

**Dr Dorota Wianowska**  
Zakład Metod Chromatograficznych  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

**Załącznik 2a** do wniosku  
o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

**Autoreferat**  
w języku polskim

## ***Autoreferat***

**1. Imię i Nazwisko: Dorota Wianowska**

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

**1996 Magisterium z chemii.**

Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin.

Tytuł rozprawy:

*Badanie pojemności sorpcyjnej względem jonów  $\text{Cu}^{2+}$  materiałów krzemionkowych z powierzchniową warstwą dekstranowo – poliiminową.*

Promotor: Prof. dr hab. Andrzej L. Dawidowicz

**2000 Doktorat z chemii fizycznej.**

Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin.

Tytuł rozprawy:

*Badania fizykochemicznych właściwości materiałów krzemionkowych z powierzchniową warstwą polimerową otrzymaną poprzez sieciowanie mieszaniny dekstranu i trietylotetraaminy.*

Promotor: Prof. dr hab. Andrzej L. Dawidowicz

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych:**

**1 października 2000 – nadal:** Zakład Metod Chromatograficznych, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie (październik 2000 - maj 2013 – adiunkt, kwiecień 2013 - nadal – asystent).

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm.).

a. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Zastosowanie ciśnieniowej ekstrakcji cieczą w chromatograficznej analizie drugorzędowych metabolitów roślinnych – blaski i cienie techniki PLE

b. Spis publikacji stanowiących podstawę wniosku habilitacyjnego

Poniżej w porządku chronologicznym zebrano prace będące podstawą przewodu habilitacyjnego. Prace te stanowią monotematyczny cykl obrazujący blaski i cienie zastosowania ciśnieniowej ekstrakcji cieczą (ang. *Pressurized Liquid Extraction*, PLE) w analizie drugorzędowych metabolitów roślinnych. Mój udział w nich wynosi 25 - 100 %. Komentarz do publikacji przedstawiony w autoreferacie nie zawiera pełnego omówienia uzyskanych wyników, lecz stanowi ich zwięzłą charakterystykę.

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | IF <sup>1</sup> | CI <sup>2</sup> |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|
| H1 | Andrzej L. Dawidowicz, <b>Dorota Wianowska</b> , Jan Gawdzik, Danuta H. Smolarz,<br><i>Optimisation of ASE conditions for HPLC determination of rutin and isoquercitrin in Sambucus nigra L.</i><br>J. Liq. Chromatogr. R. T., 26 (2003) 2381-2397.<br><a href="#">Zaplanowałam i wykonałam całą część badawczą; opracowałam wyniki; współredagowałam artykuł. Mój udział oceniam na 50 %.</a>                                                                                                     | 0,709           | 22              |
| H2 | Ewa Skórzyńska-Polit, Maria Drażkiewicz, <b>Dorota Wianowska</b> ,<br><span style="border: 1px solid black;">Waldemar Maksymiec</span> , Andrzej L. Dawidowicz, Anna Tukiendorf,<br><i>The influence of heavy metal stress on the level of some flavonols in the primary leaves of Phaseolus coccineus.</i><br>Acta Physiol. Plant., 26 (2004) 247-254.<br><a href="#">Zaplanowałam i wykonałam całą część badawczą; opracowałam wyniki; współredagowałam artykuł. Mój udział oceniam na 30 %.</a> | 0,433           | 11              |

<sup>1</sup> Impact Factor danego czasopisma według Journal Citation Reports zgodny z rokiem opublikowania

<sup>2</sup> Liczba cytowań (*Citation index*, CI) danego artykułu

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |       |    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|----|
| <b>H3</b> | Monika Waksmundzka-Hajnos, Anna Petruczynik, Anna Dragan,<br><b>Dorota Wianowska</b> , Andrzej L. Dawidowicz, Ireneusz Sowa,<br><i>Influence of the extraction method on the yield of some furanocoumarines from Pastinaca sativa fruits.</i><br>Chromatogr. B, 800 (2004) 181-187.<br>Wykonałam ekstrakcję badanych związków, opracowałam wyniki.<br>Mój udział oceniam na 25 %.                                                                                        | 2,176 | 25 |
| <b>H4</b> | Monika Waksmundzka-Hajnos, Anna Petruczynik, Anna Dragan,<br><b>Dorota Wianowska</b> , Andrzej L. Dawidowicz,<br><i>Effect of extraction method on the yield of furanocoumarines from fruits of Archangelica officinalis Hoffm.</i><br>Phytochem. Analysis, 15 (2004) 313-319.<br>Wykonałam ekstrakcję badanych związków, opracowałam wyniki.<br>Mój udział oceniam na 25 %.                                                                                             | 1,385 | 27 |
| <b>H5</b> | Andrzej L. Dawidowicz, <b>Dorota Wianowska</b> ,<br><i>PLE in the analysis of plant compounds. Part 1. The application of PLE for HPLC analysis of caffeine in green tea leaves.</i><br>J. Pharmaceut. Biomed., 37 (2005) 1155-1159.<br>Zaplanowałam i wykonałam całą część badawczą; opracowałam wyniki;<br>współredagowałam artykuł. Mój udział oceniam na 60 %.                                                                                                       | 1,889 | 23 |
| <b>H6</b> | Andrzej L. Dawidowicz, <b>Dorota Wianowska</b> ,<br><i>PLE in the analysis of plant compounds. II. One-cycle PLE in determining total amount of analyte in plant material.</i><br>J. Pharmaceut. Biomed., 37 (2005) 1161-1165.<br>Zaplanowałam i wykonałam całą część badawczą; opracowałam wyniki;<br>współredagowałam artykuł. Mój udział oceniam na 60 %.                                                                                                             | 1,889 | 6  |
| <b>H7</b> | <u>Waldemar Maksymiec</u> , <b>Dorota Wianowska</b> , Andrzej L. Dawidowicz,<br>Stanisław Radkiewicz, Marek Mardarowicz, Zbigniew Krupa,<br><i>The level of jasmonic acid in Arabidopsis thaliana and Phaseolus coccineus plants under heavy metal stress.</i><br>J. Plant Physiol., 162 (2005) 1338-1346.<br>Opracowałam procedurę PLE i osobiście wykonałam zdecydowaną większość badań. Opracowałam wyniki i współredagowałam artykuł.<br>Mój udział oceniam na 40 %. | 1,403 | 51 |
| <b>H8</b> | Andrzej L. Dawidowicz, <b>Dorota Wianowska</b> , Barbara Baraniak,<br><i>The antioxidant properties of alcoholic extracts from Sambucus nigra (The antioxidant properties of extracts.</i><br>Food Sci. Technol.-Leb., 39 (2006) 308-315.<br>Zaplanowałam i wykonałam całą część badawczą. Opracowałam wyniki.<br>Współredagowałam artykuł. Mój udział oceniam na 60 %.                                                                                                  | 1,299 | 44 |

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |       |    |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|----|
| <b>H9</b>  | Monika Waksmundzka-Hajnos, Anna Oniszcuk, Katarzyna Szewczyk,<br><b>Dorota Wianowska</b> ,<br><i>Effect of sample preparation methods on the HPLC quantitation of some phenolic acids in plant materials.</i><br>Acta Chromatogr., 19 (2007) 227-237.<br><a href="#">Wykonałam ekstrakcje. Opracowałam wyniki. Mój udział oceniam na 30 %.</a>                                                                                                                              | 0,746 | 5  |
| <b>H10</b> | Andrzej L. Dawidowicz, Ewelina Rado, <b>Dorota Wianowska</b> ,<br>Marek Mardarowicz, Jan Gawdzik,<br><i>Application of PLE for the determination of essential oil components from Thymus vulgaris L.</i><br>Talanta, 76 (2008) 878-884.<br><a href="#">Pomysł pracy, część eksperymentów jest moim udziałem. Opracowałam wyniki. Współredagowałam artykuł. Mój udział oceniam na 35 %.</a>                                                                                  | 3,206 | 28 |
| <b>H11</b> | Monika Waksmundzka-Hajnos, <b>Dorota Wianowska</b> Anna Oniszcuk,<br>Andrzej L. Dawidowicz,<br><i>Effect of sample preparation methods on the quantification of selected flavonoids in plant materials by High Performance Liquid Chromatography.</i><br>Acta Chromatogr., 20 (2008) 475-488.<br><a href="#">Wykonałam całą część badawczą. Opracowałam wyniki. Mój udział oceniam na 45 %.</a>                                                                             | 0,621 | 3  |
| <b>H12</b> | <b>Dorota Wianowska</b> , Michał Ł. Hajnos, Andrzej L. Dawidowicz,<br>Anna Oniszcuk, Monika Waksmundzka-Hajnos, Kazimierz Głowniak,<br><i>Extraction methods of 10-deacetylbaccatin III, paclitaxel and cephalomannine from Taxus baccata L. twigs: A comparison (Comparison of extraction methods).</i><br>J. Liq. Chromatogr. R. T. 32 (2009) 589-601.<br><a href="#">Wykonałam ekstrakcje, opracowałam wyniki, współredagowałam artykuł. Mój udział oceniam na 40 %.</a> | 0,998 | 1  |
| <b>H13</b> | Andrzej L. Dawidowicz, Ewelina Rado, <b>Dorota Wianowska</b> ,<br><i>Static and dynamic superheated water extraction of essential oil components from Thymus vulgaris L.</i><br>J. Sep. Sci. 32 (2009) 3034-3042.<br><a href="#">Pomysł pracy i część eksperymentów jest moim udziałem. Opracowałam wyniki. Współredagowałam artykuł. Mój udział oceniam na 40 %.</a>                                                                                                       | 2,551 | 9  |
| <b>H14</b> | Andrzej L. Dawidowicz, Natalia B. Czapczyńska, <b>Dorota Wianowska</b> ,<br><i>The loss of essential oil components induced by the purge time in the Pressurized Liquid Extraction (PLE) procedure of Cupressus sempervirens.</i><br>Talanta 94 (2012) 140– 145.<br><a href="#">Zaplanowałam część badawczą, wykonałam część ekstrakcji, opracowałam wyniki, współredagowałam artykuł. Mój udział oceniam na 40 %.</a>                                                      | 3,498 | 3  |

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                    |            |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|------------|
| <b>H15</b> | <b>Dorota Wianowska, Mariusz Wiśniewski;</b><br><i>Simplified procedure of silymarin extraction from Silybium Marianum L. Gaertner.</i><br>Zaakceptowana do druku w J. Chromatogr. Sci.<br>Pomysł pracy i zdecydowana większość badań jest moim wyłącznym udziałem. Opracowałam wyniki oraz napisałam i zredagowałam artykuł. Mój udział procentowy wynosi 95%. | 0,884 <sup>3</sup> | 0          |
| <b>H16</b> | <b>Dorota Wianowska,</b><br><i>The influence of purge times on the yields of essential oils components extracted from plants by pressurized liquid extraction.</i><br>Zaakceptowana do druku w J. AOAC Int.<br>Pomysł pracy i wszystkie badania są moim wyłącznym udziałem. Napisałam i zredagowałam artykuł. Mój udział procentowy wynosi 100%.                | 1,233 <sup>3</sup> | 0          |
| <b>H17</b> | <b>Dorota Wianowska,</b><br><i>Hydrolytical instability of hydroxyanthraquinone glycosides in Pressurized Liquid Extraction.</i><br>Anal. Bioanal. Chem: 406 (2014) 3219–3227.<br>Pomysł pracy i wszystkie badania są moim wyłącznym udziałem. Napisałam i zredagowałam artykuł. Mój udział procentowy wynosi 100%.                                             | 3,659 <sup>3</sup> | 0          |
|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>Σ 28,579</b>    | <b>258</b> |

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

#### 4c.1 Cel pracy

Etap przygotowania próbki do analizy chromatograficznej prawie od dwóch dekad skupia na sobie uwagę zarówno badaczy, analityków, jak i koncernów produkujących sprzęt analityczny oraz ten wspomagający właściwy etap analizy. Zainteresowanie to jest wyrazem świadomości istotności wpływu tego etapu procedury analitycznej na jakość otrzymywanych wyników. Ponadto jest ono efektem ogólnej tendencji do stosowania szybszych i efektywniejszych metod, które powinny być także bardziej przyjazne środowisku. Problem właściwego przygotowania materiału do badań jest szczególnie istotny w przypadku analizy złożonych materiałów naturalnych, zwłaszcza takich jak materiał roślinny. Cechą wyróżniającą materiał roślinny, poza jego zmiennością i charakterystyczną ustrukturalizowaną architekturą

<sup>3</sup> Najnowszy dostępny IF

komórkową, jest bowiem bogactwo bardzo zróżnicowanych pod względem właściwości fizykochemicznych związków, które występują w bardzo szerokim zakresie stężeń. Od dobrej metody przygotowania próbki roślinnej należałoby oczekiwać, aby niezależnie od miejsca położenia danego związku w matrycy, jej typu (twarda, gumowata czy delikatna), obecności innych składników (np. lipidów) równie łatwo i w pełni izolowała związek lotny i nielotny, polarny i niepolarny, wrażliwy jak i ten odporny na działanie np. wysokiej temperatury. Biorąc pod uwagę obszar wykorzystania surowego lub przetworzonego wstępnie materiału roślinnego oraz rangę prowadzonej analizy, wśród pożądanych cech metody przygotowania próbki roślinnej należy szczególnie mocno zaakcentować brak wpływu stosowanej metody na zmianę składu jakościowego i ilościowego badanej rośliny.

Najczęściej celem przygotowania próbki materiału roślinnego do analizy chromatograficznej wykorzystuje się metodę ekstrakcji. Wśród obecnie dostępnych wyczerpujących technik ekstrakcji związków z ciał stałych na uwagę zasługują te zaliczane do tzw. wspomaganych technik ekstrakcji. Jedną z nich jest ciśnieniowa ekstrakcja cieczą (ang. *Pressurized Liquid Extraction*, PLE). Technika PLE dzięki specyficznym warunkom jej prowadzenia przewyciężyła ograniczenia krępujące możliwości ekstrakcyjne technik klasycznych, dając jednocześnie więcej sposobów kontroli selektywności procesu. Wybór typu rozpuszczalnika przestał być jedynym kluczem do sukcesu. Nie dość, że w PLE rutynowo stosuje się temperaturę wyższą od temperatury wrzenia danego rozpuszczalnika, to można ją zmieniać w szerokich granicach temperatur. Zmieniać również można ciśnieniowe warunki ekstrakcji oraz czas trwania procesu. PLE ponadto wprowadziła wodę jako medium ekstrakcyjne niepolarnych związków i upowszechniła stosowanie kilkuskładnikowych ekstrahentów. W świetle tych faktów nie dziwi rosnące zainteresowanie zastosowaniem ciśnieniowej ekstrakcji cieczą. W ten nurt włączają się również moje zainteresowania naukowo-badawcze.

Reprezentowana przeze mnie tematyka skupia się wokół zagadnień związanych z analizą drugorzędowych metabolitów roślinnych, stąd osnową przedłożonego do oceny cyklu publikacji jest zastosowanie PLE w chromatograficznej analizie tej grupy związków. Na cykl ten składa się 17 artykułów (publikacje oznaczone symbolem **H1 - H17**). Celem badań opisanych w większości z nich (prace **H1**, **H3**, **H4**, **H9 - H13**, **H15** oraz **H17**) jest **przetestowanie możliwości techniki PLE w analizie przedstawicieli różnych grup metabolitów wtórnych**. W pracach **H1**, **H3**, **H4**, **H9**, **H11**, **H12**, **H15** oraz **H17** za cel postawiłam optymalizację procesu PLE **pod kątem ekstrakcji nielotnych farmakologicznie czynnych związków z roślin** (rozdział 4c.4.1 niniejszego opracowania). Z kolei w pracach

**H10 i H13** celem badań była optymalizacja procesu PLE **pod kątem ekstrakcji składników lotnych** (rozdział 4c.4.3).

Wśród metabolitów wtórnych roślin licznie jest reprezentowana grupa związków polifenolowych. Związki te, a szczególnie flawonoidy, uczestniczą w procesach utleniania-redukcji zachodzących tak wewnątrz jak i na zewnątrz komórki. W ramach prowadzonych badań **postanowiłam sprawdzić, czy większe możliwości ekstrakcyjne PLE nie wpływają na zwiększenie właściwości antyoksydacyjnych otrzymywanych ekstraktów** (rozdział 4c.4.2). Badania te są kanwą pracy **H8**.

Wyzwaniem analitycznym jest oznaczanie zmian stężenia związków jako odpowiedzi rośliny na stres. Ten problem włączyłam w krąg swoich zainteresowań naukowo-badawczych przyjmując za kolejny cel badań **opracowanie takiej metodyki PLE, która umożliwi badanie zmian stężenia metabolitów wtórnych (np. fitohormonów) w odpowiedzi rośliny na stres metali ciężkich** (rozdział 4c.4.4). Wyniki tego cyklu badań opublikowano w pracach **H2 i H7**.

W badaniach składu próbek naturalnych istotny etap stanowi uwierzytelnienie jakości wyników otrzymywanych daną metodą. Proces PLE jest szybki a sama technika ekstrakcyjna wysoce efektywna co zachęca do stosowania jej jako metody odniesienia. Stąd, **intencją pracy H6 jest eksperymentalne zweryfikowanie słuszności tezy, że jednocyklowa procedura PLE może służyć jako metoda pozwalająca określić rzeczywistą zawartość związków w materiale roślinnym** (rozdział 4c.4.5).

Jak wspominałam, technika PLE dzięki specyficznym warunkom jej prowadzenia przezwyciężyła ograniczenia krępujące możliwości ekstrakcyjne technik klasycznych. Te dość drastyczne warunki prowadzenia procesu PLE zwróciły moją uwagę na kolejny problem, który **przyjęłam za istotny cel moich badań - odpowiedź na pytanie, czy zmiany dokonane w warunkach ekstrakcji a towarzyszące wprowadzeniu techniki PLE nie zmieniają obrazu badanej rośliny, dając zbiór mało rzetelnych informacji na temat jej składu jakościowego i ilościowego**. Odpowiedź na to pytanie, w formie eksperymentalnego wykazania nowych faktów na temat stosowania ciśnieniowej ekstrakcji cieczą, stanowi treść pracy **H5 oraz H14 – H17** (rozdział 4c.5).



Zaprezentowane wyżej cele naukowo-badawcze, przedłożonego do oceny cyklu publikacji, można podsumować jedną sentencją, a mianowicie

***Oblicza PLE w analizie drugorzędowych metabolitów roślinnych.***

Materiał roślinny jest przykładem bardzo złożonego typu próbki. Efektywność ekstrakcji tego materiału zależy od wielu czynników. Dlatego przedstawione wyżej połączenie celu z miejscem jego realizacji (ze wskazaniem konkretnej publikacji) nie należy traktować w sposób dosłowny. Jest to jedynie wytyczenie ogólnych kierunków badań. Wątek wpływu właściwości analitu, matrycy, obecności substancji interferujących jak i warunków procesu PLE przewija się w każdej publikacji niniejszego cyklu. Stąd te same prace często są przytaczane przy omawianiu różnych aspektów stosowania ciśnieniowej ekstrakcji cieczą.

