
Dr inż. Anna Szymczycha-Madeja

Politechnika Wrocławska

Wydział Chemiczny

Zakład Chemii Analitycznej i Metalurgii Chemicznej

Załącznik nr 2a do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

Autoreferat

Wrocław, 2019

1. Imię i Nazwisko: Anna Szymczycha-Madeja

2. Informacje o posiadanych dyplomach i uzyskanych stopniach naukowych:

doktor nauk chemicznych	Politechnika Wrocławska Wydział Chemiczny Zakład Chemii Analitycznej, 2007 r. Praca doktorska pt.: „ <i>Ługowanie metali z zużytego katalizatora hydroodsiarczania w środowisku kwaśnym</i> ”. Promotor: prof. dr hab. inż. Władysława Mulak
magister inżynier chemii	Politechnika Wrocławska Wydział Chemiczny Zakład Chemii Analitycznej, 2003 r. Praca magisterska pt.: „ <i>Charakterystyka fizykochemiczna zużytych katalizatorów niklowych</i> ”. Promotor: prof. dr hab. inż. Władysława Mulak

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

01.2015 – obecnie	Politechnika Wrocławska Wydział Chemiczny Zakład Chemii Analitycznej i Metalurgii Chemicznej adiunkt naukowo-dydaktyczny
10.2011 – 12.2014	Politechnika Wrocławska Wydział Chemiczny Zakład Chemii Analitycznej adiunkt naukowo-dydaktyczny
10.2007 – 09.2011	Politechnika Wrocławska Wydział Chemiczny Zakład Chemii Analitycznej asystent naukowo-dydaktyczny
08.2016 – 08.2017	Urlop macierzyński

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

4A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

*Wielopierwiastkowa analiza żywności z zastosowaniem spektrometrii atomowej
– poszukiwanie nowych, alternatywnych procedur oznaczania całkowitych zawartości
pierwiastków i ich form frakcyjnych*

4B) Wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego:

* – oznaczono autora do korespondencji

IF – współczynnik oddziaływania zgodnie z rokiem opublikowania, w przypadku roku publikacji 2019 podano ostatnią dostępną wartość IF

MNiSW – liczba punktów MNiSW

CI – liczba cytowań

H1. A. Szymczycha-Madeja*, M. Welna

Evaluation of a simple and fast method for the multi-elemental analysis in commercial fruit juice samples using atomic emission spectrometry
Food Chemistry 141 (2013) 3466-3472

IF₂₀₁₃=3,259; MNiSW=40; CI=24

H2. A. Szymczycha-Madeja*, M. Welna, P. Pohl

Determination of elements in energy drinks by ICP OES with minimal sample preparation
Journal of the Brazilian Chemical Society 24 (2013) 1606-1612

IF₂₀₁₃=1,253; MNiSW=25; CI=3

H3. A. Szymczycha-Madeja*, M. Welna, P. Pohl

Fast method of elements determination in slim coffees by ICP OES
Food Chemistry 146 (2014) 220-225

IF₂₀₁₄=3,391; MNiSW=40; CI=9

H4. A. Szymczycha-Madeja*, M. Welna, P. Pohl

Simple and fast sample preparation procedure prior to multi-element analysis of slim teas by ICP OES
Food Analytical Methods 7 (2014) 2051-2063

IF₂₀₁₄=1,956; MNiSW=30; CI=7

H5. A. Szymczycha-Madeja*

Rapid method of elements determination in rye crispbread by ICP OES
Arabian Journal of Chemistry 10 (2017) S3913-S3919

IF₂₀₁₇=2,969; MNiSW=35; CI=2

H6. A. Szymczycha-Madeja*

A simple and rapid method for the multi-element analysis of wheat crispbread products by inductively coupled plasma optical spectrometry
Journal of AOAC International 97 (2014) 1656-1661

IF₂₀₁₄=1,120; MNiSW=25; CI=0

- H7. A. Szymczycha-Madeja, M. Welna, P. Pohl***
Elemental analysis of teas and their infusions by spectrometric methods
TrAC. Trends in Analytical Chemistry 35 (2012) 165-181
IF₂₀₁₂=6,351; MNiSW=50; CI=71
- H8. A. Szymczycha-Madeja, M. Welna, P. Pohl***
Determination of essential and non-essential elements in green and black teas by FAAS and ICP OES simplified - multivariate classification of different tea products
Microchemical Journal 121 (2015) 122-129
IF₂₀₁₅=2,893; MNiSW=35; CI=16
- H9. A. Szymczycha-Madeja*, M. Welna, P. Pohl**
Simplified multi-element analysis of ground and instant coffees by ICP-OES and FAAS
Food Additives & Contaminants: Part A 32 (2015) 1488-1500
IF₂₀₁₅=1,878; MNiSW=25; CI=2
- H10. A. Szymczycha-Madeja*, M. Welna, P. Pohl**
Comparison and validation of different alternative sample preparation procedures of tea infusions prior to their multi-element analysis by FAAS and ICP OES
Food Analytical Methods 9 (2016) 1398-1411
IF₂₀₁₆=2,038; MNiSW=30; CI=6
- H11. A. Szymczycha-Madeja*, P. Pohl, M. Welna, E. Stelmach, D. Jedryczko**
The evaluation of the suitability of different alternative sample preparation procedures prior to the multi-elemental analysis of brews of ground roasted and instant coffees by FAAS and ICP OES
Food Research International 89 (2016) 958-966
IF₂₀₁₆=3,086; MNiSW=40; CI=1
- H12. P. Pohl*, A. Szymczycha-Madeja, E. Stelmach, M. Welna**
Multivariate data reduction and discrimination of black and green teas due to the physical fractionation pattern of selected metals determined in their infusions
Talanta 160 (2016) 314-324
IF₂₀₁₆=4,162; MNiSW=40; CI=0
- H13. P. Pohl*, A. Szymczycha-Madeja, E. Stelmach, M. Welna**
Differentiation of roasted and soluble coffees through physical fractionation of selected essential and nonessential metals in their brews and exploratory data analysis
Talanta 160 (2016) 686-693
IF₂₀₁₆=4,162; MNiSW=40; CI=2
- H14. A. Szymczycha-Madeja*, M. Welna, P. Pohl**
Method validation for multi-elemental analysis of dialyzable and non-dialyzable fraction of coffee brews by FAAS and ICP OES: a bioaccessibility study
Food Analytical Methods 12 (2019) 198-216
IF₂₀₁₇=2,245; MNiSW=30; CI=0
- H15. A. Szymczycha-Madeja*, M. Welna, P. Pohl**
Solubility and bioaccessibility of Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, P, Sr and Zn in slim coffee infusions by *in vitro* gastrointestinal digestion
Journal of the Brazilian Chemical Society 26 (2015) 1781-1789
IF₂₀₁₅=1,096; MNiSW=25; CI=3

PODSUMOWANIE - publikacje H1-H15:

Sumaryczny IF zgodny z rokiem opublikowania:	41,859
Sumaryczna liczba punktów MNiSW:	510
Sumaryczna liczba cytowań:	146

4C) Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Przygotowanie próbek do analizy stanowi jeden z najważniejszych i najbardziej wymagających etapów procesu analitycznego, który wpływa na jakość otrzymywanych wyników. Jedynie nieliczne metody pomiarowe pozwalają na badanie próbek pierwotnych bez wstępnego ich przygotowania. Zdecydowana większość metod analitycznych wiąże się z koniecznością przeprowadzenia składników próbek stałych do roztworu przed właściwym etapem ich oznaczania. Efektem tych działań jest przeniesienie analitów z matrycy pierwotnej do matrycy wtórnej, którą stanowi roztwór do analizy. Wszelkie czynności oraz operacje wykonywane w trakcie tego procesu mogą być źródłem błędów wskutek kontaminacji próbek i/lub straty analitów. Wybór sposobu rozkładu próbki uzależniony jest od składu matrycy, rodzaju i stężenia analitów oraz użytej metody detekcji.

Całkowite stężenia wybranych pierwiastków w żywności oznacza się najczęściej metodami atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu (FAAS), optycznej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP OES) i spektrometrii mas ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnej (ICP MS). Niestety, metody te wymagają przygotowania próbek w postaci wodnych roztworów. Do tego celu stosuje się najczęściej rozkład na mokro w układach otwartych z wykorzystaniem płyty grzejnej/bloku grzejnego lub układach zamkniętych wspomaganym energią mikrofalową. W obu przypadkach próbka traktowana jest stężonymi odczynnikami utleniającymi, np. HNO_3 , $\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{O}_2$, HNO_3+HCl , HNO_3+HF oraz $\text{HNO}_3+\text{HClO}_4$ [1-10]. Oprócz metod rozkładu na mokro stosuje się również spopielenie próbek [11,12]. Rozkład na mokro w układzie otwartym i spopielenie to metody bardzo praco- i czasochłonne. Czas wymagany na przygotowanie roztworów próbek z wykorzystaniem wymienionych procedur wynosi około 7 godzin lub dłużej. Ponadto tego rodzaju procedury wymagają użycia znacznych ilości odczynników oraz energii elektrycznej. Dodatkowo długotrwałe przetwarzanie próbek w wysokiej temperaturze często prowadzi do strat analitów spowodowanych lotnością niektórych związków tworzących się tych warunkach i/lub zanieczyszczenie rozkładanych próbek z otoczenia lub użytych odczynników.

Przyjmuje się, że rozkład próbek na mokro w układzie zamkniętym wspomaganym energią mikrofalową jest jedną z najkorzystniejszych i najczęściej stosowanych procedur przygotowania próbek do pomiaru metodami FAAS, ICP OES i ICP MS. Tego rodzaju rozkład wymaga relatywnie krótszego czasu – około 2 godzin oraz eliminuje ryzyko zanieczyszczenia próbek i strat analitów. Niemniej jednak zasadniczą wadą tej procedury jest wysoki koszt wykorzystywanych urządzeń. W przypadku analizy dużej ilości próbek

znacznie wydłuża się czas ich przygotowania ze względu na konieczność czyszczenia używanych naczyń teflonowych, a także ich chłodzenie przed otwarciem po każdym cyklu mineralizacji. Ponadto różny skład matrycy analizowanych próbek może wymagać odmiennych i odpowiednio dobranych parametrów rozkładu, dostosowanych do czasu dawki promieniowania mikrofalowego oraz jego mocy (tzw. programów roztwarzania). Wymienione wady mogą być dość uciążliwe i wymuszają konieczność poszukiwania nowych, alternatywnych procedur przygotowania próbek do analizy spektrochemicznej. Procedury te powinny być znacznie szybsze i prostsze, zmniejszając ilość stosowanych odczynników, całkowicie eliminować etap rozkładu wysokotemperaturowego matryc próbek z zachowaniem wysokiej efektywności i przydatności do analiz rutynowych, np. szybkiego określenia jakości badanych produktów spożywczych. Możliwość uproszczenia etapu przygotowania próbek przed pomiarami spektrometrycznymi poprzez wyeliminowanie rozkładu na mokro, wpływa znacząco na jakość uzyskiwanych wyników oraz wpisuje się w wiodący nurt badań naukowych, którego celem jest poszukiwanie alternatywnych procedur przygotowania próbek do analizy.

Popularność żywności funkcjonalnej w tym soków, napojów energetycznych, kawy, herbaty czy pieczywa chrupkiego sprawia, że zainteresowanie analizą składu pierwiastkowego tych produktów stale rośnie, o czym świadczy liczba prac opublikowanych w ostatniej dekadzie. Dlatego też głównym celem przedstawionego przeze mnie cyklu prac [H1-H15], stanowiących osiągnięcie naukowe uzyskane po otrzymaniu stopnia naukowego doktora, było poszukiwanie nowych, alternatywnych procedur przygotowania próbek żywności, bez konieczności ich wysokotemperaturowego rozkładu, do oznaczania całkowitych stężeń wybranych pierwiastków z zastosowaniem metod ICP OES i FAAS. W pracach tych omówiono nowe różnorodne procedury rozkładu próbek i sposoby uwalniania do roztworu oznaczanych składników tj. rozkład na mokro w układzie otwartym i zamkniętym, rozpuszczanie, ekstrakcja w układzie ciało stałe-ciecz, co umożliwiała ich właściwe przygotowanie do analizy wielopierwiastkowej metodami spektrometrii atomowej. Wybrane prace cyklu [H12-H15] przedstawiają również sposoby przygotowania próbek do oznaczania form frakcyjnych wybranych pierwiastków z zastosowaniem filtracji membranowej (UF) oraz trawienia enzymatycznego. Opracowane procedury frakcjonowania fizycznego pierwiastków w analizowanych próbkach umożliwiają zróżnicowanie występujących w nich związków pierwiastków pod względem wielkości oraz masy cząsteczkowej, dają również unikatową wiedzę nt. rozkładów wyodrębnionych frakcji fizycznych, tj. < 100 kDa, 50-100 kDa, 30-50 kDa, 10-30 kDa, 5-10 kDa, < 5 kDa. Symulacja trawienia żołądkowo-jelitowego w warunkach *in vitro* daje natomiast cenną informację o frakcjach biodostępnych i bioprzyswajalnych oznaczanych pierwiastków.

