

**Załącznik nr 3A**

**„ZASTOSOWANIE ANALITYKI CHEMICZNEJ  
W BADANIACH BIOLOGICZNYCH I ŚRODOWISKOWYCH”**

**dr Anetta Ziola-Frankowska  
AUTOREFERAT**

**Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu  
Wydział Chemii  
Zakład Chemii Analitycznej  
Poznań, grudzień 2016**

## Załącznik 3A

### Spis treści

1. Dane personalne.
2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe.
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu.
4. Uprawiana dziedzina, dyscyplina i specjalność naukowa.
5. Wskazanie osiągnięcia naukowego wynikającego z art.16 ust.2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.2016 r. poz.882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz.1311.)
  - 5.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.
  - 5.2. Wykaz publikacji habilitacyjnej stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art.16 ust.2 ustawy.
  - 5.3. Autoreferat wraz z omówieniem osiągnięcia naukowego.
    - 5.3.1. Wstęp.
    - 5.3.2. Cele rozprawy habilitacyjnej.
    - 5.3.3. Omówienie najważniejszych osiągnięć zawartych w pracach stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego.
    - 5.3.4. Podsumowanie osiągnięcia naukowego wraz z elementami nowości naukowej i wkładem do dyscypliny.
    - 5.3.5. Cytowana literatura.
6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.
  - 6.1. Przebieg pracy naukowo-badawczej.
  - 6.2. Plany na przyszłość i perspektywy rozwoju.

## Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

### 1. Imię i nazwisko

Anetta Ewa Zioła-Frankowska

### 2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

**2002** - magister chemii, specjalność- chemia środowiska, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

**2002** - kurs Przygotowania Pedagogicznego, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza (w wymiarze 420 godzin)

**2004** - Studia Podyplomowe „Analityka zanieczyszczeń środowiska i żywności” Wydział Chemii, Politechnika Gdańska

**2008** – doktor nauk chemicznych w dyscyplinie chemia, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Tytuł rozprawy doktorskiej: „Oznaczanie glinu w próbkach środowiskowych w aspekcie analizy frakcjonowania i specjacji”.

Promotor: Prof. zw. dr hab. Jerzy Siepak

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

1.10.2008 – 6.03.2014 – adiunkt w Zakładzie Analizy Wody i Gruntów, Wydziału Chemii UAM w Poznaniu (Kierownik Zakładu: Prof. zw. dr hab. Jerzy Siepak).

7.03.2014 – obecnie - adiunkt w Zakładzie Chemii Analitycznej, Wydziału Chemii UAM w Poznaniu (Kierownik Zakładu: Prof. zw. dr hab. Wiesław Wasiak).

### 4. Uprawiana dziedzina, dyscyplina i specjalność naukowa

Dziedzina: nauki chemiczne.

Dyscyplina: chemia, chemia analityczna.

Specjalność naukowa: techniki rozdzielania chromatograficznego, techniki spektralne, analiza specjacyjna, frakcjonowanie, łączone techniki analityczne, analiza statystyczna, modelowanie komputerowe, analityka żywności i analityka biomedyczna

### 5. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art.16 ust.2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.2016 r. poz.882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz.1311.)

#### 5.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

## **„ZASTOSOWANIE ANALITYKI CHEMICZNEJ W BADANIACH BIOLOGICZNYCH I ŚRODOWISKOWYCH”**

#### 5.2 Wykaz publikacji habilitacyjnej stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art.16 ust.2 ustawy

*Wszystkie z zamieszczonych poniżej prac opublikowane zostały w czasopismach znajdujących się w Journal Citation Reports. Podane w tabeli wartości wskaźnika Impact factor (IF) tych czasopism odnoszą się do roku opublikowania, 5-letniego IF oraz bieżącego IF a ujęty udział procentowy jest udziałem procentowym habilitantki w prezentowanych pracach. Osiągnięcie stanowi monotematyczny cykl publikacji od H1 do H10, których kopie znajdują się w Załączniku 4.*

	<p><b>Zioła-Frankowska, A., Frankowski, M., Siepak, J. (2009) <i>Development of a new analytical method for online simultaneous qualitative determination of aluminium (free aluminium ion, aluminium-fluoride complexes) by HPLC-FAAS.</i> Talanta. 78 623-630.</b></p> <p><b>IF= 3.722/3.749/4.035 punkty MNiSW=40</b></p> <hr/> <p>Mój udział polegał na:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Opracowaniu koncepcji badań.</li> <li>Zaplanowaniu badań.</li> <li>Stworzeniu i optymalizacji nowego układu analitycznego technik łączonych HPLC-FAAS.</li> <li>Badaniu mechanizmów powstawania kompleksów glinu z fluorkami przy wykorzystaniu programów do chemicznego modelowania (Mineql).</li> <li>Przeprowadzeniu analizy specjacyjnej kompleksów fluoroglinowych w układzie HPLC-FAAS w roztworach modelowych i w próbkach wód podziemnych.</li> <li>Pisaniu publikacji, w tym: wybraniu literatury cytowanej, zebraniu wyników oznaczeń, sformułowaniu wniosków z pracy, dyskusji wyników badań, graficznym przedstawieniu wyników oznaczeń i korekcie pracy przed złożeniem do druku.</li> </ol> <p><b>Mój udział procentowy wynosi 80%.</b></p>
<p><b>H1</b></p>	<p>Frankowski, M., <b>Zioła-Frankowska, A.,</b> Siepak, J. (2010) <i>New method for speciation analysis of aluminium fluoride complexes by HPLC-FAAS hyphenated technique.</i> Talanta 80 (5), 2120-2126.</p> <p><b>IF= 3.794/3.749/4.035 punkty MNiSW=40</b></p> <hr/> <p>Mój udział, dotyczył części pracy związanej z opracowaniem warunków analizy ilościowej form glinu w układzie analitycznym HPLC-FAAS i polegał na:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Dobranie warunków pracy układu HPLC-FAAS, w tym na: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Opracowaniu procedury analizy ilościowej wszystkich rozdzielonych w procesie chromatograficznym form glinu.</li> <li>- Określeniu kolejności elucji poszczególnych form glinu.</li> </ul> </li> <li>Przeprowadzeniu analizy specjacyjnej (jakościowej i ilościowej) form glinu w próbkach gleb (ekstrakty wodne).</li> <li>Pisaniu publikacji, w tym: wybraniu literatury cytowanej, zebraniu wyników oznaczeń, sformułowaniu wniosków z pracy, graficznym przedstawieniu wyników oznaczeń i korekcie pracy przed złożeniem do druku.</li> </ol> <p><b>Mój udział procentowy wynosi 25%.</b></p>
<p><b>H2</b></p>	<p>Frankowski, M., <b>Zioła-Frankowska, A.,</b> Kowalski, A., Siepak, J. (2010) <i>Fractionation of heavy metals in bottom sediments using Tessier procedure.</i> Environmental Earth Sciences 60(6), 1165-1178.</p> <p><b>IF= 1.059/2.013/1.768 punkty MNiSW=25</b></p> <hr/> <p>Mój udział polegał na:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Zaplanowaniu i koncepcji badań.</li> <li>Stworzeniu i optymalizacji warunków procesu ekstrakcji wieloetapowej.</li> <li>Przeprowadzeniu analizy granulometrycznej (na sucho, na mokro i z odczynnikiem dyspergującym).</li> <li>Przeprowadzeniu frakcjonowania próbek osadów dennych w oparciu o opracowaną procedurę ekstrakcji.</li> <li>Pisaniu publikacji, w tym na: wybraniu literatury cytowanej, zebraniu wyników oznaczeń, sformułowaniu wniosków z pracy; graficznym przedstawieniu wyników oznaczeń i korekcie pracy przed złożeniem do druku.</li> </ol> <p><b>Mój udział procentowy wynosi 55%.</b></p>

	<p><b>Zioła-Frankowska A.</b>, Frankowski M., Szczuciński W., Siepak, J. (2009) <i>Analysis of labile aluminium form in grain size fractions of tsunami deposits in Thailand</i>. Polish Journal of Environmental Studies, 18, 77-85.</p> <p><b>IF= 0.543/0.877/0.790 punkty MNiSW=15</b></p> <hr/> <p>Mój udział polegał na:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Opracowaniu koncepcji badań.</li> <li>Zaplanowaniu badań i wyborze stosowanych technik pomiarowych (FAAS).</li> <li>Opracowaniu metody ekstrakcji jednoetapowej oznaczeń labilnych form glinu.</li> <li>Przygotowaniu próbek osadów naniesionych przez falę tsunami do badań (analiza granulometryczna, ekstrakcja).</li> <li>Przeprowadzeniu ekstrakcji jednoetapowej i oznaczeniu stężenia labilnej formy glinu w próbkach.</li> <li>Pisaniu publikacji, w tym: wybraniu literatury cytowanej, zebraniu wyników oznaczeń, sformułowaniu wniosków z pracy, graficznym przedstawieniu wyników oznaczeń i korekcie pracy przed złożeniem do druku.</li> </ol> <p><b>Mój udział procentowy wynosił 80%.</b></p>
<p><b>H4</b></p>	<p>Frankowski M., <b>Zioła-Frankowska A.</b> (2014) <i>Analysis of labile form of aluminum and heavy metals in bottom sediments from Kongsfjord, Isfjord, Hornsund fjords</i>. Environmental Earth Sciences 71 (3) 1147-1158.</p> <p><b>IF= 1.765/2.013/1.765 punkty MNiSW=25</b></p> <hr/> <p>Mój udział, polegał na:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Sprawdzeniu precyzji metodyki analitycznej oznaczania labilnych form metali ciężkich w referencyjnym materiale odniesienia.</li> <li>Określeniu zależności pomiędzy oznaczanymi metalami ciężkimi w próbkach osadów z fiordów Spitzbergenu przy wykorzystaniu technik chemometrycznych (analiz składników głównych PCA).</li> <li>Pisaniu publikacji, w tym: wybraniu literatury cytowanej, zebraniu wyników oznaczeń, sformułowaniu wniosków z pracy, graficznym przedstawieniu wyników oznaczeń i korekcie pracy przed złożeniem do druku</li> </ol> <p><b>Mój udział procentowy wynosił 30%.</b></p>
<p><b>H5</b></p>	<p><b>Zioła-Frankowska, A.</b>, Frankowski, M., Novotny, K., Kanicky, V. (2014) <i>Comparison of the level of boron concentrations in black teas with fruit teas available on the polish market</i>. Scientific World Journal Article ID 898425, DOI. 10.1155/2014/898425.</p> <p><b>IF= 1.290/1.300/- punkty MNiSW=30</b></p> <hr/> <p>Mój udział polegał na:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Opracowaniu koncepcji badań.</li> <li>Zaplanowaniu badań, wyborze i optymalizacji stosowanej techniki analitycznej (ICP-OES).</li> <li>Opracowaniu metody przygotowania próbek herbat do analiz na zawartość boru, w tym procedury ekstrakcji frakcji rozpuszczalnej w wodzie boru.</li> <li>Wyliczeniu dziennego zapotrzebowania przez człowieka na bor</li> <li>Pisaniu publikacji, w tym: wybraniu literatury cytowanej, zebraniu wyników oznaczeń, sformułowaniu wniosków z pracy, graficznym przedstawieniu wyników oznaczeń, korekcie pracy przed złożeniem do druku i korespondencji z edytorem i recenzentami.</li> </ol> <p><b>Mój udział procentowy wynosił 85%</b></p>
	<p><b>H6</b></p>

H7	<p><b>Zioła-Frankowska, A.,</b> Frankowski, M. (2016) <i>Determination of Metals and Metalloids in Wine Using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry and Mini-torch</i>. Food Analytical Methods. DOI: 10.1007/s12161-016-0567-6.  <b>IF= 2.167/2.003/2.167 punkty MNiSW=30</b></p> <hr/> <p>Mój udział polegał na:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Opracowaniu koncepcji badań.</li> <li>Zaplanowaniu badań i wyborze stosowanej techniki analitycznej (ICP-OES).</li> <li>Optymalizacji spektrometru ICP-OES pod kątem redukcji zużycia gazu podczas analiz.</li> <li>Opracowaniu metod przygotowania próbek win do analizy wielopierwiastkowej.</li> <li>Przeprowadzeniu analiz w próbkach win.</li> <li>Określeniu efektywności procedur przygotowania próbek win na poziom stężeń oznaczanych pierwiastków.</li> <li>Pisaniu publikacji, w tym: wybraniu literatury cytowanej, zebraniu wyników oznaczeń, sformułowaniu wniosków z pracy, graficznym przedstawieniu wyników oznaczeń, korekcie pracy przed złożeniem do druku i korespondencji z edytorem i recenzentami.</li> </ol> <p><b>Mój udział procentowy wynosi 90%</b></p>
H8	<p><b>Zioła-Frankowska, A.,</b> Kubaszewski, Ł., Dąbrowski, M., Kowalski A., Rogala P., Strzyżewski W., Łabędź W., Uklejewski R. Novotny K., Kanicky V., Frankowski M. (2015) <i>The content of the 14 metals in cancellous and cortical bone of the hip joint affected by osteoarthritis</i>. BioMed Research International Article ID 815648, DOI. 10.1155/2015.  <b>IF= 2.134/2.149/2.134 punkty MNiSW=20</b></p> <hr/> <p>Mój udział polegał na:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Opracowaniu koncepcji badań.</li> <li>Zaplanowaniu badań, wyborze i optymalizacji stosowanych technik analitycznych (ICP-OES, FAAS).</li> <li>Opracowaniu metody przygotowania próbek kości do analiz chemicznych.</li> <li>Przeprowadzeniu analizy zawartości pierwiastków w próbkach kości technikami FAAS i ICP-OES.</li> <li>Wykonaniu analizy statystycznej i chemometrycznej (test Shapiro-Wilka, test Kruskala-Wallisa, test Manna-Whitneya, korelacje Spermmana, analizę składników głównych PCA).</li> <li>Przeprowadzenie oceny potencjalnego zagrożenia dla zdrowia człowieka na podstawie uzyskanych wyników badań.</li> <li>Pisaniu publikacji, w tym wybraniu literatury cytowanej, zebraniu wyników oznaczeń, sformułowaniu wniosków z pracy, graficznym przedstawieniu wyników oznaczeń, korekcie pracy przed złożeniem do druku i korespondencji z edytorem i recenzentami.</li> </ol> <p><b>Mój udział procentowy wynosi 72,5%.</b></p>
H9	<p><b>Zioła-Frankowska, A.,</b> Dąbrowski, M., Kubaszewski, Ł., Rogala, P., Frankowski, M. (2015) <i>Factors affecting the aluminium content of human femoral head and neck</i>. Journal of Inorganic Biochemistry 152, 167-173.  <b>IF= 3.205/3.227/3.205 punkty MNiSW=35</b></p> <hr/> <p>Mój udział polegał na:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Opracowaniu koncepcji badań.</li> <li>Zaplanowaniu badań, wyborze i optymalizacji stosowanej techniki analitycznej GFAAS.</li> <li>Dobranie warunków pracy poszczególnych etapów pieca grafitowego do oznaczeń zawartości glinu w próbkach kości bez dodatku modyfikatora.</li> <li>Przeprowadzeniu analizy zawartości glin w próbkach kości techniką GFAAS.</li> <li>Wykonaniu analizy statystycznej i chemometrycznej (test Shapiro-Wilka, test Manna-Whitneya).</li> <li>Pisaniu publikacji, w tym: wybraniu literatury cytowanej, zebraniu wyników oznaczeń, sformułowaniu wniosków z pracy, graficznym przedstawieniu wyników oznaczeń, korekcie pracy przed złożeniem do druku i korespondencji z edytorem i recenzentami</li> </ol> <p><b>Mój udział procentowy wynosi 86,5%.</b></p>

**Zioła-Frankowska, A.,** Dąbrowski, M., Kubaszewski, Ł., Rogala, P., Kowalski A., Frankowski M. (2016) *An analysis of factors affecting the mercury content in the human femoral bone.* Environmental Science and Pollution Research. DOI: 10.1007/s11356-016-7784-9.

**IF= 2.760/2.876/2.760 punkty MNiSW=30**

Mój udział polegał na:

- H10**
- Opracowaniu koncepcji badań.
  - Zaplanowaniu badań, wyborze i optymalizacji stosowanej techniki analitycznej CV-AFS.
  - Oznaczeniu zawartości rtęci w próbkach kości techniką CV-AFS.
  - Określeniu wpływu czynników środowiskowych na zawartość rtęci w tkankach kostnych
  - Wykonaniu analizy statystycznej wyników badań
  - Pisaniu publikacji, w tym :wybraniu literatury cytowanej, zebraniu wyników oznaczeń, sformułowaniu wniosków z pracy, graficznym przedstawieniu wyników oznaczeń, korekcje pracy przed złożeniem do druku i korespondencji z edytorem i recenzentami

**Mój udział procentowy wynosił 83%.**

Sumaryczny IF	<b>22.439/24.001/22.656</b>
Średni IF na pracę	<b>2.2439/2.4001/2.2656</b>
Sumaryczna wartość punktów MNiSW dla 10 publikacji	<b>290</b>
Średni udział % habilitanki	<b>68,70%</b>

### 5.3. Autoreferat wraz z omówieniem osiągnięcia naukowego.

#### 5.3.1. Wstęp

Rozwój analityki chemicznej ukierunkowany jest głównie na opracowywanie nowych procedur analitycznych oraz na projektowanie i budowę nowych układów analitycznych wykorzystywanych do pozyskiwania informacji o jakościowym i/lub ilościowym składzie badanego obiektu. Coraz częściej w analityce poddaje się analizie obiekty badań, których próbki charakteryzują się złożonym składem matrycy tak jak np.: materiał roślinny, tkanka zwierzęca, tkanka ludzka, osad denny czy gleba. Rodzaj próbki niejednokrotnie determinuje wybór techniki analitycznej, która w obliczu ilości i rodzaju wprowadzanych do środowiska związków chemicznych, powinna być selektywna i wiarygodna. Stąd, konieczność stosowania łączonych technik analitycznych lub układów sprzężonych, które umożliwiają oznaczenie pierwiastków, w tym między innymi ksenobiotyków na niższych poziomach stężeń oraz pozwalają na przeprowadzenie analizy specyjnej z potwierdzeniem tożsamości analitu (Namieśnik i in. 2003). Należy podkreślić, że właściwości chemiczne, biologiczne i toksykologiczne danego pierwiastka zależą od formy w jakiej ten pierwiastek występuje. Doskonałym pierwiastkiem, który charakteryzuje się zmiennymi właściwościami w środowisku, w jakim występuje, jest glin, który może tworzyć liczne kompleksy mineralne i organiczne o różnym stopniu hydratacji. Ich wspólną właściwością jest łatwość przechodzenia w inne formy (metastabilność) oraz duża rozpuszczalność w środowisku przy pH<7,0. Za najbardziej toksyczne formy glinu uważa się: formę  $[Al(H_2O)_6]^{3+}$  jako  $Al^{3+}$ ,  $Al(OH)^{2+}$ ,  $Al(OH)_2^+$ ,  $Al(OH)_4^-$  oraz połączenia glinu w formie labilnych nieorganicznych kompleksów z fluorkami czy siarczanami (Exley i in.1999; Zioła-Frankowska i in. 2009).

Metale i niemetale obecne są w każdym komponencie środowiska, a ich toksyczność dotyczy zarówno flory, jak i fauny (Kot i Namieśnik2000). Występujące w środowisku przyrodniczym człowieka pierwiastki w sposób naturalny lub antropogeniczny mogą ulegać różnym przemianom fizyko-chemicznym, biochemicznym i chemicznym, pod wpływem zmiennych warunków środowiskowych, w tym czynników fizycznych, biologicznych czy chemicznych (O'Neill 1997). Ponadto

wzrastające stężenie metali ciężkich w środowisku przyrodniczym człowieka, stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi, żywych zasobów i systemów ekologicznych. Mobilność i rozpuszczalność metali, które niejednokrotnie nie ulegają biodegradacji i wykazują tendencje do akumulacji w organizmach żywych, stanowią tym samym podłoże wielu chorób i zaburzeń w prawidłowym funkcjonowaniu procesów metabolicznych (Sprynsky i in. 2006). Ponadto, metale po przedostaniu się do organizmu uczestniczą w procesie biotransformacji, a produkty tych przemian charakteryzują się inną toksycznością w odniesieniu do organizmów żywych. Zachodzące między pierwiastkami interakcje mogą mieć charakter synergistyczny i/lub antagonistyczny, powodując zaburzenia w optymalnych poziomach stężeń, co prowadzić może do ich wtórnego niedoboru czy toksyczności (Goyer 1997). Dlatego, tak ważne jest oznaczenie zarówno ogólnej zawartości jak i identyfikacja, i ilościowe oznaczenie konkretnych form chemicznych pierwiastka w badanej próbce.

