

Autor rozprawy doktorskiej:

Magdalena Scheibe

Tytuł rozprawy doktorskiej:

Opracowanie nowych metodyk oznaczania związków bioaktywnych i zapachowych w próbkach owoców miechunki peruwiańskiej (*Physalis peruviana*) oraz innych "superowoców" jako narzędzi do oceny ich walorów zdrowotnych i sensorycznych



**POLITECHNIKA  
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Imię i nazwisko autora rozprawy: Magdalena Kupska

Dyscyplina naukowa: Chemia

## ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: Opracowanie nowych metodyk oznaczania związków bioaktywnych i zapachowych w próbkach owoców miechunki peruwiańskiej (*Physalis peruviana*) oraz innych "superowoców" jako narzędzi do oceny ich walorów zdrowotnych i sensorycznych.

Tytuł rozprawy w języku angielskim: Development of new methodologies for the determination of bioactive and aroma compounds in samples of cape gooseberry fruits (*Physalis peruviana*) and other "superfruits" as a tool to evaluate their health benefits and sensory.

Promotor	Promotor pomocniczy
Prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik	Dr inż. Justyna Gromadzka

Gdańsk, rok 2017





*Składam serdeczne podziękowania*

***Panu prof. dr hab. inż. Jackowi Namieśnikowi***

*za cenne uwagi, wskazówki i sugestie, dzięki którym powstała niniejsza praca*

***Pani dr inż. Justynie Gromadzkiej***

*za wszelką pomoc, konstruktywną krytykę i nieustanną mobilizację do pracy*

***Pracownikom i Doktorantom z Katedry Chemii Analitycznej***

*za miłą atmosferę i wszelkie gesty sympatii*

*Pragnę podziękować również*

***Panu prof. Luigi Mondello wraz z całym zespołem pracowników  
Department of Pharmaceutical Chemistry and Health Products  
z University of Messina, Włochy***

*za możliwość współpracy, zaufanie, przekazaną wiedzę, życzliwą pomoc  
oraz serdeczne przyjęcie do Zespołu*

***Panu prof. dr hab. inż. Stefanowi Jurdze wraz z całym zespołem  
pracowników Centrum NanoBioMedycznego UAM w Poznaniu***

*za przekazaną wiedzę, umożliwienie pracy w nowoczesnych laboratoriach  
oraz serdeczne przyjęcie do Zespołu*

***Panu prof. dr hab. Henrykowi Jeleniowi wraz z całym zespołem  
pracowników Zakładu Chemii Żywności i Analizy Instrumentalnej  
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu***

*za miłą i owocną współpracę, cenne konsultacje, wszelkie rady, zarówno  
merytoryczne jak i techniczne, cierpliwość oraz przekazane wskazówki  
dotyczące pracy w laboratorium*

*oraz*

***Samorządowi Województwa Pomorskiego, Unii Europejskiej,  
Narodowemu Centrum Nauki, LECO Polska***

*za wsparcie finansowe w trakcie realizacji badań.*

*W sposób szczególny dziękuję*

***Rodzicom i Bratu***

*za wieloletnie wsparcie, cierpliwość, dobre słowo,  
za wiarę we mnie i w moje możliwości,  
za bezwarunkową i bezgraniczną miłość.*

***Błażejowi***

*za udzielanie wskazówek w pisaniu projektów i publikacji, korektę prac,  
motywowanie do nowych wyzwań, codzienną troskę i docenianie moich  
umiejętności.*



# SPIS TREŚCI

<b>WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW</b>	<b>7</b>
<b>WPROWADZENIE</b>	<b>9</b>
<b>1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA</b>	<b>10</b>
<b>1.1. Superowoce</b>	<b>10</b>
1.1.1. Prozdrowotne właściwości superowoców	11
1.1.2. Owoce tropikalne i owoce strefy borealnej	12
1.1.3. Miechunka peruwiańska	13
<b>1.2. Związki z grupy terpenów</b>	<b>14</b>
1.2.1. Charakterystyka	14
1.2.2. Właściwości bioaktywne i zapachowe terpenów oraz występowanie w przyrodzie	16
<b>1.3. Metodyki oznaczania terpenów w próbkach owoców</b>	<b>17</b>
1.3.1. Pobieranie i przygotowywanie próbek do badań	20
1.3.2. Techniki ekstrakcji terpenów	20
1.3.2.1. Zielone techniki ekstrakcji	21
1.3.2.2. Ekstrakcja w rurce (ITEX)	22
1.3.2.3. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME)	23
1.3.3. Wykorzystanie chromatografii gazowej w analityce związków lotnych i średniolotnych	24
<b>2. CEL I ZAKRES PRACY</b>	<b>28</b>
<b>3. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Optymalizacja warunków metody oznaczania wybranych związków lotnych w owocach miechunki peruwiańskiej z wykorzystaniem ekstrakcji w rurce w połączeniu z chromatografią gazową i spektrometrią mas (ITEX/GC-MS)</b>	<b>29</b>
<b>3.2. Optymalizacja warunków metody oznaczania wybranych lotnych związków z grupy terpenów z wykorzystaniem mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej w połączeniu z dwuwymiarową chromatografią gazową i spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu HS-SPME/GC×GC-TOFMS</b>	<b>30</b>
<b>3.3. Oznaczanie profilu terpenów w potencjalnych superowocach wykorzystując mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej w połączeniu z dwuwymiarową chromatografią gazową i spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu HS-SPME/GC×GC-TOFMS</b>	<b>31</b>
<b>3.4. Analiza ilościowa terpenów w jagodzie kameczackiej wykorzystując mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej w połączeniu z dwuwymiarową chromatografią gazową i spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu HS-SPME/GC×GC-TOFMS</b>	<b>32</b>

<b>4. PODSUMOWANIE I WNIOSKI</b>	<b>32</b>
<b>STRESZCZENIE</b>	<b>35</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>36</b>
<b>LITERATURA</b>	<b>37</b>
<b>DOROBEK NAUKOWY</b>	<b>47</b>
<b>ZAŁĄCZNIKI</b>	<b>53</b>

## Wykaz skrótów i akronimów

Skrót/akronim	Termin w języku angielskim	Termin w języku polskim
<b>1D-GC</b>	<i>One Dimensional Gas Chromatography</i>	Jednowymiarowa chromatografia gazowa
<b>CAR</b>	<i>Carboxen</i>	Karboksen
<b>CFM</b>	<i>Consumable – Free Modulator</i>	Modulator nie zużywający mediów chłodzących
<b>CW</b>	<i>Carbowax</i>	Karbowaks
<b>DVB</b>	<i>Divinylbenzene</i>	Diwinylobenzen
<b>Enantio-MDGC-MS</b>	<i>Enantioselective Multidimensional Gas Chromatography Mass Spectrometry</i>	Enancjoselektywna wielowymiarowa chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
<b>GC×GC</b>	<i>Comprehensive Two – Dimensional Gas Chromatography</i>	Kompletna dwuwymiarowa chromatografia gazowa
<b>GC×GC-MS</b>	<i>Comprehensive Two – Dimensional Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i>	Kompletna dwuwymiarowa chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
<b>GC×GC-qMS</b>	<i>Comprehensive Two – Dimensional Gas Chromatography – quadrupole Mass Spectrometry</i>	Kompletna dwuwymiarowa chromatografia gazowa sprzężona z kwadrupolową spektrometrią mas
<b>GC×GC–TOFMS</b>	<i>Comprehensive Two – Dimensional Gas Chromatography Time – Of – Flight Mass Spectrometry</i>	Kompletna dwuwymiarowa chromatografia gazowa
<b>GC-FID</b>	<i>Gas Chromatography – Flame Ionization Detector</i>	Chromatografia gazowa połączona z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym
<b>GC-MS</b>	<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i>	Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
<b>GC-qMS</b>	<i>Gas Chromatography – Quadrupole Mass Spectrometry</i>	Chromatografia gazowa sprzężona z kwadrupolową spektrometrią mas



## Wykaz skrótów i akronimów cd.

<b>GC-O</b>	<i>Gas Chromatography– Olfactometry</i>	Chromatografia gazowa połączona z olfaktometrią
<b>HD</b>	<i>Hydrodistillation</i>	Hydrodestylacja
<b>HS-SPME</b>	<i>Headspace Solid – Phase Microextraction</i>	Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej
<b>ITEX</b>	<i>In-Tube Extraction</i>	Ekstrakcja w rurce
<b>LC</b>	<i>Liquid chromatography</i>	Chromatografia cieczowa
<b>LLE</b>	<i>Liquid – Liquid Extraction</i>	Ekstrakcja ciecz-ciecz
<b>LLME</b>	<i>Liquid – Liquid MicroExtraction</i>	Mikroekstrakcja ciecz-ciecz
<b>MDGC-C/P- IRMS</b>	<i>Multidimensional Gas Chromatography – Combustion/Pyrolysis – Isotope Ratio Mass Spectrometry</i>	Wielowymiarowa chromatografia gazowa sprzężona ze spalaniem/pirolizą i spektrometrią mass stosunków izotopowych
<b>MTBE</b>	<i>Methyl Tert-Butyl Ether</i>	Eter metylo-tert-butylowy
<b>NIST</b>	<i>National Institute of Standards and Technology</i>	Narodowy Instytut Standaryzacji i Technologii
<b>PA</b>	<i>Poliamide</i>	Poliamid
<b>PDMS</b>	<i>Polydimethylsiloxane</i>	Polidimetylosiloksan
<b>RI</b>	<i>Retention Index</i>	Indeks retencji
<b>RT</b>	<i>Room Temperature</i>	Temperatura pokojowa
<b>SAFE</b>	<i>Solvent – Assisted Flavor Evaporation</i>	Destylacja związków zapachowych wspomagana rozpuszczalnikiem
<b>SBSE</b>	<i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>	Ekstrakcja z wykorzystaniem wirującego elementu sorpcyjnego
<b>SDE</b>	<i>Simultaneous Distillation – Extraction</i>	Ekstrakcja ciągła z jednoczesną destylacją z parą wodną
<b>SFE</b>	<i>Supercritical fluid extraction</i>	Ekstrakcja za pomocą płynu w stanie nadkrytycznym
<b>SPE</b>	<i>Solid – Phase Extraction</i>	Ekstrakcja do fazy stałej
<b>SPME</b>	<i>Solid – Phase Microextraction</i>	Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej
<b>SSDE</b>	<i>Simultaneous Steam Distillation Extraction</i>	Ekstrakcja z jednoczesną destylacją z parą wodną

# Wprowadzenie

Dążność do wykrywania, identyfikacji i oznaczania śladowych i ultraśladowych składników w próbkach charakteryzujących się złożonym składem matrycy stanowi jedno z najważniejszych wyzwań dla chemików analityków. W związku z tym, w wielu laboratoriach trwają intensywne badania związane z modyfikacjami już znanych lub opracowaniem nowych rozwiązań metodycznych zapewniających możliwość prowadzenia badań analitycznych próbek różnego pochodzenia, w których anality występują na bardzo niskich poziomach zawartości. W tych nowych procedurach analitycznych szczególne znaczenie nabiera etap przygotowania próbek do analizy.

Ważną rolę odgrywają również urządzenia zapewniające możliwość rozdzielenia mieszanin analitów obecnych w próbce na poszczególne indywidualne chemiczne. W związku z tym następuje szybki rozwój technik chromatograficznych, w tym także technik łączonych oraz technik wielowymiarowych. Klasycznym przykładem jest rozwój i rozszerzenie obszaru praktycznego wykorzystania dwuwymiarowej chromatografii gazowej (GC×GC).

Początkowo technikę GC×GC wykorzystywano głównie do analizy próbek produktów naftowych, dlatego też sądzono, że technika ta służy jedynie do analizy olejów i powstał błędny pogląd, że na tym kończą się możliwości analityczne tej techniki. Rozwój aparatury w zakresie dwuwymiarowej chromatografii gazowej oraz wyniki badań nad opracowywaniem nowych metodyk analitycznych, stanowią podstawę do stwierdzenia, że technikę tą należy uważać za doskonałe narzędzie analityczne do analizy próbek o złożonym składzie matrycy, a w szczególności oznaczania związków lotnych i średniolotnych. Dzięki temu jest ona powszechnie stosowana w następujących obszarach nauki i techniki: przemysł petrochemiczny, ochrona środowiska, przemysł kosmetyczny i perfumeryjny, analiza żywności, analiza kliniczna, badania planetarne (analiza fragmentów meteorytów), metabolomika (badanie ludzkiego oddechu) i proteomika (identyfikacja białek w próbkach biologicznych) oraz kryminalistyka.

Ze względu na złożoność próbek żywności różnego pochodzenia, technika GC×GC z powodzeniem jest coraz częściej stosowana w analizie produktów spożywczych, a zwłaszcza w badaniach mających na celu ocenę jakości i autentyczności żywności.



Wyniki analizy frakcji lotnej próbek żywności, charakterystyka ich profilu zapachowego oraz określanie zawartości związków o walorach sensorycznych i leczniczych za pomocą techniki GC×GC mogą być źródłem informacji niezbędnych do:

- oceny stopnia dojrzałości,
- zdrowotności,
- klasyfikacji (np. trwałość, skład i wartości odżywcze, sposób przechowywania),
- wykrywania zafałszowań,
- rozróżniania pochodzenia botanicznego i geograficznego,
- określania jakości produktów żywnościowych,
- ewentualnego zanieczyszczenia produktów żywnościowych.

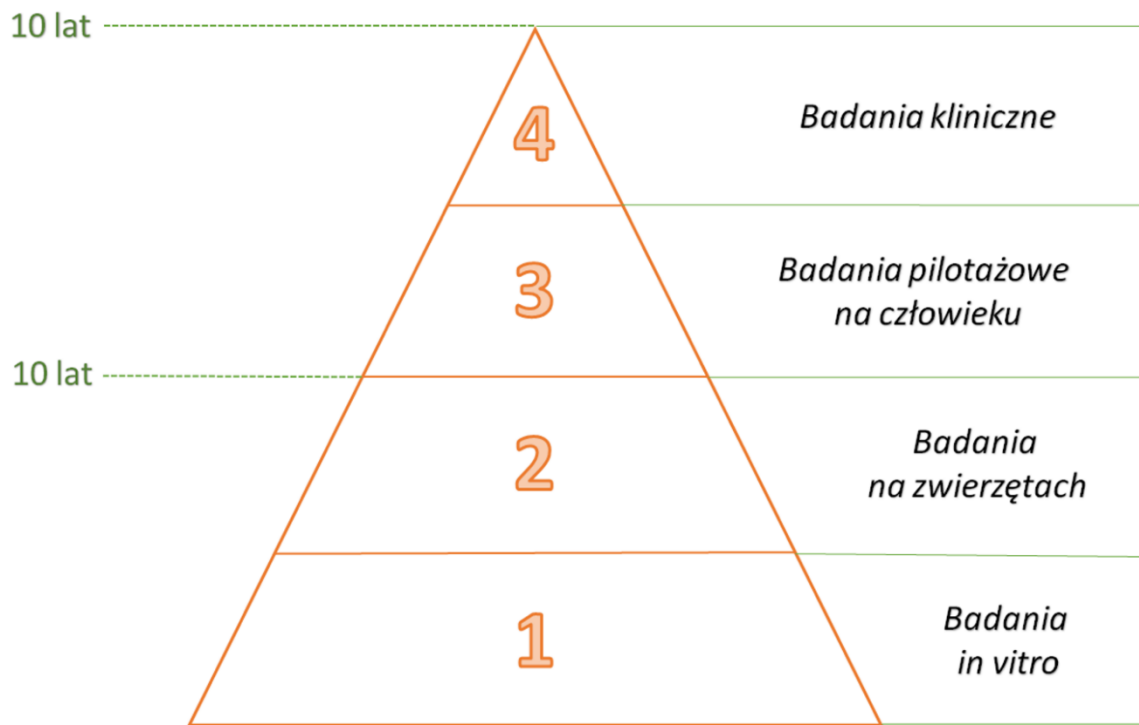
## 1. Część teoretyczna

### 1.1. Superowoce

Termin „superowoce” (superfruits) został użyty w przemyśle żywnościowym po raz pierwszy w 2005 roku [1] w celach marketingowych do określania soków z zaledwie kilku egzotycznych owoców dostępnych na rynku amerykańskim [2], a w chwili obecnej wykorzystywany jest do określania szerokiej gamy produktów na bazie różnych owoców występujących na globalnym rynku. Od samego początku, kategoria superowoców była bardziej przedmiotem marketingu niż świata nauki. Pojawiające się na rynku napoje wytworzone z rzadkich gatunków owoców, sprzedawane są konsumentom z przesłaniem posiadania właściwości przeciwutleniających i prozdrowotnych. Niestety nie wszystkie owoce proponowane marketingowo jako „super” rzeczywiście spełniają stawiane im wymagania. Wiele z nich nie ma właściwości prozdrowotnych potwierdzonych naukowo lub nie jest dopuszczonych przez organy regulacji prawa.