Przedmiotem zainteresowania w przedstawionym cyklu prac były produkty z grupy żywności funkcjonalnej, komercyjnie dostępne na rynku polskim, o różnym stopniu złożoności matrycy, tj. soki owocowe [H1], napoje energetyczne [H2], kawy odchudzające [H3], herbaty odchudzające [H4], pieczywo chrupkie żytnie [H5], pieczywo chrupkie

pszenne [H6], herbaty czarne i zielone [H8] oraz kawy mielone i rozpuszczalne [H9]. W przypadku herbat i kaw, badania dodatkowo obejmowały opracowanie i zwalidowanie uproszczonej metody wielopierwiastkowej analizy ich naparów [H10, H11] z detekcją ICP OES i FAAS, polegającej wyłącznie na zakwaszeniu analizowanych naparów. Badania poświęcone analizie pierwiastkowej naparów herbat i kaw [H10, H11] zostały dodatkowo rozszerzone o opracowanie procedury frakcjonowania fizycznego metodą UF i jej zastosowanie do oznaczania form frakcyjnych badanych pierwiastków [H12, H13] oraz oceny ich bioprzyswajalności metodą trawienia enzymatycznego, symulującego w warunkach *in vitro* trawienie żołądkowo-jelitowe [H14, H15]. Informacja na temat składu pierwiastkowego analizowanych kaw i herbat umożliwiła ich klasyfikację i grupowanie z wykorzystaniem wielowymiarowej analizy statystycznej, tj. analizy głównych składowych (ang. *principal component analysis* – PCA), liniowej analizy dyskryminacyjnej (ang. *linear discriminant analysis* – LDA) i hierarchicznej analizy skupień (ang. *hierarchical cluster analysis* – HCA) [H8-H14].

Wybór materiału badawczego podyktowany był z jednej strony dużą popularnością tych produktów w życiu codziennym, z drugiej zaś brakiem rzetelnych informacji na temat ich składu pierwiastkowego i miarodajnych metod oznaczania. Według mojej wiedzy i obszernych studiów literaturowych, po raz pierwszy określiłam całkowitą zawartość wielu ważnych, z punktu widzenia odżywiania i fizjologii człowieka, pierwiastków. Opracowałam także procedurę przygotowania próbek takich produktów żywności funkcjonalnej jak napoje energetyczne [H2], kawy odchudzające [H3] i herbaty odchudzające [H4] do ich szybkiej analizy wielopierwiastkowej metodą ICP OES. Na temat składu mineralnego chleba, w szczególności popularnego ostatnio pieczywa chrupkiego, specjalistyczna literatura opublikowana w kraju i zagranicą [13,14] podaje niewiele informacji. Dlatego też, jako pierwsza, podjęłam się opracowania uproszczonej procedury oznaczania wybranych makro- i mikroelementów oraz pierwiastków śladowych w tego rodzaju produktach [H5, H6]. Znacznie więcej uwagi poświęca się oznaczaniu pierwiastków w sokach owocowych, jednakże tylko w kilku pracach [15-18] dokonano porównania procedur przygotowania tego rodzaju próbek do analizy wielopierwiastkowej metodami spektrometrycznymi czy opracowania uproszczonych metod oznaczania w nich pierwiastków bez konieczności rozkładu. W związku z tym w pełni uzasadnione było kompleksowe porównanie różnych procedur przygotowania próbek soków, w tym z wykorzystaniem rozkładu mokrego i sposobów uproszczonych bez rozkładu wysokotemperaturowego [H1]. Podobnie jak w przypadku soków, tylko nieliczne prace dotyczą opracowania i walidacji nowych, alternatywnych procedur przygotowania herbat i kaw oraz ich zastosowania w analizie wielopierwiastkowej metodami ICP OES i FAAS. Analizą pierwiastkową herbat czarnych i zielonych oraz kaw mielonych i rozpuszczalnych [H8-H14], uwzględniającą opracowanie prostych i szybkich procedur przygotowania tych napojów do oznaczenia całkowitych zawartości wybranych pierwiastków [H8-H11], zajęłam się, jako główny wykonawca, w ramach projektu badawczego pt. *Określenie biodostępności pierwiastków w herbacie*

i kawie z zastosowaniem chromatograficznych i niechromatograficznych metod rozdzielania w połączeniu z metodami atomowej spektrometrii absorpcyjnej i emisyjnej, finansowanego w latach 2014-2017 ze środków Narodowego Centrum Nauki (konkurs Opus 5). Badania te dodatkowo poszerzyłam o ważny aspekt związany z określeniem dostępności/przyswajalności pierwiastków z próbek żywności poprzez określenie form frakcyjnych pierwiastków na drodze specjacji operacyjnej. Należy podkreślić, że informacje na temat specjacji pierwiastków występujących w tych produktach są skąpe lub niespójne, a prace poświęcone tej tematyce należą do rzadkości. W tym celu opracowałam procedurę frakcjonowania fizycznego z zastosowaniem ultrafiltracji membranowej (UF) i określiłam udziały fizycznych frakcji metali różniących się masą cząsteczkową i wielkością [H12, H13], a także wyznaczyłam udział frakcji bioprzyswajalnej pierwiastków na drodze symulacji trawienia-żołądkowo-jelitowego w warunkach *in vitro* [H14, H15]. Ponadto, jako pierwsza, opracowałam i zwalidowałam procedurę przygotowania próbek, po wspomnianym rozkładzie enzymatycznym, do ich analizy pierwiastkowej metodami spektrometrycznymi [H14].

W Tabeli 1 zestawiałam rodzaje analizowanych próbek, oznaczane pierwiastki, zastosowaną metodę pomiarową oraz testowane procedury przygotowania próbek będących podstawą cyklu publikacji [H1-H6, H8-H15]. W każdej z prac przedstawiłam wyznaczone parametry analityczne opracowanej procedury, m.in. precyzję, dokładność i granice wykrywalności (LOD) i/lub oznaczalności (LOQ). Określając precyzję, wyniki przeanalizowałam pod kątem podobieństwa wariancji grup wyników przy użyciu testu *F*-Snedecora-Fishera ($p=0,05$; $F_{krytyczne}=19,00$). Precyzję wyraziłam również jako względne odchylenie standardowe (RSD) w %. Dokładność oceniłam na podstawie statystycznego porównania stężeń pierwiastków oznaczonych po zastosowaniu procedury odniesienia z wynikami uzyskanymi przy użyciu alternatywnych procedur. W przypadku gdy $F_{obliczone} < F_{krytyczne}$, zastosowałam test *t*-Studenta ($p=0,05$; $t_{krytyczne}=2,776$ lub $4,303$). Natomiast gdy $F_{obliczone} > F_{krytyczne}$, użyłam testu Cochran-Coxa ($p=0,05$; $C_{krytyczne}=4,303$). Dla wybranych próbek żywności wykorzystywane uproszczone procedury zweryfikowałam poprzez ich zastosowanie do analizy certyfikowanych materiałów odniesienia (ang. *certified reference material* – CRM) o typie matrycy i poziomach zawartości analitów zbliżonych do składu analizowanych próbek. Dodatkowo w celu określenia dokładności, a także wpływu efektów matrycowych, zastosowałam metodę odzysku (ang. *recovery test*) lub metodę dodatku wzorca (ang. *standard addition method*). Granice wykrywalności i oznaczalności wyznaczyłam z zależności $LOD = 3\sigma/a$ i $LOQ = 10\sigma/a$, gdzie *a* jest współczynnikiem nachylenia krzywej kalibracyjnej, σ – odchyleniem standardowym dla 10 niezależnych pomiarów ślepej próby. Przed oznaczaniem zawartości pierwiastków metodami spektrometrycznymi, roztwory próbek odpowiednio rozcieńczałam i analizowałam, stosując metodę 5- lub 7-punktowych krzywych kalibracyjnych w zakresie stężeń pierwiastków od 0,02 do 5,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Do kalibracji stosowałam również wzorce z dopasowaniem matrycy. Ślepe próby proceduralne (ang. *blank sample*), przygotowywane równoległe z roztworami próbek, umożliwiły eliminację błędów związanych z ewentualnym zanieczyszczeniem próbek, jak i interferencji instrumentalnych.

Tabela 1. Syntetyczne zestawienie zakresu badań będących podstawą cyklu publikacji [H1-H6, H8-H15] z wyszczególnieniem rodzaju próbek, oznaczanych pierwiastków, metody detekcji, testowanych procedur (P) oraz sposobów zapewnienia i kontroli jakości otrzymywanych wyników analiz (QA/QC).

Próbka	Rodzaj próbki	Analit	Metoda pomiarowa	Procedura przygotowania próbki	QA/QC
Soki owocowe [H1]	ciekła 7 soków o różnej klarowności: ananasowy, grapefruitowy, gruszkowy, jabłkowy, pomarańczowy, śliwkowy, winogronowy	Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, P, Pb, Sr, Zn	ICP OES	Całkowita zawartość pierwiastków: (P1) rozkład na mokro w układzie otwartym w stęż. roztworze HNO ₃ i 30% H ₂ O ₂ (P2) rozcieńczenie roztworem HNO ₃ (2%, 1:1) z wirowaniem (P3) rozcieńczenie roztworem HNO ₃ (2%, 1:1) z filtracją (P4) pomiar bezpośredni poprzedzony wirowaniem	<ul style="list-style-type: none"> – względne odchylenie standardowe, RSD (precyzja) – porównanie z procedurą odniesienia (dokładność) – badanie odzysku (dokładność, efekty matrycowe) – granica wykrywalności (LOD) – kalibracja zewnętrzna: metoda serii wzorców
Napoje energetyczne [H2]	ciekła 6 napojów różnych firm	Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, P, Pb, Sr, Zn	ICP OES	Całkowita zawartość pierwiastków: (P1) rozkład na mokro w układzie otwartym w stęż. roztworze HNO ₃ i 30% H ₂ O ₂ (P2) ekstrakcja wodą królewską wspomaganą US (temp. pok. 15 min) (P3) rozcieńczenie roztworem HNO ₃ (2%, 1:1) z wirowaniem	<ul style="list-style-type: none"> – względne odchylenie standardowe, RSD (precyzja) – porównanie z procedurą odniesienia (dokładność) – badanie odzysku (dokładność, efekty matrycowe) – granica wykrywalności (LOD) – kalibracja zewnętrzna: metoda serii wzorców

Tabela 1 cd.

