110.
- [16] C. Pereira, M. Aguirre, J. Nóbrega, M. Hidalgo, et al., *Microchemical Journal*, 2014, **112**, 82.
- [17] H. Matusiewicz, M. Ślachciński, *Microchemical Journal*, 2017, **131**, 70.
- [18] M. Welna, A. Szymczycha–Madeja, P. Pohl, *Analytical Methods*, 2017, **9**(5), 871.
- [19] B. Deng, X. Xu, Y. Xiao, P. Zhu, et al., *Analytica Chimica Acta*, 2015, **853**, 179.
- [20] M. Thompson, B. Pahlavanpour, S. Walton, G. Kirkbright, *The Analyst*, 1978, **103**(1227), 568.
- [21] R. McLaughlin, I. Brindle, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2002, **17**(11), 1540.
- [22] A. Asfaw, G. Wibetoe, G. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2006, **21**(10), 1027.
- [23] A. Asfaw, G. Wibetoe, G. (2005). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, **382**(1), 173.
- [24] H. Matusiewicz, M. Ślachciński, *Microchemical Journal*, 2007, **86**(1), 102.
- [25] E. Ritschdorff, N. Fitzgerald, R. McLaughlin, I. Brindle, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2005, **60**(1), 139.
- [26] M. Guerrero, E. Alonso, J. Pavón, M. Cordero, et al. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2016, **31**(4), 975.
- [27] C. Tanabe, H. Hopfer, G. Gilleland, A. Liba, et al., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2016, **31**(6), 1223.
- [28] M. Welna, P. Pohl, A. Szymczycha–Madeja, *Food Analytical Methods*, 2019, **12**(2), 581.
- [29] K. Al–Assaf, J. Tyson, P. Uden, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2009, **24**(4), 376.
- [30] E. Barrientos, K. Wrobel, J. Torres Guzman, A. Corrales Escobosa, et al., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2016, **31**(1), 203.
- [31] J. Proch, P. Niedzielski, *Talanta*, 2020, **208**, 120395
- [32] J. Proch, P. Niedzielski, *Talanta*, 2021, **231**, 122403
- [33] J. Proch, P. Niedzielski, *Analytica Chimica Acta*, 2021, **1147**, 1.
- [34] M. Sánchez, L. Sabio, N. Gálvez, M. Capdevila, et al., *IUBMB Life*, 2017, **69**(6), 382.
- [35] M. Grotti, A. Terol, J. Todolí, *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 2014, **61**, 92.
- [36] P. Janvion, S. Motellier, H. Pitsch, *Journal of Chromatography A*, 1995, **715**(1), 105.
- [37] N. Cardellicchio, P. Ragone, S. Cavalli, J. Riviello, *Journal of Chromatography A*, 1997, **770**(1–2), 185.
- [38] H. Kaasalainen, A. Stefánsson, G. Druschel, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2016, **96**(11), 1074.

- [39] C. Ashworth, C. Weller, G. Frisch, *Journal of Separation Science*, 2019, **42**(15), 2517.
- [40] A. McCormack, S. Tong, W. Cooke, *Analytical Chemistry*, 1965, **37**(12), 1470.
- [41] K. Fernsebner, J. Zorn, B. Kanawati, A. Walker, et al., *Metallomics*, 2014, **6**(4), 921.
- [42] N. Solovyev, M. Vinceti, P. Grill, J. Mandrioli, et al., *Analytica Chimica Acta*, 2017, **973**, 25.
- [43] M. Mulugeta, G. Wibetoe, C. Engelsen, W. Lund, *Journal of Chromatography A*, 2010, **1217**(40), 6186.
- [44] E. Cardozo Junior, C. Morand, *Journal of Functional Foods*, 2016, **21**, 440.
- [45] R. Pardino, P. Dalla Vecchia, A. Mendes, C. Bizzi, et al., *Food Chemistry*, 2018, **263**, 37.
- [46] J. Proch, A. Orłowska, P. Niedzielski, *Foods*, 2021, **10**, 2925.

Praca wpłynęła do Redakcji 14 listopada 2024 r.



**Laureaci nagrody ufundowanej przez nLab  
za najlepszą rozprawę doktorską z elektrochemii**





# **NOWE MATERIAŁY FUNKCJONALNE W KONSTRUKCJI CZUJNIKÓW POTENCJOMETRYCZNYCH TYPU SOLID CONTACT**

## **NEW FUNCTIONAL MATERIALS IN THE CONSTRUCTION OF POTENTIOMETRIC SENSORS WITH SOLID CONTACT**

**Karolina Pietrzak<sup>1,\*</sup>, Cecylia Wardak<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Instytut Fizyki, Bijenička cesta 46, 10000 Zagrzeb, Chorwacja*

<sup>2</sup>*Zakład Chemii Analitycznej, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii,  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Plac Marii Curie-Skłodowskiej 3,  
20-031 Lublin, Polska*

*\*e-mail: karolinapietrzak94@gmail.com*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Konstrukcja SC-ISEs

2. Nowe materiały funkcjonalne

1.1. Jonofory

1.2. Materiały stałego kontaktu

3. Zastosowanie SC-ISEs w analizie próbek rzeczywistych

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr Karolina Pietrzak** ukończyła studia magisterskie na kierunku Analityka chemiczna na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie w 2018 roku. Stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne uzyskała w roku 2023. Tytuł jej rozprawy doktorskiej brzmiał: „*Nowe materiały funkcjonalne w konstrukcji elektrod jonoselektywnych ze stałym kontaktem czułych na wybrane jony nieorganiczne*”. Rozprawa doktorska została wyróżniona przez Radę Naukową Instytutu Chemii UMCS. W trakcie studiów doktoranckich otrzymała również Nagrodę Rektora za „*oryginalne i twórcze osiągnięcia naukowe związane z opracowaniem nowych czujników elektrochemicznych dedykowanych do oznaczania wybranych jonów metali oraz jonów azotanowych(V) z wykorzystaniem nowych materiałów funkcjonalnych*” oraz była wielokrotną laureatką stypendium projakościowego. Ponadto została Laureatką konkursu Komitetu Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk na najlepszą pracę doktorską z zakresu elektrochemii. Była uczestnikiem międzynarodowych szkół letnich organizowanych w Lyonie (Francja) i w Lublinie oraz szkolenia zagranicznego w ramach organizacji COST (European Cooperation in Science & Technology) – „*A PortASAP Training School on Low Cost Air Quality Sensors*” organizowanego w Thessalonikach (Grecja). Odbiła zagraniczne staże naukowe na Uniwersytecie w Zagrzebiu (Chorwacja) w ramach projektu CEEPUS – „*Colloids and Nanomaterials in Education and Research*” oraz w Instytucie Fizyki w Zagrzebiu (Chorwacja) w ramach projektu Międzynarodowych Studiów Doktoranckich z Chemii. Obecnie odbywa staż podoktorski w tym samym Instytucie i zajmuje się badaniem właściwości roztworów koloidalnych nanocząstek otrzymywanych za pomocą metody ablacji laserowej w cieczy oraz zastosowaniami wody aktywowanej z wykorzystaniem plazmy.



<https://orcid.org/0000-0002-6011-1832>

**Dr hab. Cecylia Wardak, prof. Uczelni UMCS** uzyskała stopień magistra z chemii na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie w 1994 roku, a następnie stopień doktora i doktora habilitowanego odpowiednio w latach 2003 i 2015 na tej samej uczelni. Odbiła staż podoktorski na Uniwersytecie Warszawskim oraz staż naukowy w Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie. Od października 1994 pracuje w Katedrze Chemii Analitycznej, a od lutego 2020 roku na stanowisku profesora uczelni. Jest członkiem Komitetu Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk oraz członkiem Europejskiego Programu Współpracy w Dziedzinie Badań Naukowo-Technicznych COST. Brała lub bierze udział w działaniu akcji COST: ES1302, CA 16215, CA 21112, CA 22131, CA 22134. Jej główne zainteresowania naukowe to badania, rozwój i zastosowania analityczne czujników elektrochemicznych i biosensorów. Najnowsze badania dotyczą wykorzystania nanomateriałów i materiałów kompozytowych w konstrukcji elektrod jonoselektywnych ze stałym kontaktem. Do tej pory opublikowała ponad 100 recenzowanych artykułów naukowych, z tego 63 jest indeksowanych w bazie JCR.



<https://orcid.org/0000-0002-5785-3237>

## ABSTRACT

Among all kinds of ion-selective electrodes, those with solid contact (SC-ISEs) are currently particularly popular. The elimination of the internal solution significantly improved electrical parameters and also enabled miniaturization, storage and transport of the sensors. However, not all active substances and electroactive materials can be successfully used to prepare these electrodes. The first of them must ensure, among other things, sufficient selectivity of the sensors towards the determined ion in the presence of other accompanying ions, while the second – good stability and reversibility of the potential. Therefore, new functional materials are constantly needed to obtain better and better potentiometric sensors, which can also be used in multi-sensor platforms for comprehensive determination of ion content directly in the *in situ* environment.

This article is devoted to the topic of new functional materials that can be used to improve the operation of potentiometric sensors and expand the scope of their applications. All described electrodes were constructed as part of scientific research conducted during the doctoral studies of the author. Their main goal was to develop new ion-selective electrodes with solid contact with good analytical parameters and sensitive to selected ions ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{UO}_2^{2+}$ ), using new ionophores or electroactive materials for their construction. Many different sensors were constructed and tested, the design of which differed, among others, in the material of the internal electrode, the composition of the ion-selective membrane (qualitative and quantitative), and the type and method of using the solid contact material (as an intermediate layer or an additional component of the membrane). New materials were synthesized, their properties were tested using many different analytical methods and then used to prepare ion-selective electrodes. The values of the most important analytical parameters were determined for the obtained sensors and, on their basis, the influence of individual electrode modifications on their operation was determined. Using some of the obtained electrodes, the content of selected ions in natural samples was also analyzed, confirming that they can be used in practical analysis.

Keywords: ion-selective electrodes, solid contact, nanoparticles, nanofibers, nanocomposites, potentiometry

Słowa kluczowe: elektrody jonoselektywne, stały kontakt, nanocząstki, nanowłókna, nanokompozyty, potencjometria

---

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW I OZNACZEŃ

AAS	– (z ang. <i>atomic absorption spectroscopy</i> ) absorpcyjna spektroskopia atomowa
CP	– (z ang. <i>chronopotentiometry</i> ) chronopotencjometria
CWE	– (z ang. <i>coated-wire electrodes</i> ) elektroda powlekana
EIS	– (z ang. <i>electrochemical impedance spectroscopy</i> ) elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna
EMF	– (z ang. <i>electromotive force</i> ) siła elektromotoryczna ogniwa
FIM	– (z ang. <i>fixed interference method</i> ) metoda roztworów mieszanych w wyznaczaniu współczynników selektywności
HPLC	– (z ang. <i>high-performance liquid chromatography</i> ) wysokosprawna chromatografia cieczowa
ISE	– (z ang. <i>ion-selective electrode</i> ) elektroda jonoselektywna
ISM	– (z ang. <i>ion-selective membrane</i> ) membrana jonoselektywna
LoD	– (z ang. <i>limit of detection</i> ) granica wykrywalności
MWCNTs	– (z ang. <i>multiwalled carbon nanotubes</i> ) wielościenne nanorurki węglowe
NPs	– (z ang. <i>nanoparticles</i> ) nanocząstki
PANINFs	– (z ang. <i>polyaniline nanofibers</i> ) nanowłókna polianiliny
PVC	– (z ang. <i>polyvinyl chloride</i> ) polichlorek winylu
SC	– (z ang. <i>solid contact</i> ) stały kontakt
SC-ISE	– (z ang. <i>ion-selective electrode with solid contact</i> ) elektroda jonoselektywna z warstwą stałego kontaktu umieszczoną pomiędzy materiałem elektrody a membraną jonoselektywną
SP-ISE	– (z ang. <i>single-piece ion-selective electrode</i> ) elektroda jonoselektywna, w której materiał stałego kontaktu jest zdyspergowany lub rozpuszczony w membranie
SSM	– (z ang. <i>separate solution method</i> ) metoda roztworów rozdzielonych w wyznaczaniu współczynników selektywności

## WPROWADZENIE

Elektrody jonoselektywne (ISEs) stanowią obecnie grupę najpopularniejszych czujników potencjometrycznych na świecie. Z powodzeniem są wykorzystywane do oznaczania zawartości nawet 100 różnych jonów, zarówno nieorganicznych, jak i organicznych. Ujmują przede wszystkim swoją prostotą i szybkością wykonania pomiarów, a wymagany sprzęt charakteryzuje się znacznie niższą ceną w porównaniu do innych, bardziej czułych metod analitycznych, takich jak AAS czy HPLC. Produkcja samych czujników również nie wiąże się z wysokimi kosztami, zależy jednak w znacznej mierze od materiału, z którego wykonane są elektrody wewnętrzne oraz ceny substancji i materiałów zastosowanych do ich konstrukcji. Istotną zaletą jest również szeroki zakres stężeń, w jakim możliwe jest oznaczanie analitu, co pozwala uniknąć rozcieńczania próbek lub żmudnego ich zatężania. Ponadto przygotowanie do pomiaru próbki ciekłej (również barwnej) w większości przypadków nie jest wymagane, a w razie konieczności najczęściej ogranicza się jedynie do dodania roztworu buforu mocy jonowej lub kwasu/zasady w celu ustalenia pH próbki zapewniającego poprawne działanie elektrody. W przypadku materiałów stałych, niezbędne jest przeprowadzenie próbki do roztworu, jednakże bez wykorzystywania skomplikowanych i czasochłonnych procesów, takich jak mineralizacja. Dzięki temu możliwe jest wykorzystywanie czujników potencjometrycznych do oznaczania zawartości jonów w próbkach środowiskowych pobranych i analizowanych w laboratorium, a także bezpośrednio w środowisku *in situ*. W związku z tymi licznymi zaletami ISEs często stosowane są w analizie klinicznej, w monitorowaniu stanu środowiska naturalnego lub też procesów produkcyjnych, między innymi w przemyśle spożywczym czy farmaceutycznym [1,2].

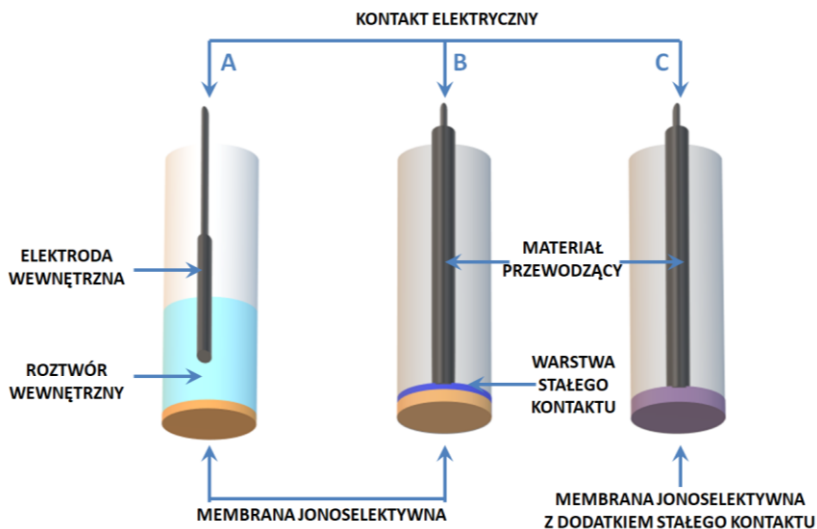
W pracy opisano teoretyczne podstawy dotyczące SC-ISEs oraz zebrano informacje dotyczące wszystkich rodzajów elektrod skonstruowanych w ramach rozprawy doktorskiej, o konstrukcjach różniących się między innymi: materiałem elektrody wewnętrznej, składem membrany jonoselektywnej (jakościowy i ilościowy) oraz rodzajem i sposobem wykorzystania materiału pełniącego funkcję stałego kontaktu (warstwa pośrednia/dodatkowy składnik membrany). We wszystkich badaniach wykorzystano nie stosowane wcześniej w SC-ISEs materiały (substancje aktywne/materiały elektroaktywne).

## 1. KONSTRUKCJA SC-ISEs

Od czasu skonstruowania przez Fritza Habera i Zygmunta Klemensiewicza w 1909 roku pierwszej elektrody jonoselektywnej – elektrody szklanej, minęło już ponad 100 lat. Za początek nowoczesnej potencjometrii można natomiast uznać lata 60. XIX wieku, kiedy to Ross przedstawił elektrodę czułą na jony wapniowe oparte na ciekłym fosforoorganicznym wymienniaczu jonowym, a Bloch – pierwsze polimerowe membrany jonoselektywne z PVC. Wraz z rozwojem ISEs zaczęto rozróżniać elektrody jonoselektywne z ciekłym kontaktem (tak zwane klasyczne) oraz elektrody jonoselektywne ze stałym kontaktem (SC-ISEs). Pierwsze z nich z racji obecności roztworu wewnętrznego są wrażliwe na wyciek lub parowanie cieczy, zmiany temperatury próbki i ciśnienia, czy powstawanie pęcherzyków powietrza wewnątrz elektrody [3].

Szereg zalet ISEs obejmujący: niskie granice wykrywalności, wysoką selektywność oraz stabilność potencjału łączą w sobie SC-ISEs, które dzięki eliminacji elektrolitu wewnętrznego i zastąpieniu go materiałem tak zwanego "stałego kontaktu" są dodatkowo łatwiejsze w modyfikacji kształtu i miniaturyzacji oraz wygodniejsze w przechowywaniu i transporcie. Obniżenie granic wykrywalności było możliwe dzięki temu, że w przeciwieństwie do elektrod z roztworem wewnętrznym nie następuje przepływ znajdujących się w nim jonów do roztworu próbki w wyniku jego wycieku. Ponadto nie ma ryzyka zapowietrzenia elektrody ani konieczności zachowywania pionowej pozycji. Istotna jest również znacząca poprawa odporności mechanicznej czujników, głównie ze względu na fakt, że membrany w SC-ISEs są często grubsze niż w elektrodach klasycznych oraz umieszczone na twardym podłożu [4].

Dodatkowy materiał SC charakteryzuje się zarówno przewodnictwem jonowym, jak i elektronowym, i ma na celu między innymi poprawę stabilności potencjału czujników w porównaniu do ich poprzednich wersji – coated-wire electrodes (CWEs), będących niejako etapem pośrednim na drodze do otrzymania współczesnych SC-ISEs. Wyróżnia się dwa typy konstrukcji SC-ISEs – z warstwą pośrednią stałego kontaktu umieszczoną pomiędzy materiałem przewodzącym a membraną jonoselektywną oraz z materiałem stałego kontaktu zdyspergowanym bezpośrednio w mieszaninie membranowej [5]. Konstrukcje elektrod przedstawiono na Rysunku 1. Dalszy rozwój SC-ISEs jest możliwy dzięki poszukiwaniu nowych substancji aktywnych i materiałów elektroaktywnych wpływających na poprawę ich parametrów analitycznych i właściwości elektrycznych.



Rysunek 1. Porównanie konstrukcji elektrod jonoselektywnych: (A) klasycznej z roztworem wewnętrznym, (B) z warstwą pośrednią stałego kontaktu (SC-ISE), (C) z materiałem stałego kontaktu zdyspergowanym w membranie jonoselektywnej (SP-ISE).

Figure 1. Comparison of the construction of ion-selective electrodes: (A) classic with internal solution, (B) with an intermediate layer of solid contact (SC-ISE), (C) with solid contact material dispersed in the ion-selective membrane (SP-ISE).

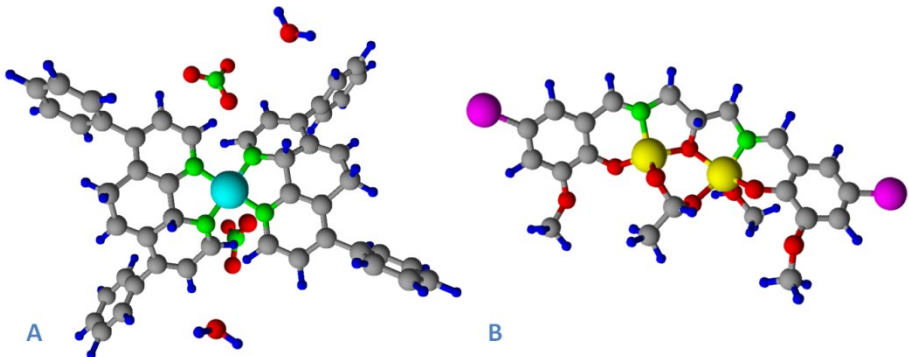
## 2. NOWE MATERIAŁY FUNKCJONALNE

### 2.1. JONOFORY

Jednym ze sposobów na uzyskanie ISEs o dobrych parametrach analitycznych jest wykorzystanie substancji aktywnych zapewniających wysoką selektywność czujników. Pomimo, że jonofor stanowi niewielki procent mieszanki membranowej (najczęściej 1-2%), jest to najważniejszy jej składnik, bez którego niemożliwe byłoby oznaczenie wybranego jonu. To właśnie dzięki obecności jonoforów elektroda jest czuła na zmiany aktywności wybranych jonów obecnych w roztworze próbki. Nawet idealna stabilność i odwracalność potencjału elektrody w roztworze jonu głównego nie jest wystarczająca, jeśli elektroda jest czuła również na inne jony obecne w badanej próbce rzeczywistej. Co istotne, oprócz wysokiej selektywności jonofor powinien charakteryzować się również stabilnością chemiczną i niską toksycznością oraz znaczną szybkością reakcji i odpornością na zmienne warunki środowiskowe. Czasami, aby poprawić właściwości membrany dodaje się również inne substancje wzmacniające działanie substancji aktywnej, do których należą między innymi różnego rodzaju wymiennicze jonowe [6].

Selektywność czujników, a dokładniej wartości współczynników selektywności jonów, które w łatwy sposób pozwalają na porównanie tej właściwości pomiędzy różnymi rodzajami elektrod, można wyznaczać na różne sposoby. Istnieje kilka metod, z których najszybsza jest metoda roztworów rozdzielonych (SSM). Oprócz niej wyróżnia się również metodę roztworów mieszanych (FIM) oraz metodę dopasowania potencjału (MPM) [7].

Jako jonofory w membranach jonoselektywnych czułych odpowiednio na jony  $\text{NO}_3^-$  oraz  $\text{Cu}^{2+}$  z powodzeniem zastosowano między innymi nowosyntezywane związki organiczne (kompleks Co(II) z 4,7-difenylo-1,10-fenantroliną [8] oraz dwurdzeniowy kompleks Cu(II) z N,N'-bis(5-bromo-2-hydrokso-3-metoksybenzylideno)-2-hydroksopropyleno-1,3-diaminą [9]). Otrzymane elektrody charakteryzowały się bardzo dobrymi współczynnikami selektywności, co potwierdziło trafność wyboru danych kompleksów do konstrukcji czujników. Dla uzyskania satysfakcjonujących właściwości membrany jonoselektywnej konieczne było przeprowadzenie procesu optymalizacji składu ISM, zarówno jakościowego, jak i ilościowego. Wzory strukturalne wymienionych związków przedstawiono na Rysunku 2.



Rysunek 2. Wzory strukturalne kompleksów: (A) Co(II) z 4,7-difenylo-1,10-fenantroliną, (B) Cu(II) z N,N'-bis(5-bromo-2-hydrokso-3-metoksybenzylideno)-2-hydroksopropyleno-1,3-diaminą).

Figure 2. Structural formulas of complexes: (A) Co(II) with 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline, (B) Cu(II) with N,N'-bis(5-bromo-2-hydroxy-3-methoxybenzylidene)-2-hydroxypropylene-1,3-diamine).

Elektrody azotanowe charakteryzowały się ponadto znakomitą odwracalnością i stabilnością potencjału (dryft  $0,09 \text{ mV dzień}^{-1}$ ) oraz szerokim zakresem pH (5,4 – 10,6). Dla elektrody z membraną zawierającą jedynie 1% jonoforu uzyskano nachylenie równe  $-56,3 \text{ mV pa}^{-1}$ , które utrzymując się przed długi czas zapewniało poprawne działanie elektrody nawet po 5 miesiącach użytkowania [8]. W przypadku elektrod miedziowych jako potencjalny jonofor przebadano szereg związków z grupy zasad Schiffa, obejmujących ligandy oraz ich kompleksy z jonami miedzi(II). Oprócz rodzaju substancji aktywnej w membranie



i jej zawartości stosowano również różne plastyfikatory i sole lipofilowe. Elektroda z membraną zawierającą 1% wybranego kompleksu, 0,34% KTpClPB, 65,66% NPOE i 33,00% PVC osiągnęła nachylenie 29,68 mV  $\text{pa}^{-1}$  w zakresie stężeń  $1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ , a otrzymana granica wykrywalności wyniosła  $6,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . W przypadku opracowanych czujników wyznaczone wartości współczynników selektywności w stosunku do wszystkich badanych jonów były mniejsze niż 0,01 (z wyjątkiem  $\text{Pb}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$ ). W czasie użytkowania elektrod wynoszącym 2 miesiące zakres liniowości badanych czujników nie uległ zmianie przy nieznacznym zmniejszeniu nachylenia krzywych kalibracyjnych od wartości 29,68 do  $\sim 28,03 \text{ mV pa}^{-1}$  [9].

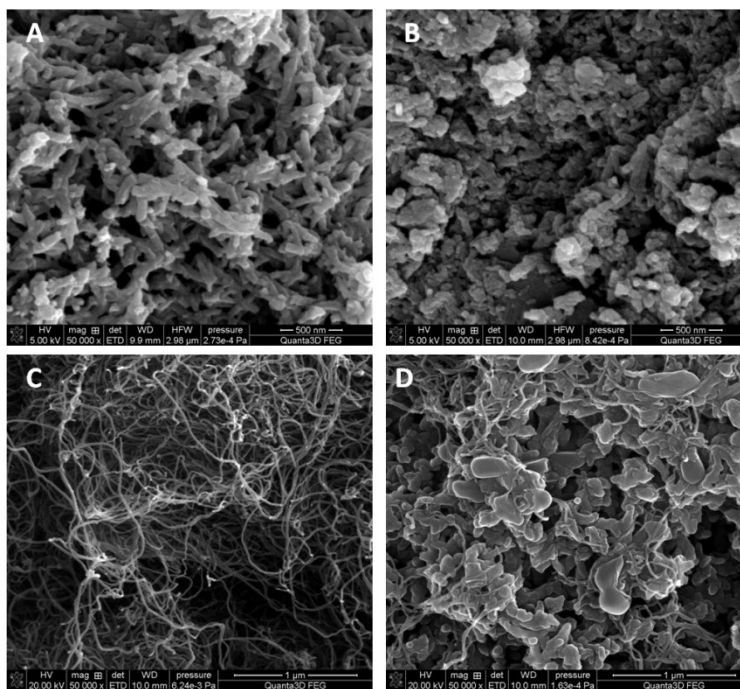
## 2.2. MATERIAŁY STAŁEGO KONTAKTU

Wprowadzenie materiału stałego kontaktu do konstrukcji ISEs, znacznie usprawniło wiele procesów i wpłynęło na poprawę parametrów elektrod. Należy jednak pamiętać, że nie każdy materiał umieszczony pomiędzy elektrodą a membraną może z powodzeniem spełniać taką funkcję. W tym aspekcie kluczowe jest wykazywanie przez badany materiał zarówno przewodnictwa jonowego, jak i elektronowego, a ponadto jego wysoka pojemność objętościowa (stabilność potencjału) i stabilność chemiczna (brak reakcji ubocznych w procesie transdukcji jon-elektron, który koniecznie powinien być odwracalny). Dodatkowo zwracana jest również uwaga na wystarczającą hydrofobowość (brak powstawania warstwy wodnej), wydajność analityczną, trwałość, żywotność i odporność mechaniczną [10].