Oddzielnym zagadnieniem, które jest fundamentalne we współczesnej chemii analitycznej jest przygotowanie próbek do analizy chemicznej wraz z uwzględnieniem tego etapu analitycznego do końcowego schematu oznaczeń jakościowych i ilościowych. Należy podkreślić, że to właśnie etap przygotowania próbki w zależności od rodzaju oznaczanego analitu determinuje końcowy wynik oznaczenia. Złożoność składu matrycy próbek poddawanych przygotowaniu wymaga od analityka nie tylko wybrania i optymalizacji techniki detekcji, ale przede wszystkim wiedzy oraz odpowiedniego dobrania metody przygotowania próbki do analizy. Stąd też, bardzo ważnymi etapami przygotowania próbki są między innymi: homogenizacja, analiza granulometryczna oraz następująca po nich mineralizacja w układach otwartych lub zamkniętych, czy też ekstrakcje jedno i wieloetapowe. Na tym etapie niezmiernie ważnym elementem jest właściwe scharakteryzowanie próbki oraz odpowiedź na pytanie „jak przygotować próbkę, aby otrzymany wynik charakteryzował całą analizowaną populację”? Doskonałym przykładem takiego toku analitycznego jest analiza granulometryczna, która stanowi wśród badaczy problem i stawia szereg pytań dotyczących m.in. sposobu prowadzenia analizy sitowej (na sucho czy na mokro?), jakiego roztworu dyspergującego należy użyć, aby nie wymyc metali z próbki, jak prowadzić selekcję na poszczególne frakcje granulometryczne i w końcu, jaką frakcję granulometryczną wykorzystać w badaniach? W kolejnym etapie w zależności od celów badań można stosować ekstrakcje i/lub mineralizację. Wśród nich, są ekstrakcje jedno i wieloetapowe, które pozwalają na uzyskanie informacji o potencjalnej mobilności metalu i możliwych mechanizmach jego remobilizacji/uwalniania z próbki do otoczenia pod wpływem np. zmiany pH, temperatury, stężenia ligandów itp. Czynniki te powodują, że zmiana ulega forma chemiczna danego pierwiastka w analizowanej próbce, a co za tym idzie jego biodostępność (Namieśnik i Rabajczyk 2010).

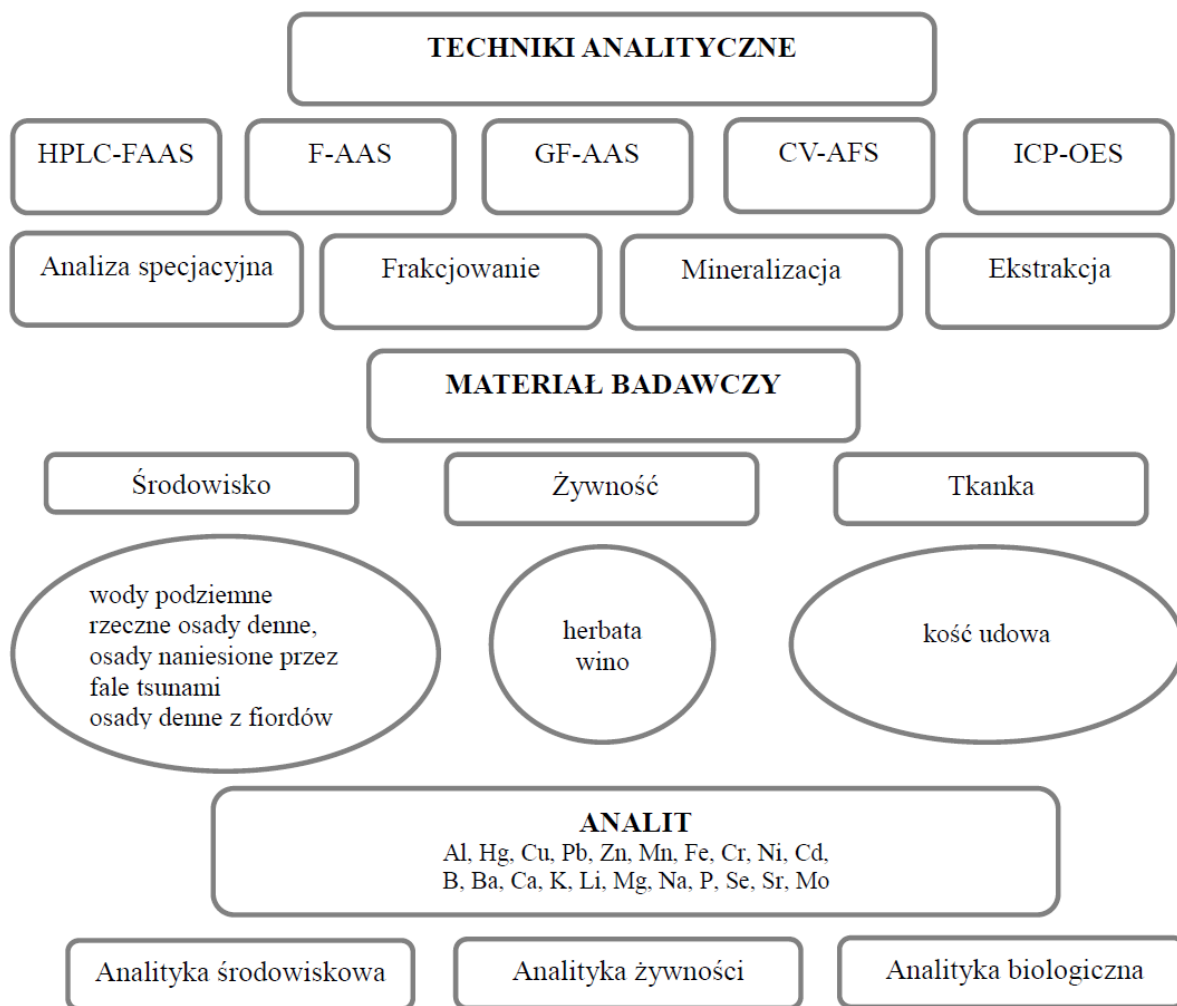
Podsumowując, uzyskany wynik analityczny wnosi do systemu badanego obiektu dane niezbędne do jego opisu, klasyfikacji, interpretacji oraz określenia jego stanu. Zarówno prace obejmujące określanie stężenia pierwiastków w różnych systemach środowiska przyrodniczego, jak i rozwiązywanie zadań analitycznych obejmujących ich oznaczenie w różnych komponentach środowiska czy próbkach biologicznych, stwarza możliwości lepszego rozumienia procesów związanych z występowaniem i migracją tych analitów.



### 5.3.2 Cele rozprawy habilitacyjnej

Tematyka przedstawianej rozprawy habilitacyjnej pt. „Zastosowanie analityki chemicznej w badaniach biologicznych i środowiskowych” obejmuje wyniki badań oznaczeń pierwiastków w różnych systemach środowiska przyrodniczego wraz z zastosowanymi przeze mnie rozwiązaniami analitycznymi. Analityka wielopierwiastkowa w publikacjach od H1 do H10 dotyczyła zastosowania analizy specjacyjnej, frakcjonowania i różnych metod ekstrakcji. Obejmowała zagadnienia z zakresu analityki takiej jak: analityka żywności, analityka środowiskowa i analityka biologiczna.

Nadrzędnym celem w ramach pracy habilitacyjnej było opracowanie nowych metod analitycznych przy wykorzystaniu technik spektrometrycznych i chromatograficznych do wielopierwiastkowej analizy próbek o zróżnicowanej matrycy. W przedstawionym cyklu publikacji, wykorzystywałam różne narzędzia analityczne i materiał badawczy, oznaczyłam różne anality oraz zastosowałam opracowane metody w różnych dziedzinach analityki (Rysunek 1). Opis cyklu 10 monotematycznych publikacji naukowych poprzedzają postawione przeze mnie hipotezy.



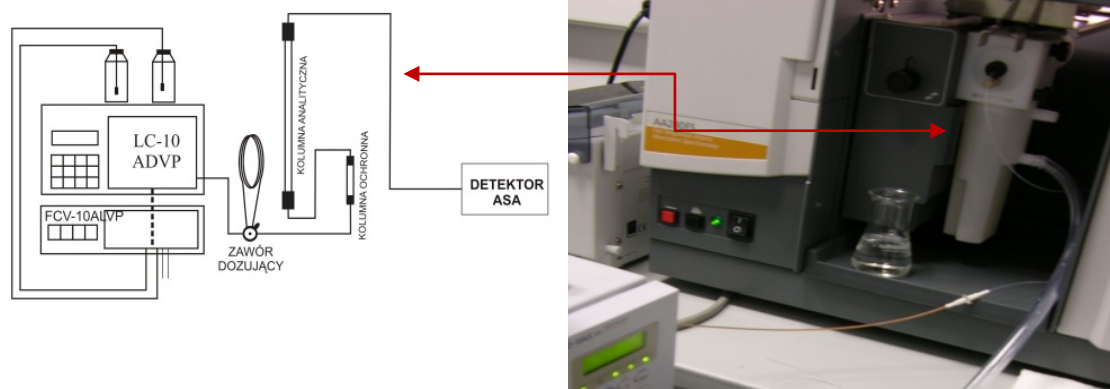
**Rys. 1** Schemat zakresu prac badawczych realizowanych w ramach pracy habilitacyjnej.

### 5.3.3. Omówienie najważniejszych osiągnięć zawartych w pracach stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego

#### ***Hipoteza do H1 i H2***

***Zastosowanie spektrometru absorpcji atomowej z atomizacją w płomieniu jako detektora chromatograficznego, pozwoli na przeprowadzenie analizy specjacyjnej glinu i kompleksów fluoroglinowych w roztworach modelowych i w próbkach środowiskowych.***

W publikacji H1 po raz pierwszy zastosowałam spektrometr absorpcji atomowej z atomizacją w płomieniu, jako detektor chromatograficzny w analizie specjacyjnej glinu w roztworach modelowych i w próbkach rzeczywistych. Wykonanie analizy specjacyjnej wymagało przede mnie opracowania optymalnych warunków pracy spektrometru absorpcji atomowej i chromatografu cieczowego. Celem moich badań było stworzenie układu łączonych technik analitycznych pracującego w systemie bezpośredniego połączenia z detektorem, który nie będzie wymagał zastosowania reakcji derywatywacji za kolumną chromatograficzną, tak jak w przypadku innych prac (np. Borman i Seubert 1996). Ponadto, żeby system pracował w systemie bezpośredniego połączenia z detektorem, wybrałam do układu atomizer płomieniowy, z atomizacją w płomieniu  $C_2H_2:N_2O$ . Należy podkreślić, że w przypadku atomizera z atomizacją w kuwecie grafitowej, system nie pracowałby w sposób ciągły, ponieważ eluat z kolumny analitycznej należałoby zbierać, a następnie dozować do wnętrza kuwety grafitowej (układ taki został wykorzystany przez Mitrovic i in. 1998; Bantan i in. 1998). Dlatego, w moim układzie analitycznym HPLC-FAAS połączyłam bezpośrednio za pomocą kapilary, analityczną kolumnę chromatograficzną z rozpylaczem atomizera płomieniowego spektrometru absorpcji atomowej, pełniącego rolę łącznika pomiędzy układem chromatograficznym, a spektrometrem. Na rysunku 2 przedstawiono schemat układu łączonych technik analitycznych HPLC-FAAS, zastosowany w pracy H1.



**Rys. 2** Schemat układu łączonych technik analitycznych HPLC-FAAS do równoczesnego oznaczania nieorganicznych (labilnych) form glinu w roztworach wodnych (H1 i H2).

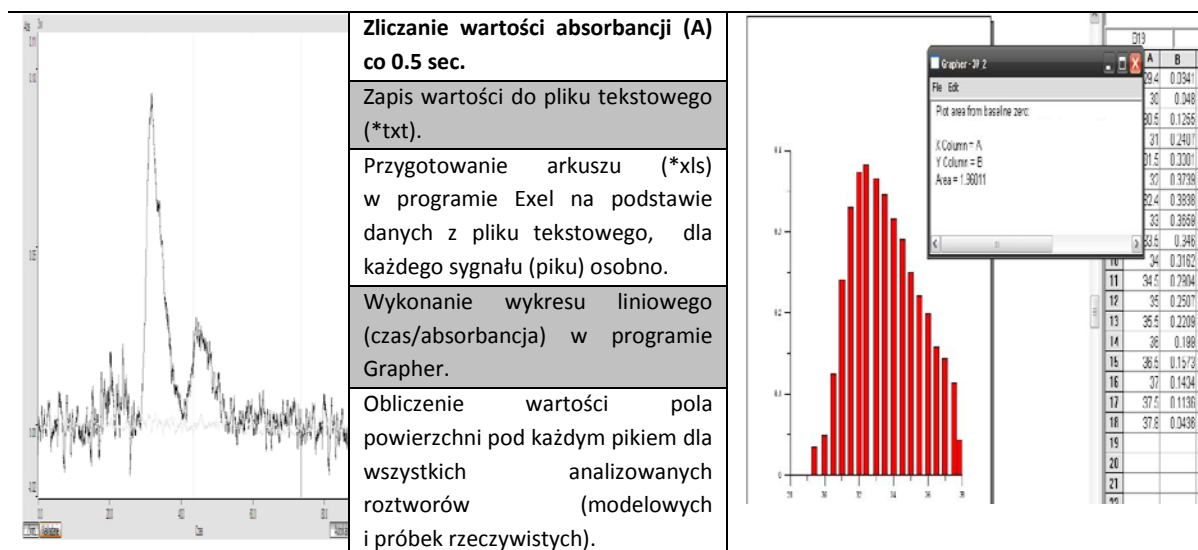
Analiza specjacyjna w nowym układzie analitycznym, miała na celu pełne rozdzielenie form glinu w związkach nieorganicznych, którymi były kompleksy glinu z fluorkami i forma  $Al^{3+}$  oraz detekcję

tych form przez spektrometr AA, podczas jednej analizy. Biorąc pod uwagę, że wykorzystanie chromatografii cieczowej daje wiele możliwości w oznaczeniach anionowych i kationowych form glinu (Bi i in.2001; Mitrovic i Milacic 2000; Lian i in.2004; Fairman i in.1998), założyłam, że rozdzielaniu chromatograficznemu w kolumnie analitycznej miały ulec kationowe formy  $\text{AlF}_2^+$ ,  $\text{AlF}^{2+}$  i  $\text{Al}^{3+}$ . Dlatego, dobranie odpowiedniej kolumny analitycznej, decydowało o przeprowadzeniu analizy specjacyjnej glinu w postaci kompleksów fluoroglinowych i formy  $\text{Al}^{3+}$  w układzie HPLC-FAAS. Ponadto, należy w tym miejscu dodać, że nie ma na rynku dostępnej kolumny chromatograficznej dedykowanej do oznaczeń glinu, tak jak w przypadku innych pierwiastków i ich form. Analizę specjacyjną form glinu prowadzono przy wykorzystaniu kationowych kolumn analitycznych, takich jak CS3 i CS2 (Dionex), jednak nie uzyskiwano pełnego rozdzielania chromatograficznego form fluoroglinowych ( $\text{AlF}_2^+$ ,  $\text{AlF}^{2+}$ ) i formy  $\text{Al}^{3+}$  (Motellier i Pitsch 1994; Willet 1989; Jones 1991). W moich badaniach wykorzystałam również dwie inne kolumny analityczne: IonPac CS5A firmy Dionex (kolumna analityczna dwuwymienna dedykowaną do oznaczeń metali dwuwartościowych i metali przejściowych) i Supelcosil™ LC-SCX firmy Supelco (kolumna analityczna kationowo wymienna). Sprawdziłam również wpływ składu fazy ruchomej na proces rozdzielania chromatograficznego. Wśród sprawdzonych eluentów, najbardziej efektywny był roztwór  $\text{NH}_4\text{Cl}$  o stężeniu 1,8 mol/L. W przypadku pozostałych, stosowanych eluentów:  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , nie uzyskałam pełnego rozdzielania chromatograficznego trzech form lub obserwowałam asymetrię i słabą rozdzielczość pików chromatograficznych ulegających elucji na początku i na końcu procesu.

Biorąc pod uwagę rodzaj kolumny i eluentu, pełne rozdzielanie trzech form glinu ( $\text{AlF}_2^+$ ,  $\text{AlF}^{2+}$  i  $\text{Al}^{3+}$ ) uzyskałam w kolumnie analitycznej IonPac CS5A+CG5A, dla roztworu modelowego zawierającego 100 mg/L glinu i 50 mg/L fluorków. W przypadku kolumny analitycznej Supelcosil™ LC-SCX uzyskałam pełne rozdzielanie tylko dwóch form ( $\text{AlF}^{2+}$  +  $\text{AlF}_2^+$  i  $\text{Al}^{3+}$ ) dla tego samego roztworu modelowego. Kolejnym etapem badań było dobranie przeze mnie warunków pracy spektrometru absorpcji atomowej z atomizerem płomieniowym, jako detektorem chromatograficznym. Konstrukcja atomizera w spektrometrach absorpcji atomowej wymaga ciągłego dostarczania próbki do rozpylacza, przy czym, aby uniknąć „pulsacji plazmy” konieczne jest doprowadzenie odpowiedniej objętości cieczy, która łączy się w komorze rozpylacza z  $\text{N}_2\text{O}$  i  $\text{C}_2\text{H}_2$ . Dlatego też, aby zapewnić wystarczającą ilość analitu wprowadzaną do rozpylacza atomizera płomieniowego, natężenie przepływu fazy ruchomej musiało być wysokie i wynosiło 2 mL/min, generując tym samym wysokie ciśnienie dla kolumny wykonanej z materiału PEEK. Zastosowanie wysokich przepływów fazy miało również swoje uzasadnienie w ograniczeniach oprogramowania detektora, który umożliwia zliczenie uzyskanego sygnału w postaci powierzchni piku tylko w ciągu 59 sec. dla jednej analizy, bez możliwości zwiększenia tej wartości. Ograniczenia oprogramowania wykorzystywanego spektrometru AA (Perkin Elmer Analyst 300) nie umożliwiały mi na techniczne wyodrębnienie sygnału analogowego, co pozwoliłoby mi wykorzystać inne zewnętrzne oprogramowanie do zliczenia poszczególnych sygnałów. Wykorzystałam natomiast jedną z funkcji oprogramowania (Continuous Graphics), dzięki czemu mogłam zaobserwować zmiany sygnału w trakcie całej analizy oraz manualnie określić czas wzrostu sygnału odpowiadającego poszczególnym rozdzielonym formom glinu. Stąd, pierwszy sygnał (pik) obserwowany był w czasie 5.47 min., drugi 5.56 min., i trzeci 6.02 min. Identyfikacja jakościowa poszczególnych form glinu przy każdej analizie poprzedzona była obserwacją czasu wzrostu sygnału w czasie rzeczywistym. Na podstawie badań literaturowych (Montes-Bayón i in. 1999; Drabek i in.2003; Tsunoda i in. 2001) i własności rozdzielania składników mieszaniny według wzrastającego ładunku, stwierdziłam że pierwszy sygnał analityczny w procesie elucji będzie odpowiadał formie

$\text{AlF}_2^+$ , następnie  $\text{AlF}^{2+}$  i ostatni formie  $\text{Al}^{3+}$ . Następnie opracowane warunki pracy nowego układu analitycznego wykorzystałam w badaniach roztworów modelowych, zawierających stałe stężenie glinu i zmienne stężenie jonów  $\text{F}^-$ , w celu przeprowadzenia analizy specjacyjnej połączeń kompleksowych glinu z fluorkami o ogólnym wzorze  $\text{AlF}_n^{(3-n)+}$ . Uzyskane chromatogramy przedstawiały poszczególne rozdzielone formy fluoroglinowe i formę  $\text{Al}^{3+}$ . Przeprowadzona analiza roztworów modelowych potwierdziła, że występowanie danej formy przy stałym stężeniu glinu zależne było od zmieniającego się stężenia jonów  $\text{F}^-$ . Na podstawie wyników badań zaobserwowałam, że stechiometria pomiędzy  $\text{Al}:\text{F}$  decydowała o występowaniu danej formy glinu. Stwierdziłam, że wraz ze wzrostem stężenia jonów  $\text{F}^-$ , wzrastał udział form fluoroglinowych, z jednoczesnym mniejszym udziałem formy  $\text{Al}^{3+}$ . Natomiast wysokie stężenia glinu powodowały dominujący udział formy  $\text{Al}^{3+}$  w stosunku do form  $\text{AlF}_2^+$  i  $\text{AlF}^{2+}$ . Stąd, nie dla wszystkich analizowanych roztworów modelowych uzyskałam rozdzielanie trzech form. Przeprowadzona przeze mnie analiza roztworów modelowych w nowym układzie analitycznym HPLC-FAAS potwierdziła możliwość wykonania analizy specjacyjnej glinu i jego form fluoroglinowych. Dlatego, opracowaną metodę wykorzystałam w analizie jakościowej tych form w próbkach wód podziemnych, charakteryzujących się wysokim stężeniem glinu i fluorków oraz niskimi wartościami pH, co sprzyja tworzeniu się połączeń kompleksów glinu z fluorkami. Dla wszystkich analizowanych próbek wód, uzyskałam pełne rozdzielanie chromatograficzne trzech form glinu oraz zaobserwowałam, że tak jak w przypadku roztworów modelowych, udział danej formy zależny był od stechiometrii pomiędzy  $\text{Al}:\text{F}$ , co potwierdziłam również w programie do chemicznego modelowania matrycy Mineql.