Próbka	Rodzaj próbki	Analit	Metoda pomiarowa	Procedura przygotowania próbki	QA/QC
Kawy odchudzające [H3]	stała 6 kaw typu slim	Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, P, Pb, Sr, Zn	ICP OES	Całkowita zawartość pierwiastków: (P1) rozkład na mokro w układzie zamkniętym wspomagany energią mikrofalową w stęż. roztworze HNO ₃ i 30% H ₂ O ₂ (P2) rozkład na mokro w układzie otwartym w stęż. roztworze HNO ₃ i 30% H ₂ O ₂ (P3) ekstrakcja wodą królewską wspomagana US (temp. pok., 15 min) (P4) ekstrakcja roztworem TMAH (25%, 80 °C, 30 min) (P5) ekstrakcja roztworem HNO ₃ (2%) (P6) ekstrakcja H ₂ O	<ul style="list-style-type: none"> – względne odchylenie standardowe, RSD (precyzja) – porównanie z procedurą odniesienia (dokładność) – badanie odzysku (dokładność, efekty matrycowe) – granica wykrywalności (LOD) – kalibracja zewnętrzna: metoda serii wzorców
Herbaty odchudzające [H4]	stała 6 herbat typu slim	Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, P, Pb, Sr, Zn	ICP OES	Całkowita zawartość pierwiastków: (P1) rozkład na mokro w układzie zamkniętym wspomagany energią mikrofalową w stęż. roztworze HNO ₃ i 30% H ₂ O ₂ (P2) rozkład na mokro w układzie otwartym w stęż. roztworze HNO ₃ i 30% H ₂ O ₂ (P3) ekstrakcja wodą królewską wspomagana US (temp. pok., 15 min) (P4) ekstrakcja roztworem TMAH (25%, 80 °C, 30 min) (P5) ekstrakcja roztworem HNO ₃ (1,0 mol/dm ³) wspomagana US (50 °C, 20 min)	<ul style="list-style-type: none"> – względne odchylenie standardowe, RSD (precyzja) – porównanie z procedurą odniesienia (dokładność) – badanie odzysku (dokładność, efekty matrycowe) – granica wykrywalności (LOD) – kalibracja zewnętrzna: metoda serii wzorców

Tabela 1 cd.

Próbka	Rodzaj próbki	Analit	Metoda pomiarowa	Procedura przygotowania próbki	QA/QC
Pieczywo chrupkie żytnie [H5]	stała 6 pieczyw różnych firm	Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, P, Pb, Sr, Zn	ICP OES	Całkowita zawartość pierwiastków: (P1) rozkład na mokro w układzie zamkniętym wspomagany energią mikrofalową w stęż. roztworze HNO ₃ i 30% H ₂ O ₂ (P2) ekstrakcja wodą królewską wspomagana US (temp. pok., 15 min) (P3) ekstrakcja roztworem TMAH (25%) wspomagana US (30 min) (P4) ekstrakcja roztworem HNO ₃ (3,0 mol/dm ³) wspomagana US (50 °C, 30 min) (P5) ekstrakcja roztworem HCl (3,0 mol/dm ³) wspomagana US (50 °C, 30 min)	<ul style="list-style-type: none"> – względne odchylenie standardowe, RSD (precyzja) – analiza certyfikowanego materiału odniesienia (dokładność) – porównanie z procedurą odniesienia (dokładność) – badanie odzysku (dokładność, efekty matrycowe) – granica wykrywalności (LOD) – kalibracja zewnętrzna: metoda serii wzorców
Pieczywo chrupkie pszenne [H6]	stała 6 pieczyw różnych firm	Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, P, Sr, Zn	ICP OES	Całkowita zawartość pierwiastków: (P1) rozkład na mokro w układzie zamkniętym wspomagany energią mikrofalową w stęż. roztworze HNO ₃ i 30% H ₂ O ₂ (P2) ekstrakcja wodą królewską wspomagana US (temp. pok., 15 min) (P3) ekstrakcja roztworem TMAH (25%) wspomagana US (50 °C, 30 min)	<ul style="list-style-type: none"> – względne odchylenie standardowe, RSD (precyzja) – analiza certyfikowanego materiału odniesienia (dokładność) – porównanie z procedurą odniesienia (dokładność) – badanie odzysku (dokładność, efekty matrycowe) – granica wykrywalności (LOD) – kalibracja zewnętrzna: metoda serii wzorców

Tabela 1 cd.

Próbka	Rodzaj próbki	Analit	Metoda pomiarowa	Procedura przygotowania próbki	QA/QC
Herbaty [H8]	stała 5 herbat czarnych liściastych 5 herbat czarnych torebkowych 5 herbat zielonych liściastych 5 herbat zielonych torebkowych	Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sr, Zn	FAAS ICP OES	Całkowita zawartość pierwiastków: (P1) rozkład na mokro w układzie zamkniętym wspomagany energią mikrofalową w stęż. roztworze HNO ₃ i 30% H ₂ O ₂ (P2) ekstrakcja wodą królewską wspomagana US (temp. pok., 15 min) (P3) ekstrakcja roztworem HCl i HNO ₃ (3:1, 1,0 mol/dm ³) wspomagana US (60 °C, 30 min) (P4) ekstrakcja roztworem HNO ₃ (1,0 mol/dm ³) wspomagana US (60 °C, 30 min) (P5) ekstrakcja roztworem HCl (1,0 mol/dm ³) wspomagana US (60 °C, 30 min)	<ul style="list-style-type: none"> – względne odchylenie standardowe, RSD (precyzja) – analiza certyfikowanego materiału odniesienia (dokładność) – porównanie z procedurą odniesienia (dokładność) – badanie odzysku/metoda dodatku wzorca (dokładność, efekty matrycowe) – granica oznaczalności (LOQ) – kalibracja zewnętrzna: metoda dopasowania matrycy (ICP OES) – kalibracja zewnętrzna: metoda serii wzorców (FAAS)
Kawy [H9]	stała 8 kaw mielonych 10 kaw rozpuszczalnych 2 kawy typu mix	Ca, Fe, K, Mg, Na Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Sr, Zn	FAAS ICP OES	Całkowita zawartość pierwiastków: (P1) rozkład na mokro w układzie zamkniętym wspomagany energią mikrofalową w stęż. roztworze HNO ₃ i 30% H ₂ O ₂ (P2) ekstrakcja wodą królewską wspomagana US (temp. pok., 15 min) (P3) ekstrakcja roztworem HCl i HNO ₃ (3:1, 1,0 mol/dm ³) wspomagana US (60 °C, 30 min) (P4) ekstrakcja roztworem HNO ₃ (1,0 mol/dm ³) wspomagana US (60 °C, 30 min) (P5) ekstrakcja roztworem HCl (1,0 mol/dm ³) wspomagana US (60 °C, 30 min)	<ul style="list-style-type: none"> – względne odchylenie standardowe, RSD (precyzja) – porównanie z procedurą odniesienia (dokładność) – badanie odzysku/metoda dodatku wzorca (dokładność, efekty matrycowe) – granica wykrywalności (LOD) – kalibracja zewnętrzna: metoda dopasowania matrycy (ICP OES) – kalibracja zewnętrzna: metoda serii wzorców (FAAS)

Tabela 1 cd.

Próbka	Rodzaj próbki	Analit	Metoda pomiarowa	Procedura przygotowania próbki	QA/QC
Herbaty [H10]	napary: 5 herbat czarnych liściastych 5 herbat czarnych torebkowych 5 herbat zielonych liściastych 5 herbat zielonych torebkowych	Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sr, Zn	FAAS ICP OES	Całkowita zawartość pierwiastków: (P1) pomiar bezpośredni (P2) zakwaszenie stęż. roztworem HNO ₃ do stężenia 0,25; 0,50; 1,0 mol/dm ³ (P3) zakwaszenie roztworem HCl i HNO ₃ (3:1) do stężenia 0,25; 0,50; 1,0 mol/dm ³ (P4) rozkład na mokro w układzie otwartym w stęż. roztworze HNO ₃ i 30% H ₂ O ₂	<ul style="list-style-type: none"> – względne odchylenie standardowe, RSD (precyzja) – porównanie z procedurą odniesienia (dokładność) – badanie odzysku/metoda dodatku wzorca (dokładność, efekty matrycowe) – granica oznaczalności (LOQ) – kalibracja zewnętrzna: metoda dopasowania matrycy (ICP OES) – kalibracja zewnętrzna: metoda serii wzorców (FAAS)
Kawy [H11]	napary: 8 kaw mielonych 10 kaw rozpuszczalnych 2 kawy typu mix	Ca, Fe, K, Mg, Na Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Sr, Zn	FAAS ICP OES	Całkowita zawartość pierwiastków: (P1) rozkład na mokro w układzie otwartym w stęż. roztworze HNO ₃ i 30% H ₂ O ₂ (P2) pomiar bezpośredni (P3) zakwaszenie stęż. roztworem HNO ₃ do stężenia 0,25; 0,50; 1,0 mol/dm ³ (P4) zakwaszenie roztworem HCl i HNO ₃ (3:1) do stężenia 0,25; 0,50; 1,0 mol/dm ³	<ul style="list-style-type: none"> – względne odchylenie standardowe, RSD (precyzja) – porównanie z procedurą odniesienia (dokładność) – badanie odzysku/metoda dodatku wzorca (dokładność, efekty matrycowe) – granica wykrywalności (LOD) – kalibracja zewnętrzna: metoda dopasowania matrycy (ICP OES) – kalibracja zewnętrzna: metoda serii wzorców (FAAS)

Tabela 1 cd.

Próbka	Rodzaj próbki	Analit	Metoda pomiarowa	Procedura przygotowania próbki	QA/QC
Herbaty [H12]	<p>napary: 5 herbat czarnych liściastych 5 herbat czarnych torebkowych 5 herbat zielonych liściastych 5 herbat zielonych torebkowych</p> <p>ciekła</p>	<p>Ca, Fe, K, Mg, Na</p> <p>Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Sr, Zn</p>	<p>FAAS</p> <p>ICP OES</p>	<p>Fracja fizyczna pierwiastków: (P) zakwaszenie stęż. roztworem HNO₃ do stężenia 0,25 mol/dm³</p>	<ul style="list-style-type: none"> – względne odchylenie standardowe, RSD (precyzja) – badanie odzysku/metoda dodatku wzorca (dokładność, efekty matrycowe) – bilans mas (dokładność) – kalibracja zewnętrzna: metoda dopasowania matrycy (ICP OES) – kalibracja zewnętrzna: metoda serii wzorców (FAAS)
Kawy [H13]	<p>napary: 8 kaw mielonych 10 kaw rozpuszczalnych 2 kawy typu mix</p> <p>ciekła</p>	<p>Ca, K, Mg, Na</p> <p>Al, Ba, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Sr, Zn</p>	<p>FAAS</p> <p>ICP OES</p>	<p>Fracja fizyczna pierwiastków: (P) zakwaszenie stęż. roztworem HNO₃ do stężenia 0,25 mol/dm³</p>	<ul style="list-style-type: none"> – względne odchylenie standardowe, RSD (precyzja) – badanie odzysku/metoda dodatku wzorca (dokładność, efekty matrycowe) – bilans mas (dokładność) – granica wykrywalności (LOD) – granica oznaczalności (LOQ) – kalibracja zewnętrzna: metoda dopasowania matrycy (ICP OES) – kalibracja zewnętrzna: metoda serii wzorców (FAAS)

Tabela 1 cd.

Próbka	Rodzaj próbki	Analit	Metoda pomiarowa	Procedura przygotowania próbki	QA/QC
Kawy [H14]	ciekła napary: 8 kaw mielonych 10 kaw rozpuszczalnych 2 kawy typu mix	Ca, Mg, Al, Ba, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Sr, Zn	FAAS ICP OES	Fracja bioprzyswajalna pierwiastków: (P1) rozkład na mokro w układzie otwartym w stęż. roztworze HNO ₃ (P2) pomiar bezpośredni (P3) zakwaszenie stęż. roztworem HNO ₃ do stężenia 0,25 mol/dm ³	<ul style="list-style-type: none"> – względne odchylenie standardowe, RSD (precyzja) – porównanie z procedurą odniesienia (dokładność) – badanie odzysku/metoda dodatku wzorca (dokładność, efekty matrycowe) – bilans mas: suma udziału frakcji (dokładność) – granica wykrywalności (LOD) – granica oznaczalności (LOQ) – kalibracja zewnętrzna: metoda dopasowania matrycy (ICP OES) – kalibracja zewnętrzna: metoda serii wzorców (FAAS)
Kawy odchudzające [H15]	ciekła 6 kaw odchudzających	Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, P, Sr, Zn	ICP OES	Fracja rozpuszczalna i bioprzyswajalna pierwiastków: (P) pomiar bezpośredni	<ul style="list-style-type: none"> – względne odchylenie standardowe, RSD (precyzja) – kalibracja zewnętrzna: metoda serii wzorców

Badania rozpoczęłam od opracowania szybkiej procedury przygotowania próbek soków owocowych [H1] i napojów energetycznych [H2] do ich analizy wielopierwiastkowej metodą ICP OES. Chociaż analiza tego rodzaju próbek wydaje się być zadaniem łatwym, wprowadzanie ich bezpośrednio do układu pomiarowego jest ograniczone ze względu na złożony skład matrycy organicznej obu rodzaju próbek oraz liczne interferencje fizyczne i chemiczne spowodowane obecnością dużych stężeń licznej grupy związków organicznych, np. monosacharydów. W badaniach tych testowałam trzy alternatywne procedury przygotowania soków owocowych [H1] oraz dwie procedury przygotowania napojów energetycznych [H2] (Tabela 2). Otrzymane rezultaty zestawiałam z wynikami uzyskanymi przy użyciu procedury odniesienia (rozkład na mokro w układzie otwartym z użyciem stężonego roztworu HNO₃ i 30% H₂O₂).