## 4c.2 Wprowadzenie

Współcześnie analityka chemiczna pod swoją jakościową opiekę wzięła wszystkie dziedziny naszego życia, od analityki prowadzonej na potrzeby różnych gałęzi przemysłu (od spożywczego poprzez farmaceutyczny i kosmetyczny do przemysłu paliwowo-energetycznego), służby zdrowia, fizykochemicznych badań poznawczych, na analizie środowiska naturalnego kończąc. Sytuacja ta w dużej mierze jest konsekwencją możliwości współczesnej aparatury analitycznej, która dzięki wykorzystaniu nowoczesnych rozwiązań technologicznych pozwala na rutynowe oznaczanie substancji na coraz niższych poziomach stężeń. Radykalnemu zmniejszeniu, nierzutuującemu na jakość otrzymywanych wyników, uległa też wymagana do analizy minimalna ilość próbki. Dokładna i precyzyjna analiza na obecność metabolitów substancji prawnie niedozwolonej w pojedynczym włosie czy niewielkiej objętości próbki potu jest już faktem. Niemniej jednak w parze z możliwościami analitycznymi współczesnych zaawansowanych technik analitycznych pojawiła się olbrzymia liczba koniecznych do wykonania oznaczeń. Okazało się, iż nawet te mocno wyrafinowane aparaty nie są w stanie sprostać coraz większej liczbie bardzo odmiennych wyzwań analitycznych bez wcześniejszego przygotowania próbki do analizy. Problem odpowiedniego, dla potrzeb danej techniki analitycznej, przygotowania próbki nabrał wyrazistości gdy podniósł się poziom wymagań stawianych przed próbką. W chwili obecnej wymóg pracy na reprezentatywnej dla badanego obiektu i homogenicznej próbce, to zaledwie skromny początek z długiej listy życzeń. Modne jeszcze w połowie lat osiemdziesiątych minionego wieku hasło: „rozcieńcz i strzel” współcześnie praktycznie całkowicie straciło swoją aktualność.

Większość procedur oznaczania związków organicznych w próbkach złożonych angażuje techniki chromatograficzne. Chromatografia bowiem, dzięki wysokim zdolnościom rozdzielczym układów chromatograficznych oraz zastosowaniu bardzo czułych systemów detekcji, zapewnia możliwość analizy śladowych ilości związku w złożonej próbce. Niemniej jednak wobec próbek, z którymi na co dzień mamy do czynienia w praktyce laboratoryjnej, zdolności rozdzielcze układów chromatograficznych okazują się niewystarczające dla zagwarantowania poprawnego wyniku analizy. Matryca próbki może bowiem nie nadawać się do bezpośredniego wprowadzenia jej na kolumnę lub też charakteryzuje się bogactwem substancji nie stanowiących celu analizy, tzw. substancji interferujących. Analit wreszcie może nie spełniać podstawowych wymagań docelowej techniki analitycznej np. co do lotności i termicznej stabilności związku poddawanego analizie techniką GC (ang. *Gas Chromatography*) lub jest on obecny w próbce nieprzetworzonej w ilości niższej niż zdefiniowany dla danej metody poziom LOQ (ang. *Limit of Quantification*).

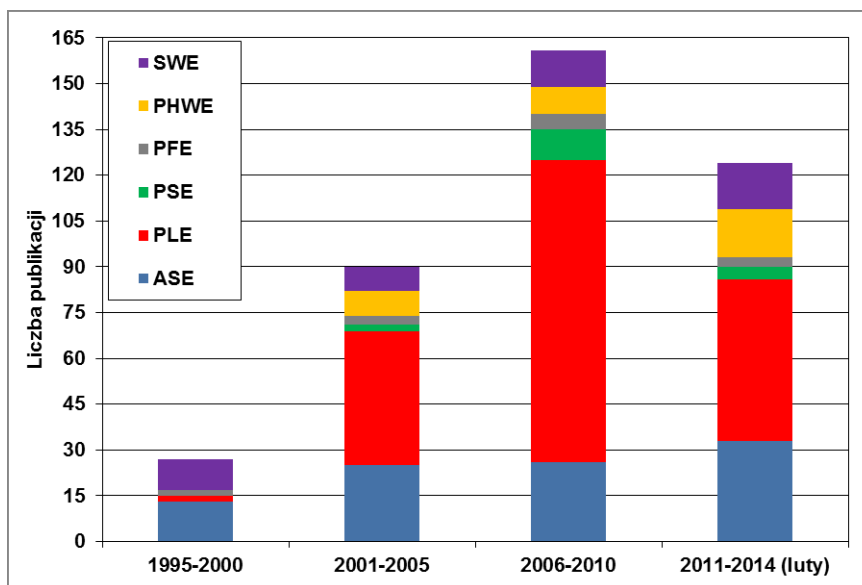
Przygotowanie próbki jest zatem procesem wymaganym do jej przekształcenia do takiej postaci, która umożliwi wykonanie oznaczenia, lub która polepszy to oznaczenie. Przekształcenie może być dokonane na substancji stanowiącej cel analizy i/lub pierwotnej matrycy próbki. Biorąc pod uwagę fakt, iż zwykle proces ten przebiega w kilku etapach nie dziwi, że przygotowanie próbki to wciąż jeden z najbardziej pracochłonnych i czasochłonnych etapów procedury analitycznej. Jest to również etap wyjątkowo podatny na błędy, których bardzo często nie można skorygować na dalszych etapach procedury. Tylko odpowiednio poprowadzony etap przygotowania próbki gwarantuje powtarzalną metodę analizy, niezależną od ewentualnych zmian w matrycy próbki oraz dokładny i niepodważalny jej wynik. Poprawność przygotowania próbki nie tylko jest kluczem do sukcesu analizy, ale również usprawnia ją, przyczyniając się do zwiększenia liczby wykonywanych analiz, skrócenia czasu pracy aparatów oraz zmniejszenia kosztów analizy.

Ekstrakcja jest jednym z najczęściej wykorzystywanych procesów przygotowania próbki. Swą popularność zawdzięcza możliwości osiągnięcia wszystkich celów stawianych przed etapem przygotowania próbki. Ponadto, odmienne właściwości fizykochemiczne analitów oraz matryc nie ograniczają obszaru jej stosowania. Niemniej, nie jest ona pozbawiona wad. Do najczęściej podkreślanych wad klasycznych technik ekstrakcji należą: konieczność pracy na dużej próbce; zużywanie dużych objętości - w większości toksycznych i drogich - rozpuszczalników organicznych; generowanie dużych objętości odpadów; utrudniona automatyzacja; brak możliwości bezpośredniego łączenia etapu przygotowania z etapem analizy; konieczność prowadzenia dodatkowych operacji na próbce (np. filtrowania

ekstraktu, jego zatężania itp.), wreszcie czasochłonność i pracochłonność procesu przy często obserwowanej małej jego efektywności i powtarzalności. W świetle tych faktów nie dziwi obserwowane dążenie do szerokorozumianego unowocześnienia technik ekstrakcyjnych. Dążenie to jest tym silniejsze, im głośniejsze brzmią głosy domagające się upowszechnienia w analityce stosowania technik ogólnie bardziej przyjaznych środowisku.

#### 4c.3 Ciśnieniowa ekstrakcja cieczą

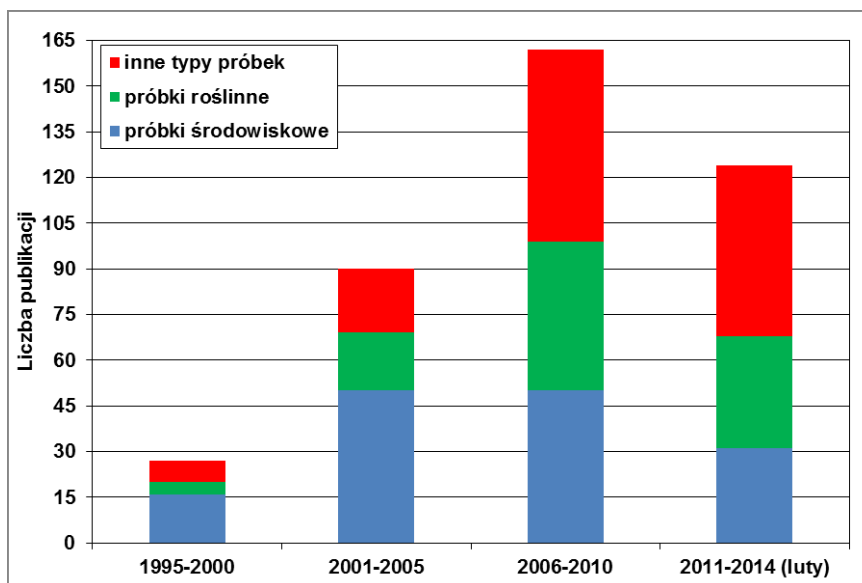
Istota procesu ciśnieniowej ekstrakcji cieczą (ang. *Pressurized Liquid Extraction*, PLE) sprowadza się do wykorzystania ciekłego rozpuszczalnika w temperaturze wyższej od jego temperatury wrzenia pod ciśnieniem atmosferycznym. Technika ta stanowi więc współczesną alternatywę dla klasycznej wersji rozpuszczalnikowej ekstrakcji związków z próbek stałych, prowadzonej w aparacie Soxhlet'a pod ciśnieniem atmosferycznym. Początkowo była ona znana pod nazwą *przyspieszona ekstrakcja cieczą*, którą wyprowadzono od nazwy pierwszego handlowo dostępnego aparatu, tj. *Accelerated Solvent Extractor* (ASE®100) firmy Dionex. Obecnie stosuje się szereg innych jej nazw uwypuklających albo właściwości medium ekstrahującego albo warunki procesu, a mianowicie: *Pressurized Solvent Extraction* (PSE), *Pressurized Fluid Extraction* (PFE), czy wspomniana już wcześniej nazwa *Pressurized Liquid Extraction* (PLE). W przypadku gdy ekstrahentem jest woda, technika ta przybiera inne nazwy dla podkreślenia faktu stosowania cieczy bezpiecznej dla środowiska: *Pressurized Hot Water Extraction* (PHWE), *Superheated Water Extraction* lub *Subcritical Water Extraction* (SWE). Jak wynika z analizy diagramów przedstawionych na Rys. 1, nazwa *Pressurized Liquid Extraction*, jest jednak stosowana najczęściej.



Rys. 1 Liczba prac opublikowanych w czasopismach *Elsevier* i *Springer* od momentu zaprezentowania techniki ciśnieniowej ekstrakcji cieczą do chwili obecnej. Dane dotyczą publikacji, w których pełne brzmienie różnych nazw techniki pojawia się w tytule pracy lub jest wskazane przez jej autora/ów jako słowo kluczowe (dane wg. bazy *ScienceDirect* z dn. 7.03.2014)

Technikę PLE opracowano celem usprawnienia analizy próbek środowiskowych. Jej pierwsza prezentacja miała miejsce w roku 1995 na międzynarodowej konferencji dotyczącej chemii analitycznej, nazywanej w skrócie *Pittcon* (*The Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy*) [1-3]. Szybko jednak obszar zastosowania PLE rozszerzono na inne typy stałych matryc, m.in. polimery i tworzywa, leki, żywność, tkankę zwierzęcą, a w tym również i na materiał roślinny [4-6]. Na Rys. 2, na przykładzie zmiany liczby prac opublikowanych tylko w czasopismach *Elsevier* i *Springer*, zaprezentowano jak w poszczególnych okresach czasu ewoluował obszar zastosowania PLE.

Widoczna na Rys. 2 ekspansja zastosowania PLE z obszaru analityki skoncentrowanej na monitorowaniu zanieczyszczeń środowiska [7] na inne jej obszary, głównie wynika z faktu, iż technika ta jest zautomatyzowana, radykalnie skraca czas przygotowania próbki oraz ogranicza zużycie organicznych rozpuszczalników. Prowadzenie procesu w atmosferze gazu obojętnego jak i wyeliminowanie dostępu światła do próbki biologicznej to dodatkowe czynniki zachęcające do stosowania PLE również w analizie związków podatnych na szkodliwe działanie tlenu czy promieniowania UV.



**Rys. 2** Liczba prac opublikowanych w poszczególnych okresach czasu w czasopiśmie *Elsevier* i *Springer*, poświęconych zastosowaniu PLE w analizie różnych typów próbek. Dane dotyczą publikacji, w których pełne brzmienie jednej z nazw tej techniki jest użyte w tytule lub przez autora pracy jest wskazane jako słowo kluczowe (dane wg. bazy *ScienceDirect* z dn. 7.03.2014)

Procedura PLE jest prosta i sprowadza się do trzech płynnie po sobie następujących etapów. W pierwszym, próbka upakowana do naczynia ekstrakcyjnego, poddawana jest procesowi ekstrakcji określonym rozpuszczalnikiem we wcześniej ustalonych warunkach procesu, uwzględniających temperaturę, ciśnienie oraz czas jego trwania (etap ekstrakcji statycznej). W etapie drugim, celem przeniesienia ekstraktu z naczynia ekstrakcyjnego do odbieralnika, przez próbkę pompuje się świeżą porcję rozpuszczalnika (etap płukania). Na koniec, przez linię rozpuszczalnika, łącznie z naczyniem ekstrakcyjnym, przepuszcza się obojętny gaz. Ten etap powszechnie jest określany terminem *purge time*. Dokładniejszy opis wpływu różnych parametrów procesu PLE na wydajność jest przedstawiony w rozdziale 4c.5.

Handlowo dostępne aparaty pozwalają na pracę w szerokim zakresie temperatur (przeważnie od temperatury pokojowej do 200 °C), ciśnień (35 - 200 bar) i czasów trwania procesu (1 - 99 min.). Niemniej najczęściej czas wymagany do ekstrakcji związków ze stałej próbki to kilka minut (przeważnie 10 - 15 min) a zalecane przez firmę Dionex jako standardowe warunki ciśnieniowej ekstrakcji cieczą, tzw. *default conditions*, to: temperatura 100 °C pod ciśnieniem 60 bar. Szeroki jest też wybór możliwych do użycia rozpuszczalników – niewskazane są jedynie ciecze silnie żrące i te, które charakteryzuje niska temperatura samozapłonu (np. dioksan, eter dietylowy). Dzięki wykorzystaniu czteroskładnikowych pomp gradientowych można łatwo tworzyć kilkuskładnikowe mieszaniny ekstrakcyjne, chociaż najczęściej są to ekstrahenty dwuskładnikowe.

Na ogół, procedura PLE realizowana jest w warunkach statycznych tzn. takich, w których ekstrakcja przebiega do pewnej objętości nieprzemieszczającego się rozpuszczalnika, przy czym ilość wykorzystanego rozpuszczalnika zależy od pojemności naczynia ekstrakcyjnego oraz stopnia i gęstości upakowania naczynia próbką. Ekstrakcję statyczną na danej porcji próbki można prowadzić stosując pojedynczy cykl ekstrakcyjny lub też kilka cykli powtarzanych po sobie. W tym ostatnim przypadku, każdy cykl ekstrakcyjny przebiega z wykorzystaniem świeżej porcji rozpuszczalnika. Do statycznych warunków ekstrakcji odnosi się przedstawiony wyżej trzyetapowy schemat procedury PLE, który jest charakterystyczny dla aparatów firmy Dionex. Alternatywnie, proces ten można zrealizować przy stałym i określonym przepływie rozpuszczalnika przez naczynie ekstrakcyjne a więc w warunkach dynamicznych, wykorzystując w tym celu laboratoryjnie skonstruowany układ.

#### 4c.4 Zastosowanie PLE w analizie drugorzędowych metabolitów roślinnych

Termin *drugorzędowe metabolity* (lub *metabolity wtórne*) określa te spośród licznie reprezentowanych substancji występujących u roślin, którym nie można przypisać podstawowych funkcji fizjologicznych związanych ze wzrostem i rozwojem rośliny. Z uwagi na ich niezwykłą czułość na zmianę warunków środowiska, związki te są określane mianem substancji sygnałowych, uczestniczących m.in. w reakcji obronnej rośliny. Synteza drugorzędowych metabolitów może bowiem być zainicjowana np. obecnością owadów (są to tzw. czynniki biotyczne), jak i przez tzw. czynniki abiotyczne do których np. należy: promieniowanie UV, zanieczyszczenie środowiska czy uszkodzenie mechaniczne rośliny. Niektóre z nich, jako hormony, stanowią główne narzędzie regulacji i koordynacji wszystkich procesów fizjologicznych roślin. Szczególne zainteresowanie jednak wzbudza rola metabolitów wtórnych w organizmie człowieka. Wiele spośród nich działa bowiem stymulująco na układ odpornościowy człowieka, wykazuje działanie antyutleniające i jest aktywnych przeciwzapalnie, przeciwbakteryjnie, przeciwgrzybiczo oraz przeciwwirusowo [8]. Wśród nich są też takie związki, które wykazują aktywność przeciwnowotworową lub łagodzą efekty uboczne chemioterapii. Nie dość zatem, że metabolity wtórne są naturalnymi substancjami czynnymi leków już opracowanych, to również są przedmiotem wnikliwych badań poznawczych. W ich trakcie, nowe możliwości terapeutyczne określa się związkom znanym, szuka się nowych ich źródeł w dotąd pomijanych badaniach gatunkach roślin oraz poszukuje się nowych ich przedstawicieli. Z analitycznego punktu widzenia te ostatnie badania są o tyle trudne, iż zdecydowana większość substancji obecnych w roślinach na

wysokim poziomie stężeń jest już znana. Badania prowadzi się na coraz niższych poziomach stężeń drugorzędowych metabolitów. Dodatkowo, wiedza na temat zagrożeń dla zdrowia i życia współczesnego człowieka sprawia, że obszar zainteresowania metabolitami wtórnymi roślin wyszedł poza ramy przemysłu farmaceutycznego, radykalnie zwiększając liczbę ich analiz. Współcześnie wiele z nich jest bowiem celowo wprowadzanych do różnych grup produktów spożywczych i kosmetycznych, podnosząc odpowiednio ich wartości żywieniowe (nutraceutyki) i pielęgnacyjne (kosmeceutyki). Nie dziwi zatem, iż analiza drugorzędowych metabolitów w roślinach stanowi ważne zagadnienie, często przybierające formę wyzwania rzucanego różnym zespołom badaczy.

Analiza metabolitów wtórnych wymaga ich wcześniejszego wyizolowania, najczęściej dokonywanego metodą ekstrakcji. W badaniach farmakognostycznych popularną techniką ekstrakcji jest maceracja. Częściej jednak związki z roślin izoluje się przy wykorzystaniu innej klasycznej techniki ekstrakcji, którą jest ekstrakcja w aparacie Soxhleta. Ta technika, w przeciwieństwie do poprzedniej, realizowana jest w wyższej temperaturze i bazuje na ciągłym procesie ekstrakcji, w którym próbka ma stały kontakt ze świeżą porcją rozpuszczalnika. Generowany gradient stężenia analitu sprzyja zwiększeniu efektywności ekstrakcji. Próbka ma jednak kontakt z rozpuszczalnikiem w temperaturze niższej od jego punktu wrzenia a liczba cykli ekstrakcyjnych na jednostkę czasu jest ograniczona i dlatego, wyczerpująca ekstrakcja wymaga procesu trwającego od kilku do kilkunastu godzin. Ten fakt oraz to, że technika ta zużywa duże objętości organicznych rozpuszczalników, które wobec mikrolitrów poddawanych analizie chromatograficznej stają się drogimi i toksycznymi odpadami, nie przysparza jej zwolenników. Przeciwnie, zmusza do jej ograniczenia na rzecz upowszechnienia stosowania ekonomicznych technik bardziej przyjaznych środowisku.