Badania nad specjacją glinu i jego formami fluoroglinowymi kontynuowałam w kolejnej publikacji H2, w której razem w zespole Profesora Jerzego Siepaka uczestniczyłam w badaniach nad opracowaniem metody umożliwiającej zarówno analizę jakościową, jak i ilościową rozdzielonych w procesie chromatograficznym form glinu. Połączony przeze mnie nowy układ łączonych technik analitycznych HPLC-FAAS w publikacji H1, potwierdził stawiane przeze mnie hipotezy o możliwości analizy specjacyjnej glinu nie tylko w roztworach modelowych, ale również w próbkach rzeczywistych. Jednak poważnym ograniczeniem tej metody była możliwość wykonania analizy jakościowej poszczególnych form glinu, ponieważ oznaczony wynik stężenia z detektora był sumą wszystkich form występujących w próbce. Należy podkreślić, że dostępne na rynku oprogramowania spektrometrów absorpcji atomowej bardzo często posiadały liczne ograniczenia, które uniemożliwiały przeprowadzenie analizy ilościowej, m.in. zbyt krótki czas integracji sygnału czy brak możliwości zliczania pola powierzchni pod uzyskanymi sygnałami analitycznymi w postaci pików. Dlatego, dla nowej metody HPLC-FAAS, wykorzystałam spektrometr AA innej firmy. Schemat układu był taki sam jak w publikacji H1, natomiast zmianie uległ program elucji gradientowej, ze względu na zastosowanie innego oprogramowania detektora AA. Wynikiem tego było skrócenie czasu analizy z 8 min. (H1) do 4 min. (H2). Zarówno kolumna analityczna oraz skład i stężenie fazy ruchomej pozostał taki sam jak w przypadku analizy jakościowej form  $\text{AlF}_x$ . Natomiast zastosowanie oprogramowania Spectraa 5.1. pro (Varian, USA), pozwoliło na wykonanie analizy ilościowej w układzie analitycznym HPLC-FAAS. Pomimo krótkiego czasu zliczania sygnału analitycznego: 30 sekund, w programie była dostępna opcja wykonania powtórzeń tej wartości, przy jednoczesnej ciągłości zliczania sygnału. Stąd, sygnał analityczny zbierany był w czasie  $3 \times 30$  sekund, jako jeden ciąg (90 sekund). Schemat opracowywania wyników ze spektrometru AA przedstawiono na rysunku 3.



**Rys.3** Schemat analizy ilościowej form glinu w układzie analitycznym HPLC-FAAS.

Układ łączonych technik analitycznych HPLC-FAAS zarówno w publikacji H1, jak i H2 umożliwił mi przeprowadzenie analizy specjacyjnej form fluoroglinowych. W publikacji H1 oznaczyłam trzy kationowe formy  $\text{AlF}_2^+$ ,  $\text{AlF}_2^+$  i  $\text{Al}^{3+}$ . Natomiast przeprowadzone modelowanie chemiczne w programie Mineql potwierdziło występowanie form kationowych, jak również form  $\text{AlF}_3^0$ ,  $\text{AlF}_4^-$ , choć na znacznie niższych poziomach stężeń ( $10^{-10}$ - $10^{-16}$  mol/L). W publikacji H2, wyniki chemicznego modelowania potwierdziły, że udział danej formy glinu zależy od stechiometrii pomiędzy glinem a fluorkami (H1). Ponadto zaobserwowano, że przy stężeniu fluorków wyższym niż stężenie glinu zaczynały tworzyć się również formy  $\text{AlF}_3^0$  oraz forma anionowa  $\text{AlF}_4^-$ . Dlatego zmianie uległa sekwencja form glinu: pierwszy sygnał (1PA) analityczny jako forma  $\text{AlF}_2^+$  i/lub  $\text{AlF}_4^-$ ; drugi sygnał (2PA) jako forma  $\text{AlF}_2^+$  i/lub  $\text{AlF}_3^0$  i trzeci sygnał (3PA) jako forma  $\text{Al}^{3+}$ .

Podobnie jak w przypadku publikacji H1, analizie specjacyjnej poddano próbki środowiskowe. W próbkach ekstraktów wodnych zanieczyszczonych gleb oznaczono wszystkie trzy formy glinu, ze znaczną dominacją form fluoroglinowych. W glebach zawartość fluorków była prawie 3 krotnie wyższa niż zawartość całkowita glinu. Stąd, przewaga form fluoroglinowych w próbkach gleb, w przeciwieństwie do próbek wód podziemnych, gdzie dominowała forma  $\text{Al}^{3+}$ . Wyniki badań potwierdzono w programie do chemicznego modelowania (Mineql).

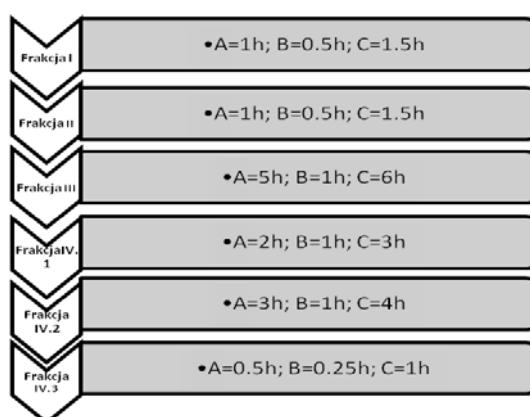
### **Hipoteza do H3, H4 i H5**

***Występowanie form glinu i metali ciężkich w stałych próbkach środowiskowych zależy od zastosowanej metody przygotowania próbki, wykorzystującej ekstrakcje jedno i wieloetapowe.***

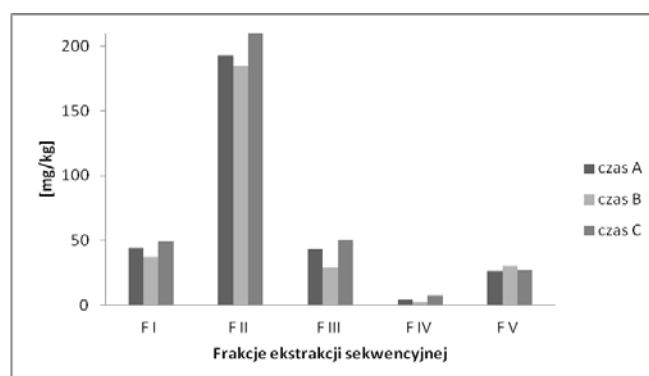
Kontynuacją moich badań w ramach pracy habilitacyjnej było nie tylko zastosowanie w analityce chemicznej analizy specjacyjnej, ale także wykorzystanie metod frakcjonowania. Należy podkreślić, że wykorzystanie frakcjonowania na drodze ekstrakcji jednoetapowych czy wieloetapowych stwarza możliwości we współczesnej analityce środowiskowej zarówno pod kątem poznania procesów migracji pierwiastków, ale także stanowi źródło informacji o toksyczności metali, ich dostępności biologicznej i mobilności (Kot i Namieśnik 2000; Bacon i Davidson 2008). Tematyka frakcjonowania została przedstawiona przeze mnie w publikacjach H3, H4 i H5.

Zgodnie z definicją Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC) frakcjonowanie polega na stopniowym wydzieleniu oznaczanego pierwiastka w różnych formach poprzez działanie specyficznym ekstrahentem/ekstrahentami o wzrastającej sile elucyjnej i może być prowadzone na drodze ekstrakcji jednoetapowych lub wieloetapowych (zwanym w literaturze, jako ekstrakcje sekwencyjne) (Templeton i in. 2000).

W publikacji H3, wykorzystałam ekstrakcję sekwencyjną w analizie metali Cu, Pb, Zn, Fe i Mn w próbkach rzecznych osadów dennych. Przeprowadziłam optymalizację procedury ekstrakcji oraz sprawdziłam, jak etap przygotowania próbek stałych będzie wpływał na wyniki analizy frakcjonowania. Procedura ekstrakcji sekwencyjnej wg. Tessiera i in. (1978) realizowana jest w pięciu etapach. W publikacji H3, poddałam optymalizacji czas ekstrakcji dla każdego etapu frakcjonowania oraz dobrałam odpowiednie ekstrahenty. Nadrzędnym celem pracy było stworzenie takiej procedury, która będzie przede wszystkim bezpieczna oraz szybka i odtwarzalna w każdych warunkach laboratoryjnych. Na rysunku 4 przedstawiłam zastosowane przeze mnie czasy ekstrakcji dla poszczególnych etapów, bez etapu V, gdzie ekstrakcję prowadzi się do momentu całkowitego rozтворzenia próbki.



**Rys. 4** Warunki optymalizacji czasów ekstrakcji poszczególnych etapów ekstrakcji sekwencyjnej (etapy I do IV).



**Rys. 5** Wyniki oznaczeń dla Pb we frakcjach ekstrakcji sekwencyjnej w zależności od czasów poszczególnych etapów.

Największe różnice w oznaczanych stężeniach w zależności od różnych czasów etapów ekstrakcji zaobserwowałam w przypadku Pb (Rysunek 5). Zarówno skrócenie czasu w etapie F(I) i F(II) o 50%, w etapie F(III) i F(IV) do 1 godziny (czas B) oraz wydłużenie (czas C) czasu o 50% w etapach F I i F(II) oraz o 1 godzinę w etapach F(III) i F(IV) w porównaniu do czasu A, miało odzwierciedlenie

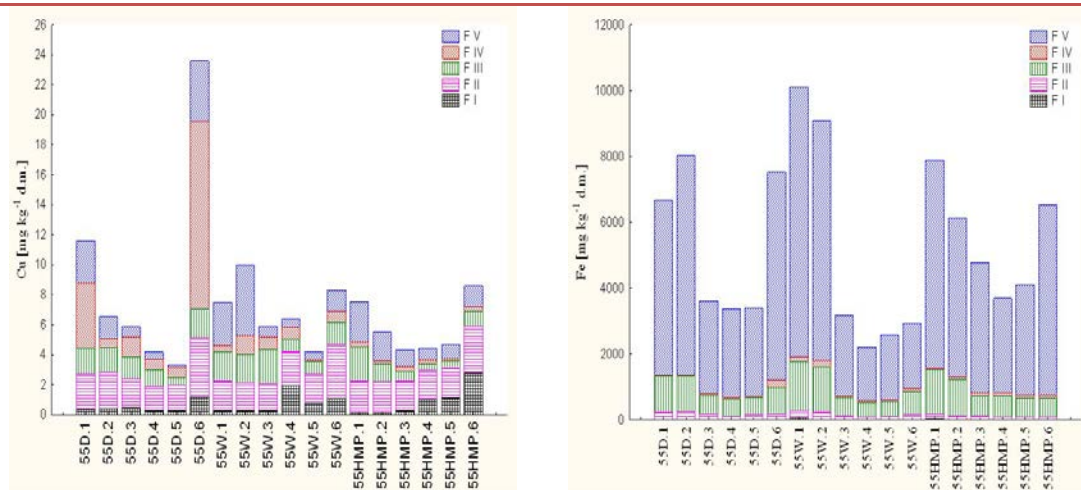
w uzyskanych wynikach stężenia Pb. Dla pozostałych metali, zaobserwowałam, że skrócenie czasu ekstrakcji w poszczególnych etapach (czas B) powodowało znaczne obniżenie stężenia analizowanych metali. W przypadku wydłużenia czasu ekstrakcji (czas C) nie zaobserwowałam znaczącego wpływu na wartości stężeń oznaczanych metali w porównaniu do czasu A. Stąd, w dalszych badaniach prowadziłam ekstrakcję według odpowiednio dobranego czasu A (Rysunek 4). Kolejnymi modyfikacjami, które zostały przeze mnie zastosowane dotyczyły przeprowadzenia wszystkich etapów ekstrakcji w jednym naczyniu reakcyjnym na płycie grzejnej z mieszaniem magnetycznym. Modyfikacja ta pozwoliła mi uniknąć strat analitu z poszczególnych etapów ekstrakcji. Należy podkreślić, że w procedurze wg. Tessiera i in. (1978) próbka po każdym etapie jest przenoszona do innego naczynia reakcyjnego, co stanowi źródło znacznych strat próbki. Ponadto, żeby dodatkowo ograniczyć możliwe straty analitu, ekstrakcję prowadziłam w zamkniętych naczyniach reakcyjnych (butelki z politetrafluoroetylenem - PTFE). W procedurze ekstrakcji sekwencyjnej wg. Tessiera i in. (1978) zmieniłam również ekstrahenty dla frakcji (V), litogennej, zastępując stężony kwas HClO<sub>4</sub> (Walna i in. 2005), mieszaniną stężonych kwasów: HF, HNO<sub>3</sub> oraz H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabela 1). Zastosowane przeze mnie odczynniki w znacznym stopniu wpłynęły na wzrost bezpieczeństwa prowadzonych badań oraz pozwoliły na szybsze i pełne rozpuszczenia struktury glinokrzemianów. Opracowana przeze mnie procedura ekstrakcji sekwencyjnej została wykonana również dla próbki certyfikowanego materiału odniesienia dla osadu rzecznoego (NCS DC 78301, China National Analysis Center for Iron and Steel). Uzyskałam wysokie wartości odzysku metody na poziomie >100% dla wszystkich analizowanych metali, co potwierdza selektywność zaproponowanej przeze mnie procedury ekstrakcji metali z osadów rzecznych.

**Tab.1** Dobrane etapy ekstrakcji sekwencyjnej.

ETAP	FRAKCJA	EKSTRAHENTY	TEMPERATURA EKSTRAKЦИИ [°C]	CZAS EKSTRAKЦИИ [h]
I	Metale wymienne	10 ml 1 M CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> pH=7	pokojsowa	1
II	Metale związane z węglanami	20 ml CH <sub>3</sub> COONa pH=5 (CH <sub>3</sub> COOH)	pokojsowa	1
III	Metale związane z tlenkami Fe i tlenkami Mn	20 ml 0.04 M NH <sub>2</sub> OH·HCl w 20% (v/v) CH <sub>3</sub> COOH	95	5
IV	Metale związane z materią organiczną	5 ml 0.02 M HNO <sub>3</sub> +5 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> pH=2	85	2
		5 ml 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> pH=2 (HNO <sub>3</sub> )	85	3
		10 ml 3.2 M CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> w 20% (v/v) HNO <sub>3</sub>	pokojsowa	0.5
V	Metale związane z glinokrzemianami	3 ml HNO <sub>3</sub> + 3 ml HF+3 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	95	0.5
		3 ml HNO <sub>3</sub> + 3 ml HF	95	1
		3 ml HF	95	3

Nowym podejściem w analizie form metali w próbkach stałych, było przeprowadzenie przeze mnie frakcjonowania nie tylko w jednej frakcji granulometrycznej, ale w wydzielonych siedmiu frakcjach: >2.0; 2.0-1.0; 1.0-0.5; 0.5-0.25; 0.25-0.1; 0.1-0.063 i <0.063 mm. W pracy zwróciłam szczególną uwagę na dobranie odpowiedniej metody analizy granulometrycznej, wykorzystując

analizę na sucho, na mokro w układzie otwartym z obiegiem wody i na mokro w układzie zamkniętym z odczynnikiem dyspergującym (hexametrafosforanem sodu - HMP). Przeprowadzając analizę granulometryczną różnymi metodami chciałam sprawdzić, jak ten etap przygotowania próbki, związany z dobraniem odpowiedniej średnicy ziarna, będzie wpływał na poziom stężeń metali w poszczególnych etapach ekstrakcji sekwencyjnej. Należy podkreślić, że najczęściej wybieraną metodą przygotowania próbek stałych jest analiza granulometryczna na sucho (Rao i in. 2007; Sutherland 2002; Abolino i in. 2002), gdzie najdrobniejsza frakcja może występować na powierzchni frakcji grubszych. Stąd przyjmuje się, że w przypadku analizy na mokro należy spodziewać się niższych wyników w stosunku do wyników z analizy granulometrycznej na sucho. W publikacji H3, przeprowadzona analiza granulometryczna osadów rzecznych różnymi metodami nie wykazała znaczącego wpływu na udział frakcji pod względem wielkości ziarna. Natomiast zaobserwowałam, że stosując metody na mokro, udział frakcji 0.1-0.063 mm był większy w porównaniu do analizy granulometrycznej prowadzonej na sucho. Z punktu widzenia prowadzonych przeze mnie badań, istotnym etapem było dla mnie określenie wpływu metody analizy granulometrycznej na stężenia metali w pięciu frakcjach chemicznych. Zaobserwowałam, że rodzaj wykonania analizy granulometrycznej miał znaczący wpływ na wartości stężeń, w zależności od oznaczanego metalu. Stwierdziłam różnice w stężeniach Cu w (IV) i (V) etapie frakcjonowania w zależności od metody analizy granulometrycznej (znacznie wyższe stężenia Cu we frakcji (IV), zwłaszcza we frakcjach granulometrycznych najgrubszych i najdrobniejszych oznaczono w metodzie na sucho). Dla Pb oznaczyłam wyższe stężenia we frakcjach chemicznych (I) i (II) dla próbek poddanych analizie granulometrycznej na sucho. W przypadku Zn wyższe stężenia (I) i (II) frakcja chemiczna oznaczyłam w próbkach z analizy granulometrycznej na mokro, zwłaszcza z odczynnikiem dyspergującym HMP. Dla Fe i Mn nie stwierdziłam znaczących różnic w stężeniach w zależności od zastosowanych metod granulometrycznych. Stwierdziłam, że najwyższe stężenia występowały we frakcji 0.1-0.063 mm oraz >2.0 i 2.0-1.0 mm dla wszystkich analizowanych pierwiastków dla każdej z wykorzystanych metod analizy granulometrycznej (Rysunek 6).



**Rys. 6** Wpływ przygotowania próbki na frakcjonowanie Cu i Fe w osadach dennych (legenda: D – analiza granulometryczna na sucho, W – analiza granulometryczna na mokro, HMP – analiza granulometryczna na mokro z odczynnikiem dyspergującym HMP, 1-6 – frakcje granulometryczne od >2.0 do 0.1-0.063 mm).



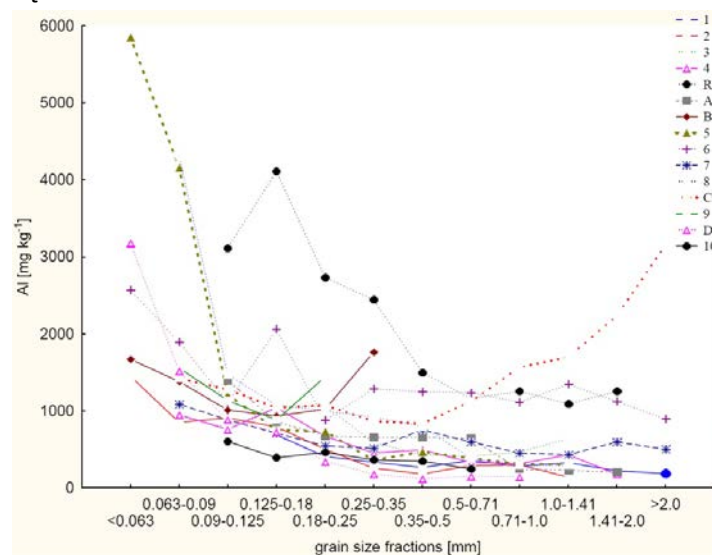
Podsumowując, w publikacji H3 po raz pierwszy przeprowadziłam ekstrakcje sekwencyjną wraz z prezentowanymi w pracy modyfikacjami w siedmiu frakcjach granulometrycznych osadów dennych pobranych z rzeki Odry i rzeki Warty. Zmodyfikowana procedura ekstrakcji sekwencyjnej według schematu zaproponowanego przez Tessiera i in. (1978) pozwoliła mi na ograniczenie do minimum strat analitu wynikających z pierwotnej procedury ekstrakcji prowadzonej w systemie otwartym. Ponadto, warunki ekstrakcji zastosowane przeze mnie w piątym etapie zdecydowanie wpłynęły na wzrost bezpieczeństwa pracy oraz umożliwiły mi na uzyskanie pełnego rozтворzenia próbki. Dlatego też, możliwe było oznaczenie całkowitej zawartości badanych metali w osadach dennych, a nie tylko „pseudo” całkowitej zawartości. Ponadto biorąc pod uwagę wpływ przygotowania próbki do analizy chemicznej jako zagadnienia związanego z selektywnością, stwierdziłam różnice w oznaczonych stężeniach badanych metali w poszczególnych etapach ekstrakcji sekwencyjnej, związane z metodą analizy granulometrycznej.