Jako pierwsze w roli SC wykorzystano polimery przewodzące (polipirol [11,12], poli(3-oktylotiofen) [13,14], poli(3,4-etylenodioksytiofen) [15,16] oraz polianilinę [17,18]). Następnie grono to poszerzono o nanomateriały węglowe (nanorurki węglowe [19,20], grafen [21], fullereny [22], sadzę węglową [23]) oraz nanocząstki metali (złoto [24], srebro [25], platyna [26]) i tlenków metali (tlenki miedzi [27], ceru [28], irydu [29], czy rutenu [30]). Do ostatnich odkryć należą różne materiały kompozytowe, które łączą w sobie właściwości swoich komponentów, a nierzadko również pozwalają na uzyskanie nowych lepszych właściwości materiałów. Jedną z możliwych kompozycji jest połączenie MWCNTs z cieczami jonowymi – składnikami wykazującymi właściwości hydrofobowe i przewodzące. Dzięki zastosowaniu cieczy jonowej możliwe jest osiągnięcie stabilizacji elektrostatycznej i sterycznej oraz powstanie jednorodnego materiału nanokompozytowego łatwiej dyspergującego w membranie polimerowej [5,31].

W ramach opisywanych badań do konstrukcji ISEs jako materiały elektroaktywne zastosowano między innymi: modyfikowane nanowłókna polianiliny (PANINFs-Cl i PANINFs-NO<sub>3</sub>) [32], nanocząstki tlenków metali

(ZnONPs, CuONPs, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs) [33] i nanocząstki metali (AgNPs) [34] oraz nanokompozyty wielościennych nanorurek węglowych z cieczami jonowymi (MWCNTs:THTDPCI [35,36], MWCNTs:BMImPF<sub>6</sub> [37]), nanowłóknami polianiliny (PANINFs-Cl:MWCNTs) [38] oraz nanocząstkami (CuO-MWCNTs) [39], które efektywnie spełniały funkcję stałego kontaktu elektrod poprawiając ich parametry analityczne, metrologiczne oraz elektryczne. Zdjęcia SEM wybranych materiałów przedstawiono na Rysunku 3.



Rysunek 3. Obrazy SEM: (A) PANINFs-NO<sub>3</sub>, (B) PANINFs-Cl, (C) MWCNTs, (D) nanokompozytu PANINFs-Cl:MWCNTs.

Figure 3. SEM images: (A) PANINFs-NO<sub>3</sub>, (B) PANINFs-Cl, (C) MWCNTs, (D) PANINFs-Cl:MWCNTs nanocomposite.

Materiał stałego kontaktu wprowadzono zarówno jako warstwę pośrednią między materiałem elektrody a membraną jonoselektywną, jak również jako jej dodatkowy składnik zdyspergowany w całej jej objętości. Wyniki otrzymane za pomocą EIS oraz CP potwierdziły, że wprowadzenie materiału stałego kontaktu do konstrukcji elektrod wpływało głównie na poprawę ich parametrów elektrycznych (zwiększenie pojemności warstwy podwójnej oraz obniżenie oporności membrany i oporności przeniesienia ładunku), czego efektem było polepszenie stabilności i odwracalności potencjału. Między innymi elektrody z warstwą nanokompozytu (2:1) PANINFs-Cl:MWCNTs charakteryzowały się prawie 4-krotnie niższą oporno-

ścią membrany i ponad 200-krotnie niższym oporem przenoszenia ładunku przy jednoczesnym niemal 200-krotnym wzroście pojemności warstwy podwójnej w wyniku znacznie szybszych procesów dyfuzji i transportu ładunku na granicy membrana/GCE w porównaniu do elektrody niemodyfikowanej [38]. Dobre parametry elektryczne mają znaczenie również w przypadku zapewnienia szybkich czasów odpowiedzi czujników oraz niewielkiego dryftu potencjału w czasie (zmiana nawet z 0,16 do 0,046 mV min<sup>-1</sup> dla elektrod miedziowych z nanokompozytem MWCNTs:BMImPF<sub>6</sub> [37]). W przypadku nanokompozytów z cieczą jonową obniżeniu uległy granice wykrywalności czujników, a co za tym idzie, rozszerzyły się także zakresy liniowości, w których można oznaczać stężenia jonów. W przypadku elektrod czułych na jony Cu(II) – w wyniku dodatku nanokompozytu do membrany poprawiła się również ich selektywność oraz rozszerzył zakres pH. Zastosowanie nanocząstek metali i tlenków metali jako warstwy pośredniej w SC-ISEs (w szczególności ZnONPs) znacznie zwiększyło ich trwałość (czas życia > 5 miesięcy) i odporność mechaniczną, a elektrody nie wykazywały tendencji do powstawania niepożądanego w przypadku czujników potencjometrycznych – warstwy wodnej między materiałem elektrody a membraną – wpływającej negatywnie na działanie elektrody [33]. Poprawa stabilności elektrod w wyniku wprowadzenia warstwy pośredniej nanocząstek metali i tlenków metali wynikała przede wszystkim z wykazywanych przez nie doskonałych właściwości fizycznych, elektrochemicznych i półprzewodnikowych w porównaniu z ich odpowiednikami masowymi oraz wysokim stosunkiem powierzchni do objętości. Dzięki obecności warstwy NPs pole powierzchni elektroaktywnej jest znacznie większe, a transfer elektronów między ISM a elektrodą wewnętrzną – dużo bardziej efektywny. Wszystkie SC-ISEs, które wybrano w wyniku procesów optymalizacji składów membrany jonoselektywnej i/lub stałego kontaktu oraz grubości jego warstwy – wykazywały nachylenia krzywej charakterystyki bliskie teoretycznemu (wynoszące odpowiednio 59 i 29,5 mV pa<sup>-1</sup> dla jonów I- i II-wartościowych). Zauważono również, że efektywność działania materiału jako stałego kontaktu zależy w dużej mierze od jego struktury i jest ona większa dla materiałów o mniejszych rozmiarach cząstek i bardziej homogenicznej strukturze – tak jak to miało miejsce w przypadku MWCNTs:THTDPCl w elektrodach azotanowych [35], czy PANINfs-Cl:MWCNTs w elektrodach chlorkowych [38]. Co szczególnie istotne, otrzymane elektrody modyfikowane nie wykazywały wrażliwości na zmiany środowiskowe takie jak: zmiana oświetlenia i potencjału redox próbki, czy też obecność gazów, co ma ogromne znaczenie przy wykorzystywaniu ich do analizy próbek naturalnych.

W Tabeli 1. przedstawiono zestawienie najlepszych spośród wszystkich rodzajów opracowanych elektrod wraz z ich podstawowymi parametrami analitycznymi.

Tabela 1. Zestawienie opracowanych elektrod jonoselektywnych oraz ich podstawowych parametrów analitycznych.  
Table 1. List of the developed ion-selective electrodes and their basic analytical parameters.

Jon główny	Jonofor	Rodzaj stałego kontaktu	Nachylenie, mV pa <sup>-1</sup>	LoD, mol L <sup>-1</sup>	Zakres liniowości, mol L <sup>-1</sup>	Literatura
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Co(Bphen) <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Ag/AgCl/Cl <sup>-</sup>	-56,3	4,0×10 <sup>-6</sup>	1,0×10 <sup>-5</sup> – 1,0×10 <sup>-1</sup>	[8]
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Co(Bphen) <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	MWCNTs:THTDPCl nanokompozyt (2% membrany)	-57,1	5,0×10 <sup>-7</sup>	1,0×10 <sup>-6</sup> – 1,0×10 <sup>-1</sup>	[35,36]
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	TDMANO <sub>3</sub>	PANINFs-CI (0,5-2% membrany)	-56,7	3,4×10 <sup>-7</sup>	1,0×10 <sup>-6</sup> – 1,0×10 <sup>-1</sup>	[32]
		PANINFs-CI (warstwa)	-56,8	3,2×10 <sup>-7</sup>	1,0×10 <sup>-6</sup> – 1,0×10 <sup>-1</sup>	
		PANINFs-NO <sub>3</sub> (0,5-2% membrany)	-57,2	1,4×10 <sup>-6</sup>	5,0×10 <sup>-6</sup> – 1,0×10 <sup>-1</sup>	
		PANINFs-NO <sub>3</sub> (warstwa)	-57,8	1,1×10 <sup>-6</sup>	5,0×10 <sup>-7</sup> – 1,0×10 <sup>-1</sup>	
Cl <sup>-</sup>	jonofor III chlorkowy	PANINFs-Cl/MWCNTs nanokompozyt (warstwa)	-61,3	2,3×10 <sup>-6</sup>	5,0×10 <sup>-6</sup> – 1,0×10 <sup>-1</sup>	[38]
Cu <sup>+2</sup>	L <sup>+</sup> Cu <sup>+</sup>	Ag/AgCl/Cl <sup>-</sup>	29,7	6,2×10 <sup>-7</sup>	1,0×10 <sup>-6</sup> – 1,0×10 <sup>-1</sup>	[9]
Cu <sup>+2</sup>	jonofor IV miedzi(II)	MWCNTs-BMImPF <sub>6</sub> nanokompozyt (2-8% membrany)	29,8	3,3×10 <sup>-8</sup>	1,0×10 <sup>-7</sup> – 1,0×10 <sup>-2</sup>	[37]
Cu <sup>+2</sup>	jonofor IV miedzi(II)	CuO-MWCNTs nanokompozyt (1% membrany)	30,1	1,5×10 <sup>-8</sup>	5,0×10 <sup>-8</sup> – 3,0×10 <sup>-2</sup>	[39]
		CuO-MWCNTs nanokompozyt (warstwa)	29,4	2,2×10 <sup>-8</sup>	5,0×10 <sup>-8</sup> – 3,0×10 <sup>-2</sup>	
K <sup>+</sup>	wainionocyna	ZnONPs (a)	56,2	5,3×10 <sup>-6</sup>	1,0×10 <sup>-5</sup> – 1,0×10 <sup>-1</sup>	[33]
		ZnONPs (b)	56,1	3,7×10 <sup>-6</sup>	1,0×10 <sup>-5</sup> – 1,0×10 <sup>-1</sup>	
K <sup>+</sup>	wainionocyna	Ag <sup>+</sup> NPs (a)	55,5	5,4×10 <sup>-6</sup>	1,0×10 <sup>-5</sup> – 1,0×10 <sup>-1</sup>	[34]
		Ag <sup>+</sup> NPs (b)	56,2	5,2×10 <sup>-6</sup>	1,0×10 <sup>-5</sup> – 1,0×10 <sup>-1</sup>	
UO <sub>2</sub> <sup>+2</sup>	Cyanex-272	Ag/AgCl/Cl <sup>-</sup>	29,8	7,1×10 <sup>-7</sup>	1,0×10 <sup>-6</sup> – 1,0×10 <sup>-1</sup>	[40]

Co(Bphen)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> – kompleks kobaltu(II) z 4,7-difenylo-1,10-fenantroliną; Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> – elektroda chlorosrebrowa; MWCNTs:THTDPCl – nanokompozyt wielościennych nanorurek węglowych z chlorkiem triheksylo-tetraedrylofosfonowym; TDMANO<sub>3</sub> – azotan tridodecyloametyloaminy; PANINFs-CI – nanowłókna polianiliny domieszkowane jonami chlorkowymi; PANINFs-Cl/MWCNTs – nanokompozyt nanowłókien polianiliny domieszkowanych jonami chlorkowymi z wielościennymi nanorurkami węglowymi; L<sup>+</sup>Cu<sup>+</sup> – dwujądrowy kompleks N,N'-bis(5-bromo-2-hydroksy-3-metoksybenzylideno)2-hydroksypropyleno-1,3-diaminy z miedzią(II); MWCNTs:BMImPF<sub>6</sub> – nanokompozyt wielościennych nanorurek węglowych z heksafluorofosforanem 1-butyl-3-metyloimidazolowym; (a) – grubsza warstwa SC; (b) – cieńsza warstwa SC; Cyanex-272 – kwas bis(2,4,4-trimetyloleptylo)fosfonowy;

### 3. ZASTOSOWANIE SC-ISEs W ANALIZIE PRÓBEK RZECZYWISTYCH

Wybrane elektrody zastosowano do oznaczeń określonych jonów w próbkach rzeczywistych. Zmierzono zawartość jonów azotanowych(V) w warzywach oraz jonów miedzi(II), chlorkowych i azotanowych(V) w próbkach wód (woda: rzeczna, wodociągowa, mineralna i studzienna) [8,32,36,37,38]. Jako metody porównawcze stosowano miareczkowanie metodą Mohra [38] i spektrofotometrię UV-Vis [32]. Ponadto do sprawdzenia poprawności wyników oznaczeń wykorzystano również certyfikowane materiały odniesienia [37] i badanie odzysku [8,36,37]. W każdym przypadku uzyskano zadowalające wyniki, co pozwoliło stwierdzić, że otrzymane czujniki z powodzeniem mogą być wykorzystywane do oznaczeń niektórych jonów w próbkach naturalnych.

W tabeli poniżej przedstawiono przykładowe wyniki oznaczeń zawartości jonów azotanowych(V) otrzymane dla próbek wód z wykorzystaniem elektrod z jonoforem – kompleksem Co(II) z 4,7-difenylo-1,10-fenantroliną oraz nanokompozytem MWCNTs:THTDPCl w roli stałego kontaktu [36]. Biorąc pod uwagę brak etapu przygotowania próbek wód i minimalne przygotowanie próbek warzyw (ograniczające się do podstawowych czynności, takich jak: rozdrobnienie, ogrzewanie z dodatkiem wody czy rozcieńczanie do stałej objętości, bez procesu mineralizacji), uzyskane wyniki wydają się być w pełni satysfakcjonujące.

Tabela 2. Wyniki oznaczenia azotanów(V) w różnych próbkach wód i warzyw (niewzbogacanych i wzbogacanych) oraz wyznaczone wartości odzysku.

Table 2. Results of nitrate(V) determination in various water and vegetables samples (unspiked and spiked) and determined recovery values.

Próbka wody	Oznaczona zawartość jonów $\text{NO}_3^-$ , [ $\text{mg L}^{-1}/\text{mg kg}^{-1}$ ]	Odzysk, %
Woda rzeczna	$14,6 \pm 0,4$	-
Woda rzeczna + $50 \text{ mg L}^{-1} \text{NO}_3^-$	$65,2 \pm 0,6$	100,9
Woda z jeziora	$17,2 \pm 0,7$	-
Woda z jeziora + $50 \text{ mg L}^{-1} \text{NO}_3^-$	$66,8 \pm 1,1$	99,4
Sałata masłowa	$916 \pm 18$	-
Sałata masłowa + $300 \text{ mg kg}^{-1} \text{NO}_3^-$	$1226 \pm 23$	100,8
Ogórek	$532 \pm 23$	-
Ogórek + $300 \text{ mg kg}^{-1} \text{NO}_3^-$	$815 \pm 27$	97,9

## UWAGI KOŃCOWE

Elektrody jonoselektywne dzięki swoim licznym zaletom są stale rozwijane i wciąż pojawiają się nowe artykuły naukowe dotyczące innowacyjnych rozwiązań konstrukcyjnych tych czujników. Ich wszechstronność i łatwość użytkowania sprzyjają temu rozwojowi, gdyż mnogość zalet wynikających z ich zastosowania znacznie przewyższa możliwe różnice w czułości lub selektywności w porównaniu do innych metod analitycznych. Dlatego szczególnie ważne jest to ciągłe dążenie do osiągania coraz niższych granic wykrywalności czy jeszcze lepszych współczynników selektywności elektrod. Eliminacja elektrolitu wewnętrznego umożliwiła nie tylko miniaturyzację czujników, ale również przyczyniła się do znacznego obniżenia granic wykrywalności, w niektórych przypadkach nawet do poziomu nanomoli i niższych. SC-ISEs kryją w sobie jeszcze wiele możliwości rozwojowych i są wciąż udoskonalane, zarówno w zakresie stosowanych rodzajów jonoforów, jak i materiałów elektroaktywnych. Z pewnością możliwe jest skonstruowanie czujników o jeszcze lepszych parametrach, których wykorzystanie będzie zapewniać miarodajne, szybkie i dokładne wyniki analiz próbek, także w środowisku *in situ*.

## PODZIĘKOWANIA

Dziękuję serdecznie Promotor mojej pracy doktorskiej – dr hab. Cecylii Wardak za cenne wskazówki, życzliwość i opiekę podczas moich studiów doktorskich. Na szczególne słowa podziękowania zasługuje również doc. dr Niksa Krstulović, który był opiekunem mojego stażu w Instytucie Fizyki w Zagrzebiu w 2020 roku i z którym współpracuję obecnie w tej samej instytucji na stażu podoktorskim. Dziękuję rodzinie i przyjaciołom za wsparcie i dobre słowo. Dziękuję również Komitetowi Chemii Analitycznej PAN za wyróżnienie mojej dysertacji, będącej zwieńczeniem wieloletniej pracy nad czujnikami potencjometrycznymi, i przyznanie nagrody za najlepszą pracę doktorską w zakresie elektrochemii.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J. Bobacka, A. Ivaska, A. Lewenstam, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 329.
- [2] C. Bieg, K. Fuchsberger, M. Stelzle, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, **409**, 45.
- [3] C. Wardak, K. Morawska, K. Pietrzak, *Materials*, 2023, **16**, 5779.
- [4] A. Michalska, *Electroanalysis*, 2012, **24**, 1253.
- [5] C. Wardak, K. Pietrzak, K. Morawska, M. Grabarczyk, *Sensors*, 2023, **13**, 5839.
- [6] E. Bakker, P. Bühlmann, E. Pretsch, *Electroanalysis*, 1999, **11**, 915.
- [7] E. Lindner, Y. Umezawa, *Pure Appl. Chem.*, 2008, **80**, 85.
- [8] K. Pietrzak, C. Wardak, R. Łyszczek, *Electroanalysis*, 2020, **32**, 724.
- [9] K. Pietrzak, C. Wardak, B. Cristóvão, *Ionics*, 2022, **28**, 2423.
- [10] T. Yin, W. Qin, *TrAC*, 2013, **51**, 79.
- [11] A. Cadogan, Z. Gao, A. Lewenstam, A. Ivaska, D. Diamond, *Anal. Chem.*, 1992, **64**, 2496.
- [12] J. Sutter, E. Lindner, R.E. Gyurcsányi, E. Pretsch, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **380**, 7.
- [13] J. Bobacka, M. McCarrick, A. Lewenstam, A. Ivaska, *Analyst*, 1994, **119**, 1985.
- [14] J. Bobacka, A. Ivaska, A. Lewenstam, *Analytica Chimica Acta*, 1999, **385**, 195.
- [15] J. Bobacka, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 4932.
- [16] T. Lindfors, *J. Solid State Electrochem.*, 2009, **13**, 77.
- [17] J. Bobacka, T. Lindfors, M. McCarrick, A. Ivaska, A. Lewenstam, *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 3819.
- [18] Y. Huang, J. Li, T. Yin, J. Jia, Q. Ding, H. Zheng, Ch.-T.A. Chen, Y. Ye, *J. Electroanal. Chem.*, 2015, **741**, 87.
- [19] G.A. Crespo, S. Macho, F.X. Rius, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 1316.
- [20] S.S.M. Hassan, A.G. Eldin, A.E.-G.E. Amr, M.A. Al-Omar, A.H. Kamel, N.M. Khalifa, *Sensors*, 2019, **19**, 3891.
- [21] F. Li, J. Ye, M. Zhou, S. Gan, Q. Zhang, D. Han, L. Niu, *Analyst*, 2012, **137**, 618.
- [22] M. Fouskaki, N. Chaniotakis, *Analyst*, 2008, **133**, 1072.
- [23] B. Paczosa-Bator, *Talanta*, 2012, **93**, 424.
- [24] E. Jaworska, M. Wójcik, A. Kisiel, J. Mieczkowski, A. Michalska, *Talanta*, 2011, **85**, 1986.
- [25] T. Yin, T. Han, C. Li, W. Qin, J. Bobacka, *Analytica Chimica Acta*, 2020, **1101**, 50.
- [26] B. Paczosa-Bator, L. Cabaj, R. Piech, K. Skupień, *Analyst*, 2012, **137**, 5272.
- [27] K. Khun, Z. H. Ibupoto, M. Willander, *Electroanalysis*, 2013, **25**, 1425.
- [28] N. Lenar, R. Piech, B. Paczosa-Bator, *Membranes*, 2022, **12**, 349.
- [29] N. Lenar, R. Piech, J. Wyrwa, B. Paczosa-Bator, *Membranes*, 2021, **11**, 259.
- [30] N. Lenar, B. Paczosa-Bator, R. Piech, *Membranes*, 2020, **10**, 182.
- [31] E. Lindner, R.E. Gyurcsányi, *J. Solid State Electrochem.*, 2009, **13**, 51.
- [32] K. Pietrzak, C. Wardak, S. Malinowski, *Appl. Nanosci.*, 2021, **11**, 2823.
- [33] K. Pietrzak, N. Krstulović, D. Blažeka, J. Car, S. Malinowski, C. Wardak, *Talanta*, 2022, **243**, 123335.
- [34] K. Pietrzak, N. Krstulović, C. Wardak, S. Malinowski, *Proceedings of the 17th International Students Conference “Modern Analytical Chemistry”*, 2021, **17**, 85.
- [35] K. Pietrzak, C. Wardak, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 348, 130720.
- [36] K. Pietrzak, C. Wardak, *Modern Problems and Solutions in Environmental Protection*, 2021, 11.
- [37] C. Wardak, K. Pietrzak, M. Grabarczyk, *Water*, 2021, **13**, 2869.
- [38] K. Pietrzak, K. Morawska, S. Malinowski, C. Wardak, *Membranes*, 2022, **12**, 1150.
- [39] C. Wardak, K. Pietrzak, K. Morawska, *Appl. Nanosci.* 2023, **13**, 7017.
- [40] K. Pietrzak, C. Wardak, *Proceedings of the 16th International Students Conference “Modern Analytical Chemistry”*, 2020, **16**, 45.

Praca wpłynęła do Redakcji 12 listopada 2024 r.





**Laureaci nagrody ufundowanej przez Polygen  
za najlepszą rozprawę doktorską z chemii analitycznej**



# **SEZONOWA ZMIENNOŚĆ ŹRÓDEŁ PYŁÓW ZAWIESZONYCH NA PRZYKŁADZIE KRAKOWA**

SEASONAL VARIABILITY OF PARTICULATE  
MATTER SOURCES ON THE EXAMPLE OF KRAKOW

**Alicja Skiba<sup>1,\*</sup>, Katarzyna Styszko<sup>1</sup>, Lucyna  
Samek<sup>1</sup>, Zbigniew Gorczyca<sup>1</sup>, Mirosław Zimnoch<sup>1</sup>,  
Kazimierz Różański<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*AGH Akademia Górniczo-Hutnicza*  
*\*e-mail: skiba@agh.edu.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Aerozole atmosferyczne: rodzaje i źródła emisji
2. Charakterystyka obszaru badań
3. Metodyka pomiarów i baza aparaturowa
4. Metody interpretacji wyników
5. Dyskusja wyników badań
6. Podsumowanie


Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---


**Dr inż. Alicja Skiba** – adiunkt na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej, w swojej pracy naukowej skupia się na zagadnieniach jakości powietrza, w szczególności na analizie chemicznej i izotopowej pyłów zawieszonych i gazów cieplarnianych.



 <https://orcid.org/0000-0002-7346-8267>


**Dr hab. inż. Katarzyna Styszko, prof. AGH** – profesor uczelni na Wydziale Energetyki i Paliw, Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Prowadzi prace badawcze związane z emisją do środowiska mikrozanieczyszczeń, między innymi pozostałości farmaceutyków, środków pielęgnacji osobistej oraz mikroplastiku. Procesów przemian zachodzących z ich udziałem oraz zastosowania epidemiologii opartej na analizie ścieków jako źródła informacji o jakości życia i narażenia na zanieczyszczenia środowiska. Ponadto prowadzi prace badawcze z zakresu składu chemicznego pyłu zawieszzonego i jego wpływu na zdrowie.



 <https://orcid.org/0000-0003-0092-3772>


**Dr hab. inż. Lucyna Samek, prof. AGH** – Profesor AGH na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej. Specjalista w zakresie analizy składu pierwiastkowego metodą fluorescencji rentgenowskiej różnych materiałów (środowiskowych, obiektów ceramiki zabytkowej). Zajmuje się badaniami jakości powietrza, analizą składu pyłów powietrza oraz określaniem źródeł emisji i ich udziału w zanieczyszczeniach. Badania dotyczą pyłów na zewnątrz jak i wewnątrz pomieszczeń np. w uzdrowiskach. Badania ceramiki zabytkowej obejmują obiekty z Muzeum Zamku Królewskiego na Wawelu.



 <https://orcid.org/0000-0001-8636-2771>


**Dr inż. Zbigniew Gorczyca** - adiunkt na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej, w pracy naukowej stosuje spektrometrię mas stosunków izotopowych (IRMS) w badaniach składu izotopowego wodoru ( $\delta^2\text{H}$ ) i tlenu ( $\delta^{18}\text{O}$ ) w wodach opadowych, podziemnych i powierzchniowych oraz węgla ( $\delta^{13}\text{C}$ ) w atmosferycznym dwutlenku węgla i w pyłach zawieszonych.



 <https://orcid.org/0000-0002-1643-4589>


**Dr hab. inż. Mirosław Zimnoch, prof. AGH** - Prodziekan ds. Nauki i Współpracy na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej, w swojej pracy naukowej zajmuje się badaniem obiegu węgla, pomiarami gazów cieplarnianych, modelowaniem atmosfery oraz wykorzystaniem naturalnych znaczników izotopowych w badaniach atmosferycznych.



 <https://orcid.org/0000-0002-0594-9376>

**Prof. dr hab. inż. Kazimierz Różański** - emerytowany profesor na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej Akademii Górniczo-Hutniczej. Zajmuje się zastosowaniami metod izotopowych w Naukach o Ziemi.



 <https://orcid.org/0000-0003-4704-0379>

## ABSTRACT

We are observing a long-term trend, which is the growing interest of scientists and the general public, in air quality and air pollution, both in Poland and around the world.