Tabela 2. Wybrane parametry analityczne metody ICP OES w połączeniu z testowanymi procedurami (P) przygotowania soków [H1] i napojów energetycznych [H2] do ich wielopierwiastkowej analizy.

	Procedura przygotowania próbki	RSD, %	Odzysk, %	LOD ^a , ng/cm ³
SOKI OWOCOWE				
P1	rozkład na mokro w układzie otwartym w stęż. roztworze HNO ₃ i 30% H ₂ O ₂	1,7-13	74,2-110	0,12-56
P2	rozcieńczenie roztworem HNO ₃ (2%, 1:1) z wirowaniem	0,63-9,8	95,1-108	0,11-40
P3	rozcieńczenie roztworem HNO ₃ (2%, 1:1) z filtracją	1,3-22	60,0-118	0,13-77
P4	pomiar bezpośredni poprzedzony wirowaniem	1,52-19	60,0-116	0,13-60
NAPOJE ENERGETYCZNE				
P1	rozkład na mokro w układzie otwartym w stęż. roztworze HNO ₃ i 30% H ₂ O ₂	0,49-8,3	98,0-106	0,09-11
P2	ekstrakcja wodą królewską wspomaganą US	0,62-8,9	90,6-118	0,09-12
P3	rozcieńczenie roztworem HNO ₃ (2%, 1:1) z wirowaniem	0,50-7,9	98,6-103	0,08-11

^a zakres granic wykrywalności oznaczanych pierwiastków (z wyłączeniem Ca i P).

Na podstawie analizy statystycznej (test *t*-Studenta, $p=0,05$, $t_{krytyczne}=4,303$) ustaliłam, że spośród wszystkich testowanych procedur przygotowania próbek do pomiaru, wyniki otrzymane po zastosowaniu rozcieńczenia roztworem HNO₃ (2%, 1:1) i wirowania rozcieńczonej próbki, zarówno dla soków owocowych jak i napojów energetycznych, nie różnią się w sposób statystycznie istotny od tych uzyskanych po zastosowaniu procedury odniesienia. W tym przypadku dla wszystkich oznaczanych pierwiastków obliczone wartości testu były niższe od wartości krytycznej testu ($t_{krytyczne}$). Ponadto, używając tej procedury

przygotowawczej, uzyskałam zadawalające odzyski pierwiastków, tj. 95,1-108% i 98,6-103%, i precyzję (RSD), tj. 0,63-9,8% i 0,50-7,9%, odpowiednio dla soków owocowych i napojów energetycznych. Wyniki przedstawione w pracy [H1] pokazują ponadto (Tabela 2), że procedura z rozcieńczeniem próbek roztworem HNO₃ (2%, 1:1) i późniejszej filtracji roztworu rozcieńczonej próbki zamiast wirowania, nie daje miarodajnych wyników oznaczeń Al, Mg, Pb i Sr. Bezpośrednia analiza soków owocowych, mimo wirowania (odseparowanie cząstek stałych), jest bezużyteczna do analizy wielopierwiastkowej soków metodą ICP OES ze względu na znaczne efekty matrycowe. Przeprowadzone badania [H1, H2] potwierdziły, że odpowiednie rozcieńczenie próbek oraz jednocześnie ich zakwaszenie HNO₃ prowadzi do zmniejszenia wpływu składników matrycowych (obecność niewielkiej ilości HNO₃ w roztworze prawdopodobnie jest korzystne dla rozkładu składników organicznych w kanale centralnym plazmy i/lub procesów odparowania aerozolu i atomizacji składników w tymże kanale) oraz powoduje uwolnienie oznaczanych pierwiastków z matrycy (np. poprzez rozpad kompleksów składników matrycy). W tych warunkach możliwe jest miarodajne oznaczenie pierwiastków o różnych energiach wzbudzenia z zastosowaniem kalibracji metodą serii wzorców, tj. bez konieczności stosowania wzorców z dopasowaniem matrycy. Dzięki zastosowaniu uproszczonej procedury przygotowania tego rodzaju próbek uniknęłam konieczności użycia tradycyjnego i czasochłonnego rozkładu na mokro z użyciem stężonego roztworu HNO₃ i 30% H₂O₂. Przyczyniło się to do znacznego skrócenia etapu przygotowania próbek przed analizą i całkowicie wyeliminowało straty analitów na skutek ich lotności oraz możliwość zanieczyszczenia próbek. Powyższą procedurę zastosowałam do analizy wielopierwiastkowej soków owocowych różniących się konsystencją, tj. klarowane, naturalnie mętne i przecierowe, oraz popularnych na polskim rynku napojów energetycznych.

Konsekwencją badań nad opracowaniem uproszczonych procedur przygotowania różnego rodzaju próbek żywności, eliminujących czasochłonny rozkład na mokro, były prace [H3-H6], w których po raz pierwszy opracowałam alternatywną do wspomnianego długotrwałego rozkładu wysokotemperaturowego ze stężonymi odczynnikami procedurę przygotowania próbek kaw i herbat odchudzających [H3, H4] oraz pieczywa chrupkiego żytniego [H5] i pszennego [H6] do ich wielopierwiastkowej analizy metodą ICP OES. Ze względu na bogatą i skomplikowaną matrycę tego rodzaju próbek, a także ich stan skupienia (próbki stałe), najbardziej efektywnym sposobem przygotowania ich do analizy wydaje się być rozkład na mokro w systemie zamkniętym wspomagany energią mikrofalową lub spopielenie (takie procedury są najczęściej opisywane w literaturze fachowej). Niestety, jak wspomniałam wcześniej, metody te są czasochłonne, mogą powodować starty analitów na skutek lotności związków powstających w wysokich temperaturach i/lub zanieczyszczenie próbek ze względu na długotrwałe przetwarzanie. Ponadto nie wpisują się one w nurt tzw. zielonej chemii analitycznej. Dlatego też w badaniach własnych wykorzystałam przyjazną środowisku metodę ekstrakcji w układzie ciało stałe-ciecz (ang. *solid liquid extraction* – SLE), a także ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami

(ang. *ultrasound assisted extraction* – UAE), pozwalającą na szybkie i efektywne wydzielenie analitów z matrycy próbki bez konieczności całkowitego jej rozkładu. Zastosowanie ultradźwięków znacznie upraszcza proces przygotowania próbek, zwiększając szybkość i wydajność ekstrakcji, dzięki interakcji wysokiej częstotliwości fal dźwiękowych z badanym materiałem. W ośrodku poddanym działaniu ultradźwięków powstaje okresowe ciśnienie akustyczne, które wywołuje liczne efekty wtórne, tj. kawitację, tarcie na powierzchniach międzyfazowych i absorpcję energii ultradźwiękowej. Efektem tym towarzyszy wydzielanie się ciepła, co znacznie zwiększa rozpuszczalność składników próbki stałej, dyfuzję i penetrację rozpuszczalnika oraz transport analitów do roztworu. Niedogodnością UAE jest konieczność oddzielenia otrzymanego ekstraktu od pozostałości poekstrakcyjnej [19-21].

W pracach [H3-H6] opisałam różne typowe i alternatywne procedury przygotowania wspomnianych wcześniej próbek, tj. rozkład na mokro w układzie zamkniętym wspomagany energią mikrofalową [H3-H6], rozkład na mokro w układzie otwartym z użyciem stężonego roztworu HNO₃ i 30% H₂O₂ [H3, H4], SLE z użyciem roztworu wodorotlenku tetrametyloamoniowego (TMAH) [H3, H4], roztworu HNO₃ [H3] i H₂O [H3] oraz UAE z użyciem wody królewskiej [H3-H6], roztworu TMAH [H5, H6], roztworu HNO₃ [H4, H5] i roztworu HCl [H5]. Otrzymane wyniki porównałam z tymi uzyskanymi po zastosowaniu procedury odniesienia (prace [H3-H6]) i certyfikowaną zawartością pierwiastków w CRM: Wheat Flour - NIST 1567a (prace [H5, H6]). Wybrane parametry analityczne testowanych procedur przedstawiają Tabele 3 i 4. Jak można zauważyć, pomimo znacznych różnic w składzie matrycy analizowanych próbek, zastosowanie UAE z wodą królewską w temperaturze pokojowej prowadzi do otrzymania wiarygodnych i rzetelnych wyników. Analiza statystyczna (test *t*-Studenta, $p=0,05$, $t_{krytyczne}=4,303$) wykazała, że stężenia wszystkich pierwiastków oznaczonych w kawie i herbacie odchudzającej [H3, H4] oraz pieczywie chrupkim żytnim [H5] i pszennym [H6] po zastosowaniu tej procedury przygotowawczej nie różnią się w sposób statystycznie istotny od tych uzyskanych po zastosowaniu procedury odniesienia (całkowity rozkład matrycy w stężonych odczynnikach utleniających w systemie zamkniętym wspomagany energią mikrofalową). Opracowana procedura umożliwiła również oznaczenie ośmiu pierwiastków (Ca, Cd, Cu, Fe, Mg, Mn, P i Zn) w materiale CRM [H5, H6], których stężenia były zgodne z wartościami certyfikowanymi.

Tabela 3. Wybrane parametry analityczne metody ICP OES w połączeniu z testowanymi procedurami (P) przygotowania kaw [H3] i herbat odchudzających [H4] do ich wielopierwiastkowej analizy.

	Procedura przygotowania próbki	RSD, %	Odzysk, %	LOD ^a , ng/cm ³	test <i>t</i> -Studenta ^b
KAWY ODCHUDZAJĄCE					
P1	rozkład na mokro w układzie zamkniętym wspomagany energią mikrofalową w stęż. roztworze HNO ₃ i 30% H ₂ O ₂	1,2-5,9	96,5-106	0,16-33 (88)	-
P2	rozkład na mokro w układzie otwartym w stęż. roztworze HNO ₃ i 30% H ₂ O ₂	1,7-6,4	93,7-108	0,17-34 (96)	13/13
P3	UAE: woda królewska	0,6-5,0	97,9-104	0,13-33 (87)	13/13
P4	SLE: roztwór TMAH	2,2-6,4	88,9-123	0,20-62 (100)	6/13
P5	SLE: roztwór HNO ₃	1,7-8,3	79,1-105	0,23-35 (83)	5/13
P6	SLE: H ₂ O	1,9-11	84,7-116	0,95-55 (134)	5/13
HERBATY ODCHUDZAJĄCE					
P1	rozkład na mokro w układzie zamkniętym wspomagany energią mikrofalową w stęż. roztworze HNO ₃ i 30% H ₂ O ₂	0,88-3,8	95,8-108	0,14-31 (102)	-
P2	rozkład na mokro w układzie otwartym w stęż. roztworze HNO ₃ i 30% H ₂ O ₂	1,8-4,1	88,5-118	0,16-33 (108)	13/13
P3	UAE: woda królewska	0,64-3,0	98,7-105	0,15-31 (98)	13/13
P4	SLE: roztwór TMAH	1,8-7,1	76,7-137	0,19-38 (99)	3/13
P5	UAE: roztwór HNO ₃	1,8-9,1	71,3-121	0,38-38 (111)	0/13

^a w nawiasie granica wykrywalności dla P;

^b liczba pierwiastków, dla których $t_{\text{obliczone}} < t_{\text{krytyczne}}$ (test *t*-Studenta) w przypadku porównania oznaczonych stężeń z użyciem danej procedury przygotowawczej i procedury odniesienia/ do całkowitej liczby pierwiastków oznaczanych.