Kolejne zadanie badawcze realizowane przeze mnie w ramach pracy habilitacyjnej dotyczyło opracowania metody ekstrakcji jednoetapowej umożliwiającej wyodrębnienie jednej frakcji o określonych właściwościach. Ekstrakcja jednoetapowa miała umożliwić mi przeprowadzenie analizy form metali łatwo wymienialnych zwanych także dostępnymi biologicznie. Realizacja tego zadania została przedstawiona w publikacjach H4 i H5. Biorąc pod uwagę aspekt środowiskowy, frakcjami łatwo dostępnymi biologicznie w środowisku przyrodniczym człowieka są dwie pierwsze frakcje, a zwłaszcza frakcja (I), charakteryzująca metale łatwo wymienialne. Przeprowadzona ekstrakcja sekwencyjna certyfikowanego materiału odniesienia NCS DC 78301 w pracy H3 wykazała, że zawartość metali we frakcji (I) i (II) została oznaczona w zakresie od <1 do 30% całkowitej zawartości metali we wszystkich pięciu frakcjach. Dlatego, w publikacjach H4 i H5 miałam na celu opracowanie szybkiej i prostej metody ekstrakcji, umożliwiającej na ilościowe oznaczenie frakcji mobilnych metali ciężkich, Fe, Mn i Al w stałych próbkach środowiskowych.

Ekstrakcje jednoetapową przeprowadziłam przy wykorzystaniu 3 mol/L kwasu chlorowodorowego (I). W celu ograniczenia strat analitu, u wylotu kolby stożkowej umieszczałam kolumnę szklaną typu Vigroux. W celu sprawdzenia selektywności metody ekstrakcji jednoetapowej w publikacji H4, wykonałam analizę certyfikowanego materiału odniesienia NIST SRM 2709 (National Institute of Standards and Technology, USA) uzyskując odzysk dla metody z 3 mol/L kwasem HCl na poziomie  $25.6 \pm 0.7\%$  całkowitej zawartości glinu. Ponadto sprawdziłam, jak stężenie ekstrahenta, będzie wpływało na wartości odzysku. I tak, dla stężenia ekstrahenta wynoszącego: 3,0; 1,0; 0,5; 0,1 i 0,001 mol/L uzyskałam odpowiednio następujące wartości odzysków (%)  $25.6 \pm 0.7$ ;  $11.5 \pm 0.5$ ,  $3.2 \pm 0.3$ ,  $0.12 \pm 0.01$  i  $0.017 \pm 0.005$ . Dla porównania Walna i in. (2005) uzyskała odzysk dla trzech pierwszych frakcji glinu według procedury Tessiera i in. (1978), na poziomie 13.7%, a Sutherland i Tack (2002) dla trzech pierwszych frakcji (Al, Cu, Fe, Mn, Pb i Zn) według procedury BCR uzyskali wartości 12.6% (SRM 2710) i 12.8% (SRM 2711). Dlatego, w publikacjach H4 i H5 zastosowałam opracowaną metodę ekstrakcji jednoetapowej z wykorzystaniem 3 mol/L HCl w próbkach osadów naniesionych przez falę tsunami (H4) i osadów pobranych z fiordów z wyspy Spitzbergen (H5).

W publikacji H4, przedstawiłam po raz pierwszy na świecie wyniki oznaczeń labilnej formy glinu w próbkach naniesionych przez falę tsunami zdeponowanych w prowincji Patong Bay na wyspie Phuket i w pobliżu Nham Kem w prowincji Phang Nga oraz w próbce z plaży, osadów podścielających osady tsunami („pre 2004 tsunami”) i w próbkach z wioski Thung Tuk, nie zalanej przez falę tsunami. Unikatowość prowadzonych przeze mnie badań w ramach publikacji H4 dotyczyła oznaczenia labilnej

formy glinu, rodzaju próbek oraz przeprowadzenia ekstrakcji nie tylko w jednej frakcji granulometrycznej, ale w dwunastu wyodrębnionych frakcjach granulometrycznych. Należy podkreślić, że uziarnienie od dawna jest uważane za jeden z czynników wpływających na zdolności akumulowania zanieczyszczeń w osadzie. Stąd, analiza ilościowa labilnej formy glinu w istotny sposób przyczyniła się do ekstrapolacji wyników jako, że osady tsunami charakteryzowały się znaczną zmiennością teksturalną (Shiki i in. 2008). Ponadto środowiskowymi następstwami fali tsunami było: zasolenie gleb, wód gruntowych i powierzchniowych, uwalnianie zanieczyszczeń z podmorskich i lądowych składowisk czy depozycja znacznych ilości osadów głównie morskiego pochodzenia na zalanych terenach (Moore i in.2006). Ten ostatni czynnik był szczególnie istotny, ponieważ spowodował on nie tylko pokrycie dawnej gleby, ale zdeponowane osady mogły zawierać zanieczyszczenia – na przykład metale ciężkie (Szcuciński i in. 2005; Szcuciński i in. 2007), które będąc obecne w podwyższonych stężeniach we frakcjach wymienialnych (labilnych) z czasem mogłyby zostać uwolnione do wód gruntowych bądź ulec wtórnej akumulacji w roślinach. W publikacji H4 oznaczyłam stężenie labilnej formy glinu we wszystkich próbkach pobranych z warstwy powierzchniowej oraz z profili pionowych. Podobnie jak w publikacji H3, stwierdziłam istotny wpływ wielkości frakcji granulometrycznej na oznaczany poziom stężeń glinu. Na rysunku 7 przedstawiono wpływ wielkości frakcji granulometrycznej na stężenie glinu w próbkach osadów naniesionych przez falę tsunami.



**Rys. 7** Zmienność stężenia labilnej formy glinu w poszczególnych frakcjach granulometrycznych w próbkach z osadów naniesionych przez falę tsunami z warstwy powierzchniowej.

Dla próbek osadów naniesionych przez falę tsunami najwyższe stężenie labilnej formy glinu oznaczyłam w próbie (5) we frakcji <0.063 mm (5850 mg/kg), dla próbki gleby z terenów nie dotkniętych skutkami tsunami (próbka R) we frakcji 0.125-0.18 mm (4110 mg/kg) a dla próbki pobranej z terenu plaży (nr 10) we frakcji 0.09-0.125 mm (603 mg/kg). Stwierdziłam zmienność stężenia labilnej formy glinu w zależności od wielkości frakcji granulometrycznej, z istotną zależnością wzrostu stężenia glinu wraz ze zmniejszającą się średnicą ziarna. Ponadto warto podkreślić, że pomimo iż zastosowałam rozcieńczony kwas HCl, który powodował ekstrakcję z powierzchni ziarna osadu labilnej formy glinu, a nie powodował uwalniania się glinu wbudowanego w struktury mineralne, oznaczone przeze mnie stężenia były na wysokim poziomie, zarówno w próbkach

naniesionych przez falę tsunami, jak i w pozostałych. Biorąc pod uwagę wzrost stopnia zanieczyszczenia terenów dotkniętych skutkami fal tsunami, przeprowadzona przeze mnie ekstrakcja jednoetapowa kwasem HCl jest istotna, ponieważ glin jest powszechnie występującym pierwiastkiem w skorupie ziemskiej, a jego rozpuszczalne formy wykazują negatywne oddziaływanie na poszczególne komponenty środowiska przyrodniczego, co w przypadku osadów tsunami może być efektem o działaniu długoterminowym.

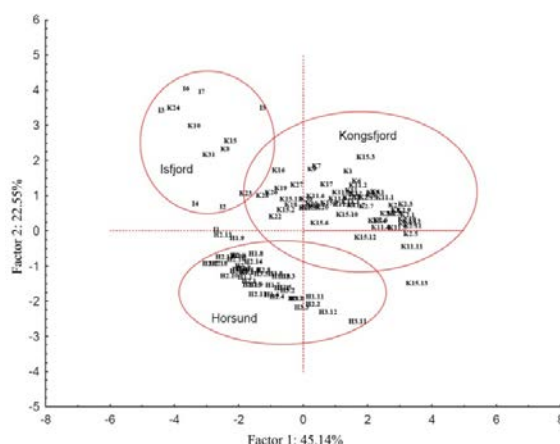
W kolejnej publikacji H5 kontynuowałam tematykę ekstrakcji jednoetapowej przy wykorzystaniu 3 mol/L HCl oznaczając labilną formę metali: Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn, Fe, Mn i Al w próbkach pobranych z fiordów Spitzbergenu. Określiłam również zależności pomiędzy oznaczanymi metalami przy wykorzystaniu metod statystycznych. W celu sprawdzenia procedury analitycznej oznaczania labilnej formy metali, tak jak w przypadku pracy H4, przeprowadziłam ekstrakcję jednoetapową 3 mol/L HCl w certyfikowanym materiale odniesienia NIST SRM 2709 (National Institute of Standards and Technology, USA) oraz zgodnie z zaleceniem producenta, wykonałam mineralizację z wykorzystaniem metody EPA 3050b (rekomendowanej dla materiału SRM 2709). W tabeli 2 przedstawiłam wyniki oznaczeń stężeń dla obu metod ekstrakcji oraz wartości odzysków dla metali ciężkich. Należy podkreślić, że wykorzystany przeze mnie 3 mol/L HCl charakteryzował się wysokim stopniem ekstrakcji metali ciężkich z badanego materiału na średnim poziomie  $65,8 \pm 3,3\%$  w porównaniu do uzyskanych wyników dla metody EPA 3050b (USEPA. EPA.1996)

**Tab. 2** Wyniki oznaczeń stężeń metali ciężkich i wartości odzysku dla metody EPA 3050 b i ekstrakcji 3 mol/L HCl.

	Cu	Cr	Pb	Ni	Zn	Cd
	[mg/kg]					
wartość certyfikowana	34,6±0,7	130±4	18,9±0,5	88,0±5,0	106±3	0,38±0,01
wartość oznaczona*	33,5±0,6	71,2±0,7	19,6±0,5	70,4±1,8	85,8±1,4	0,45±0,01
wartość oznaczona**	24,0±2,0	38,1±1,6	11,5±0,8	55,3±2,3	74,8 ± 2,0	0,39±0,01
	[%]					
odzysk*	97,8 ± 1,9	54,8±1,0	103,9±2,7	81,4±2,4	80,9±1,6	118±0,9
odzysk **	69,4±5,8	29,3±1,2	60,8±4,2	62,8±2,6	70.5 ±3,5	102,5±2,5

\*metoda EPA 3050b , \*\* metoda 3 mol/L HCl

Badania chemiczne obszaru Spitzbergenu były przedmiotem wielu prac, jednak analiza chemiczna osadów dennych prowadzona była rzadko, ale nie pod kątem analizy ilościowej i jakościowej labilnych form metali. Badania dotyczyły głównie wyników analiz mikrobiologicznych czy sedimentologicznych (Walkusz i in. 2004; Zajączkowski i Legeżyńska 2001; Szczuciński i in. 2009). W publikacji H5 ekstrakcję jednoetapową przeprowadziłam w próbkach zarówno z warstwy powierzchniowej, jak i z rdzeni pobranych z trzech fiordów: Konsfjord, Horsund i Isfjorden. Oznaczone wyniki stężeń labilnych form metali: Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn, Fe, Mn i Al pozwoliły mi na określenie zależności pomiędzy tymi pierwiastkami w badanych próbkach osadów z fiordów przy zastosowaniu metod statystycznych (wielowymiarowych). Analizę składników głównych (PCA) analizowanych próbek fiordów przeprowadziłam dla całego zbioru danych obejmujących zarówno próbki powierzchniowe, jak i rdzenie pobrane dla wszystkich fiordów. W badaniach wykorzystałam transformacje opisane przez Mazerskiego (2004). Na rysunku 8 przedstawiłam wyniki analizy PCA.



**Rys. 8** Wyniki analizy składników głównych (PCA) dla próbek z fiordów Kongsfjord, Horsund i Isfjorden.

Na podstawie przeprowadzonej analizy PCA wyodrębniłam trzy grupy próbek charakteryzujących poszczególne fiordy dla wszystkich typów analizowanych próbek. Głównymi procesami tworzenia osadów dennych w rejonie wyspy Spitsbergen jest sedimentacja zawieszin, które dostają się do wody w wyniku szeregu procesów fizyczno-chemicznych. Analiza PCA wykazała podział poszczególnych fiordów na systemy różniące się między sobą, które jednocześnie wykazywały pewną indywidualność. Analiza chemometryczna potwierdziła wysoką korelację między Cd, Ni i Zn (czynnik 1) oraz Mn (czynnik 2) dla ładunków czynnikowych bez rotacji. Natomiast analiza dla ładunków oznaczonych ze znormalizowaną rotacją varimax, wykazała wysoką korelację pomiędzy Cd, Mn i Ni (czynnik 1) oraz Cr, Cu i Zn (czynnik 2). Należy podkreślić, że w badaniach tego typu próbek analiza wyników jest trudna przede wszystkim ze względu na skomplikowane procesy wymiany i migracji pierwiastków między systemami. Oznaczone w publikacji H5 korelacje pomiędzy metalami stanowią istotne źródło informacji na temat potencjalnego toksycznego działania tych pierwiastków na rośliny, co również zostało stwierdzone w badaniach Melke (2006) w próbkach gleby pobranych z terenu Spitzbergenu.

Kontynuacją moich badań są kolejne prace analityczne, które dotyczą analityki żywności (H6 i H7) i próbek biologicznych (H8, H9 i H10), przy wykorzystaniu metod spektrometrycznych i nowych metod przygotowania próbek o złożonej matrycy wykorzystywanych w analizie wielopierwiastkowej, w tym metali wykazujących toksyczność na organizm ludzki.

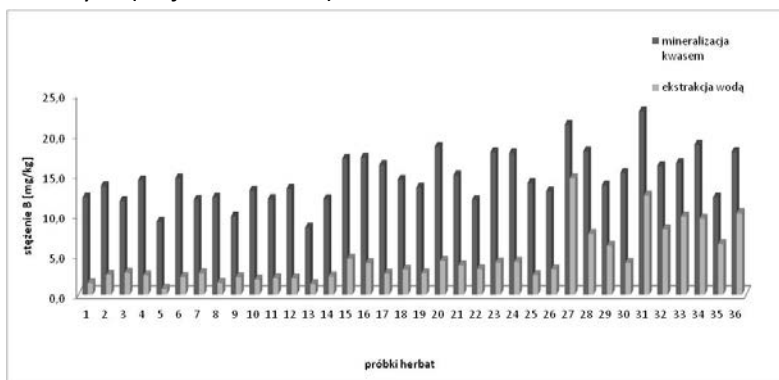
#### **Hipoteza do H6 i H7**

***Metoda przygotowania próbek żywności ma fundamentalne znaczenie na wynik oznaczenia metali w próbkach o zróżnicowanej matrycy. Technika optycznej spektrometrii emisyjnej w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-OES) umożliwi oznaczenie zawartości boru w próbkach herbaty bez efektu pamięci i strat analitu. Dobranie odpowiednich warunków spektrometru ICP-OES pozwoli obniżyć zużycie gazu plazmowego podczas rutynowych, wielopierwiastkowych analiz w próbkach win.***

Biorąc pod uwagę, że o jakości żywności decyduje przede wszystkim skład chemiczny, tworzenie nowych metodyk analitycznych potwierdza istotność rozwoju analityki żywności. Ponadto, to właśnie analityka żywności dostarcza szeregu informacji o chemicznych, biologicznych i fizycznych właściwościach składników i dodatków do żywności. Dlatego, tak ważna jest analiza jakościowa i ilościowa rzeczywistego składu produktów żywnościowych (Kumirska i in. 2010).

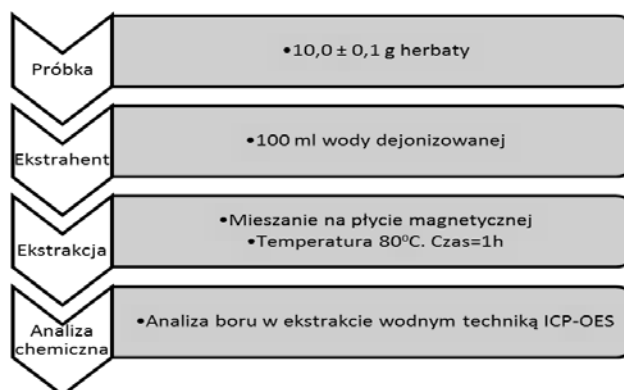
W publikacji H6 przeprowadziłam analizę próbek herbat pod kątem zarówno całkowitej zawartości oraz frakcji rozpuszczalnej boru w wodzie. Ważnym etapem pracy było opracowanie przeze mnie metody oznaczeń boru przy wykorzystaniu techniki ICP-OES. Oznaczenia boru w pracy H6 wykonywałam w ramach stażu, który odbyłam w Uniwersytecie Masaryka w Brnie na Wydziale Chemii w grupie badawczej Prof. Viktora Kanického, specjalisty z dziedziny chemii analitycznej.

Wybór techniki oznaczeń związany był z celem ograniczenia do minimum strat analitu i wpływu efektu pamięci podczas analizy boru. Powszechnie stosowane metody spektrofotometrycznego oznaczania boru, oparte są na barwnych reakcjach z odczynnikiem kompleksującym (m.in. kurkumina, azometyna H, kwasem karminowym) i charakteryzują się niską precyzją, i licznymi interferencjami (Rajput i in. 2010; Garcia-Soto i Camacho, 2005). Ponadto w analizie stężeń boru wykorzystywano absorpcyjną spektrometrię atomową z atomizacją w kuwecie grafitowej (GF-AAS). Należy jednak pamiętać, że technika ta bez zastosowania chemicznych modyfikatorów charakteryzuje się niską czułością. Powodem tego, jest nieefektywna dysocjacja związków zawierających w swoich połączeniach atom boru (są to termoodporne tlenki i węgliki), które powstają przez dysocjacyjną desorpcję  $B_2O_3$  (Sah i Brown 1997). Tlenek ten, może również reagować z grafitem tworząc węgiel boru (Wiltshire i in. 1994). Ponadto w niskiej temperaturze ( $800^\circ C$ ) na etapie pirolizy w technice GF-AAS powstaje również tlenek boru (III) -  $B_2O_3$ , którego tworzenie się powoduje znaczące straty podczas analizy. Kolejnym problemem przy oznaczeniach boru techniką GF-AAS jest wysokie tło (Botelho i in. 1994). Stąd podczas analizy boru występuje zjawisko podnoszenia linii podstawowej tzw. „efekt pamięci”, wpływające znacząco na obniżenie czułości wartości absorbancji (Wiltshire i in.1994; Sah i Brown 1997). Dlatego, w publikacji H6 dobrane przeze mnie warunki pracy spektrometru ICP-OES pozwoliły na przeprowadzenie analizy stężenia boru w ekstraktach kwaśnych i wodnych próbek herbat bez strat analitu. Podczas przeprowadzonych oznaczeń nie zaobserwowałam żadnych wpływów matrycy czy wtórnego zanieczyszczenia borem elementów spektrometru (w szczególności na etapie wprowadzania próbki). Oznaczyłam wysokie wartości odzysku na poziomie  $102,5 \pm 4,4\%$  analizując zawartość boru w certyfikowanym materiale odniesienia liści jabłoni (SRM1515 National Institute of Standards and Technology, USA) po mineralizacji metodą EPA 3051. Na rysunku 9 przedstawiałam wyniki stężeń boru w próbkach herbat czarnych (1-24) i herbat owocowych (25-36), po mineralizacji z kwasem i po ekstrakcji wodą dejonizowaną. Oznaczyłam znacznie wyższe całkowite zawartości boru w próbkach herbat (8.31-22.8 mg/kg) w porównaniu do oznaczonych zawartości boru  $<1$  mg/kg w innych produktach żywnościowych (Zaijun i in. 2006).