Kilka lat temu ukazała się lista 20 „najlepszych” naturalnych superowoców. W skład tej listy wchodzi: mango, figi, wiśnie, maliny, pomarańcze, truskawki, guawy, jagody Goi, jeżyny, czerwone winogrona, czarne porzeczki, żurawina, daktyle, kiwi, granaty, papaje, borówki, suszone śliwki, owoce euterpy warzywnej (*acai berries*) oraz rokitnika. Każdemu z tych owoców przypisano odpowiednią rangę opierając się na określonych kryteriach oceny [3]. Jednak, aby smaczny owoc został uznany za prawdziwy superowoc, musi przejść przez żmudną i długotrwałą procedurę składającą się z czterech etapów przedstawionych

na rysunku 1. Piramida ilustruje etapy badań naukowych, które są niezbędne m.in. do osiągnięcia statusu posiadania właściwości prozdrowotnych.



Rys. 1. Schemat obrazujący etapy prowadzenia badań naukowych w celu zakwalifikowania owoców do superowoców [3].

U podstaw piramidy znajdują się badania podstawowe czyli eksperymenty laboratoryjne, które mają wykazać celowość prowadzenia dalszych badań. Należą do nich m.in. analiza jakościowa i ilościowa próbek badanych owoców. Każdy superowoc powinien mieć naukowo udowodnione działanie prozdrowotne, ponieważ bez udokumentowanych wyników badań można tylko przypuszczać, że dany owoc potencjalnie jest superowocem.

### 1.1.1. Prozdrowotne właściwości superowoców

W ostatnich latach coraz większą uwagę przywiązuje się do poszukiwania naturalnych składników diety, których regularne spożywanie może mieć znaczenie dla ochrony zdrowia człowieka przed chorobami cywilizacyjnymi, głównie układu krążenia i nowotworami. Wyniki badań epidemiologicznych wskazują, że spożycie owoców, warzyw i ich przetworów może stanowić antidotum na wiele chorób, poprawiając tym samym zdrowie konsumentów [4-6]. Świeże owoce oraz ich przetwory, zwłaszcza naturalne soki owocowe, dostarczają podstawowych substancji energetycznych (cukrów

prosty i złożony) oraz stanowią źródło niezbędnych do życia witamin i pierwiastków biogennych (makro- i mikroelementów), a także korzystnie oddziałujących na zdrowie przeciwutleniaczy oraz związków należących do tzw. olejków eterycznych (np. terpenów). Przewodniki oraz olejki eteryczne są bardzo istotne dla człowieka ze względu na wiązanie wolnych rodników i metali ciężkich oraz szereg właściwości prozdrowotnych takich jak: działanie przeciwzapalne, przeciwrakotwórcze, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne, antywirusowe, antyalergiczne czy przeciwartretyczne [6-9]. Ponadto terpeny obecne w owocach kształtują ich aromat, a w konsekwencji są odpowiedzialne za walory sensoryczne otrzymywanych z nich produktów. Wiedza ta przyczyniła się do poszukiwania nowych roślin oraz tworzenia nowych produktów spożywczych oraz preparatów leczniczych na bazie superowoców [10, 11].

Zgodnie z koncepcją superowoców, owoce należące do tej grupy powinny spełniać następujące wymagania:

- posiadać wysoką zawartość składników odżywczych,
- posiadać wysoką zawartość przeciwutleniaczy,
- charakteryzować się właściwościami prozdrowotnymi popartymi badaniami naukowymi,
- oddziaływać pozytywnie na komórki i struktury molekularne w organizmie,
- posiadać egzotyczne pochodzenie, ciekawy smak, zapach i wygląd [9].

### **1.1.2. Owoce tropikalne i owoce strefy borealnej**

Owoce należące do grupy strefy borealnej, obecnie znane są jedynie ze swoich właściwości leczniczych. Aczkolwiek, jest bardzo mało informacji na temat składu i stężenia substancji chemicznych odpowiedzialnych za działanie prozdrowotne. Przykładowo, owoce oliwnika, wykazujące działanie przeciwzapalne i przeciwbólowe [12], wykorzystywane są w leczeniu gorączki, żółtaczk, astmy i reumatycznego zapalenia stawów. Jednak nie wiadomo dokładnie które związki odpowiadają za właściwości lecznicze owoców oliwnika - przypuszcza się, że są to flawonoidy i terpenoidy [13]. Ze względu na znikomy stan wiedzy na temat składu owoców borealnych, które mogą stanowić źródło niezbędnych współczesnemu społeczeństwu substancji prozdrowotnych, istotne jest podjęcie badań w kierunku ustalenia zawartości wybranych związków bioaktywnych w tych owocach.

Egzotyczne smaki, ciekawy wygląd, oryginalne aromaty sprawiają, że owoce tropikalne zyskują coraz większą popularność. Smaki tych owoców kojarzą się ze słońcem, słodyczą i orzeźwieniem, w dużej mierze dzięki soczystym owocom, które najlepiej oddają klimat tych upalnych miejsc. Egzotyczne duriany, liczi, kiwano, marakuje, karambole, rambutany czy tajemniczo brzmiący jackfruit, skutecznie gaszą pragnienie, odżywiają, a ponadto są znakomitym dodatkiem do dań czy napojów. W tropikach są tak popularne jak nasze jabłka czy śliwki.

### 1.1.3. Miechunka peruwiańska

Jednym z najbardziej obiecujących owoców tropikalnych jest miechunka peruwiańska (*Physalis peruviana*) znana również jako miechunka jadalna, rodzynek brazylijski, wiśnia peruwiańska czy też jagoda inkaska. Owoce miechunki od dawna są uprawiane na terenie Andów, a także w USA (Kalifornia), RPA, Indiach, Nowej Zelandii, Australii i Egipcie [14]. Są to soczyste, kuliste owoce o złocistym kolorze i średnicy rzędu około 2 cm, natomiast smak owocu został opisany jako "truskawka / kiwi / agresto-podobny" [15]. Owoce podczas wzrostu są chronione przez otaczające je liście, z których po etapie dojrzewania owocu robią się papierowe łuski przypominające chińskie lampiony. Pojedyncza roślina może wydać aż 300 owoców, a starannie uprawiane rośliny mogą dostarczać 20-33 t/ha. Owoce są trwałe, mogą być przechowywane w suchej atmosferze lub po zamrożeniu nawet przez kilka miesięcy [14].

W dostępnej literaturze można znaleźć informacje, że owoce miechunki peruwiańskiej mają działanie moczopędne, przeciwzapalne i przeciwreumatyczne. Owoce te są doskonałym źródłem witamin A (prowitaminy), B3, C oraz fosforu. Pestki jagód wykazują delikatne właściwości oczyszczające, dlatego ich spożywanie zalecane jest osobom cierpiącym na schorzenia jelit i układu wydalniczego. Owoce miechunki charakteryzuje także wysokie stężenie bioflawonoidów, popularnie zwanych witaminą P. Wyniki wielu badań wykazały, że bioflawonoidy podnoszą kondycję naczyń włosowatych, uszczelniają i wzmacniają ściany naczyń krwionośnych oraz poprawiają przepływ krwi w naczyniach wieńcowych [2].

Owoce miechunki peruwiańskiej uważane są za ekskluzywne i wykorzystywane głównie w celu dekoracji wyrobów cukierniczych. Europejczycy często płacą wyższe ceny, aby zanurzyć te owoce w czekoladzie lub udekorować ciasta i torty. W Polsce, owoce te

dostępne są w niektórych sklepach z żywnością ekologiczną pochodzenia krajowego lub sporadycznie pojawiają się w hipermarketach jako owoce importowane z krajów Ameryki Południowej. Podobnie jak inne owoce egzotyczne, można je spożywać w formie świeżej, suszonej oraz składników sałatek, deserów, dżemów i soków.

Dostępne w literaturze prace badawcze, poświęcone owocom miechunki peruwiańskiej dotyczą zawartości związków z grupy fizjologicznie aktywnych laktonów steroidowych, które występują w liściach [16] i korzeniach [17]. Profil lotnych związków został zbadany z wykorzystaniem procedury analitycznej opartej na zastosowaniu ekstrakcji ciecz-ciecz (LLE) oraz chromatografii gazowej połączonej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID), chromatografii gazowej połączonej z olfaktometrem (GC-O) oraz chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas (GC-MS) na etapie analizy uzyskanych ekstraktów [15]. Wykazano, że w owocach miechunki peruwiańskiej obecne są liczne związki z grupy terpenów, aldehydów, ketonów, kwasów, laktonów oraz estrów.

Prowadzone dotychczas badania nad owocami miechunki peruwiańskiej, skupiały się głównie na grupie związków zwanej witanoloidami. Witanoloidy należą do grupy steroidów, posiadają od 22 do 26 atomów węgla, w postaci utlenionych sześcioczłonowych laktonów [18]. Przeprowadzono również bardziej szczegółowe badania dotyczące związków z grupy alkaloidów.

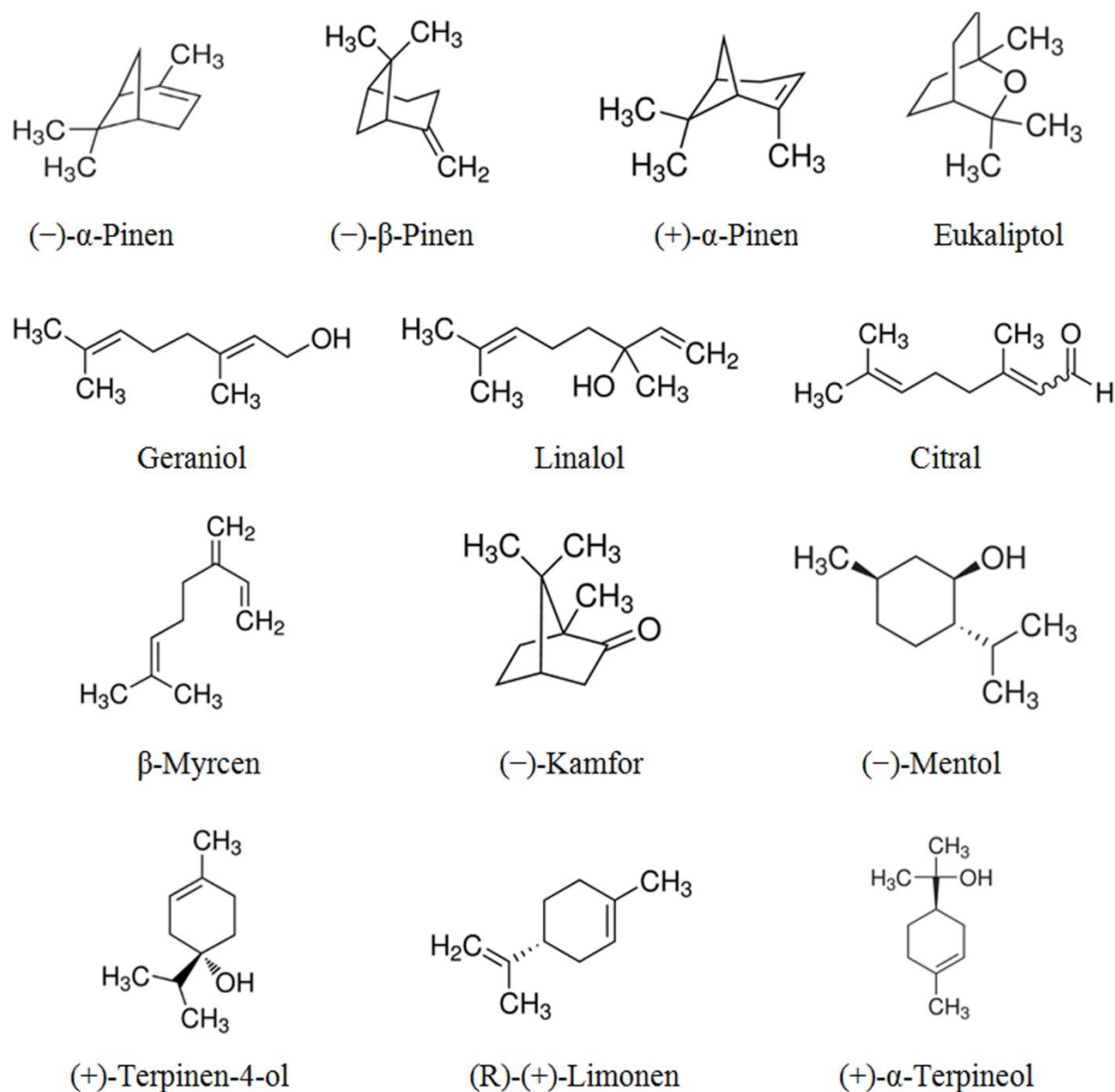
## **1.2. Związki z grupy terpenów**

### **1.2.1. Charakterystyka**

Terpeny są to naturalne węglowodory pochodzenia głównie roślinnego o ogólnym wzorze  $(C_5H_8)_n$ , będące oligomerami izoprenu (2-metylobuta-1,3-dien). Związki te stanowią największą klasę wtórnych metabolitów roślin. Obejmuje ona około 30 000 zdefiniowanych związków, wśród których znanych jest ponad 400 monoterpenów. Monoterpeny i ich utlenione analogi zwane terpenoidami, charakteryzują się właściwościami smakowo-zapachowymi oraz zróżnicowaną aktywnością biologiczną.

Lecznicze i zapachowe właściwości monoterpenów wykorzystywane są od czasów starożytności. Świadczą o tym najstarsze wzmianki o wykorzystywaniu ziół i zawartych w nich olejków eterycznych. Przykładem może być stosowanie nasion kminku przy atakach

histerii, stanach przygnębienia czy też anemicznym wyglądem. W starożytnym Egipcie stosowano nasiona kopru. Miętę stosowano w celach poprawy pamięci i pobudzenia aktywności mózgu, natomiast oplatanie głowy liśćmi mięty miało przynosić „ukojenie duszy”, dlatego też uczniowie rzymskich filozofów, nosili na głowach wianki ze świeżych liści tej rośliny [9].