Tabela 4. Wybrane parametry analityczne metody ICP OES w połączeniu z testowanymi procedurami przygotowania pieczywa żytniego [H5] do jego wielopierwiastkowej analizy.

	Procedura przygotowania próbki	RSD, %	Odzysk, %	LOD ^a , ng/cm ³	CRM ^b
P1	rozkład na mokro w układzie zamkniętym wspomagany energią mikrofalową w stęż. roztworze HNO ₃ i 30% H ₂ O ₂	0,60-5,6	97,0-106	0,16-31 (129)	8/8
P2	UAE: woda królewska	0,40-5,0	99,1-103	0,12-31 (126)	8/8
P3	UAE: roztwór TMAH	0,60-15	95,7-110	0,20-55 (183)	5/8
P4	UAE: roztwór HNO ₃	2,3-13	76,6-117	0,26-37 (143)	1/8
P5	UAE: roztwór HCl	2,7-20	74,7-114	0,15-37 (150)	0/8

^a w nawiasie granica wykrywalności dla P;

^b ilość pierwiastków zgodnych z wartością certyfikowaną/ilość pierwiastków z certyfikowaną zawartością analitu.

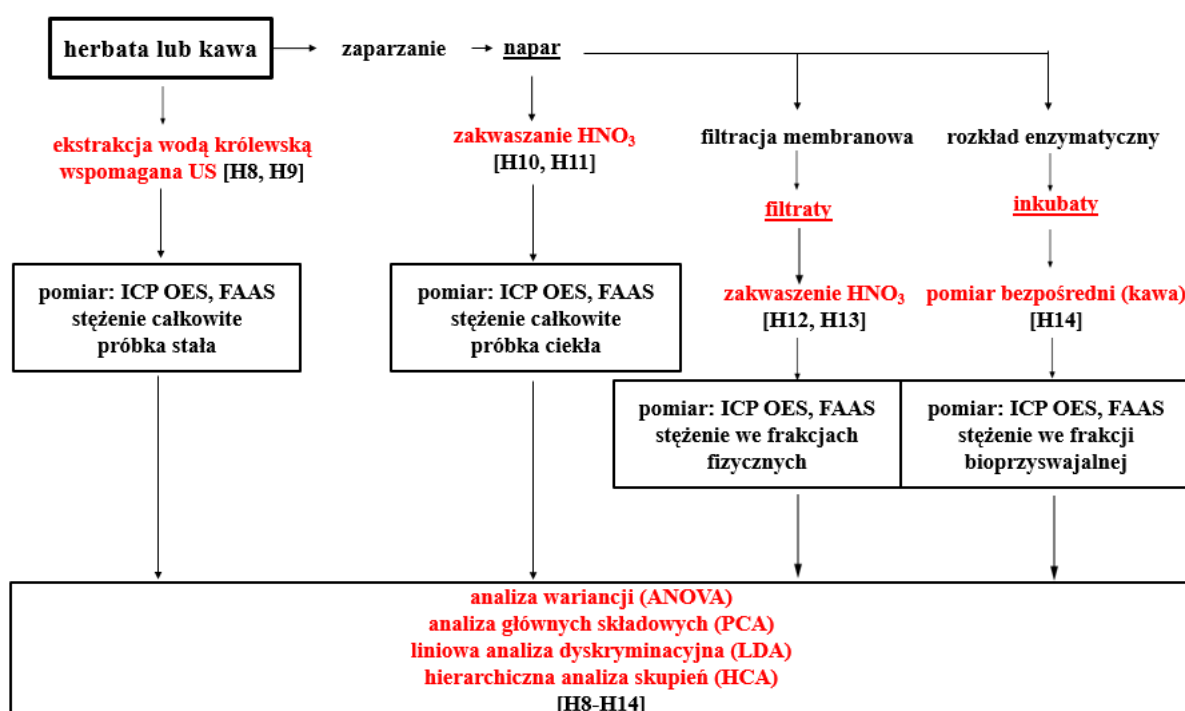
Ponadto dla procedury tej osiągnęłam ilościowe odzyski, co świadczy o braku wpływu efektów matrycowych. Dla wszystkich oznaczanych pierwiastków stosunek nachylenia krzywych kalibracji ($a_{\text{dod.}}/a_{\text{zew.}}$) otrzymanych dla metody dodatku wzorca ($a_{\text{dod.}}$) i metody serii wzorców ($a_{\text{zew.}}$) zawierał się w przedziale 0,97-1,04 [H4], co potwierdza brak wpływu efektów matrycowych lub znaczne ich ograniczenie. Dzięki temu możliwe było oznaczenie pierwiastków z zastosowaniem kalibracji metodą serii wzorców, znacznie przyspieszającej i upraszczającej przebieg całej analizy. Co więcej, uzyskano w większości przypadków granice wykrywalności równe lub niższe od tych z zastosowaniem procedury odniesienia, tj. wysokotemperaturowego rozkładu na mokro. Powszechnie wiadomo, że zastosowanie ultradźwięków przyspiesza i zwiększa efektywność procesu ekstrakcji, jednakże ze względu na dokładność i precyzję uzyskiwanych wyników ważny jest dobór odpowiedniego ekstrahenta. Woda królewska dzięki swoim właściwościom utleniającym i kompleksującym powoduje częściowy rozkład matrycy i ilościowe uwalnianie z niej analitów. W przypadku pozostałych testowanych procedur (SLE i/lub UAE z roztworami TMAH, HNO₃ i HCl lub tylko H₂O) oznaczone stężenia dla większości pierwiastków różnią się w sposób statystycznie istotny od wartości uzyskanych po zastosowaniu procedury odniesienia. Dodatkowo dla procedur tych precyzja pomiarów metodą ICP OES była znacznie niższa od wyznaczonej dla procedury odniesienia i UAE z wodą królewską, a odzysk dla badanych pierwiastków był nieilościowy, co wskazuje na wpływ składników matrycy na wyniki oznaczeń.

Wartością naukową badań opisanych w pracach [H3-H6] jest propozycja relatywnie szybkiej, prostej i niedrożej, w porównaniu do rozkładu na mokro, procedury przygotowania różnego rodzaju próbek do pomiaru stężeń wielu pierwiastków, tj. Ca, Mg, P, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sr i Zn metodą ICP OES. Opracowana procedura przygotowawcza pozwala efektywnie oddzielić anality od matrycy próbki przy użyciu mniejszej ilości odczynników (2 cm³), a także znacznie skrócić czas analizy, co jest szczególnie ważne w przypadku rutynowych analiz dużej ilości próbek celem np. weryfikacji jakości i bezpieczeństwa badanych produktów żywnościowych.

Zainteresowanie tematyką spektrochemicznej analizy wielopierwiastkowej liści herbaty *Camellia sinensis* i jej naparów skłoniło mnie do napisania pracy przeglądowej [H7], w której omówiłam różne aspekty tego rodzaju analizy, w szczególności znaczenie etapu przygotowania próbek do pomiaru różnymi metodami spektrometrycznymi. W pracy przedstawiłam również i przedyskutowałam sposoby zapewnienia jakości otrzymywanych wyników analizy oraz przykłady zastosowania informacji o składzie pierwiastkowym herbat do ich klasyfikacji i grupowania z wykorzystaniem wielowymiarowej analizy statystycznej. Wspomniany przegląd literaturowy dobitnie wykazał, że tylko nieliczne prace dotyczą porównania procedur przygotowania próbek herbaty i jej naparów do ich analizy spektrochemicznej i opracowania nowych, uproszczonych metod ich analizy. Przeważająca liczba prac koncentruje się na oznaczaniu wyłącznie całkowitej zawartości pierwiastków po uprzednim rozkładzie na sucho lub na mokro analizowanych próbek [12,22-26]. Napary roztwarzane są w podobny sposób jak próbki stałe [27,28] lub mogą być analizowane

bezpośrednio po uprzednim rozcieńczeniu wodą [29,30] lub dodatkowym zakwaszeniu [3,31]. Wyżej wymieniona praca przeglądowa, a także inne przeglądy literaturowe nt. specjacji i frakcjonowania pierwiastków w naparach herbat [32] i analizy pierwiastkowej kaw i jej naparów [2] wskazywały, że dotychczasowa wiedza na temat form specjacyjnych i frakcyjnych pierwiastków w herbacie i kawie jest znikoma.

Opracowanie prostych metod analitycznych, umożliwiających szybkie oznaczenie stężeń całkowitych wielu pierwiastków w próbkach herbat i kaw metodami ICP OES i FAAS bez konieczności rozkładu tych próbek oraz pozyskanie informacji o formach frakcyjnych tych pierwiastków i ich biodostępności/bioprzyswajalności było tematem projektu pt. *Określenia biodostępności pierwiastków w herbacie i kawie z zastosowaniem chromatograficznych i niechromatograficznych metod rozdzielania w połączeniu z metodami atomowej spektrometrii absorpcyjnej i emisyjnej*, który został sfinansowany przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu Opus 5. Będąc głównym wykonawcą tego projektu i współpracując z prof. dr hab. inż. Pawłem Pohlem (kierownik projektu) oraz dr inż. Mają Welną (drugi główny wykonawca), przeprowadziłam kompleksową analizę herbat (czarne i zielone) i kaw (mielone i rozpuszczalne) według schematu (Rysunek 1).



Rysunek 1. Schemat kompleksowej analizy herbat (czarne, zielone) oraz kaw (mielone, rozpuszczalne). Na czerwono zaznaczyłam etapy badań uznane za nowatorskie.

W ramach prowadzonych badań projektowych opracowałam szereg metodologii dotyczących postępowania analitycznego w wielopierwiastkowej analizie różnego rodzaju herbat i kaw. Oznaczone stężenia różnych pierwiastków w analizowanych herbatach i kawach posłużyły mi również do ich klasyfikacji i grupowania z zastosowaniem metod

rozpoznawania wzorców (ang. *pattern recognition methods*) tj. PCA, HCA i LDA. Skład pierwiastkowy produktów żywnościowych jest bardziej stabilny niż zawarte w nich związki organiczne i najczęściej niezależny od warunków przechowywania, w związku z tym stężenia pierwiastków stanowią unikalną informację, która jest przydatna do oceny statystycznej przy użyciu wyżej wymienionych metod. Zmiany stężenia niektórych metali, np. Al, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, w różnych gatunkach herbaty i kawy są ściśle związane z określonymi warunkami środowiskowymi i rolniczymi występującymi na obszarze danej plantacji. Co więcej zawartość np. Al. czy Mn jest szczególnie przydatna do celów taksonomicznych, ponieważ metale te są preferencyjnie gromadzone przez rośliny [H7,22,33].