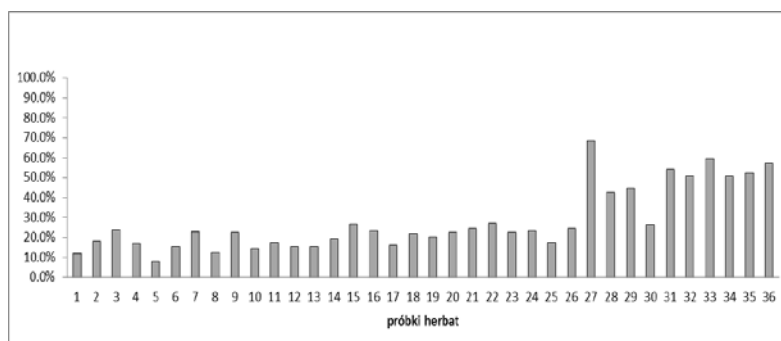
**Rys. 9** Wyniki stężeń boru w próbkach herbat czarnych i owocowych po mineralizacji z kwasem i ekstrakcji wodą dejonizowaną, oznaczone przy wykorzystaniu techniki ICP-OES (spektrometr iCAP 6500 duo).

Istotnym etapem publikacji H6 było opracowanie metody ekstrakcji jednoetapowej z wodą dejonizowaną w celu wyodrębnienia frakcji boru rozpuszczalnej w wodzie (rysunek 10).



**Rys. 10** Schemat ekstrakcji jednoetapowej próbek herbat z wodą dejonizowaną jako ekstrahentem.

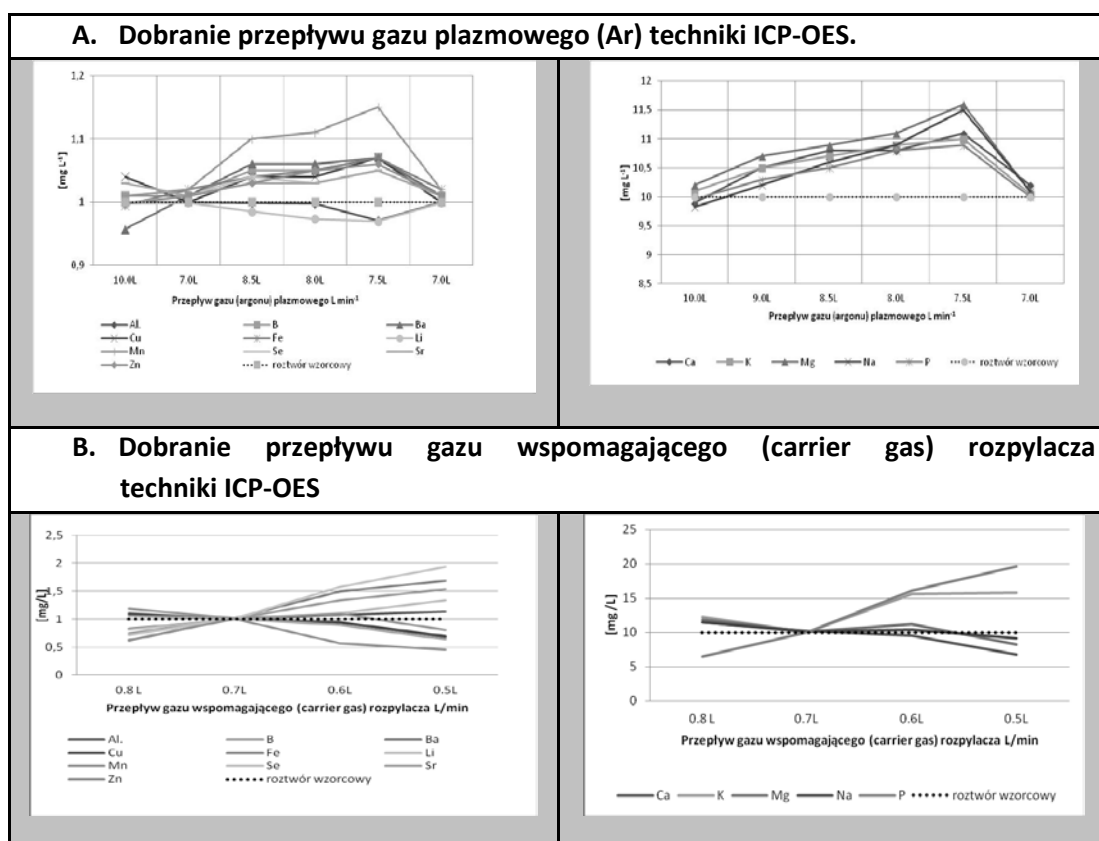
Zastosowanie opracowanej metody ekstrakcji, umożliwiło mi wyodrębnienie frakcji boru rozpuszczalnej w wodzie, a co za tym idzie mogłam określić, jaki jest rzeczywisty stopień ekstrakcji tego pierwiastka z herbaty do roztworu (w celu symulacji warunków rzeczywistych dla konsumenta herbaty). Ekstrakcji jednoetapowej wodą, poddałam również próbkę certyfikowanego materiału odniesienia liści jabłoni NIST SRM 1515 (National Institute of Standards and Technology, USA) uzyskując odzysk metody na poziomie  $56,26 \pm 1,83\%$ . Warto podkreślić, że dla próbek herbat owocowych zawierających w swoim składzie suszone jabłka, oznaczony przeze mnie udział frakcji wodnej dla tych próbek wynosił od 40 do 70% (Rysunek. 11).



**Rys. 11** Procentowy udział rozpuszczalnej w wodzie frakcji boru w próbkach herbat czarnych i owocowych.

Ważnym etapem badań w publikacji H6, było oznaczenie stężenia boru, jakie może być przyjęte przez potencjalnego konsumenta herbaty. Stwierdziłam, że oznaczone stężenie B w tzw. kubku herbaty (200 ml) było relatywnie wysokie, zwłaszcza dla próbek herbat zawierających susz z owoców (dla porównania stężenie B w herbatach czarnych wynosiło: 0.29-1.45 mg/200 ml; herbatach owocowych 2.52-7.24 mg/200 ml). Biorąc pod uwagę, że przeciętnie spożywamy więcej niż jeden kubek herbaty, przy oznaczonych stężeniach boru w „kubku herbaty”, picie tylko herbaty pokrywa, dzienne zapotrzebowanie na ten pierwiastek przez człowieka. Należy podkreślić, że bor w diecie człowieka pochodzi nie tylko z żywności czy napojów, ale również z suplementów diety i z wody.

W kolejnej publikacji H7, kontynuowałam temat analityki żywności, przeprowadzając wielopierwiastkową analizę metali w próbkach win. Badania zawartości metali w winach mają ogromne znaczenie dla celów autentyczności, kontroli jakości i produkcji win. Metale w winie mogą wpływać na właściwości organoleptyczne, jakość, na przebieg reakcji utleniania-redukcji oraz powodować brązowienie, mętność i cierpkość (Pohl 2007; Pyrzyńska 2007). Obecny trend coraz większego spożywania wina w stosunku do innych alkoholi powoduje, że konieczne jest poznanie faktycznego składu wina w tym kontrolowanie całkowitej zawartości pierwiastków. Analizę próbek wina prowadziłam przy wykorzystaniu optycznej spektrometrii emisyjnej w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-OES). Technika ICP-OES jest często wykorzystywana w tego typu badaniach (Gonzálvez i in. 2008; Grindlay i in. 2011) jednak jedną z wad tej techniki jest wysokie zużycie gazu plazmowego (Ar). Średnie zużycie argonu przy zastosowaniu tradycyjnego palnika podczas analizy wynosi od 15 do 25 L/min (Yabuta i in. 2002, Nunes i in. 2013; Santos i in. 2014). Dlatego, jednym z głównych celów badawczych w publikacji H7 było maksymalne obniżenie ilości gazu plazmowego, przy jednoczesnym zachowaniu czułości spektrometru podczas analiz. Optymalizacji poddałam zarówno przepływ gazu plazmowego, jak i gazu wspomagającego rozpylacza (tzw. carrier gas). Sprawdzając różne wartości przepływów gazu, stwierdziłam na podstawie oznaczonych wyników stężeń wielopierwiastkowych roztworów wzorcowych, że najwyższe wartości odzysku, uzyskałam dla wyników oznaczonych przy przepływie gazu plazmowego 10 i 7.0 L/min. Wyniki doboru odpowiednich parametrów techniki przedstawiłam na rysunku 12 A.



**Rys. 12** Dobranie przepływu gazu plazmowego (A) oraz gazu wspomagającego (carrier gas) (B) dla techniki ICP-OES. Stężenie roztworów wzorcowych: 1 mg/L dla Al, B, Ba, Cu, Fe, Li, Mn, Se, Sr, Zn i 10 mg/L dla Ca, Mg, Na, P, K.

Ponadto warto podkreślić, że stworzona przez firmę Shimadzu dla wykorzystywanego przeze mnie spektrometru ICP-OES nota aplikacyjna dla oznaczeń wybranych metali w próbkach win, rekomenduje warunki przepływu gazu plazmowego na poziomie 10 L/min. Natomiast w publikacji H7, zastosowanie przeze mnie mini-palnika umożliwiło mi na znaczącą redukcję zużycia gazu, bez strat na czułości czy intensywności stosowanej techniki analitycznej. W przypadku optymalizacji gazu wspomagającego rozpylacza, dla przepływu gazu plazmowego 7.0 L/min uzyskałam najwyższe odzyski dla wartości 0.7 L/min. Dla pozostałych wartości przepływów obserwowałam zarówno zaniżanie, jak i zawyżanie wyników oznaczeń (Rysunek 12 B).

Kolejnym etapem badań w ramach publikacji H7, było opracowanie metod przygotowania próbek win do analizy wielopierwiastkowej. Opracowałam trzy metody przygotowania próbek wina: poprzez rozcieńczenie, mineralizację z kwasem w piecu mikrofalowym i mineralizację z kwasem przy wykorzystaniu łaźni wodnej (Tabela 3).

**Tab. 3** Metody przygotowania próbek wina do analizy wielopierwiastkowej techniką ICP-OES

<b>Próbka wina</b>		
<b>Metoda rozcieńczenia próbki</b>	<b>Metoda mineralizacji przy wykorzystaniu fal mikrofalowych</b>	<b>Metoda mineralizacji przy wykorzystaniu łaźni wodnej</b>
10 mL próbki wina	2 mL próbki wina	2 mL próbki wina
Rozcieńczenie w stosunku objętościowym 1:10 wodą dejonizowaną	+ 8 mL stężonego HNO <sub>3</sub>	+ 8 mL stężonego HNO <sub>3</sub>
	Mineralizacja próbki w piecu mikrofalowym MARS XPress	Mineralizacja próbki na łaźni wodnej, T=95 <sup>o</sup> C, czas=1 h
	Przeniesienie próbek do kolb miarowych i uzupełnienie do objętości 25 mL wodą dejonizowaną	Przeniesienie próbek do kolb miarowych i uzupełnienie do objętości 25 mL wodą dejonizowaną

Dobre warunki w poszczególnych metodach przygotowania próbek wina umożliwiły mi na oznaczenie we wszystkich próbkach, 15 pierwiastków techniką ICP-OES przy przepływie gazu plazmowego na poziomie 7.0 L/min. W przypadku metody z rozcieńczeniem próbki, optymalnym współczynnikiem rozcieńczenia było 1:10 próbka/woda dejonizowana (v/v). W przypadku współczynników rozcieńczeń 1:1, 1:2 and 1:5 (v/v) plazma w spektrometrze gasła, co mogło być związane ze zbyt wysoką zawartością etanolu, gęstością próbki oraz wysoką zawartością związków organicznych, czego nie obserwowałam w przypadku rozcieńczenia próbki w stosunku 1:10. W kwaśnych ekstraktach próbek win oznaczone przeze mnie stężenia pierwiastków były na zbliżonym poziomie stężeń, jak w przypadku metody rozcieńczenia próbek win. Zaobserwowałam, że w ekstraktach kwaśnych oznaczyłam wyższe stężenia glinu i żelaza oraz niższe stężenia selenu i fosforu we wszystkich analizowanych próbkach win. Na podstawie uzyskanych wyników stężeń pierwiastków w próbkach win przygotowanych różnymi metodami oraz na podstawie stwierdzonych różnic, zaproponowałam sposób porównania efektywności przygotowania próbek win na wynik oznaczenia. Aby porównać uzyskane wyniki z trzech różnych metod przygotowania próbki wyliczyłam współczynniki determinacji (R<sup>2</sup>) dla trzech konfiguracji krzywych, uwzględniając wyniki dla wszystkich analizowanych win: **A.** rozcieńczenie (Y) mineralizacja w piecu mikrofalowym (X); **B.** rozcieńczenie (Y) mineralizacja na łaźni wodnej (X); **C.** mineralizacja na łaźni wodnej (Y) mineralizacja w piecu



mikrofalowym (X). Najwyższe współczynniki determinacji otrzymałam dla układu C, stwierdzając, że obie metody mineralizacji przy użyciu kwasu, dają porównywalne wyniki (przy stężeniach <1 i >10 mg/L). Dlatego też, te dwie metody przygotowania próbek win, mogą być stosowane zamiennie. Biorąc pod uwagę koszty przygotowania próbek, metoda mineralizacji na łaźni wodnej jest tańsza i bardziej dostępna niż mineralizacja w piecu mikrofalowym. Na podstawie uzyskanych wysokich współczynników determinacji dla układu A i B w przypadku Ca, Mg, P i K stwierdziłam, że wystarczy rozcieńczyć próbkę wina, bez konieczności jej mineralizacji z kwasem. Warto podkreślić, że nie stwierdzono tego w badaniach wina przez innych autorów (Grindlay i in. 2008). Ponadto wyniki współczynnika ( $R^2$ ) potwierdziły, że zaproponowane trzy metody przygotowania próbek win, dają porównywalne wyniki stężenia analizowanych metali. Potwierdziły również, że w przypadku oznaczeń Al i Fe bardziej efektywną metodą przygotowania próbek win jest mineralizacja z kwasem w obu zaproponowanych metodach. Również dla Se, stwierdziłam, że mineralizacja próbek wina z kwasem zarówno w układzie zamkniętym, jak i w układzie otwartym może powodować straty analitu. Stąd, metoda rozcieńczeń zarówno dla Se, jak i dla P jest bardziej efektywna.

Dodatkowo, sprawdziłam precyzję wszystkich trzech metod, stosując metodę dodatku wzorca, ponieważ dostępne na rynku materiały referencyjne obejmują jedynie wartości stężenia dla: K, Ca, Cu, Fe, Cd i Pb. Na podstawie wartości odzysku dla trzech metod oraz względnego odchylenia standardowego (%RSD) stwierdziłam, że największą precyzją charakteryzowała się metoda rozcieńczeń, a dla obu metod mineralizacji oznaczyłam zbliżone wartości %RSD, co potwierdza, że metody te można stosować zamiennie. Ponadto uzyskane wyniki odzysków dla Se i P potwierdziły, że mineralizacja kwasem powoduje oznaczenie niższych wyników stężeń niż w przypadku wyników z bezpośredniego rozcieńczenia próbki wina. Natomiast w przypadku odzysków dla Al i Fe, niższe wartości oznaczone dla metody rozcieńczeń potwierdziły, że dla tych metali lepszą metodą jest mineralizacja z kwasem.

Podsumowując, w publikacjach H6 i H7 uzyskane wyniki badań potwierdziły stawiane przeze mnie hipotezy o wykorzystaniu techniki ICP-OES w analityce żywności, a zastosowane przeze mnie warunki spektrometrów ICP oraz metody przygotowania próbek żywności, umożliwiły mi przeprowadzenie analiz wielopierwiastkowych.

#### **Hipoteza do H8, H9 i H10**

***Potwierdzenie możliwości wykonywania badań populacyjnych dla oceny zawartości pierwiastków w tkankach narządu ruchu w oparciu o tkanki niedostępne w badaniach przesiewowych, takich jak tkanka kostna, jest możliwe przy wykorzystaniu metod spektrometrycznych. Zmiany zwyrodnieniowe w stawie biodrowym znajdują swoje odzwierciedlenie w zawartości pierwiastków śladowych, strukturalnych i toksycznych. Wykazanie korelacji pomiędzy stężeniami metali w stawie biodrowym w przebiegu procesu zwyrodnieniowego będzie możliwe na podstawie analizy zawartości pierwiastków śladowych, strukturalnych i toksycznych.***

Kontynuacją mojej pracy habilitacyjnej, było opracowanie nowych metod przygotowania próbek i zastosowania technik spektrometrycznych w analityce próbek biologicznych. Stąd, w publikacjach H8, H9 i H10 wykorzystywałam próbki ludzkich kości, jako materiał badawczy. Tematykę badawczą realizowałam w ramach działalności sieci naukowej Wydziału Chemii UAM z Wydziałem Lekarskim i Wydziałem Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, której jestem członkiem.

Biorąc pod uwagę, że procesy przebudowy kości zachodzą w organizmie przez całe życie, stanowi ona swoisty wskaźnik kumulacji metali w tkance kostnej, które mogą ulegać wymianie na inne pierwiastki niezbędne do prawidłowej przemiany materii, zaburzając wiele procesów zależnych wewnętrznego układu równowagowego (Brodziak i in. 2004; Glimcher 2006; Zaichick i in. 2011). W publikacjach H8, H9 i H10 materiałem pobranym od pacjentów do badań były próbki głowy i szyi kości udowej. Próbki pochodziły od pacjentów, którzy poddani byli zabiegowi endoprotezoplastyki stawu biodrowego, który uległ zwyrodnieniu. Warto podkreślić, że ilość zabiegów endoprotezoplastyki stawu biodrowego ciągle wzrasta, a w 2014 w Polsce wykonano ponad 40 tysięcy takich zabiegów. Dlatego, tak bardzo istotne jest opracowanie metod analitycznych i ich zastosowanie w analityce biologicznej, zwłaszcza pod kątem oznaczenia rzeczywistego składu pierwiastkowego badanych tkanek.

W publikacjach H8, H9 i H10 określiłam różnice między zawartościami metali w szyi i głowie kości udowej na podstawie wpływu m.in. takich czynników środowiskowych jak: wiek, płeć, spożycie alkoholu, palenie tytoniu, kontakt z substancjami chemicznymi w miejscu pracy, miejsce zamieszkania, dieta, przyjmowane leki, parametry kliniczne oraz rodzaj zwyrodnienia kości. Wykonanie analiz nie byłoby możliwe bez etapu przygotowania próbek. Należy podkreślić, że próbki kości, to materiał badawczy o złożonej matrycy. Dlatego, opracowałam metodę przygotowania próbek kości do dalszych etapów toku analitycznego. Poszczególne etapy przygotowania próbek kości przedstawiłam na schemacie zamieszczonym w tabeli 4. Nowym rozwiązaniem było dodanie przeze mnie do procesu mineralizacji próbek kości dodatkowego etapu, tzw. powolnej mineralizacji trwającej 8 godzin, po którym prowadziłam mineralizację przy wykorzystaniu fal mikrofalowych. Dzięki wprowadzeniu dodatkowego etapu powolnej mineralizacji, próbki kości zostały w pełni zmineralizowane, a uzyskane ekstrakty były klarowne, bez pozostałości osadów, w tym tłuszczu z tkanek kostnych, który jeśli występuje na powierzchni kości może być usunięty poprzez zanurzenie kości w roztworze metanolu z dietylo eterem (Tang i in. 1996) lub w roztworze 30% wody utlenionej (Kruger i in. 2014). Usunięcie tłuszczu z próbek było bardzo ważne dla całej procedury mineralizacji, ponieważ bez tego, warstwa zestalonego tłuszczu pozostałaby w górnej części kwaśnego ekstraktu po jego wystudzeniu.

**Tab. 4** Schemat przygotowania próbek kości do analiz chemicznych.

Zamrażanie próbek kości (-40 <sup>o</sup> C)
Liofilizacja zamrożonych próbek kości LYOVAC LYOPHILIZER GT2E Czas= 24 h.
0,5 g suchej próbki kości + 10 ml ultra czystego HNO <sub>3</sub>
Mineralizacja próbek w mineralizatorze mikrofalowym typu MARS 5 XPRESS
<b>I etap - powolna mineralizacja przez 8 godzin</b>
II etap - mineralizacja w piecu mikrofalowym zmodyfikowaną metodą EPA 3051.
Przeniesienie ekstraktów bez konieczności sączenia próbki do kolb miarowych o pojemności 50 ml

W publikacji H8 oznaczenia Mo, Cr, Zn, Pb, Cu, Ni, Fe, Mg, P, Ca wykonywałam przy wykorzystaniu spektrometru ICP-OES (Horiba, Yobin Yvon) w ramach stażu, który odbyłam w Uniwersytecie Masaryka w Brnie na Wydziale Chemii w grupie badawczej Prof. Viktora Kanického, specjalisty z dziedziny chemii analitycznej. Natomiast analizę Na i K przeprowadziłam w Pracowni Analizy Wody i Gruntów Wydziału Chemii UAM przy wykorzystaniu techniki F-AAS (AA7000, Shimadzu) (Tabela 5). W przypadku spektrometru ICP-OES ważnym etapem pracy, było dobranie optymalnych długości fal dla oznaczanych pierwiastków (Tabela 5). Ponadto w przypadku oznaczeń

Ca i P ekstrakty po mineralizacji próbek kości wymagały dobrania odpowiedniego współczynnika rozcieńczenia. Natomiast przy oznaczeniach Na i K zastosowałam dodatek modyfikatora (2.5% roztwór CsCl<sub>2</sub>), w celu zniwelowania wpływu matrycy.