The deterioration of air quality is influenced by both anthropogenic and natural factors. The most well-known sources of anthropogenic emissions into the atmosphere include the combustion of fossil fuels and biomass, transportation, industry, as well as agricultural activities. Natural sources include, for example, grass pollen, soil erosion, wildfires, and volcanic emissions.

One of the primary pollutants emitted into the atmosphere is particulate matter (PM) – an aerosol with a complex composition. It may contain chemical compounds considered carcinogenic, and long-term exposure to high concentrations can lead to adverse health effects. Therefore, in 2021, the World Health Organization (WHO) published recommended limits for particulate matter fractions  $PM_{10}$  and  $PM_{2.5}$ .

In the doctoral dissertation of Alicja Skiba entitled „Seasonal variability of air pollution sources in Kraków during the period of 2018-2019, based on analyses of chemical and isotopic composition”, the sources of particulate matter in a major urban center – Krakow, were studied. Two particulate matter fractions ( $PM_1$  and  $PM_{10}$ ) were analyzed, with daily samples collected between April 21, 2018, and March 19, 2019. These samples underwent the following analyses: ion chromatography, high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry, thermo-optical analysis of OC/EC, and mass spectrometry (AMS and IRMS). The results were interpreted using methods such as positive matrix factorization (PMF).

The application of PMF revealed five emission sources: coal and biomass (solid fuel) combustion, secondary inorganic aerosols, road emissions, soil matter, industry and other unidentified sources. The results showed significant variability in emissions from coal and biomass combustion between the heating and non-heating seasons (a substantial increase from several percent to as much as 41%). Industrial emissions exhibited a relatively stable contribution throughout the year, ranging from approximately 14% to 24%, depending on the fraction and season.

Keywords: air quality, air pollution, smog, Krakow, particulate matter

Słowa kluczowe: jakość powietrza, zanieczyszczenie powietrza, smog, Kraków, pył zawieszony

---

**WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

PM <sub>1</sub> , PM <sub>2.5</sub> , PM <sub>10</sub>	– pył zawieszony (ang. particulate matter) o średnicy aerodynamicznej odpowiednio: mniejszej lub równej 1 μm, 2,5 μm, 10 μm
WHO	– Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)
PMF	– dodatnia faktoryzacja macierzy (ang. positive matrix factorization)
EF	– współczynnik wzbogacenia (ang. enrichment factor)
WFiIS	– Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
OC, EC	– węgiel organiczny (ang. organic carbon), węgiel elementarny (ang. elemental carbon)
GIOŚ	– Główny Inspektorat Ochrony Środowiska
SIA	– wtórne aerozole nieorganiczne (ang. secondary inorganic aerosols)

## WPROWADZENIE

Obserwujemy wieloletni trend, jakim jest utrzymujący się zarówno w Polsce jak i na świecie wzrost zainteresowania zarówno naukowców, jak i pozostałych mieszkańców globu tematyką jakości oraz zanieczyszczenia powietrza.

Na pogorszenie jego jakości mają wpływ zarówno czynniki antropogeniczne jak i naturalne. Do najbardziej znanych źródeł emisji zanieczyszczeń antropogenicznych do atmosfery należy spalanie paliw kopalnych i biomasy, transport, przemysł, ale także zanieczyszczenia związane z działalnością rolniczą. Do źródeł naturalnych możemy zaliczyć np. pylenie traw, erozje gleby, pożary oraz emisje wulkaniczne.

Jednym z podstawowych zanieczyszczeń emitowanych do atmosfery jest pył zawieszony (PM, ang. particulate matter) – jest on aerozolem o kompleksowym składzie. W jego skład wchodzić mogą związki chemiczne uważane za rakotwórcze, stąd długotrwałe narażenie na jego wysokie stężenia, może nieść za sobą negatywne konsekwencje zdrowotne. Dlatego też w 2021 roku Światowa Organizacja Zdrowia w opublikowała zalecane limity dla pyłu zawieszonego frakcji PM<sub>10</sub> i PM<sub>2,5</sub>.

W rozprawie doktorskiej dr inż. Alicji Skiby pt. „Zmienność sezonowa źródeł zanieczyszczeń pyłowych powietrza w Krakowie w okresie 2018-2019 w oparciu o badania składu chemicznego i izotopowego”, pokazano jakie są źródła pyłów zawieszonych na przykładzie dużego ośrodka miejskiego - Krakowa. Przebadano dwie frakcje pyłu zawieszonego (PM<sub>1</sub> i PM<sub>10</sub>), pobrane dobowe próbki pochodziły z okresu 21.04.2018-19.03.2019. Zostały one poddane następującym analizom: chromatografii jonowej, wysokosprawnej chromatografii anionowymiennej z pulsacyjnym detektorem amperometrycznym, spektrometrii fluorescencji rentgenowskiej, analizie termooptycznej OC/EC oraz spektrometrii masowej (AMS i IRMS). Następnie otrzymane wyniki poddano interpretacji wykorzystując m.in. metodę dodatniej faktoryzacji macierzy (ang. PMF, positive matrix factorization). W wyniku zastosowania PMF uzyskano 5 źródeł emisji: spalanie węgla i biomasy (paliw stałych), wtórne aerozole nieorganiczne, emisje drogowe, materię glebową, przemysł i pozostałe niezidentyfikowane źródła pyłu. Wyniki pokazują m.in. znaczną zmienność źródła związanego ze spalaniem węgla i biomasy pomiędzy sezonem niegrzewczym i grzewczym (znaczący wzrost od kilkunastu do nawet 41%), z kolei źródła związane m.in. z przemysłem przejawiały stały poziom w ciągu roku ok. 14-24% w zależności od frakcji i pory roku.

## 1. AEROZOLE ATMOSFERYCZNE: RODZAJE I ŹRÓDŁA EMISJI

Aerозole, czyli koloidy, których fazą dyspergującą jest powietrze, a fazą zdyspergowaną cząstki ciekłe lub stałe, wchodzą, obok gazów, w skład atmosfery ziemskiej. Standardowo dzieli się je na aerозole pierwotne (emitowane bezpośrednio ze źródeł do atmosfery cząstki stałe/ciekłe np. pył zawieszony, sól morską) i wtórne (należą tutaj np. azotany, siarczany - powstają na skutek reakcji i przemian gazów takich jak  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ , czy  $\text{NO}_x$  w atmosferze). Skład chemiczny aerозoli jest zróżnicowany, zawartość poszczególnych składników różni się w odmiennych porach roku, a nawet porach dnia, silnie zależy od występujących w pobliżu źródeł emisji, a także od warunków meteorologicznych.

Pył zawieszony (PM, ang. particulate matter) jest aerозolem o kompleksowym składzie, wśród jego składników możemy wymienić szereg jonów (np.  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ), metali (np. K, Fe, Mn, Ni), niemetalu (np. Cl, S), składową węglową (w tym węgiel organiczny, w którego skład wchodzi szereg związków organicznych oraz węgiel elementarny) – niebagatelną rolę w określaniu źródeł emisji PM stanowi także zróżnicowany skład izotopowy węgla we wspomianej składowej węglowej (w szczególności stosunek  $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$  oraz  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ).

Jednoznacznie wykazano negatywny wpływ pyłów zawieszonych na zdrowie człowieka. Do negatywnych skutków zdrowotnych związanych z ekspozycją na pył zawieszony należą m.in. choroby układu oddechowego (np. astma, przewlekłe zapalenie oskrzeli) i układu sercowo-naczyniowego (np. choroba niedokrwienna serca, zwiększone ryzyko arytmii) [1], stanowią one zagrożenie także dla wielu innych układów organizmu, w tym moczowego, rozrodczego, czy nerwowego [1]–[3]. W związku z powyższym, Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, ang. World Health Organization) opublikowała w 2021 roku nowe globalne rekomendacje dotyczące limitów stężeń kluczowych zanieczyszczeń powietrza, w tym pyłów zawieszonych o średnicy aerodynamicznej mniejszej niż  $2,5\ \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2.5}$ ) i o średnicy aerodynamicznej mniejszej niż  $10\ \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{10}$ ) [4]. Wyszczególniono je poniżej:

a)  $\text{PM}_{2.5}$ :

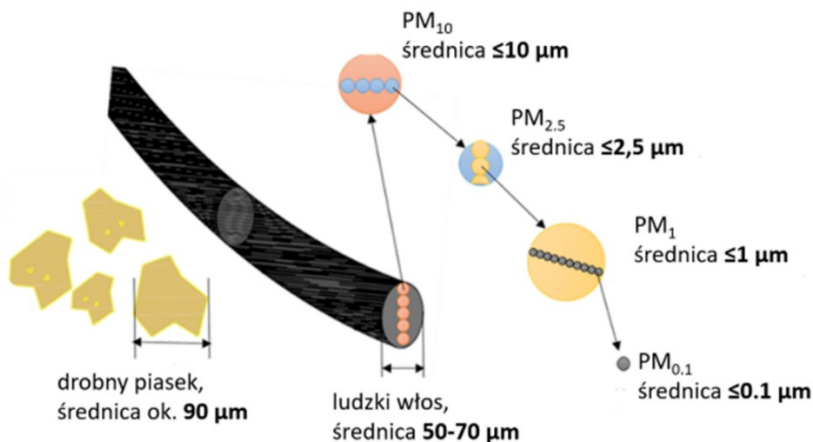
- Średnia roczna:  $5\ \mu\text{g}/\text{m}^3$
- Średnia dzienna (24 godziny):  $15\ \mu\text{g}/\text{m}^3$

b)  $\text{PM}_{10}$ :

- Średnia roczna:  $15\ \mu\text{g}/\text{m}^3$
- Średnia dzienna (24 godziny):  $45\ \mu\text{g}/\text{m}^3$



Warto zauważyć, że rozróżniamy także PM o średnicy aerodynamicznej mniejszej niż  $2,5 \mu\text{m}$ , jednak tak małe średnice nie zostały ujęte w rekomendacjach przedstawionych przez WHO. Na Rysunku 1 ukazano średnice poszczególnych frakcji pyłu zawieszonego na tle ludzkiego włosa i ziarenka piasku.



Rysunek 1. Porównanie rozmiaru pyłu zawieszonego różnych frakcji na tle średnicy ludzkiego włosa i ziarenka piasku ([5], zmodyfikowano).

Figure 1. Comparison of the size of particulate matter of different fractions against human hair and fine beach sand ([5], modified).

Źródła aerozoli atmosferycznych możemy podzielić na antropogeniczne i naturalne, przykład takiego podziału zilustrowano na Rysunku 2.

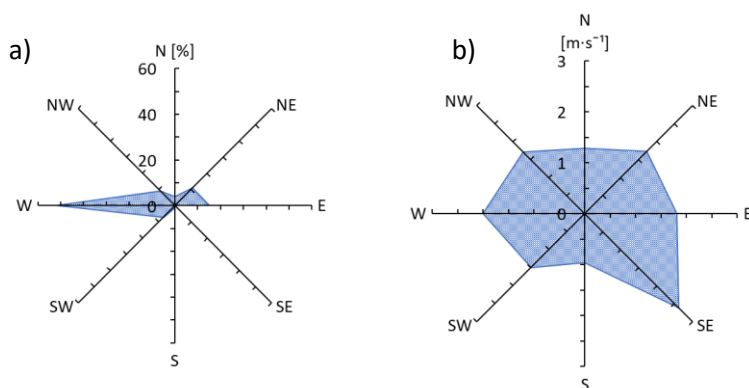


Rysunek 2. Podział źródeł aerozoli ze względu na pochodzenie ([6], zmodyfikowano).

Figure 2. Division of aerosol sources by their origin ([6], modified).

## 2. CHARAKTERYSTYKA OBSZARU BADAŃ

Kraków jest miastem położonym w Małopolsce na terenie 5 makroregionów geograficznych, jest stolicą regionu, a także drugim co do wielkości i liczby ludności miastem Polski. Liczba mieszkańców w 2019 roku wynosiła 779115, a jego łączna powierzchnia 327 km<sup>2</sup> [7]. Kraków jest usytuowany w nieszczęśliwej dolinie Wisły i otoczony terenem wyżynnym, co negatywnie wpływa na możliwości naturalnego przewietrzania miasta. W Krakowie dominują wiatry bardzo słabe (<2 m·s<sup>-1</sup>) i słabe (2-4 m·s<sup>-1</sup>) [8]–[10]. Rozkład kierunków i prędkości wiatrów dla badanego (24.04.2018 – 19.03.2019 wyj. okres 28.09.2018 – 25.10.2018). został zobrazowany na Rysunku 3 (a-b).



Rysunek 3. (a-b). Rozkład kierunków (a) i średnich prędkości (b) wiatrów w Krakowie w okresie, w którym prowadzono badania; sumaryczna liczba dni wzięta pod uwagę wyniosła 318\*[6].

\*Przedstawione dane meteorologiczne pochodzą ze stacji meteorologicznej Zespołu Fizyki Środowiska WFiIS AGH oraz z bazy danych meteorologicznych dostępnych na stronie Instytutu Meteorologii i Gospodarki Wodnej - Państwowego Instytutu Badawczego.

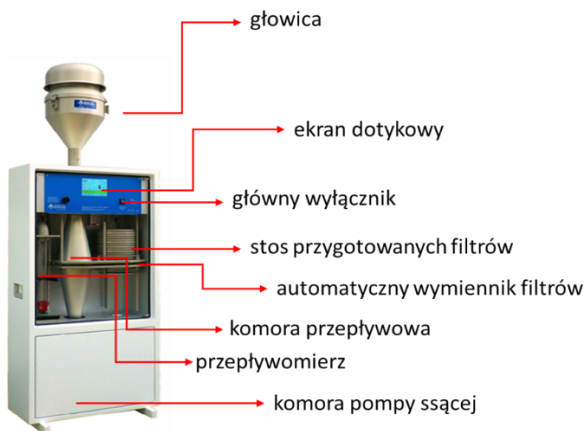
Figure 3. (a-b) Distribution of wind directions (a) and average speeds (b) in Kraków during the period of the study; the total number of days taken into account was 318\*[6].

\* The presented meteorological data come from the meteorological station of the Environmental Physics Team from the AGH University of Krakow and from meteorological database available on the website of the Institute of Meteorology and Water Management - National Research Institute.

Warto zaznaczyć, że odnotowane prędkości wiatru w całym okresie, nie przekroczyły skali dla wiatrów umiarkowanych (>4-7 m·s<sup>-1</sup>), a najczęściej notowano wiatr zachodni (52%). Roczne sumy opadów atmosferycznych w Krakowie zawierają się zazwyczaj w przedziale 650 - 700 mm, a średnia miesięczna temperatura niższa niż 0 °C notowana może być od listopada do marca, w pozostałych miesiącach jest ona dodatnia [8].

### 3. METODYKA POMIARÓW I BAZA APARATUROWA

Dobowe próbki pyłu zawieszonego ( $PM_{10}$  i  $PM_{2.5}$ ) pobierano w okresie 24.04.2018 – 19.03.2019 (z wyjątkiem okresu 28.09.2018 – 25.10.2018). Poborniki pyłu typu DHA-80 firmy DIGITEL (przepływ powietrza  $720 \text{ m}^3 \cdot \text{doba}^{-1}$ ) zostały ustawione na dachu budynku D10 Akademii Górniczo-Hutniczej ( $50^\circ 04' \text{ N } 19^\circ 55' \text{ E}$ , wys. 220 m n.p.m.) na wysokości ok. 20 metrów nad powierzchnią gruntu. Schemat pobornika wysokoobjętościowego DHA-80 firmy DIGITEL został przedstawiony na Rysunku 4.



Rysunek 4. Pobornik wysokoobjętościowy DHA-80 ([6], [www.digitel-ag.com](http://www.digitel-ag.com), zmodyfikowano).

Figure 4. High-volume sampler DHA-80 ([6], [www.digitel-ag.com](http://www.digitel-ag.com), modified).

By określić źródła emisji pyłów zawieszonych, najpierw wytypowano niezbędne pierwiastki i związki chemiczne, które następnie oznaczano w zgromadzonych próbkach pyłów. Zebrany materiał badano pod kątem występowania: węgla organicznego i elementarnego, cukrów, jonów (w szczególności  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NH}_4^+$  oraz  $\text{NO}_3^-$ ) oraz izotopów węgla  $^{14}\text{C}$  i  $^{13}\text{C}$ . Zastosowane metody analityczne oraz wykorzystana aparatura zostały przedstawione poniżej na Rysunkach 5-10.



Rysunek 5. Termo-optyczna analiza OC/EC (analizator OC/EC Sunset Laboratory Inc. – do określania zawartości węgla organicznego i elementarnego).

Figure 5. Thermal-optical OC/EC analysis (Sunset Laboratory OCEC Lab Aerosol Analyzer– for determining organic and elemental carbon concentration).



Rysunek 6. Izokratyczna chromatografia jonowa z detektorem konduktometrycznym [chromatograf jonowy ICS-1100 (Thermo Scientific)], mierzono jony:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Figure 6. Isocratic ion chromatography with conductometric detector [performed with ICS-1100 instrument (Thermo Scientific)], measured ions:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ .



Rysunek 7. Wysokosprawna chromatografia anionowymienna z pulsacyjnym detektorem amperometrycznym (Dionex ICS 3000), mierzono zawartość 14 związków organicznych, w tym lewogłukozy.

Figure 7. High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (Dionex ICS 3000), a presence of 14 organic compounds was measured, including levoglucosan.



Rysunek 8. Spektrometria fluorescencji rentgenowskiej z dyspersją energii (EDXRF) (aparat zaprojektowany przez pracowników WFiIS AGH), badano zawartość następujących pierwiastków w próbkach: Cl, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, Sr, As, Pb.

Figure 8. Energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF) method, (the instrument was designed by employees of WFiIS AGH), the content of the following elements was analyzed: Cl, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, Sr, As, Pb.



Rysunek 9. Spektrometria masowa stosunków izotopowych (IRMS) (spektrometr masowy Finnigan Delta-S), analiza próbek pod kątem zawartości izotopu  $\delta^{13}\text{C}$  w ich frakcji węglowej.

Figure 9. Isotope ratio mass spectrometry (IRMS) (Finnigan Delta-S mass spectrometer), analysis of samples for the content of the  $\delta^{13}\text{C}$  isotope in their carbonaceous fraction.



Rysunek 10. Akceleracyjna spektrometria mas (AMS) (spektrometr „Compact Carbon AMS”) do analizy zawartości  $^{14}\text{C}$  w próbkach (źródło: [www.radiocarbon.pl](http://www.radiocarbon.pl)).

Figure 10. The accelerator mass spectrometry (AMS) (“Compact Carbon AMS” spectrometer) to analyse the  $^{14}\text{C}$  content in samples (source: [www.radiocarbon.pl](http://www.radiocarbon.pl)).

#### 4. METODY INTERPRETACJI WYNIKÓW

Zgromadzone wyniki badań składu chemicznego, pierwiastkowego i izotopowego pobranych próbek  $\text{PM}_{10}$  i  $\text{PM}_{2.5}$ , zostały następnie poddane interpretacji, poprzez wykorzystanie kilku wybranych metod badawczych. Były to:

- Dodatnia faktoryzacja macierzy (PMF) – z ang. positive matrix factorization, należy do grupy modeli receptorowych tj. pozwala na bazie zgromadzonych parametrów, za pomocą narzędzi statystycznych, określić profile i udziały źródeł emisji aerozoli atmosferycznych [12]–[14],
- Metoda rekonstrukcji masy pyłu zawieszonego – z ang. mass closure, jest metodą półilościową, polega na porównaniu wyznaczonego grawimetrycznie stężenia masowego rozważanej frakcji PM z sumą stężeń składników tego pyłu ([15],

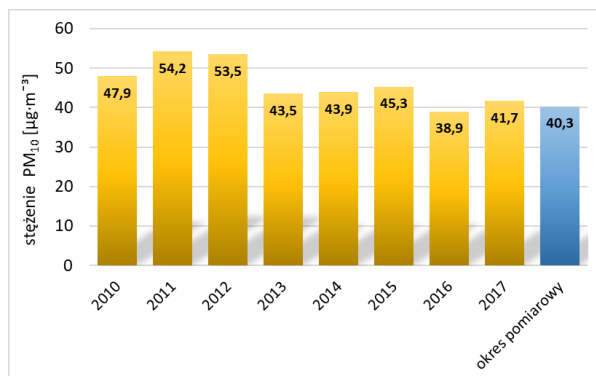
- Współczynnik wzbogacenia – z ang. enrichment factor, to wskaźnik pozwalający na określenie 3 możliwych źródeł pochodzenia pierwiastków wchodzących w skład pyłu zawieszonego (wyróżniamy pochodzenie ze skorupy ziemskiej, związane z aktywnością człowieka oraz mieszane) [16].
- Bilans masowo-izotopowy – pozwala zidentyfikować i określić udziały źródeł węgla we frakcji węglowej pyłu zawieszonego. Oparty jest on na danych

dotyczących masy frakcji węglowej, pomiarach zawartości izotopów  $^{13}\text{C}$  oraz  $^{14}\text{C}$  w badanych próbkach oraz sygnaturach izotopowych różnych źródeł węgla [17].

Szczegółowy opis wyżej wymienionych metod badawczych znajduje się w rozprawie doktorskiej dr inż. Alicji Skiby [6]. W dyskusji wyników badań przedstawiono wyniki uzyskane w wyniku zastosowania metody dodatkowej faktoryzacji macierzy (PMF).

## 5. DYSKUSJA WYNIKÓW BADAŃ

Uzyskane w ramach przeprowadzonej kampanii pomiarowej średnie stężenie frakcji  $\text{PM}_{10}$  zestawiono ze średniorocznymi stężeniami ze stacji tła miejskiego przy ul. Bujaka w Krakowie pozyskanymi przez GIOŚ w latach 2010-2017, wyniki przedstawiono na Rysunku 11.



Rysunek 11. Porównanie średniego stężenia  $\text{PM}_{10}$  w badanym okresie ze średniorocznymi stężeniami otrzymanymi w latach 2010-2017 przez GIOŚ na stacji monitoringu powietrza przy ul. Bujaka (źródła: <https://powietrze.gios.gov.pl/pjp/archives>, [6]).

Figure 11. Comparison of the average  $\text{PM}_{10}$  concentration in the studied period with the average annual concentrations obtained in 2010-2017 by GIOŚ at the air monitoring station at Bujaka Street (sources: <https://powietrze.gios.gov.pl/pjp/archives>, [6]).

Na Rysunku 11 możemy zaobserwować zmienne średnioroczne stężenie  $\text{PM}_{10}$  notowane na stacji przy ul. Bujaka w Krakowie, które wynosiło od  $54,2 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$  w 2011 roku do  $38,9 \mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$  w 2016 roku. Jak widać, średnia dla okresu pomiarowego jest wyższa jedynie od średniej notowanej w 2016 roku.

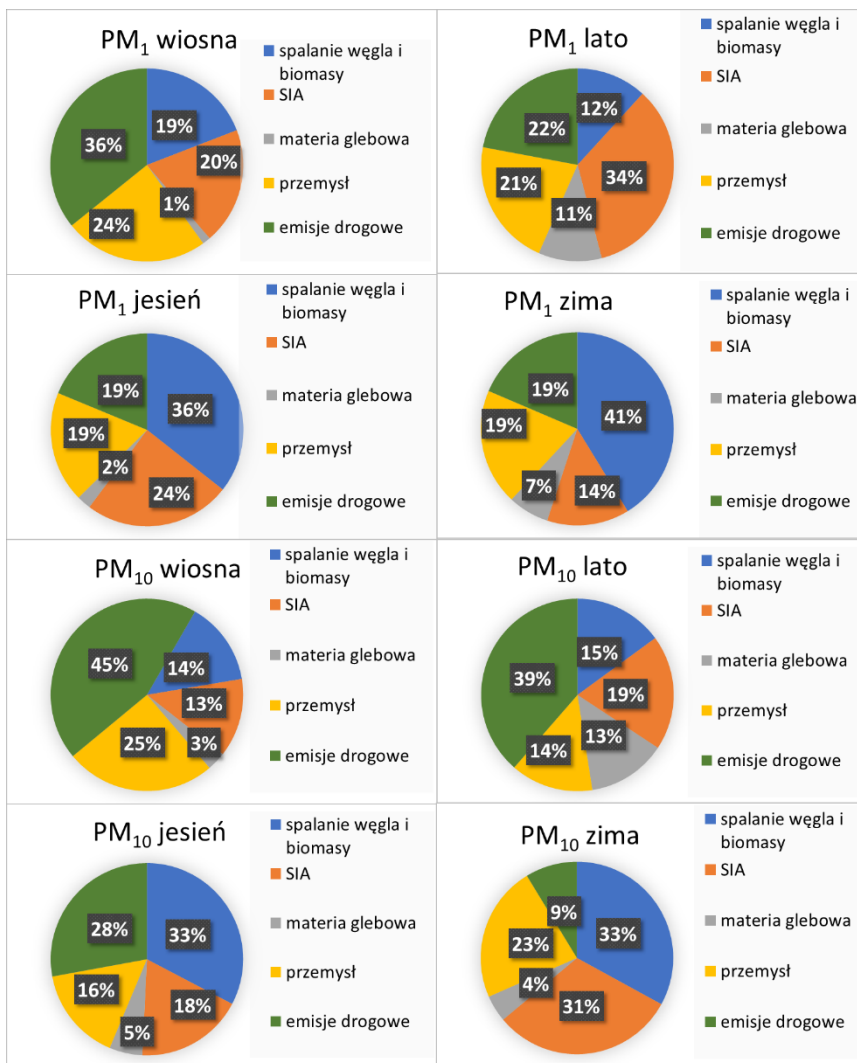
W wyniku zastosowania dla zgromadzonych danych metody dodatniej faktoryzacji macierzy, otrzymano 5 czynników tj. źródeł emisji pyłu zawieszonego. Wśród źródeł wymienić możemy: spalanie paliw stałych (WB), wtórne aerozole nieorganiczne (SIA), emisje drogowe (EK), emisje glebowe (CM), przemysł i pozostałe niezidentyfikowane źródła pyłu (PP). Źródła te są identyfikowane w metodzie PMF na podstawie wysokich udziałów poszczególnych składników przedstawionych szczegółowo w Tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka źródeł otrzymanych poprzez analizę PMF ([6], zmodyfikowano).

Table 1. Characterization of sources obtained by PMF analysis ([6], modified).

Oznaczenie źródła	Rodzaj źródła	Podstawowe składniki wskazujące na rodzaj źródła
WB	Spalanie węgla i biomasy (paliw stałych)	OC, EC, lewoglukoza, Cl, NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , K, Na <sup>+</sup>
SIA	Wtórne aerozole nieorganiczne	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
EK	Emisje drogowe	OC, EC, NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , Cu, Fe, Zn
CM	Materia glebowa	K, Ca, Na <sup>+</sup> , Cl, Fe, As, Ti, Pb, Ni
PP	Przemysł i pozostałe niezidentyfikowane źródła pyłu	Co, Cr, Fe, Zn, Cu, As, Pb

Na Rysunku 12 przedstawione zostały udziały wyszczególnionych powyżej źródeł emisji (dla  $PM_1$  i  $PM_{10}$ ) w Krakowie w różnych porach roku, dla rozpatrywanego okresu pomiarowego. Udziały te zostały określone za pomocą metody dodatniej faktoryzacji macierzy.