Technikę przyspieszonej ekstrakcji cieczą, jak wspomniano, wprowadzono celem usprawnienia analizy zanieczyszczeń w próbkach środowiskowych. Stosunkowo szybko jednak rozpoczęto próby nad adaptowaniem jej w analizie innych typów próbek [9]. Praca H1 z roku 2003 jest jedną z pierwszych pokazujących możliwości tej wówczas nowej techniki w analizie drugorzędowych metabolitów roślinnych. W cytowanej pracy technikę PLE zastosowałam do ekstrakcji istotnych farmakologicznie przedstawicieli drugorzędowych metabolitów roślinnych z grupy związków polifenolowych - flawonoli tj. rutyny (3-rutynozyd kwercetyny) i izokwercytryny (3-glukozyd kwercetyny) z kwiatów, liści i owoców czarnego bzu (*Sambucus nigra* L.). Wykazałam w niej, że *dzięki większym możliwościom zmiany warunków procesu PLE otrzymuje się wyższe uzyski badanych związków*, w porównaniu do ilości ujawnianych na drodze maceracji, a *sam proces jest znacznie krótszy i tańszy*. Ponadto

stwierdziłam, że *optymalne warunki ekstrakcji PLE bardzo podobnych pod względem właściwości związków są nieznacznie różne* - co jest o tyle istotne, iż dotychczas w świetle metodologicznie skąpych możliwości klasycznych technik ekstrakcji zakładano te same warunki ekstrakcji różnych przedstawicieli tej samej grupy związków. Otrzymane wyniki ujawniły więc wartości poznawcze techniki PLE i zachęciły do wnikliwszego poznania możliwości w niej drzemiących.

W trakcie badań zaprezentowanych w pracy **H1** zauważyłam, że praca z materiałem roślinnym na aparacie ASE200 firmy Dionex jest jednak dosyć kłopotliwa. Ekstrakty roślinne, w porównaniu do ekstraktów próbek środowiskowych np. próbek gleby, charakteryzują się bowiem większą gęstością. Stąd nagminnie dochodziło do zatykania się wąskiej kapilary odprowadzającej ekstrakt z naczynia ekstrakcyjnego. Łatwa adaptacja układu ASE do potrzeb badania próbek materiału roślinnego, sprowadzająca się do wymiany kapilary na szerszą oraz opracowanie przydatnej w tym względzie procedury odpowiedniego pakowania naczynia ekstrakcyjnego, zaowocowały podjęciem szerszych badań nad zastosowaniem techniki PLE w analizie drugorzędowych metabolitów roślinnych. (Na marginesie warto podkreślić, iż w efekcie rozmów z polskim przedstawicielem firmy Dionex niedługo później również handlowo dostępne aparaty ASE wyposażone były w kapilary o większej średnicy a w instrukcjach obsługi tychże aparatów pojawił się dopisek o sposobie pakowania naczynia ekstrakcyjnego próbką – tzn. dyspergowania próbki w materiale obojętnym.)

#### 4c.4.1 PLE w analizie farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych roślin

Szacuje się, iż dotychczas poznano ponad 50 000 substancji o charakterze metabolitów wtórnych. Blisko 20 % z nich to związki fenolowe pogrupowane w co najmniej 10 klas substancji [10]. Wśród nich do najliczniej i najczęściej występujących w królestwie roślin należą flawonoidy i kwasy fenolowe. Związkom tym przypisuje się szereg prozdrowotnych właściwości, ale te cechy charakteryzują również inne grupy fenoli np. antocyjany, kumaryny, lignany czy antrachinony. Poza fenolami wśród drugorzędowych metabolitów, stanowiących przedmiot zainteresowania farmakognozji i fitochemii farmaceutycznej, są również np. saponiny, alkaloidy, garbniki oraz terpeny.

Liczba metabolitów wtórnych o udowodnionym działaniu farmakologicznym jest przytłaczająca jak na możliwości badawcze pojedynczej osoby. Niemniej współpraca podjęta m.in. z grupą Pani prof. dr hab. Moniki Waksmundzkiej-Hajnos z Uniwersytetu Medycznego



w Lublinie stworzyła mi możliwość przetestowania techniki PLE w analizie szeregu przedstawicieli większości głównych grup metabolitów wtórnych [H3, H4, H9, H11, H12].

W pracy H12 technikę PLE testowałam do izolacji wybranych przedstawicieli taksonoidów – substancji czynnych leków przeciwnowotworowych – z igieł cisu pospolitego (*Taxus baccata* L.) i stwierdziłam, że *uzysk PLE paklitakselu, 10-deacetylbakatinu III oraz cefalomanniny jest wyraźnie większy od wartości ujawnionej w aparacie Soxhlet'a*. Wprawdzie PLE okazała się techniką znacznie bardziej efektywną od Soxhlet'a, niemniej taksonoidy należą do związków trudnych do izolacji. W wyniku badań okazało się bowiem, że ich ilościowa ekstrakcja wymaga czterech cykli ekstrakcyjnych. Warto jednak podkreślić, iż czas czterech 15-minutowych cykli, mimo wszystko jest znacznie krótszy od 21-godzinnej procedury Soxhleta. Ponadto, w świetle termicznej nietrwałości taksonoidów [11, 12], *skrócenie czasu ich ekspozycji na działanie wysokiej temperatury sprzyja efektywniejszej ekstrakcji taksonoidów w warunkach PLE*. Aspekt zwiększenia efektywności ekstrakcji taksonoidów z cisu nabiera wyrazistości gdy uświadomimy sobie bardzo wolny czas dojrzewania tej rośliny. Godnym podkreślenia jest też fakt, iż *efektywność PLE izolacji taksonoidów przewyższa zdolności ekstrakcyjne innych wspomaganych rozpuszczalnikowych technik ekstrakcji* tj. ekstrakcji wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym (ang. *Microwave Assisted Solvent Extraction*, MASE) oraz ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami (ang. *Ultrasound Assisted Solvent Extraction*, UASE).

Podobnym wnioskiem zakończyły się też badania nad zastosowaniem PLE do izolacji furanokumaryn ekstrahowanych z owoców arcydzięgla litwor (*Archangelica officinalis* Hoffm.) [H4] oraz pasternaka zwyczajnego (*Pastinaca sativa* L.) [H3]. *Efektywność PLE ekstrakcji umbeliferonu, ksantotoksyny, izopimpinliny, bergaptenu, imperatoryny, pimpinliny, felopteryny oraz umbelipereniny jest wyższa od ekstrakcji w aparacie Soxhleta oraz MASE i UASE*.

Wyniki zaprezentowane w pracach H3, H4 i H12 pozwalają mi stwierdzić, iż *ciśnieniowa ekstrakcja cieczą jest szczególnie przydatna przy izolacji związków występujących na niewielkim poziomie stężeń, z matryc roślinnych charakteryzujących się bogactwem lipidowych substancji interferujących*. Słuszność tego wniosku potwierdziłam niezależnie, w później prowadzonych badaniach, na jeszcze innej grupie drugorzędowych metabolitów – flawonolignanach, ekstrahowanych z owoców ostropestu plamistego (*Silybium marianum* L.), w których frakcja lipidowa stanowi niemal 30 % ich masy [H15]. W tym przypadku również *efektywność PLE ekstrakcji sylichristyny, sylidianiny, sylibiny A,*

*sylibiny B, izosylibiny A i izosylibiny B przewyższa efektywność ich ekstrakcji w aparacie Soxhlet'a.*

Badania nad wpływem metody przygotowania próbki na uzysk wybranych związków fenolowych ekstrahowanych z kwiatu czarnego bzu (*Sambucus nigra* L.) oraz ziela rdestu ptasiego (*Polygonum aviculare* L.) pozwoliły mi stwierdzić, iż *pomimo uznania PLE za efektywną technikę izolacji związków, jej wydajność zależy od właściwości fizykochemicznych analitów oraz rodzaju matrycy roślinnej* [H9, H11]. W przypadku bowiem ekstrakcji wybranych przedstawicieli pochodnych kwasu benzoowego (kwas protokatechowy, gallusowy, p-hydroksybenzoowy, wanilinowy, syringowy) oraz kwasu cynamonowego (kwas kawowy i ferulowy) [H9] uzysk PLE był ogólnie niski, choć zróżnicowany dla poszczególnych fenolokwasów i materiałów roślinnych poddawanych ekstrakcji. Porównawcze techniki ekstrakcji (w aparacie Soxhleta'a oraz MASE i UASE) ujawniły ogólnie wyższe ilości badanych związków. Szczególnie niskie uzyski PLE otrzymano dla kwasu chlorogenowego, tj. estrowej pochodnej dwóch fenolokwasów – kawowego i chinowego, ekstrahowanego z kwiatu czarnego bzu. Dla tej matrycy techniką nieco bardziej wydajną okazała się klasyczna ekstrakcja w aparacie Soxhlet'a. Jednak w przypadku ziela (liści i łodyg) rdestu ptasiego efektywniejsze okazały się wspomagane techniki ekstrakcji. Fakt ten powiązano ze specyficzną strukturą tej matrycy. Łodyga, w przeciwieństwie do liści i kwiatów, zawiera bowiem więcej mechanicznie odpornych tkanek (kolenchyma, sklerenchyma) o małych przestrzeniach międzykomórkowych. Do uwolnienia związków ze zwartych i twardych tkanek, najwyraźniej konieczne są bardziej drastyczne warunki ekstrakcji, charakterystyczne dla technik wspomaganych. Ponadto nie należy zapominać, iż związki fenolowe mogą wchodzić w stosunkowo silne oddziaływania z ligninami, komponentami ścian komórkowych łodyg i liści. Tak więc również i w tym przypadku bardziej drastyczne warunki ekstrakcji mogą sprzyjać efektywniejszej izolacji fenolokwasów z ziela rdestu ptasiego.

Do podobnych wniosków prowadzą wyniki badań nad efektywnością PLE w kontekście zastosowania jej do izolacji innych przedstawicieli związków polifenolowych z tych samych matryc, tj. kwiatów czarnego bzu oraz ziela rdestu ptasiego zaprezentowane w pracy H11. Porównując uzysk PLE rutyny i izokwecetyny z ilościami tych związków otrzymanymi na drodze ekstrakcji w aparacie Soxhlet'a oraz MASE i UASE stwierdzono, iż ekstrakcja w aparacie Soxhlet'a jest optymalna dla kwiatu a PLE dla ziela rdestu ptasiego. Wyniki zaprezentowane w cytowanej pracy potwierdzają słuszność wniosku na temat wpływu matrycy roślinnej na efektywność procesu ciśnieniowej ekstrakcji cieczą. Niemniej, w tym

„zachwycie” nad aplikacyjnością techniki PLE do izolowania różnych grup metabolitów wtórnych z roślin, zmuszają do zrewidowania wyciąganych na jej temat wniosków. Dlaczego bowiem w przypadku fenolokwasów, a szczególnie w przypadku ich depsydogowego przedstawiciela (kwasu chlorogenowego), PLE raptem ujawnia najniższe ich ilości? Pytanie to jest o tyle zasadne, iż jeszcze większe kłopoty z interpretacją wyników PLE napotkałam przy zastosowaniu tej techniki do ekstrakcji antrachinonów ze szczawiu (*Rumex L.*) [B7].

Dążenie do wyjaśnienia przyczyn dziwnego, bo niepodyktowanego właściwościami fizykochemicznymi antrachinonów, ich zachowania w warunkach PLE stało się podwaliną rozpoczęcia kolejnych - już w pełni samodzielnych - badań, które z jednej strony zostały zwieńczone wyjaśnieniem tego problemu - unaoczniającym nowe oblicze PLE, jej wady (wyniki szczegółowo przedyskutowane w H17 i przedstawione w rozdziale 4c.5.3 tego dokumentu). Z drugiej, zwróciły moją uwagę na jak dotąd często pomijany w literaturze problem przekształceń złożonych związków organicznych w warunkach ekstrakcji próbek naturalnych. Ten aspekt ekstrakcji drugorzędowych metabolitów z roślin jest niezwykle istotny w kontekście zagwarantowania dokładnych wyników analiz składu chemicznego roślin. Wiedza na temat czynników odpowiedzialnych za przekształcenia związków na etapie ekstrakcji może zatem być pomocna w wyeliminowaniu błędnych wyników analiz. Zagadnienia te stały się kanwą badań nad wpływem zawartości wody w mieszaninie ekstrakcyjnej na efektywność ciśnieniowej ekstrakcji cieczą 4'-glukozydu kwercetyny z różnych gatunków cebul. Ich rezultaty opracowałam w formie publikacji (praca znajduje się w redakcji jednego z czasopism analitycznych). W toku dyskusji prowadzonych na forum Zakładu o konieczności badania stabilności drugorzędowych metabolitów nutkę dociekliwości naukowej udało mi się również wzbudzić u kolegów. Efektem wspólnych badań nad transformacją kwasu chlorogenowego w warunkach PLE jest wyjaśnienie przyczyn małych, w porównaniu do innych technik ekstrakcji, ilości tego związku ujawnianych w roślinach techniką PLE (wyniki zredagowałam w formie publikacji przesłanej do redakcji jednego z czasopism analitycznych).

#### 4c.4.2 PLE w badaniach antyutlenialności drugorzędowych metabolitów roślinnych

Jak wiadomo, tlen działa na żywe organizmy dwojako. Z jednej strony warunkuje życie na Ziemi, a z drugiej może działać toksycznie. Negatywny wpływ tlenu jest efektem jego zdolności do tworzenia reaktywnych form, zaliczanych do wolnych rodników. Ich nadmiar jest wskazywany za przyczynę wielu niekorzystnych procesów, począwszy od chorób, przez

przedwczesne starzenie się organizmu, na psuciu żywności kończąc. W walce z wolnymi rodnikami i skutkami ich niekorzystnej działalności wykorzystuje się antyutleniacze. Działanie antyutleniaczy w dużej mierze opiera się na neutralizacji wolnych rodników oraz na zapobieganiu ich powstawania. Wśród substancji wykazujących działanie antyutleniające wyróżnia się substancje naturalne i syntetyczne. Ze względu na liczne przesłanki literaturowe, które dotyczą toksycznego, wręcz mutagennego działania syntetycznych antyutleniaczy oraz fakt, iż antyutleniacze (konserwanty) są obecne w każdym z produktów, coraz większą uwagę zwraca się na antyutleniacze pochodzenia roślinnego. W badaniach ocenia się właściwości antyutleniające tak pojedynczych metabolitów wtórnych jak i ich mieszanin, określając aktywność antyutleniającą ekstraktów roślinnych.

W nurcie testowania przydatności techniki ciśnieniowej ekstrakcji cieczą do izolowania farmakologicznie czynnych metabolitów wtórnych roślin postanowiłam sprawdzić, czy większa sprawność ekstrakcyjna procesu PLE nie wpływa na zwiększenie właściwości antyoksydacyjnych otrzymywanych ekstraktów. Związki polifenolowe a szczególnie flawonoidy znane są bowiem z tego, iż uczestniczą w procesach utleniania-redukcji zachodzących wewnątrz jak i na zewnątrz komórki.

Celem badań zaprezentowanych w **H8** była ocena właściwości antyutleniających alkoholowych ekstraktów *S. nigra* L. w kontekście ilości obecnych w ekstraktach charakterystycznych dla tej rośliny przedstawicieli drugorzędowych metabolitów, tj. flawonoli (rutyny, izokwercytryny, astragaliny) oraz antocyjanów (3-glukozydu cyjanidyny i 3-sambubiozydu cyjanidyny). Na tle otrzymanych wyników mogę stwierdzić, że *ciśnieniowe warunki ekstrakcji sprzyjają otrzymaniu ekstraktów o większych właściwościach antyutleniających* - analogiczny wniosek wysnuli inni badacze tego problemu [13, 14].

Właściwości antyoksydacyjne otrzymanych ekstraktów zależą od temperatury ekstrakcji i składu ekstraktu. Niemniej, w toku prowadzonych badań dostrzegłam problem z bezpośrednim powiązaniem zmiany właściwości antyutleniających ekstraktów ze stężeniem głównych flawonoidowych składników badanej rośliny. Bowiem o ile wzrost temperatury ekstrakcji prowadził do otrzymania ekstraktów o większych właściwościach antyutleniających, to w tym samym czasie ilość głównych flawonoidowych składników malała. Ten brak korelacji właściwości antyutleniających ekstraktów z ilością głównych ich składników oraz chęć wyjaśnienia tego fenomenu - podsycana dodatkowo szybko dającym się odczuć sporym zainteresowaniem ze strony innych badaczy tego problemu - stały się zarzewiem nowej tematyki badawczej Zakładu.

W efekcie nieszablonowego podejścia do badania właściwości antyutleniających udało się wykazać, iż ocena właściwości antyutleniających zależy od szeregu różnych czynników m.in.: rodzaju rozpuszczalnika próbki (ekstrahenta), pH, zawartości wody w próbce, stężenia jonów metalu czy rodzaju metalu. To właśnie te czynniki odpowiadają za brak korelacji właściwości antyutleniających ekstraktów z ilością głównych polifenolowych ich składników. Badania te zainicjowane pracą **H8** i kontynuowane w pracy [B10] rozrosły się do dwóch rozpraw doktorskich, z których jedna już doczekała się pozytywnego finału obrony. Warto podkreślić, iż praca **H8** była i nadal jest dostrzegana przez innych badaczy antyutlenialności związków (44 cytowania tego artykułu).

#### 4c.4.3 PLE w analizie olejków eterycznych

Olejki eteryczne (OE) stanowią mieszaninę drugorzędowych metabolitów i choć ich udział w składzie chemicznym danej rośliny jest niewielki, to są poszukiwanym i cennym dla wielu gałęzi przemysłu surowcem naturalnym. Od wieków stosowanie OE wiązało się z wykorzystaniem ich leczniczych właściwości. Współczesne badania udowodniły, iż związki te również działają antyutleniająco, a wprowadzenie ich do składu wielu niekiedy odległych grup produktów pozwala ograniczyć lub wyeliminować użycie sztucznych konserwantów. Z racji zdolności OE do oddziaływania z receptorami owadów są one stosowane w repelentach, jako substancje odstraszające owady lub maskujące zapach potu i krwi człowieka. Z tego samego powodu są one wykorzystywane jako bezpieczne dla środowiska pestycydy. Stosuje się je też jako naturalne czynniki wzrostu roślin. Nie należy również zapominać o tych z nich, które jak kolory na paletce barw malarza w rękach zdolnego kucharza zamieniają przeciętne potrawy w arcydzieła sztuki kulinarnej.

Niemniej jednak to kontrast właściwości fizykochemicznych olejków eterycznych na tle właściwości wcześniej wspomnianych grup związków, objawiający się również w temacie przygotowania próbki do analizy, narzuca konieczność odrębnego omówienia efektywności PLE w analizie tej grupy drugorzędowych metabolitów.