**Tab. 5** Dobrane warunki pracy spektrometrów ICP-OES i FAAS do wielopierwiastkowej analizy w próbkach kości.

Parametr	Jednostka	ICP-OES	F-AAS
Długość fali	[nm]	Mo-204.6	Na-789.0
		Cr-205.5	(szczelina monochromatora: 0.2nm)
		Zn-213.8	K-766.5
		Pb-220.3	(szczelina monochromatora 0.7 nm)
		Cu-224.7	
		Ni-231.6	
		Fe-259.9	
		Mg-280.3	
		P-213.6	
Ca-317.9			
Moc	[W]	1200	
Przepływ argonu	[L/min]		Typ płomienia: powietrze/acetylen
-gaz plazmowy		12	10/2 [L/min]
-gaz rozpylający		0.4	
-gaz wspomagający (carrier gas)		0.6	
Przepływ próbki	[mL/min]	1.0	4.0
Czas płukania	[s]	30	30
Ilość powtórzeń	-	3	3
Typ rozpylacza	-	Meinhard	-

W publikacji H9 analizę zawartości glinu w próbkach kości przeprowadziłam przy wykorzystaniu spektrometru absorpcji atomowej z atomizacją w kuwecie grafitowej. Należy podkreślić, że analizę glinu techniką GF-AAS prowadziłam bez dodatku modyfikatorów, które standardowo są wykorzystywane w badaniach próbek biologicznych (Tang i in. 1996, Kruger i in. 2010; Kruger i in. 2014). Również sam producent wykorzystywanego spektrometru (AA7000 Shimadzu, Japonia) zaleca stosowanie 0.1% roztworu lantanu, jako modyfikatora oraz temperaturę atomizacji na poziomie 2400°C. W publikacji H9, dobrałam warunki pracy w tym, temperaturę i czas poszczególnych etapów pieca grafitowego (Tabela 6) oraz zastosowałam trzy etapową pirolizę (dodatkowy krok). Wprowadzenie dodatkowego kroku pirolizy, brak modyfikatora oraz wyższa temperatura etapu atomizacji (2750°C) nie spowodowały strat analitu czy obniżenia precyzji i dokładności stosowanej techniki analitycznej.

**Tab. 6** Dobrane warunki programu pieca grafitowego w oznaczeniach Al techniką GF-AAS.

<b>Etap</b>	<b>Temp. [°C]</b>	<b>Czas (sec.)</b>	<b>Rodzaj grzania</b>	<b>Argon [L/min]</b>	<b>Czułość</b>
1 Suszenie	150	30	Wzrost temperatury	0.1	
2 Suszenie	250	30	Wzrost temperatury	0.1	
3 Rozkład termiczny (piroliza)	1000	30	Wzrost temperatury	1.0	
4 Rozkład termiczny (piroliza)	1000	15	Utrzymanie temperatury	1.0	
5 Rozkład termiczny (piroliza)	1000	3	Utrzymanie temperatury	0.0	x
6 Atomizacja	<b>2700*</b>	5	Utrzymanie temperatury	0.0	x
7 Czyszczenie /wypalanie	2750	3	Utrzymanie temperatury	1.0	
*pomiar					

Optymalizacji poddałam również pozostałe parametry wykorzystywanego w publikacji H8 spektrometru (Tabela 7). Na uwagę zasługuje fakt wykorzystania metody „self reverse” jako metody korekcji tła.

**Tab. 7.** Dobrane warunki oznaczeń glinu techniką GF-AAS.

<b>Parametr</b>	<b>Jednostka</b>	<b>Wartość</b>
<b>Długość fali</b>	[nm]	309.3
<b>Szczelina monochromatora</b>	[nm]	0.7
<b>Prąd lampy – niski sygnał</b>	[mA]	10
<b>Prąd lampy – wysoki sygnał</b>	[mA]	600
<b>Tryb lampy</b>	BGC-SR (self-reverse)	
<b>Objętość próbki</b>	[μL]	30
<b>Szybkość dozowania próbki</b>	[μL/sec]	20
<b>Ilość powtórzeń</b>	-	3
<b>Max. ilość powtórzeń</b>	-	5
<b>RSD limit</b>	[%]	7.0
<b>Typ kuwety grafitowej</b>	Platforma (L'Vov)	
<b>Rodzaj pomiaru sygnału</b>	Powierzchnia pod pikiem	
<b>Zakres liniowości</b>	[μg/L]	50
<b>Granica wykrywalności LOD (3s) n=10</b>	[μg/L]	0.01
<b>Granica oznaczalności LOQ (10s) n=10</b>	[μg/L]	0.03
<b>Powtarzalność (n=5)</b>	[%]	≤2.5%

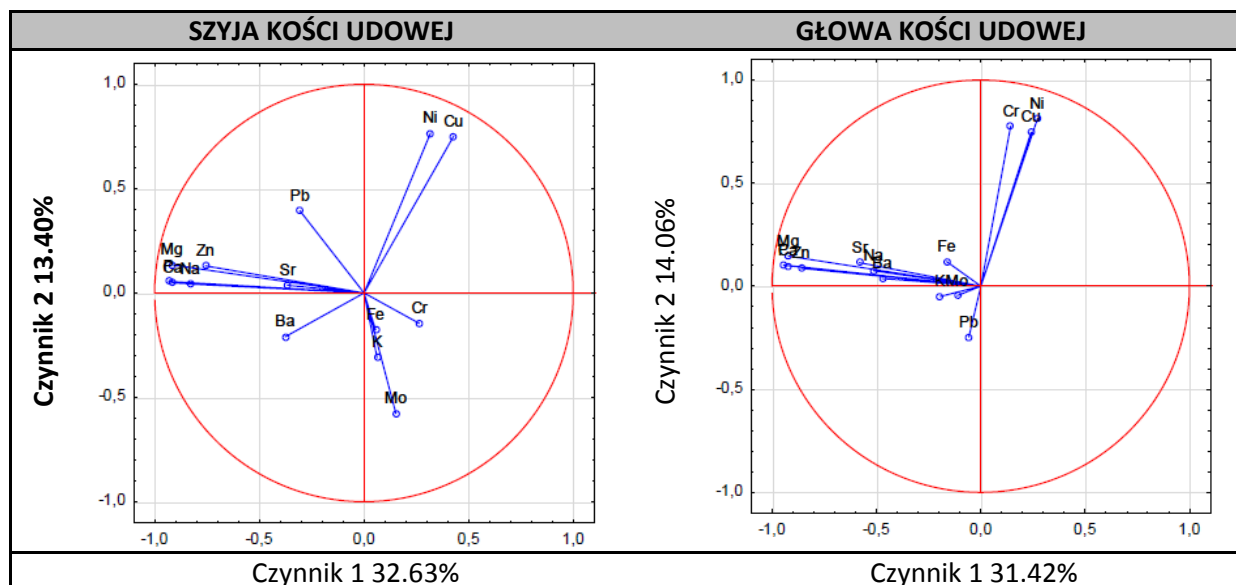
W publikacji H10 zawartość rtęci w próbkach kości, przygotowanych według opracowanej i zmodyfikowanej procedury (Tabela 4) oznaczyłam przy wykorzystaniu analizatora rtęci, techniką zimnych par rtęci atomowej spektrometrii fluorescencyjnej (CV-AFS). Ważnym etapem dla oznaczania rtęci, było przygotowanie przez mnie szkła laboratoryjnego, wykorzystywanego po mineralizacji próbek kości. Kolbki miarowe przez 24 godzin były trawione 10% kwasem HNO<sub>3</sub>, a następnie przepłukiwane trzy krotnie wodą dejonizowaną, która wcześniej przez 6 godzin przedmuchiwała była

strumieniem argonu. Wszystkie te czynności, miały na celu ograniczenie do minimum wtórnego zanieczyszczenia ekstraktów z próbek kości rtęcią.

Opracowane warunki przygotowania próbek i ich oznaczenia, zostały sprawdzone na certyfikowanych materiałach odniesienia. W publikacjach H8 i H9, wykorzystywałam certyfikowany materiał odniesienia spopielonych kości NIST SRM 1400 Bone Ash (National Institute of Standards and Technology, USA), uzyskując wartości odzysków metali od 94.6 do 109±%, w tym dla Al na poziomie 98,6±2,7%. Natomiast w przypadku rtęci, materiał ten, nie zawierał żadnych wartości dla tego metalu, stąd wykorzystywałam certyfikowany materiał odniesienia dla liści (NIST SRM 1515 Apple Leaves) uzyskując odzysk na poziomie 98.1± 3.5%.

Dysponując dużym zbiorem danych wykorzystywałam metody statystyczne (wielowymiarowe), w celu wykazania korelacji pomiędzy oznaczanymi pierwiastkami a różnymi czynnikami środowiskowymi. Należy podkreślić, że w publikacjach H8, H9 i H10 przedstawiłam unikatowe wyniki badań, które nie były dotychczas prezentowane w literaturze. Biorąc pod uwagę, że rozkład częstości występowania oznaczonych pierwiastków w próbkach kości nie charakteryzował się rozkładem normalnym, w analizie statystycznej wykorzystywałam oprócz zakresu zmian zawartości średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego, wartości mediany, rozkładu oraz współczynnika zmienności. Natomiast analizę istotnie statystycznie różnic między grupami przeprowadziłam stosując nieparametryczne testy U Manna-Whitneya dla dwóch grup oraz test Kruskala-Wallisa dla większej liczby grup. Dodatkowo w publikacji H8 określiłam zależności pomiędzy oznaczanymi pierwiastkami, a czynnikami środowiskowymi przy zastosowaniu testu Spearmana oraz wykonałam analizę wieloczynnikową (analizę składników głównych PCA) w celu określenia zależności między pierwiastkami w badanej tkance kostnej.

W publikacji H8 oznaczyłam zawartość 14 metali: Ca, Mg, P, Na, K, Zn, Cu, Fe, Mo, Cr, Ni, Ba, Sr i Pb we wszystkich próbkach szyi i głowy kości udowej. Analiza wyników przy wykorzystaniu testów statystycznych pozwoliła mi na wykazanie wielu zależności i korelacji pomiędzy oznaczanymi pierwiastkami, a czynnikami środowiskowymi. Po raz pierwszy w literaturze stwierdziłam znaczące różnice w zawartości Zn, Pb, Cu i Ni w próbkach głowy kości udowej dla obu płci. Wyższe zawartości Zn, Pb, Cu i Ni oznaczyłam w próbkach głowy kości udowej u mężczyzn w porównaniu do kobiet. Stwierdziłam, że u mężczyzn Zn akumulował się w szyi kości udowej jednocześnie z Pb, przez co toksyczne skutki Pb mogą być mniejsze u badanych pacjentów. Zarówno w głowie, jak i w szyi kości udowej stwierdziłam, że zawartość K była istotnie wyższa u kobiet niż u mężczyzn. Natomiast analiza składników głównych (PCA) wykonana w grupie kobiet i mężczyzn, wykazała, że pierwsze sześć czynników wyjaśniało 79,1% ogólnej zmienności dla szyi i 77,4% dla głowy kości udowej. Z pierwszym czynnikiem (wyjaśniającym 32% zmienności), który można określić, jako „budulec kości”, najsilniej związane były pierwiastki strukturalne i mikroelementy związane z metabolizmem kości: Ca, P, Na, Mg i Zn (oraz Sr w głowie kości udowej) oraz z Pb w szyi kości udowej tylko u mężczyzn. Drugi czynnik analizy PCA objaśniał 13% ogólnej zmienności. Związane z nim były metale Cu, Ni i Mo w szyi kości udowej oraz Cr w głowie kości udowej (Rysunek 13).

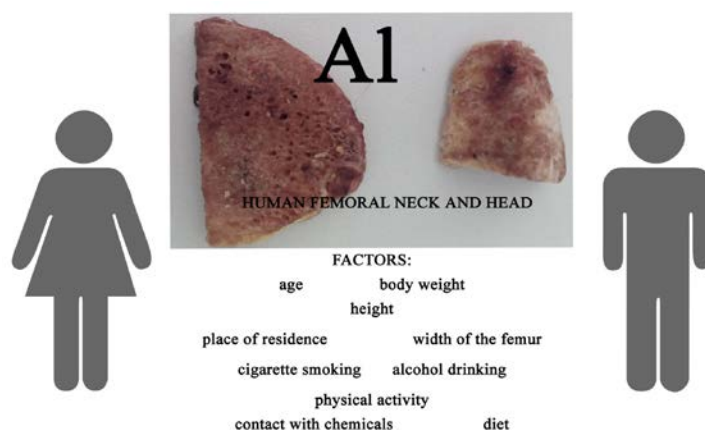


**Rys. 13** Analiza składników głównych (PCA) stężeń metali w głowie i szyjce kości udowej. Projekcja zmiennych (zawartość metali) na płaszczyznę dwóch pierwszych głównych składników (Czynnik 1, Czynnik 2).

Uzyskany przeze mnie wynik potwierdził rolę pierwiastków strukturalnych jako budulca kości, w przeciwieństwie do innych badań, gdzie wynik analizy PCA wykazał, że Mg opisywany był dopiero przez piąty czynnik (Brodziak-Dopierała i in. 2010). Ponadto wykazałam, że istotne statystycznie korelacje o największym współczynniku występowały między makroelementami: Ca, P, Mg i Zn zarówno w głowie, jak i szyi kości udowej u wszystkich pacjentów. Przeprowadzona analiza PCA w publikacji H8 potwierdziła także różnice wynikające z płci pacjentów. Tylko u kobiet stwierdziłam, że pierwszy czynnik opisywał zawartość Ba i Sr w głowie kości udowej, a u mężczyzn w szyi kości udowej tylko Pb. Ponadto u osób palących stwierdziłam, że zawartość Ca, Mg i P w próbkach głowy kości udowej była znacząco niższa w porównaniu do osób niepalących. Tylko u osób palących w próbkach szyi kości udowej stwierdziłam istotnie wysoką korelację pomiędzy Cr/Ni. Również wykonana analiza PCA wykazała, że Cr i Ni charakteryzował drugi czynnik, w obu rodzajach próbek kości u osób palących. Ponadto stwierdziłam, że zawartość Ni wśród osób palących była dwukrotnie wyższa niż u osób niepalących. Również zawartość Pb i Cr była wyższa u osób palących. W przypadku czynnika, jakim było spożycie alkoholu, stwierdziłam istotnie statystycznie różnice w zawartości metali w analizowanych próbkach kości pomiędzy spożywającymi alkohol i abstynentami. Uzyskane wyniki badań nie były zidentyfikowane wcześniej przez innych autorów. U pacjentów spożywających alkohol stwierdziłam istotnie statystycznie wyższe zawartości Cu w porównaniu do abstynentów, zarówno w głowie i szyi kości udowej oraz wyższe zawartości Ni i Pb w próbkach głowy kości udowej u pacjentów pijących alkohol. Wyniki potwierdza wykonana analiza składników głównych, gdzie Cu i Ni związany był z drugim czynnikiem w obu rodzajach próbek kości u osób spożywających alkohol. Natomiast tylko Pb był silnie związany z pierwszym czynnikiem u osób pijących w próbkach szyi kości udowej. Należy podkreślić, że ekspozycja na Pb i etanol znacząco obniża proces tworzenia kości oraz zwiększa jej resorpcję w wyniku zachodzącego procesu demineralizacji (Kupraszewicz i Brzóška 2013). Natomiast analiza wyników pod kątem wpływu kontaktu z substancjami chemicznymi na poziom oznaczanych metali, wykazała, że zawartość Ni w głowie kości udowej była istotnie wyższa u osób,

które miały kontakt z zanieczyszczeniami chemicznymi w środowisku, co potwierdzają wyniki analiz PCA oraz oznaczona dodatnia korelacja Spearmana. Stwierdziłam również, że stężenie pierwiastków strukturalnych Ca, P i Mg w głowie kości udowej oraz Sr w szyi kości udowej istotnie statystycznie malało wraz z wiekiem pacjentów.

W kolejnej publikacji H9 podjęłam tematykę analityki glinu w próbkach kości, stosując dobrane warunki oznaczeń techniką analityczną GF-AAS (Tabela 6, Tabela 7) oraz opracowaną metodę przygotowania próbek biologicznych (Tabela 3). Zarówno wyniki zawartości glinu w próbkach kości, jak i oznaczonych korelacji, są unikatowe i po raz pierwszy przedstawiają tak szerokie studium badań nad tym metalem. Glin, jako aktywny biologicznie pierwiastek stanowi podłoże nie tylko chorób neurologicznych (Bondy 2014), ale również jego toksyczne skutki obejmują układ kostny człowieka, powodując zaburzenia we wzroście kości, ich tworzeniu i rozwoju (Krewski i in. 2007; Rihimaki i Aitio 2012). Ponadto glin może akumulować się w kościach przez całe życie, dlatego tak istotne jest jego oznaczenie, zwłaszcza, że oznaczone rzeczywiste poziomy stężenie tego metalu mogą być pomocne w rozpoznawaniu mechanizmów takich chorób jak Alzheimer czy osteodystrofia nerek (Pejović-Milic i in. 2005). W publikacji H9, interpretację uzyskanych wyników badań prowadziłam pod kątem określenia korelacji i wpływu wybranych czynników środowiskowych, w tym wieku pacjentów, rodzaju przyjmowanych leków, spożycia alkoholu, palenia tytoniu, kontaktu z substancjami chemicznymi w miejscu pracy, na poziom stężeń glinu w próbkach kości (Rysunek 14).



**Rys. 14** Czynniki środowiskowe wpływające na zawartość glinu w szyi i głowie kości udowej (graficzne streszczenie publikacji H9).

W przypadku czynnika, którym był wiek, pacjenci zostali podzieleni na sześć grup wiekowych od 20 do >80 lat. Badania Hellström i in. (2005) wykazały, że zawartość glinu w kościach znacząco wzrastała wraz z wiekiem badanych pacjentów. W publikacji H9 nie stwierdziłam istotnie statystycznych korelacji pomiędzy wzrostem wieku pacjentów, a zawartością glinu. Jednak, u kobiet w próbkach szyi kości udowej obserwowałam wzrost zawartości glinu u osób starszych w porównaniu do najmłodszych. Również u mężczyzn wzrost zawartości glinu był większy w próbkach szyi kości udowej u pacjentów starszych. Stwierdziłam natomiast istotną statystycznie różnicę w zawartości glinu w głowie kości udowej między pacjentami przed i po 60 roku życia. Należy podkreślić, że w badaniach nie uczestniczyli pacjenci, ze zdiagnozowaną demencją typu Alzheimer czy z niewydolnością nerek, a mimo to oznaczone przeze mnie zawartości glinu przekraczały 1 mg/kg, a w niektórych przypadkach wartości te wynosiły od 3 do 6 mg/kg w próbkach głowy i szyi kości udowej. Dla porównania, Mjöberg i in. (1997) oznaczyli glin w próbkach kości biodrowych u osób z Alzheimerem na poziomie 4 mg/kg,

Hellström i in. (2005) w zakresie 0.134-5.934 mg/kg, natomiast u pacjentów zdrowych glin oznaczono w zakresie od 0.176-5.182 mg/kg. Zarówno dane literaturowe, jak i wyniki oznaczone przeze mnie nie wskazują na odrębny mechanizm kumulacji glinu w kościach u osób z demencją w porównaniu do osób zdrowych, co może wskazywać na inny mechanizm wbudowywania się glinu w kości.