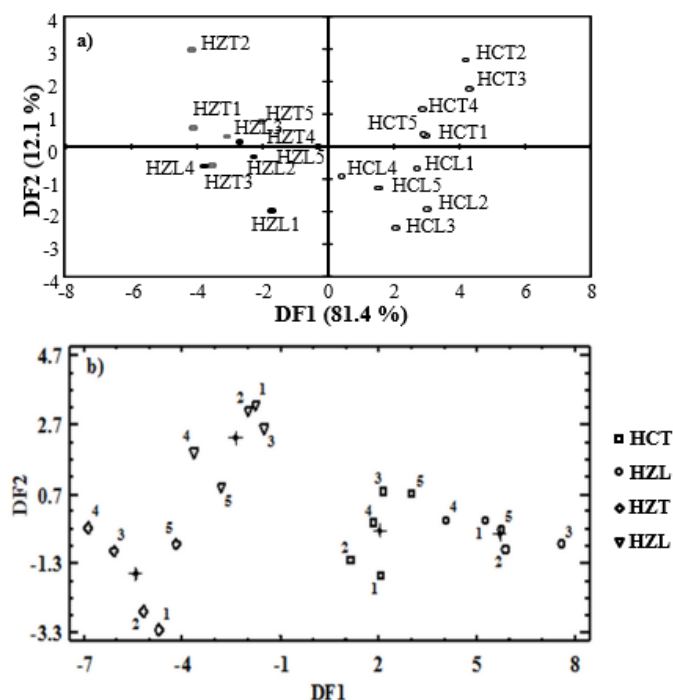
Analogicznie jak we wcześniejszych pracach, w pierwszym etapie badań skupiłam się na opracowaniu prostej i szybkiej procedury przygotowania herbat [H8] i kaw [H9] do oznaczania całkowitych stężeń pierwiastków (Al, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr i Zn) metodami ICP OES i FAAS. Procedurą odniesienia był rozkład na mokro w układzie zamkniętym wspomagany energią mikrofalową, natomiast testowanymi procedurami alternatywnymi były UAE z wodą królewską w temperaturze pokojowej oraz UAE w temperaturze 60 °C z użyciem 1,0 mol/dm³ roztworów mieszaniny kwasów HCl i HNO₃ (3:1), HNO₃ lub HCl. Prace [H8] i [H9] pokazują, że UAE z wodą królewską w temperaturze pokojowej, podobnie jak w przypadku prac [H3-H6], jest uniwersalną procedurą przygotowania próbek o różnym stopniu złożenia matrycy. Na podstawie analizy statystycznej wykazałam, że wyniki pomiarów stężenia pierwiastków otrzymanych przy zastosowaniu tej alternatywnej procedury przygotowawczej nie różnią się w sposób statystycznie istotny od wyników uzyskanych przy zastosowaniu procedury odniesienia. Dokładność zastosowanej procedury odniesienia zweryfikowałam analizując certyfikowany materiał odniesienia: Tea Leaves (INCT-TL-1). Ustaliłam również, że w przypadku wyników pomiarów roztworów próbek przygotowanych przy użyciu UAE z wodą królewską w temperaturze pokojowej metodami ICP OES i FAAS nie było statystycznie istotnych różnic pomiędzy współczynnikami kierunkowymi krzywych kalibracyjnych uzyskanych przy użyciu metody serii prostych wzorców i wzorców z dopasowaniem matrycy. Stąd też, dla uproszczenia tego etapu analizy, oznaczenia stężeń analizowanych pierwiastków w naparach próbek przeprowadziłam przy użyciu metody serii prostych wzorców. W przypadku herbat [H8] zaproponowana procedura analityczna charakteryzuje się dobrymi parametrami analitycznymi, tj. precyzją w przedziale 0,2-8,9% i dokładnością od -9,9 do +1,2%. Odzysk pierwiastków mieścił się w zakresie od 98,1 do 104%. Granice oznaczalności pierwiastków wynosiły: 0,1-2,4 ng/cm³ (Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Sr i Zn), 5,1-25 ng/cm³ (Al, K, Mg Mn, Na i Pb) i 75-120 ng/cm³ (Ca i Fe). Podobnie jak w przypadku herbat, zastosowanie zaproponowanej alternatywnej procedury (UAE z wodą królewską w temperaturze pokojowej) do przygotowania próbek kaw [H9] pozwoliło uzyskać satysfakcjonujące parametry walidacyjne, tj. precyzję w przedziale 0,5-8,6%, dokładność od -4,7 do +1,9% i odzysk w zakresie 93,5-103%. Granice wykrywalności pierwiastków wyniosły od

0,086 ng/cm³ (Sr) do 40 ng/cm³ (Fe). Zaobserwowałam także, że użyta alternatywna procedura przygotowawcza, znacznie obniża wartości ślepej próby. Opracowaną procedurę zastosowałam do wielopierwiastkowej analizy 20 różnych herbat torebkowych i liściastych, a także 18 kaw mielonych i rozpuszczalnych dostępnych na rynku polskim. W przypadku pozostałych procedur przygotowania próbek herbat i kaw, otrzymane wyniki dla większości pierwiastków różnią się w sposób statystycznie istotny od stężeń pierwiastków oznaczonych przy użyciu procedury odniesienia. Wyniki testu odzysku pokrywają się z wynikami statystycznego porównania średnich stężeń pierwiastków oznaczonych po zastosowaniu wyżej wymienionych procedur. Dla większości pierwiastków odzyski te są niższe niż 90%, a nawet 80%. Zastosowanie UAE z rozcieńczonymi roztworami kwasów nie powoduje ilościowego uwolnienia analitów z matrycy próbek herbat i kaw i/lub nie prowadzi do zmniejszenia wpływu składników matrycowych w trakcie oznaczeń pierwiastków metodami ICP OES i FAAS.

Kolejnym etapem badań było opracowanie uproszczonej procedury przygotowania naparów herbat [H10] i kaw [H11] do ich analizy wielopierwiastkowej metodami ICP OES i FAAS. Sprawdziłam przydatność trzech różnych procedur, w tym analizę bezpośrednią (bez etapu przygotowania), jak również zakwaszanie stężonym roztworem HNO₃ lub mieszaniną HCl i HNO₃ (3:1) do stężenia 0,25, 0,50 i 1,0 mol/dm³. Jako procedurę odniesienia użyłam rozkładu na mokro w stężonym roztworze HNO₃ i 30% H₂O₂ w układzie otwartym. Warto w tym miejscu podkreślić, że wyniki takiego porównania procedur przygotowywania naparów herbat i kaw nigdy wcześniej nie były opisane w literaturze fachowej. Wykazałam, że zarówno dla naparów herbat jak i kaw procedura polegająca wyłącznie na zakwaszeniu stężonym roztworem HNO₃ do stężenia 0,25 mol/dm³ dawała pełną zgodność uzyskiwanych wyników z tymi otrzymanymi przy użyciu procedury odniesienia, jak również satysfakcjonujące wartości parametrów walidacyjnych obu metod detekcji, tj. ICP OES i FAAS. Zastosowanie tej procedury przygotowania naparów herbat do ich analizy metodą ICP OES (Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sr, Zn) i FAAS (Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na) pozwoliło uzyskać granice wykrywalności pierwiastków w zakresie 0,03-4,0 ng/cm³ (ICP OES) i 3,3-36 ng/cm³ (FAAS), precyzję w granicach 0,2-6,9% i dokładność w przedziale -1,4 do +5,0%. W przypadku analizy naparów kaw wartości te były porównywalne i wynosiły: granice wykrywalności między 0,04-1,6 ng/cm³ (ICP OES) i 3,3-36 ng/cm³ (FAAS), precyzja w zakresie 0,2-8,7% i dokładność od -7,9 do +4,0%. Zaproponowana procedura jest bardzo prosta, szybka, ogranicza do minimum etap przygotowania próbki i w pełni eliminuje ewentualne straty oznaczanych pierwiastków i możliwe zanieczyszczenie próbek. Zastosowanie wspomnianej procedury przygotowawczej prowadzi do ograniczenia efektów matrycowych na skutek częściowego rozkładu matrycy organicznej analizowanych próbek, jest również wystarczająca do ilościowego uwolnienia analitów z tej matrycy, co umożliwia ich rzetelny i wolny od interferencji fizycznych i chemicznych pomiar spektrometryczny zarówno metodą ICP OES jak i FAAS. Zaproponowana procedura jest bardzo dobrą alternatywą dla czasochłonnych

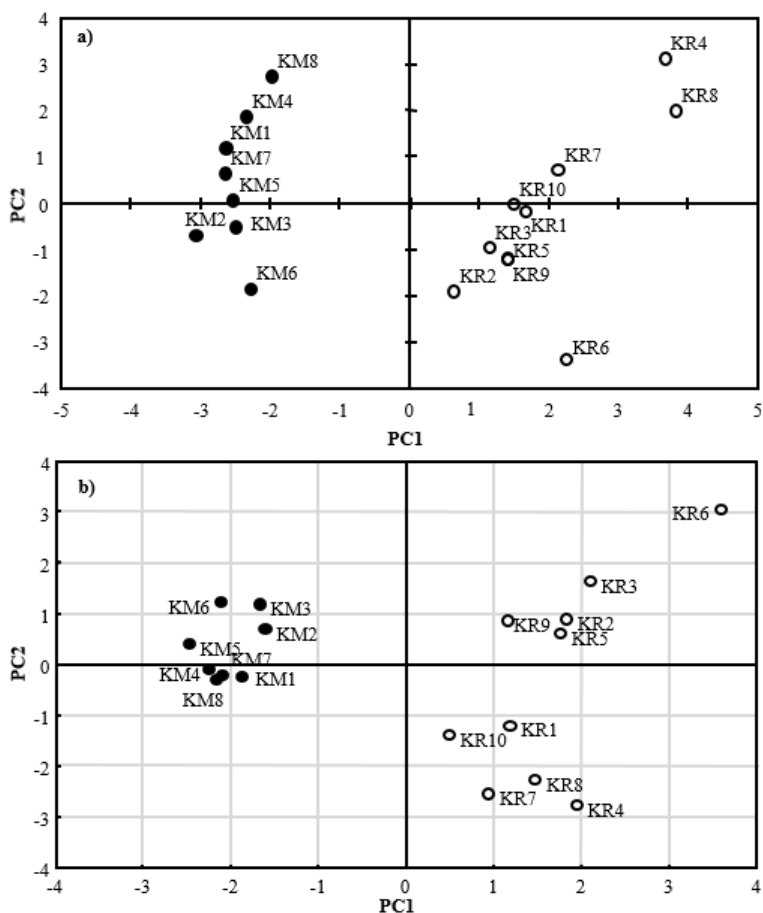
i pracochłonnych wysokotemperaturowych rozkładów na mokro i z powodzeniem może być stosowana do seryjnych analiz tego rodzaju próbek. Analiza statystyczna wyników otrzymanych dla innych testowanych procedur, w tym zakwaszenia HNO_3 do stężenia 0,50 i 1,0 mol/dm³ lub mieszaniną HCl i HNO_3 (3:1) do stężenia 0,25, 0,50 i 1,0 mol/dm³ oraz analizy bezpośredniej wykazała, że zastosowanie ich do przygotowania naparów herbat jak i kaw, daje w wielu przypadkach wyniki statystycznie różniące się od tych uzyskanych z zastosowaniem procedury odniesienia. Prawdopodobnie związane to jest z występującymi interferencjami fizycznymi; większe stężenie kwasu w próbce może powodować zmianę gęstości roztworu. W przypadku zastosowania analizy bezpośredniej, duży wpływ na otrzymane wyniki mają błędy systematyczne związane ze składnikami matrycy próbki.

Oznaczone stężenia pierwiastków w 20 różnych herbatach wykorzystałam do ich klasyfikacji i grupowania (ze względu na rodzaj: zielona, czarna i typ: liściasta, torebkowa) używając metody PCA i LDA. Metoda PCA wykazała, że dla próbek stałych stężenia Al, Ba, Fe, Mn i Ni są zmiennymi o największym udziale w pierwszej głównej składowej (PC1), natomiast stężenia Cr, K, Mg i Sr są zmiennymi o największym udziale w drugiej głównej składowej (PC2). Dla naparów tylko stężenia Al, Ba, Cr, Mn i Sr mają najwyższą moc dyskryminacji. Niemniej jednak nie zaobserwowałam wyraźnego rozdzielania pomiędzy czterema rodzajami analizowanych herbat. Ponieważ PCA nie doprowadziło do jednoznacznej klasyfikacji herbat, zastosowałam metodę LDA w celu sprawdzenia możliwości ich zróżnicowania pod tym względem. Jak widać na Rysunku 2, stężenia Al, Ba, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na i Sr (próbki stałe) i stężenia Ba, Ca, Mg, Mn, Sr i Zn (napary) umożliwiają rozróżnienie rodzajów herbat z wydajnością odpowiednio 95,0% i 98,8%.