Rys. 2. Wzory strukturalne wybranych terpenów oznaczanych w próbkach superowoców charakteryzujących się właściwościami prozdrowotnymi [19].

Dzisiaj wiadomo, że monotereny (Rysunek 2) spełniają różne funkcje w organizmie człowieka. Składniki olejków eterycznych wykorzystuje się w leczeniu schorzeń górnych dróg oddechowych (działanie wykrztuśne, przeciwbakteryjne





i przeciwwirusowe), schorzeń gastrycznych (środki żółciopędne i spazmolityczne) oraz łagodzi bóle mięśni. Wiele z terpenów działa leczniczo na skórę pobudzając jej ukrwienie, a także poprzez właściwości bakteriobójcze. Hydrofobowe właściwości monoterpenu przyczyniają się do rozpuszczania kamieni cholesterolowych i żółciowych u ludzi. Olejek miętowy skutecznie poprawia funkcje układu pokarmowego, łagodzi objawy w zespole wrażliwego jelita, odpływie żołądkowo-jelitowym oraz różnych zakażeniach. Monoterpeny poprawiają samopoczucie, działają uspokajająco lub pobudzająco, a na ich właściwościach leczniczych opiera się aromaterapia. Preparaty do inhalacji składają się z eukaliptolu, terpineolu, olejku sosnowego, tymiankowego i rozmarynowego. Duże zainteresowanie budzi aktywność przeciwnowotworowa oraz właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne, przeciwwirusowe, immunomodulacyjne i przeciwzapalne.

### 1.2.2. Właściwości bioaktywne i zapachowe terpenów oraz występowanie w przyrodzie

Właściwości terpenów zależą od ich budowy chemicznej, czyli m.in. od długości łańcucha węglowego, obecności grup funkcyjnych, budowy przestrzennej cząsteczek czy też oddziaływania międzycząsteczkowego. W tabeli 1 zestawiono właściwości wybranych terpenów, a na rysunku 2 przedstawiono ich wzory strukturalne.

Tab. 1. Charakterystyka wybranych terpenów [9, 19-22].

Nazwa polska	Numer CAS	Klasa	Zapach	Właściwości lecznicze	Występowanie w naturze
(-)- $\alpha$ -Pinen	7785-26-4	Monoterpeny	Ostry ciepły żywiczny świeży sosnowy	Bakteriobójcze, przeciwgrzybiczne	Drzewa iglaste
(-)- $\beta$ -Pinen	18172-67-3	Monoterpeny	Świeży, orzeźwiający sosnowy, drzewny, suchy, zapach siana, zielony żywiczny	Bakteriobójcze, przeciwgrzybiczne	Marchew, kolendra, kminek, hizop, cytryna, gałka muszkatołowa, sok z pomarańczy, terpentyna
(+)- $\alpha$ -Pinen	7785-70-8	Monoterpeny	Drzewiasty, sosnowy, żywiczny, ostry, miętowy	Bakteriobójcze, przeciwgrzybiczne	Sosna Loblolly
Geraniol	106-24-1	Monoterpeny	Kwiatowy, słodki, zielony, zapach róży, owocowy, geranium z nutą cytrusową	Aktywność przeciwnowotworowa (wobec mysiej białaczki, wątrobiaka, czerniaka i raka trzustki)	Olejek akacjowy, sok z jabłek, liść laurowy, cytryna, goździki, bazylija, bergamotka, jeżyna, jagoda, marchew, cynamon, geranium, szaflwia, kolendra, owoc curry, eukaliptus, korzeń imbiru, sok z grejfrutów, winogrona
Eukaliptol	470-82-6	Monoterpeny	Świeży, zimny, eukaliptusowy, ziołowy, kamfora	Antywirusowe, bakteriobójcze, przeciwgrzybiczne, przeciwzapalne, zabija komórki białaczki <i>in vitro</i>	Eukaliptus, bylica, bergamotka, bazylija, kardamon, marchew, rumianek, cynamon, szaflwia, kolendra, nasiona kopru, geranium, korzeń imbiru, jaśmin, mięta, lawenda

Tab. 1. cd.

<b>(+)-<math>\alpha</math>-Terpineol</b>	7785-53-7	Monoterpeny	Słodki, liliowy, kwiatowy, zapach bzu i lipy	Antywirusowe, bakteriobójcze, przeciwgrzybiczne, wykrztuśne, przeciwzapalne	Olejki z drzewa herbacianego
<b>(-)-Mentol</b>	2216-51-5	Monoterpeny	Chłodny, świeży, miętowy, zwiewny z pikantną nutką eukaliptusa	Przeciwbólowe, bakteriobójcze, wykrztuśne, przeciwzapalne	Liście kolendry, olejek mięty pieprzowej, olejek mięty zielonej
<b><math>\beta</math>-Myrcen</b>	123-35-3	Monoterpeny	Zielony, owocowy, słodki, balsamiczny, ziołowy, lekko metaliczny, z nutką zapachu selera naciowego i marchewki	Przeciwbólowy	Nasiona anyżu, bylica, bazylia, bergamotka, mięta, tatarak, papryka, kminek, liście selera, rumianek, geranium, szalwia, kawa palona, kolendra, czarna porzeczka, kminek, lawenda, grejpfrut, trawa cytrynowa, lubczyk, rozmaryn, krwawnik pospolity
<b>Linalol</b>	78-70-6	Monoterpeny	Świeży kwiatowy, cytrusowy, owocowy, drzewny, słodki, wosku i róży	Antywirusowe, bakteriobójcze, przeciwgrzybiczne, przeciwzapalne, przeciwbólowe	Tymianek, kurkuma, piołun, krwawnik, <i>ylang ylang</i> , oczar wirginijski, liście pomidora, zielona herbata, jaśmin, truskawki, rozmaryn
<b>(-)-Kamfor</b>	464-48-2	Seskwiterpeny	Zapach kamfory	Pobudzające, rozkurczowe, znieczulające, uspokajające, przeciwzapalne, antyseptyczne, owadobójcze	Bylica, szalwia
<b>Cytral</b>	5392-40-5	Monoterpeny	Świeży, soczysty, zielony, ostry cytrynowy słodki	Przeciwgrzybiczne, przeciwbakteryjne	Bergamotka, pomarańcza, lipa, cytryna, trawa cytrynowa, grejpfrut, imbir, pelargonja, geranium, kardamon, bylica
<b>(R)-(+)-Limonen</b>	5989-27-5	Monoterpeny	Słodki, cytrusowy	Aktywność przeciwnowotworowa (wobec raka sutka, skóry, wątroby, płuc, okrężnicy, trzustki i prostaty), właściwości lecznicze w ostrym zapaleniu oskrzeli	Grejpfrut, cytryna, lipa, gałka muszkatołowa, pomarańcza, pieprz, olejek z drzewa herbacianego
<b>(+)-Terpinen-4-ol</b>	2438-10-0	Monoterpeny	Pieprzowy, drzewny, ziemisty, stęchły, słodki	Antywirusowe, bakteriobójcze, przeciwgrzybiczne	Sok z jabłek, olej słonecznikowy, pomidory, olej z bazylii, olejek tymiankowy, olejek z drzewa herbacianego

### 1.3. Metodyki oznaczania terpenów w próbkach owoców

Większość metodyk analitycznych jest niedostatecznie czuła, aby możliwe było bezpośrednie oznaczanie analitów, które często występują na poziomie śladowym w badanych próbkach. Ponadto, w przypadku analizy próbek stałych (np. owoców) konieczny jest etap izolacji oznaczanych składników poprzez przeprowadzenie ich w stan ciekły (ekstrakt) lub gazowy (faza nadpowierzchniowa). W związku z tym, nieodzownym etapem procedury analitycznej jest dobranie odpowiedniej techniki ekstrakcji oraz zoptymalizowanie kluczowych parametrów realizacji procesu (np. temperatury, czasu,

ilości próbki, rodzaju ekstrahenta). Wybór metodyki przygotowania próbki ma istotny wpływ na stopień wzbogacenia analitów, a także uniknięcie interferencji. W tabeli 2 zestawiono informacje literaturowe na temat metodyk analitycznych stosowanych w celu oznaczania związków z grupy terpenów podczas analizy próbek owoców. W ostatnich latach najczęściej stosowaną techniką ekstrakcji jest technika mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME).

Tab. 2. Dane literaturowe dotyczące procedur analitycznych stosowanych w analizie próbek owoców w celu oznaczania związków lotnych z grupy terpenów z wykorzystaniem chromatografii gazowej.

Rodzaj próbki	Ilość oznaczonych terpenów	Technika ekstrakcyjna	Warunki metody	Technika chromatograficzna	Literatura
winogrona	4	HS-SPME	PDMS (100µm), PA (85µm), PDMS/DVB (65 µm), CW/ DVB (65µm), DVB/CAR/PDMS (50/30µm), 35min, 50°C	GC-MS	[23]
		SBSE	PDMS (20mm×1,0mm, 30min), 60 min, Ciekła desorpcja: n-hexan (2 ml), łaźnia ultradźwiękowa (10min)		
jeżyna andyjska	16	SPE	Enzymatyczna hydroliza z MeOH, ekstrakcja (β-D-glukonolakton, 90min, 4°C), SPE (LC-18; 0,5 g), MeOH, woda, pentan/eter, bufor fosforanowo-cytrynianowy (18h, 40°C)	GC-MS	[24]
	26	HS-SPME	PDMS (100µm), PDMS/DVB (65µm), CAR/PDMS/DVB (50µm), 20min, 60°C		
jałowiec pospolity	73	HS-SPME	DVB/CAR/PDMS (50/30 µm), 30min, 50°C	GC-MS	[25]
		SDE	Woda podwójnie destylowana, pentan/dichlorometan (4h), bezwodny siarczan sodu		
białe winogrona	14	SPE	C18, pentan/dichlorometan, siarczan sodu, MeOH, hydroliza, bufor fosforanowo-cytrynianowy (18h, 40°C)	GC-FID	[26]
oliwki	7	SPME	PDMS, 40 min, 40°C	GC-MS	[27]
rokitnik zwyczajny	5	HS-SPME	DVB/CAR/PDMS (50/30 µm), 40 min, 20°C	GC-MS	[28]
morela	6	HS-SPME	CAR/PDMS (75 µm), 30 min, 40°C	GC-MS	[29]
figa	2	HS-SPME	DVB/CAR/PDMS (50/30 µm), 10 min, 40°C	GC-MS	[30]
mandarynka	46	HS-SPME	DVB/CAR/PDMS (50/30 µm), 40 min, 40°C	GC-MS	[31]
truskawki	3	HS-SPME	PDMS (100 µm), 30 min, 30°C	GC-MS	[32]
ewodia	33	HS-SPME	PDMS (100 µm), PDMS/DVB (65 µm), DVB/CAR/PDMS (50/30 µm), CW/ DVB (65µm), 15 min, 60°C	GC-MS	[33]
białe winogrona	56	HS-SPME	CW/DVB (65 µm), 60 min, 60°C	GC×GC–TOFMS GC–qMS	[34]
męczennica jadalna, nanercz zachodni, tamaryndowiec indyjski, acerola, gujawa pospolita	27	HS-SPME	DVB/CAR/PDMS (50/30 µm), CAR/PDMS (75 µm), PDMS (100 µm), PA (85 µm), wykonane w warunkach laboratoryjnych zimne włókno (PDMS, rurki z ciekłego polimeru, 340 µm), 10-30 min, 40-80°C	GC-FID GC-MS	[35]

Tab. 2. cd.

jabłko, gruszką, pigwa pospolita	4	HS-SPME	DVB/CAR/PDMS (50/30 µm), 10 min, 45°C	GC×GC-qMS	[36]
truskawka	2	HS-SPME	PDMS (100µm), 45 min, RT	GC×GC-MS	[37]
morela	7	HS-SPME	PDMS (100 µm), PDMS/DVB (65 µm), CAR/PDMS (75 µm), 20 min, 40°C	GC-MS GC-O	[38]
moszcz z winogron	1	SBSE	PDMS (30min)	enantio-MDGC- MS	[39]
		SPE	C18, MeOH, dichlorometan, hydroliza, bufor cytrynianowo-chlorowodorowy (24h), MTBE		
skórki z winogron	1	SPE	C18 (2 g), MeOH, chlorek metylenu, hydroliza, bufor cytrynianowo-chlorowodorowy, Glucanex® (24h, RT), MTBE	GC-MS	[40]
winogrona	9	SBSE	PDMS (60min, 500rpm), hydroliza, kwas cytrynowy (2h, 70°C), termiczna desorpcja	GC-MS	[41]
winogrona	3	SBSE	Hydroliza, bufor cytrynianowy (24h, 25°C), PDMS (3h, 1000rpm), termiczna desorpcja	GC-MS	[42]
wytłoki z jabłek	10	SBSE	PDMS (3h, 700rpm), termiczna desorpcja	GC-MS	[43]
maliny	1	SBSE	PDMS (3h), termiczna desorpcja	GC-MS	[44]
		SDE, Vigreux		MDGC-C/P-IRMS enantio-MDGC-MS	
brzoskwinia nektarynka	19	HS-SPME	PDMS/DVB (65 µm), 30 min, 45°C	GC-MS	[45]
morela	3	LLME	Homogenizacja, wirowanie, filtracja, ekstrakcja z chloroformem (30 min, RT, mieszanie), ultradźwięki (1 min), wirowanie	GC-MS GC-FID	[46]
jagoda karczaska	12	HS-SPME	DVB/CAR/PDMS (50/30 µm), 29 min, 50°C	GC×GC-TOFMS	[47]
Słodliwka pospolita, mangostan właściwy, durian właściwy, jagodzian rambutan, pigwica właściwa	26	HS-SPME	PDMS/DVB (65 µm), 12 h, RT	GC-MS	[48]
chińska morela	14	HS-SPME	PDMS (85µm), 60 min, RT	GC-MS	[49]
		SSDE	woda, 3 h, heksan, mrożenie w -30°C, kolumny Vigreux (15 cm)		
flaszowiec peruwiański	5	HS-SPME	DVB/CAR/PDMS (50/ 30 µm), 30°C, 800 rpm	GC-qMS	[50]
morela	7	HS-SPME	CAR/PDMS (65 µm), 20 min, 40°C	GC-MS GC-FID	[51]
	7	Po hydrolizie chemicznej:	Hydroliza, bufor fosforanowy (pH 8), olej silikonowy Rhodorsil, odparowanie (100–120°C), dichlorometan (2h, 45°C), mrożenie w -20°C, mikrodestylacja		
	12	SDE			
	10	Po hydrolizie enzymatycznej:	C18, MeOH, woda ultraczysta, dichlorometan, hydroliza enzymatyczna, bufor cytrynowo-fosforanowy (pH 5), dichlorometan, AR-2000® (40°C, 16 h), ekstrakcja dichlorometanem, mikrodestylacja		
	3	LLE	Dichlorometan (30 min, w atmosferze gazowego azotu), podwójne wirowanie (10000g, 4°C, 15 min), mikrodestylacja		

Tab. 2. cd.

mango	31	HS-SPME	PDMS (100 $\mu\text{m}$ ), NiTi-ZrO <sub>2</sub> (1,35 $\mu\text{m}$ ), NiTi-ZrO <sub>2</sub> -PDMS (35 $\mu\text{m}$ ), 30-60°C, 30-120 s	GC-MS	[52]
		HD	Modyfikowany aparat Clevenger (4 h), heksan, bezwodny siarczan sodu		
awokado	24		Owoce zamknięte w szklanej rurce, powietrze filtrowane przez węglowodorową pułapkę, kolumny 30 mg Super Q (80/100 mesh), chlorek metylenu	GC-MS	[53]
kiwi	1	HS-SPME	PA (85 $\mu\text{m}$ ), PDMS (100 $\mu\text{m}$ ), PDMS/DVB (65 $\mu\text{m}$ ), CW/DVB (70 $\mu\text{m}$ ), CAR/PDMS (75 $\mu\text{m}$ ), 30°C, 30 min, 800 rpm	GC-qMS	[54]
papaja	2				
cytryna	16				
miechunka peruwiańska, oliwnik wielokwiatowy jabłoń jagodowa głóg szkarłatny	79	HS-SPME	DVB/CAR/PDMS (50/30 $\mu\text{m}$ ), 30 min, 50°C	GC×GC-TOFMS	[55]
miechunka peruwiańska	14	ITEX	Tenax TA (80/100 mesh)	GC-MS	[56]

### 1.3.1. Pobieranie i przygotowywanie próbek do badań

W przypadku izolacji terpenów o właściwościach bioaktywnych i zapachowych z próbek owoców i otrzymanych z nich produktów wstępne przygotowanie próbek do analizy obejmuje:

- dla próbek stałych (owoce, dzemy) - homogenizację i ewentualne rozcieńczenie próbek. Często na tym etapie dodaje się niewielkie ilości soli (np. CaCl<sub>2</sub> i NaCl), która zapobiega generowaniu nowych związków lotnych w wyniku rozdrabniania,
- dla próbek ciekłych (soki, wina) - rozcieńczenia badanych próbek.