Olejki eteryczne to bardzo zróżnicowana pod względem składu i właściwości fizykochemicznych mieszanina związków aromatycznych. Ogólnie w mieszaninie tej można wyróżnić dużą, bo 90 - 95 % lotną frakcję olejkową - opartą głównie na monoterpenach i węglowodorach seskwiterpenowych oraz ich utlenionych pochodnych (aldehidach, alkoholach, ketonach, laktonach, tlenkach, eterach, estrach) - oraz mniej liczną frakcję nielotną, zawierającą m.in.: kwasy tłuszczowe, sterole, karotenoidy czy flawonoidy [15].

Zróznicowane są też ilości poszczególnych komponentów danego olejku eterycznego. Obok pojedynczych związków stanowiących niekiedy nawet 80 % całkowitej ilości olejku występuje liczna rzesza takich składników, których zawartość jest niewielka. Bardzo często to właśnie te nielicznie reprezentowane związki stanowią o charakterystycznym zapachu danej rośliny [16]. W analizie składu OE nie bez znaczenia jest też fakt, iż te charakterystyczne i mniej reprezentacyjne składniki to związki nienasycone podatne na przekształcenia prowadzące do zmiany składu lotnej frakcji olejkowej badanej rośliny. Stąd wyzwaniem dla analityka jest takie przygotowanie próbki rośliny, które nie zmieni charakterystycznego dla niej składu olejku eterycznego.

Klasyczną i rekomendowaną przez farmakopeę techniką otrzymywania lotnej frakcji olejkowej z roślin, zarówno w kontekście preparatyki jak i analityki, jest destylacja z parą wodną i/lub hydrodestylacja [17]. Metody te są jednak czasochłonne i dlatego bardzo ograniczone są możliwości ich stosowania w badaniach składu olejkowego większej liczby roślin. Ponadto w trakcie tych procesów związki olejkowe mogą podlegać różnym przekształceniom chemicznym prowadzącym do wzbogaceniu składu OE w związki obce dla danej rośliny (np. chamazulen w olejku rumiankowym) lub też skład OE może ulegać zubożeniu w efekcie degradacji poszczególnych składników olejku [18]. Innym podejściem do analizy składu olejków eterycznych charakteryzują się współczesne techniki bezrozpuszczalnikowej ekstrakcji: technika mikroekstrakcji na ciele stałym (ang. *Solid Phase MicroExtraction*, SPME) oraz technika ekstrakcji nadkrytycznej (ang. *Supercritical Fluid Extraction*, SFE) [19 - 26]. Niemniej, również i one nie są pozbawione wad. W technice SPME, przykładowo, analiza związków występujących na niewielkim poziomie stężeń jest trudna. W przypadku związków o wysokich temperaturach wrzenia wymagane są długie czasy ustalania stanu równowagi. A ponadto, technika ta nie pozwala oszacować całkowitej ilości składników olejkowych danej rośliny, co jest podstawą typowania najbardziej olejkowych roślin. W technice SFE z kolei, z racji powszechnego stosowania tylko jednego typu ekstrahenta, nadkrytycznego dwutlenku węgla, jej zastosowanie jest ograniczone głównie do izolowania średnio- i niepolarnych związków lotnych [27]. W tym świetle techniką, która pozwala na optymalizację warunków ekstrakcji nie tylko średnio- i niepolarnych związków lotnych, ale też i polarnych ich przedstawicieli, ograniczając jednocześnie zużycie rozpuszczalników organicznych oraz skracając czas przygotowania próbki jest ciśnieniowa ekstrakcja cieczą.

Dlatego postanowiłam sprawdzić możliwość stosowania PLE w analizie składu olejków eterycznych roślin, odnosząc wyniki otrzymane tą techniką do wyników uzyskanych przy

wykorzystaniu innych technik izolowania OE. Eksperymenty te stanowią pierwszy blok tematyczny badań nad zastosowaniem PLE w analizie składu olejkowego roślin.

Warto w tym miejscu zauważyć, że technika PLE pozwala użyć w procesie ekstrakcji przegrzaną wodę - a więc wyeliminować wykorzystanie rozpuszczalników organicznych. Dlatego postanowiłam również sprawdzić, czy w warunkach PLE wydajność dynamicznej ekstrakcji wodą olejków dorównuje efektywności ich ekstrakcji rozpuszczalnikiem organicznym. Eksperymenty te, to drugi blok tematyczny badań nad zastosowaniem PLE w analizie składu olejkowego roślin. Do badań wytypowałam ziele tymianku (*Thymus vulgaris* L.), gdyż należy on do grupy roślin szczególnie często poddawanych analizie na zawartość olejku eterycznego.

#### *Efektywność PLE na tle innych technik izolowania składników olejkowych z roślin*

Praca **H10** szczegółowo dyskutuje rezultaty pierwszego bloku badań. W cytowanej pracy skład jakościowy i ilościowy ekstraktów otrzymanych techniką PLE porównywałam z analogicznymi danymi, uzyskanymi przy wykorzystaniu klasycznej destylacji z parą wodną oraz współczesnymi technikami bezroztupuszczalnikowej ekstrakcji: SPME i SFE. Dodatkowo pod uwagę wzięłam wyniki otrzymane na drodze ekstrakcji prowadzonej w aparacie Soxhlet'a przy wykorzystaniu *n*-heksanu tj. rozpuszczalnika, który najczęściej jest stosowany do izolowania olejków z roślin w rozpuszczalnikowych technikach ekstrakcji.

W świetle przeprowadzonych eksperymentów mogę stwierdzić, iż spośród technik badanych skład jakościowy ekstraktów PLE jest najbliższy składowi olejków eterycznych otrzymanych na drodze destylacji z parą wodną. Dlatego *technika PLE jest najlepszą alternatywą do klasycznej metody destylacji olejków*. Ponadto, *w warunkach PLE to octan etylu ekstrahuje największą ilość składników olejkowych* (efektywność ekstrakcji *n*-heksanem jest nieco gorsza).

Porównanie rezultatów poszukiwania takich warunków PLE (temperatury, ciśnienia i czasu), w których dla danego rozpuszczalnika (*n*-heksanu i/lub octanu etylu) uzysk olejkowych składników tymianku będzie największy, skłania do jeszcze jednego interesującego wniosku. Otóż *niezależnie od typu zastosowanego ekstrahenta, optymalny uzysk PLE składników olejkowych obserwuje się w bardzo podobnych warunkach ekstrakcji a warunki te są analogiczne do tych wskazanych przez firmę Dionex jako standardowe warunki ekstrakcji (ang. default conditions). Fakt ten znosi konieczność optymalizowania warunków PLE, co znacznie skraca czas niezbędny na przygotowanie próbki do analizy i stanowi dodatkową korzyść stosowania tej techniki w analizie składu lotnych związków roślin.*

*Dynamiczna ekstrakcja wodą olejkowych składników tymianku w warunkach PLE*

Praca **H13** dyskutuje wyniki otrzymane w warunkach PLE przy zastosowaniu przegrzanej wody jako bezpiecznego dla środowiska ekstrahenta, zaliczanego do grupy odczynników GRAS (ang. *Generally Recognized as Safe*). [Jak wspominałam, kiedy proces PLE przebiega z wykorzystaniem wody, wówczas technika ta przybiera m.in. nazwę *Superheated Water Extraction* (SWE) i dlatego ta właśnie nazwa pojawiła się w tytule cytowanej pracy.] W eksperymentach wykorzystano statyczne jak i dynamiczne warunki procesu, przy czym o ile ekstrakcję statyczną realizowano na aparacie ASE200, to do ekstrakcji dynamicznej wykorzystano układ skonstruowany samodzielnie na potrzeby tych eksperymentów. W cytowanej pracy wyniki otrzymane przy wykorzystaniu wody zestawiono także z tymi uzyskanymi przy pomocy destylacji jak i ekstrakcji PLE, prowadzonej przy wykorzystaniu *n*-heksanu jako rozpuszczalnika ekstrakcyjnego.

Wyniki przedstawione w pracy **H13** dowodzą, że *uzysk składników olejkowych tymianku otrzymany w dynamicznym procesie ekstrakcji przegrzaną wodą dorównuje ilości otrzymywanej przy wykorzystaniu n-heksanu* jako ekstrahenta w procesie PLE. Zatem *zastosowanie techniki PLE z wodą jako medium ekstrakcyjnym pozwala na całkowite wyeliminowanie użycia organicznych rozpuszczalników w procesie izolacji lotnych związków roślin*. Ponadto, dzięki porównaniu efektywności ekstrakcji dwóch układów – handlowo dostępnego (ASE200) i laboratoryjnego – okazało się, że etap *purge* procedury PLE realizowanej na ASE200 prowadzi do straty składników lotnych. (Zagadnienie wpływu etapu *purge* na zmianę składu różnych olejków eterycznych jest szczegółowo dyskutowane w pracy **H16** i omówione w rozdziale 4c.5.4 tego opracowania.)

## 4c.4.4 PLE w badaniach udziału metabolitów wtórnych w odpowiedzi rośliny na stres

Jak wspomniano w rozdziale 4c.4, drugorzędowe metabolity należą do związków sygnałowych i są syntezowane w reakcji obronnej rośliny np. na niekorzystne zmiany środowiska naturalnego (na tzw. stres środowiskowy). Efektem stresowania roślin są zmiany ich stanu fizjologicznego, które początkowo dostrzegalne są np. jako rdzawe wybarwienia fragmentów liścia, a finalnie prowadzą do wyraźnego spadku plonów. Dlatego w laboratoriach prowadzi się badania: nad wytypowaniem tych spośród drugorzędowych metabolitów, które uczestniczą w odpowiedzi rośliny na stres; nad poznaniem przebiegu



procesów, w trakcie których dochodzi do niekorzystnych zmian fizjologicznych oraz nad wytypowaniem bezpośrednich inicjatorów tychże zmian.

Dzięki opracowaniu procedury PLE właściwej do oznaczania małych stężeń drugorzędowych metabolitów w pierwszych liściach młodej i starej rośliny tuż po jej zerwaniu, możliwym było m.in. wykazanie, iż fasola wielokwiatowa (*Phaseolus coccineus* L.) poza izoflawonoidami, które najczęściej pojawiają się w literaturze zajmującej się badaniami zmian stanu fizjologicznego roślin pod wpływem stresu metali ciężkich, zawiera również flawonole: ramnozydowe i glukuronidowe pochodne kwercetyny oraz kaemferolu. Istotniejsze jest jednak to, że dzięki oznaczeniu ilości tych związków w roślinach kontrolnych (w których ich stężenie jest dużo niższe niż w roślinach stresowanych) *udało się po raz pierwszy wykazać, że zmiana stężenia ramnozydowych i glukuronidowych pochodnych kwercetyny i kaemferolu jest symptomem antyoksydacyjnej obrony rośliny przed stresem metali ( $Cd^{2+}$  i  $Cu^{2+}$ )*. Proces ten jest wyraźniejszy w młodych liściach, w których stężenie flawonoli po podaniu czynnika stresującego zwiększa się od 200 do 490 % ilości stwierdzonej w roślinach kontrolnych, zależnie od rodzaju metalu, jego stężenia jak i rodzaju flawonolu [H2].

Tematyka badawcza zainicjowana w pracy H2 postawiła przede mną jeszcze większe wyzwanie niż tylko przygotowanie próbki materiału roślinnego do analizy zawartości flawonoidów. Dużym wyzwaniem analitycznym było bowiem opracowanie takiej procedury PLE, która pozwoliłaby zweryfikować hipotezę o indukcji syntezy kwasu jasmonowego (JA) w efekcie stresu rośliny metalami ciężkimi (wyniki szczegółowo omówione w pracy H7). Analiza kwasu jasmonowego jest przykładem analizy o wielu obliczach trudności. Nie dość, że kwas jasmonowy jako fitohormon jest obecny w roślinie na bardzo niskim poziomie stężeń, to jego ilość jest zmienna w zależności od typu rośliny, jej części a nawet rodzaju liści w obrębie jednej rośliny. Ograniczenie materiału badawczego do pierwszych liści danej rośliny wymagało zatem opracowania niezwykle wydajnej metody ekstrakcji. Biorąc pod uwagę wyjątkową zmienność roślin, nawet tych hodowanych hydroponicznie na niewielkiej powierzchni kuwety, opracowywana procedura winna być bardzo precyzyjna. JA należy do głównych składników sygnalizujących zmiany w komórce roślinnej. Jest on zatem bardzo czuły na wszelkie bodźce biotyczne i abiotyczne np. wywołane zmianą ciśnienia osmotycznego czy zranieniem. W efekcie, konieczna była dokładna analiza materiału nie poddanego wstępnie suszeniu i rozdrabnianiu. Ostatecznie biorąc pod uwagę, iż zainicjowanie odpowiedzi rośliny na stres jest krótkotrwałe a cykl metaboliczny komórki przebiega nawet po jej zerwaniu, należało stworzyć takie warunki, które umożliwią szybką analizę.

*Dzięki opracowaniu właściwej metodyki PLE po raz pierwszy wykazano, że:*

- 1) stres metali ciężkich indukuje syntezę kwasu jasmonowego w dojrzałych liściach rzodkiewnika pospolitego [Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.] - roślinie modelowej dla botaników oraz w młodych i starszych liściach fasoli wielokwiatowej;*
- 2) w reakcji obronnej głównie uczestniczy izomer trans (3R,7R) jasmonianu metylu;*
- 3) indukcja ma charakter dynamiczny i dwuetapowy.*

Warto podkreślić, iż jakość wyników zaprezentowanych w cytowanej pracy szybko została dostrzeżona przez świat nauki - o czym, co prawda nieskromnie ale w sposób niepozostawiający wątpliwości, świadczy liczba cytowań tego artykułu ( $Lb_{\text{cyt}} = 51$ ).

#### 4c.4.5 PLE a dokładność analizy metabolitów wtórnych

Jak wcześniej wspominałam, analiza związków w materiale roślinnym jest zagadnieniem złożonym i trudnym. Jakość wyniku analizy zależy tak od etapu przygotowania próbki, jak i od ostatecznego etapu jej analizy. Niemniej jednak, w przypadku oznaczania zawartości związków w próbkach naturalnych, rzetelny wynik analizy głównie zależy od etapu przygotowania próbki a dokładniej od efektywności izolacji danego związku z matrycy roślinnej.

Efektywność ekstrakcji zależy od szeregu zmiennych czynników. Do najważniejszych z nich należy: lokalizacja metabolitów w roślinie (charakterystyczna dla tego miejsca budowa tkanki); fakt występowania metabolitów w kilku formach (np. glikozydowej, aglikonowej, estrowej); rodzaj oddziaływania metabolitu z innymi związkami obecnymi w komórce/tkance oraz rodzaj i ilość substancji interferujących. Nie należy zapominać, iż na efektywność ekstrakcji wpływa rodzaj ekstrahenta oraz warunki procesu ekstrakcji. Oczywiście stosuje się takie rozpuszczalniki i warunki ekstrakcji, które zapewniają jak największe uzyski badanych metabolitów. (Warunki, w których otrzymuje się największe ilości związków często są określane terminem optymalnych warunków ekstrakcji.)

Wobec tak wielu uwarunkowań efektywności ekstrakcji nikogo nie dziwi, że dla powiązania zawartości metabolitów w ekstrakcie z ich rzeczywistą ilością w materiale poddawany analizie, koniecznym jest zbadanie odzysku stosowanej metody ekstrakcyjnej. W tym celu do rozdrobnionej próbki dodaje się znaną ilość substancji obcej dla badanego materiału o właściwościach fizykochemicznych podobnych do substancji oznaczanej, tzw. standard wewnętrzny. Jednakże, biorąc pod uwagę komórkową architekturę tkanki roślinnej i różną siłę z jaką metabolity są przytrzymywane w obrębie tkanki, nigdy efektywność odzyskania

substancji sztucznie wprowadzonej nie odda w pełni sprawności izolacji naturalnego metabolitu. Dlatego częściej porównuje się wartości uzysków otrzymanych przy wykorzystaniu dwóch różnych technik ekstrakcyjnych.

W badaniach ukierunkowanych na stosowanie nowych technik przygotowania próbek do analizy, wynik otrzymany testowaną metodą - w warunkach dla niej optymalnych - porównuje się z tym otrzymanym przy wykorzystaniu jednej z klasycznych i/lub zalecanych technik izolacji. W tej metodzie za rzetelny wynik analizy bardzo często przyjmuje się wynik wyższy. Jest to podejście dość powszechnie stosowane, ale nie do końca słuszne - o czym świadczą niespójne wyniki badań nad zastosowaniem PLE do analizy ilościowej rutyny i izokwercytryny w kwiecie czarnego bzu, otrzymane na przestrzeni lat. Bowiem o ile w świetle wyników zaprezentowanych w pracy **H1** wyższy uzysk PLE, względem ilości określonej na drodze maceracji, przyjął za dokładną miarę zawartości rutyny i izokwercytryny w kwiecie czarnego bzu, to w świetle danych przedstawionych w pracy **H11** wynik ten był nieprawdziwy – bo mniejszy, względem ilości otrzymanej w aparacie Soxhlet’a. Zestawienie tych faktów pokazuje ewidentną wadę tego podejścia do oceny rzeczywistej zawartości związku w próbce naturalnej, która zmusiła mnie do szukania innych metod określania rzeczywistej zawartości związku w próbce naturalnej. [Na marginesie, inną wadę tego podejścia pokazują wyniki przedstawione w pracy **H17** i przybliżone w rozdziale 4c.5.3 tego opracowania. W ich świetle, przyczyną wyższych uzysków może być transformacja innych związków (np. form glikozydowych polifenoli) do związku analizowanego (np. aglikonu).]

W innym podejściu do weryfikowania efektywności ekstrakcji testowanej metody, ekstrakcję na tej samej porcji próbki powtarza się w cyklach ekstrakcyjnych tak długo, aż ilość wyekstrahowanych związków w kolejnej porcji ekstraktu określona metodą chromatograficzną osiągnie poziom LOD tej metody. Ponieważ ekstrakcja jest powtarzana przy wykorzystaniu nowej porcji rozpuszczalnika, ten sposób prowadzenia PLE jest nazywany ekstrakcją wielokrotną lub wyczerpującą. Każdy cykl ekstrakcyjny to kolejny stan równowagi a od ich liczby zależy efektywność ekstrakcji. W tym podejściu, eksperymenty nie muszą być prowadzone w warunkach optymalnych, co jest jego zaletą. Sposób ten przetestowałam w pracy **H6** i jak się okazało jest on dobry w przypadku delikatnych matryc roślinnych (kwiaty, liście), dla których wysokie ciśnienie panujące w naczyniu ekstrakcyjnym utrudnia dyfuzję analitów do rozpuszczalnika. W przypadku niektórych typów matryc, całkowity odzysk analitów może jednak wymagać nawet do kilkunastu cykli ekstrakcyjnych

tej samej próbki materiału [H5]. Wydłuża to procedurę analityczną i uzależnia czas jej trwania od czasu wielokrotnej ekstrakcji.