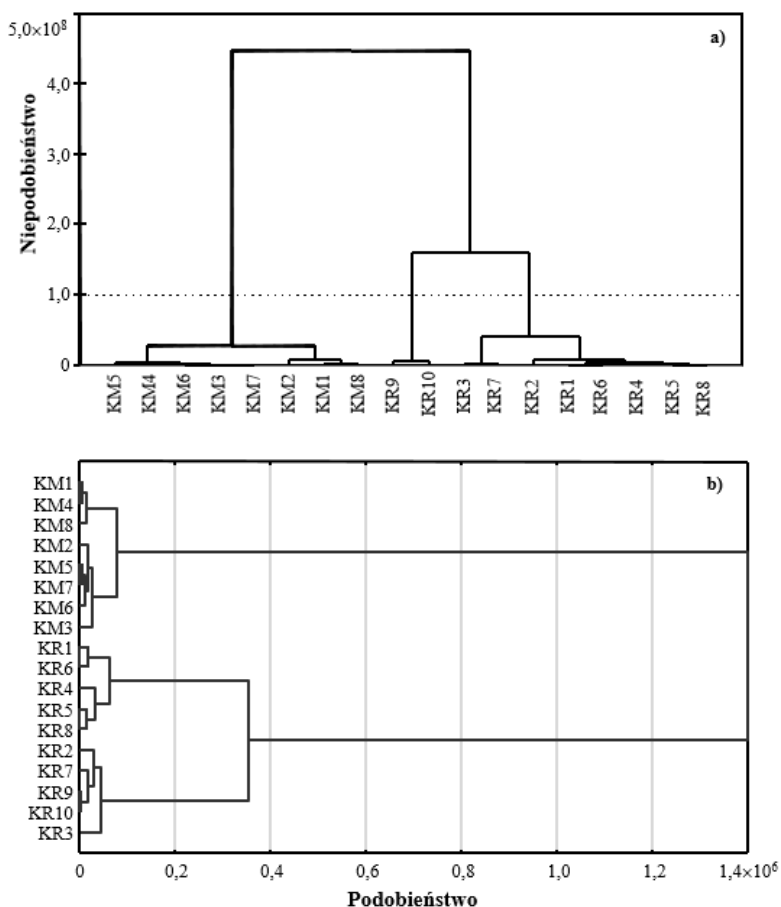
Rysunek 2. Wykres punktowy funkcji dyskryminacyjnych DF1 względem DF2: (a) próbki stałe, (b) napary [H8, H10]. HCT – herbata czarna torebkowa, HCL – herbata czarna liściasta, HZT – herbata zielona torebkowa, HZL – herbata zielona liściasta.

W przypadku kaw mielonych i rozpuszczalnych (18 kaw) stężeń oznaczonych pierwiastków użyłam jako zmiennych do ich grupowania metodami PCA i HCA. PCA wykazała, że zmiennymi o największym udziale w PC1 są stężenia Ca, Cu, K, Mg i Sr w próbkach stałych i Ca, K i Mg w naparach, natomiast w przypadku PC2 - stężenia Al, Ba i Mn (próbki stałe) i Al, Co, Mn i Ni (napary). Jak widać na Rysunku 3 osiągnięto satysfakcjonujące rozdzielenie i rozróżnienie obu rodzajów kaw. Wszystkie próbki kaw mielonych miały ujemne wartości PC1 (od -3,1 do -2,0 – próbki stałe) i (-2,05 do -1,58 – napary), podczas gdy wszystkie kawy rozpuszczalne miały dodatnie wartości PC1 (od 0,7 do 3,9 – próbki stałe) i (od 0,50 do 3,52 – napary).



Rysunek 3. Wykres PC1 względem PC2 dla badanych kaw mielonych (KM) i rozpuszczalnych (KR): (a) próbki stałe, (b) napary [H9, H11].

Dodatkowo do badanych próbek zastosowałam metodę HCA używając stężeń Ca, Cu, K, Mg i Sr (próbek stałe) i Al, Ca, Co, K, Mg, Mn i Ni (napary) jako zmiennych. Powstałe dendrogramy przedstawia Rysunku 4. Jak można zauważyć, stosując stężenia oznaczonych pierwiastków w próbkach stałych jak i ich naparach, otrzymano 2 dobrze rozdzielone skupiska (klastry) główne, odpowiadające obu badanym rodzajom kaw.



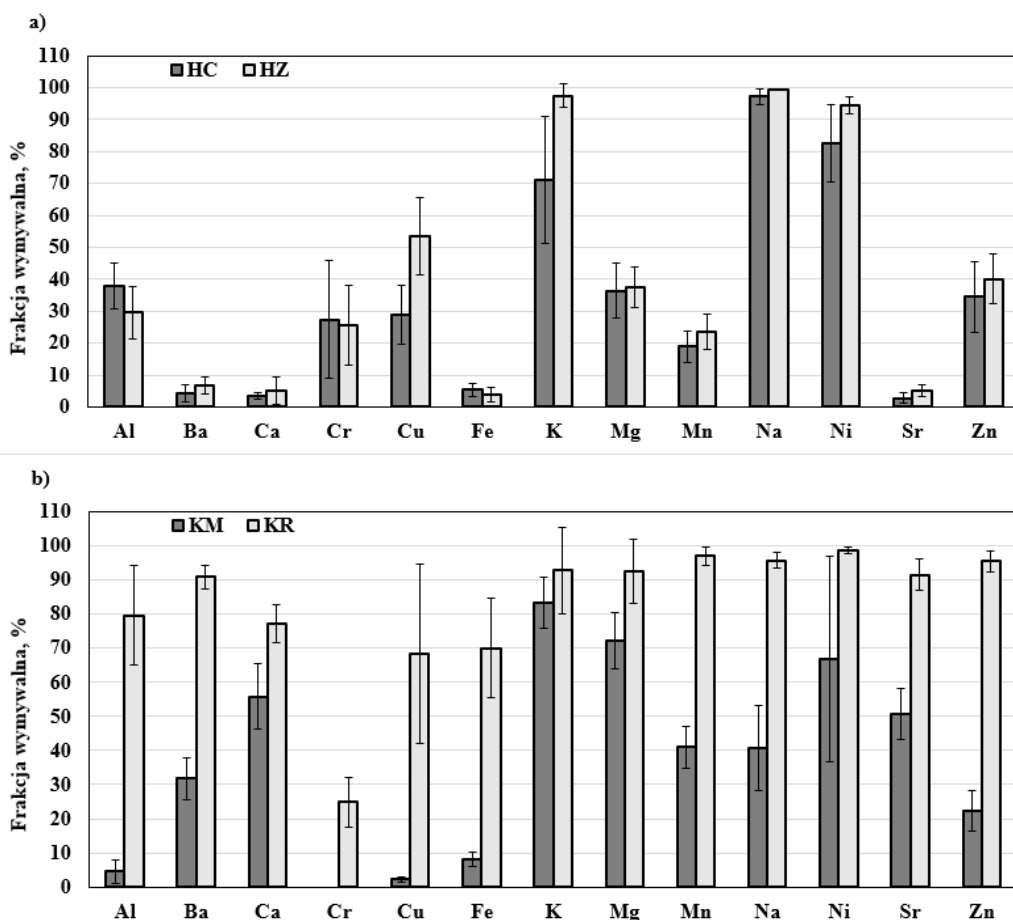
Rysunek 4. Diagram hierarchicznego drzewa dla: (a) próbek stałych, (b) naparów kaw (mielone – KM, rozpuszczalne – KR) [H9, H11].

Podsumowując, najważniejszym osiągnięciem badań opisanych w cyklu prac [H8-H11] było opracowanie i zwalidowanie uproszczonych procedur przygotowania próbek różnego rodzaju herbat i kaw, stanowiących alternatywę do powszechnie stosowanych, opisanych w literaturze fachowej, długotrwałych i żmudnych rozkładów na mokro. Wykazałam, że UAE z wodą królewską w temperaturze pokojowej (próbki stałe herbat i kaw) oraz zakwaszanie stężonym roztworem HNO_3 do stężenia $0,25 \text{ mol/dm}^3$ (napary herbat i kaw) mogą być z powodzeniem zastosowane na etapie przygotowania tego rodzaju próbek do pomiarów całkowitych zawartości pierwiastków metodami ICP OES i FAAS, co ma szczególne znaczenie w przypadku wykonywania rutynowych analiz. Całkowite stężenia oznaczonych pierwiastków w herbatkach i kawach (próbka stała), a także w ich naparach posłużyły mi do wstępnej klasyfikacji i grupowania tych produktów na drodze wielowymiarowej analizy statystycznej.

Bardzo często na podstawie wyników analizy pierwiastkowej określa się wartość odżywczą produktów żywnościowych oraz oszacowuje, w jakim stopniu spożycie tych produktów pokrywa dzienne zapotrzebowanie na niezbędne pierwiastki lub prowadzi do przekroczenia dawek dopuszczalnych dla pierwiastków toksycznych przy założeniu jednak, że pierwiastki te są w 100% dostępne i przyswajalne przez organizm w trakcie trawienia

wewnątrzustrojowego. Biorąc pod uwagę specjację pierwiastków, takie podejście nie jest uzasadnione, ponieważ ich bioprzyswajalność zależy od form fizykochemicznych w jakich występują w żywności, a rzeczywisty wpływ składu pierwiastkowego na zdrowie człowieka może być odmienny od tego na jaki wskazują stężenia całkowite [34,35]. Obecność różnych form specjacyjnych pierwiastków, tj. prostych jonów, jonów kompleksowych z małowartościowymi ligandami nieorganicznymi oraz średnio- i wielkowartościowymi ligandami organicznymi o różnej trwałości, znacząco wpływa na stopień ich przechodzenia z suszu herbacianego czy mielonych ziaren kawy do naparów, a tym samym na przyswajalność przez organizm ludzki [34,36,37]. Ponieważ bezpośrednio oznaczanie poszczególnych form specjacyjnych pierwiastków (tzw. specjacja właściwa) może być trudne z uwagi na ich dużą liczbę oraz brak odpowiednich wzorców, istotną informację o formach specjacyjnych pierwiastków w naparach herbaty i kawy można uzyskać przy zastosowaniu rozwiązania alternatywnego, tzw. specjacji operacyjnej (frakcjonowania), polegającej na określeniu oraz oznaczeniu grup związków pierwiastków o zbliżonych właściwościach fizykochemicznych. Niestety problem specjacji pierwiastków w naparach kawy i herbaty nie jest dobrze rozpoznany. W literaturze dostępne są tylko dwie prace naukowe dotyczące chemicznego i fizycznego frakcjonowania Mn w naparach kawy mielonej przy użyciu ekstrakcji do fazy stałej (SPE) i ultrafiltracji [38] oraz chemicznego frakcjonowania Ca, Fe, Mg i Mn w kawie rozpuszczalnej przy użyciu metody SPE [39]. W przypadku herbat większość badań dotyczy specjacji Al [40-44].

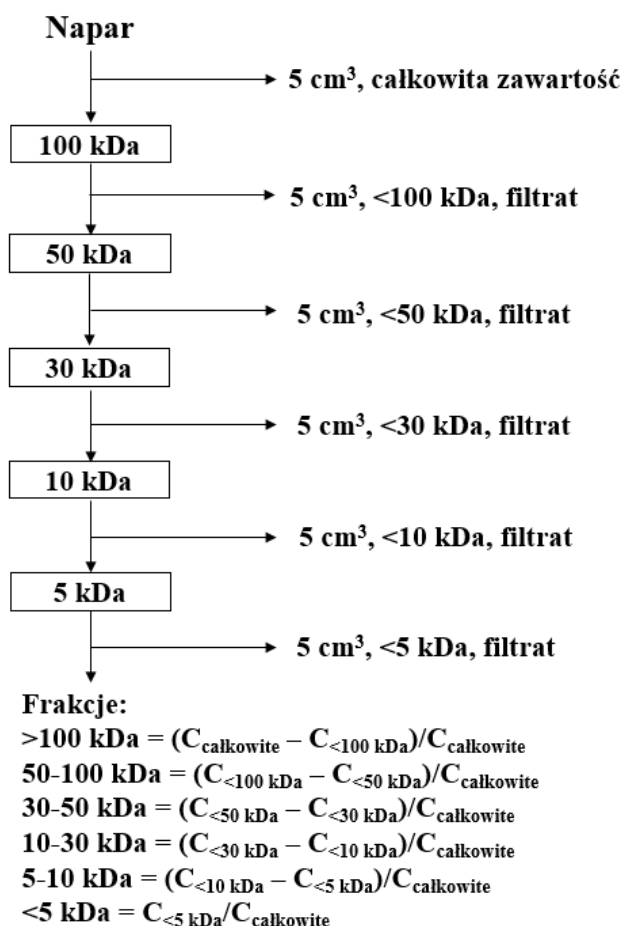
Na podstawie oznaczonych stężeń pierwiastków w naparach herbat [H10] i kaw [H11] wyznaczyłam wstępnie zawartość frakcji wymywalnej (%), która daje bezpośrednią informację o stopniu związania metali z matrycą próbki i pozwala na oszacowanie „potencjalnej” dostępności pierwiastków. Jak widać na Rysunku 5a najlepiej ekstrahowalnymi (70-100%) metalami z suszu herbat czarnych są K, Na i Ni. W stopniu umiarkowanym (25-40%) ekstrahowane są do naparów Al, Cr, Cu, Mg i Zn. Do najslabiej (<5%) ekstrahowalnych pierwiastków należą Ba, Ca, Fe i Sr, prawdopodobnie dlatego, że matryca herbat czarnych silnie wiąże te metale lub ich związki w indywidua bardzo słabo rozpuszczalne w wodzie. W przypadku naparów herbat zielonych, skuteczność ekstrakcji badanych metali była relatywnie wyższa i podobnie jak w przypadku herbat czarnych, wysoko ekstrahowalnymi metalami są K, Na i Ni, umiarkowanie: Al, Cr, Cu, Mg, Mn i Zn, a najslabiej Ba, Ca, Fe i Sr. Dla naparów kaw rozpuszczalnych (Rysunek 5b), stopień ekstrakcji metali, poza Cr (30%), był wysoki i wynosił 68-80% (Al, Ca, Co, Cu, Fe) i 91-99% (Ba, K, Mg, Mn, Na, Ni, Sr i Zn). Znacznie niższe udziały frakcji wymywalnej pierwiastków otrzymano dla naparów kaw mielonych: 67-85% (K, Mg, Ni), 20-55% (Ba, Ca, Mn, Na, Sr, Zn) i <10% (Al, Cu, Fe). Wskazuje to na potencjalnie większą biodostępność pierwiastków z naparów kaw rozpuszczalnych niż z kaw mielonych, co prawdopodobnie jest związane ze zmianami, jakim poddawane są ziarna kawy podczas procesu produkcyjnego.