### 1.3.2. Techniki ekstrakcji terpenów

Znanych jest wiele technik, wykorzystywanych do izolacji składników lotnych i średniolotnych z owoców. Na podstawie danych literaturowych można stwierdzić, że najczęściej wykorzystywane są takie techniki jak:

- ekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPE),
- mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME),
- techniki wykorzystujące analizę fazy nadpowierzchniowej (HS),
- metoda jednoczesnej destylacji z parą wodną i ekstrakcji (SDE).

Coraz rzadziej stosuje się klasyczną ekstrakcję ciecz-ciecz (LLE), natomiast coraz częściej stosowane są zarówno ekstrakcja z wirującym elementem sorpcyjnym (SBSE) oraz ekstrakcja za pomocą płynu w stanie nadkrytycznym (SFE). Warta uwagi jest również

mało rozpowszechniona, a szybko rozwijająca się technika destylacji związków wspomaganą rozpuszczalnikiem (SAFE), której główną zaletą jest brak tworzenia związków pochodnych oznaczanych substancji, a to przemawia za możliwością zastosowania jej w analizie frakcji lotnej [57].

Ze względu na coraz większy nacisk na ochronę środowiska i wprowadzenie idei zrównoważonego rozwoju w postaci zasad Zielonej Chemii i Zielonej Chemii Analitycznej do praktyki laboratoryjnej, istotne jest, aby wybrana technika była jak najbardziej przyjazna środowisku, a jednocześnie charakteryzująca się takimi cechami jak: duża efektywność procesu, niski koszt oraz krótki czas trwania operacji [58]. Takimi cechami charakteryzuje się np. technika ekstrakcji w rurce (ITEX) [56].

### **1.3.2.1. Zielone techniki ekstrakcji**

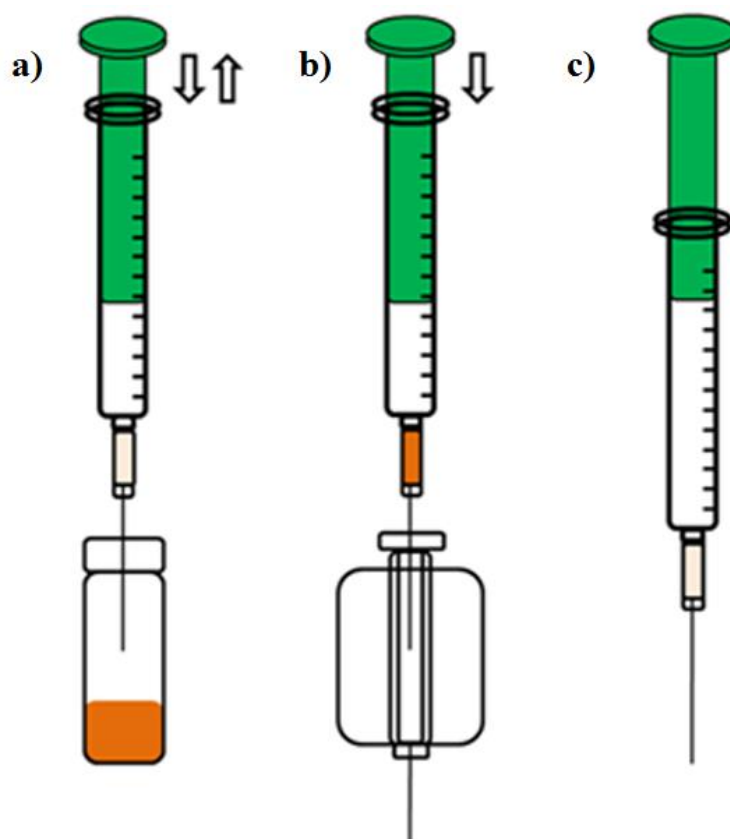
W ostatnich latach coraz częściej przy wyborze metod ekstrakcji bierze się pod uwagę zasady Zielonej Chemii Analitycznej. Przygotowanie próbki do analizy uważane jest za najbardziej krytyczny etap w procesie rozdzielania chromatograficznego. Znane są różne sposoby prowadzące do spełnienia wyżej wymienionych zasad Zielonej Chemii i Zielonej Chemii Analitycznej jeśli chodzi o etap wzbogacenia i rozdzielania analitów. Można w tym miejscu wymienić:

- eliminacja (lub częściowe zmniejszenie) ilości rozpuszczalników i odczynników stosowanych w analizie,
- miniaturyzacja przyrządów i zmniejszenie skali działań analitycznych,
- integracja różnych operacji i automatyzacja etapu przygotowania próbki,
- prawidłowe uszczelnienie wszystkich stosowanych naczyń wykorzystywanych w trakcie przygotowania próbki,
- odzyskiwanie rozpuszczalników po procesie oraz ich ponowne wykorzystanie,
- zastosowanie zielonych mediów (np. cieczy jonowych lub płynów w stanie nadkrytycznym),
- stosowanie czynników zwiększających skuteczność stosowanej techniki (podwyższonej temperatury i/lub ciśnienia, wykorzystanie mikrofal lub ultradźwięków) [59].

W kolejnych rozdziałach przedstawiono krótką charakterystykę dwóch bezrozpuszczalnikowych technik ekstrakcji, które spełniają wymogi wynikające z zasad Zielonej Chemii Analitycznej.

### 1.3.2.2. *Ekstrakcja w rurce (ITEX)*

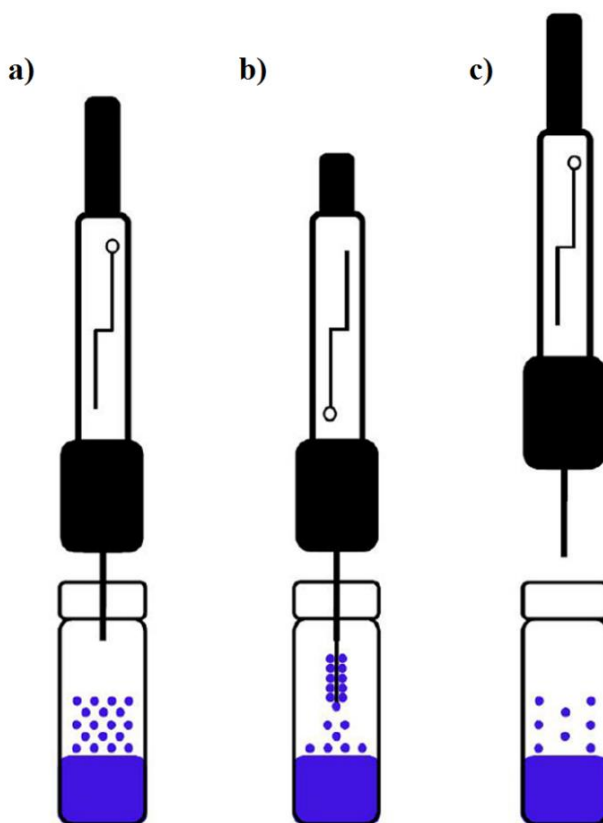
Ekstrakcja w rurce umożliwia w sposób szybki i łatwy przeprowadzenie badań analitycznych i oznaczenie analitów występujących w próbkach na niskich poziomach zawartości. W przypadku stosowania tej techniki proces adsorpcji następuje w mikro pułapce wypełnionej sorbentem, umieszczonej pomiędzy strzykawką a igłą. Etap pobierania próbek analitów polega na kilkukrotnym przepompowywaniu fazy nadpowierzchniowej przez sorbent i zatrzymywaniu analitów w złożu. W kolejnym etapie ogrzewając złoże sorbentu następuje termiczna desorpcja analitów i dozowanie próbki do komory dozownika chromatografu gazowego (Rysunek 3).



Rys.3. Schematyczne przedstawienie etapów prowadzenia ekstrakcji w rurce: a) ekstrakcja analitów, b) termiczna desorpcja analitów, c) czyszczenie złoża.

### 1.3.2.3. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME)

Mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej należy traktować jako wariant techniki SPE, zachowujący wszystkie jej zalety - prostotę, niski koszt, łatwość automatyzacji i możliwość zastosowania w terenie, a nie posiadający jednocześnie jej wad - czasochłonności i konieczności używania rozpuszczalników. Technika ta zaliczana jest do bezrozpuszczalnikowych technik ekstrakcji i jest klasycznym przykładem „zielonej” techniki z zakresu przygotowania próbek do analizy. Sorbent naniesiony jest w tym przypadku na cienkie włókno szklane lub kwarcowe. Taka zmiana geometrii sorbentu w porównaniu do kolumniek SPE ułatwia wymianę masy podczas wzbogacania i uwalniania zatrzymywanych związków.



Rys. 4. Schematyczne przedstawienie etapów prowadzenia mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej: a) inkubacja próbki, b) ekspozycja włókna, c) przeniesienie włókna do desorbera chromatografu.

Po określonym czasie ekstrakcji, włókno chowane jest do wnętrza igły. W przypadku gdy analiza nie może być przeprowadzona natychmiast, ekstrakt po zamknięciu końca igły np. uszczelką chromatograficzną, przechowuje się na włóknie





do czasu analizy. Rozwiązanie to jest jednak bardzo rzadko stosowane w praktyce. W kolejnym etapie analizy zatrzymane na włóknie SPME, uwalnia się w dozowniku chromatografu gazowego w wyniku desorpcji termicznej (igła urządzenia SPME jest wprowadzana do dozownika, a włókno z fazą stacjonarną wysuwa się do specjalnej wkładki w dozowniku). Jednym z wariantów techniki SPME jest mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej (HS-SPME). Etapy ekstrakcji HS-SPME przedstawiono graficznie na rysunku 4.

W trakcie ekstrakcji włókno umieszcza się w fazie nadpowierzchniowej nad ciekłą lub stałą próbką. Gdy włókno znajduje się w fazie nadpowierzchniowej nad próbką, w stanie równowagi między fazami, ilość analitu w fazie stacjonarnej ( $n_f$ ) zgodnie z poniższym równaniem (1) zależy od wartości liczbowej stałej podziału między fazą stacjonarną a fazą gazową ( $K_{fh}$ ) oraz między fazą gazową a próbką ( $K_{hs}$ ).

$$n_f = \frac{K_{fh} \times K_{hs} \times V_f \times V_s \times C_0}{K_{fh} \times K_{hs} \times V_f + K_{hs} \times V_h + V_s} \quad (1)$$

gdzie:

$V_f$  - objętość fazy stacjonarnej włókna,

$V_h$  - objętość fazy nadpowierzchniowej (gazowej),

$V_s$  - objętość próbki,

$C_0$  - stężenie początkowe analitu w próbce.

### 1.3.3. Wykorzystanie chromatografii gazowej w analityce związków lotnych i średniolotnych

W przypadku oznaczania terpenów i ich pochodnych w próbkach produktów żywnościowych, najczęściej stosowana jest jednowymiarowa chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrem mas lub detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-MS, GC-FID) [60-78]. Jednakże, ze względu na złożony skład próbek żywności i możliwość koelucji związków o zbliżonym charakterze chemicznym, istotne jest zastosowanie techniki umożliwiającej pełne rozdzielanie oznaczanych składników próbki. Z tego względu konieczne jest zastosowanie bardziej efektywnej techniki, którą jest dwuwymiarowa chromatografia gazowa (GC×GC) [67, 79, 80] w połączeniu z odpowiednią techniką przygotowania próbek. Technika dwuwymiarowej chromatografii gazowej znana jest od ponad 25 lat i została wynaleziona w 1991 roku [81]. Od klasycznego układu chromatografii gazowej odróżniają ją następujące elementy:



- zastosowanie dwóch różnych kolumn (pierwsza najczęściej niepolarna o długości 30-60 m, druga kolumna polarna lub średnio polarna o długości 0,5-2 m, inne konfiguracje i odwrotne połączenia kolumn są również stosowane),
- zastosowanie modulatora (umieszczany pomiędzy pierwszą i drugą kolumną, zapobiega zmieszaniu rozdzielanych analitów w pierwszej kolumnie i umożliwia osiągnięcie efektu dwóch wymiarów),
- stosowanie detektorów o bardzo wysokiej rozdzielczości (szerokość powstających pików w drugiej kolumnie w zakresie 50-400 ms wymaga próbkowania co najmniej 50-100 Hz w celu uzyskania 10-20 punktów na pik) [82].

Dwuwymiarowa chromatografia gazowa umożliwia lepsze rozdzielenie składników próbki o bardzo złożonym składzie matrycy od konwencjonalnej 1D-GC wymagając przy tym tyle samo (lub tylko nieznacznie więcej) czasu podczas rozdzielania chromatograficznego, jednocześnie charakteryzuje się podobnym zużyciem mediów. W obu przypadkach analizie poddaje się próbki o podobnej wielkości (objętości). Zasadniczo sprawia to, że GC×GC jest techniką bardziej zieloną w porównaniu do techniki jednowymiarowej [59].