Rysunek 12. Procentowe udziały źródeł emisji pyłu zawieszonego ( $PM_1$  i  $PM_{10}$ ) w Krakowie w różnych porach roku, zidentyfikowane na podstawie modelowania PMF (źródło: [6]).

Figure 12. Percentage shares of particulate matter emission sources ( $PM_1$  and  $PM_{10}$ ) in Kraków in different seasons, based on PMF modelling (source: [6]).

Wyniki modelowania PMF wykazały, co następuje: jesienią i zimą źródła związane ze spalaniem węgla i biomasy stanowiły odpowiednio 36% i 41% w przypadku  $PM_1$  oraz 33% w przypadku  $PM_{10}$ , natomiast wiosną i latem odpowiednio: 19% i 12%



dla  $PM_1$  oraz 14% i 15% dla  $PM_{10}$ . Udział SIA w  $PM_{10}$  wynosił od 13% wiosną do 31% zimą, a w  $PM_1$  od 14% zimą do 34% latem. Emisje drogowe w  $PM_{10}$  stanowiły od 9% zimą do 45% wiosną, a w  $PM_1$  od 19% jesienią i zimą do 36% wiosną. Materia glebowa maksymalnie wynosiła 13% dla  $PM_{10}$  i 11% dla  $PM_1$  latem. Udział źródeł związanych z przemysłem i pozostałymi niezidentyfikowanymi źródłami (PP) wynosił dla  $PM_{10}$  od 14% latem do 25% wiosną, a dla  $PM_1$  od 19% jesienią i zimą do 24% wiosną.

Wyniki jednoznacznie pokazują dominację spalania paliw stałych (węgla i biomasy) jako źródła emisji pyłów zawieszonych w sezonie jesienno-zimowym dla obu frakcji. Z kolei udział wtórnych aerozoli nieorganicznych (SIA) zmieniał się w zależności od pory roku i frakcji. Wysoki udział SIA zimą dla  $PM_{10}$  (23%) wynikał z wyższych stężeń prekursorów w powietrzu, który związany jest ze spalaniem paliw stałych oraz notowanym niższym temperaturą powietrza i wysokiej wilgotności w tym okresie, natomiast latem ich wysoki udział w  $PM_1$  (21%) był związany z procesami fotochemicznymi, którym sprzyja wysoka temperatura powietrza.

Emisje drogowe, obejmujące spalanie paliw ciekłych oraz ścieranie elementów pojazdów wykazywały tendencję odwrotną do spalania paliw stałych – ich stężenie było niższe w miesiącach chłodniejszych. Możliwe, że jest to związane z tym, że emisje związane ze spalaniem paliw stałych (węgla kamiennego i biomasy), dominują jesienią i zimą, przez co udział procentowy emisji drogowych w tych porach roku jest nieco niższy.

Materia glebowa, związana z resuspensją pyłów ulicznych i użyciem soli drogowej, pozostawała na niskim poziomie przez cały rok, osiągając maksimum latem: 13% dla  $PM_{10}$  i 11% dla  $PM_1$ . Pierwiastki związane z glebą wykazywały niewielkie zmiany sezonowe, choć niektóre (np. brom, chlor) miały wyższe stężenia zimą z powodu spalania węgla, czy jak w przypadku chloru, przez stosowania soli drogowej do odładzania ulic.

Emisje przemysłowe i niezidentyfikowane źródła (PP) nie wykazywały wyraźnej zmienności sezonowej, co jest uzasadnione stałą, całoroczną produkcją z pobliskich zakładów przemysłowych.

Szczegółowa dyskusja danych przedstawionych w rozdziale 4 została przeprowadzona w rozprawie doktorskiej dr inż. Alicji Skiby pt. „Zmienność sezonowa źródeł zanieczyszczeń pyłowych powietrza w Krakowie w okresie 2018-2019 w oparciu o badania składu chemicznego i izotopowego” [6].

## 6. PODSUMOWANIE

Badania nad składem i pochodzeniem aerozoli atmosferycznych są niezwykle istotne m.in. ze względu na ich znaczący wpływ na zdrowie ludzkie. Istnieje wiele metod pozwalających określić źródła emisji pyłów. Na przykładzie zastosowanej metody PMF możemy zaobserwować zmienność sezonową tych źródeł w Krakowie i zależność procentowego udziału tych źródeł od frakcji pyłu zawieszzonego. Widoczne jest to np. dla

źródła zidentyfikowanego jako spalanie paliw stałych (WB), które wzrasta od 12-19% dla  $PM_1$  w sezonie wiosenno-letnim do 36-41% w sezonie jesienno-zimowym, a dla  $PM_{10}$  odpowiednio od 14-15% do 33% - zauważalny jest wzrost udziału źródła związany z sezonem grzewczym w Krakowie. Źródło rozpoznane jako materia glebowa pozostało na niskim poziomie przez cały rok, wahania stężeń poszczególnych pierwiastków glebowych mogą się wiązać z użyciem soli drogowej, czy spalaniem węgla do celów grzewczych. Emisje przemysłowe pozostawały w przypadku obu frakcji na stałym poziomie przez cały rok. Zaś emisje drogowe przejawiały odwrotną tendencję do czynnika WB. Udział czynnika SIA był zróżnicowany w zależności od frakcji, na jego wartość wpływały inne czynniki w zależności od pory roku.

Wyniki te mogą stanowić cenny materiał odniesienia, w kontekście walki Władz Miasta Krakowa ze złej jakości powietrzem. Obecnie Kraków znajduje się w innej sytuacji prawnej niż w latach 2018-2019, które objęły przedstawione badania. Charakteryzują one bowiem źródła emisji pyłu zawieszonego jeszcze sprzed wprowadzenia przez Sejmik Województwa Małopolskiego zakazu spalania paliw stałych, który wszedł w życie 1 września 2019 roku [18]. Ponadto 30 kwietnia 2024 roku upłynął termin na wymianę tzw. kotłów bezklasowych, niespełniających norm emisyjnych na terenie województwa małopolskiego [19]. Wskazaniem na przyszłość byłoby powtórzenie przedstawionych w niniejszym artykule badań, by móc ocenić wpływ wprowadzonych zmian prawnych, na faktyczną zmianę struktury źródeł emisji na terenie miasta.

## PODZIĘKOWANIE

Autorzy dziękują za finansowe wsparcie uzyskane na poczet realizacji projektu badawczego nr 2019/33/N/ST10/02925, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki, którego wyniki przedstawiono w niniejszym artykule. Podziękowania kierujemy także do kolegów z Akcji COST „COLOSSAL” (nr CA16109), dzięki którym wsparciu udało się zrealizować niniejsze badania.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] C. Zhu, K. Maharajan, K. Liu, Y. Zhang, *Environ. Res.* 2021, **198**, 111281.
- [2] H. Li, J. E. Hart, S. Mahalingaiah, R. C. Nethery, E. Bertone-Johnson, F. Laden, *Environ. Pollut.*, 2021, **269**, 116216.
- [3] J. Oh, S. Ye, D.-H. Kang, E. Ha, *Environ. Res.* 2022, **212**, 113080.
- [4] WHO global air quality guidelines. Particulate matter (PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub>), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide. Geneva: World Health Organization; 2021.
- [5] M. Li, Y. Feng, K. Wang, W. F. Yong, L. Yu, T. S. Chung, *Environ. Sci. Technol.*, 2017, **51**, 10041.
- [6] A. Skiba, “Seasonal variability of air pollution sources in Kraków during the period of 2018-2019, based on analyses of chemical and isotopic composition,” AGH University of Krakow, 2022.

- [7] Urząd Statystyczny w Krakowie, "Statystyczne Vademecum Samorządowca" Kraków, 2020.
- [8] D. Matuszko, "Climate of Krakow in the 20th century". Krakow: Institute of Geography and Spatial Management of the Jagiellonian University, Kraków, 2007.
- [9] A. Bokwa, "Wieloletnie zmiany struktury mezoklimatu miasta na przykładzie Krakowa". Kraków: Instytut Geografii i Gospodarki Przestrzennej Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2010.
- [10] A. Bokwa, *Acta Geogr. Lodz.* 2019, **108**, 2019.
- [11] [www.digitel-ag.com](http://www.digitel-ag.com)
- [12] U.S. Environmental Protection Agency, "EPA Positive Matrix Factorization (PMF) 5.0 Fundamentals and User Guide," Washington, 2014.
- [13] P. Paatero, U. Tapper, *Environmetrics*, 1994, **5**, 111.
- [14] Y. Zhang, R. J. Sheesley, M. Bae, J. J. Schauer, *Atmos. Environ.* 2009, **43**, 4951.
- [15] J. C. Chow, D. H. Lowenthal, L. W. A. Chen, X. Wang, J. G. Watson, *Air Qual. Atmos. Health*, 2015, **8**, 243.
- [16] C. A. Belis, F. Karagulian, B. R. Larsen, P. K. Hopke, *Atmos. Environ.* 2013, **69**, 94.
- [17] M. Zimnoch, L. Samek, L. Furman, K. Styszko, A. Skiba, Z. Gorczyca, M. Galkowski, K. Rozanski, E. Konduracka, *Sustainability*, 2020, **12**,1.
- [18] Parliament of the Lesser Poland Voivodeship, "Uchwała Nr XVIII/243/16 w sprawie wprowadzenia na obszarze Gminy Miejskiej Kraków ograniczeń w zakresie eksploatacji instalacji, w których następuje spalanie paliw", nr 243, 2016.
- [19] Parliament of the Lesser Poland Voivodeship, "Uchwała NR LIX/842/22 Sejmiku Województwa Małopolskiego z dnia 26 września 2022 roku w sprawie zmiany uchwały Nr XXXII/452/17 Sejmiku Województwa Małopolskiego z dnia 23 stycznia 2017r.", nr 6497. 2022.

Praca wpłynęła do Redakcji 7 listopada 2024 r.



**Laureaci nagrody ufundowanej przez Tusnovic  
za osiągnięcie z zakresu bioanalitiky i miniaturyzacji**



## OZNACZANIE POTENCJALNIE CHARAKTERYSTYCZNYCH BIAŁEK PROZAPALNYCH I PROANGIOGENNYCH JAKO NOWY OBSZAR ROZWOJU MATRYCOWYCH BIOCZUJNIKÓW SPRi

DETERMINATION OF POTENTIALLY CHARACTERISTIC  
PRO-INFLAMMATORY AND PRO-ANGIOGENIC PROTEINS  
AS A NEW AREA OF DEVELOPMENT OF SPRi MATRIX  
BIOSENSORS

**Łukasz Oldak<sup>1,\*</sup>, Ewa Gorodkiewicz<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Pracownia Bioanalizy, Wydział Chemii, Uniwersytet w Białymstoku, ul.  
Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok  
\*e-mail: oldak.lukas@gmail.com*

---

Abstract


Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Potencjalne biomarkery nowotworowe a glejak
    - 1.1. Znaczenie MMP-1, UCH-L1 i proteasomu 20S w glejaku
    - 1.2. Znaczenie katepsyn B, D i S w glejaku
    - 1.3. Znaczenie lamininy-5, fibronektyny i kolagenu IV w glejaku
  2. Diagnostyka glejaka
    - 2.1. Neuroobrazowanie
    - 2.2. Diagnostyka molekularna
    - 2.3. Biopsja i badanie histopatologiczne
  3. Bioczujniki SPRi
  4. Oznaczenia wybranych potencjalnych biomarkerów glejaka
    - 4.1. Materiał badawczy
    - 4.2. Przygotowanie bioczujników
  5. Wyniki oznaczeń
    - 5.1. Analiza statystyczna
    - 5.2. Oznaczenia katepsyny B, D i S
    - 5.3. Oznaczenia lamininy-5, fibronektyny, kolagenu IV
    - 5.4. Oznaczenia UCH-L1, proteasomu 20S, MMP-1
  6. Podsumowanie i dyskusja
- Piśmiennictwo cytowane
-

**Dr Łukasz Oldak** jest pracownikiem naukowo-dydaktycznym Pracowni Bioanalizy Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku. W 2023 roku obronił pracę doktorską związaną z oznaczeniami potencjalnych biomarkerów glejaka, za którą został nagrodzony przez Komitet Chemii Analitycznej PAN. Poza tym prowadzi badania z zakresu opracowywania i rozwoju nowych metod bioanalitycznych ze szczególnym uwzględnieniem rozwoju biosensorów, bierze czynny udział w popularyzacji nauki oraz macierzystego Wydziału.



 <https://orcid.org/0000-0003-1829-7466>

---

**Prof. dr hab. Ewa Gorodkiewicz** jest kierownikiem Pracowni Bioanalizy Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku. Członkini IUPAC, w latach 2002 – 2004 odbyła staż naukowy w TU Dresden w Niemczech. Swoje zainteresowania naukowe skupia przede wszystkim wokół powierzchniowego rezonansu plazmonowego oraz konstrukcji i komercjalizacji biosensorów.



 <https://orcid.org/0000-0002-3680-054X>



---

**ABSTRACT**

This paper presents new methods for determining potential glioma biomarkers that can support the diagnosis of this tumor. The presented methods of determination have demonstrated the ability to distinguish advanced glioma grades (G3 and G4) from the control group (K) and mild grades (G1 and G2) based on the concentration values of the determined analytes. The blood-brain barrier probably makes it difficult to quantitatively detect biomarkers in milder grades of the disease, which limits their use in early diagnosis. However, studies indicate that the concentrations of the determined potential biomarkers are independent of the IDH 1/2 mutation and show positive correlations with each other, which suggests their potential synergistic effect. Due to the high sensitivity and specificity of the proposed methods, confirmed by ROC analysis, they can support imaging techniques in distinguishing between the grades of glioma advancement, especially in differentiating between grades G2 and G3.

Keywords: glioma, biomarker, SPRI, clinical chemistry, diagnostic

Słowa kluczowe: glejak, biomarker, SPRI, chemia kliniczna, diagnostyka

---

**WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

ATRX	– remodeler chromatyny ATRX
CCD	– urządzenie ze sprzężeniem ładunkowym
DTI	– obrazowanie tensora dyfuzji
ECM	– macierz zewnątrzkomórkowa
EDC	– 1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid
FDG	– fluorodeoksyglukoza
GBM	– glejak wielopostaciowy
IDH 1/2	– dehydrogenaza izocytrynianu 1 i 2
MGMT	– metylacja promotora genu MGMT
MMP-1	– metaloproteinaza 1 macierzy zewnątrzkomórkowej
MRI	– obrazowanie rezonansu magnetycznego
MRS	– spektroskopia rezonansu magnetycznego
NGS	– sekwencjonowanie następnej generacji
NHS	– N-hydroksysukcynimid
PET	– pozytonowa tomografia emisyjna
ROC	– ocena jakości klasyfikatora
SPECT	– tomografia emisyjna pojedynczych fotonów
SPRi	– powierzchniowy rezonans plazmonów imaging
TP53	– gen TP53
UCH-L1	– C-końcowa hydroksylaza 1 ubikwityny
WHO	– Światowa Organizacja Zdrowia

## WPROWADZENIE

Glejak mózgu to grupa nowotworów, które rozwijają się w obrębie tkanki glejowej układu nerwowego, która pełni funkcję wspomagającą i ochronną dla neuronów. Należą do grupy jednych z najczęściej występujących pierwotnych guzów mózgu u dorosłych, a ich patogenezę, objawy oraz leczenie stanowią przedmiot intensywnych badań. Glejaki wykazują wysoki stopień zróżnicowania pod względem złośliwości, od mniej agresywnych guzów (stopień G1 i G2), przez stopień G3, aż po najbardziej złośliwy glejak IV stopnia (G4), nazywany glejakiem wielopostaciowym ze względu na jego wysokie zróżnicowanie (glioblastoma multiforme, GBM) [1]. Etiologia glejaków nie jest do końca poznana. Czynnikiem ryzyka są przede wszystkim wiek, predyspozycje genetyczne i narażenie na promieniowanie jonizujące. Badania sugerują także rolę zaburzeń genetycznych, takich jak mutacje w genach IDH1 i IDH2, szczególnie w przypadku glejaków o niższym stopniu złośliwości [2]. Ponadto, część badań wykazuje, że mikrośrodowisko mózgu, w tym aktywność komórek układu odpornościowego i układu naczyń krwionośnych, może mieć znaczący wpływ na rozwój i progresję glejaków [3].

Celem artykułu jest przedstawienie nowych metod oznaczania potencjalnych biomarkerów glejaka, wykorzystujących biosensory oraz SPRi jako metodę detekcji. Ponadto w pracy zaprezentowano wyniki badań własnych dotyczących oznaczeń wybranych biomarkerów w osoczu, które przedstawiają charakter aplikacyjny opracowanych bioczuJNIKÓW i możliwości wykorzystania oznaczanych białek w rutynowej diagnostyce medycznej.

### 1. Potencjalne biomarkery nowotworowe a glejak

#### 1.1. Znaczenie MMP-1, UCH-L1 i proteasomu 20S w glejaku

Metaloproteinazy macierzy (MMPs) to enzymy proteolityczne, które odgrywają kluczową rolę w przebudowie tkanek, co ma znaczenie dla procesu wzrostu inwazyjności komórek nowotworowych. Metaloproteinaza 1 macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP-1) odgrywa szczególną rolę w degradacji kolagenu, co umożliwia komórkom glejaka przenikanie przez przyległe tkanki i prowadzi do migracji komórek nowotworowych do sąsiednich struktur mózgu. W agresywnych stopniach zaawansowania glejaka dowiedziono znacząco podwyższoną ekspresję MMP-1, co czyni ten biomarker potencjalnym wskaźnikiem złośliwości nowotworu i przewidywania przebiegu klinicznego choroby [4,5]. Ponadto badania wykazują, że MMP-1 może wpływać na mikrośrodowisko nowotworowe, indukując procesy odżywcze komórek nowotworowych i dzięki temu przyspieszać wzrost guza nowotworowego [4].

C-końcowa hydrolaza 1 ubikwityny (UCH-L1) to enzym z rodziny hydrolaz ubikwitynowych, który istotny jest w cyklu ubikwityna-proteasom, regulującym degradację białek wewnątrzkomórkowych. Nadekspresję UCH-L1 zauważono przede wszystkim w tkankach nerwowych, jak i również w komórkach ludzkiego glejaka mózgu. Znacząco podwyższone stężenia UCH-L1, w odniesieniu do grupy kontrolnej, wskazują głównie na zaawansowaną transformację nowotworową, przy czym enzym ten może mieć wpływ na adaptację komórek glejaka do stresu oksydacyjnego, jak również na ich odporność na czynniki uszkadzające DNA. Zatem, UCH-L1 może pełnić funkcję zarówno diagnostyczną, jak i prognostyczną wskazując na agresywność nowotworu i stopień jego zawansowania [6].

Proteasom 20S, będący częścią kompleksu proteasomowego, jest odpowiedzialny za usuwanie zdegradowanych i nieprawidłowo funkcjonujących białek. Wykazano, że w glejaku nadekspresja proteasomu 20S koreluje z nasilonymi procesami inwazyjnymi i zwiększoną przeżywalnością komórek nowotworowych, dzięki czemu komórki nowotworowe unikają apoptozy. Proteasom 20S odgrywa zatem istotną rolę w modulacji białek zaangażowanych w cykl komórkowy oraz w odpowiedzi na stres komórkowy, co czyni go potencjalnym biomarkerem wspierającym zarówno diagnostykę, jak i monitorowanie odpowiedzi na leczenie w glejakach [7].

### 1.2. Znaczenie katepsyn B, D i S w glejaku

Katepsyny są enzymami lizosomalnymi odpowiedzialnymi za rozkład białek wewnątrzkomórkowych oraz składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), co umożliwia nowotworom przenikanie przez tkanki i naciekanie sąsiednich obszarów. Wykazano, że w glejaku katepsyny B, D i S pełnią kluczową rolę w modulacji mikrośrodowiska nowotworowego, wspierając procesy związane z migracją i inwazją komórek nowotworowych. Katepsyna B bierze udział w degradacji kolagenu i innych składników ECM, co sprzyja wzrostowi inwazyjności komórek glejaka. Badania sugerują, że katepsyna B nie tylko wspiera procesy związane z rozprzestrzenianiem się nowotworu, ale może również wpływać na przeżywalność komórek glejaka w warunkach stresu oksydacyjnego i niedotlenienia. Wysoka ekspresja katepsyny B została powiązana z bardziej agresywnym fenotypem glejaków, co czyni ją obiecującym biomarkerem do oceny stopnia złośliwości [8]. Kolejna z katepsyn - katepsyna D, będąca proteazą aspartylową, uczestniczy w procesach degradacji białek wewnątrzkomórkowych oraz może wpływać na zdolność komórek do adaptacji w niekorzystnych warunkach, takich jak niedobór substancji odżywczych. W glejakach katepsyna D odgrywa ważną rolę w modulacji sygnałów wzrostu i przeżycia, a jej ekspresja wzrasta w zaawansowanych stopniach glejaka [9]. Katepsyna S wykazuje natomiast unikalne właściwości w degradacji białek ECM i jest zaangażowana w procesy immunomodulacyjne, które mogą wpływać na zdolność nowotworu do unikania odpowiedzi immunologicznej organizmu gospodarza. Wysoki poziom katepsyny S może ułatwiać migrację komórek glejaka oraz ich zdolność do naciekania

sąsiednich tkanek, co sugeruje jej znaczenie jako biomarkera oceny złośliwości glejaka oraz wspomaganie wyboru optymalnych terapii celowanych choroby [10].

### 1.3. Znaczenie lamininy-5, fibronektyny i kolagenu IV w glejaku

Białka macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), takie jak laminina-5, fibronektyna i kolagen IV, odgrywają ważną rolę w interakcjach między komórkami nowotworowymi a ich mikrośrodowiskiem. W glejakach, białka ECM wspierają procesy związane z adhezją, migracją oraz inwazyjnością komórek nowotworowych, umożliwiając im przenikanie do sąsiednich struktur mózgu. Laminina-5 jest glikoproteina, która ułatwia adhezję komórek do błon podstawnych, co ma kluczowe znaczenie dla ich zdolności do przenikania przez bariery tkankowe. Wysoka ekspresja lamininy-5 w glejaku została powiązana ze zwiększoną inwazyjnością i złośliwością nowotworu, co czyni ją przydatnym wskaźnikiem dla oceny stopnia zaawansowania choroby. Ponadto, laminina-5 wspiera także procesy angiogenezy, które dostarczają tlen i składniki odżywcze do szybko rosnących guzów [11]. Fibronektyna, będąca białkiem wiążącym integryny, również uczestniczy w procesach adhezji i migracji komórek nowotworowych. Jej obecność w ECM wspiera tworzenie połączeń między komórkami nowotworowymi a macierzą zewnątrzkomórkową, co zwiększa zdolność komórek glejaka do rozprzestrzeniania się. Dowiedziono, że fibronektyna jest wysoce ekspresjonowana w zaawansowanych stopniach glejaka, co sugeruje jej znaczenie jako biomarkera oceny stopnia zaawansowania nowotworu oraz jako potencjalny cel terapeutyczny [12]. Ostatnie z omawianych białek - kolagen IV jest głównym składnikiem błon podstawnych i odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu integralności strukturalnej ECM. W glejaku nadekspresja kolagenu IV jest związana z większą inwazyjnością nowotworu, umożliwiając komórkom nowotworowym degradację i penetrację błon podstawnych otaczających tkanki. Kolagen IV może być zatem markerem złośliwości oraz prognostycznym wskaźnikiem wskazującym na skłonność nowotworu do przerzutowania [13].

## 2. Diagnostyka glejaka

Diagnostyka glejaka mózgu stanowi wyzwanie ze względu na zróżnicowany obraz kliniczny oraz podobieństwo objawów do innych chorób neurologicznych. Współczesna diagnostyka opiera się na zaawansowanych technikach neuroobrazowania oraz badaniach molekularnych i histopatologicznych. Podejście to pozwala na precyzyjne rozpoznanie rodzaju i stopnia złośliwości guza, co jest kluczowe dla doboru odpowiedniej terapii oraz prognozy dla pacjenta.

### 2.1. Neuroobrazowanie

Podstawową metodą diagnostyczną w rozpoznawaniu glejaków mózgu jest rezonans magnetyczny (MRI), który pozwala na uzyskanie szczegółowych obrazów struktur mózgu. W szczególności stosuje się rezonans z kontrastem gadolinowym, który

umożliwia lepsze uwidocznienie obszarów o wzmożonej przepuszczalności bariery krew-mózg, charakterystycznych dla glejaka w złośliwych stopniach (G3, G4) [14]. Zaawansowane techniki MRI, takie jak obrazowanie tensora dyfuzji (DTI) oraz spektroskopia rezonansu magnetycznego (MRS), dostarczają informacji na temat struktury, metabolizmu i funkcji komórek glejowych, co jest pomocne w różnicowaniu glejaków od innych zmian nienowotworowych [15]. Tomografia emisyjna pojedynczych fotonów (SPECT) oraz pozytonowa tomografia emisyjna (PET) są technikami pomocniczymi, które pozwalają na ocenę metaboliczną i czynnościową guzów mózgu. PET z użyciem znakowanych izotopów, takich jak fluorodeoksyglukoza (FDG), pozwala ocenić aktywność metaboliczną guza oraz rozróżnić guz od obrzęku lub zmian zapalnych. PET-CT z izotopami specyficznymi dla komórek nowotworowych, takimi jak aminokwasy znakowane izotopem węgla 11 (np. [11C]-MET), ma zastosowanie w ocenie stopnia złośliwości glejaka oraz monitorowaniu odpowiedzi na leczenie [16].

## 2.2. Diagnostyka molekularna

W ostatnich latach na znaczeniu w klasyfikacji glejaków zyskała diagnostyka molekularna. Analiza mutacji genów, takich jak IDH1, IDH2, ATRX i TP53, pozwala na precyzyjne określenie rodzaju glejaka. Mutacje w genach IDH są związane z lepszym rokowaniem i częściej występują w glejakach o niższym stopniu złośliwości [2]. W diagnostyce molekularnej stosuje się także techniki immunohistochemiczne oraz analizy metylacji DNA, np. analiza metylacji promotora genu MGMT, która ma istotne znaczenie w prognozowaniu odpowiedzi na chemioterapię temozolomidem [17]. Wprowadzenie sekwencjonowania następnej generacji (NGS) oraz metod opartych na mikro macierzach umożliwia analizę ekspresji genów oraz profilowanie mutacji na poziomie genomowym, co pozwala na bardziej precyzyjną diagnostykę oraz personalizację terapii [18].