Mając powyższe doświadczenia, w pracy H6 zaproponowałam jeszcze inne podejście do oceny efektywności procesu ekstrakcji, bazujące na jednoetapowej (jednocyklicznej) ekstrakcji próbek o różnej masie. Podejście to jest o tyle nowatorskie, że do opisu wydajności ekstrakcji prowadzonej w układzie ciecz - ciało stałe wykorzystuje zależność znaną w układzie ciecz – ciecz. W jej myśl, odzysk substancji ( $E$ ) w jednym cyklu ekstrakcyjnym można wyrazić równaniem (1) [28]:

$$E = \frac{K_0 \cdot V}{1 + K_0 \cdot V} \quad (1)$$

gdzie  $K_0$  jest współczynnikiem podziału substancji pomiędzy dwie fazy ciekłe, a  $V = V_o/V_w$ .  $V_o$  i  $V_w$  to odpowiednio objętość fazy organicznej i wodnej.

Przekształcając powyższe równanie do postaci liniowej:

$$\frac{1}{E} = \frac{1}{K_0 \cdot V} + C \quad (2)$$

otrzymamy postać pozwalającą wyliczyć całkowitą ilość substancji obecnej w jednej z faz układu ekstrakcyjnego:

$$\frac{1}{E_{total}} = \lim_{\frac{V_w}{V_o} \rightarrow 0} \left( \frac{V_w}{K_0 \cdot V_o} + C \right) \quad (3)$$

Oszacowanie całkowitej ilości substancji obecnej w jednej z dwóch faz sprowadza się zatem do kilku pojedynczych procesów ekstrakcji, prowadzonych przy różnych stosunkach ( $V_w/V_o$ ) oraz ekstrapolacji liniowej zależności ( $1/E$ ) vs. ( $V_w/V_o$ ) do wartości  $V_w/V_o = 0$ .

Adaptując te założenia do oceny efektywności ekstrakcji metabolitów wtórnych z roślin, równanie ostatnie przyjmie postać następującą:

$$\frac{1}{E^*} = \frac{m_p}{K_0^* \cdot V_s} + C^* \quad (4)$$

gdzie  $m_p$  i  $V_s$  to masa materiału roślinnego i objętość ekstrahenta.

Zatem, jeśli przy kilku różnych stosunkach masy próbki roślinnej do objętości rozpuszczalnika, wykres zależności  $1/E^* = f(m_p/V_s)$  będzie linią prostą, to wynik jej ekstrapolacji do wartości  $m_p/V_s \rightarrow 0$  powinien być równy odwrotności wartości stanowiącej całkowitą ilość metabolitu w próbce ( $E_{total}^*$ ).

Teza ta została zweryfikowana na przykładzie ekstrakcji dwóch typów analitów: rutyny (izolowanej w kwiatów *S. nigra* L.) oraz kofeiny (izolowanej z zielonej i czarnej herbaty oraz z ziaren kawy). Otrzymane rezultaty są szczegółowo omówione w pracy **H6**. Wynika z nich, że *odwrotność ilości związku otrzymanej w jednocyklowej ekstrakcji PLE ( $E^*$ ) jest liniową funkcją stosunku masy rośliny do objętości użytego ekstrahenta ( $m_p/V_s$ ) i z zależności tej można wyliczyć rzeczywistą zawartość danego związku w roślinie.*

Z porównania wyników otrzymanych proponowaną metodą z ilością związków ujawnioną na drodze wielokrotnej ekstrakcji PLE można twierdzić, że zaproponowana metoda sprawdza się i może zastąpić czasochłonną ekstrakcję wielokrotną. W myśl proponowanego podejścia do zastosowania PLE jako szybkiej metody odniesienia, do wyznaczenia rzeczywistej zawartości składnika w roślinie wystarczą dwa punkty eksperymentalne, otrzymane przy dwóch stosunkach masy próbki do objętości rozpuszczalnika.

#### 4c.5 Problemy ciśnieniowej ekstrakcji cieczą

Jak wspominałam, technikę PLE wyróżnia stosowanie wysokich ciśnień oraz wysokich temperatur. Prowadzenie procesu pod zwiększonym ciśnieniem pozwala zachować stan ciekły medium ekstrakcyjnego mimo, iż została przekroczona temperatura wrzenia danego rozpuszczalnika pod ciśnieniem atmosferycznym. Wysokie ciśnienie zwiększa również powierzchnię kontaktu obu faz, wtłaczając ekstrahent w takie rejony stałej matrycy, które pod ciśnieniem normalnym nie są dla niego dostępne. Wyższa temperatura ekstrakcji ułatwia desorpcję analitu ze stałej matrycy oraz jego dyfuzję do rozpuszczalnika, a ponadto pozwala osiągnąć wyższe wartości współczynników podziału. W efekcie, w procesie PLE obserwuje się w jednostce czasu wzrost zdolności danego medium do rozpuszczania większej ilości analitu. Ponadto, dzięki stosowaniu mieszanych faz ekstrakcyjnych PLE umożliwia większą zmianę polarności ekstrahenta a przez to i większą kontrolę selektywności procesu ekstrakcji. To są fakty ogólnie znane na temat ciśnieniowej ekstrakcji cieczą. Rzadko jednak w literaturze (jeśli w ogóle) można spotkać informacje, że:

- wzrost temperatury procesu PLE przyczynia się do spadku selektywności ekstrakcji;
- wzrost ciśnienia w naczyniu ekstrakcyjnym może powodować spadek wydajności ekstrakcji;

- stosowanie kilkuskładnikowych ekstrahentów może prowadzić do rozpadu złożonych form związków, a ponadto że
- etap *purge* procedury PLE może prowadzić do zmiany ilości lotnych składników ekstraktu.

Poruszone wyżej zagadnienia stanowią mój wkład w poszerzenie wiedzy na temat stosowania ciśnieniowej ekstrakcji cieczą. Zagadnienia te, rozpracowane w kontekście chromatograficznej analizy składu drugorzędowym metabolitów roślinny, są omówione poniżej.

#### 4c.5.1 Podwyższona temperatura jako czynnik zmniejszający selektywność ekstrakcji

Jak podkreślano wielokrotnie, technika PLE dzięki zastosowaniu w układzie podwyższonego ciśnienia, umożliwia prowadzenie procesu w temperaturze wyższej od temperatury wrzenia danego rozpuszczalnika pod ciśnieniem atmosferycznym. Wyższa temperatura ekstrakcji z jednej strony ułatwia rozrywanie wiązań van der Waalsa, mostków wodorowych i oddziaływań dipolowych występujących pomiędzy analitem a stałą matrycą próbki, wpływając tym samym na zwiększenie dyfuzji analitu do ciekłego rozpuszczalnika [3]. Z drugiej zaś, dzięki obniżeniu lepkości oraz napięcia powierzchniowego ekstrahenta, polepsza zwilżalność próbki biologicznej przez dany rozpuszczalnik oraz zwiększa jego zdolność do rozpuszczania analitu. W efekcie obserwuje się wzrost szybkości przenoszenia masy analitu i skrócenie czasu jego ekstrakcji [3, 29]. To są fakty, które najczęściej badacze przywołują podkreślając efektywność techniki PLE.

Niewiele osób donosi, że ze wzrostem temperatury w warunkach PLE często obserwuje się odstępstwo od zasady *podobne rozpuszcza podobne*, w myśl której polarne rozpuszczalniki stosuje się do ekstrakcji polarnych związków a niepolarne do ekstrakcji niepolarnych. W konsekwencji odstępstwo to prowadzi do pogorszenia selektywności ekstrakcji. *Wyniki dyskutowane w pracach H1, H12 i H15 unaoczniają problem straty analitów w efekcie zmniejszenia selektywności procesu PLE pod wpływem wyższej temperatury ekstrakcji.*

W pracy **H1** przedstawiłam, że podczas ekstrakcji rutyny i izokwercytryny za pomocą 80 % roztworu metanolu w wodzie, ze wzrostem temperatury ekstrakcji obserwuje się spadek ilości ekstrahowanych związków. Im wyższa temperatura ekstrakcji, tym większa ilość kłaczkowatego osadu pojawia się w ekstrakcie po jego schłodzeniu do temperatury pokojowej. Dodać należy, że osad ten po wysuszeniu bardzo dobrze rozpuszcza się w

*n*-heksanie, dowodząc swojej fizykochemicznej natury. Tworzenie się ze wzrostem temperatury ekstrakcji coraz większej ilości osadu jest konsekwencją gorszej selektywności procesu PLE – polarny ekstrahent ze wzrostem temperatury zaczyna rozpuszczać niepolarne składniki matrycy. *W parze z coraz mniejszą selektywnością PLE obserwuje się spadek ilości oznaczanych związków w efekcie ich współstrącania z osadem.*

W pracy **H12** opisującej poszukiwania najefektywniejszej techniki izolacji taksoidów z cisu pospolitego wykazałam, że *wstępna ekstrakcja lipofilowych substancji balastowych w warunkach PLE prowadzi również do straty taksoidów.* Wyniki badań zaprezentowane w cytowanej pracy dowiodły, iż toluen, *n*-heksan i chloroform – rozpuszczalniki, które w klasycznych technikach ekstrakcji nie wykazują powinowactwa do taksoidów [30 - 33] - izolują je w warunkach PLE. Wstępna ekstrakcja substancji balastowych w PLE może zatem prowadzić do straty analitów, a w konsekwencji do błędnych wyników analizy zawartości taksoidów w materiale roślinnym.

Do podobnych wniosków prowadzą wyniki badań nad optymalizacją warunków ekstrakcji silymariny z owoców ostropestu plamistego (*Silybum marianum* L. Gaertner.), zaprezentowane w pracy **H15**. W tym przypadku również *wstępna ekstrakcja n-heksanem lipidowych substancji balastowych prowadzi do straty cennych dla zdrowia człowieka flawonolignanów.* Związków tych nie stwierdza się natomiast w *n*-heksanowym ekstrakcie otrzymanym w aparacie Soxhleta.

#### 4c.5.2 Podwyższone ciśnienie jako czynnik spowalniający kinetykę dyfuzji analitu z matrycy roślinnej na przykładzie ekstrakcji kofeiny z liści zielonej herbaty

Zastosowanie w układzie ekstrakcyjnym wyższego ciśnienia ma przede wszystkim zagwarantować ciekły stan rozpuszczalnika w wyższych temperaturach ekstrakcji. W praktyce, na ogół, nie dostrzega się wpływu ciśnienia na zwiększenie efektywności ekstrakcji [34, 35, **H1**]. Powszechnie stosuje się wartości ciśnień na poziomie 40 – 60 bar jako wystarczające do utrzymania rozpuszczalnika w stanie ciekłym, kiedy temperatura ekstrakcji przewyższa jego temperaturę wrzenia. Niemniej, wprowadzając rozpuszczalnik pod ciśnieniem można go wtłoczyć w takie rejony porowatej matrycy, które pod normalnym ciśnieniem nie mają z nim kontaktu np. na skutek obecności powietrza w porach stałej matrycy - rozwijając w ten sposób powierzchnię kontaktu obu faz. Po ten argument również często sięgają badacze, tłumacząc wyższą efektywność PLE względem konwencjonalnych technik ekstrakcji rozpuszczalnikiem [36, 37]. Nie ma jednak badań jednoznacznie

pokazujących, iż *w przypadku niektórych matryc roślinnych zwiększone ciśnienie procesu PLE prowadzi do zmniejszenia efektywności ekstrakcji związków z roślin.*

Testując możliwość zastosowania techniki PLE do izolacji kofeiny z rozdrobnionych liści zielonej herbaty oraz kawy zaobserwowałam, że o ile kofeina z kawy ekstrahuje się bardzo łatwo w pojedynczym cyklu ekstrakcyjnym dając wynik wyższy i/lub porównywalny do innych technik, to ten sam związek z liści herbaty ekstrahuje się znacznie trudniej. Mało tego, spośród zastosowanych w badaniach technik to PLE ujawnia najmniejszą ilość kofeiny w liściach herbaty. Rezultat ten kłóci się z popularną opinią na temat efektywności techniki ciśnieniowej ekstrakcji cieczą w izolowaniu związków z roślin. Ponadto, wobec łatwej ekstrakcji kofeiny z kawy sugeruje, że po procesie PLE wciąż pewna ilość tego analitu pozostaje w matrycy roślinnej.

Z danych szczegółowo przedyskutowanych w pracy **H5** wynika, że *wydajność procesu PLE kofeiny z liści zielonej herbaty zależy od wartości zastosowanego ciśnienia. Im wyższe ciśnienie, tym mniejszy uzysk kofeiny.* Fakt ten można połączyć z łatwo zauważalną przy parzeniu herbaty liściastej tendencją tej matrycy do pęcznienia. Najwyraźniej wyższe ciśnienie w naczyniu ekstrakcyjnym upakowanym pęczniejącą próbką, utrudnia dyfuzję kofeiny do rozpuszczalnika. Wyższe ciśnienie jest odpowiedzialne za zwolnienie kinetyki ekstrakcji, a w konsekwencji za mniejszy jej uzysk w pojedynczym cyklu ekstrakcyjnym. Oczywiście optymalizacja warunków PLE pozwala zwiększyć wydajność pojedynczego cyklu. Uzyskiwane wyniki analizy są jednak wciąż dalekie od rzeczywistej zawartości kofeiny w herbacie.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów dowodzą, że *wbrew obiegowanej opinii technika PLE nie zawsze jest tak efektywna. To podwyższone ciśnienie może być czynnikiem odpowiedzialnym za zmniejszenie efektywności ekstrakcji analitu z rośliny.*

#### 4c.5.3 Wpływ kilkuskładnikowych ekstrahentów

- Hydrolityczna niestabilność glikozydów hydroksyantrachinonowych [H17]

Ciśnieniowa ekstrakcja cieczą jest jedną z nielicznych technik ekstrakcji stałych próbek, w której celem zwiększenia selektywności procesu regułą jest stosowanie kilkuskładnikowych ekstrahentów. Co więcej, w PLE powszechnie stosuje się mieszaniny wodno-organiczne po to, by zmniejszyć zużycie rozpuszczalników organicznych. W badaniach polifenolowych metabolitów wtórnych roślin szczególnie często stosuje się mieszaniny wodno-metanolowe.



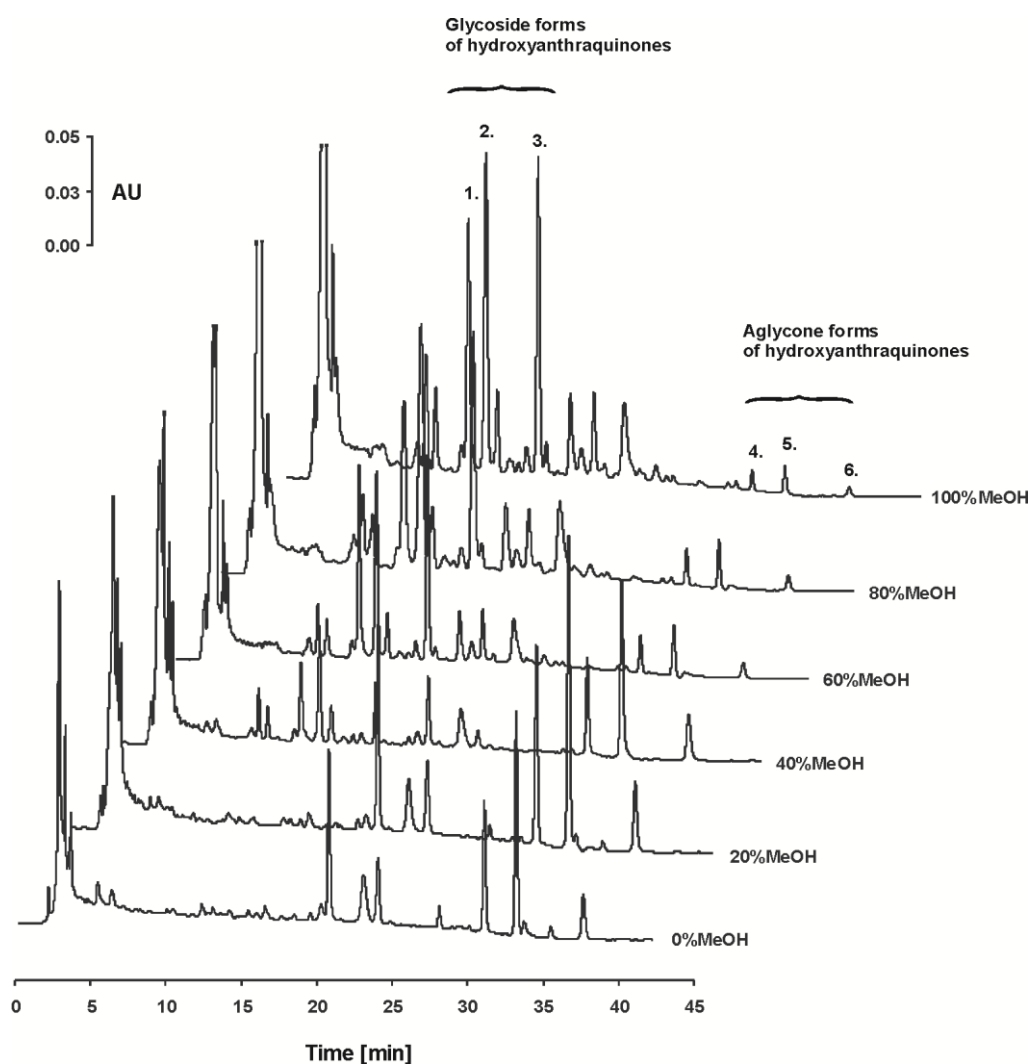
W literaturze tematu rzadko podnosi się kwestię stabilności hydrolitycznej form glikozydowych polifenoli, w warunkach ich ekstrakcji z materiału roślinnego. A przecież glikozydy mogą hydrolizować do odpowiednich form aglikonowych, zmieniając w ten sposób ich relacje ilościowe w ekstrakcie - względem tych charakterystycznych dla badanego materiału - w konsekwencji, prowadząc do błędnych wniosków na temat składu chemicznego danej rośliny. Problem rzetelnego oznaczenia zawartości glikozydów nabiera szczególnego znaczenia w przypadku analizy hydroksyantrachinonów w materiale roślinnym. Związki te w organizmie człowieka działają przeczyszczająco. Jako takie są więc często nadużywane a zważywszy, że glikozydy są łatwiej przez organizm przyswajalne, to właśnie głównie one są odpowiedzialne za szereg efektów ubocznych częstego stosowania pochodnych antrachinonowych. Wśród najczęściej wymienianych w literaturze efektów ubocznych są perforacje jelit i stomie jelitowe zakładane w znacznym procencie u młodych ludzi [38 - 40].

Hydroksyantrachinony są związkami charakterystycznymi dla wielu gatunków szczawiu (*Rumex*) i rabarbaru (*Rheum*) [41, 42]. W roślinach tych głównie występują jako glikozydy, szczególnie często jako monoglikozydy. Aglikony stanowią zaledwie kilka procent ich całkowitej ilości [43]. Odmienność właściwości fizykochemicznych glikozydów i aglikonów sprawia, że do ich ekstrakcji stosuje się różne składniki mieszanin ekstrakcyjnych [38, 39, 44 - 46]. Aglikony - mniej polarne od odpowiednich form glikozydowych - lepiej rozpuszczają się w metanolu i w roztworach wodnych, zawierających większe stężenie tego alkoholu. Do ekstrakcji glikozydów zaleca się, z kolei, mieszaniny wodno-metanolowe bogatsze w wodę. Optymalizując warunki PLE pod kątem izolacji glikozydowych pochodnych antrachinonów z korzenia szczawiu kędzierzawego (*Rumex crispus* L.) w układzie wodno-metanolowym zauważyłam jednak odwrotne zależności [H17]. Im bardziej polarną (na skutek większego udziału procentowego wody) mieszaninę ekstrakcyjną stosowałam w procesie PLE, tym większy był uzysk mniej polarnych przedstawicieli hydroksyantrachinonów tj. aglikonów. I na odwrót, bardziej polarne antrachinony – glikozydy lepiej ekstrahowały się mniej polarnymi mieszaninami ekstrakcyjnymi.