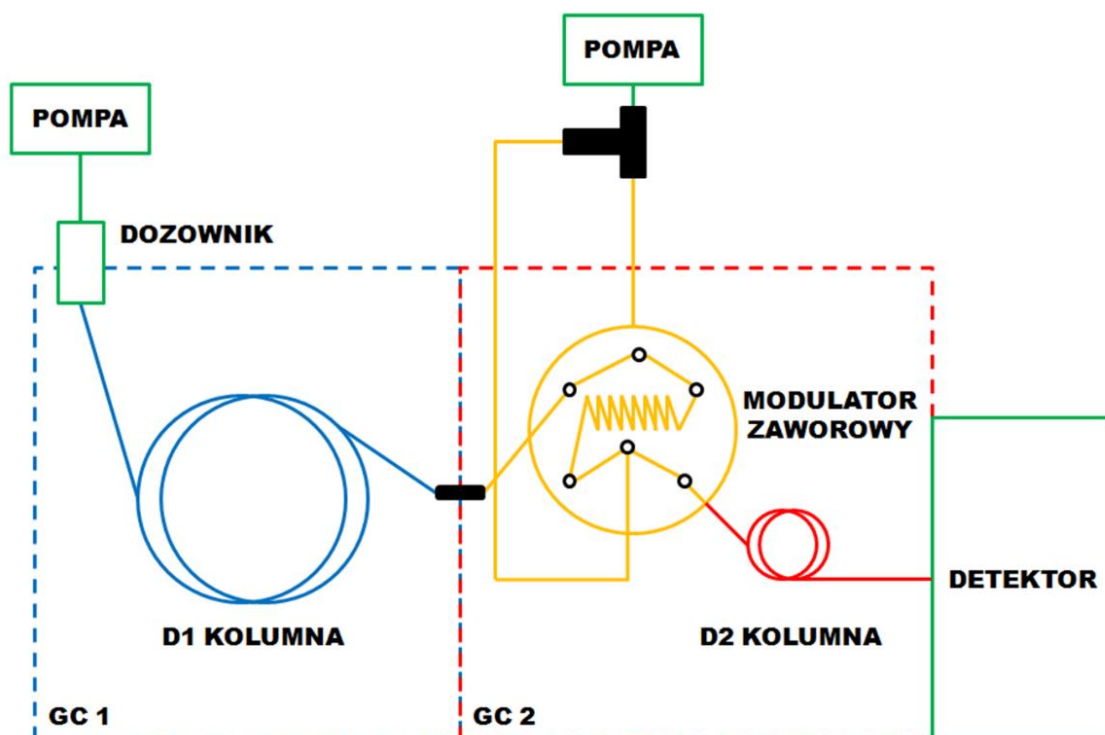
Najważniejszym elementem układu GC×GC jest modulator. Zadaniem tego urządzenia jest zbieranie małych porcji eluatu z pierwszej kolumny i cykliczne dozowanie analitów do drugiej kolumny. Opracowanie efektywnie działających modulatorów, które umożliwiają gromadzenie i wprowadzanie analitów do drugiej kolumny w sposób szybki i powtarzalny nadal pozostaje głównym wyzwaniem tej technologii. Historia rozwoju modulatorów została niedawno szeroko opisana w dwóch pracach przeglądowych [80, 82]. Obecnie najczęściej stosowanym typem modulatorów są modulatory termiczne, gdzie anality są zatrzymywane w fazie stacjonarnej kolumny chromatograficznej, stosując bardzo niską temperaturę. Na końcu każdego okresu modulacji, kapilara jest szybko ogrzewana w celu uwolnienia analitów w postaci wąskiego pasma do drugiej kolumny. Modulacja termiczna odbywa się zwykle za pomocą gorącego i zimnego strumienia gazu dozowanego naprzemiennie na kolumnę kapilarną. Główną wadą tego systemu jest skomplikowana konstrukcja oraz konieczność stosowania czynników kriogenicznych (ciekły CO<sub>2</sub> lub N<sub>2</sub>), które są trudne w obsłudze i drogie w użyciu. Duże zużycie płynów kriogenicznych sprawia, że system GC×GC przestaje być zieloną techniką rozdzielania, dlatego wciąż trwają prace nad stworzeniem bardziej ekologicznego rozwiązania.

Drugim typem modulatorów są modulatory przepływowe. W tym przypadku eluent z pierwszej kolumny jest gromadzony w pętli do pobierania próbek (lub kilku pętlach). Zanim pętla zostanie całkowicie wypełniona analitami, jej zawartość jest opróżniana poprzez bardzo duże zwiększenie szybkości przepływu z wykorzystaniem dodatkowego strumienia gazu nośnego. Konstrukcja tych modulatorów jest prostsza niż modulatorów termicznych i nie wymagają one żadnych czynników kriogenicznych, dzięki czemu są bardziej ekologiczne i ekonomiczne. Jednak mają kilka istotnych ograniczeń. Jednym z nich jest maksymalny czas modulacji określany na podstawie wielkości pętli (zwykle nie przekracza on 2 s). Kompresję w pętli osiąga się poprzez zwiększenie ciśnienia w momencie gromadzenia analitów, co nie jest tak skuteczne jak w przypadku modulatorów termicznych. W konsekwencji znacząco spada czułość systemu. Dodatkowo, duże natężenie przepływu strumienia gazu nośnego w drugiej kolumnie wyklucza możliwość bezpośredniego połączenia do spektrometru mas. Możliwe jest zastosowanie podziału strumienia, jednak prowadzi to do ponownego pogorszenia czułości całego toku postępowania.

W ostatnich latach wprowadzono nowy typ modulatora termicznego chłodzonego powietrzem z otoczenia i nie zużywającego dodatkowych mediów chłodzących (CFM) [83]. Modulator typu CFM zapewnia możliwość eliminacji stosowania czynników kriogenicznych, co sprawia, że technika staje się „zielona” i dzięki temu może być dobrą alternatywą dla wcześniej zaprojektowanych modulatorów kriogenicznych. W tym układzie, możliwe jest rozdzielanie związków w zakresie lotności dla homologów n-alkanów od C5 do C40. Dodatkowo modulator typu CFM nie posiada żadnych ruchomych części i nie wymaga materiałów eksploatacyjnych. Dzięki temu jest idealnym modulatorem do analiz wykonywanych *in situ* - co jest kolejnym ważnym aspektem zielonej chemii.

Kolejnym typem modulatorów są modulatory zaworowe z zatrzymaniem przepływu, które umożliwiają zmniejszenie ilości zużywanych czynników kriogenicznych, a jednocześnie eliminują zależność czasu analizy w drugim wymiarze od czasu trwania modulacji [84]. W tych modulatorach, przepływ gazu nośnego w pierwszej kolumnie może być zatrzymany przy ciągłym dostarczaniu gazu do drugiej kolumny. W związku z tym rozdzielanie analitów w drugim wymiarze, może być prowadzone przez czas dłuższy niż okres modulacji. Technika ta pozwala na zastosowanie zoptymalizowanych warunków zarówno w pierwszej jak i drugiej kolumnie, co prowadzi do efektywniejszego rozdzielania.

Na rysunku 3 przedstawiono schemat budowy zestawu GC×GC z modulatorem zaworowym.



Rys. 3. Schemat budowy zestawu do analizy GC×GC z modulatorem zaworowym.

Optymalizacja procesu rozdzielania i detekcji w układzie GC×GC obejmuje dobranie odpowiednich parametrów takich jak:

- program temperaturowy,
- czas analizy,
- sposób dozowania próbki,
- okres modulacji,
- sposób rejestracji widm mas (częstotliwości skanowania, stosunku sygnału do szumu, współczynnika dopasowania widm mas, rodzaju bibliotek widm mas).

W celu optymalizacji procesu rozdzielania przeprowadza się analizy próbek wzorcowych będących mieszaniną oznaczanych terpenów. Ponadto, analiza ilościowa terpenów w próbkach rzeczywistych może być prowadzona metodą wzorca zewnętrznego, metodą wzorca wewnętrznego, metodą dodatku wzorca oraz metodą wzorca wewnętrznego znakowanego izotopowo.

## 2. Cel i zakres pracy

Celem pracy jest opracowanie nowych procedur analitycznych umożliwiających analizę próbek owoców, głównie pod kątem zawartości związków prozdrowotnych i smakowo-zapachowych oraz charakterystyka frakcji lotnych związków organicznych występujących w tych owocach. Do tego celu wykorzystano zielone techniki ekstrakcji i wzbogacania analitów z próbki w połączeniu z chromatografią gazową. Do celów szczegółowych należy zaliczyć:

- zbadanie przydatności techniki ITEX w połączeniu z chromatografią gazową sprzężoną ze spektrometrią mas do oznaczania związków lotnych w próbkach owoców,
- ustalenie składu frakcji lotnej owoców miechunki peruwiańskiej,
- optymalizacja warunków ekstrakcji ITEX,
- analiza ilościowa głównych składników frakcji lotnej owoców miechunki peruwiańskiej,
- zbadanie przydatności techniki HS-SPME w połączeniu z dwuwymiarową chromatografią gazową sprzężoną ze spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu do oznaczania związków lotnych w próbkach owoców,
- optymalizacja warunków ekstrakcji HS-SPME oraz rozdzielania chromatograficznego,
- przeprowadzenie analizy ilościowej wybranych terpenów w próbkach odmian jagody kamczackiej,
- zbadanie profilu lotnych terpenów w ekstraktach uzyskanych z próbek 4 owoców (miechunka peruwiańska, głóg szkarłatny, jabłoń jagodowa, oliwnik wielokwiatowy) z wykorzystaniem procedury opartej na zastosowaniu HS-SPME/GC×GC-TOFMS.

Analiza danych literaturowych prowadzi do wniosku, że nieliczne dostępne procedury analityczne nie zapewniają możliwości wykrycia, identyfikacji oraz ilościowego oznaczenia możliwie szerokiego spektrum analitów z grupy związków o aktywności biologicznej oraz właściwościach zapachowych. W ramach pracy doktorskiej podjęto prace badawcze, których efektem jest opracowanie procedur analitycznych charakteryzujących się takimi parametrami metrologicznymi, które pozwalają na zrealizowanie postawionych zadań badawczych.

### 3. Część doświadczalna

#### 3.1. Optymalizacja warunków metody oznaczania wybranych związków lotnych w owocach miechunki peruwiańskiej z wykorzystaniem ekstrakcji w rurce w połączeniu z chromatografią gazową i spektrometrią mas (ITEX/GC-MS)

W ramach pracy badawczej przeprowadzono optymalizację warunków oznaczania wybranych związków lotnych w owocach miechunki peruwiańskiej z wykorzystaniem ekstrakcji w rurce w połączeniu z chromatografią gazową i spektrometrią mas na etapie oznaczeń końcowych (ITEX/GC-MS). Zastosowana technika ekstrakcji zapewnia możliwość odpowiedniego wzbogacenia analitów przed etapem oznaczeń końcowych. Możliwe jest więc ilościowe oznaczenie lotnych związków organicznych, które występują w owocach na bardzo niskich poziomach zawartości.

W ramach parametryzacji metody, zostały zbadane następujące parametry procesu ekstrakcji:

- czas i temperatura inkubacji próbki,
- temperatura desorpcji,
- objętość pobieranej mieszaniny gazowej z fazy nadpowierzchniowej,
- szybkość desorpcji,
- ilość ruchów tłoka strzykawki podczas procesu sorpcji analitów na złożu,
- szybkość procesu aspiracji/despiracji.

Zbadano również zależność zmiany sumarycznej powierzchni pików od ilości powtórzeń dla tej samej próbki. Określono wartości liczbowe granicy wykrywalności i oznaczalności dla wybranych związków, wyznaczono liniowość metody oraz zbadano parametr określający ilość analitów jaka pozostaje na złożu ekstrakcyjnym po procesie w danych warunkach prowadzenia eksperymentu.

Zoptymalizowaną metodę z powodzeniem zastosowano do ilościowego oznaczania 24 związków, które stanowią istotną część frakcji lotnych związków organicznych obecnych w owocach miechunki peruwiańskiej, w tym 14 monoterpenu, 4 estry, 4 alkohole, 1 aldehyd, 1 węglowodór. Stwierdzono, że w badanych owocach najwięcej jest benzaldehydu, butanianu etylu, 2-metylo-1-butanolu, 1-hexanolu, 1-butanolu,  $\alpha$ -terpineolu, terpinen-4-olu oraz (68,6 - 585  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Wyniki wskazują, że technika ekstrakcji w rurce jest dobrą alternatywą do oznaczania lotnych oraz średniolotnych związków w porównaniu

do powszechnie stosowanych technik ekstrakcji. Zastosowana technika pozwala na ograniczenie użycia rozpuszczalników organicznych na etapie przygotowania próbek do analizy.

Wyniki badań przedstawiono w pracy opublikowanej w czasopiśmie *Journal of Separation Science* w artykule pt. "*In tube extraction for determination of the main volatile compounds in Physalis peruviana L.*" (Załącznik 1).

### **3.2. Optymalizacja warunków metody oznaczania wybranych lotnych związków z grupy terpenów z wykorzystaniem mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej w połączeniu z dwuwymiarową chromatografią gazową i spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu HS-SPME/GC×GC-TOFMS**

W ramach pracy badawczej przeprowadzono optymalizację warunków oznaczania wybranych terpenów w owocach jagody kaczki z wykorzystaniem mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej oraz desorpcji termicznej w połączeniu z kompletną dwuwymiarową chromatografią gazową sprzężoną ze spektrometrem mas z analizatorem czasu przelotu (HS-SPME/GC×GC-TOFMS). W celu oznaczania wybranych terpenów w próbkach badanych owoców, sparametryzowano warunki rozdzielania chromatograficznego, takie jak:

- okres modulacji,
- częstotliwość próbkowania,
- program temperaturowy,

oraz zoptymalizowano następujące warunki ekstrakcji:

- masa próbki,
- dobór fazy stacjonarnej włókna ekstrakcyjnego,
- dodatek soli,
- czas inkubacji,
- temperatura ekstrakcji,
- czas ekstrakcji,
- czas i temperatura desorpcji.

Wyniki uzyskane w trakcie badań potwierdzają możliwość wykorzystania techniki GC×GC w analizie próbek o złożonym składzie matrycy, a przede wszystkim w wykrywaniu związków śladowych oraz rozróżnianiu odmian np. owoców ze względu

na botaniczne i/lub geograficzne pochodzenie. Opracowana procedura została wykorzystana w kolejnym etapie badań.

Wyniki badań przedstawiono w pracy opublikowanej w czasopiśmie Food Chemistry w artykule pt. "*Application of response surface methodology to optimize solid-phase microextraction procedure for chromatographic determination of aroma-active monoterpenes in berries*" (Załącznik 2).

### **3.3. Oznaczanie profilu terpenów w potencjalnych superowocach wykorzystując mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej w połączeniu z dwuwymiarową chromatografią gazową i spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu HS-SPME/GC×GC-TOFMS**

Celem badań było scharakteryzowanie owoców miechunki peruwiańskiej (*Physalis peruviana*) oraz innych wybranych superowoców pod kątem zawartości prozdrowotnych związków jakimi są terpeny.

Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły na określenie profilu terpenów w wybranych owocach: miechunki peruwiańskiej, jabłoni jagodowej, oliwnika wielokwiatowego oraz głogu szkarłatnego. Zidentyfikowano 80 związków z grupy terpenów, w tym 62 związki w owocach miechunki peruwiańskiej, 38 w jabłoni jagodowej, 27 w oliwniku wielokwiatowym, a 29 w głogu szkarłatnym. Ponadto, wyodrębniono związki charakterystyczne dla konkretnych superowoców. Do realizacji powyższego zadania na etapie izolacji i wzbogacania analitów wykorzystano technikę mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej, a na etapie oznaczeń końcowych - technikę kompleksowej dwuwymiarowej chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas z analizatorem czasu przelotu. Zoptymalizowana na wcześniejszym etapie badań procedura analityczna GC×GC-TOFMS pozwoliła na rozdzielenie i uzyskanie charakterystyki lotnej frakcji badanych próbek owoców, co byłoby niemożliwe przy wykorzystaniu klasycznej jednowymiarowej chromatografii gazowej. Natomiast zastosowanie techniki HS-SPME zapewnia możliwość efektywnej izolacji i wzbogacenia analitów występujących w owocach z zadowalającą czułością i powtarzalnością.