## 2.3. Biopsja i badanie histopatologiczne

Biopsja stereotaktyczna, polegająca na pobraniu próbki guza w celu badania mikroskopowego, jest standardową metodą diagnostyczną stosowaną do potwierdzenia obecności glejaka oraz jego klasyfikacji histologicznej. Badanie histopatologiczne pozwala na ocenę stopnia złośliwości glejaka, określanego według kryteriów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO). Histopatologicznie glejaki są klasyfikowane od I do IV stopnia, gdzie IV stopień odpowiada glejakom wielopostaciowym o najwyższej złośliwości i agresywności [18].

## 3. BioczuJNIKI SPRi

BioczuJNIKI oparte na powierzchniowym rezonansie plazmonów (Surface Plasmon Resonance Imaging, SPRi) stanowią nowoczesne narzędzie analityczne, które znajduje

szerokie zastosowanie w badaniach biomolekularnych i diagnostyce medycznej. Technika SPRi umożliwia monitorowanie interakcji biomolekularnych w czasie rzeczywistym bez potrzeby znakowania cząsteczek, co czyni ją bardzo czułą i specyficzną metodą analizy. Dzięki zdolności do równoczesnego wykrywania wielu analitów na tej samej powierzchni, SPRi stało się niezwykle przydatne w badaniach wymagających szybkiej i wysokoprzepustowej analizy [19]. BioczuJNIki SPRi opierają się na zjawisku rezonansu plazmonów powierzchniowych, które zachodzi na granicy między metalem (najczęściej złotem) a dielektrykiem (szklana powierzchnia biosensora). Gdy monochromatyczne światło p-spolaryzowane pada pod odpowiednim kątem, elektrony w powierzchni metalowej zaczynają oscylować, co powoduje spadek intensywności światła odbitego. Zatem, SPRi mierzy zmiany odbicia światła w odpowiedzi na zmiany masy molekularnej na powierzchni bioczuJNIka, co jest związane z interakcjami biomolekularnymi. Dzięki zastosowaniu kamer CCD, SPRi umożliwia wizualizację tych zmian w postaci obrazu, co pozwala na jednoczesną analizę wielu interakcji biomolekularnych [20]. Technika SPRi znajduje zastosowanie w diagnostyce różnych chorób, takich jak nowotwory, choroby autoimmunologiczne i zakaźne. Przykładowo, SPRi jest wykorzystywane do wykrywania markerów nowotworowych we krwi, co może wspierać wczesne rozpoznanie raka i monitorowanie terapii [21]. Dzięki możliwości monitorowania interakcji antygen-przeciwciała, SPRi stało się również narzędziem do badań nad infekcjami wirusowymi, w tym w diagnostyce wirusów takich jak HIV, wirus zapalenia wątroby typu B i wirus SARS-CoV-2 [22].

## **4. Oznaczenia wybranych potencjalnych biomarkerów glejaka**

### **4.1. Materiał biologiczny**

Badania przeprowadzono w osoczu osób ze zdiagnozowanymi glejakami mózgu w czterech stopniach zaawansowania: G1 (3 próbki), G2 (10 próbek), G3 (7 próbek) oraz G4 (37 próbek), a także w osoczu palaczy jako grupy kontrolnej K (48 próbek) . Łącznie przebadano 105 próbek osocza, w tym 48 z grupy kontrolnej. Materiał biologiczny uzyskano z Biobanku Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, a na przeprowadzenie wszystkich badań uzyskano stosowną zgodę komisji bioetycznej (licencja APK.002.171.2021).

### **4.2. Przygotowanie bioczuJNIków oraz materiału biologicznego do oznaczeń**

BioczuJNIki przygotowano zgodnie z wcześniej opracowaną metodyką funkcjonalizacji powierzchni każdego z nich. Procedurę rozpoczynano od zanurzenia czystych płytek złotych w 20 mM roztworze chlorowodoru cysteaminy i pozostawienia ich w nim na co najmniej 12 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie, płytki płukano bezwodnym etanolem oraz wodą destylowaną i suszono w strumieniu argonu. Utworzona na powierzchni złotej płytki samoorganizująca się monowarstwa cysteaminy, umożliwia związaną się przeciwciała z powierzchnią bio-

czujnika za pomocą wiązania amidowego na drodze reakcji grup  $-NH_2$  cysteaminy oraz grup  $-COOH$  obecnych na końcach łańcuchów ciężkich przeciwciał, w obecności EDC/NHS i buforu węglanowego ( $pH = 8.50$ ). BioczuJNIK, po związaniu przeciwciała z powierzchnią złotą jest zdolny do wychwytywania analitu z próbki. Analizę ilościową przeprowadzano poprzez nałożenie kropli o objętości  $3 \mu L$  na miejsce aktywne bioczuJNIKA i inkubację w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Następnie nadmiar próbki odsysano za pomocą aspiratora próżniowego, a miejsce reakcji opłukiwano buforem PBS i dokonywano akwizycji danych. Informacje dotyczące metod oznaczeń poszczególnych potencjalnych biomarkerów zestawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Zestawienie warunków funkcjonalizacji powierzchni bioczuJNIKÓW.

Table 1. Summary of conditions for functionalization of biosensor surfaces.

Analit	Metal stanowiący podstawę bioczuJNIKA	Linker	Ligand (element wychwytyjący analit z roztworu)	Opis reakcji linker-ligand	Opis reakcji ligand-analit	Ref.		
Katepsyna B	złoto	cysteamina	Cystatyna C	Utworzenie wiązania amidowego w wyniku reakcji między grupami $-NH_2$ cysteaminy, a grupami $-COOH$ przeciwciał w obecności buforu węglanowego i mieszaniny EDC/NHS	Reakcja immunologiczna między epitopem a paratopem	[23]		
Katepsyna D			Pepstatyna A			[24]		
Katepsyna S			Przeciwciało monoklonalne			[25]		
Laminina-5			Przeciwciało poliklonalne			[26]		
Fibronektyna			Przeciwciało monoklonalne			[27]		
Kolagen IV			Przeciwciało monoklonalne			[28]		
UCH-L1			Przeciwciało monoklonalne			[29]		
MMP-1			Przeciwciało monoklonalne			[30]		
Proteasom 20S			PSI (Z-Ile-Glu(OBut)-Ala-Leu-H)			Modyfikacja grupy $-R1-CH_2-COO-CH_3$ za pomocą mieszaniny EDC/NHS w obecności buforu węglanowego, a następnie reakcja między grupami $-NH_2$ cysteaminy i powstałymi po wcześniejszej modyfikacji grupami $-COOH$ i utworzenie wiązania amidowego	Utworzenie hemiketalu na drodze reakcji grupy $-OH$ pochodzącej od kinazy homoserynowej (Thr1), a grupą $-C=O$ pochodzącej od PSI [31]	[32]



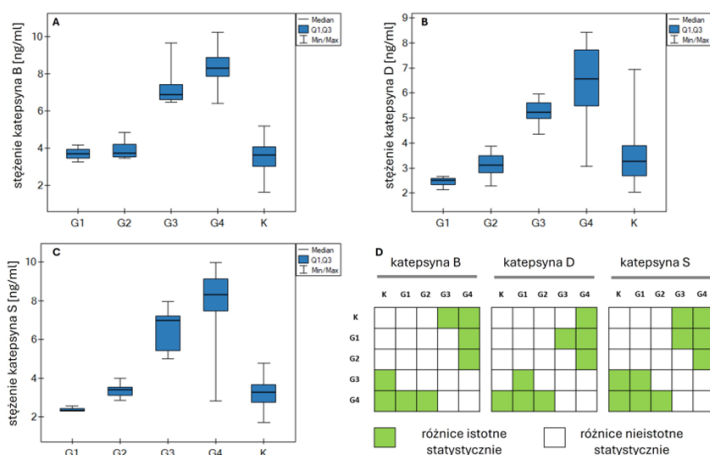
## 5. Wyniki oznaczeń

### 5.1. Analiza statystyczna

Wszystkie analizy statystyczne cytowane w niniejszej pracy, przeprowadzono przy użyciu oprogramowania PQStat (2022), PQStat v.1.8.4, Poznań, Polska. [33–35].

### 5.2. Oznaczenia katepsyny B, D i S

W związku z brakiem normalności rozkładu danych (test Shapiro-Wilka), przeprowadzono nieparametryczny test Kruskala-Wallisa oraz test Dunna-Bonferroni, których reprezentację graficzną przedstawiono na Rysunku 1.



Rysunek 1. Wykresy pudełkowe stężeń (A) katepsyny B; (B) katepsyny D; (C) katepsyny S; (D) test post-hoc Dunna-Bonferroni.

Figure 1. Box plots of concentrations of (A) cathepsin B; (B) cathepsin D; (C) cathepsin S; (D) Dunna-Bonferroni post-hoc test.

Zaobserwowano istotnie statystyczne różnice stężeń między grupą kontrolną (K) a najwyższym stopniem zaawansowania glejaka (G4) dla wszystkich oznaczanych katepsyn. Poza tym, oznaczane białka wykazywały zbliżone poziomy stężeń dla stopni G1 i G2 oraz w grupie kontrolnej, które zawierały się w przedziale 1.62 – 6.95 ng/ml. Podobną zależność zauważono w przypadku stopni G3 i G4, gdzie stężenia mieściły się w granicach 2.81 – 10.23 ng/ml. W Tabeli 2 podsumowano pozostałe parametry kliniczne w odniesieniu do wzrostu stężeń oznaczanych katepsyn i wzrostu ryzyka zachorowania na glejaka.

Tabela 2. Charakterystyka czynników potencjalnie wpływających na ryzyko zachorowania na glejaka mózgu.  
Table 2. Characterization of factors potentially influencing the risk of developing glioma.

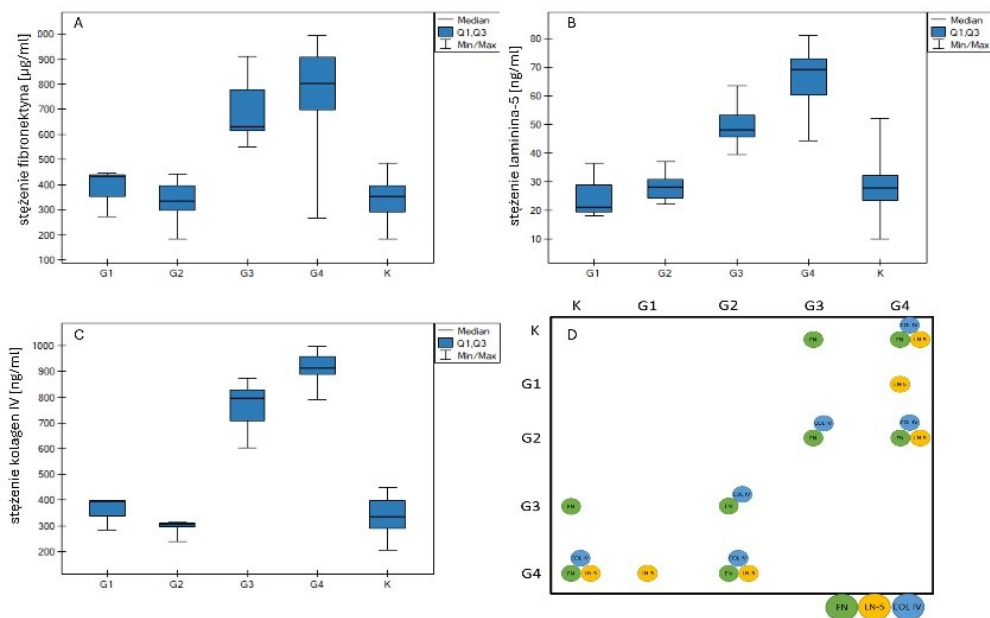
Analit	Obecność nowotworów u członków najbliższej rodziny	Nienowotworowe choroby współistniejące pacjenta	Status IDH 1/2	Korelacja wiek pacjenta – stężenie analitu <sup>a</sup>	Korelacja między analizami <sup>a</sup>	ROC	Ref.
Katepsyna B	Brak zależności wzrostu stężenia oznaczanych katepsyn	Brak tendencji wzrostu stężeń oznaczanych katepsyn i ryzyka zachorowania na glejaka	Brak oddziaływania na stężenia oznaczanych katepsyn w stopniach G3 i G4 choroby	0.3 < R <sub>s</sub> ≤ 0.5	Dodatnia korelacja umiarkowana	Możliwe jest jedynie odróżnienie łagodnych stopni choroby (G1, G2) oraz grupy kontrolnej (K) od stopni zaawansowanych (G3, G4)	[25]
Katepsyna D							
Katepsyna S							

<sup>a</sup>wg. Skali zaproponowanej przez J.Guilforda

Nie zaobserwowano, aby obecność nowotworów w najbliższej rodzinie chorego, lub występowanie chorób współistniejących miało istotny wpływ na wzrost ryzyka zachorowania na glejaka. Podobnie, nie odnotowano wpływu mutacji IDH 1/2 na stężenia oznaczanych katepsyn w zaawansowanych stopniach choroby, co sugeruje, że katepsyny B, D oraz S mogą być niezależnymi, potencjalnymi biomarkerami nowotworu mózgu. Poza tym, stwierdzono umiarkowaną dodatnią korelację stężenia oznaczanych katepsyn w odniesieniu do wieku pacjenta, jak również wysoką dodatnią korelację między stężeniami poszczególnych katepsyn. Analiza ROC potwierdza natomiast, że możliwe jest odróżnienie łagodnych stopni choroby i grupy kontrolnej od stopni zaawansowanych na podstawie jedynie stężeń oznaczanych katepsyn B, D i S z dobrą specyficnością i czułością.

### 5.3. Oznaczenia lamininy-5, fibronektyny, kolagenu IV

Podobnie, jak w przypadku poprzednich oznaczeń, przeprowadzony test Shapiro-Wilka wykonany w kierunku sprawdzenia normalności rozkładu uzyskanych danych potwierdził, iż rozkład stężeń oznaczanych białek błony podstawnej odbiega od rozkładu normalnego. Zatem kolejne analizy prowadzono z wykorzystaniem testów nieparametrycznych, takich jak test Kruskala-Wallisa i analiza post-hoc Dunna-Bonferroni, których wyniki przedstawiono na Rysunku 2.



Rysunek 2. Wykresy pudełkowe stężeń (A) fibronektyny; (B) lamininy-5; (C) kolagenu IV; (D) test post-hoc Dunna-Bonferronio.

Figure 2. Box plots of concentrations of (A) fibronectin; (B) laminin-5; (C) collagen IV; (D) Dunn-Bonferroni post-hoc test.

Z powyższych danych wynika, iż istnieją statystycznie istotne różnice między stężeniami lamininy-5, fibronektyny i kolagenu IV między grupą kontrolną (K), a najwyższym stopniem choroby (G4), a także między stopniami G2 i G4. Istotnie statystycznie różnią się również stężenia lamininy-5, fibronektyny oraz kolagenu IV między stopniami G1 i G2 a stopniami G3 i G4. Tabela 3 zawiera podsumowanie pozostałych parametrów klinicznych, mogących mieć wpływ na wzrost ryzyka wystąpienia glejaka mózgu.

Tabela 3. Charakterystyka czynników potencjalnie wpływających na ryzyko zachorowania na glejaka mózgu.  
Table 3. Characterization of factors potentially influencing the risk of developing glioma.

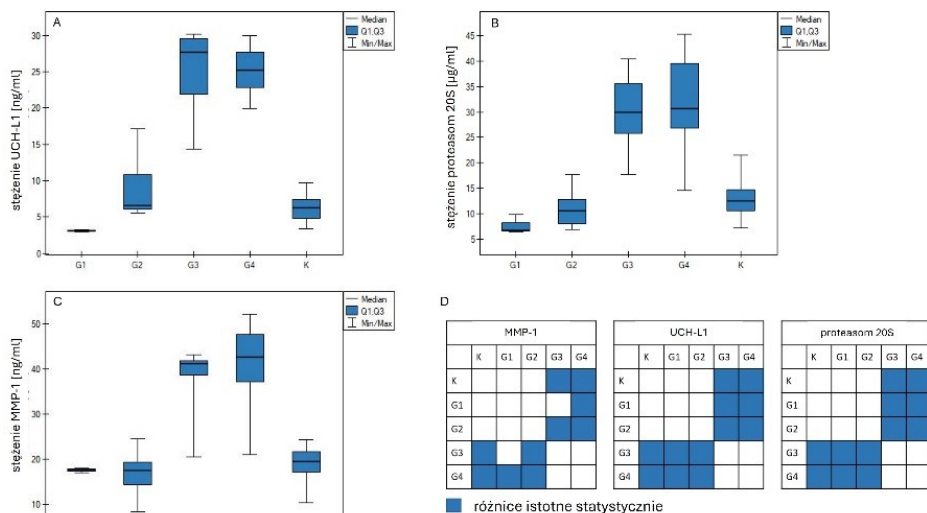
Analit	Obecność nowotworów w u członków najbliższej rodziny	Nienowotworowe choroby współistniejące pacjenta	Status IDH 1/2	Korelacja wiek pacjenta – stężenie analitu <sup>a</sup>	Korelacja między analizami <sup>a</sup>	ROC	Ref.
Laminina-5 Fibronektyna	Brak zależności wzrostu stężenia oznaczanych białek	Brak tendencji wzrostu stężenia oznaczanych białek i ryzyka zachorowania na glejaka	Brak oddziaływania na stężenia oznaczanych białek w stopniach G3 i G4 choroby	0.3 <R <sub>s</sub> ≤ 0.5	Dodatnia korelacja umiarkowana	0.5 <R <sub>s</sub> ≤ 0.7 Dodatnia korelacja wysoka	Możliwe jest odróżnienie stopnia G1 oraz grupy kontrolnej (K) od stopni G2, G3 i G4
Kolagen IV							

<sup>a</sup>wg. Skali zaproponowanej przez J.Guilforda

Obecność nowotworów w rodzinie pacjenta, jak i jego choroby współistniejące nie zwiększają ryzyka zachorowania na glejaka mózgu. Również mutacja IDH 1/2 nie ma wpływu na zmiany stężeń lamininy-5, fibronektyny i kolagenu IV, zatem podobnie jak poprzednio opisywane katepsyny, białka te, pretendują do potencjalnych i niezależnych biomarkerów glejaka. Poza tym, zaobserwowano dodatnią umiarkowaną korelację stężeń oznaczanych białek w odniesieniu do wieku pacjenta oraz wysoką dodatnią korelację między stężeniami lamininy-5, fibronektyny i kolagenu IV. Przeprowadzona analiza ROC wskazuje, że na podstawie wartości stężeń lamininy-5, fibronektyny oraz kolagenu IV możliwe jest rozróżnienie grupy kontrolnej i stopnia G1 od stopni G2, G3 i G4 z bardzo wysoką skutecznością diagnostyczną.

#### 5.4. Oznaczenia UCH-L1, proteasomu 20S, MMP-1

Analogicznie, jak w przypadku poprzednich oznaczeń, pierwszym etapem analizy statystycznej było określenie normalności rozkładu uzyskanych danych testem Shapiro-Wilka. Ponieważ test ten zaprzeczył normalności rozkładu danych, przystąpiono do dalszych analiz wykorzystując test Kruskala-Wallisa oraz test post-hoc Dunna-Bonferroni, których interpretację graficzną przedstawiono na Rysunku 3.



Rysunek 3. Wykresy pudełkowe stężeń (A) UCH-L1; (B) proteasomu 20S; (C) MMP-1; (D) test post-hoc Dunna-Bonferroniego.

Figure 3. Box plots of concentrations of (A) UCH-L1; (B) 20S proteasome; (C) MMP-1; (D) Dunn-Bonferroni post-hoc test.

Przeprowadzona analiza statystyczna dowodzi istotnych statystycznie różnic stężeń UCH-L1, proteasomu 20S i MMP-1 między grupą kontrolną (K) a stopniami G3 i G4 oraz między stopniem G1 a stopniami G3 i G4. Jedynie stężenie MMP-1 nie zmienia się istotnie statystycznie między stopniem G1 a G3. W Tabeli 4 podsumowano wpływ pozostałych parametrów klinicznych na zmiany stężeń UCH-L1, proteasomu 20S i MMP-1 i wzrost ryzyka zachorowania na glejaka.

Tabela 4. Charakterystyka czynników potencjalnie wpływających na ryzyko zachorowania na glejaka mózgu.  
Table 4. Characterization of factors potentially influencing the risk of developing glioma.

Analityt	Obecność nowotworów u członków najbliższej rodziny	Nienowotworowe choroby współistniejące pacjenta	Status IDH 1/2	Korelacja wiek pacjenta – stężenie analitu <sup>a</sup>	Korelacja między analitami <sup>a</sup>	ROC	Ref.
UCH-L1	Brak zależności wzrostu stężenia oznaczanych białek	Brak tendencji wzrostu stężeń oznaczanych białek i ryzyka zachorowania na glejaka	Brak oddziaływania na stężenia oznaczanych białek w stopniach G3 i G4 choroby	0.3 <Rs ≤ 0.5	Dodatnia korelacja umiarkowana	Możliwe jest jedynie odróżnienie łagodnych stopni choroby (G1, G2) oraz grupy kontrolnej (K) od stopni zaawansowanych (G3, G4)	[34]
Proteasom 20S							
MMP-1							

<sup>a</sup>wg. Skali zaproponowanej przez J.Guilforda

W wyniku przeprowadzonych badań zaprzeczono, aby występowanie chorób nowotworowych u członków najbliższej rodziny pacjenta miało realny wpływ na wzrost ryzyka zachorowania na glejaka. Podobnie, nie odnotowano wpływu występowania chorób współlistniejących u badanego pacjenta. Analogicznie jak w poprzednich przytoczonych badaniach, mutacja IDH 1/2 nie wpływa w żaden sposób na zmiany stężeń oznaczanych białek. Zaobserwowano dodatnią umiarkowaną korelację stężenia UCH-L1, proteasomu 20S i MMP-1 w odniesieniu do wieku pacjenta, natomiast siła korelacji między oznaczanymi białkami została określona jako dodatnia korelacja wysoka. Przeprowadzona analiza ROC wskazuje, że bazując tylko na stężeniach UCH-L1, proteasomu 20S oraz MMP-1 możliwe jest jedynie odróżnienie grupy kontrolnej (K) i stopni G1, G2 od zaawansowanych stopni choroby G3 i G4.

## 6. Podsumowanie i dyskusja

Rozwój nowych metod i technik oznaczeń biomarkerów jest ważnym kierunkiem rozwoju chemii analitycznej, zwłaszcza w przypadku chorób takich jak glejak, dla których diagnostyka nie jest jeszcze wystarczająco rozwinięta. Przedstawione w artykule metody oznaczeń potencjalnych biomarkerów glejaka są pretendentami do wykorzystania w przyszłości w nieinwazyjnej i skutecznej diagnostyce tego nowotworu. Każda z przedstawionych metod oznaczeń służy do ilościowej analizy białka, które jest istotne w nowotworze mózgu, pod względem zmian ekspresji, mutacji lub zmian stężeń.

Mediany stężeń oznaczanych białek nie wykazują istotnych statystycznie różnic między grupą kontrolną (K) a stopniami choroby G1 i G2, co więcej, w większości przypadków stężenia badanych analitów utrzymują się na podobnym poziomie. Zatem, przytoczone metody oznaczeń umożliwiają diagnostykę tylko złośliwych stopni glejaka (G3, G4). Być może, główną przeszkodą jest bariera krew-mózg, która zapobiega swobodnemu przedostawaniu się białek z mózgu do krwioobiegu oraz odwrotnie. Jednak, w strukturze tej bariery zachodzą różne zmiany, w tym zmiany ekspresji białek, które w następstwie prowadzą nawet do utraty ciągłości bariery krew-mózg. Udowodniono, że owa utrata spójności następuje głównie w zaawansowanych stopniach glejaka, dlatego też, prawdopodobnie następuje znaczny wzrost stężeń oznaczanych białek w stopniach G3 i G4 [36]. Stąd też zapewne istotny statystycznie wzrost stężeń oznaczanych białek w agresywnych stopniach glejaka w odniesieniu do stopni łagodnych i grupy kontrolnej. Zmiany w mutacji IDH 1/2 nie wpływały w żaden sposób na stężenia analizowanych potencjalnych biomarkerów glejaka, zatem każdy z nich może kandydować na niezależny biomarker prognostyczny. Ponad to, wysokie dodatnie korelacje między stężeniami oznaczanych białek sugerują ich silne działanie synergistyczne. Relacje te więc można uznać za charakterystyczne i przydatne do określania stopnia zaawansowania glejaka. Odnotowano umiarkowane dodatnie korelacje stężeń analizowanych białek do wieku pacjenta biorącego udział w projekcie, natomiast fakt ten wynika prawdopodobnie z najwyższej liczebności grupy stopnia G4, która wnosi najwięcej danych oraz charakteryzuje się najwyższą medianą zarówno

stężen oznaczanych analitów, jak i wieku pacjentów. Dlatego też, zależność *stężenie biomarkera – wiek pacjenta* nie jest wiążąca dla jednoznacznego określenia wpływu wieku pacjenta na stężenie oznaczanego białka. Pozostałe parametry, takie jak obecność nowotworów (innych niż glejak) w najbliższej rodzinie pacjenta, czy występowanie chorób współistniejących u badanego, nie mają realnego wpływu na ryzyko zachorowania na glejaka. Ostatecznie, do zbadania skuteczności diagnostycznej omawianych metod oznaczania białek przeprowadzono analizę ROC. Potwierdzono, że bazując jedynie na wartościach stężeń analizowanych potencjalnych biomarkerów istnieje możliwość oddzielenia grupy kontrolnej oraz łagodnych stopni G1 i G2 od złośliwych form choroby G3 i G4 z wysoką specyficznością i czułością. Przedstawione metody oznaczeń nie umożliwiają natomiast wczesnej diagnostyki glejaka, ze względu na brak istotnych różnic stężeń między grupą kontrolną a stopniami G1 i G2.

Podsumowując, korzystając z przedstawionych metod oznaczeń wybranych białek nie jest możliwa wczesna diagnostyka glejaka, jeżeli materiałem badawczym jest osocze. Być może największą przeszkodą jest obecność bariery krew-mózg, która w łagodnych stopniach choroby jest jeszcze na tyle funkcjonalna, że uniemożliwia przejście oznaczanych analitów do krwi obwodowej. Przytoczone metody mogą być jednak przydatne do wspomagania aktualnie wykorzystywanych metod diagnostyki glejaka, która opiera się głównie na badaniach obrazowych. Badania te także charakteryzują się pewnymi ograniczeniami, do których należy zaliczyć przede wszystkim trudności w rozróżnianiu stopni G2 i G3. Proponowane metody oznaczeń mogą być na tym polu niezwykle pomocne, ze względu na udowodnioną możliwość rozróżniania stopni G2 i G3, G4. Poza tym, opisywane nowe metody bazują na bioczułnikach, które zapewniają analizę w krótkim czasie, nie wymagają dużych ilości materiału badawczego – wystarczą zaledwie 3  $\mu$ l próbki, dają niemal nieskończone możliwości rozwoju i udoskonalania oraz miniaturyzacji i automatyzacji.