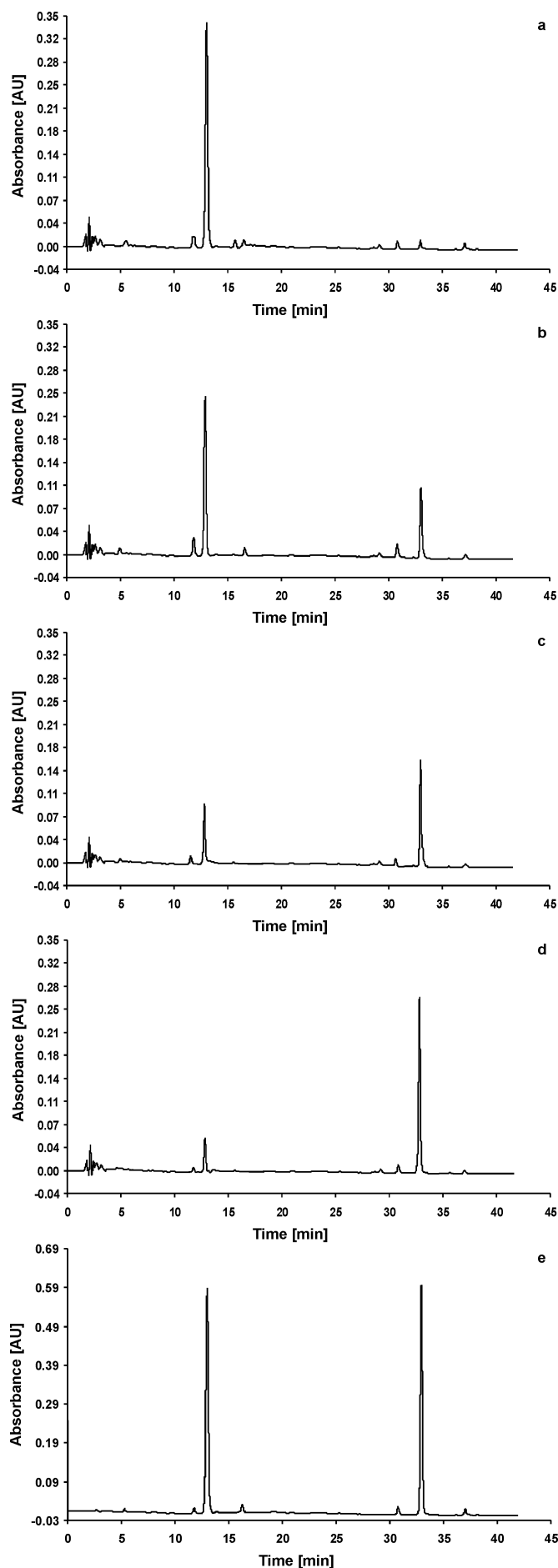
Zmianę relacji pomiędzy formami glikozydowymi i aglikonowymi hydroksyantrachinonów w ekstraktach korzenia szczawiu, otrzymanych przy różnym udziale wody w mieszaninie ekstrakcyjnej, najlepiej oddają chromatogramy przedstawione na Rys. 3.

Z ich porównania widać jak w monitorowanym zakresie rozdziału analitycznego zmienia się skład chemiczny ekstraktów. Im większy jest % wody w mieszaninie ekstrakcyjnej, tym mniejszy jest sygnał od form glikozydowych a większy sygnał od form aglikonowych. Przytaczając zalety PLE podkreśla się fakt, iż dzięki skróceniu czasu ekspozycji próbki na

działanie wyższej temperatury eliminuje się możliwość transformacji niestabilnych związków. Przeprowadzone badania wskazują jednak, iż *nawet podczas kilkuminutowej ekstrakcji PLE glikozydy hydroksyantrachinonów są niestabilne i hydrolizują do odpowiednich form aglikonowych, zwiększając stężenie tych ostatnich w ekstrakcie. Transformacja ta prowadzi do błędnych wniosków na temat zawartości glikozydów w roślinie.*



Rys. 3 Zmiana relacji pomiędzy formami glikozydowymi i aglikonowymi hydroksyantrachinonów na chromatogramach ekstraktów z korzenia szczawiu kędzierzawego (*Rumex crispus* L.) otrzymanych przy zastosowaniu różnych składów wodno-metanolowej mieszaniny ekstrakcyjnej (1. emodyna-8-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozyd, 2. chryzofanol-8-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozyd, 3. fiscjon-8-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozyd, 4. emodyna, 5. chryzofanol, 6. fiscjon)



- a Ich analiza potwierdza słusność wniosku, iż obecność wody w mieszaninie ekstrakcyjnej prowadzi do rozpadu hydrolitycznego glikozydowej formy antrachinonu, i że rozpad ten jest tym większy im większe jest stężenie wody w mieszaninie użytej do ekstrakcji.
- b Aby potwierdzić słusność hipotezy na temat hydrolitycznego rozpadu glikozydów w trakcie ich kilkuminutowej ekstrakcji w warunkach PLE, prowadziłam badania także w układach sztucznych, symulując proces PLE z wykorzystaniem standardu wybranego różniących się stężeniem metanolu. Chromatogramy tak otrzymanych ekstraktów prezentuje Rys. 4.
- c
- d
- e

Rys. 4 Chromatogramy otrzymane dla roztworu standardu (chryzofanol-8- $\beta$ -D-glukopiranozyd) w warunkach symulujących proces ekstrakcji tego glikozydu z naczynia ekstrakcyjnego przy zastosowaniu jako ekstrahenta: (A) metanolu; (B) 80 % r-u metanolu w wodzie; (C) 40 % r-u metanolu w wodzie; (D) 80 % r-u metanolu w buforze fosforanowym o pH = 3,05. Warunki PLE: temp. ekstrakcji 100 °C; czas 10 min; ciśnienie 40 bar. Rys. 4 E przedstawia chromatogram mieszaniny standardów: chryzofanol-8- $\beta$ -D-glukopiranozyd (1 pik) i chryzofanol (2 pik)

W świetle danych szczegółowo przedyskutowanych w pracy **H17** wynika, iż *zmiana temperatury procesu PLE i/lub czasu jego trwania modyfikuje kinetykę rozpadu hydrolitycznego badanych hydroksyantrachinonów*.

Najlepszym potwierdzeniem wpływu warunków PLE na kinetykę hydrolizy hydroksyantrachinonów jest tabelaryczne zestawienie wartości  $F$  i  $P$  otrzymanych w analizie wariancji. Dane te zebrano w Tab. 1. Warto przypomnieć, że wpływ testowanego czynnika jest tym istotniejszy statystycznie, im wyższa jest wartość  $F_{exp}$  ( $F_{exp} > F_{crit}$ ) a niższa jest wartość  $P$ .

Optymalizację warunków ciśnieniowej ekstrakcji cieczą metabolitów wtórnych z roślin zwykle rozpoczyna się od znalezienia takiego składu mieszaniny ekstrakcyjnej, który zagwarantuje największy uzysk badanych związków. W pracy **H17** udowodniłam, że ten tok postępowania może być jednak zawodny w badaniach składu chemicznego roślin, gdyż związki podczas ekstrakcji mogą przekształcać się do form pokrewnych. Szczególną wątpliwość wzbudza stosowanie jako ekstrahentów mieszanin wodno-organicznych w analizie glikozydowych/aglikonowych przedstawicieli związków polifenolowych w materiale roślinnym. Ten aspekt analizy metabolitów wtórnych, szczególnie w kontekście konsekwencji płynących z błędnej analizy glikozydów hydroksyantrachinonowych w materiale roślinnym, jak dotąd w literaturze jest pomijany. O randze podjętego w pracy **H17** problemu może również świadczyć fakt, iż redakcja czasopisma *Analytical and Bioanalytical Chemistry* zaproponowała mi jej publikację w trybie *Open Access* bez obciążania mnie jego kosztami.

**Tabela 1. Wartości F i P otrzymane podczas analizy wariancji dla wpływu warunków PLE na uzysk hydroksyantrachinonów  
(EG - glukozyd emodyny, ChG - glukozyd chryzofanolu, PG - glukozyd fiscjonu, E - emodyna, Ch – chryzofanol, P – fiscjon)**

| Związek | Skład ekstrahenta* |                       | Temperatura* |                       | Ciśnienie w temp. 75 °C* |                       | Ciśnienie w temp. 125 °C* |                       | Czas w temp. 75 °C** |                       | Czas w temp. 125 °C** |                       |
|---------|--------------------|-----------------------|--------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|         | F                  | P                     | F            | P                     | F                        | P                     | F                         | P                     | F                    | P                     | F                     | P                     |
| EG      | 113.97             | $1.10 \cdot 10^{-09}$ | 161.92       | $1.40 \cdot 10^{-10}$ | 1.69                     | $2.11 \cdot 10^{-01}$ | 2.84                      | $6.41 \cdot 10^{-02}$ | 52.82                | $1.29 \cdot 10^{-05}$ | 93.41                 | $1.44 \cdot 10^{-06}$ |
| ChG     | 335.98             | $1.85 \cdot 10^{-12}$ | 358.10       | $1.27 \cdot 10^{-12}$ | 0.69                     | $6.39 \cdot 10^{-01}$ | 3.58                      | $3.24 \cdot 10^{-02}$ | 195.63               | $8.00 \cdot 10^{-08}$ | 437.28                | $3.31 \cdot 10^{-09}$ |
| PG      | 331.52             | $2.00 \cdot 10^{-12}$ | 466.43       | $2.62 \cdot 10^{-13}$ | 1.80                     | $1.88 \cdot 10^{-01}$ | 3.05                      | $5.27 \cdot 10^{-02}$ | 362.84               | $6.95 \cdot 10^{-09}$ | 753.52                | $3.80 \cdot 10^{-10}$ |
| E       | 115.52             | $1.02 \cdot 10^{-09}$ | 42.50        | $3.19 \cdot 10^{-07}$ | 1.35                     | $3.08 \cdot 10^{-01}$ | 3.26                      | $4.34 \cdot 10^{-02}$ | 4.65                 | $3.66 \cdot 10^{-02}$ | 7.89                  | $8.96 \cdot 10^{-03}$ |
| Ch      | 515.07             | $1.45 \cdot 10^{-13}$ | 55.28        | $7.20 \cdot 10^{-08}$ | 0.35                     | $8.75 \cdot 10^{-01}$ | 3.14                      | $4.83 \cdot 10^{-02}$ | 14.51                | $1.34 \cdot 10^{-03}$ | 31.41                 | $8.93 \cdot 10^{-05}$ |
| P       | 378.48             | $9.10 \cdot 10^{-13}$ | 46.62        | $1.89 \cdot 10^{-07}$ | 1.10                     | $4.09 \cdot 10^{-01}$ | 3.40                      | $3.83 \cdot 10^{-02}$ | 23.92                | $2.39 \cdot 10^{-04}$ | 17.47                 | $7.15 \cdot 10^{-04}$ |

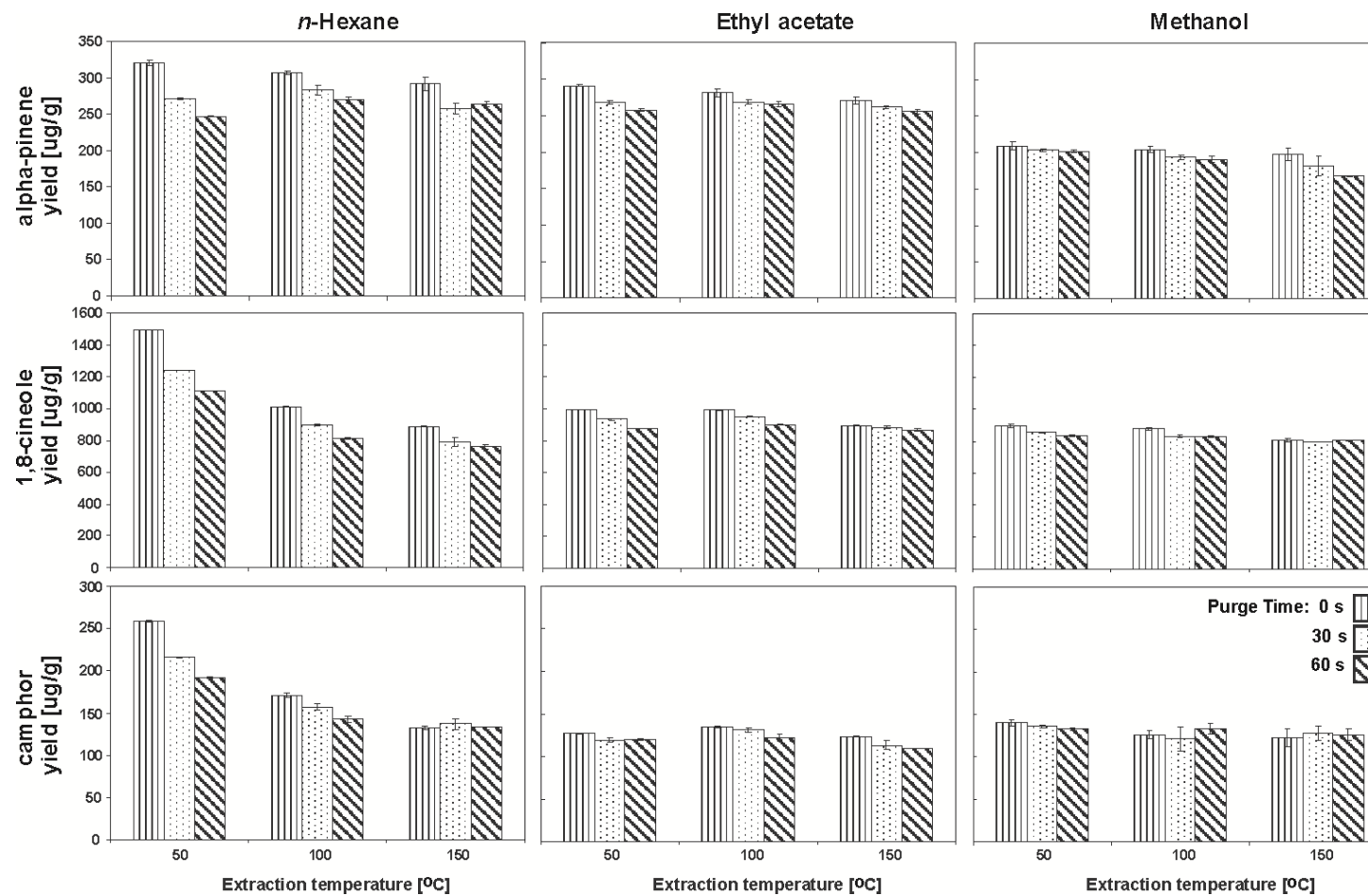
\*  $F_{crit.} = 3.106$

\*\*  $F_{crit.} = 4.066$

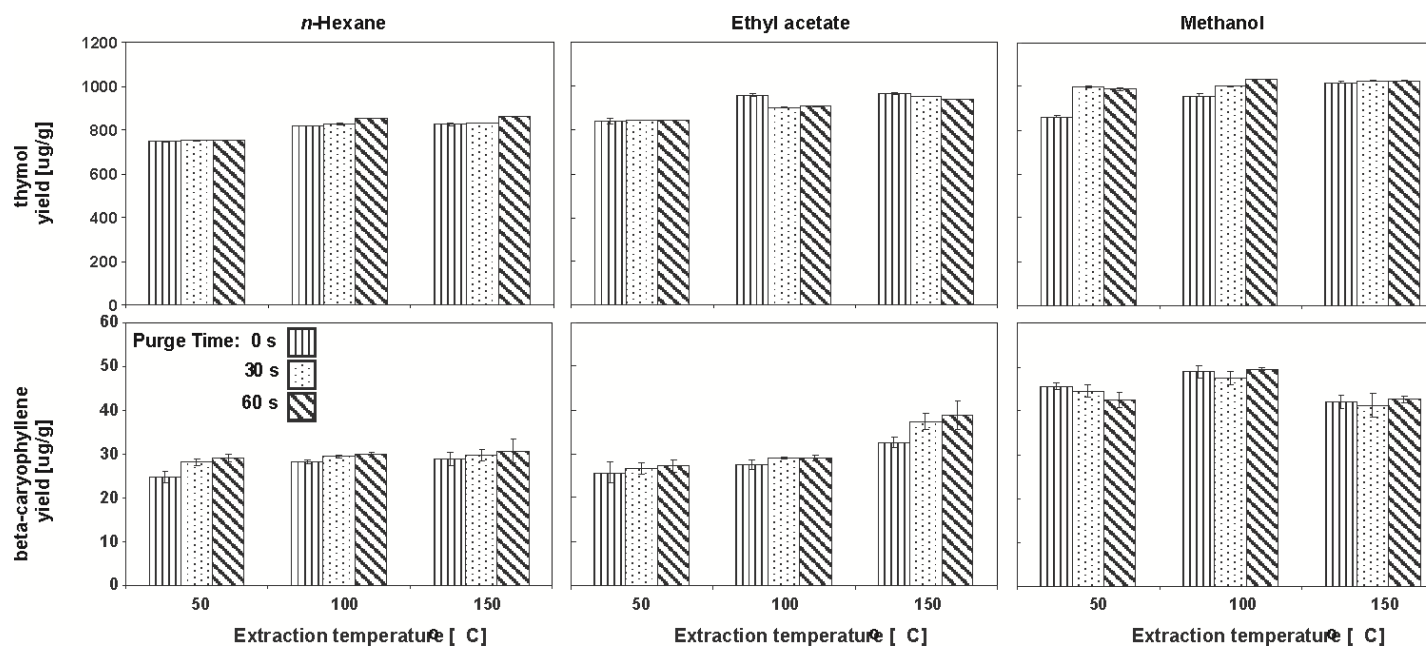
#### 4c.5.4 Wpływ etapu *purge* na uzysk olejkowych składników roślin [H16]

W badaniach nad zastosowaniem techniki PLE do ekstrakcji związków z ciał stałych pomija się wpływ ostatniego jej etapu (etapu *purge*) na wydajność procesu. Tymczasem w świetle wyników zaprezentowanych w **H13** stwierdzono, że etap *purge* może prowadzić do straty lotnych składników roślin. Ponieważ w eksperymentach opisanych w cytowanej pracy jako ekstrahent zastosowano przegrzaną wodę, dlatego postanowiono sprawdzić czy straty lotnych składników roślin również mają miejsce wtedy, gdy w procesie PLE do ekstrakcji zastosuje się rozpuszczalnik organiczny. Eksperymenty opisane w **H14** wykazały, że zastosowanie ekstrahenta organicznego nie eliminuje udziału etapu *purge* w stratach lotnej frakcji roślin. W ostatniej z cytowanych prac, dyskusja udziału etapu *purge* koncentruje się jednak tylko wokół zmiany ilości D-limonenu i dlatego pracę tą należy uznać za preludeum szeroko zakrojonych badań szczegółowo przedstawionych w pracy **H16** i przybliżonych poniżej.