Wyniki badań przedstawiono w pracy opublikowanej w czasopiśmie *International Journal of Food Properties* w artykule pt. "*Determination of terpenes profile in four potential superfruits with use of HS-SPME/GC×GC-TOFMS procedure*" (Załącznik 3).

### **3.4. Analiza ilościowa terpenów w jagodzie kamczackiej wykorzystując mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej w połączeniu z dwuwymiarową chromatografią gazową i spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu HS-SPME/GC×GC-TOFMS**

Celem badań było oznaczenie wybranych związków z grupy terpenów w odmianach owoców jagody kamczackiej wykorzystując procedurę analityczną, której parametry zostały poddane optymalizacji (HS-SPME/GC×GC-TOFMS). W owocach jagody kamczackiej zidentyfikowano 44 związki z grupy terpenów, z czego 34 związki zostały oznaczone po raz pierwszy w tych owocach. Ze względu na budowę chemiczną, związki zostały przypisane do określonych grup: monoterpeny węglowodorowe oraz monoterpeny zawierające atomy tlenu (tlenki, alkohole, aldehydy i ketony). Wstępną identyfikację związków przeprowadzono na podstawie zgodności widm mas z widmami w bibliotece NIST oraz poprzez porównanie indeksów retencji analitów z wartościami literaturowymi. Głównymi składnikami frakcji lotnej owoców jagody kamczackiej są monoterpeny takie jak linalol, eukaliptol, limonen  $\alpha$ -terpineol. Analiza ilościowa wykazała, że w analizowanych próbkach jagód najwięcej było eukaliptolu.

Wyniki badań przedstawiono w pracy opublikowanej w czasopiśmie *Food Chemistry* w artykule pt. "*Comprehensive two-dimensional gas chromatography for determination of the terpenes profile of blue honeysuckle berries*" (Załącznik 4).

## **4. Podsumowanie i wnioski**

Wnioski wynikające z przeprowadzonych studiów literaturowych oraz wyniki badań własnych dotyczą przede wszystkim etapu izolacji i wzbogacania związków lotnych z grupy terpenów w połączeniu z chromatografią gazową na etapie oznaczeń końcowych z próbek owoców oraz zastosowaniu chromatografii gazowej na etapie rozdzielania, identyfikacji i oznaczenia ilościowego analitów z grupy terpenów.

### **Analiza danych literaturowych wskazuje na:**

- konieczność oznaczania związków z grupy terpenów w próbkach żywności, w tym szczególnie w próbkach owoców;
- potrzebę opracowywania metodyk oznaczania powyższych analitów;
- zwrócenie szczególnej uwagi podczas opracowywania nowych metodyk na etap przygotowania próbki do analizy oraz na wybór odpowiedniej techniki na etapie oznaczeń końcowych, takiej, która umożliwi oznaczanie wybranej grupy analitów.

Zasadniczym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie nowych i udoskonalenie już istniejących instrumentalnych metod analitycznych umożliwiających kompleksową analizę próbek żywności pod kątem oznaczania związków z grupy terpenów.

### **Prace badawcze podjęte podczas realizacji badań obejmowały:**

- opracowanie metodyki oznaczania lotnych związków z grupy terpenów w oparciu o technikę ITEX,
- opracowanie metodyki oznaczania lotnych związków z grupy terpenów w oparciu o technikę SPME,
- określenie profilu lotnych terpenów w owocach miechunki peruwiańskiej, głogu szkarłatnego, jabłoni jagodowej i oliwnika wielokwiatowego,
- analizę ilościową wybranych związków w owocach miechunki peruwiańskiej oraz jagody kamczackiej.

### **W trakcie realizacji badań niniejszej rozprawy doktorskiej:**

- zastosowano technikę ekstrakcji w rurce jako technikę izolacji i wzbogacania analitów z próbek w połączeniu z kapilarną chromatografią gazową sprzężoną ze spektrometrią mas,
- zastosowano technikę mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej jako technikę izolacji i wzbogacania analitów z próbek w połączeniu z dwuwymiarową chromatografią gazową sprzężoną ze spektrometrią mas z analizatorem czasu przelotu,
- w trakcie realizacji opracowywania procedur analitycznych dobrano zarówno warunki izolacji i wzbogacania jak i selektywnego rozdzielania związków w układzie chromatograficznym oraz określono wybrane parametry walidacyjne stosowanych procedur.

**Aby zrealizować zamierzone cele przeprowadzono szereg badań, których wyniki mogą być podstawą do następujących spostrzeżeń i wniosków dotyczących:**

**1.** Opracowania odpowiednich metodyk analitycznych, które w porównaniu z istniejącymi procedurami oznaczania lotnych związków z grupy terpenów, stanowią nowość naukową ze względu na:

- zastosowanie bezrozpuszczalnikowych technik wzbogacania analitów z próbek owoców,
- możliwość oznaczenia znacznie szerszego spektrum analitów w porównaniu z możliwościami analitycznymi procedur opisanych w literaturze,
- możliwość oznaczania lotnych związków na bardzo niskim poziomie stężeń.

**2.** Optymalizacji niezbędnych parametrów zaproponowanych metodyk analitycznych.

**3.** Wyznaczenia podstawowych parametrów walidacyjnych metodyk oznaczania lotnych związków z grupy terpenów na bazie próbek wzorcowych, zapewniających pewien poziom kontroli i zapewnienia jakości uzyskanych wyników analitycznych.

**4.** Zastosowania opracowanych procedur do określenia stężeń związków z grupy terpenów w próbkach owoców. Uzyskane dane mogą stanowić cenne przesłanki w zakresie:

- kwalifikacji owoców do grupy superowoców,
- zwiększenia popularności mało znanych owoców wśród konsumentów,
- wykorzystania badanych owoców w przemyśle spożywczym jak i farmaceutycznym jako surowca lub dodatku do nowych, zdrowych produktów (takich jak soki owocowe, jogurty, wina) oraz farmaceutyków i suplementów diety,
- wzbogacenia ludzkiej diety o dodatkowe zdrowe i wartościowe produkty,
- rozszerzenie zakresu informacji na temat profili oraz poziomu zawartości związków z grupy terpenów w owocach miechunki peruwiańskiej, jagody kamczackiej, głogu szkarłatnego, jabłoni jagodowej oraz oliwnika wielokwiatowego.

## Streszczenie

Globalizacja światowych rynków żywności umożliwia dostęp do nawet najbardziej egzotycznych owoców, które są wykorzystywane w celu wzbogacenia ludzkiej diety nowymi smakami i jednocześnie dostarczają wielu prozdrowotnych składników. Termin „superowoce” zaczęto stosować jako nowe podejście marketingowe do wspierania popytu rzadkich i mało znanych owoców. Jednakże wzrost popularności prozdrowotnej siły superowoców zależy nie tylko od odpowiedniego marketingu, ale również udokumentowanych wyników badań naukowych. Tylko owoce, które zawierają silne związki bioaktywne można sklasyfikować jako superowoce. Do tej grupy związków należą m.in. terpeny, które wiążą wolne rodniki, metale ciężkie, działają przeciwzapalnie, przeciwrakotwórczo, przeciwbakteryjnie, przeciwgrzybicznie, antywirusowo, antyalergicznie czy przeciwartretycznie. Jest to szczególnie istotne w czasach gdy ludziom przychodzi zmagać się z wieloma chorobami cywilizacyjnymi. Bodźcem do podjęcia tematyki badawczej było dążenie do poszukiwania i wprowadzania na rynek nowych, smacznych i zdrowych produktów, głównie na bazie naturalnych składników diety, a w szczególności owoców.

Jednym z najbardziej obiecujących owoców tropikalnych jest miechunka peruwiańska popularnie nazywana także rodzyńkiem brazylijskim. Miechunka peruwiańska nie jest rośliną uprawianą na szeroką skalę, w szczególności na terenie Europy, niemniej jednak jej owoce, stają się coraz bardziej poszukiwanym surowcem.

Głównym celem badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej była charakterystyka frakcji lotnych związków organicznych występujących w owocach miechunki peruwiańskiej oraz innych wybranych owocach, a w szczególności zawartości związków bioaktywnych i zapachowych. Problematyka tematyki badawczej wymagała opracowania lub modyfikacji metod analitycznych umożliwiających:

- wykrycie możliwie szerokiej gamy związków lotnych wykazujących właściwości prozdrowotne i zapachowe,
- identyfikację oraz ilościowe oznaczenie tych związków,
- określenie profili związków należących do wyżej wymienionych grup występujących w badanych owocach.



Zakłada się, że uzyskane dane przyczynią się do zakwalifikowania tych owoców do grupy superowoców oraz do większego ich rozpowszechnienia. W efekcie wzbogacona zostanie ludzka dieta o dodatkowe zdrowe oraz wartościowe produkty.

## Abstract

The present globalization of world markets results in the world-wide availability of even most exotic fruits, which are used to enrich human diet with new flavors and at the same time provide many health-enhancing natural ingredients. The term superfruit is used in new marketing approach to promote the demand for rare fruits, which can be consumed as foodstuffs or used as ingredients by manufacturers of functional foods, nutraceuticals, and beverages. However, an increase in popularity of health-enhancing superfruits on the market depends heavily on both pertinent research results and appropriate marketing. Only fruits which contain powerful bioactive compounds can be classified as superfruits. This group of compounds also include terpenes, which bind free radicals, heavy metal ions and act as an anti-inflammatory, anti-carcinogenic, anti-bacterial, anti-fungal, anti-viral, anti-allergic and anti-arthritic agents. Nowadays, it is particularly important, whereas humanity struggle with many civilization diseases. The motivation to conduct this research subject was growing marketing need of new, tasty and healthy products, mainly based on natural ingredients of diet and in particular fruits.

One of the most promising tropical fruit is *Physalis peruviana*, commonly known as goldenberry or cape gooseberry. *Physalis peruviana* is a solanaceous hairy plant, native to tropical South America. It is not a plant grown on a large scale in Europe but its fruits are becoming increasingly desired market product.

The main aim of the research carried out under the doctoral thesis was to characterize the fraction of volatile organic compounds determined in cape gooseberry fruits and few selected other fruits, in particular, content of bioactive and aroma compounds. The issue of the research topic, required to develop or modify analytical methods which allow to obtain:

- detection of the highest amount of compounds exhibiting health benefits and fragrances;
- identification and quantification of these compounds;
- determination of compounds profiles, which occur in tested fruits.

It is assumed the obtained data will contribute to qualify these fruits to group of superfruits and also increase their popularity. As a result of conducted research, the human diet will be supplemented with additional healthy and valuable products.

## Literatura

- [1] M. Druri, *Superowoce*. Przemysł Spożywczy 64 (2010) 12-16.
- [2] M. F. Ramadan, *Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (physalis peruviana): An overview*. Food Research International 44 (2011) 1830-1836.
- [3] P. M. Gross, *Superfruits: (Top 20 fruits packed with nutrients and phytochemicals, best ways to eat fruits for maximum nutrition, and 75 simple and delicious recipes for overall wellness)*. The McGraw-Hill Companies, Inc.: Columbus, OH, 2009.
- [4] H. E. Miller, F. Rigelhof, L. Marquart, A. Prakash, M. Kanter, *Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables*. Journal of the American College of Nutrition 19 (2000) 312-319.
- [5] X. Wu, G. R. Beecher, J. M. Holden, D. B. Haytowitz, S. E. Gebhardt, R. L. Prior, *Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52 (2004) 4026-4037.
- [6] G. D. Stoner, N. P. Seeram, *Berries and cancer prevention*. Springer, New York, 2011.
- [7] W. Grajek, W. Beer-Dubowska, *Przeciwutleniacze w żywności: aspekty zdrowotne, technologiczne, molekularne i analityczne*. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2007.
- [8] S. Zwenger, C. Basu, *Plant terpenoids: applications and future potentials*. Biotechnology and Molecular Biology Reviews 3 (2008) 1-7.
- [9] M. Trytek, R. Paduch, J. Fiedurek, M. Kandefer-Szerszeń, *Monoterpeny – stare związki nowe zastosowania i biotechnologiczne metody ich otrzymywania*. Biotechnologia 1 (2007) 135-155.

- [10] K. Bogacz, *Superfruits – korzyści dla producentów i konsumentów*. Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny 53 (2009) 3-6.
- [11] Ö. Yildiz, S. P. Eyduran, *Functional components of berry fruits and their usage in food technologies*. African journal of agricultural research 4 (2009) 422-426.
- [12] A. Ahmadiani, J. Hosseiny, S. Semnanian, M. Java, F. Saeedi, M. Kamalinejad, S. Saremi, *Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Elaeagnus angustifolia* fruit extract*. Journal of Ethnopharmacology 72 (2000) 287-292.
- [13] V. Hajhashemi, A. Ghannadi, B. Sharif, *Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill.* Journal of Ethnopharmacology 89 (2003) 67-71.
- [14] M. F. Ramadan, J. T. Moersel, *Impact of enzymatic treatment on chemical composition, physicochemical properties and radical scavenging activity of goldenberry (*Physalis peruviana* L.) juice*. Journal of the Science of Food and Agriculture 87 (2007) 452-460.
- [15] R. G. Berger, F. Drawert, H. Kollmannsberger, *The flavor of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.)*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung 188 (1989) 122-126.
- [16] A. B. Ray, A. Ali, M. Sahai, P. L. Schiff, J. E. Knapp, D. J. Slatkin, *Physalolactone B: a novel withanolide of *Physalis peruviana**. Chemistry & Industry (London) 2 (1981) 62-64.
- [17] P. Neogi, M. Sahai, A. B. Ray, *Withaperuvins F and G, two withanolides of *Physalis peruviana* roots*. Phytochemistry 26 (1986) 243-247.
- [18] A. S. R. Anjaneyulu, D. S. Rao, P. W. Lequesne, *Withanolides, biologically active natural steroidal lactones: a review*. Studies in Natural Products Chemistry 20 (1998) 135-261.
- [19] Materiały informacyjne firmy Sigma Aldrich <http://www.sigmaaldrich.com>
- [20] Internetowa baza danych <http://www.odour.org.uk/>
- [21] Internetowa baza danych [http://flavornet.org/f\\_kovats.html](http://flavornet.org/f_kovats.html)

- [22] Internetowa baza danych <http://www.thegoodscentcompany.com/index.html>
- [23] H. Prosen, L. Janeš, M. Strlič, D. Rusjan, D. Kočar, *Analysis of free and bound aroma compounds in grape berries using headspace solid-phase microextraction with GC-MS and a preliminary study of solid-phase extraction with LC-MS*. Acta Chimica Slovenica 54 (2007) 25-32.
- [24] M. Meret, P. Brat, C. Mertz, M. Lebrun, Z. Gunata, *Contribution to aroma potential of Andean blackberry (Rubus glaucus Benth.)*. Food Research International 44 (2011) 54-60.
- [25] S. Vichi, M. Riu-Aumatell, M. Mora-Pons, J. M. Guadayol, S. Buxaderas, E. López-Tamames, *HS-SPME coupled to GC/MS for quality control of Juniperus communis L. berries used for gin aromatization*. Food Chemistry 105 (2007) 1748-1754.
- [26] L. Carballeira Lois, S. Cortes Dieguez, M. L. Gil de la Pena, E. Fernandez Gomez, *SPE-GC determination of aromatic compounds in two varieties of white grape during ripening*. Journal of Chromatography – Supplement 53 (2001) 350-355.
- [27] A. Vezzaro, J. Degenhardt, S. T. Krause, A. Nonis, A. Ramina, B. Ruperti, *Isolation and characterization of terpene synthases potentially involved in flavor development of ripening olive (Olea europaea) fruits*. Journal of Plant Physiology 169 (2012) 908-14.
- [28] K. Tiitinen, M. Hakala, H. Kallio, *Headspace volatiles from frozen berries of sea buckthorn (Hippophaë rhamnoides L.) varieties*. European Food Research and Technology 233 (2006) 455-460.
- [29] I. Gokbulut, I. Karabulut, *SPME–GC–MS detection of volatile compounds in apricot varieties*. Food Chemistry 132 (2012) 1098-1102.
- [30] I. Ibrahim Mujić, M. B. Kralj, S. Jokić, T. Jug, D. Šubarić, S. Vidović, J. Živković, K. Jarni, *Characterisation of volatiles in dried white varieties figs (Ficus carica L.)*. Journal of Food Science and Technology 51 (2014) 1837-1846.
- [31] Q. Yu, X. Bi-jun, Z. Yan, Z. Hai-yan, P. Si-yi, *Study on aroma components in fruit from three different satsuma mandarin varieties*. Agricultural Sciences in China 6 (2007) 1487–1493.