Ponadto w publikacji H9, po raz pierwszy w literaturze wykazałam istotnie statystycznie wyższe zawartości glinu w szyi kości udowej w porównaniu do zawartości w głowie kości udowej u pacjentek regularnie przyjmujących leki na nadciśnienie i antyrytmiczne. Zależność tą stwierdziłam tylko u kobiet. Następnie potwierdziłam statystycznie, że u kobiet wraz ze wzrostem szerokości kości udowej, wzrostowi ulegała zawartość glinu w szyi kości udowej. Natomiast u mężczyzn stwierdziłam istotny statystycznie wzrost zawartości glinu w głowie kości udowej wraz ze zwiększaniem się masy ciała i wzrostem. Również u mężczyzn większym stężeniem glinu w głowie kości udowej sprzyjało zaawansowanie choroby zwyrodnieniowej (wg skali Kellgrena-Lawrence'a). Zależność ta może być potwierdzeniem hipotezy, że glin może wpływać negatywnie na proces tworzenia się kości. Zaobserwowane przeze mnie korelacje nie zostały stwierdzone we wcześniejszych badaniach (Hellström i in.2006; Hellström i in. 2005) . Stwierdziłam także znaczący wpływ płci pacjentów na poziom stężenia glinu w badanych próbkach kości. U kobiet wyższe zawartości glinu oznaczyłam w próbkach szyi kości udowej, niż w próbkach głowy kości udowej, w przeciwieństwie u mężczyzn. Dotychczasowe badania nie podejmowały wyjaśnienia różnic w stężeniach glinu pomiędzy głową, a szyją kości udowej. W wyniku przeprowadzonej analizy statystycznej wykazałam istotną dodatnią korelację między zawartością glinu w głowie i szyi kości udowej. Oznaczone w publikacji H9 różnice zawartości glinu mogą być związane z rodzajem badanych tkanek kostnych oraz miejscem pobrania tkanki do analizy. Biorąc pod uwagę, że zawartość metali w kościach może zależeć od czynników genetycznych, a także od poziomu hormonów w organizmie (Berglund i in. 2000), stwierdzone przeze mnie różnice w zawartości glinu w kościach pomiędzy kobietami a mężczyznami, mogą być z tym związane.

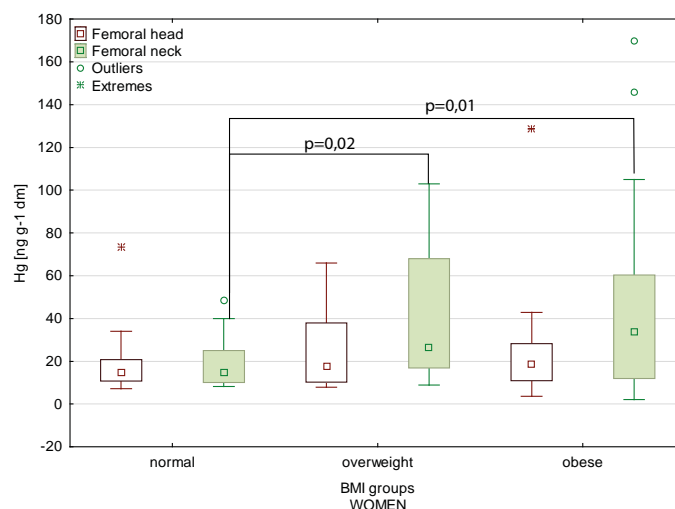
Podsumowując, uzyskane przeze mnie wyniki badań wskazują, że glin może kumulować się w kościach bez względu na rodzaj choroby. Dlatego, rzeczywiste stężenia glinu w kościach mogą stanowić wstępny obraz o jego otoczeniu chemicznym i możliwych zależnościach, dzięki czemu łatwiej będzie zrozumieć biologiczne i biochemiczne podłoże zmian zwyrodnieniowych zachodzących w kościach.

Publikacją zamykającą prezentowany cykl jest praca H10, w której kontynuowałam tematykę wykorzystania analityki chemicznej w badaniach próbek biologicznych. W próbkach kości przygotowanych według opracowanej procedury roztwarzania (Tabela 3), oznaczyłam zawartość rtęci techniką CV-AFS. Analizę rtęci prowadziłam w zamkniętym układzie analitycznym przy zastosowaniu chlorku cyny (II) w środowisku kwaśnym (HCl). Podczas oznaczeń nie zaobserwowałam żadnych interferencji kinetycznych czy chemicznych, o czym świadczą uzyskane wartości odzysku stosowanej metody analitycznej. Dotychczas rtęć oznaczano we krwi, w moczu, we włosach, w nerkach czy w mózgu (Clarkson 2002; Syversen i Kaur 2012). W publikacji H10 zawartość rtęci w kościach udowych oznaczyłam w zakresie od 2,00 do 176,5 ng/g. Na podstawie oznaczonych zawartości rtęci przy zastosowaniu analiz statystycznych określiłam zależności i korelacje pomiędzy zawartością rtęci, a wybranymi czynnikami zewnętrznymi. W przypadku czynnika, którym był wiek pacjentów, biorąc pod uwagę wszystkich chorych, nie stwierdziłam istotnie statystycznych korelacji pomiędzy wiekiem, a zawartością rtęci w próbkach głowy i szyi kości udowej. Jednak u kobiet zaobserwowałam, że zawartość rtęci wzrastała wraz z wiekiem w szyi kości udowej. Natomiast u mężczyzn zawartość



rtęci w szyi kości udowej malała wraz z wiekiem (od 40 lat do 80 lat). Również u mężczyzn oznaczyłam wyższe stężenia rtęci zarówno w głowie, jak i szyi kości udowej, niż u kobiet, w przeciwieństwie do dotychczasowych badań, gdzie zawartość rtęci była znacząco wyższa u kobiet (Michalak i in. 2014; Agusa i in. 2007; Vahter i in. 2002).

W publikacji H10 po raz pierwszy analizowałam uzyskane wyniki badań rtęci pod kątem korelacji pomiędzy rodzajem przyjmowanych leków, a stężeniem metalu w kościach. W grupie pacjentów przyjmujących regularnie leki regulujące ciśnienie tętnicze, u kobiet, nie stwierdziłam istotnych statystycznie różnic pomiędzy przyjmującymi i pozostałymi pacjentkami. Należy jednak podkreślić, że oznaczona zawartość rtęci w obu rodzajach próbek kości była wyższa u pacjentek przyjmujących lekarstwa tego typu. Natomiast u mężczyzn przyjmujących leki nasercowe, potwierdziłam statystyczny wzrost zawartości rtęci w głowie kości udowej. Dlatego, biorąc pod uwagę, że prowadzone przez innych badania potwierdzają związek pomiędzy zawartością rtęci w ciele człowieka, a zachorowalnością na choroby układu krążenia (Salonen i in.2000; Kim i in. 2014; Tinkov i in.2015), oznaczona w pracy H10 korelacja związana z występowaniem wyższych stężeń rtęci u pacjentów przyjmujących leki związanych z tą chorobą może wskazywać, że leki mogą stanowić potencjalne, dodatkowe źródło tego metalu dla ludzi. Również w publikacji H10 po raz pierwszy określiłam korelację pomiędzy zawartością rtęci w kościach, a indeksem masy (BMI), masą ciała i szerokością kości udowej u kobiet. Istotnie statystyczny wzrost zawartości rtęci w próbkach szyi kości udowej u kobiet występował wraz ze wzrostem masy ciała i wskaźnika BMI (Rysunek 15). Dotychczasowe badania dotyczyły korelacji pomiędzy zawartością rtęci tylko we krwi (Cho i in. 2014;) i we włosach (Skalnaya i in. 2014), a indeksem masy BMI. Oznaczona korelacja pomiędzy otyłością pacjentów, a zawartością rtęci w kościach potwierdza stwierdzenie Barbosa i in. (2001), że czynniki takie jak płeć, wiek i indeks masy BMI mogą regulować metabolizm metali odżywczych, ale również tych toksycznych, jak rtęć. Ponadto uzyskane przeze mnie wyniki badań mogą być wykorzystane w określeniu rzeczywistej roli rtęci w patogenezie takich chorób jak nadciśnienie, oporność na insulinę czy otyłość.



**Rys. 15** Zawartość rtęci w próbkach głowy (femoral head) i szyi kości (femoral neck) udowej u kobiet w zależności od indeksu masy BMI (wartość prawidłowa (normal) 18.5 - 24.9, nadwaga (overweight) 25- 29.9, otyłość (obese) 30 i powyżej).

Podsumowując, w publikacjach H8, H9 i H10 przedstawiłam zróżnicowane zawartości metali w próbkach głowy i szyi kości udowej wśród pacjentów poddanych wszczępieniu endoprotezy stawu biodrowego przy wykorzystaniu zoptymalizowanych warunków różnych technik analitycznych. Należy podkreślić, że badany rodzaj próbki należy do rzadkich, ponieważ materiał od żyjących ludzi można pobrać tylko podczas operacji stawu biodrowego. Stąd uzyskane wyniki zawartości metali, w tym pierwiastków toksycznych tj.: Pb, Al i Hg mogą posłużyć, jako biomarker ekspozycji na metale przez organizm ludzki oraz mogą być cennym źródłem informacji o ich rzeczywistym stężeniu w tkankach kostnych.

#### **5.3.4. Podsumowanie osiągnięcia naukowego wraz z elementami nowości naukowej i wkładem do dyscypliny**

Zgodnie z przyjętym kierunkiem badań w przedstawionym cyklu publikacji H1 do H 10, poniżej przedstawiam najważniejsze wyniki i osiągnięcia ze szczególnym uwzględnieniem tych, które zawierały elementy nowości naukowej:

1. Opracowałam selektywną i efektywną metodę analizy specjacyjnej form glinu, wykorzystując po raz pierwszy stworzony układ łączonych technik analitycznych HPLC-FAAS. Wykazałam, że układ HPLC-FAAS pracuje w systemie bezpośredniego połączenia z detektorem bez konieczności stosowania reakcji derywatywacji za kolumną chromatograficzną. Kompleksowe badania nad dobraniem odpowiednich warunków chromatograficznych (m.in. rodzaj fazy ruchomej, program elucji gradientowej, rodzaj kolumny analitycznej) oraz spektrometrycznych (m.in. zliczanie sygnału analitycznego) zaowocowały przeprowadzeniem analizy specjacyjnej form fluoroglinowych i formy  $Al^{3+}$  w roztworach modelowych i w próbkach rzeczywistych, co potwierdzono poprzez modelowanie.
2. Procedurę ekstrakcji wieloetapowej (sekwencyjnej) metali ciężkich z próbek osadów rzecznych opracowałam w taki sposób, aby ograniczyć do minimum straty analitu wynikające z pierwotnej procedury ekstrakcji proponowanej w literaturze. Odpowiednio dobrane parametry ekstrakcji (m.in. czas poszczególnych etapów, rodzaj stosowanych odczynników do ekstrakcji) pozwolił mi na uzyskanie zadowalających odzysków oznaczanych metali ciężkich, a ponadto umożliwił na jakościowe i ilościowe oznaczenie chemicznych form metali ciężkich występujących w osadach dennych. Jednocześnie zastosowałam nowe podejście we frakcjonowaniu, przeprowadzając ekstrakcje w różnych frakcjach granulometrycznych osadów dennych, wykazując zależność pomiędzy wielkością frakcji granulometrycznej, a stężeniem analitu.
3. Porównałam metody analizy granulometrycznej, wykazując istotny wpływ metody analizy granulometrycznej na wartości stężeń, w zależności od oznaczanego metalu i frakcji chemicznej.
4. Opracowałam efektywną i prostą metodę ekstrakcji jednoetapowej umożliwiającej na ilościowe oznaczenie labilnych i dostępnych środowiskowo frakcji metali w próbkach stałych. W efekcie po raz pierwszy dokonałam oznaczeń labilnej frakcji glinu w osadach naniesionych przez falę tsunami. Wykazałam istotne zależności pomiędzy labilnymi frakcjami metali ciężkich w próbkach fiordów pobranych z wyspy Spitzbergen dzięki zastosowaniu technik chemometrycznych.

5. Wykazałam możliwość ograniczenia strat analitu w przypadku oznaczania boru i wpływu efektu pamięci podczas analiz przy wykorzystaniu optycznej spektrometrii emisyjnej w plazmie sprzężonej indukcyjnie, potwierdzając dobrane warunki oznaczeń wysoką wartością odzysku dla zastosowanej techniki analitycznej.
6. Opracowałam procedurę ekstrakcji frakcji boru rozpuszczalnej w wodzie. Określiłam rzeczywisty stopień ekstrakcji tego pierwiastka z herbaty do roztworu, wraz z obliczeniem dziennego zapotrzebowania przez człowieka na badany pierwiastek.
7. Wykazałam możliwość zastosowania znacząco niższych ilości gazu plazmowego przy jednoczesnym zachowaniu czułości optycznej spektrometrii emisyjnej w plazmie sprzężonej indukcyjnie, podczas analizy wielopierwiastkowej.
8. Dokonałam kompleksowych badań wpływu najważniejszych parametrów (m.in. rodzaju ekstrahenta, typu mineralizacji) opracowanych procedur przygotowania próbek win do analiz chemicznych. Jednoznacznie wykazałam na podstawie uzyskanych wysokich współczynników determinacji, że do oznaczeń Ca, Mg, P i K w winach wystarczającą metodą przygotowania próbki jest jej rozcieńczenie, a nie mineralizacja, tak jak jest to prezentowane w literaturze. Równocześnie wskazałam, że mineralizacja w systemie otwartym i zamkniętym może być stosowana zamiennie, jako metody przygotowania próbek win do analiz.
9. W celu przeprowadzenia oznaczenia pierwiastków w materiale biologicznym zastosowałam spektrometrię absorpcji atomowej z różnym typem atomizacji i optycznej spektrometrii emisyjnej w plazmie sprzężonej indukcyjnie. Wykazałam, że po odpowiednim doborze warunków pracy spektrometrów możliwe jest wykonanie analizy ilościowej makro i mikrośladników oraz metali toksycznych w tkankach kostnych.
10. Wykazałam istotne korelacje pomiędzy oznaczanymi pierwiastkami w tkance kostnej, a różnymi czynnikami środowiskowymi stosując techniki chemometryczne. Uzyskane unikatowe wyniki badań, dotychczas nie prezentowane w literaturze, dowiodły iż badane kości udowe mogą być doskonałym biomarkerem ekspozycji na metale przez organizm ludzki, co stanowi cenne źródło informacji w diagnostyce chorób układu kostnego.

### 5.3.5. Cytowana literatura

- Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Mentasti, E., Sarzanini, C., Petrella, F. Heavy metals in agricultural soils from Piedmont, Italy. Distribution, speciation and chemometric data treatment (2002) *Chemosphere*, 49 (6), pp. 545-557.
- Agusa, T., Kunito, T., Sudaryanto, A., Monirith, I., Kan-Atireklap, S., Iwata, H., Ismail, A., Sanguansin, J., Muchtar, M., Tana, T.S., Tanabe, S. Exposure assessment for trace elements from consumption of marine fish in Southeast Asia (2007) *Environmental Pollution*, 145 (3), pp. 766-777.
- Bacon J.R., Davidson C.M.,(2008) Is there a future for sequential chemical extraction?, *Analyst* 133, 25-46.
- Bantan, T., Milačić, R., Pihlar, B. Quantitative determination of trace amounts of Al-citrate by anion-exchange FPLC-ETAAS (1998) *Talanta*, 47 (4), pp. 929-941.
- Barbosa, A.C., Jardim, W., Dórea, J.G., Fosberg, B., Souza, J. Hair mercury speciation as a function of gender, age, and body mass index in inhabitants of the negro river basin, amazon, brazil (2001) *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40 (3), pp. 439-444.
- Berglund, M., Åkesson, A., Bjellerup, P., Vahter, M. Metal-bone interactions (2000) *Toxicology Letters*, 112-113, pp. 219-225.
- Bi, S.-P., Yang, X.-D., Zhang, F.-P., Wang, X.-L., Zou, G.-W. Analytical methodologies for aluminium speciation in environmental and biological samples - A review (2001) *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 370 (8), pp. 984-996.
- Bondy, S.C. Prolonged exposure to low levels of aluminum leads to changes associated with brain aging and neurodegeneration (2014) *Toxicology*, 315 (1), pp. 1-7.
- Borrmann, G., Seubert, A. (1996) Aluminum speciation by liquid chromatography concerning hydro- and geo-chemical aspects. *Analytica Chimica Acta*, 332 (2-3), pp. 233-239.
- Botelho, G.M.A., Curtius, A.J., Campos, R.C. Determination of boron by electrothermal atomic absorption spectrometry: Testing different modifiers, atomization surfaces and potential interferents (1994) *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 9 (11), pp. 1263-1267.
- Brodziak, B., Kwapulinski, J., Rzepka, J., Application of femur capitulum in estimation of the exposure to the selected heavy metals in inhabitants of industrial and recreational regions (2004) *Environmental Medicine*, vol. 7, no. 2, pp. 105-111.
- Brodziak-Dopierała, B., Kwapuliński, J., Kowol, J., Sobczyk, K., Gajda, Z. The application of principal component analysis to interpretation of occurrence of metals in the femur head (2010) *Polish Journal of Environmental Studies*, 19 (1), pp. 49-58.
- Cho, S., Jacobs, D.R., Park, K. Population correlates of circulating mercury levels in Korean adults: The Korea National Health and Nutrition Examination Survey IV (2014) *BMC Public Health*, 14 (1), art. no. 527, .
- Clarkson, T.W. The three modern faces of mercury (2002) *Environmental Health Perspectives*, 110 (SUPPL. 1), pp. 11-23.
- de la Fuente García-Soto, M.delM., Muñoz Camacho, E. Boron removal from industrial wastewaters by ion exchange: An analytical control parameter (2005) *Desalination*, 181 (1-3), pp. 207-216.
- Drabek, O., Boruvka, L., Mladkova, L., Kocarek, M. Possible method of aluminium speciation in forest soils (2003) *Journal of Inorganic Biochemistry*, 97 (1), pp. 8-15.
- Exley, C., Chappell, J.S., Birchall, J.D., A mechanism for acute aluminium toxicity in fish (1991) *Journal Theoretical Biology*, 151(3), 417-428.
- Fairman, B., Sanz-Medel, A., Jones, P., Evans, E.H. Comparison of fluorimetric and inductively coupled plasma mass spectrometry detection systems for the determination of aluminium species in waters by high-performance liquid chromatography (1998) *Analyst*, 123 (4), pp. 699-703.
- Fairman, B., Sanz-Medel, A., Jones, P., Evans, E.H. Comparison of fluorimetric and inductively coupled plasma mass spectrometry detection systems for the determination of aluminium species in waters by high-performance liquid chromatography (1998) *Analyst*, 123 (4), pp. 699-703.
- Glimcher, M.J. Bone: Nature of the calcium phosphate crystals and cellular, structural, and physical chemical mechanisms in their formation (2006) *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 64, pp. 223-282.

- González, A., Armenta, S., Pastor, A., De La Guardia, M. Searching the most appropriate sample pretreatment for the elemental analysis of wines by inductively coupled plasma-based techniques (2008) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (13), pp. 4943-4954.
- Goyer, R.A., Toxic and essential metal interactions (1997) *Annual review of nutrition*. 17(1), 37-50.
- Grindlay, G., Mora, J., Gras, L., de Loos-Vollebregt, M.T.C. Atomic spectrometry methods for wine analysis: A critical evaluation and discussion of recent applications (2011) *Analytica Chimica Acta*, 691 (1-2), pp. 18-32.
- Grindlay, G., Mora, J., Maestre, S., Gras, L. Application of a microwave-based desolvation system for multi-elemental analysis of wine by inductively coupled plasma based techniques (2008) *Analytica Chimica Acta*, 629 (1-2), pp. 24-37.
- Hellström H.O., Mjöberg B., Mallmin H., Michaëlsson K., The aluminum content of bone increases with age, but is not higher in hip fracture cases with and without dementia compared to controls (2005) *Osteoporosis International* 16 (12), pp.1982–1988.
- Hellström H.O., Mjöberg B., Mallmin H., Michaëlsson K., No association between the aluminium content of trabecular bone and bone density, mass or size of the proximal femur in elderly men and women (2006) *BMC Musculoskeletal Disorders* 7(1), 69 pp. 1–6.
- Jones, P. The investigation of aluminium speciation in natural and potable waters using short-column ion chromatography (1991) *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 44 (1), pp. 1-10.
- Kim, Y.-N., Kim, Y.A., Yang, A.-R., Lee, B.-H. Relationship between blood mercury level and risk of cardiovascular diseases: Results from the Fourth Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES IV) 2008-2009 (2014) *Preventive Nutrition and Food Science*, 19 (4), pp. 333-342.
- Kot, A., Namiesnik, J. The role of speciation in analytical chemistry (2000) *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 19 (2-3), pp. 69-79.
- Krewski, D., Yokel, R.A., Nieboer, E., Borchelt, D., Cohen, J., Harry, J., Kacew, S., Lindsay, J., Mahfouz, A.M., Rondeau, V. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide (2007) *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 10 (SUPPL. 1), pp. 1-269.
- Kruger, P.C., Parsons, P.J., Galusha, A.L., Morrisette, M., Recker, R.R., Howard, L.J. Excessive aluminum accumulation in the bones of patients on long-term parenteral nutrition: Postmortem analysis by electrothermal atomic absorption spectrometry (2014) *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 38 (6), pp. 728-735.
- Kruger, P.C., Schell, L.M., Stark, A.D., Parsons, P.J. A study of the distribution of aluminium in human placental tissues based on alkaline solubilization with determination by electrothermal atomic absorption spectrometry (2010) *Metallomics*, 2 (9), pp. 621-627.
- Kumirska J. Gołębowski M.; Paszkiewicz M. ; Bychowska A., *Analiza żywności* (2010) Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk, pp. 1-276.
- Kupraszewicz, E., Brzóška, M.M. Excessive ethanol consumption under exposure to lead intensifies disorders in bone metabolism: A study in a rat model (2013) *Chemico-Biological Interactions*, 203 (2), pp. 486-501.
- Lian, H., Kang, Y., Bi, S., Arkin, Y., Shao, D., Li, D., Chen, Y., Dai, L., Gan, N., Tian, L. Direct determination of trace aluminum with quercetin by reversed-phase high performance liquid chromatography (2004) *Talanta*, 62 (1), pp. 43-50.
- Mazerski J (2004) *Fundamentals of chemometrics*. Gdańsk University of Technology, Gdańsk.
- Melke, J. The contents of selected trace elements in the soils of Bellsund, Spitsbergen (2006) *Polish Journal of Soil Science*, 39 (1), pp. 21-32.
- Michalak, I., Chojnacka, K., Saeid, A., Mikulewicz, M. Research on mercury levels in scalp hair (2014) *Polish Journal of Environmental Studies*, 23 (3), pp. 793-800.
- Mitrović, B., Milačić, R. Speciation of aluminium in forest soil extracts by size exclusion chromatography with UV and ICP-AES detection and cation exchange fast protein liquid chromatography with ETAAS detection (2000) *Science of the Total Environment*, 258 (3), pp. 183-194.
- Mitrović, B., Milačić, R., Pihlar, B., Simončič, P. Speciation of trace amounts of aluminium in environmental samples by cation-exchange FPLC – ETAAS (1998) *Analisis*, 26 (10), pp. 381-388.
- Mjöberg, B., Hellquist, E., Mallmin, H., Lindh, U. Aluminum, Alzheimer's disease and bone fragility (1997) *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 68 (6), pp. 511-514.