Do badań wpływu etapu *purge* na straty lotnych składników roślin, wytypowałam rozmaryn (*Rosmarinus officinalis* L.), tymianek (*Thymus vulgaris* L.) oraz rumianek (*Chamomilla recutita* L.), gdyż główne składniki ich olejków eterycznych charakteryzują się wyraźnie odmiennymi temperaturami wrzenia. Jako główne składniki danego olejku uznałam te, których zawartość w danym oleju przekraczała 20 %. W ekstrakcie rozmarynowym był to więc  $\alpha$ -pinen, 1,8-cyneol (eukaliptol) i kamfora; dla tymianku: tymol i  $\beta$ -kariofilen, a dla rumianku:  $\beta$ -farnezen oraz tlenki A i B  $\alpha$ -bisabololu. W badaniach uwzględniłam wpływ różnych czasów *purge*, temperatur oraz rozpuszczalników. Ich wyniki są zaprezentowane na Rys. 5 - 7 w sekwencji odzwierciedlającej wzrost temperatury wrzenia tych związków. Wartości współczynników Fishera ( $F$ ), oddające wielkość wpływu parametrów procesu PLE na zmianę uzysku poszczególnych składników są z kolei przedstawione w Tab. 2.

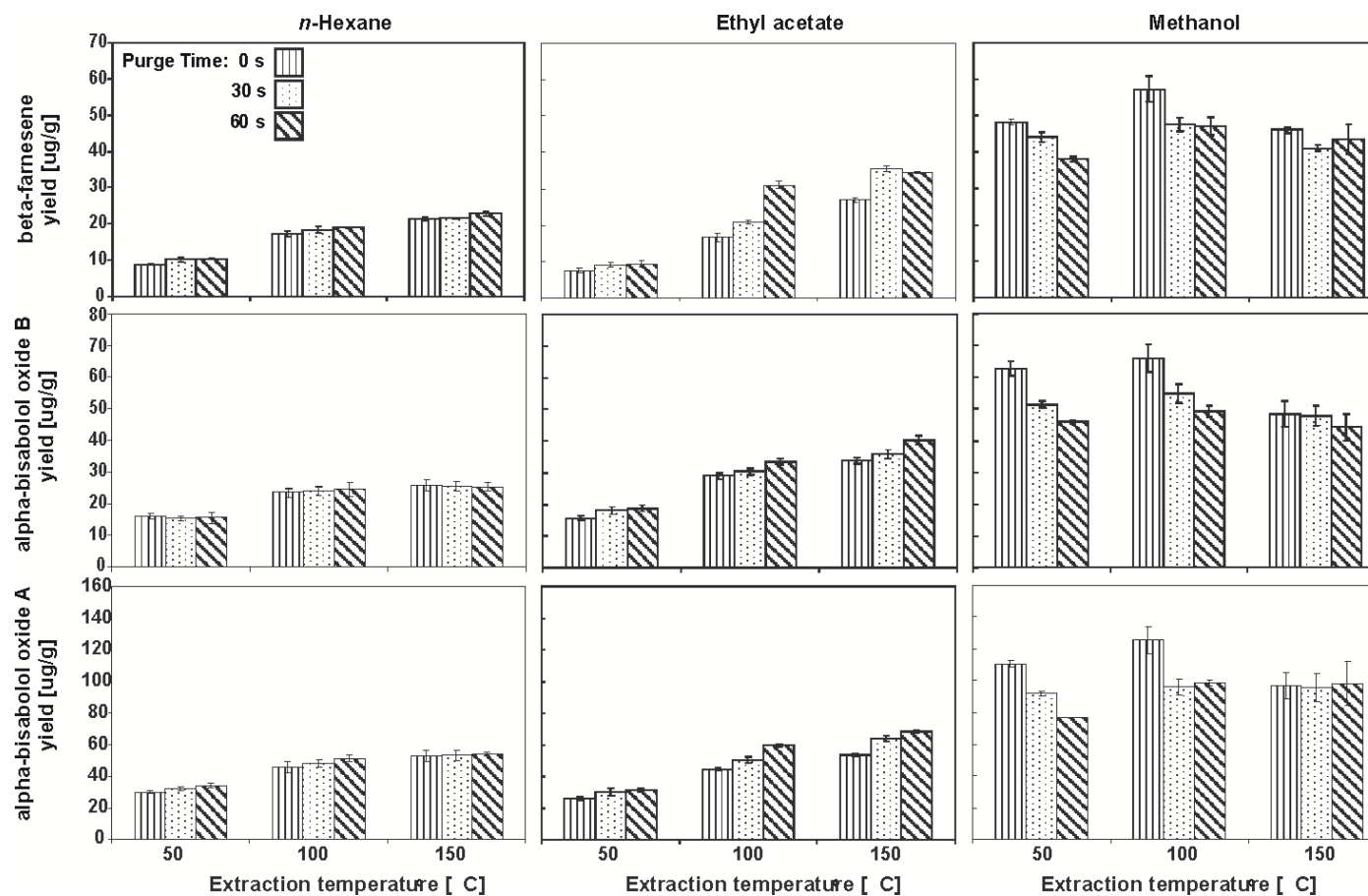


Rys. 5 Wpływ różnych czasów *purge*, temperatur oraz rozpuszczalników na uzysk  $\alpha$ -pinenu, 1,8-cyneolu i kamfory z rozmarynu



Rys. 6 Wpływ różnych czasów *purge*, temperatur oraz rozpuszczalników na uzysk tymolu i  $\beta$ -kariofilenu z tymianku





Rys. 7 Wpływ różnych czasów *purge*, temperatur oraz rozpuszczalników na uzysk  $\beta$ -farnenezu, tlenku A  $\alpha$ -bisabololu oraz tlenku B  $\alpha$ -bisabololu z rumianku

**Tabela 2. Wartości  $F$  i  $P$  otrzymane podczas analizy wariancji wyników eksperymentalnych ( $F_{crit} = 5,14$ )**

| Składnik<br>olejku eterycznego | Temp.<br>[°C] | <i>n</i> -Heksan |            | Octan etylu |            | Metanol    |            |
|--------------------------------|---------------|------------------|------------|-------------|------------|------------|------------|
|                                |               | $F_{exp.}$       | $P$ -value | $F_{exp.}$  | $P$ -value | $F_{exp.}$ | $P$ -value |
| $\alpha$ -pinen                | 50            | 119,57           | < 0,0001   | 80,03       | < 0,0001   | 8,40       | 0,0182     |
|                                | 100           | 19,78            | 0,0023     | 10,16       | 0,0118     | 10,43      | 0,0111     |
|                                | 150           | 13,94            | 0,0055     | 6,23        | 0,0343     | 12,91      | 0,0067     |
| 1,8-cyneol                     | 50            | 246,80           | < 0,0001   | 85,80       | < 0,0001   | 9,45       | 0,0140     |
|                                | 100           | 16,60            | 0,0036     | 9,57        | 0,0136     | 4,31       | 0,0691     |
|                                | 150           | 12,81            | 0,0068     | 0,31        | 0,7462     | 0,05       | 0,9506     |
| Kamfora                        | 50            | 596,23           | < 0,0001   | 14,33       | 0,0052     | 3,32       | 0,1070     |
|                                | 100           | 33,30            | 0,0006     | 9,09        | 0,0153     | 2,21       | 0,1907     |
|                                | 150           | 0,80             | 0,4911     | 13,84       | 0,0056     | 0,15       | 0,8622     |
| Tymol                          | 50            | 0,27             | 0,7689     | 0,19        | 0,8347     | 5,55       | 0,0432     |
|                                | 100           | 9,32             | 0,0144     | 3,10        | 0,1192     | 6,24       | 0,0342     |
|                                | 150           | 7,70             | 0,0220     | 1,90        | 0,2299     | 0,06       | 0,9445     |
| $\beta$ -kariofilen            | 50            | 268,786          | < 0,0001   | 3,77        | 0,0870     | 32,90      | 0,0006     |
|                                | 100           | 340,366          | < 0,0001   | 21,23       | 0,0019     | 5,91       | 0,0381     |
|                                | 150           | 14,187           | 0,0053     | 32,97       | 0,0006     | 1,53       | 0,2911     |
| $\beta$ -farnezen              | 50            | 1237,69          | < 0,0001   | 683,32      | < 0,0001   | 567,99     | < 0,0001   |
|                                | 100           | 277,24           | < 0,0001   | 2543,45     | < 0,0001   | 47,80      | 0,00021    |
|                                | 150           | 156,39           | < 0,0001   | 1372,22     | < 0,0001   | 14,92      | 0,00470    |
| tlenek B $\alpha$ -bisabololu  | 50            | 17,42            | 0,0032     | 273,11      | < 0,0001   | 283,51     | < 0,0001   |
|                                | 100           | 5,84             | 0,0391     | 147,78      | < 0,0001   | 57,22      | 0,0001     |
|                                | 150           | 1,70             | 0,2600     | 132,21      | < 0,0001   | 5,34       | 0,0466     |
| tlenek A $\alpha$ -bisabololu  | 50            | 72,15            | < 0,0001   | 82,42       | < 0,0001   | 342,30     | < 0,0001   |
|                                | 100           | 32,81            | 0,0006     | 412,00      | < 0,0001   | 16,81      | 0,0035     |
|                                | 150           | 18,33            | 0,0028     | 271,17      | < 0,0001   | 0,04       | 0,9617     |

Z danych zaprezentowanych na Rys. 5 wynika, iż *wydłużenie czasu purge prowadzi do coraz większych strat  $\alpha$ -pinenu, 1,8-cyneolu i kamfory* (najlotniejszych spośród wytypowanych składników olejków eterycznych). *Wielkość straty zależy od rodzaju rozpuszczalnika i temperatury ekstrakcji*. Wartości  $F$  (patrz Tab. 2) dowodzą, iż ten efekt jest lepiej widoczny dla ekstraktu otrzymanego przy użyciu *n*-heksanu niż przy użyciu octanu etylu oraz mniej widoczny w wyższych temperaturach ekstrakcji. W przypadku ekstraktu metanolowego tej rośliny straty  $\alpha$ -pinenu są widoczne niezależnie od temperatury, dla 1,8-cyneolu są one widoczne tylko powyżej 50 °C a dla kamfory różnice w uzyskach są statystycznie nieistotne. Najmniejszą stratę głównych składników olejku rozmarynowego, w danej temperaturze, obserwuje się w zerowym czasie *purge*.

W świetle danych przedstawionych na Rys. 6 i 7, *wpływ etapu purge na uzysk lotnych składników roślin zmienia się ze wzrostem ich temperatur wrzenia. Wydłużenie czasu purge, podczas ekstrakcji rumianku *n*-heksanem i octanem etylu, prowadzi do wzrostu uzysku badanych składników*. Jedynym racjonalnym wytłumaczeniem obserwowanego

zjawiska jest odparowanie rozpuszczalnika z ekstraktu, prowadzące do zatężenia analizowanych związków w odbieralniku. Innymi słowy, im dłuższy jest etap *purge* w danej temperaturze, tym większe jest odparowanie *n*-heksanu i octanu etylu, i tym większe jest zatężenie analitów w końcowym ekstrakcie. Wzrost stężenia głównych składników olejku rumiankowego w *n*-heksanie i octanie etylu lepiej jest widoczny w wyższych temperaturach ekstrakcji. *Dla metanolu jednak zauważa się odwrotny wpływ purge na uzysk tych samych związków. Im dłuższy czas przedmuchiwania azotem, tym wyraźnie mniejsza jest ilość badanych składników w ekstrakcie.* Taka relacja sugeruje, iż nie molekuly rozpuszczalnika a główne składniki olejku rumiankowego odparowują z ekstraktu a ponadto, że odparowanie lotnych związków olejku rośnie ze wzrostem czasu *purge*.

W tym miejscu warto zauważyć, iż metanol znany jest z tego, iż jego molekuly tworzą klasterzy połączone wiązaniem wodorowym [47, 48]. Najwyraźniej wiązanie to utrudnia odparowanie metanolu w strumieniu azotu. Fakt ten tłumaczy, dlaczego dla tych samych związków olejku rumiankowego zawieszonych w różnych rozpuszczalnikach wpływ etapu *purge* na efektywność ich ekstrakcji jest różny. *Mniej lotne składniki olejku rumiankowego zawieszone w łatwo odparowującym rozpuszczalniku (n-heksan i/lub octan etylu) są zatężane. Te same związki na etapie purge są z ekstraktu usuwane, jeśli jako ekstrahent wykorzystano wolniej odparowujący rozpuszczalnik tj. metanol.*

Jak wynika z [47], wzrost temperatury sprzyja rozpadowi dużych klasterów metanolu do mniejszych a te dalej rozpadają się do pojedynczych molekuł tego rozpuszczalnika. W konsekwencji, jak wykazałam w **H16**, przy wyższych temperaturach metanol odparowuje szybciej, co tłumaczy dlaczego ze wzrostem temperatury ekstrakcji maleje wpływ etapu *purge* na uzysk lotnych składników olejku rumiankowego (mniejsze wartości *F* w Tab. 2).

Dla pełni obrazu wpływu etapu *purge* na uzysk PLE indywidulanych składników olejków eterycznych należy przyjąć, że *wielkość straty lotnych związków również zależy od siły oddziaływania rozpuszczalnika z analitem (siły odpowiadającej zdolności danego rozpuszczalnika do ekstrakcji).* Zatem można założyć, iż składniki OE podlegają zjawisku współodparowania z molekułami rozpuszczalnika na sposób podobny do współdestylacji. *Jeśli szybkość odparowania danego składnika olejku w strumieniu azotu jest porównywalna do szybkości odparowania molekuł zastosowanego rozpuszczalnika, to wpływ purge na zmianę uzysku tego składnika jest niezauważalny.* Wniosek ten potwierdzają dane otrzymane dla tymolu (patrz Rys. 6), charakteryzującego się średnią lotnością. Słuszność tego wniosku dodatkowo wspierają rezultaty badań przedstawione w pracy **H13**.

Podsumowując, uzysk PLE lotnych składników roślin zależy od etapu *purge*. W trakcie tego etapu procedury PLE generalnie obserwuje się straty składników łatwiej lotnych od ekstrahenta zaś w przypadku mniej lotnych związków wydłużenie etapu *purge* prowadzi do ich zatężania na skutek odparowania rozpuszczalnika. Należy jednak zauważyć, że wpływ *purge* na uzysk frakcji lotnej roślin może być bardziej złożony.

#### 4c.6 Podsumowanie

Analiza drugorzędowych metabolitów w materiale roślinnym stanowi złożone zagadnienie badawcze. Jakość otrzymywanych wyników w dużym stopniu zależy od etapu przygotowania próbki materiału roślinnego do analizy chromatograficznej. Najczęściej etap ten przebiega z wykorzystaniem ekstrakcji. W pracach wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej wykazałam, iż technika ciśnieniowej ekstrakcji cieczą może zastąpić tradycyjnie stosowane techniki izolacji związków z ciał stałych (ekstrakcję w aparacie Soxhlet'a, pod chłodnicą zwrotną, macerację czy destylację) w analizie metabolitów wtórnych w matricach roślinnych. Ta zamiana skutkuje spełnieniem wymagań stawianych przed współczesną analityką - w kontekście zmniejszenia jej kosztów, zwiększenia liczby analiz na jednostkę czasu oraz ograniczenia/wyeliminowania użycia rozpuszczalników organicznych. Fakty te to pozytywne strony stosowania ciśnieniowej ekstrakcji cieczą (jej blaski) w analizie metabolitów wtórnych roślin dodatkowo wspierane tym, że technika PLE:

- jest szczególnie przydatna przy izolacji związków występujących na niewielkim poziomie stężeń z matric roślinnych charakteryzujących się bogactwem lipidowych substancji interferujących;
- sprzyja zwiększeniu efektywności izolacji związków nietrwałych na działanie wysokich temperatur, dzięki ograniczeniu czasu ich ekstrakcji do kilku minut;
- ułatwia uwalnianie związków ze zwartych i twardych tkanek roślinnych oraz takich, które mogą wchodzić w stosunkowo silne oddziaływania z ligninami;
- nie wymaga optymalizowania warunków ekstrakcji lotnych składników roślin;
- ułatwia prowadzenie badań nad metabolizmem roślin;
- może być stosowana jako szybka metoda odniesienia.

Niemniej jednak w świetle badań przeze mnie prowadzonych mogę stwierdzić, iż cieniem na stosowaniu PLE w analizie drugorzędowych metabolitów w materiale roślinnym kładą się następujące fakty:

- pomimo uznania PLE za efektywną technikę izolacji związków jej wydajność zależy od właściwości fizykochemicznych analitów oraz rodzaju matrycy roślinnej
- wzrost temperatury procesu przyczynia się do zmniejszenia selektywności ekstrakcji a w konsekwencji do zmniejszenia uzysku analitu;
- wzrost ciśnienia w naczyniu ekstrakcyjnym może prowadzić do zmniejszenia wydajności ekstrakcji związków z pęczniejących matryc;
- stosowanie wodno-organicznych ekstrahentów prowadzi do rozpadu złożonych form związków, a ponadto
- etap *purge* procedury PLE prowadzi do ilościowych zmian w składzie lotnych składników ekstraktu.

Dodatkowo do swoich osiągnięć mogę zaliczyć to, iż pokazałam prosty i szybki sposób wyliczenia rzeczywistej zawartości związku w materiale roślinnym, w oparciu o niepełny odzysk badanego związku w jednocyklowej ekstrakcji PLE.

Pragnę dodać, iż wobec różnorodności struktur i fizykochemicznych własności związków zaliczanych do drugorzędowych metabolitów oraz odmienności matryc roślinnych, rezultaty badań nad zastosowaniem PLE w analizie metabolitów wtórnych, przybliżone powyżej a szczegółowo omówione w publikacjach H1 - H17, z jednej strony pokazują *blaski PLE*, potwierdzając słuszność obiegowych opinii na temat jej użyteczności i efektywności a z drugiej, wskazują *cienie PLE*, które należy traktować jako drogowskazy wytyczające kierunki badań warte dalszego zgłębiania i to nie tylko przeze mnie.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych)

Osiągnięcia naukowo-badawcze nieobjęte monotematycznym cyklem publikacji, który stanowi podstawę niniejszego wniosku habilitacyjnego są skrótowo przedstawione poniżej.

Osiągnięcia te podzieliłam na:

- badania prowadzone przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora (publikacje A1 - A7 przedstawione w Załączniku 3a) oraz
- badania prowadzone po uzyskaniu stopnia naukowego doktora (publikacje B1 – B18 zebrane w Zał. 3a).