- [32] E. Kafkas, S. Paydas, *Evaluation and identification of volatile compounds of some promising strawberry genotypes using HS-SPME technique by GC/MS*. World Journal of Agricultural Sciences 3 (2007) 191-195.
- [33] F. Pellat<sup>a</sup>, S. Benvenuti<sup>a</sup>, F. Yoshizaki<sup>b</sup>, D. Bertelli<sup>a</sup>, M. C. Rossi<sup>c</sup>, *Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry analysis of the volatile compounds of Evodia species fruits*. Journal of Chromatography A 1087 (2005) 265–273.
- [34] S. M. Rocha, E. Coelho, J. Zrostlikova, I. Delgadillo, M. A. Coimbra, *Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry of monoterpenoids as a powerful tool for grape origin traceability*. Journal of Chromatography A 1161 (2007) 292-297.
- [35] E. Carasek, J. Pawliszyn, *Screening of tropical fruit volatile compounds using solid-phase microextraction (SPME) fibers and internally cooled SPME fiber*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54 (2006) 8688-8696.
- [36] H. G. Schmarra, J. Bernhardt, *Profiling analysis of volatile compounds from fruits using comprehensive two-dimensional gas chromatography and image processing techniques*. Journal of Chromatography A 1217 (2010) 565-574.
- [37] A. Williams, D. Ryan, A. O. Guasca, P. Marriott, E. Pang, *Analysis of strawberry volatiles using comprehensive two-dimensional gas chromatography with headspace solid-phase microextraction*. Journal of Chromatography B 817 (2005) 97–107.
- [38] S. Guillot, L. Peytavi, S. Bureau, R. Boulanger, J. P. Lepoutre, J. Crouzet, S. Schorr-Galindo, *Aroma characterization of various apricot varieties using headspace–solid phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–olfactometry*. Food Chemistry 96 (2006) 147–155.
- [39] F. Luan, A. Mosandl, A. Munch, M. Wüst, *Metabolism of geraniol in grape berry mesocarp of Vitis vinifera L. cv. Scheurebe: demonstration of stereoselective reduction, E/Z-isomerization, oxydation and glycosylation*. Phytochemistry 66 (2005) 295-303.

[40] F. Luana, A. Mosandl, A. Degenhardt, M. Gubesch, M. Wüst, *Metabolism of linalool and substrate analogs in grape berry mesocarp of Vitis vinifera L. cv. Morio Muscat: demonstration of stereoselective oxygenation and glycosylation*. *Analytica Chimica Acta* 563 (2006) 353–364.

[41] M. A. Pedroza, A. Zalacain, J. F. Lara, M. R. Salinas, *Global grape aroma potential and its individual analysis by SBSE–GC–MS*. *Food Research International* 43 (2010) 1003–1008.

[42] J. Song, K. C. Shellie, H. Wang, M. C. Qian, *Influence of deficit irrigation and kaolin particle film on grape composition and volatile compounds in Merlot grape (Vitis vinifera L.)*. *Food Chemistry* 134 (2012) 841–50.

[43] R. Rodríguez Madrera, B. Suárez Valles, *Determination of volatile compounds in apple pomace by stir bar sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry (SBSE-GC-MS)*. *Journal of Food Science* 76 (2011) 1326–1334.

[44] S. Sewenig, D. Bullinger, U. Hener, A. Mosandl, *Comprehensive authentication of (E)- $\alpha$ ( $\beta$ )-ionone from raspberries, using constant flow MDGC-C/P-IRMS and enantio-MDGC-MS*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 838–844.

[45] Y. Wang, C. Yang, S. Li, L. Yang, Y. Wang, J. Zhao, Q. Jiang, *Volatile characteristics of 50 peaches and nectarines evaluated by HS-SPME with GC-MS*. *Food Chemistry* 116 (2009) 356–364.

[46] C. Aubert, P. Bony, G. Chalot, V. Hero, *Changes in physicochemical characteristics and volatile compounds of apricot (Prunus armeniaca L. cv. Bergeron) during storage and post-harvest maturation*. *Food Chemistry* 119 (2010) 1386–1398.

[47] M. Kupska, T. Chmiel, R. Jędrkiewicz, W. Wardencki, J. Namieśnik, *Comprehensive two-dimensional gas chromatography for determination of the terpenes profile of blue honeysuckle berries*. *Food Chemistry* 152 (2014) 88–93.

[48] N. Laohakunjit, O. Kerdchoechuen, F. B. Matta, J. L. Silva, W. E. Holmes, *Postharvest survey of volatile compounds in five tropical fruits using headspace-solid phase microextraction (HS-SPME)*. *HortScience* 42 (2007) 309–314.

- [49] C. Mei-xia, C. Xue-sen, W. Xin-pol, C. Zhi-juan, L. Xiao-li, H. Tian-ming, Z. Li-jie, *Comparison of headspace solid-phase microextraction with simultaneous steam distillation extraction for the analysis of the volatile constituents in chinese apricot*. *Agricultural Sciences in China* 5 (2006) 879-884.
- [50] L. Ferreira, R. Perestrelo, J. S. Camara, *Comparative analysis of the volatile fraction from Annona cherimola Mill. cultivars by solid-phase microextraction and gas chromatography-quadrupole mass spectrometry detection*. *Talanta* 77 (2009) 1087-1096.
- [51] H. M. Solís-Solís, M. Calderón-Santoyo, S. Schorr-Galindo, G. Luna-Solano, J. A. Ragazzo-Sánchez, *Characterization of aroma potential of apricot varieties using different extraction techniques*. *Food Chemistry* 105 (2007) 829–837.
- [52] S. S. Gebara, W. Ferreira, N. Ré-Poppi, E. Simionatto, E. Carasek, *Volatile compounds of leaves and fruits of Mengifera indica var. coquinho (Anacardiaceae) obtained using solid phase microextraction and hydrodistillation*. *Food Chemistry* 127 (2011) 689–693.
- [53] M. E. C. Pereira, D. M. Tieman, S. A. Sargent, H. J. Klee, D. J. Huber, *Volatile profiles of ripening West Indian and Guatemalan-West Indian avocado cultivars as affected by aqueous 1-methylcyclopropene*. *Postharvest Biology and Technology* 80 (2013) 37–46.
- [54] J. Pereira, J. Pereira, J. S. Camara, *Effectiveness of different solid-phase microextraction fibres for differentiation of selected Madeira island fruits based on their volatile metabolite profile-identification of novel compounds*. *Talanta* 83 (2011) 899–906.
- [55] M. Kupska, T. Wasilewski, R. Jędrkiewicz, J. Gromadzka, J. Namieśnik, *Determination of terpenes profile in four potential superfruits with use of HS-SPME/GC×GC-TOFMS procedure*. *International Journal of Food Properties*, 19 (2016) 2726-2738. IF= 1,586
- [56] M. Kupska, H. H. Jeleń, *In tube extraction for determination of the main volatile compounds in Physalis peruviana L.* *Journal of Separation Science*, DOI: 10.1002/jssc.201600797.

[57] M. Kupska, E. Rosenberg, J. Namieśnik, *Ekstrakcja micelarna – dogodna technika izolacji i wzbogacania analitów z ciekłych próbek środowiskowych*. *Analityka*, 13 1 (2012) 50.

[58] M. Koel, M. Kaljurand, *Green Analytical Chemistry*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2010.

[59] J. Płotka, M. Tobiszewski, A. Sulej, M. Kupska, T. Górecki, Jacek Namieśnik, *Green Chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 1307 (2013) 1-20.

[60] S. A. Fayed, *Antioxidant and anticancer activities of Citrus reticulata (Petitgrain mandarin) and Pelargonium graveolens (Geranium) essential oils*. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 5 (2009) 740-747.

[61] E. Abilleira, M. Renobales, A. I. Nájera, M. Virto, J. C. R. Gordo, F. J. Pérez-Elortondo, M. Albisu, L. J. R. Barron, *An accurate quantitative method for the analysis of terpenes in milk fat by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry*. *Food Chemistry* 120 (2010) 1162-1169.

[62] H. Prosen, L. Janes, M. Strlic, D. Rusjan, D. Kocar, *Analysis of free and bound aroma compounds in grape berries using headspace solid-phase microextraction with GC-MS and a preliminary study of solid-phase extraction with LC-MS*. *Acta Chimica Slovenica* 54 (2007) 25-32.

[63] M. Meret, P. Brat, C. Mertz, M. Lebrun, Z. Günata, *Contribution to aroma potential of andean blackberry (Rubus glaucus Benth.)*. *Food Research International* 22 (2011) 54-60.

[64] L. Carballeira Lois, S. Cortes Dieguez, M. L. Gil de la Pena, E. Fernandez Gomez, *SPE-GC determination of aromatic compounds in two varieties of white grape during ripening*. *Chromatographia Supplement* 53 (2001) 350-355.

[65] J. Emmert, G. Sartor, F. Sporer, J. Gummersbach, *Determination of  $\alpha$ -/ $\beta$ -thujone and related terpenes in absinthe using solid phase extraction and gas chromatography*. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 100 (2004) 352-356.

[66] J. Song, K. C. Shellie, H. Wang, M. C. Qian, *Influence of deficit irrigation and kaolin particle film on grape composition and volatile compounds in merlot grape (Vitis Vinifera L.)*. Food Chemistry 134 (2012) 841-850.

[67] M. Dziadas, H. H. Jeleń, *Analysis of terpenes in white wines using SPE–SPME–GC/MS approach*. Analytica Chimica Acta 677 (2010) 43-49.

[68] A. Vezzano, S. T. Krause, A. Nonis, A. Ramina, J. Degenhardt, B. Ruperti, *Isolation and characterization of terpene synthases potentially involved in flavor development of ripening olive (Olea europaea) fruits*. Journal of Plant Physiology 169 (2012) 908-914.

[69] M. L. Ruiz del Castillo, G. P. Blanch, M. Herraiz, *Natural variability of the enantiomeric composition of bioactive chiral terpenes in Mentha piperita*. Journal of Chromatography A 1054 (2004) 87-93.

[70] I. Gokbulut, I. Karabulut, *SPME–GC–MS detection of volatile compounds in apricot varieties*. Food Chemistry 132 (2012) 1098-1102.

[71] M. Majcher, H. H. Jeleń, *Comparison of suitability of SPME, SAFE and SDE methods for isolation of flavor compounds from extruded potato snacks*. Journal of Food Composition and Analysis 22 (2009) 606-612.

[72] M. Riu-Aumatell, L. Vargas, S. Vichi, J. M. Guadayol, E. Lopez-Tamames, S. Buxaderas, *Characterisation of volatile composition of white salsify (Tragopogon porrifolius L.) by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and simultaneous distillation–extraction (SDE) coupled to GC–MS*. Food Chemistry 129 (2011) 557-564.

[73] M. Ziino, C. Condurso, V. Romeo, D. Giuffrida, A. Verzera, *Characterization of “Provola dei Nebrodi”, a typical Sicilian cheese, by volatiles analysis using SPME-GC/MS*. International Dairy Journal 15 (2005) 585-593.

[74] E. Abilleira, M. de Renobales, A. I. Najera, M. Vitro, J. C. R. de Gordo, F. J. Perez-Elortondo, M. Albisu, L. J. R. Barron, *An accurate quantitative method for the analysis of terpenes in milk fat by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry*. Food Chemistry 120 (2010) 1162-1169.

- [75] F. Maggi, F. Papa, G. Cristalli, G. Sagratini, S. Vittori, *Characterisation of the mushroom-like flavour of Melittis melissophyllum L. subsp. melissophyllum by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography (GC-FID) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)*. Food Chemistry 123 (2010) 983-992.
- [76] S. Panseri, I. Giani, T. Mentasti, F. Bellagamba, F. Caprino, V. M. Moretti, *Determination of flavour compounds in a mountain cheese by headspace sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry*. LWT - Food Science and Technology 41 (2008) 185-192.
- [77] A. Maruffo-Curtido, M. J. Cejudo-Bastante, E. Duran-Guerrero, R. Castro-Mejias, R. Natera-Marin, F. Chinnici, C. Garcia-Barroso, *Characterization and differentiation of high quality vinegars by stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry (SBSE-GC-MS)*. LWT - Food Science and Technology 47 (2012) 332-341.
- [78] M. A. Pedroza, A. Zalacain, J. F. Lara, M. R. Salinas, *Global grape aroma potential and its individual analysis by SBSE-GC-MS*. Food Research International 43 (2010) 1003-1008.
- [79] J. E. Welke, C. A. Zini, *Comprehensive two-dimensional gas chromatography for analysis of volatile compounds in foods and beverages*. Journal of the Brazilian Chemical Society 22 (2011) 609-622.
- [80] S. M. Rocha, E. Coelho, J. Zrostlikova, I. Delgadillo, M. Coimbra, *Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry of monoterpenoids as a powerful tool for grape origin traceability*. Journal of Chromatography A 1161 (2007) 292-299.
- [81] Z. Y. Liu, J. B. Phillips, *Comprehensive two-dimensional gas chromatography using an on-column thermal modulator interface*. Journal of Chromatographic Science 29 (1991) 227-231.
- [82] T. Górecki, J. Harynuk, O. Panic, *The evolution of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC)*. Journal of Separation Science 27 (2004) 359-379.

[83] O. Panic, T. Górecki, C. McNeish, A. H. Goldstein, B. J. Williams, D. R. Worton, S. V. Hering, N. M. Kreisberg, *Development of a new consumable-free thermal modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC)*. Journal of Chromatography A 1218 (2011) 3070-3079.

[84] J. Harynuk, T. Górecki, *Comprehensive two-dimensional gas chromatography in stop-flow mode*. Journal of Separation Science 27 (2004) 431-441.