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Q.T. Ostrom, H. Gittleman, J. Fulop, M. Liu, R. Blanda, C. Kromer, Y. Wolinsky, C. Kruchko, J.S. Barnholtz-Sloan, *Neuro. Oncol.*, 2015, **17**, 1.
- [2] A. Aibaidula, A.K.Y. Chan, Z. Shi, Y. Li, R. Zhang, R. Yang, K.K.W. Li, N.Y.F. Chung, Y. Yao, L. Zhou, J. Wu, H. Chen, H.K. Ng, *Neuro. Oncol.*, 2017, **19**, 1327.
- [3] D.F. Quail, J.A. Joyce, *Canc. Cell.*, 2017, **31**, 326.
- [4] C.M. Overall, C. López-Otín, *Nat. Rev. Canc.*, 2002, **2**, 657.
- [5] V. V. Artym, K. Matsumoto, *Curr. Protoc. Cell. Biol.*, 2010, **10**, 1.
- [6] P.C. Sanchez-Diaz, J.C. Chang, E.S. Moses, T. Dao, Y. Chen, J.Y. Hung, *PLoS One.*, 2017, **12**, 1.
- [7] D.J. McConkey, K. Zhu, *Drug. Resist. Updat.*, 2008, **11**, 164.
- [8] J.A. Joyce, A. Baruch, K. Chehade, N. Meyer-Morse, E. Giraud, F.Y. Tsai, D.C. Greenbaum, J.H. Hager, M. Bogoyo, D. Hanahan, *Canc. Cell.*, 2004, **5**, 443.
- [9] M.E. Fukuda, Y. Iwadate, T. Machida, T. Hiwasa, Y. Nimura, Y. Nagai, M. Takiguchi, H. Tanzawa, A. Yamaura, N. Seki, *Canc. Res.*, 2005, **65**, 5190.

- [10] B. Wang, J. Sun, S. Kitamoto, M. Yang, A. Grubb, H.A. Chapman, R. Kalluri, G.P. Shi, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 6020.
- [11] T. Kawataki, T. Yamane, H. Naganuma, P. Rousselle, I. Andurén, K. Tryggvason, M. Patarroyo, *Exp. Cell. Res.*, 2017, **313**, 3819.
- [12] E.E. Torr, C.R. Ngam, K. Bernau, B. Tomasini-Johansson, B. Acton, N. Sandbo, *J. Biol. Chem.*, 2015, **290**, 6951.
- [13] A. Naba, K.R. Clauser, H. Ding, C.A. Whittaker, S.A. Carr, R.O. Hynes, *Mat. Biol.*, 2016, **49**, 10.
- [14] M. Weller, M. van den Bent, M. Preusser, E. Le Rhun, J.C. Tonn, G. Minniti, M. Bendszus, C. Balana, O. Chinot, L. Dirven, P. French, M.E. Hegi, A.S. Jakola, M. Platten, P. Roth, R. Rudà, S. Short, M. Smits, M.J.B. Taphoorn, A. von Deimling, M. Westphal, R. Soffiatti, G. Reifenberger, W. Wick, *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2021, **18**, 170.
- [15] L.B. Nabors, J. Portnow, M. Ahluwalia, J. Baehring, H. Brem, S. Brem, N. Butowski, J.L. Campian, S.W. Clark, A.J. Fabiano, P. Forsyth, J. Hattangadi-Gluth, M. Holdhoff, C. Horbinski, L. Junck, T. Kaley, P. Kumthekar, J.S. Loeffler, M.M. Mrugala, S. Nagpal, M. Pandey, I. Parney, K. Peters, V.K. Puduvalli, I. Robins, J. Rockhill, C. Rusthoven, N. Shonka, D.C. Shrieve, L.J. Swinnen, S. Weiss, P.Y. Wen, N.E. Willmarth, M.A. Bergman, S.D. Darlow, *J. Natl. Compr. Canc. Netw.*, 2020, **18**, 1537.
- [16] N.L. Albert, M. Weller, B. Suchorska, N. Galldiks, R. Soffiatti, M.M. Kim, C. La Fougère, W. Pope, I. Law, J. Arbizu, M.C. Chamberlain, M. Vogelbaum, B.M. Ellingson, J.C. Tonn, *Neuro. Oncol.*, 2016, **18**, 1199.
- [17] M.E. Hegi, A.-C. Diserens, T. Gorlia, M.-F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J.M. Kros, J.A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J.E.C. Bromberg, P. Hau, R.O. Mirimanoff, J.G. Cairncross, R.C. Janzer, R. Stupp, *N. Engl. J. Med.*, 2005, **352**, 997.
- [18] D.N. Louis, A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W.K. Cavenee, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, P. Kleihues, D.W. Ellison, *Acta. Neuropathol.*, 2016, **131**, 803.
- [19] J. Homola, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 462.
- [20] M.A. Cooper, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2002, **1**, 515.
- [21] J.F. Masson, *ACS Sens.*, 2017, **2**, 16.
- [22] Y. Zeng, R. Hu, L. Wang, D. Gu, J. He, S.Y. Wu, H.P. Ho, X. Li, J. Qu, B.Z. Gao, Y. Shao, *Nanophotonics.*, 2017, **6**, 1017.
- [23] E. Gorodkiewicz, *Prot. Pept. Lett.*, 2009, **18**, 23.
- [24] E. Gorodkiewicz, E. Regulska, *Prot. Pept. Lett.*, 2010, **17**, 1148.
- [25] L. Oldak, A. Sankiewicz, B. Żelazowska-Rutkowska, B. Cylwik, Z. Lukaszewski, M. Skoczylas, E. Gorodkiewicz, *Talanta.*, 2021, **225**, 1.
- [26] A. Sankiewicz, L. Romanowicz, P. Laudanski, B. Żelazowska-Rutkowska, B. Puzan, B. Cylwik, E. Gorodkiewicz, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 5269.
- [27] A. Sankiewicz, L. Romanowicz, M. Pyc, A. Hermanowicz, E. Gorodkiewicz, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2018, **150**, 1.
- [28] A. Sankiewicz, Z. Lukaszewski, K. Trojanowska, E. Gorodkiewicz, *Anal. Biochem.*, 2016, **515**, 40.
- [29] A. Sankiewicz, P. Laudanski, L. Romanowicz, A. Hermanowicz, W. Roszkowska-Jakimiec, W. Debek, E. Gorodkiewicz, *Anal. Biochem.*, 2015, **469**, 4.
- [30] A. Tokarzewicz, L. Romanowicz, I. Sveklo, E. Gorodkiewicz, *Anal. Methods.*, 2016, **8**, 6428.
- [31] C. Leonardo-Sousa, A.N. Carvalho, R.A. Guedes, P.M.P. Fernandes, N. Aniceto, J.A.R. Salvador, M.J. Gama, R.C. Guedes, *Molecules.*, 2022, **27**, 1.
- [32] E. Gorodkiewicz, H. Ostrowska, A. Sankiewicz, *Microchim. Acta.*, 2011, **175**, 177.
- [33] L. Oldak, S. Chludzinska-Kasperuk, P. Milewska, K. Grubczak, J. Reszec, E. Gorodkiewicz, *Biomedicines.*, 2022, **10**, 2290.



- [34] L. Oldak, S. Chludzinska-Kasperuk, P. Milewska, K. Grubczak, J. Reszec, E. Gorodkiewicz, *Biomolecules.*, 2022, **12**, 1477.
- [35] L. Oldak, P. Milewska, S. Chludzinska-Kasperuk, K. Grubczak, J. Reszec, E. Gorodkiewicz, *J. Clin. Med.*, 2022, **11**, 1.
- [36] A.S. Silantyev, L. Falzone, M. Libra, O.I. Gurina, K.S. Kardashova, T.K. Nikolouzakis, A.E. Nosyrev, C.W. Sutton, M. Panayioti, A. Tsatsakis, *Cells.*, 2019, **8**, 863.

Praca wpłynęła do Redakcji 15 listopada 2024 r.



**Laureaci nagrody ufundowanej przez WITKO  
za osiągnięcia w zakresie rozwoju i stosowania technik  
przygotowania próbek do analizy**

---

---



# OZNACZANIE WYBRANYCH ZWIĄZKÓW BIOAKTYWNYCH W WINACH POLSKIEGO POCHODZENIA

## IDENTIFICATION OF SELECTED BIOACTIVE COMPOUNDS IN WINES OF POLISH ORIGIN

**Magdalena Fabjanowicz<sup>1,\*</sup>, Justyna Płotka-  
Wasyłka<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, ul. G. Narutowicza 11/12, 80-233, Gdańsk*

<sup>2</sup> *BioTechMed, Centrum Badawcze, Politechnika Gdańska, ul. G. Narutowicza 11/12, 80-233, Gdańsk*

*\*e-mail: magfabja@pg.edu.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Oznaczanie polifenoli i kwasów organicznych

1.1. Analityczny proces hierarchiczny

1.2. Wspomagana ultradźwiękami ekstrakcja próbek ciekłych za pomocą rozpuszczalnika przez membrany porowate z GC-MS (UAPM-LS-GC-MS)

2. Oznaczanie amin biogennych

3. Ocena profilu metabolomicznego win pochodzących z chłodnego klimatu

4. Ocena wzajemnych zależności pomiędzy fizyko-chemicznymi parametrami wina

Uwagi końcowe


Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr inż. Magdalena Fabjanowicz** (ur. 1992) ukończyła Politechnikę Gdańską z tytułem doktora nauk chemicznych w 2023 roku. W trakcie studiów doktoranckich ukończyła również studia magisterskie na kierunku zarządzanie międzynarodowe. Jej zainteresowania badawcze obejmują rozwijanie zielonych metod analitycznych z zastosowaniem technik mikroekstrakcji oraz analizę wina. Rozwija się także w wielu innych obszarach, takich jak zrównoważone zarządzanie. Brała udział w projekcie Erasmus+ o akronimie TOO4TO ( <https://too4to.eu/> ), gdzie pełniła dwie role: badacza i nauczyciela. Obecnie zgłębia temat dobrostanu osobistego, zawodowego i planetarnego jako członkini zespołu w projekcie Erasmus+ o akronimie SWEPPP ( <https://www.wellbeing4sustainability.eu/> ), w którym również działa jako badaczka. Od 10.2024 zatrudniona na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym na stanowisku postdoc. Magdalena jest współautorką 16 publikacji i 2 rozdziałów w książkach. W wolnym czasie uwielbia kolarstwo górskie (była członkinią CST 7r MTB Team; 7r Politechnika Gdańska team kolarstwa górskiego), podróże oraz kontakt z naturą.




 <https://orcid.org/0000-0003-2040-9287>

---

**Dr hab. inż. Justyna Płotka-Wasyłka, prof. uczelni** (ur. 1986) ukończyła Politechnikę Gdańską, uzyskując w 2014 roku tytuł doktora nauk chemicznych. Następnie rozpoczęła pracę w Katedrze Chemii Analitycznej PG. W 2019 roku otrzymała tytuł profesora PG. W 2018 roku została powołana na członka Rady Młodych Naukowców przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego. W tym samym roku dołączyła również do zespołu redakcyjnego *Microchemical Journal*. Jej zainteresowania badawcze obejmują ocenę jakości wina i identyfikację jego pochodzenia z różnych regionów Polski, a także aspekty zrównoważonego rozwoju w chemii, zwłaszcza chemii analitycznej. Swoje badania prowadzi zgodnie z zasadami zielonej chemii analitycznej. Opracowała narzędzia do oceny "zieloności" protokołów analitycznych, znane jako GAPI oraz ComplexGAPI. Ponadto była zaangażowana w stworzenie nowego wskaźnika do oceny użyteczności metod analitycznych, nazwanego BAGI. Prowadziła wiele projektów badawczych i jest autorką ponad 100 publikacji, w tym artykułów recenzowanych, rozdziałów w książkach oraz podręczników. Prywatnie uwielbia: bieganie, taniec, fotografię i wyprawy górskie. Mama trójki dzieci.



 <https://orcid.org/0000-0002-1304-8623>

## ABSTRACT

Each wine has a unique chemical composition that is influenced by the grape variety, the geology and climate of the vine's growth (*terroir*), and the winemaking process. Despite the fact that several scientific reports have been published about the characteristic of wines from The Old and The New World Countries, data on the specific characteristics of wines from the cool climate regions is still lacking.

The objective of this study was to develop analytical methods for evaluating the quality of domestically produced wines in terms of the concentration of specific bioactive compounds, such as:

- organic acids and polyphenols determined in one course of analytical procedure, using solvent extraction of liquid samples through an ultrasound-assisted porous membrane (UASE-PMLS) in conjunction with gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) at the stage of final determinations;
- biogenic amines using two analytical procedures (a) capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry (CE-MS) and (b) salting-out liquid-liquid microextraction technique coupled with GC-MS (SALLME-GC-MS).

Furthermore, micro- and macroelements were determined. All the data gathered were used to ascertain the correlations between wines' various physicochemical properties by multivariate statistical analysis.

The research work was conducted in accordance with the principles of Green Analytical Chemistry, and the developed methods were assessed for their green nature using the Analytical EcoScale and the GAPI Index.

Keywords: wine, polyphenols, organic acids, biogenic amines, GC-MS

Słowa kluczowe: wino, polifenole, kwasy organiczne, aminy biogenne, GC-MS

---

---

**WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

2-PE	– 2-feniloetyloamina
ACN	– acetonitryl
AHP	– analityczny process hierarchiczny
BA	– aminy biogenne
BUT	– butyloamina
BSTFA	– N,o-bis(trimetylosililo)trifluoroacetamid
CAD	– kadaweryna
CE-MS	– elektroforeza kapilarna ze spektrometrią mas
CV	– współczynnik zmienności
DCM	– dichlorometan
DIET	– dietyloamina
DIMET	– dimetyloamina
ET	– etyloamina
EtOAc	– octan etylu
GAPI	– zielony index procedur analitycznych ( <i>ang. Green Analytical Procedure Index</i> )
GC-MS	– chromatografia gazowa ze spektrometrią mas
HEX	– heksyloamina
HIS	– histamina
ICP-MS	– spektrometria mas sprzężona z plazmą wzbudzą indukcyjnie
IPA	– izopentyloamina
LOD	– granica wykrywalności
LOQ	– granica oznaczalności
PROP	– propyloamina
PUT	– putrescyna
RSD	– względne odchylenie standardowe
TMCS	– trimetylochlorosilan
TRYP	– tryptamina
TYR	– tyramina

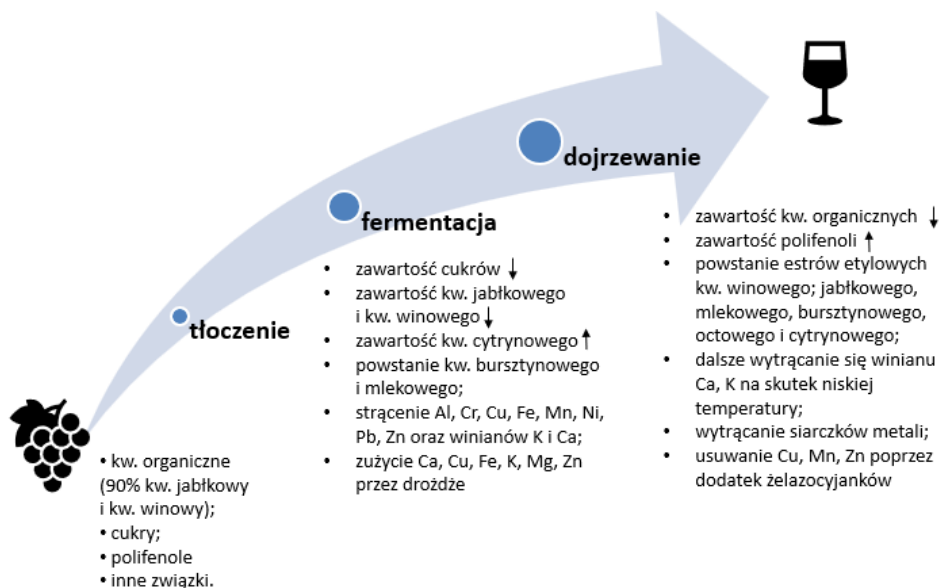


## WPROWADZENIE

Polska w świecie winiarskim jest uznawana jako kraj o chłodnym klimacie. Jednak, mimo to winogrodnictwo w Polsce cieszy się bardzo dużym zainteresowaniem i bardzo mocno się rozwija. Tylko na przestrzeni ostatnich pięciu lat, liczba winnic w Polsce wzrosła o dodatkowe 50. Natomiast powierzchnia jaką zajmują wzrosła o ok 200 ha. Największa liczba winnic znajduje się na południu Polski, ale coraz więcej winnic pojawia się również w północnej części naszego kraju [1]. Rozwój winogrodnictwa w Polsce jest możliwy ze względu na zmieniający się klimat jak również dzięki wprowadzeniu nowych hybrydowych odmian winorośli, które dużo lepiej znoszą wahania temperatury w okolicach 0°C [2]. Winogrodnictwo w Polsce jest bardzo młode a technologie produkcji wina są stale modyfikowane stąd też duże zainteresowanie winiarzy wynikami badań na temat ich trunków, których na dzień dzisiejszy w literaturze jest niewiele.

Każde wino to unikatowa kompozycja smaku i aromatu, na które ma wpływ cały szereg czynników [2]. Jednym z najczęściej poruszanych tematów jest wpływ *terroir'u* na walory smakowe wina. Kładzie się duży nacisk na pochodzenie wina, a co za tym idzie na jego unikatowość wyrażoną smakiem i zawartością związków odpowiedzialnych za działania prozdrowotne na organizm człowieka. Kiedyś *terroir* i jego charakterystyka było istotne jedynie dla Francuzów, obecnie ten trend opanował cały świat. Niewątpliwie *terroir* każdej winnicy jest unikalne i niepowtarzalne ze względu na warunki klimatyczne, topograficzne i typ podłoża. Często zdarza się, że winnice które dzieli zaledwie kilkanaście kilometrów produkują zupełnie inne wina [3].

Ponadto bardzo duży wpływ na charakterystykę wina ma odmiana winorośli jak również sama technologia wytwarzania wina. Zmiany strukturalne głównych składników wina, zostały przedstawione na Rysunku 1.



Rysunek 1. Zmiany strukturalne w głównych składnikach wina zachodzące podczas procesu tłoczenia, fermentacji i dojrzewania wina [4].

Celem niniejszych badań było opracowanie precyzyjnych, niezawodnych i szybkich procedur analitycznych, które posłużą do scharakteryzowania win pochodzących z regionu o chłodnym klimacie, pod kątem zawartości polifenoli, kwasów organicznych oraz amin biogennych (BA) jak również znalezienie wzajemnych korelacji pomiędzy oznaczanymi związkami a mikro- i makroelementami. Wina wykorzystane do badań pochodziły z polskich winnic z różnych części naszego kraju. W zbiorze win znajdowało się 10 win czerwonych, 10 białych oraz 3 wina różowe. Wina były wyprodukowane między 2014 a 2018 rokiem. Natomiast zawartość alkoholu deklarowana przez producenta była na poziomie od 10,5 do 13,5%. Charakterystyka win wykorzystanych do badań jest przedstawiona w Tabeli 1.

Tabela 1 Charakterystyka badanych win.

Symbol	Rok	Winnica	Rodzaj wina	Województwo	Zawartość alkoholu [%]	Odmiana winorośli	Zawartość cukru
1R	2015	HOPLE Winnica Poraj Paczkow	Czerwone	Opolskie	11,0	Regent	wytrawne
2R	2017	Winnica Chodorowa	Czerwone	Małopolskie	12,0	Regent	wytrawne
3R	2014	Dom Bliskowice	Czerwone	Lubelskie	12,0	Rondo	wytrawne

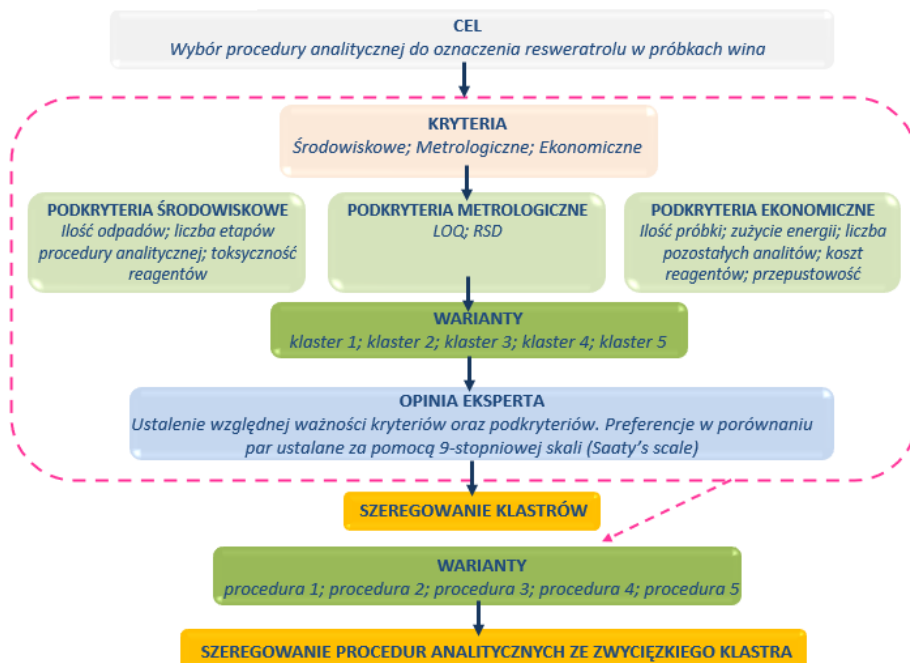
4R	2013	Winnica Witanowice	Czerwone	małopolskie	12,5	Regent	wytrawne
5R	2017	Adoria Vineyards	Czerwone	Dolnośląskie	13,5	Dornfelder	wytrawne
6R	2017	Winnica Chodorowa	Czerwone	Małopolskie	11,0	Rondo	wytrawne
7R	2017	Adoria Vineyards	Czerwone	Dolnośląskie	13,5	Pinot Noir	wytrawne
8R	2016	Winnica Turnau	Czerwone	Zachodniopomorskie	13,0	Rondo/Regent	wytrawne
9R	2015	HOPLE Winnica Poraj Paczkow	Czerwone	Opolskie	11,5	Rondo	wytrawne
10R	2016	Winnica Goleisz	Czerwone	Podkarpackie	12,5	Mieszanka trzech odmian	wytrawne
1W	2016	Winnica Solaris	Białe	Lubelskie	12,0	Johanniter	wytrawne
2W	2017	Adoria Vineyards	Białe	Dolnośląskie	12,0	Riesling	półwytrawne
3W	2016	Winnica Saint Vincent	Białe	Lubuskie	12,0	Pinot Gris, Riesling, Muscat Ottonel, Gewurztraminer	półwytrawne
4W	2017	Winnica Srebrna Gora	Białe	Małopolskie	12,0	Seyval Blanc, Hibernal, Johanniter, Solaris	półwytrawne
5W	2016	Winnica Saint Vincent	Białe	Lubuskie	13,0	Pinot Gris	półwytrawne
6W	2016	Winnica Solaris	Białe	Lubelskie	12,5	Solaris	słodkie
7W	2014	Winnica Witanowice	Białe	Małopolskie	12,0	Bianca	wytrawne
8W	2017	Winnica Turnau	Białe	Zachodniopomorskie	12,5	Solaris	wytrawne
9W	2017	Winnica Goleisz	Białe	Podkarpackie	12,0	Mieszanka kilku odmian	półsłodkie
10W	2015	Winnica Goleisz	Białe	Podkarpackie	11,5	Mieszanka ośmiu odmian	wytrawne
1Ro	2014	Winnica Srebrna Gora	Różowe	Małopolskie	10,5	Zweiglet	półwytrawne
2Ro	2015	Winnica De Sas	Różowe	Dolnośląskie	10,5	Regent	wytrawne
3Ro	2016	Winnica Goleisz	Różowe	Podkarpackie	11,5	Mieszanka trzech odmian	wytrawne

## 1. OZNACZANIE POLIFENOLI I KWASÓW ORGANICZNYCH

W literaturze dostępnych jest wiele metod do oznaczenia polifenoli. Jednak brakowało krytycznej oceny opracowanych metod nie tylko pod względem parametrów metrologicznych, ale również ich oddziaływania na środowisko. Dlatego zanim rozpoczęto prace nad nową metodą analityczną, poddano analizie dostępne metody. W tym celu wykorzystano jeden z algorytmów wielokryterialnej analizy decyzyjnej, analityczny proces hierarchiczny (AHP). Była to pierwsza próba oceny metod analitycznych za pomocą tego algorytmu.

### 1.1. ANALITYCZNY PROCES HIERARCHICZNY

Do analizy zebrano 19 metod analitycznych [5-23], opisanych w literaturze, używanych do oznaczenia resweratrolu w próbkach wina. Zebrane metody zostały opisane według kryteriów: środowiskowych (ilość odpadów [g], liczba etapów procedury analitycznej, toksyczność reagentów), metrologicznych (LOQ, RSD) oraz ekonomicznych (ilość próbki [ml], zużycie energii [kWh], liczba pozostałych oznaczanych analitów, koszt reagentów, przepustowość). Biorąc pod uwagę, że algorytm AHP można stosować do małych zbiorów danych, pierwszym krokiem była redukcja danych za pomocą analizy skupień. Wynikiem tej analizy była redukcja danych z 19 obiektów do 5 klastrów. Przebieg wybranego algorytmu został przedstawiony na Rysunku 2.



Rysunek 2. Schemat algorytmu AHP.

Zastosowanie algorytmu AHP pozwoliło wytypować jedną procedurę analityczną, która została najwyżej oceniona, a jest nią metoda oparta na wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z detektorem UV z bezpośrednim nastrzykiem. Wybrana metoda omija etap przygotowania próbki, jednak, trzeba też zwrócić uwagę na fakt, że oznaczano tylko jeden analit – resweratrol, a analiza zajęła 19 min. Ponadto przeprowadzona równolegle analiza zielonego charakteru, wybranych metod analitycznych, za pomocą Eco Skali oraz indeksu GAPI wskazała, że najmniej szkodliwa dla środowiska naturalnego jest metoda oparta na chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) [24].

## 1.2. WSPOMAGANA ULTRADŹWIEKAMI EKSTRAKCYJA PRÓBEK CIEKŁYCH ZA POMOCĄ ROZPUSZCZALNIKA PRZEZ MEMBRANY POROWATE POŁĄCZONA Z GC-MS (UAPM-LS-GC-MS)

Przeprowadzone studium literaturowe pozwoliło zauważyć, że brakuje procedur analitycznych pozwalających oznaczyć związki z grupy polifenoli oraz kwasów organicznych w trakcie jednego toku postępowania analitycznego. Ponadto niewiele jest prac, w których procedury analityczne są oparte na wykorzystaniu technik GC,

która pozwala osiągnąć wyższą rozdzielczość, lepszą selektywność, a przy tym zużywa znacznie mniej rozpuszczalników niż technika chromatografii cieczowej. Zastosowanie nowatorskiej techniki ekstrakcji próbek - wspomagana ultradźwiękami ekstrakcja próbek ciekłych za pomocą rozpuszczalnika przez membrany porowate połączona z GC-MS pozwoliła oznaczyć 15 związków należących do dwóch wcześniej wspomnianych grup (kw. mlekowy, kw. bursztynowy, kw. fumarowy, kw. jabłkowy, kw. winowy, kw. cytrynowy, kw. protokatechowy, kw. kumarowy, kw. galusowy, kw. ferulowy, kw. kawowy, kw. synapowy, pterostiblen, resweratrol i katechina), przy zachowaniu bardzo dobrych parametrów walidacyjnych (LOD [ $\mu\text{g/ml}$ ]: 0,016 – 8,2; LOQ [ $\mu\text{g/ml}$ ]: 0,047 – 24; liniowość o współczynniku determinacji 0,9852 – 0,9993) a dodatkowo odzysk >93%.