### 5.1 Badania prowadzone przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Działalność naukową rozpoczęłam na Studiach Doktoranckich kontynuując tematykę zainicjowaną wynikami badań, które prowadziłam w ramach przygotowywania mojej pracy magisterskiej. Tematyka ta, ukierunkowana przez prof. dr hab. Andrzeja L. Dawidowicza, koncentrowała się wokół zagadnień związanych z badaniem właściwości fizykochemicznych materiałów krzemionkowych ze zdeponowaną na ich powierzchni warstwą polimerową. Podjęta tematyka zaowocowała 7 artykułami opublikowanymi w czasopismach o światowym obiegu. Dyskutowane w nich rezultaty (skrótowo przybliżone poniżej) stanowią podstawę mojego doktoratu, który obroniłam z wyróżnieniem we wrześniu 2000 r.

Materiały krzemionkowe należą do niezwykle popularnych sorbentów. Ich zastosowanie jest jednak ograniczone, z uwagi na:

- brak możliwości ich użytkowania w alkalicznych rozpuszczalnikach oraz
- polarny charakter ich powierzchni, a w szczególności obecność powierzchniowych grup silanolowych o charakterze kwasowym, które mogą powodować silną (czasami nieodwracalną) adsorpcję związków.

Te dwie przyczyny legły u podstaw badań nad opracowaniem skutecznych metod eliminacji niekorzystnych cech materiałów krzemionkowych. Jedna z nich sprowadza się do utworzenia na powierzchni krzemionki cienkiej polimerowej warstwy. Warstwa ta z jednej strony zabezpiecza szkielet krzemionkowy przed niekorzystnym działaniem rozpuszczalników o wysokim pH, a z drugiej pełni rolę ekranu eliminującego oddziaływanie pomiędzy powierzchniowymi grupami silanolowymi i separowanymi molekułami.

Badania dowiodły, iż warstwy zwilżalne przez wodę można wykonać w oparciu o sieciowanie mieszanin dekstranu i trietylotetraaminy. Istotniejsze jest jednak to, że

właściwości fizykochemiczne takich warstw można regulować w szerokim zakresie, co w konsekwencji pozwala rozszerzyć możliwości aplikacyjne materiałów krzemionkowych ze zdeponowaną na ich powierzchni warstwą polisacharydowo-poliiminową. Efektem badań nad zdolnościami sorpcyjnymi warstw względem jonów metali jest praca A1.

Dzięki zastosowaniu metody SAXS w badaniach struktury powierzchniowych warstw polimerowych, możliwym było udowodnienie obecności na powierzchni warstw form przejściowych (tzw. warstw pośrednich). Warstwy te istotnie wpływają na fizykochemiczne własności otrzymywanych materiałów. Rezultaty tej serii badań są przedstawione w pracach A2 - A4 oraz A7.

W trakcie badań efektów cieplnych związanych z procesem adsorpcji i desorpcji alkoholi na materiałach krzemionkowych z powierzchniową warstwą polisacharydowo-poliiminową zaobserwowano niezgodne z punktu widzenia termodynamiki zjawisko. W przypadku adsorpcji i desorpcji alkoholi bezwzględne wartości ciepła ich desorpcji ( $Q_{des}$ ) przewyższały ciepła adsorpcji ( $Q_{ads}$ ). W oparciu o uzyskane wówczas rezultaty opracowano model, którego szczegóły wraz z wynikami eksperymentalnych badań opublikowano w *Journal of Colloid and Interface Science* (praca A5 w Załączniku 3a).

Prowadząc szersze badania nad przyczynami anomalnych relacji pomiędzy wartościami ciepła adsorpcji-desorpcji określałam m.in. wpływ stężenia alkoholu rozpuszczonego w niepolarnym rozpuszczalniku (*n*-heksan, heptan) na wielkości  $Q_{ads}$  i  $Q_{des}$ . Badania te pozwoliły stwierdzić, że przyczyn relacji  $|Q_{des}| > Q_{ads}$  najprawdopodobniej należy upatrywać w procesie asocjacji alkoholi. W przeprowadzonych eksperymentach stwierdzono bowiem, iż różnica pomiędzy  $Q_{ads}$  i  $|Q_{des}|$  rośnie ze wzrostem stężenia alkoholu. Wyniki tych badań zaprezentowano w czasopiśmie *Langmuir* (praca A6).

## 5.2 Badania prowadzone po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Moje zainteresowania i osiągnięcia naukowe w okresie po uzyskaniu stopnia naukowego doktora można podzielić na dwa działy tematyczne.

- Pierwszy z nich stanowi kontynuację tematyki rozpoczętej w okresie przed doktoratem. W tym nurcie badawczym powstały prace B1 - B5.
- W drugim, podjęłam nowy temat badań: chromatograficzną analizę związków biologicznie czynnych izolowanych z roślin.

### 5.2.1 Badania stanowiące kontynuację tematyki rozpoczętej w okresie przed doktoratem

Adsorpcyjne techniki przepływowe należą do jednych z najczęściej wykorzystywanych w badaniach procesów adsorpcji i desorpcji na granicy ciecz – ciało stałe, gaz - ciało stałe i ciecz - ciecz. Uzyskiwane dzięki nim wyniki są użyteczne w określaniu parametrów fizykochemicznych, które charakteryzują naturę oddziaływań zachodzących pomiędzy adsorbentem a powierzchnią międzyfazową. Parametry te są bardzo pomocne w zrozumieniu mechanizmów adsorpcji, kinetyki adsorpcji oraz związanych z nimi procesów takich jak: kataliza, dyspersja, korozja, adhezja.

Badając efekty cieplne adsorpcji i desorpcji alkoholi na materiałach krzemionkowych z powierzchniową warstwą polisacharydowo-poliiminową z wykorzystaniem przepływowego mikrokalorymetru (badania wspomniane wyżej) zaobserwowałam nietypowe zjawisko polegające na tym, że bezwzględne wartości ciepła desorpcji alkoholi przewyższały ciepła ich adsorpcji. Ponieważ problem ten stanowił niezwykle istotne zagadnienie z punktu widzenia fizykochemii zjawisk powierzchniowych, dlatego też kontynuowałam badania nad przyczynami wspomnianej relacji. Uzyskiwane wyniki stały się też podstawą do wystąpienia o przyznanie grantu KBN, którego celem było wyjaśnienie jej przyczyn (Grant nr 3 T09A 13218, którego byłam głównym wykonawcą).

Przeprowadzone w trakcie realizacji grantu badania wskazują, że przyczyną anomalnych relacji pomiędzy efektami cieplnymi procesów adsorpcji – desorpcji alkoholi na powierzchni ciał stałych jest właściwość przepływowego mikrokalorymetru. Przyrząd ten mierzy jedynie całkowity efekt cieplny, który jest wypadkową efektu cieplnego związanego z adsorpcją pojedynczych jak i zasocjowanych molekuł alkoholu oraz efektu cieplnego potrzebnego na rozpad asocjatów. Tak więc efekt cieplny towarzyszący procesowi adsorpcji alkoholu jest obniżony o efekt cieplny rozpadu asocjatów tego związku. Desorpcji z kolei ulegają pojedyncze cząsteczki alkoholu, które rekombinują się w asocjaty w fazie objętościowej już poza zasięgiem czujników przyrządu pomiarowego i w konsekwencji efekt cieplny związany z rekombinacją asocjatów nie jest przez przyrząd w pełni „widoczny”. Rejestrowany jest przede wszystkim efekt cieplny procesu desorpcji cząsteczek alkoholu.

Warto w tym miejscu zauważyć, iż ogrom wyników uzyskanych w ramach realizowanego grantu [ponad 150 zmierzonych wielkości (przeszło 800 pomiarów), blisko 300 dni roboczych] nie tylko pozwolił na wyjaśnienie przyczyn uzyskiwania relacji  $|Q_{des}| > Q_{ads}$ , ale także umożliwił stworzenie modelu adsorpcji alkoholi z niepolarnych rozpuszczalników na powierzchniach ciał stałych.



Wyniki powyższych badań publikowano w czasopismach o obiegu światowym takich jak: *Langmuir* [B2], *Colloids and Surfaces A* [B4], *Journal of Colloids and Interface Science* [B5].

Warto dodać, iż efektem kontynuowania tematyki rozpoczętej przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora są jeszcze dwie prace. Pierwsza z nich dyskutuje wyniki badań nad zastosowaniem metody SAXS do oceny stopnia pęcznienia warstwy polimerowej zdeponowanej na sztywnej powierzchni porowatej krzemionki [B1]. Tematem drugiej są kwasowo-zasadowe właściwości usieciowanej warstwy polisacharydowo-poliiminowej [B3].

#### 5.2.2 Osiągnięcia badawcze w ramach analizy naturalnych związków biologicznie czynnych

Jak wspomniałam wcześniej, równolegle z tematyką zainicjowaną jeszcze przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora rozpoczęłam nowy nurt badawczy, dotyczący zagadnień związanych z chromatograficzną analizą związków biologicznie czynnych roślin. Analiza związków w tak złożonych matrycach wymaga ich wcześniejszej izolacji. Najczęściej w tym celu stosuje się klasyczną ekstrakcję w aparacie Soxhleta.

W swoich badaniach postanowiłam skupić się na opracowaniu nowych metod analizy związków w materiale roślinnym, wykorzystując współcześnie dostępne techniki ekstrakcji. Poza techniką PLE (która jest przedmiotem prac H1 - H17 stanowiących podstawę wniosku habilitacyjnego) w badaniach wykorzystywałam także technikę SFE, SPME, MSPD oraz SSDM. Rezultaty badań otrzymane przy użyciu tych technik są opisane w siedmiu pracach, z których sześć opublikowano w czasopismach znajdujących się na liście Web of Science – prace B6 - B9 oraz B11 przedstawione w punkcie IIa Zał. 3a, a jedna jest opublikowana w czasopiśmie krajowym (punkt II d Zał. 3a).

Pragnę podkreślić, iż efektem moich badań nad oznaczaniem aktywnych składników roślin było wytyczenie dwóch nowych kierunków badawczych Zakładu:

- Pierwszym z nich są badania właściwości antyutleniających tak pojedynczych związków (naturalnych i sztucznych) jak i ich mieszanin (praca B10).
- Drugim są badania nad wpływem warunków ekstrakcji na transformacje naturalnych związków złożonych (dwie prace przesłane do redakcji czasopism analitycznych).

Moje najbliższe plany badawcze wiąże z rozwojem tego ostatniego kierunku, Uważam bowiem, iż problem transformacji związków w trakcie ich wyodrębniania z materiału roślinnego nie jest w pełni poznany.

## 4c.7 Literatura uzupełniająca

1. J.L. Ezzell, B.E. Richter, W.D. Felix, S.R. Black, J.E. Meikle. A comparison of accelerated solvent extraction with conventional solvent extraction for organophosphorus pesticides and herbicides. *LC/GC* **13** (1995) 390.
2. F. Höfler, D. Jensen, J. Ezzell, B.E. Richter. Accelerated solvent extraction of PAH from solid samples with subsequent HPLC analysis. *Chromatographie* **15** (1995) 68.
3. B.E. Richter, B.A. Jones, J.L. Ezzell, N.L. Porter, N. Avdalovic, C. Pohl. Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Anal. Chem.* **68** (1996) 1033.
4. E. Björklund, M. Järemo, L. Mathiasson, L. Karlsson, J.T. Strode III, J. Eriksson, A. Tortensson. Determination of felodipine in tablets using accelerated solvent extraction. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **21** (1998) 535.
5. K. Schäfer. Accelerated solvent extraction of lipids for determining the fatty acid composition of biological material. *Anal. Chim. Acta* **358** (1998) 69.
6. P.L. Buldini, S. Cavalli, A. Trifirò. State-of-the-art ion chromatographic determination of inorganic ions in food. *J. Chromatogr. A* **789** (1997) 529.
7. H. Giergielewicz-Możajska, Ł. Dąbrowski, J. Namieśnik; Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples — some aspects of theory and practice. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **31** (2001) 149.
8. T. Bartram. Encyclopedia of Herbal Medicine. Grace Publishers, Bournemouth, 1<sup>st</sup> Edn., 1995.
9. J. Namiesnik, T. Gorecki. Sample preparation for chromatographic analysis of plant material. *JPC - J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC* **13** (2000) 404.
10. L. Bravo. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56** (1998) 317.
11. K. Główniak, T. Wawrzynowicz, M. Hajnos, T. Mroczek. The application of zonal thin-layer chromatography to the determination of paclitaxel and 10-deacetylbaccatin III in some *Taxus* species. *J. Planar Chromatogr.* **12** (1999) 328.
12. S.L. Richheimer, D.M. Tinnermeier, D.W. Timmons. High-performance liquid chromatographic assay of taxol. *Anal. Chem.* **64** (1992) 2323.
13. M. Herrero, M. Plaza, A. Cifuentes, E. Ibaez. Green processes for the extraction of bioactives from rosemary: chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *J. Chromatogr. A* **1217** (2010) 2512.
14. E. Ibanez, M. Herrero, P.J. Martin-Alvarez, F.J. Senorans, G. Reglero, A. Cifuentes. Accelerated Solvent Extraction: A New Procedure to Obtain Functional Ingredients from Natural Sources. Modern Extraction Techniques: Food and Agricultural Samples. *ACS Symposium Series* **926** (2006) 65.
15. R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz, J. Hernández-Méndez. Pressurized Liquid Extraction in the analysis of food and biological samples. *J. Chromatogr. A* **1089** (2005) 1.
16. G. Anitescu, C. Doneanu, V. Radulescu. Isolation of coriander oil: comparison between steam distillation and supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *Flavour Fragr. J.* **12** (1997) 173.
17. European Pharmacopoeia, 3rd ed., 1997.
18. V. Illes, H.G. Daoud, S. Perneczki, L. Szokonya, M. Then. Extraction of coriander seed oil by CO<sub>2</sub> and propane at super- and subcritical conditions. *J. Supercrit. Fluids* **17** (2000) 177.
19. C.L. Arthur, J. Pawliszyn. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* **62** (1990) 2145.
20. P. Lo'pez, M.A. Huerga, R. Batlle, C. Nerin. Use of solid phase microextraction in diffusive sampling of the atmosphere generated by different essential oils. *Anal. Chim. Acta* **559** (2006) 97.
21. J. Richter, I. Schellenberg. Comparison of different extraction methods for compounds from and optimization of solid-phase microextraction/gas chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* **387** (2007) 2207.
22. E.E. Stashenko, J.R. Mart'inez. Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. *J. Biochem. Biophys. Methods* **70** (2007) 235.
23. S.M. Pourmortazavi, S.S. Hajimirsadeghi. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A* **1163** (2007) 2.

24. M. Moldao-Martins, A. Palavra, M.L. Beirao da Costa, M.G. Bernardo-Gil. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Thymus zygis* L. subsp. *sylvestris* aroma. *J. Supercrit. Fluids* **18** (2000) 25.
25. Q. Lang, C.M. Wai. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - a practical review. *Talanta* **53** (2001) 771.
26. R.M. Smith. Supercritical fluids in separation science - the dreams, the reality and the future. *J. Chromatogr. A* **856** (1999) 83.
27. E. Reverchon, I. De Marco. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J. Supercrit. Fluids* **38** (2006) 146.
28. G. Schill, H. Ehrsson, J. Vessman, D. Westerlund. Separation Methods for Drugs and Related Organic Compounds. Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm Sweden, 2nd Edn., 1984.
29. L. Ramos, E.M. Kristenson, U.A.T. Brinkman. Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *J. Chromatogr. A* **975** (2002) 3.
30. A.G. Fett-Neto, F. DiCosmo, W.F. Reynolds, K. Sakata. Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes. *Biotechnology (N.Y.)* **10** (1992) 1572.
31. S.H. Hoke II, J.M. Wood, R.G. Cooks, Li Xiao-Hua, Ch. Ching-Jer. Rapid screening for taxanes by tandem mass-spectrometry. *Anal. Chem.* **64** (1992) 2313.
32. D. Song, J.L.S. Au. Isocratic high-performance liquid chromatographic assay of taxol in biological fluids and tissues using automated column switching. *J. Chromatogr. B.* **663** (1995) 337.
33. N.C. Wheeler, K. Jech, S. Masters, S.W. Brobst, A.B. Alvarado, A.J. Hoover, K.M. Snader. Effects of genetic, epigenetic, and environmental factors on taxol content in *Taxus brevifolia* and related species. *J. Nat. Prod.* **55** (1992) 432.
34. M.P.K. Choi, K.K.C. Chan, H.W. Leung, C.W. Huie. Pressurized liquid extraction of active ingredients (ginsenosides) from medicinal plants using nonionic surfactant solutions. *J. Chromatogr. A* **983** (2003) 153.
35. C.H. Deng, N. Li, X.M. Zhang. Rapid determination of essential oil in *Acorus tatarinowii* Schott by pressurized hot water extraction followed by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1059** (2004) 149.
36. B.E. Richter, J.L. Ezzell, D.E. Knowles, F. Hoefler, A.K.R. Mattulat, M. Scheutwinkel, D.S. Waddell, T. Gobran, V. Khurana. Extraction of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans from environmental samples using accelerated solvent extraction (ASE). *Chemosphere* **34** (1997) 975.
37. M.A. Rostagno, A. Villares, E. Guillaumon, A. Garcia-Lafuente, J.A. Martinez. Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 2.
38. Y.X. Gong, S.P. Li, Y.T. Wang, P. Li, F.Q. Yang. Simultaneous determination of anthraquinones in Rhubarb by pressurized liquid extraction and capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **26** (2005) 1778.
39. G.C.H. Derksen, T.A. Van Beek, Á. De Groot, A. Capelle. High-performance liquid chromatographic method for the analysis of anthraquinone glucosides and aglycone in madder root (*Rubia tinctorum* L.). *J. Chromatogr. A* **816** (1998) 227.
40. M. Palma, Z. Piñeiro, C.G. Barroso. Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents. *J. Chromatogr. A* **921** (2001) 169.
41. J.W. Fairbairn, F.J. Muhtadi. Chemotaxonomy of anthraquinones in Rumex. *Phytochemistry* **11** (1972) 263.
42. S. Foster, J.A. Duke. Sheep Sorrel in Medicinal Plants. Houghton Mifflin Co, New York, 1990.
43. I.A. Khan, E.A. Abourashed. Leung's Encyclopedia of Common Natural Ingredients: Used in Food, Drugs and Cosmetics (3rd Edn.). John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, 2010.
44. W. Li, C.L. Chan, H.W. Lueng. Liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry as a tool for the characterization of anthraquinone derivatives from Chinese herbal medicine. *J. Pharm. Pharmacol.* **52** (2000) 723.
45. L.Ö. Demirezer, A. Kuruuzum-Zu, I. Bergere. The structure of antioxidant and cytotoxic agents from natural source: anthraquinones and tannins from roots of Rumex patientia. *Phytochemistry* **58** (2001) 1213.

46. Lu Yang, In: Xu Rensheng, Ye Yang, Zhao Weimin (Eds.). Introduction to Natural Products Chemistry, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2012.
47. P. Borowski, J. Jaroniec, T. Janowski, K. Woliński. Quantum cluster equilibrium theory of hydrogen-bonded liquids: water, methanol and ethanol. *Mol. Phys.* **101** (2003) 1413.
48. R. Ludwig. Quantum clusters equilibrium theory of liquids: molecular clusters and thermodynamics of liquid ethanol. *Mol. Phys.* **97** (1999) 465.

Lublin, dn. ...30 maja 2014...