# Dorobek Naukowy

## Publikacje

### Prace w czasopismach z listy Journal Citation Reports

1. **M. Kupska**, H. H. Jeleń, *In tube extraction for determination of the main volatile compounds in Physalis peruviana L.*, Journal of Separation Science, DOI: 10.1002/jssc.201600797. **IF= 2,741**
2. T. Chmiel, **M. Kupska**, W. Wardencki, J. Namieśnik, *Application of response surface methodology to optimize solid-phase microextraction procedure for chromatographic determination of aroma-active monoterpenes in berries*, **Food Chemistry**, 221 (2017) 1041-1056. **IF = 4,052**  
DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.11.057
3. **M. Kupska**, T. Wasilewski, R. Jędrkiewicz, J. Gromadzka, J. Namieśnik, *Determination of terpenes profile in four potential superfruits with use of HS-SPME/GC×GC-TOFMS procedure*, **International Journal of Food Properties**, 19 (2016) 2726-2738. **IF= 1,586**  
DOI: 10.1080/10942912.2016.1144066
4. R. Jędrkiewicz, **M. Kupska**, A. Głowacz, J. Gromadzka, J. Namieśnik, *3-MCPD: A worldwide problem of food chemistry*, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 56 (2016) 2268-2277. **IF = 5,492**  
DOI: 10.1080/10408398.2013.829414.
5. **M. Kupska**, T. Chmiel, R. Jędrkiewicz, J. Namieśnik, *Comprehensive two-dimensional gas chromatography for determination of the terpenes profile of blue honeysuckle berries*, **Food Chemistry**, 152 (2014) 88-93. **IF = 4,052**  
DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.129
6. R. Jędrkiewicz, A. Głowacz **M. Kupska**, J. Gromadzka, J. Namieśnik, *Applications of modern sample preparation techniques for the determination of chloropropanols in food samples*, **Trends in Analytical Chemistry**, 62 (2014) 173-183. **IF = 7,487**  
DOI: 10.1016/j.trac.2014.07.012
7. J.Namiesnik, K. Veerasilp, **M.Kupska**, K.-S. Ham, S.-G. Kang, Y.-K. Park, D. Barasch, A. Nemirovski, S. Gorinstein, *Antioxidant activities and bioactive components in some berries*, **European Food Research and Technology**, 237 (2013) 819-829. **IF = 1,433**  
DOI: 10.1007/s00217-013-2041-7



8. J. Płotka, M. Tobiszewski, A. Sulej, **M. Kupska**, T. Górecki, Jacek Namieśnik, *Green Chromatography*, **Journal of Chromatography A**, 1307 (2013) 1-20.  
**IF = 3,926**  
DOI: 10.1016/j.chroma.2013.07.099

### **Inne publikacje**

1. T.Wasilewski, **M.Kupska**, R. Jędrkiewicz, J. Gromadzka, J.Namieśnik, *Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana ultradźwiękami, cz. II - Zastosowania*, *Analityka* 16 (2015) 4
2. T.Wasilewski, **M.Kupska**, R. Jędrkiewicz, J. Gromadzka, J.Namieśnik, *Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana ultradźwiękami, cz. I - Podstawy teoretyczne*, *Analityka* 15 (2014) 4
3. T.Wasilewski, **M.Kupska**, J.Namieśnik, *Rozwój technik ekstrakcji z wykorzystaniem wirującego elementu sorpcyjnego*, *Analityka* 15 (2) (2014) 10
4. **M.Kupska**, T.Chemiel, T.Dymerski, W.Wardencki, J.Namieśnik, *Kompletna dwuwymiarowa chromatografia gazowa – nowoczesne narzędzie analityczne*, *Analityka*, 13 (2012) 24
5. **M.Kupska**, E.Rosenberg, J.Namieśnik, *Ekstrakcja micelarna – dogodna technika izolacji i wzbogacania analitów z ciekłych próbek środowiskowych*, *Analityka*, 13 (2012) 50

### **Wystąpienia ustne**

1. **M. Kupska**, J. Gromadzka, J. Namieśnik, *Terpenes – properties and determination* (wystąpienie ustne), Food Safety and Regulatory Measures. (Birmingham, Wielka Brytania, 17-19.08.2015)
2. **M. Kupska**, F.A. Franchina, L.Mondello, J. Namieśnik, *Volatile profile of Cape Gooseberry using HS-SPME coupled to conventional and multidimensional gas chromatography* (wystąpienie ustne), Challenges in Flavor Chemistry and Analysis. (Poznań, 11.06.2015)
3. **M. Kupska**, J. Gromadzka, J. Namieśnik, *Determination of terpenes profile in four potential superfruits with use of HS-SPME/GC×GC-TOFMS procedure* (wystąpienie ustne), 16th edition of ExTech, the International Symposium on Advances in Extraction Technologies. (Chania, Grecja, 25-28.05.2014)

4. **M. Kupska**, R. Jędrkiewicz, T. Wasilewski, J. Gromadzka, J. Namieśnik, *The search for new supefruits - determination of terpene profile* (wystąpienie ustne), 19th Conference of Young Researchers Section of Polish Society of Food Technologist – 3rd International Session „Food Science Horizon. Somewhere, something incredible is waiting to be known.” (Warszawa, 07-09.05.2014)
5. R. Jędrkiewicz, A. Głowacz, **M. Kupska**, J. Gromadzka, J. Namieśnik, *Determination of chloropropanols in baby food samples* (współautor prezentacji ustnej), 19th Conference of Young Researchers Section of Polish Society of Food Technologist – 3rd International Session „Food Science Horizon. Somewhere, something incredible is waiting to be known.” (Warszawa, 07-09.05.2014)
6. J. Gromadzka, A. Głowacz, R. Jędrkiewicz, **M. Kupska**, *3-MCPD in Food Lipids* (współautor prezentacji ustnej), 11th Euro Fed Lipid Congress and 30th ISF lecture series "Oils, Fats and Lipids: New Strategies for a High Quality Future" (Antalya, Turcja, 27-30.10.2013)
7. **M. Kupska**, T. Wasilewski, R. Jędrkiewicz, J. Gromadzka, J. Namieśnik, *Determination of profile of VOC in selected superfruits with use of HS-SPME/GC×GC-TOFMS procedure* (wystąpienie ustne), 9th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry" (Praga, Czechy, 23-24.09.2013)
8. R. Jędrkiewicz, **M. Kupska**, J. Gromadzka, J. Namieśnik, *3-MCPD in infant foods and human breast milk: determination by GC-MS* (współautor prezentacji ustnej), 9th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry" (Praga, Czechy, 23-24.09.2013)
9. T. Chmiel, T. Dymerski, **M. Kupska**, W. Wardencki, T. Górecki, J. Namieśnik, *Characterization of flavor profile and quantification of bioactive terpenes and macroelements in Polish blue honeysuckle berries (*Lonicera caerulea* L.) by GC×GC-TOFMS and cITP-cITP-CON* (współautor prezentacji ustnej), 245th ACS National Meeting & Exposition (New Orleans, Louisiana, USA, 7-11.04.2013)
10. **M. Kupska**, T. Chmiel, T. Dymerski, J. Namieśnik, *Chromatografia Wielowymiarowa* (współautor prezentacji ustnej), VII Konferencja Analityczne Zastosowania Chromatografii Cieczowej (Warszawa, 26-27.10.2012)

## Postery

1. **M. Kupska**, J. Gromadzka, J. Namieśnik, *Two dimensional gas chromatography for determination terpenes in fruits* (poster), Food Safety and Regulatory Measures. (Birmingham, Wielka Brytania, 17-19.08.2015)
2. **M. Kupska**, J. Jencyk, S. Jurga, J. Namieśnik, *Determination of bioactive compounds in Cape Gooseberry* (poster), AMPERE NMR School and 5th Summer Symposium on Nanomaterials and their application to Biology and Medicine. (Zakopane, 14-20.06.2015)
3. **M. Kupska**, J. Gromadzka, J. Namieśnik, *Terpenes profile in Cape Gooseberry (Physalis peruviana)* (poster), 16th edition of ExTech, the International Symposium on Advances in Extraction Technologies. (Chania, Grecja, 25-28.05.2014)
4. **M. Kupska**, T. Wasilewski, R. Jędrkiewicz, J. Gromadzka, J. Namieśnik, *Determination of terpene profile in cape gooseberry (Physalis peruviana)* (poster), 19th Conference of Young Researchers Section of Polish Society of Food Technologist – 3rd International Session „Food Science Horizon. Somewhere, something incredible is waiting to be known.” (Warszawa, 07-09.05.2014)
5. A. Głowacz, R. Jędrkiewicz, **M. Kupska**, J. Gromadzka, *Determination of 3-MCPD in food lipids* (poster), 19th Conference of Young Researchers Section of Polish Society of Food Technologist – 3rd International Session „Food Science Horizon. Somewhere, something incredible is waiting to be known.” (Warszawa, 07-09.05.2014)
6. **M. Kupska**, R. Jędrkiewicz, J. Gromadzka, J. Namieśnik, *Determination of 3-monochloropropane-1,2-diol in palm oil by GC-MS and GC×GC-TOFMS* (poster), 11<sup>th</sup> Euro Fed Lipid Congress and 30<sup>th</sup> ISF lecture series "Oils, Fats and Lipids: New Strategies for a High Quality Future"(Antalya, Turcja, 27-30.10.2013)
7. R. Jędrkiewicz, **M. Kupska**, J. Gromadzka, J. Namieśnik, *Determination of 3-monochloropropane-1,2-diol in infant foods and human breast milk by GC-MS and GC×GC-TOFMS* (poster), 11<sup>th</sup> Euro Fed Lipid Congress and 30<sup>th</sup> ISF lecture series "Oils, Fats and Lipids: New Strategies for a High Quality Future"(Antalya, Turcja, 27-30.10.2013)
8. **M.Kupska**, T.Chmiel, P.Wiśniewska, M.Śliwińska, J.Namieśnik, *Comprehensive two-dimensional gas chromatography for determination of the terpene profile of blue honeysuckle berries* (poster), 29th International Symposium on Chromatography (Toruń, 9-13.09.2012)

9. T.Dymerski, P.Wiśniewska, M.Śliwińska, **M.Kupska**, W.Wardencki, *Prototype of electronic nose for botanical origin assessment of Polish honeys* (poster), 29th International Symposium on Chromatography (Toruń, 9-13.09.2012)

### **Udział w realizowaniu projektów badawczych**

1. Projekt finansowany przez Narodowe Centrum Nauki (PRELUDIUM 4)

Charakter udziału: **kierownik projektu**

Tytuł: Opracowanie nowych metodyk oznaczania związków bioaktywnych i zapachowych w próbkach owoców miechunki peruwiańskiej (*Physalis peruviana L.*) oraz innych "superowoców" jako narzędzia do oceny ich walorów zdrowotnych i sensorycznych.

Okres realizacji projektu: 36 miesięcy

2. Projekt finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (LIDER)

Charakter udziału: **wykonawca**

Tytuł: Opracowanie nowych procedur analitycznych umożliwiających oznaczenie 3-MCPD i 1,3-DCP w olejach i tłuszczach spożywczych w laboratoriach przemysłowych

Okres realizacji projektu: 36 miesięcy

### **Staże i wymiany międzynarodowe i krajowe**

1. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu - staż krajowy w zespole prof. dr hab. Henryka Jelenia (Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Zakład Chemii Żywności i Analizy Instrumentalnej). Praca w Laboratorium Chromatografii Gazowej. Czas trwania: 01.12.2015-30.09.2016 (10 miesięcy)
2. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu - staż krajowy w zespole prof. dr hab. Henryka Jelenia (Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Zakład Chemii Żywności i Analizy Instrumentalnej). Praca w Laboratorium Chromatografii Gazowej. Czas trwania: 01.09-30.11.2015 (3 miesiące), Program Advanced PhD
3. Centrum NanoBioMedyczne, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu - staż krajowy w zespole prof. dr hab. inż. S. Jurgi. Praca w Laboratorium Spektroskopii NMR. Czas trwania: 01.03-31.05.2015 (3 miesiące), Program Advanced PhD

4. University of Messina, Mesyna, Sycylia, Włochy - staż zagraniczny w zespole prof. L. Mondello (Department of Pharmaceutical Sciences and Health Products). Realizacja projektu pt. "Development of new methodologies for the determination of terpenes profile in selected fruits." Czas trwania: 01.09-15.12.2014 (3,5 miesiąca), Program Inter PhD
5. University of Lisbon, Lizbona, Portugalia - badania w zespole prof. J.M.F. Nogueira (Department of Analytical Chemistry). Realizacja projektu pt. "Analysis of terpenes by GC-qMS after the Stir Bar Sorptive Extraction and Liquid Desorption. Profile of all compounds in fruit, juice and jam of blue honeysuckle berries analyzed by SBSE-LD/LVI-GC-qMS.". Czas trwania: 29.02-29.05.2012 (3 miesiące), Program LLP Erasmus
6. Vienna University of Technology, Wiedeń, Austria - praktyka w zespole prof. E. Rosenberg (Laboratory for Organic Trace Analysis). Realizacja projektu pt. „Analysis of PAHs by GC-FID after the Cloud Point Extraction”. Czas trwania: 20.06-20.09.2011 (3 miesiące), Program LLP Erasmus

### **Szkolenia**

1. AMPERE NMR SCHOOL 2015 - udział w szkoleniu w zakresie NMR oraz MRI, Zakopane, 14-20.06.2015
2. BioAnalytic - udział w warsztatach, Ekstrakcja do fazy stałej jej miejsce w laboratorium analitycznym, Gdańsk, 15.04.2014
3. LECO - szkolenie w zakresie dwuwymiarowej chromatografii gazowej, wykorzystania wielozadaniowego automatycznego podajnika próbek firmy Gerstel, obsługa programu Maestro oraz ChromaTOF, Gdańsk, 13-17.01.2014

### **Nagrody i stypendia**

1. Stypendium sponsorowane przez Grupę LECO POLSKA Sp. z o.o. dla słuchacza studium doktoranckiego
2. Stypendium naukowe dla doktorantów w ramach projektu „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii”, 2012-2015
3. Stypendium dla najlepszych doktorantów, 2012-2015
4. Stypendium z dotacji projakościowej, 2012-2015

5. Laureatka szóstej edycji projektu "InnoDoktorant - stypendia dla doktorantów", stypendium przyznane w ramach Priorytetu VIII Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Działanie 8.2, Poddziałanie 8.2.2 „Regionalne Strategie Innowacji”, finansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, budżetu państwa oraz budżetów samorządów województw, 2014
6. Stypendium wyjazdowe na staż zagraniczny w ramach projektu „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii”, 2014
7. Stypendium wyjazdowe na staż krajowy z projektu "Centrum Studiów Zaawansowanych - rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w obszarach kluczowych w kontekście celów Strategii Europa 2020", 2014-2015

## Załączniki

### Załącznik 1

*In tube extraction for determination of the main volatile compounds in Physalis peruviana L.*

### Załącznik 2

*Application of response surface methodology to optimize solid-phase microextraction procedure for chromatographic determination of aroma-active monoterpenes in berries*

### Załącznik 3

*Determination of terpenes profile in four potential superfruits with use of HS-SPME/GC×GC-TOFMS procedure*

### Załącznik 4

*Comprehensive two-dimensional gas chromatography for determination of the terpenes profile of blue honeysuckle berries*