- Montes Bayón, M., Rodríguez García, A., García Alonso, J.I., Sanz-Medel, A. Indirect determination of trace amounts of fluoride in natural waters by ion chromatography: A comparison of on-line post-column fluorimetry and ICP-MS detectors (1999) *Analyst*, 124 (1), pp. 27-31.
- Moore, A., Nishimura, Y., Gelfenbaum, G., Kamataki, T., Triyono, R. Sedimentary deposits of the 26 December 2004 tsunami on the northwest coast of Aceh, Indonesia (2006) *Earth, Planets and Space*, 58 (2), pp. 253-258.
- Motellier, S., Pitsch, H. Determination of aluminium and its fluoro complexes in natural waters by ion chromatography (1994) *Journal of Chromatography A*, 660 (1-2), pp. 211-217.
- Namieśnik, J., Chrzanowski, W., Szpinek, P. Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym (2003) Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego. Wydział Chemiczny. Politechnika Gdańska. ISBN 83-919081-1-9.
- Namieśnik, J., Rabajczyk, A., The speciation of aluminium in environmental samples (2010) *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40, pp. 68-88.
- Nunes, A.M., de Sousa, R.A., da Silva, C.S., Peixoto, R.R.A., Vieira, M.A., Ribeiro, A.S., Cadore, S. Fast determination of Fe, Mg, Mn, P and Zn in meat samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after alkaline solubilization (2013) *Journal of Food Composition and Analysis*, 32 (1), pp. 1-5.
- O'Neill, P., *Chemia środowiska* (1997) Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa. ISBN: 830112377X.
- Pejović-Milić, A., Byun, S.H., Comsa, D.C., McNeill, F.E., Prestwich, W.V., Chettle, D.R. In vivo measurement of bone aluminium: Recent developments (2005) *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99 (9 SPEC. ISS.), pp. 1899-1903.
- Pohl, P. What do metals tell us about wine? (2007) *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26 (9), pp. 941-949.
- Pyrżyńska, K. Chemical speciation and fractionation of metals in wine (2007) *Chemical Speciation and Bioavailability*, 19 (1), pp. 1-8.
- Rajput, M., Jain, V.K., Jain, D.P., Aggarwal, M., Khandal, R.K. Quantitative determination of boron content in tamsulosin hydrochloride using inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (2010) *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2 (4), pp. 182-185.
- Rao, C.R.M., Sahuquillo, A., Lopez Sanchez, J.F. A review of the different methods applied in environmental geochemistry for single and sequential extraction of trace elements in soils and related materials (2008) *Water, Air, and Soil Pollution*, 189 (1-4), pp. 291-333
- Riihimäki, V., Aitio, A. Occupational exposure to aluminum and its biomonitoring in perspective (2012) *Critical Reviews in Toxicology*, 42 (10), pp. 827-853.
- Sah, R.N., Brown, P.H. Techniques for boron determination and their application to the analysis of plant and soil samples (1997) *Plant and Soil*, 193 (1-2), pp. 15-33.
- Salonen, J.T., Seppänen, K., Lakka, T.A., Salonen, R., Kaplan, G.A. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: A population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland (2000) *Atherosclerosis*, 148 (2), pp. 265-273.
- Santos, D.C.M.B., Carvalho, L.S.B., Lima, D.C., Leão, D.J., Teixeira, L.S.G., Korn, M.G.A. Determination of micronutrient minerals in coconut milk by ICP OES after ultrasound-assisted extraction procedure (2014) *Journal of Food Composition and Analysis*, 34 (1), pp. 75-80.
- Shiki, T., Tachibana, T., Fujiwara, O., Goto, K., Nanayama, F., Yamazaki, T. Characteristic Features of Tsunamiites (2008) *Tsunamiites - Features and Implications*, pp. 319-340.
- Skalnaya, M.G., Tinkov, A.A., Demidov, V.A., Serebryansky, E.P., Nikonorov, A.A., Skalny, A.V. Hair Toxic Element Content in Adult Men and Women in Relation to Body Mass Index (2014) *Biological Trace Element Research*, 161 (1), pp. 13-19.
- Sutherland, R.A. Comparison between non-residual Al, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn released by a three-step sequential extraction procedure and a dilute hydrochloric acid leach for soil and road deposited sediment (2002) *Applied Geochemistry*, 17 (4), pp. 353-365.
- Sutherland, R.A., Tack, F.M.G. Determination of Al, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in certified reference materials using the optimized BCR sequential extraction procedure (2002) *Analytica Chimica Acta*, 454 (2), pp. 249-257.
- Syversen, T., Kaur, P. The toxicology of mercury and its compounds (2012) *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26 (4), pp. 215-226.

- Szczuciński, W., Niedzielski, P., Kozak, L., Frankowski, M., Zioła, A., Lorenc, S. Effects of rainy season on mobilization of contaminants from tsunami deposits left in a coastal zone of Thailand by the 26 December 2004 tsunami (2007) *Environmental Geology*, 53 (2), pp. 253-264.
- Szczuciński, W., Niedzielski, P., Rachlewicz, G., Sobczyński, T., Zioła, A., Kowalski, A., Lorenc, S., Siepak, J. Contamination of tsunami sediments in a coastal zone inundated by the 26 December 2004 tsunami in Thailand (2005) *Environmental Geology*, 49 (2), pp. 321-331.
- Szczuciński, W., Zajaczkowski, M., Scholten, J. Sediment accumulation rates in subpolar fjords - Impact of post-Little Ice Age glaciers retreat, Billefjorden, Svalbard (2009) *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 85 (3), pp. 345-356.
- Tang, S., Parsons, P.J., Slavin, W. Rapid and reliable method for the determination of aluminium in bone by electrothermal atomic absorption spectrometry (1996) *Analyst*, 121 (2), pp. 195-200.
- Templeton, D.M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.-G., Muntau, H., Van Leeuwen, H.P., Łobiński, R. (2000) Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC recommendations 2000) *Pure and Applied Chemistry*, 72 (8), pp. 1453-1470.
- Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson M., Sequential extraction procedure for speciation of particulate trace metals (1978) *Analytical Chemistry*, 51 (7), pp.844-851
- Tinkov, A.A., Ajsuvakova, O.P., Skalnaya, M.G., Popova, E.V., Sinitskii, A.I., Nemereshina, O.N., Gatiatulina, E.R., Nikonorov, A.A., Skalny, A.V. Mercury and metabolic syndrome: A review of experimental and clinical observations (2015) *BioMetals*, 28 (2), pp. 231-254.
- Tsunoda, K.-I., Umemura, T., Ohshima, K., Aizawa, S.-I., Yoshimura, E., Satake, K.-I. Determination and speciation of aluminum in environmental samples by cation exchange high-performance liquid chromatography with high resolution ICP-MS detection (2001) *Water, Air, and Soil Pollution*, 130 (1-4 III), pp. 1589-1594.
- USEPA. EPA. 1996. "Method 3050B: Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils," Revision 2.
- Vahter, M., Berglund, M., Åkesson, A., Lidén, C. Metals and women's health (2002) *Environmental Research*, 88 (3), pp. 145-155.
- Walkusz, W., Kwaśniewski, S., Dmoch, K., Hop, H., Zmijewska, M.I., Bielecka, L., Falk-Petersen, S., Siciński, J. Characteristics of the Arctic and Antarctic mesozooplankton in the neritic zone during summer (2004) *Polish Polar Research*, 25 (3-4), pp. 275-291.
- Walna, B., Spychalski, W., Siepak, J. Assessment of potentially reactive pools of aluminium in poor forest soils using two methods of fractionation analysis (2005) *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99 (9 SPEC. ISS.), pp. 1807-1816.
- Willet, I.R. (1989) Direct determination of aluminum and its cationic fluoro-complexes by ion chromatography. *Soil Science Society of America Journal*. 53, 1385.
- Wiltshire, G.A., Bolland, D.T., Littlejohn, D. Study of the atomization of boron in electrothermal atomic absorption spectrometry and hollow cathode furnace atomic non-thermal excitation spectrometry (1994) *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 9 (11), pp. 1255-1262.
- Zaichick, S., Zaichick, V., Karandashev, V.K., Moskvina, I.R. The effect of age and gender on 59 trace-element contents in human rib bone investigated by inductively coupled plasma mass spectrometry (2011) *Biological Trace Element Research*, 143 (1), pp. 41-57.
- Zaijun, L., Zhengwei, C., Jian, T. The determination of boron in food and seed by spectrophotometry using a new reagent 3,4-dihydroxyazomethine-H (2006) *Food Chemistry*, 94 (2), pp. 310-314.
- Zajaczkowski, M.J., Legezyńska, J. Estimation of zooplankton mortality caused by an Arctic glacier outflow (2001) *Oceanologia*, 43 (3), pp. 341-351.
- Zioła-Frankowska, A., Frankowski, M., Siepak, J., Development of a new analytical method for online simultaneous qualitative determination of aluminium (free aluminium ion, aluminium-fluoride complexes) by HPLC-FAAS (2009) *Talanta*. 78, 623-630.

## 6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

### 6.1. Przebieg pracy naukowo – badawczej

W roku 1997 ukończyłam 4-letnie liceum ogólnokształcące (I LO St. Dubois w Koszalinie), w klasie o profilu biologiczno-chemicznym. W tym samym roku rozpoczęłam 5 letnie studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, na kierunku chemia środowiska. W trakcie III roku studiów, rozpoczęłam współpracę w grupie badawczej Prof. zw. dr hab. Jerzego Siepaka, który był kierownikiem Zakładu Analizy Wody i Gruntów, Wydziału Chemii UAM. W tymże Zakładzie wykonałam również pracę magisterską pod opieką Profesora, uzyskując tytuł magistra chemii, w zakresie chemii środowiska. Następnie, od 2002 roku do stycznia 2004 roku, byłam na wolontariacie naukowo-badawczym w Zakładzie Analizy Wody i Gruntów u Prof. zw. dr hab. Jerzego Siepaka. W styczniu 2004, decyzją Jego Magnificencji Rektora, Prof. zw. dr hab. Stanisława Lorenca, otrzymałam stypendium rektorskie i zostałam przyjęta na studia doktoranckie w Collegium Polonicum w Słubicach na kierunku ochrona środowiska. W tym samym roku ukończyłam studia podyplomowe w zakresie „Analityki zanieczyszczeń środowiska i żywności” na Wydziale Chemii Politechniki Gdańskiej. W czerwcu 2006 roku, zostałam przeniesiona na studia doktoranckie na Wydziale Chemii UAM, na których w lipcu 2006 otworzyłam przewód doktorski. Prof. zw. dr hab. Jerzy Siepak był promotorem i opiekunem naukowym mojej pracy doktorskiej, która została zrealizowana w ramach otrzymanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego grantu badawczego promotorskiego. Stopień doktora nauk chemicznych w zakresie chemii, uzyskałam 20 czerwca 2008. Od 1 października 2008 roku zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Zakładzie Analizy Wody i Gruntów (kierownik Prof. zw. dr hab. Jerzy Siepak), Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Następnie od marca 2014 jestem adiunktem w Zakładzie Chemii Analitycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza (kierownik Prof. zw. dr hab. Wiesław Wasiak). Ponadto od 6 grudnia 2013 roku, zostałam powołana przez Dziekana Wydziału Chemii UAM Prof. zw. dr hab. Henryka Koroniaka na Pełnomocnika Dziekana Wydziału Chemii UAM do spraw promocji.

W ramach mojej pracy naukowo-badawczej realizowałam cele przedstawione w publikacjach z cyklu habilitacyjnego (H1-H10) oraz brałam udział w badaniach z zakresu analityki chemicznej w aspektach tworzenia nowych metod oraz ich zastosowania w szerokim spektrum analityki dla próbek o zróżnicowanej matrycy.

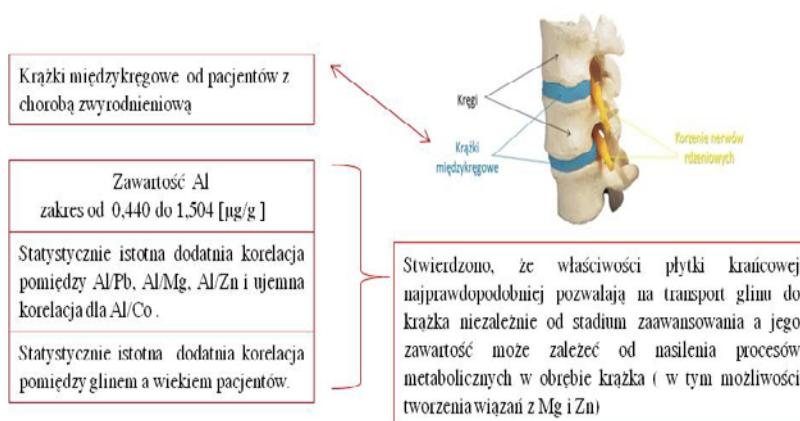
*Pełen wykaz opublikowanych prac naukowych, wykładów, komunikatów, posterów i konferencji oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki zawarty jest w Załączniku 2.*

#### **Prace te dotyczyły następujących tematów badawczych:**

- analityki glinu i metali ciężkich przy wykorzystaniu technik spektrometrycznych w próbkach osadów dennych, w wodach podziemnych, w profilach glebowych i w skałach osadowych (m.in. A1, A2, A4, A6, A7, A8, A10, A15, A16, A18, A21) oraz analizy parametrów fizykochemicznych w próbkach środowiskowych (C1, C2, C4, C8, C22, C26)
- analizy chemicznej próbek osadów naniesionych przez falę tsunami oraz oceny stopnia zanieczyszczenia i dostępności biologicznej analizowanych pierwiastków (A4, A9)
- zastosowania wielowymiarowych metod statystycznych (analizy skupień (CA), analizy czynnikowej (FA), analizy składników głównych (PCA), analizy dyskryminacyjnej (DA) oraz hierarchicznej analizy skupień (HCA)) w badaniach środowiskowych (A13, A23, A25, C25)



- opracowywania nowych metod w analizie specjacyjnej glinu i jego kompleksów przy wykorzystaniu metod chromatograficznych i spektrometrycznych z różnym typem detekcji (A17, A19, A20, A26, C18, C27)
- zastosowania programów do modelowania chemicznego modelowania w analizie specjacyjnej glinu oraz na potrzeby tworzenia metod chromatograficznych (A14, C15)
- opracowywania nowych metod ekstrakcyjnych dla próbek biologicznych i próbek żywności (A11, A22, A27, A28, C7)
- oceny zmian zawartości mikroelementów w tkance krążka międzykręgowego w przebiegu choroby zwyrodnieniowej kręgosłupa przy wykorzystaniu technik spektrometrycznych z różnym typem detekcji oraz porównanie oznaczonych zawartości do obserwowanych w obrębie innych tkanek ze szczególnym uwzględnieniem tkanki kostnej przy zastosowaniu technik chemometrycznych (A23, A24, A25, C25). Jednym z ważniejszych rezultatów tych badań, było oznaczenie w próbkach krążków międzykręgowych, po raz pierwszy w literaturze, korelacji pomiędzy Al a innymi pierwiastkami oraz wskazanie na potencjalny mechanizm transportu Al w organizmie człowieka (Rysunek 16).



**Rys. 16** Wyniki badań analizy krążków międzykręgowych pod kątem zawartości Al i jego korelacji (publikacje A23 i A25).

Realizacja badań omówionych w cyklu habilitacyjnym (H1-H10) oraz mojej pozostałej działalności naukowej była możliwa dzięki pozyskanym środkom finansowym. Badania finansowane były z projektów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, poświęconych udoskonaleniu i opracowywaniu metod przygotowania próbek do analiz chemicznych, tworzeniu nowych układów analitycznych technik łączonych oraz rozwiązywaniu metodycznych i analitycznych problemów w analizie specjacyjnej i frakcjonowaniu (projekt T09D03827 na lata 2004-2005; N 304 374 338 na lata 2010-2011 N30508231/3249 na lata 2006-2008; N 52501732/1871 na lata 2006-2008; N305101235 na lata 2008-2010; N304013337 na lata 2009-2010; oraz projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki 2012/07/D/NZ8/01030 na lata 2013-2016). W dwóch pierwszych projektach pełniłam funkcję kierownika, w pozostałych głównego wykonawcy. Podjęcie przeze mnie przedstawionych tematów badawczych było możliwe dzięki determinacji rozwiązywania prostych, jak i złożonych problemów analitycznych oraz dzięki wielu stażom zagranicznym, które pozwoliły mi przede wszystkim na możliwość prowadzenia badań przy wykorzystaniu nowoczesnej aparatury.

## 6.2. Plany na przyszłość i perspektywy rozwoju

W ramach dalszych prac badawczych zamierzam kontynuować dotychczasową tematykę, zwłaszcza tą związaną z tworzeniem nowych aplikacji w analityce medycznej i analityce żywności. Planuję rozwinąć swój warsztat badawczy, wykorzystując w badaniach spektrometrię fluorescencji rentgenowskiej (EDX), spektrometrię mas ze wzbudzeniem w indukowanej plazmie pracującą samodzielnie i w układzie z chromatografem cieczowym (LC-ICP-MS).

### Najbliższe plany badawcze:

- Opracowanie procedury jednoczesnego oznaczania metali ciężkich i glinu oraz boru i glinu w próbkach środowiskowych przy wykorzystaniu metod chromatograficznych (HPLC-FLD, HPLC-DAD, HPLC-ICP-MS)
- Badania w zakresie analityki chemicznej związane ze stworzeniem nowych metod analizy specjacyjnej glinu w połączeniu z nieorganicznymi ( $F^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ) i organicznymi ( $C_2O_4^{2-}$ ,  $C_3H_5O(COO)_3^{3-}$ ) ligandami w winach polskich i zagranicznych przy wykorzystaniu metody LC-ICP-MS oraz HPLC-FLD,
- Badania o charakterze aplikacyjnym w próbkach wina, z uwzględnieniem gatunków wina, szczepu, miejsca produkcji i roku produkcji wina (przede wszystkim wina produkowane w Polsce)
- Przeprowadzenie modelowania kompleksów glinu z ligandami nieorganicznymi i organicznymi z wykorzystaniem programów do chemicznego modelowania: Mineql i Medusa.
- Analityka makro i mikrośladników oraz metali toksycznych w tkankach narządu ruchu w oparciu o tkanki łatwo dostępne (włos, płytki paznokciowa, krew, mocz) oraz w tkankach niedostępnych w badaniach przesiewowych, takich jak tkanka kostna, więzadłowa, krążka międzykręgowego oraz chrząstka przy wykorzystaniu metod chromatograficznych i spektrometrycznych.
- Określenie profili pierwiastków śladowych w chorobie zwyrodnieniowej krążka międzykręgowego oraz płytki krańcowej w celu szczegółowej analizy patogenezы choroby zwyrodnieniowej kręgosłupa.

Data

8. 12. 2016

Podpis

Anetta Kucińska-Frankowska