Optymalizacji poddano 4 parametry:

- rodzaj rozpuszczalnika (EtOAc; ACN; DCM; 1:1 v/v EtOAc:DCM);
- temperatura ekstrakcji (temperatura otoczenia; 25°C; 40°C);
- czas derywatywacji [min] (0+15; 15+15; 15+30);
- odczyn próbki wina (1,30; 3,45; 4,80; 6,00).

Najlepsze rezultaty (sygnały o najwyższej intensywności) otrzymano gdy spośród puli badanych rozpuszczalników zastosowano mieszaninę EtOAc z DCM w stosunku 1:1 v/v, w korelacji z temperaturą otoczenia; dodawano środek sililujący - BSTFA z 1%TMCS., a pH wynosiło 1.30 w przypadku kw. organicznych oraz 3.45 gdy brano pod uwagę polifenole. Zgodnie z przyjętą procedurą proces derywatywacji był prowadzony przez 15 min.

Przebieg procedury analitycznej wyglądał następująco:

1. Torebkę wykonaną z membrany polipropylenowej o wymiarach 1x1 cm wypełniono: 60 mg  $\text{MgSO}_4$  oraz 250  $\mu\text{L}$  próbki z dodatkiem wzorca wewnętrznego.
2. Zamkniętą torebkę zanurzono w 1 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego EtOAc:DCM (1:1 v/v) i poddano działaniu ultradźwięków przez 25 min.
3. Następnie usunięto torebkę, a ekstrakt odparowano do sucha w strumieniu azotu.
4. Przeprowadzono konwersję chemiczną analitów za pomocą środka sililującego - BSTFA z 1%TMCS.
5. Poddano próbkę analizie za pomocą GC-MS (Agilent 7890A GC system z detektorem 5975C MS; kolumna chromatograficzna ZB-5 MS (30m x 0,25 mm wew. śr.) ; temperatura dozownika: 250°C; przepływ He: 1 ml/min; program temperaturowy: 70°C (1 min), wzrost temperatury do 280°C (10°C/min), utrzymanie temperatury 280°C przez 5 min; całkowity czas analizy: 27 min).

Po zastosowaniu opracowanej metody do próbek rzeczywistych otrzymano następujące wyniki: w winach czerwonych najwyższą zawartość odnotowano dla kwasu bursztynowego około 400  $\mu\text{g/ml}$  oraz katechiny nawet 6226  $\mu\text{g/ml}$  a najmniejszą dla kwasu cytrynowego oraz kwasu synapowego, których zawartość była często poniżej granicy oznaczalności. Natomiast w próbkach win białych i różowych najwyższą zawartość oznaczono dla kwasu jabłkowego około 1000  $\mu\text{g/ml}$  oraz katechiny nawet 119  $\mu\text{g/ml}$ , a najmniejszą dla kwasu fumarowego oraz synapowego często poniżej granicy oznaczalności.

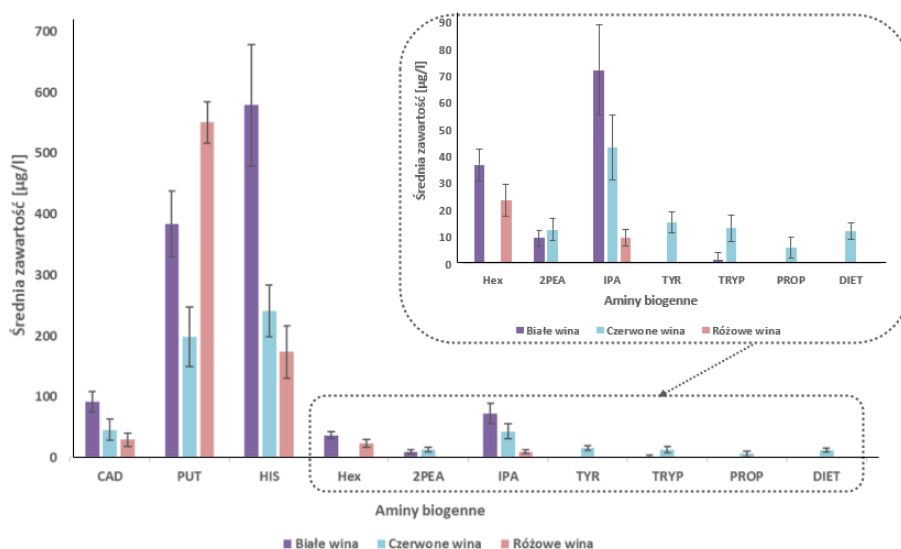
We wszystkich badanych próbkach win pterostilben był poniżej granicy wykrywalności natomiast kw. ferulowy poniżej granicy oznaczalności. Związek, który najbardziej wyróżnia badane próbki win od win pochodzących z innych rejonów świata jest resweratrol. Zawartość resweratrolu w próbkach win białych i czerwonych była na zbliżonym poziomie między 2 a 3  $\mu\text{g/ml}$  podczas gdy w winach białych pochodzących z innych rejonów świata zawartość resweratrolu jest znacznie mniejsza niż w winach czerwonych i nie przekracza 1  $\mu\text{g/ml}$ .

## 2. OZNACZANIE AMIN BIOGENNYCH

Do oznaczenia BA w winach pochodzących z chłodnego klimatu, opracowano i zwalidowano procedurę analityczną opartą na zmodyfikowanej mikroekstrakcji typu ciecz-ciecz (wspomaganej efektem wysolenie) w połączeniu z GC-MS (SALLME-GC-MS). Z uwagi na właściwości fizykochemiczne BA i ich polarność, stosowanie chromatografii gazowej do ich oznaczania jest bardzo wymagające ze względu na konieczność przeprowadzania procesu derywatywacji analitów. Jednak ze względu na wysoką dokładność i czułość pomiarów przy zastosowaniu techniki GC-MS podjęto to wyzwanie. Zaproponowana procedura analityczna obejmowała: filtrację próbek wina przez filtr strzykawkowy 0,45  $\mu\text{m}$ , a następnie wzbogacenie próbek wina poprzez dodatek wzorca wewnętrznego – aniliny (IS). Derywatywacja analitów oraz ich ekstrakcja odbywały się równolegle. Proces konwersji chemicznej analitów był przeprowadzony z wykorzystaniem chloromrówczanu etylu w obecności trietylaminy, która pełniła rolę katalizatora reakcji. Natomiast rozpuszczalnikiem ekstrakcyjnym był EtOAc jako „zielona” alternatywa dla powszechnie stosowanych rozpuszczalników ekstrakcyjnych. Po przeprowadzeniu wstępnych badań do procesu optymalizacji wybrano trzy parametry: objętość EtOAc (w zakresie 50 – 250  $\mu\text{l}$ ), dodatek NaCl (w stężeniu od 5 do 15% w/v) oraz czas wytrząsania (10 - 90 sek.).

Optymalizacja procesu ekstrakcji została przeprowadzona w oparciu o model Box – Behnken'a. Wybrany model pozwolił na przeprowadzenie efektywnego procesu optymalizacji z wykorzystaniem zaledwie 15 próbek. Spośród wybranych parame-

trów największy wpływ na efektywność procesu ekstrakcji miała objętość EtOAc oraz dodatek NaCl. Najlepsze wyniki uzyskano przy wykorzystaniu 50  $\mu$ l EtOAc oraz 5% w/v NaCl. Ten niewielki dodatek NaCl zapobiegał tworzeniu się emulsji. Czas wytrząsania nie miał wpływu na efektywność ekstrakcji BA. Parametry metrologiczne opracowanej metody przedstawiały się następująco: liniowości sprawdzono dla dwóch poziomów stężeń od 0,05 do 1 mg/l i od 1 do 10 mg/l - w obu zakresach współczynniki determinacji wynosiły powyżej 0,99 dla wszystkich badanych związków; powtarzalność określono dla dwóch poziomów stężeń 0,25 mg/l oraz 2,5 mg/l, dla stężenia 0,25 mg/l mieściła się między 2,3 a 10 %, a dla stężenia 2,5 mg/l między 2,6 a 11 %; precyzja wynosiła 82 – 101 %; LOD mieściło się w zakresie 1,5 – 8,1  $\mu$ g/l.



Rysunek 3. Zawartość BA w badanych próbkach win.

W badanych próbkach win największe zawartości odnotowano dla kadaweryny, putrescyny oraz histaminy. Natomiast zawartość pozostałych amin biogennych była poniżej 100  $\mu$ g/l. Ten trend, w którym zawartości kadaweryny, putrescyny i histaminy są wyższe od zawartości pozostałych amin biogennych można zaobserwować również w winach pochodzących z innych krajów w tym z Grecji czy Hiszpanii. Jednak biorąc pod uwagę wartości stężeń oznaczanych amin są one niższe niż w winach z innych krajów, gdzie osiągają nawet kilkanaście mg/l.



### 3. OCENA PROFILU METABOLOMICZNEGO WIN POCHODZĄCYCH Z CHŁODNEGO KLIMATU

Kolejnym etapem badań była ocena profilu metabolicznego win pochodzących z chłodnego klimatu. Pierwszym krokiem by osiągnąć wyznaczony cel, było opracowanie metody opartej na elektroforezie kapilarnej sprzężonej ze spektrometrią mas (CE-MS) dla związków z grupy BA. Procedura analityczna obejmowała przygotowanie próbki, które polegało na przefiltrowaniu próbki wina przez filtr celulozowy 0,45  $\mu\text{m}$  oraz poddaniu działaniom ultradźwięków. Tak przygotowana próbka mogła być analizowana za pomocą CE-MS. Czas analizy wynosił 10 min, w którym oznaczono 32 BA otrzymując bardzo dobre parametry walidacyjne - liniowość:  $R^2 > 0,981$  w zakresie stężeń 0,05-10  $\mu\text{g/ml}$ ; LOD: 0,002-0,22  $\mu\text{g/ml}$ ; powtarzalność pola powierzchni (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) (n=5): CV <23; precyzja pośrednia pola powierzchni (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) (n=5): CV <16,8; powtarzalność czasu migracji (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) (n=5): CV <3,8; precyzja pośrednia czasu migracji (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) (n=5): CV <1,7.

Następnie w celu identyfikacji występujących w winie polarnych, obdarzonych ładunkiem elektrycznym metabolitów zastosowano analizę niecelowaną. Badaniu poddano wina białe i czerwone. Po usunięciu szumu, duplikatów, adduktów oraz fragmentów, oznaczono 94 polarne, głównie z grup aminokwasów, BA i białek związki. Analiza statystyczna (w tym analiza głównych składowych, analiza cząstkowych najmniejszych kwadratów) pozwoliła wskazać, że największe różnice pomiędzy winami pochodzącymi z różnych części naszego kraju jak również pomiędzy typami win można zaobserwować wśród aminokwasów a zwłaszcza w zawartości proliny i fenyloalaniny. Natomiast rozpatrując różnice pomiędzy profilem metabolomicznym win białych i czerwonych a związkiem najbardziej determinującym kategoryzację win jest cykliczny kwas arginobursztynowy, który znajduje się w dynamicznej równowadze z kwasem arginobursztynowym w jego otwartej postaci. Cykliczną formę można zaobserwować w winach białych, które charakteryzują się niższą wartością pH niż wina czerwone.

### 4. OCENA WZAJEMNYCH ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY FIZYKO-CHEMICZNYMI PARAMETRAMI WINA

Istnieje wiele doniesień naukowych wskazujących, że warunki uprawy winorośli mają istotny wpływ na właściwości fizyko-chemiczne wina. W związku z tym przeprowadzona analiza chemometryczna miała na celu zbadanie potencjalnych korelacji pomiędzy zawartością polifenoli, kwasów organicznych (oznaczonych w poprzednim etapie badań) oraz mikro- i makroelementami w winach polskiego pochodzenia.

Skład pierwiastkowy badanych win został zbadany za pomocą spektrometrii mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie (ICP-MS), obejmując analizę takich pierwiastków, jak: Ag, Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Sr, Ti, Tl, V, Zn i Zr. Przed analizą wszystkie wina zostały poddane filtracji przez filtr strzykawkowy 45  $\mu\text{m}$  oraz rozcieńczone wodą dejonizowaną w stosunku 1:10.

W celu odkrycia zależności między wybranymi grupami związków w winach chłodnego klimatu a ich właściwościami charakterystycznymi dla win czerwonych, białych i różowych, zastosowano wielowymiarową analizę statystyczną (grupowanie hierarchiczne oraz niehierarchiczne jak również analizę głównych składowych). Badanie opierało się na analizie 23 próbek win pochodzących z polskich winnic zlokalizowanych w różnych regionach, opisanych przy użyciu 43 zmiennych chemicznych. Wykorzystano eksplorację danych do identyfikacji grup podobieństw (wzorców, klastrów) pomiędzy winami oraz zmiennymi opisującymi ich skład. Dodatkowo, szczególnie nacisk położono na analizę resweratrolu i jego powiązań z innymi związkami chemicznymi. Podczas rozróżniania win pochodzących z różnych rejonów Polski oraz rozróżniania typów win najbardziej znaczące są stężenia: kwasu mlekowego, kumarowego, galusowego, synapowego jak również resweratrolu, katechiny, K i Se, które są wyższe w winach czerwonych niż w winach białych i różowych. Natomiast wina białe i różowe są bogatsze w kwas jabłkowy i cytrynowy oraz Ca i Co [25].

Ponadto, punktacja ReliefF wskazuje na możliwą korelację między resweratrolem a kilkoma metalami, takimi jak Zr, K, B, Pb i Ba. Wykorzystanie w przyszłości innych narzędzi analitycznych być może pomoże zidentyfikować ewentualne kompleksy [25].

## UWAGI KOŃCOWE

W omawianej pracy przedstawiono trzy metody analityczne, które następnie zostały wykorzystane do oznaczenia wybranych analitów z grupy polifenoli, kwasów organicznych, BA oraz mikro- i makroelementów w polskich winach. Biorąc pod uwagę znaczenie zrównoważonego rozwoju, wszystkie opracowane metody analityczne zostały stworzone w taki sposób, aby spełniały wymagania Zielonej Chemii Analitycznej. Cele przy projektowaniu tych technik obejmowały minimalizację użycia rozpuszczalników organicznych, redukcję czasu analizy oraz minimalizację i/lub znaczne ograniczenie źródeł błędów związanych z etapem przygotowania próbki w procedurze analitycznej. Co więcej, każda z opracowanych metod analitycznych została pomyślnie zastosowana do próbek rzeczywistych, dając wiarygodne i powtarzalne wyniki. Warto podkreślić, że oprócz nowych metod analitycznych, nowatorstwo badań polegało na wyborze samych

próbek. Polskie wina to unikalne, niszowe produkty o dużym potencjale rozwoju, rzadko omawiane w literaturze.

Przy użyciu opracowanych metodyk scharakteryzowano polskie wina pod kątem zawartości omawianych związków. Ponadto, wyniki uzyskane za pomocą opracowanych metod analitycznych zostały wykorzystane jako dane wejściowe do wielowymiarowej analizy statystycznej w celu znalezienia możliwych korelacji między parametrami fizykochemicznymi badanych próbek win, co może być użyte do oceny autentyczności win, rozróżnienia typów win, oceny jakości oraz oceny wpływu *terroir*.

Wyniki przeprowadzonych badań umożliwiają wybór techniki analitycznej, która pozwala na szybką, niedrogą i przyjazną dla środowiska ocenę jakościową i ilościową określonych składników w winach. Ponadto otrzymane wyniki mogą być kluczowe zarówno dla konsumentów, którzy będą w stanie ocenić jakość polskich win, a także dla winiarzy, którzy będą mogli kontrolować proces produkcji wina tak by dostarczać najwyższej jakości produkty.

### PODZIĘKOWANIE

Serdecznie dziękuję Komitetowi Chemii Analitycznej Państwowej Akademii Nauk za przyznanie mi zaszczytnego tytułu Laureatki konkursu oraz za uznanie moich osiągnięć. Pragnę również podziękować firmie WITKO sp. z o.o. za ufundowanie nagrody. To dla mnie ogromne wyróżnienie i motywacja do dalszej pracy.

### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Winogrodnicy, <https://winogrodnicy.pl/> (Dostęp: 30.10.2024)
- [2] T. Tarko, A. Duda-Chodak, P. Sroka, P. Satora, Eż. Jurasz, J. Food Compost. Anal. 2010, **23**, 463.
- [3] C. van Leeuwen, In Managing Wine Quality. Elsevier, 2010.
- [4] A. Robles, M. Fabjanowicz, T. Chmiel, J. Płotka-Wasyłka, Trends Anal. Chem. 2019, **120**, 115630
- [5] M. Gawlik, Ł. Nowak, M. Baran, Bromat. Chem. Toksykol. XLI 2008, 15-20
- [6] M. Gerogiannaki-Christopoulou, P. Athanasopoulos, N. Kyriakidis, I.A. Gerogiannaki, M. Spanos, Food Control 2006, **17**, 700-706
- [7] L. Cai, J. Koziel, M. Dharmadhikari, J. H. van Leeuwen, J. Chromatogr. A 2009, **1216**, 281–287
- [8] I. Kolouchova-Hanzlikova, K. Melzoch, V. Filip, J. Smidrkal, Food Chem. 2004 **87**, 151–158
- [9] J.I. Cacho, N. Campillo, P. Viñas, M. Hernández-Córdoba, J. Chromatogr. A 2013, **1315**, 21–27
- [10] J.J. Ren, H. Yan Liu, Y. Hong Hao, P. Gang He, Y. Zhi Fang, Chin. Chem. Letters. 2007, **18**, 985–988
- [11] T. Rodríguez-Cabo, I. Rodríguez, M. Ramil, A. Silva, R. Cela, J. Chromatogr. A 2016, **1442**, 107–117
- [12] R. Montes, M. García-López, I. Rodríguez, R. Cela, Anal. Chim. Acta. 2010, **673**, 47–53

- [13] A. Souto, M. Carneiro, M. Seferin, M. Senna, A. Conz, K. Gobbi, *J. Food Comp. Anal.* 2001, **14**, 441-445
- [14] M. Careri, C. Corradini, L. Elviri, I. Nicoletti, I. Zagnoni, *J. Agric. Food Chem.* 2003, **51**, 5226-5231
- [15] R. Preti, S. Vieri, G. Vinci, *J. Food Comp. Anal.* 2016, **46**, 7-14
- [16] E. Geana, O. Dinca, R. Ionete, V. Artem, V. Niculescu, *Food Technol. Biotechnol.* 2015, **53**, 73-80
- [17] Y. Wang, F. Catana, Y. Yang, R. Roderick, R. Van Breemen, *J. Agric. Food Chem.* 2002, **50**, 431-435
- [18] J. Goncalves, J. Camara, *J. Sep. Sci.* 2011, **34**, 2376-2384
- [19] M. Presta, B. Bruyneel, R. Zanella, J. Kool, J. Krabbe, H. Lingeman, *Chromatogr.* 2009, **69**, 167-173
- [20] L. Vlase, B. Kiss, S. Leucuta, S. Gocan, *J. Liquid Chromatogr. Related Technol.* 2009, **32**, 2105-2121
- [21] L. Liu, Y. Zhou, Y. Kang, H. Huang, C. Li, M. Xu, B. Ye, *J. Anal. Meth. Chem.* 2017, 1-8
- [22] J. Goncalves, J. Câmara, *J. Sep. Sci.* 2011, **34**, 2376-2384
- [23] L. Gao, Q. Chu, J. Ye, *Food Chem.* 2002, **78**, 255-260
- [24] M. Fabjanowicz, M. Bystrzanowska, J. Namieśnik, M. Tobiszewski, J. Płotka – Wasylka, *Microchem. J.*, 2018, **142**, 126
- [25] M Fabjanowicz, V. Simeonov, M. Frankowski, W. Wojnowski, J. Płotka-Wasyłka, *Molecules* 2022, **27**, 6566

Praca wpłynęła do Redakcji 9 listopada 2024 r.

---

---

**WIADOMOŚCI** 2025, 79, 1-2  
*chemiczne* ISSN 0043-5104  
*Chemical News* eISSN 2300-0295

## **INFORMACJE**

---

---



## MECENASI WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH



Hydrolab to polska firma z ponad 20-letnim doświadczeniem na rynku. Jesteśmy dobrze zorganizowanym, nowoczesnie zarządzanym przedsiębiorstwem.

Produkujemy laboratoryjne demineralizatory, zaprojektowane zgodnie z wytycznymi polskich i europejskich norm, wykorzystując najnowsze technologie oczyszczania wody.

Jesteśmy w stanie zaplanować całą gospodarkę wodną w laboratorium, z pełną dokumentacją kwalifikacyjną.

Hydrolab aktualnie posiada w swojej ofercie ponad sto modeli urządzeń do oczyszczania wody.



Firma CEMIS-TECH Sp. z o.o. powstała w celu promowania ekologicznych rozwiązań firmy SOAPY-EUROPE na rynku polskim i rynkach środkowej Europy.

Jednakże energiczne poczynania naszego profesjonalnego zespołu, zaowocowały rozszerzeniem działalności na segment laboratoryjny.

W chwili obecnej CEMIS-TECH Sp. z o.o. jest wyłącznym i autoryzowanym przedstawicielem w Polsce tak uznanych firm jak: CEM Corporation, Teledyne ISCO Inc., Syrris Ltd, JACOMEX SAS, ThalesNano Inc, SOAPY Europe SRL, Mantech Inc., ZUELAB.

Ambicją naszej firmy jest dostarczenie Państwu nie tylko zamówionego sprzętu. Nasi specjaliści pomogą w wyborze urządzeń i dostosują ofertę do Państwa specyficznych wymagań aplikacyjnych. Proponujemy też grupowe bądź indywidualne szkolenia w naszym laboratorium aplikacyjnym w Kamp-Lintfort lub w Poznaniu. Ułatwi to Państwu szybkie opracowanie własnych metodyk analitycznych lub przygotowania próbek do analizy.

CEMIS-TECH Sp. z o.o. organizuje we współpracy z Uniwersytetem Jana Kochanowskiego w Kielcach coroczne Sympozjum na Łysej Górze. Możecie tam Państwo zapoznać się z najnowszymi osiągnięciami polskiej i światowej analityki chemicznej, a także indywidualnie skonsultować swoje problemy z najwybitniejszymi postaciami polskiej chemii.





---

## Medal A.J.P. Martina dla prof. Bogusława Buszewskiego

Najwyższe wyróżnienie wręczone przez Towarzystwo Chromatograficzne (ChromSoc, The Chromatographic Society), zostało przyznane w roku 2025 prof. dr. hab. Bogusławowi Buszewskiemu – Prezesowi PTChem w latach 2010-2015 – za jego wybitny wkład w rozwój technik separacyjnych. Prestiżowy medal, przyznawany nieprzerwanie od 1978 roku za osiągnięcia na najwyższym światowym poziomie w dziedzinie chromatografii i metod pokrewnych, zostanie wręczony podczas międzynarodowej konferencji HPLC2025, która odbędzie się w czerwcu w Brugii.

Panu Profesorowi Buszewskiemu serdecznie gratulujemy!



Przygotowała Izabela Nowak, zdjęcie nadesłane wyróżnionego.

---

## Konferencja EUROFOODCHEM XXIII 2025

Serdeczne zaproszenie do uczestniczenia w konferencji XXIII European Conference on Food Chemistry (EUROFOODCHEM XXIII) Konferencja organizowana jest przez Food Chemistry Division działającym przy European Chemistry Society w dn. 11-13 czerwiec 2025 w Bratysławie (Słowacja). Informacje o wydarzeniu na stronie konferencji:

<https://eurofoodchem2025.schems.sk/>

Sekcja Chemii Żywności

## **Konferencja dla wykładowców chemii (EuroVariety 2025). ZAPROSZENIE DO KRAKOWA 2-4.07.2025**

Wykładowców chemii, z dowolnych kierunków prowadzących ten przedmiot, serdecznie zapraszamy do podzielenia się swoim doświadczeniem podczas konferencji 11th European Variety in University Chemistry Education, która odbędzie się na Uniwersytecie Jagiellońskim w dniach 2-4.07.2025. Zapraszamy do odwiedzenia strony: Welcome - 11th European Variety in University Chemistry Education Conference. Otworzyliśmy już rejestrację. To będzie także wyjątkowa okazja zapoznania się z tym, jak uczy się chemii na innych uczelniach w Europie, a nawet poza nią.

---

### **Podsumowanie Zjazdu Zimowego SMPTChem w Lublinie**

Dnia 14 grudnia 2024 roku na Wydziale Matematyki, Fizyki i Informatyki Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie odbył się Zjazd Zimowy Sekcji Młodych Polskiego Towarzystwa Chemicznego.

Współorganizatorem konferencji został Instytut Nauk Chemicznych UMCS, Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych UMCS oraz Samorząd Doktorantów UMCS, zaś Partnerem konferencji zostało Studenckie Koło Naukowe Chemików „Sherlock” oraz Studenckie Koło Naukowe Chemików „Bioaktywni”.

W Konferencji wzięło udział 124 uczestników z 21 ośrodków akademickich w Polsce. Przedstawiono 89 posterów z badań własnych oraz 23 postery popularnonaukowe.

W trakcie konferencji zostały wygłoszone wykłady zaproszonych gości:

prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki (UMCS)

„Gdy fizyk i chemik spoglądają głęboko w oczy...”

prof. dr hab. Agnieszka Nosal-Wiercińska (UMCS)

“Efekt ‘cap-pair’. Dlaczego szybciej oznacza lepiej?”

prof. dr hab. n. farm. Dariusz Matosiuk (UMLub)

„Nowe leki – przyszłość farmacji”

W ramach bloku tematycznego „Młodzi w Nauce” zostały wygłoszone komunikaty ustne młodych naukowców, których badania szczególnie wyróżniły się na poprzedzającym Zjeździe Wiosennym:

Wiktoria Zawrzykraj (UAM)

„Formy żelaza w osadach polarnych – wpływ topniejących lodowców”

Beata Wyźga (UJ)

„Hinokitiol jako składnik kosmetyków – porównanie aktywności antymikrobiologicznej i wpływu na komórki skóry, badania w układach modelowych imitujących błony komórkowe”

Łukasz Czapura (PŚ)

„Dziel i modyfikuj – ekstrakcja i funkcjonalizacja jednościennej nanorurek węglowych”

Jakub Iwaszczuk (UwB)

„Synteza koniugatów kwasu N-acetyleneuraminowego z rodaminą B”

W skład Komitetu Naukowego weszli:

Izabela Nowak – Prezes PTChem (Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu)

Zbigniew Galus – Prezes Honorowy PTChem (Uniwersytet Warszawski)

dr hab. Monika Budzyńska, prof. UMCS – Dziekan Wydziału Matematyki, Fizyki i Informatyki UMCS (Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej)

dr hab. Beata Cristóvão, prof. UMCS – Dziekan Wydziału Chemii UMCS (Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej)

Małgorzata Grabarczyk – Dyrektor Instytutu Nauk Chemicznych UMCS (Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej)

Wiesław Gruszecki – Prorektor UMCS ds. Nauki i Współpracy Międzynarodowej (Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej)

dr hab. Dagmara Jacewicz, prof. UG – Wiceprezes PTChem, Opiekun Sekcji (Uniwersytet Gdański)

Dorota Kołodyńska – Prorektor UCMS ds. Studentów i Jakości Kształcenia (Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej)

Rafał Latajka – Członek Prezydium PTChem (Politechnika Wrocławska)

Jacek Lipok – Członek Prezydium PTChem (Uniwersytet Opolski)

Dariusz Matosiuk (Uniwersytet Medyczny w Lublinie)

Artur Michalak – Wiceprezes PTChem (Uniwersytet Jagielloński)

Agnieszka Nosal-Wiercińska – Skrabnik PTChem (Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej)

Robert Pietrzak – I-Wiceprezes PTChem (Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu)

Beata Podkościelna – Przewodnicząca Oddziału Lubelskiego PTChem (Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej)

dr hab. Paweł Rodziewicz, prof. UJK – Sekretarz PTChem (Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach)

dr hab. Aleksandra Szcześ, prof. UMCS – Dyrektor Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych UMCS (Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej)

Małgorzata Wiśniewska – Przewodnicząca Sekcji Fizykochemii Zjawisk Międzyfazowych PTChem (Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej)

Podczas tegorocznego Zjazdu Zimowego wyłoniono autorów najlepszych posterów.

Nagrodę Komitetu Naukowego za najlepsze postery z badań własnych otrzymali:

W kategorii studiów pierwszego stopnia:

Maciej Gdala

“Badania nad wprowadzaniem barwników rozpuszczalnikowych w skład warstw tlenkowych wytworzonych w procesie utleniania mikrołukowego na stopach glinu”

Weronika Wolna

“Optymalizacja syntezy analogów VHL modyfikowanych łącznikami alkilowymi – synteza elementów budulcowych nowej klasy terapeutyków, cząsteczek PROTAC”

W kategorii studiów drugiego stopnia:

Julia Borda

“Polimery skoniugowane w mediach organicznych: klucz do zaawansowanej separacji jednościennych nanorurek węglowych”

Agata Kołkowska

“Modyfikacja warstwy wierzchniej stopu NiTi metodą elektrochemiczną”

W kategorii studiów trzeciego stopnia:

Paweł Kalarus

“Wpływ grupy funkcyjnej na właściwości fizykochemiczne i biologiczne nowych pochodnych fenantro[9,10-d]imidazolu”

Grzegorz Przesławski

“A Star Polymer-Eugenol Complex as a Potential Modifier of Methacrylate Bone Cement”

Dodatkowe wyróżnienia za postery z badań własnych otrzymali:

W kategorii studiów pierwszego stopnia:

Adam Dobosz

“Wulkanizacja siarkowa kauczuku naturalnego wspierana anionem fluorkowym”

W kategorii studiów drugiego stopnia:

Hubert Knap

“Modyfikacja powierzchni stopów tytanu i badania biogodności uzyskanych powłok”

W kategorii studiów trzeciego stopnia:

Julia Kurasik

“Nowe pochodne pirenu: synteza i charakterystyka związków fluorescencyjnych o wysokiej stabilności fotofizycznej”

Paulos Asefa Fufa

“Is Methyl a Universal Inert Protecting Group? The Curious Case of  $\alpha$ -Methylbithiophene”

Nagrodę Komitetu Naukowego za najlepszy plakat popularnonaukowy otrzymał:

Adrian Grzonka

„Natura w walce z plastikiem: biodegradacja polietylenu przez larwy Barciaka Większego”

Dodatkowe wyróżnienie za najlepszy plakat popularnonaukowy otrzymał:

Bartosz Wojdyła

„Różnorodność strukturalna degraderów z osi endosom-lizosom, czyli co wolno chemikowi gdy nie martwi się przenikalnością przez błony biologiczne”

Nagrody publiczności otrzymali:

Za najlepszy plakat z badań własnych:

Katarzyna Balon

„Wykorzystanie reakcji bioortogonalnych do syntezy sond fluorescencyjnych”

Za najlepszy plakat popularnonaukowy:

Maja Gędłek

„Podwójne uderzenie w nowotwór, czyli czym są dualne inhibitory?”

Patronat Honorowy nad Zjazdem objęli:

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Marszałek Województwa Lubelskiego Jarosław Stawiarski

Wojewoda Lubelski Krzysztof Komorski

Prezydent Miasta Lublin Krzysztof Żuk

Ponadto patronat objęli:

Przewodnicząca Komisji Rozwoju i promocji Osiągnięć Młodych Nauowców Oddziału PAN w Lublinie – Prof. dr hab. Agnieszka Nosal-Wiercińska

Przewodnicząca Oddziału Lubelskiego PTChem – Prof. dr hab. Beata Podkościelna

Dziekan Wydziału Chemii UMCS – Dr hab. Beata Cristóvão, prof. UMCS

Dyrektor Instytutu Nauk Chemicznych UMCS – Prof. dr hab. Małgorzata Grabarczyk

Dziekan Wydziału Matematyki, Fizyki i Informatyki UMCS – Dr hab. Monika Budzyńska, prof. UMCS

Dyrektor Szkoły Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych UMCS – Dr hab. Aleksandra Szcześ, prof. UMCS

Dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego – Dr hab. Beata Grobelna, profesor Uniwersytetu Gdańskiego

Dziekan Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego – Prof. dr hab. Magdalena Prokopowicz

Dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu w Białymstoku – Prof. dr hab. Joanna Karpińska.

Dziekan Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej – Prof. dr hab. inż. Wioletta Raróg-Pilecka

Dziekan Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej – Prof. dr hab. inż. Ewa Kaczorek

Dziekan Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej – Prof. dr hab. inż. Małgorzata Iwona Szynkowska-Jóźwik

Dziekan Wydziału Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu w Siedlcach – Dr hab. Marzena Stańska, profesor uczelni

Dziekan Wydziału Chemii i Farmacji Uniwersytetu Opolskiego – Dr Anna Kusakiewicz-Dawid

Dziekan Wydziału Energetyki i Paliw Akademii Górniczo-Hutniczej im. Stanisława Staszica w Krakowie – Prof. dr hab. Monika Motak

Dziekan Wydziału Nauk Ścisłych, Przyrodniczych i Technicznych Uniwersytetu Jana Długosza w Częstochowie – Dr hab. Renata Barczyńska-Felusiak, prof. UJD

Dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego – Dr hab. Marcin Sobczyk, prof. Uwr

Dziekan Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej – Dr hab. inż. Piotr Rutkowski, prof. uczelni

Dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego – Prof. dr hab. Sławomir Sęk

Dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza – Prof. dr hab. Maciej Kubicki

Dziekan Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej – Prof. dr hab. inż. Wojciech Simka

Dziekan Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie – Prof. dr hab. inż. Rafał Rakoczy

Dziekan Wydziału Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach – Dr hab. Dariusz Banaś, prof. UJK

Dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego – Prof. dr hab. Rafał Głowacki

Dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego – Dr hab. Piotr Pietrzyk, prof. UJ

Dziekan Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum –

Prof. dr hab. Marcin Kołaczkowski

Patronat Medialny nad Zjazdem objęło:

Akademickie Radio Centrum

Telewizja Akademicka UMCS

Platynowymi sponsorami Zjazdu zostali:

Selvita S.A.

ABL&E-JASCO Polska Sp. z o.o.

LATECH Sp. z o.o.

Labsoft Sp. z o.o.

Diamentowym sponsorem Zjazdu została firma Hydrolab Sp. z o.o.

Złotymi sponsorami Zjazdu Zimowego zostali:

OFICYNA EDUKACYJNA \* KRZYSZTOF PAZDRO sp. z o.o.

Wydawnictwo Naukowe PWN S.A.

Chemat Sp. z o.o.

SHIM-POL A.M. Borzymowski





Bardzo dziękujemy wszystkim uczestnikom za udział w konferencji.

Serdecznie zapraszamy do ponownego udziału w Zjeździe Wiosennym SMPTChem 2025!



11th Conference  
European Variety in University Chemistry Education  
Chemistry Beyond Borders:  
Innovating Education for a Sustainable Future

# EuroVariety 2025

Kraków  02-04.07.2025 

## Jeśli jesteś:

- wykładawcą chemii, biochemii, technologii lub inżynierii chemicznej,
- doktorantem w roli asystenta,
- pracodawcą dla absolwentów studiów chemicznych,
- autorem podręczników lub materiałów dydaktycznych,
- dydaktykiem lub metodykiem nauczania chemii.

## Jeśli chcesz:

- podzielić się swoim doświadczeniem,
- porozmawiać o wyzwaniach,
- poszukać rozwiązań,
- zainspirować się pomysłami innych.

**To zaproszenie jest  
właśnie dla Ciebie!**

<https://eurovariety2025.confer.uj.edu.pl>  
[eurovariety2025@uj.edu.pl](mailto:eurovariety2025@uj.edu.pl)



**Ważne daty:** 13.03 – Termin streszczeń prezentacji; 18.04 – Termin streszczeń posterów  
18.04 – Wczesna opłata konferencyjna; 23.05 – Zwykła opłata; 13.06 – Późna opłata



# EuroVariety 2025

## O CZYM BĘDZIEMY ROZMAWIAĆ:

1. Competence based chemistry education (development of employability skills).
2. Chemistry education for promoting responsibility and sustainability.
3. Practical education: the role, effectiveness and organisation of the laboratory and industrial placement.
4. Remote teaching and learning.
5. Multimedia, AR, VR and AI in chemistry education.
6. Research based education.
7. Innovations in: content, methods and assessment.
8. University students involvement in outreach of chemistry and science communication.
9. RPL and lifelong learning in chemistry.
10. Pre-service school teacher training.
11. Professional development of university teaching staff.

**Serdecznie  
zapraszamy!**

## **REGULAMIN I INFORMACJE DLA AUTORÓW PUBLIKUJĄCYCH W CZASOPIŚMIE „WIADOMOŚCI CHEMICZNE”**

### **1. Informacje ogólne**

„Wiadomości Chemiczne” są recenzowanym czasopismem naukowym Polskiego Towarzystwa Chemicznego, które publikuje przede wszystkim artykuły przeglądowe. Ponadto publikowane są tutaj inne wartościowe materiały o charakterze edukacyjno-informacyjnym takie jak: artykuły oparte na pracach doktorskich lub habilitacyjnych, które zostały wyróżnione przez Rady Wydziałów, przed którymi toczyły się odpowiednie procesy; materiały informacyjne na temat uczonych oraz jednostek naukowych/firm chemicznych lub pokrewnych chemii; materiały o aktualnych osiągnięciach w szeroko pojętych naukach chemicznych.

Dodatkowa ofertę Wydawnictwa stanowi seria, „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”, gdzie publikowane są dłuższe artykuły przeglądowe lub monografie poświęcone ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii. Autorzy, którzy chcieliby takie prace napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją, a następnie przesłać wstępnie przygotowaną publikację (redagowaną na wzór artykułów w czasopiśmie „Wiadomości Chemicznych”) lub informacje na temat przygotowywanej pracy – tytuł przygotowywanej publikacji, przybliżoną liczbę stron, tabel, rysunków. W chwili obecnej Redakcja nie posiada środków na finansowanie prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”. W zależności od sytuacji finansowej Wydawnictwa, Redakcja zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

„Wiadomości Chemiczne” wydawane są zarówno w wersji drukowanej jak i elektronicznej. Wersja elektroniczna udostępniana jest bezpłatnie w Internecie.

Czasopismo jest indeksowane/abstraktowane w kilku bazach danych: Chemical Abstracts, Polska Bibliografia Naukowa, BazTech, Polska Bibliografia Lekarska, Index Copernicus, Baza ARIANTA.

### **2. Informacje dla autorów na temat wymagań i zasad publikowania prac**

- Prace nie były wcześniej publikowane, ani nie są złożone w redakcji innego czasopisma.
- Autorzy prac stosują się do wymagań praw autorskich tzn. w przypadku zamieszczania rysunków, tabel itp., pochodzących z opracowań opublikowanych w innych czasopismach lub publikacjach zwartych, posiadają pisemną zgodę na ich przedruk.

- Opublikowana raz praca bez zgody Redakcji, nie może być wydawana gdzie indziej.
- Autorzy przysyłający prace po raz pierwszy powinni podać swój numer telefonu oraz adresy poczty tradycyjnej i elektronicznej. Jest to niezbędny warunek sprawnego przebiegu opracowania redakcyjnego tekstu.
- Autorzy zobowiązani są do wykonania korekty tekstu. W pracach przyjętych do druku Redakcja ma prawo dokonywania niezbędnej korekty.
- Jeżeli autorzy nie zastrzegą inaczej w momencie zgłoszenia pracy, wydawca nabywa ogólnych praw autorskich do wydrukowanych prac (w tym prawo wydawania na nośnikach elektronicznych oraz w Internecie). Tytułem powyższego wykorzystania utworów autorom nie są wypłacane honoraria.
- Wszystkie nadsyłane prace są poddawane wstępnej ocenie, która określa czy odpowiadają randze i profilowi „Wiadomości Chemicznych” oraz czy zostały przygotowane zgodnie z formalnymi wymogami MNiSW oraz Redakcji.
- Po uzyskaniu pozytywnej wstępnej oceny wszystkie prace są recenzowane przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów, zgodnie ze wskazówkami zawartymi w broszurze informacyjnej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, [http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user\\_upload/ministerstwo/Publikacje/20110216\\_MNiSW\\_broszura\\_210x210.pdf](http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user_upload/ministerstwo/Publikacje/20110216_MNiSW_broszura_210x210.pdf).
- O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny.
- Prace, które Komitet Redakcyjny na podstawie uzyskanych recenzji stwierdził, że nie należy przyjąć do druku w czasopiśmie, po uwzględnieniu sugestii recenzentów mogą być powtórnie przesłane do czasopisma. W takim przypadku praca traktowana jest jako nowy tekst i ponownie przechodzi pełną procedurę recenzowania.
- Ponadto Komitet Redakcyjny informuje, że tzw. „ghostwiting” (ktoś wniósł znaczący wkład w powstanie publikacji, a nie został przedstawiony jako współautor lub też nie został wymieniony w podziękowaniu zamieszczonym w publikacji) lub „guest authorship” (udział autora jest znikomy lub też w ogóle nie miał miejsca, a mimo to jest współautorem publikacji) są przejawem nierzetelności naukowej. Wszelkie przejawy nierzetelności naukowej, łamanie i naruszanie zasad etyki obowiązującej w nauce będą ujawniane, włącznie z powiadomieniem jednostek zatrudniających autorów.
- Autorzy mają prawo do zaproponowania co najmniej trzech niezależnych recenzentów, jednak ostatecznego wyboru anonimowych recenzentów dokonuje Redakcja.

### 3. Koszty

Autorzy czasami mogą ponosić częściowe koszty wydania swoich artykułów. Tak jest w przypadku tzw. stron nadliczbowych tj. powyżej 25 stron. Za każdą rozpoczętą nadliczbową stroną jest naliczana opłata w wysokości około 50 zł. Najczęściej- kwota ta pokrywana jest z funduszy pozyskiwanych przez Autorów lub przez Wydziały które wspomagają wydawanie „Wiadomości Chemicznych”.

Niezależnie od rodzaju pracy opłata pobierana jest również za strony drukowane w kolorze (zgodnie z faktycznym kosztem druku).

Redakcja zastrzega sobie możliwość zmiany wysokości opłat, w zależności od wielkości dofinansowania z MNiSW oraz wypracowanych środków własnych. Faktura wystawiana jest po ukazaniu się pracy.

W przypadku prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”, Redakcja nie posiada środków na finansowanie i zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

#### 4. Informacje szczegółowe dotyczące przygotowania maszynopisu do druku

##### 4.1. Wymagania merytoryczne

Tekst należy napisać zwięźle, prostym stylem, według zasad pisowni polskiej, z zachowaniem poprawnego i obowiązującego nazewnictwa fachowego. Nie należy zamieszczać nadmiaru szczegółów odsyłając Czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego, które to powinno uwzględniać najnowsze informacje, dotyczące napisanej pracy. Literaturę należy cytować ze źródeł oryginalnych.

##### 4.2. Wymagania techniczne składu tekstu

- W przypadku prac współfinansowanych przez autorów, liczba stron oraz forma kolorystyczna manuskryptu nie jest ograniczona (wymagane jest wcześniejsze uzgodnienie z Redakcją).

- Maszynopisy prac autorów którzy nie chcą ponosić dodatkowych kosztów, nie powinny przekraczać 25 stron całej pracy (po wydruku w czasopiśmie) oraz drukowane będą w wersji czarno białej.

- Główny tekst nadsyłanych prac powinien być napisany w edytorze Word, czcionką Times New Roman, 12p z zachowaniem interlinii 1,5 oraz z 5 cm marginesem z prawej strony. Przy podziale tekstu należy stosować numerację cyfrową wielorzędową. Numerujemy tylko tytuły rozdziałów, nie numerujemy działów: Abstract, Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Uwagi końcowe, Podziękowanie, Piśmiennictwo cytowane.

Jednolity sposób numeracji konsekwentnie stosuje się wewnątrz tekstu (w całym tekście tj. zarówno przy numerowaniu rozdziałów, przy przytaczaniu piśmiennictwa cytowanego oraz odwoływaniu się do tabel rysunków itp., nie należy stosować odsyłaczy hipertekstowych).

- Tekst powinien być napisany poprawnym językiem, wszystkie skróty muszą być wyjaśnione, oznaczenia i jednostki miar należy podawać według układu SI, pozycje cytowanej literatury należy oznaczać numerami umieszczonymi w nawiasach kwadratowych, w kolejności cytowania wg wzorów [1, 5, 7] (dla prac 1, 5 i 7) lub [1-5, 7] (dla prac od 1 do 5 oraz pracy 7).

- Jeśli w artykułach znajdują się przedruki rysunków, czy innych elementów prac cudzych, w opisach (polskich i angielskich) należy zamieścić stosowną informację.

- Zaleca się umieszczać w tekście pracy rysunki, tabele oraz podpisy (jeśli są przygotowane w edytorze Word), jednak w przypadku plików o bardzo dużych rozmiarach należy zaznaczyć miejsca na ich umieszczenie (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji).

- Pierwsza strona pracy powinna zawierać kolejno:

- tytuł pracy w języku polskim (Times New Roman, 14 p, pogrubiony, WERSALIKI), i angielskim (Times New Roman, 14 p, WERSALIKI),
- pełne imię i nazwisko autora (autorów) pracy (Times New Roman, 15p, pogrubione),
- pełne nazwy ośrodków przypisane do autorów pracy (wraz z adresem ośrodka i adresem e-mail autora korespondującego (Times New Roman, 10,5, kursywa),
- spis treści pracy z zastosowaniem następującego podziału:

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Tytuł rozdziału

1.1. Tytuł podrozdziału itp.

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

- Kolejne strony pracy powinny zawierać:

- notki o autorach pracy wraz z tytułami naukowymi (można dołączyć osobno pliki z fotografiami autorów (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji),

- obszernie streszczenie pracy w języku angielskim (od 1800 do 2700 znaków ze spacjami) z uwzględnieniem cytowanego piśmiennictwa oraz odsyłaczami do tabel, rysunków zamieszczonych w tekście (Rys. 1, Tab. 1-2, Schemat 1) oraz słowa kluczowe – nie więcej niż 6, uzyskane najlepiej z bazy haseł przedmiotowych podawane w języku angielskim i polskim,

- wykaz stosowanych skrótów – w przypadku niewielkiej liczby skrótów lub akronimów nie jest konieczne zamieszczanie tej pozycji, wówczas, skróty wyjaśniamy w tekście przy pierwszym użyciu. Angielskie skróty należy podać

i wyjaśnić wg poniżej podanego wzoru lub w oparciu o inne prace zamieszczone w „Wiadomościach Chemicznych”. Przykład: dla skrótu SSRI

– selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny (ang. Selective Serotonin Reuptake Inhibitor),

– dalszy tekst pracy zgodny z podawanym wcześniej spisem treści.

- Tabele, rysunki, fotografie

Tabele i rysunki powinny być zamieszczone w przesyłanym tekście oraz dodatkowo (po zatwierdzeniu pracy do druku, na etapie przygotowywania szczołki) dołączone w postaci osobnych plików zapisanych w formacie pdf, doc, jpg, tiff.

Tabele i rysunki powinny być przejrzyste, zawierać informacje niezbędne do zrozumienia treści, bez konieczności poszukiwania objaśnień w tekście pracy, należy je numerować cyframi arabskimi oraz podać tytuł (polski/angielski, nad tabelą, pod rysunkiem, Times New Roman, 10 p).

Wszystkie fotografie – należy przesłać w postaci plików zapisanych w formacie tif, jpg lub podobnym, każdą zapisać w oddzielnym pliku o rozdzielczości co najmniej 300 dpi.

- Piśmiennictwo cytowane

Piśmiennictwo należy zestawić numerycznie według kolejności cytowania w tekście, należy cytować wyłącznie pozycje istotne dla treści pracy w sposób precyzyjny.

W przypadku artykułów z czasopism tradycyjnych, opis powinien zawierać kolejno następujące elementy: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, numer wolumenu zaznaczony pogrubioną czcionką, numer pierwszej strony cytowanej pracy, np.

[1] J. Kowalski, Wiad.Chem., 2007, 61, 473.

[2] W. Kowalski, A. Nowak, Przem. Spoż. 2010, 51, 3.

W przypadku książek najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł książki, nazwę wydawcy, miejsce wydania, rok wydania, np.

[1] J. Malinowski, Tytuł książki, PWN, Warszawa, 2004.

[2] W. Kowalski, Tytuł książki, Volumed, Wrocław, 1999

W przypadku zasobów Internetowych najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł (artykułu) dokumentu online, [dostęp], wydawca, [data dostępu]. Warunki dostępu, np.



[7] J. Kowalski, Tytuł artykułu. [online], wydawca, [dostęp: 2010-05-

20]. Dostępny w Internecie: <http://www.....>

#### 4.3. Materiały jakie należy przygotować w celu przesłania pracy do Redakcji

Przed podjęciem decyzji o zakwalifikowaniu pracy do druku w celu oceny merytorycznej należy przesłać jeden plik kompletnej pracy zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji.

Po uzyskaniu pozytywnej recenzji i po ustosunkowaniu się do uwag Recenzenta oraz Redakcji należy przesłać ostateczną wersję pracy w następującej postaci:

- 1 plik tekstu zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji;
- 1 plik zawierający krótkie notki biograficzne o autorach nadesłanej pracy (każda notka do 150 wyrazów powinna zawierać: tytuł naukowy, miejsce pracy oraz inne ważne informacje o autorze);
- pliki zawierające zdjęcia portretowe autorów, w nazwie powinny wskazywać autora, którego zdjęcie dotyczy (dobrowolne, przesłanie plików jest jednoznaczne ze zgodą na jego opublikowanie);
- 1 plik zawierający: stronę tytułową, streszczenie (abstrakt), słowa kluczowe, podpisy pod rysunki, tabele, schematy (wszystko w obu wersjach językowych); jeśli zachodzi potrzeba to również oddzielne pliki z rysunkami, schematami, tabelami (zob. Tabele, rysunki, fotografie).

Prace nie odpowiadające wyżej wymienionym wymaganiom nie będą przyjmowane do druku. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania poprawek stylistycznych i skrótów. Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty artykułu i jego zwrotu do Redakcji w ciągu kilku dni od otrzymania.

Na etapie przygotowania szrotki, w przypadku przesyłania prac z kolorowymi stronami prosimy o zaznaczenie stron, które w formie druku mają być kolorowe. Brak tej czynności będzie skutkowało czarno-białym wydrukiem wersji papierowej. W przypadku zmian w wersji drukowanej kolorowych rysunków na czarno-białe, prosimy o przesłanie dostosowanych do tego celu rysunków.

Prace prosimy przysyłać pocztą elektroniczną na adres: [czasopisma@ptchem.pl](mailto:czasopisma@ptchem.pl), zaś dokumenty wymagające podpisów autorów (np. list intencyjny, oświadczenia autorów, kopie zgody na przedruk potwierdzone za zgodność z oryginałem) pocztą tradycyjną na adres Redakcji.

*Redakcja „Wiadomości Chemicznych”*

## SPIS TREŚCI

Paulina GAȚAREK, Joanna KALUŻNA-CZAPLIŃSKA: Zastosowanie technik chromatograficznych w badaniach metabolitów w schorzeniach związanych z ośrodkowym układem nerwowym .....	3
Joanna BOGUSIEWICZ, Katarzyna BURLIKOWSKA, Bogumiła KUPCEWICZ, Kamil ŁUCZYKOWSKI, Karol JAROCH, Paulina Zofia GORYŃSKA, Krzysztof GORYŃSKI, Marcin BIRSKI, Jacek FURTAK, Dariusz PACZKOWSKI, Marek HARAT, Janusz PAWLISZYN, Barbara BOJKO: Analiza lipidomiczna w diagnostyce guzów mózgu .....	21
Szymon WÓJCIK, Filip CIEPIELA, Bogusław BAŚ, Małgorzata JAKUBOWSKA: Zastosowanie metod chemometrycznych do woltamperometrycznego profilowania żywności ...	39
Jędrzej PROCH: Układy łączone oparte na detekcji przy użyciu optycznej spektrometrii emisyjnej w oznaczaniu form metali i metaloidów .....	61
Karolina PIETRZAK, Cecylia WARDAK: Nowe materiały funkcjonalne w konstrukcji czujników potencjometrycznych typu solid contact .....	83
Alicja SKIBA, Katarzyna STYSZKO, Lucyna SAMEK, Zbigniew GORCZYCA, Mirosław ZIMNOCH, Kazimierz RÓŻAŃSKI: Sezonowa zmienność źródeł pyłów zawieszonych na przykładzie Krakowa .....	101
Łukasz OŁDAK, Ewa GORODKIEWICZ: Oznaczanie potencjalnie charakterystycznych białek prozapalnych i proangiogennych jako nowy obszar rozwoju matrycowych bio-czujników SPRi .....	121
Magdalena FABJANOWICZ, Justyna PŁOTKA-WASYLKA: Oznaczanie wybranych związków bioaktywnych w winach polskiego pochodzenia .....	143
<b>Informacje</b> .....	159