Rysunek 5. Średni udział frakcji wymywalnej (w %) oznaczanych metali w naparach: (a) herbat (czarne – HC, zielone – HZ) i (b) kaw (mielone – KM, rozpuszczalne – KR).

W dalszych badaniach opracowałam procedurę frakcjonowania fizycznego wybranych pierwiastków (Al, Ba, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Sr i Zn) w naparach herbat czarnych i zielonych [H12] oraz kaw mielonych i rozpuszczalnych [H13], polegającą na szeregowej filtracji membranowej (UF) tych naparów przez membrany o malejącej odciętej mas, tj. 100, 50, 30, 10 i 5 kDa, wraz z oznaczaniem stężeń pierwiastków w otrzymanych filtratach metodami ICP OES i FAAS. Zaproponowana procedura frakcjonowania fizycznego pierwiastków w naparach analizowanych herbat i kaw pozwoliła mi wydzielić sześć frakcji fizycznych różniących się masami wchodzących w ich skład związków/kompleksów, tj. >100 kDa, 50-100 kDa, 30-50 kDa, 10-30 kDa, 5-10 kDa i <5 kDa. Schemat procedury frakcjonowania przedstawia Rysunek 6. Uzyskana informacja nt. udziału poszczególnych frakcji fizycznych pierwiastków pozwoliła mi wyciągnąć wnioski o ich potencjalnej dostępności i przyswajalności w naparach analizowanych herbat i kaw. Całkowite stężenia oznaczanych pierwiastków w analizowanych napojach oraz w wydzielonych filtratach oznaczyłam stosując opracowaną we wcześniejszych pracach uproszczoną procedurę przygotowania próbek do pomiaru metodami ICP OES i FAAS [H10, H11]. Wybrane parametry walidacyjne, takie jak precyzja, dokładność, granice wykrywalności i/lub oznaczalności, a także suma udziału frakcji wydzielonych na drodze frakcjonowania

fizycznego potwierdziły słuszność użycia wspomnianej alternatywnej procedury (zakwaszenie stężonym HNO_3 do stężenia $0,25 \text{ mol/dm}^3$) przygotowania filtratów do ich analizy wielopierwiastkowej. Średnie zawartości całkowite pierwiastków oraz poszczególne udziały ich frakcji fizycznych w naparach herbat i kaw porównałam stosując jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) dla grup niezależnych.



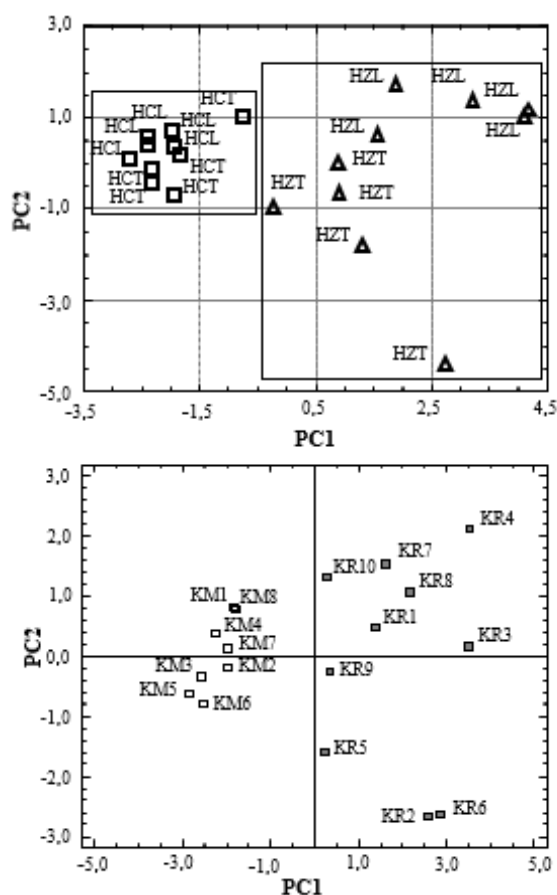
Rysunek 6. Schemat frakcjonowania fizycznego z zastosowaniem ultrafiltracji membranowej [H12, H13].

Biorąc pod uwagę różnice statystycznie istotne między naparami herbat czarnych (torebkowe i liściaste) i zielonych (torebkowe i liściaste) [H12] dla wyznaczonych frakcji fizycznych pierwiastków stwierdziłam, że udziały frakcji: <5 kDa, >100 kDa i 5-10 kDa są najbardziej charakterystyczne i w znacznym stopniu różnicują analizowane herbaty. W odróżnieniu do naparów herbat zielonych, w naparach herbat czarnych dominuje frakcja wielkocząsteczkowa (>100 kDa) kosztem udziałów frakcji o mniejszych masach (<5 kDa i 5-10 kDa). Najprawdopodobniej związane jest to z różnicami w procesie produkcji i składzie matrycy organicznej obu rodzajów herbat. Herbata czarna, z powodu fermentacji liści, ma bardziej zwartą strukturę, zawierającą złożone związki wielkocząsteczkowe, które łatwiej i silniej wiążą badane metale, szczególnie Al, Ba, Cr, Fe i Sr. Dlatego należy się spodziewać, że dostępność biologiczna i przyswajalność tych metali z naparów herbat

czarnych będzie utrudniona ze względu na stosunkowo wysoki udział frakcji >100 kDa tj. 61% (Al), 69% (Ba), 94% (Cr), 76% (Fe) i 62% (Sr). Natomiast dostępność/przyswajalność K, Na, Ni i Zn powinna być znacznie wyższa, ponieważ udział frakcji <5 kDa i 5-10 kDa dla tych metali jest najwyższy i wynosi odpowiednio 77%, 76%, 67% i 68%. W przypadku naparów herbat zielonych, tylko Fe posiada dominujący udział frakcji >100 kDa (67%). Większość badanych pierwiastków obecna jest w tych naparach w postaci frakcji małocząsteczkowej (<5 kDa i 5-10 kDa) o stosunkowo wysokim udziale, tj. 90% (Zn), 89% (Cu, K), 87% (Ca), 85% (Ni), 83% (Mg), 79% (Mn), 72% (Al) i 71% (Sr). Na podstawie otrzymanych wyników można wysunąć wnioski, że tylko K, Na, Ni i Zn mogą być łatwo przyswajalne z naparów herbat czarnych, ponieważ udział frakcji 5-10 kDa i <5 kDa tych pierwiastków jest bardzo duży. Inne pierwiastki, w tym Al, Ba, Cr, Fe i Sr, występują w naparach głównie w postaci związków o dużych masach cząsteczkowych (znaczny udział frakcji >100 kDa), zatem ich dostępność jest ograniczona. W naparach herbat zielonych, większość pierwiastków (Al, Ca, Cu, K, Mg, Ni, Sr i Zn) występuje w postaci małocząsteczkowych związków (<5 kDa i 5-10 kDa).

W przypadku kaw mielonych i rozpuszczalnych [H13], frakcje związane ze związkami metali o największych (>100 kDa) i najmniejszych (<5 kDa) masach cząsteczkowych różnicują obie grupy kaw w największym stopniu. W stosunku do obu wyżej wymienionych frakcji fizycznych, wszystkie badane metale można podzielić na trzy grupy: (1) - Al, Cu, Fe i Ni - posiadają dominujący udział frakcji >100 kDa; (2) - Co, K, Mg i Na - udział frakcji <5 kDa jest najwyższy spośród innych frakcji oraz (3) - Ba, Ca, Mn, Sr i Zn - udziały obu wspomnianych frakcji są porównywalne. Frakcję fizyczną metali związaną z obecnością ich form wielkocząsteczkowych (>100 kDa) najprawdopodobniej stanowią kompleksy ze związkami melanoidowymi, które powstają w trakcie ostatniego etapu reakcji Millarda i mają duże powinowactwo do tzw. metali miękkich dzięki obecności w ich strukturze związków polifenolowych, białek oraz cukrów [45,46]. Frakcję fizyczną metali związaną z obecnością ich form małocząsteczkowych (<5 kDa) stanowią głównie kompleksy z cukrami, kofeiną i kwasem chlorogenowym ze względu na małe powinowactwo do tzw. metali twardych, które nie mają tendencji do tworzenia kompleksów z ligandami organicznymi [45,47]. Wyniki frakcjonowania fizycznego pozwoliły mi pośrednio określić stopień dostępności i przyswajalności oznaczanych pierwiastków (Al, Ba, Ca, Co, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Sr i Zn) z naparów obu rodzajów kawy. Można przypuszczać, że Al, Cu, Fe i Ni, ze względu na dominujący udział frakcji >100 kDa i najniższy udział frakcji <5 kDa, mają obniżoną bioprzyswajalność, ponieważ jony tych metali są silnie związane z ligandami o wysokich masach cząsteczkowych. Z drugiej strony, Co, K, Mg i Na, dla których udział frakcji <5 kDa jest znacznie wyższy niż udział frakcji >100 kDa i wynosi 60-70%, są wysoce biodostępne. Podsumowując, w naparach kaw mielonych i rozpuszczalnych pierwiastki takie jak Co, K, Mg i Na mogą wykazywać znaczną przyswajalność, ze względu na dominujący udział frakcji <5 kDa. Inne pierwiastki, w tym Al, Cu, Fe i Ni, charakteryzuje z kolei wysoki udział frakcji >100 kDa, co może skutkować ich utrudnioną przyswajalnością z naparów kaw.

Jednocześnie udowodniłam, że obraz frakcyjny pierwiastków ma większe znaczenie w grupowaniu i klasyfikowaniu naparów analizowanych herbat niż zawartości całkowite tych pierwiastków. Stosując ANOVA, PCA i LDA potwierdziłam, że informacja o stężeniach poszczególnych pierwiastkach w wydzielonych frakcjach fizycznych i udziałach tych frakcji, w szczególności frakcji wielkocząsteczkowej >100 kDa i małowcząsteczkowej <5 kDa, umożliwia skuteczne grupowanie (PCA) i klasyfikację (LDA) herbat (ze względu na rodzaj: zielona, czarna i typ: liściasta, torebkowa). Możliwości tej nie daje natomiast informacja o całkowitych stężeniach pierwiastków w naparach tych herbat (Rysunek 7a). Identycznych obserwacji dokonałam w przypadku analizy frakcjonowanej pierwiastków w naparach kaw mielonych i rozpuszczalnych (Rysunek 7b).



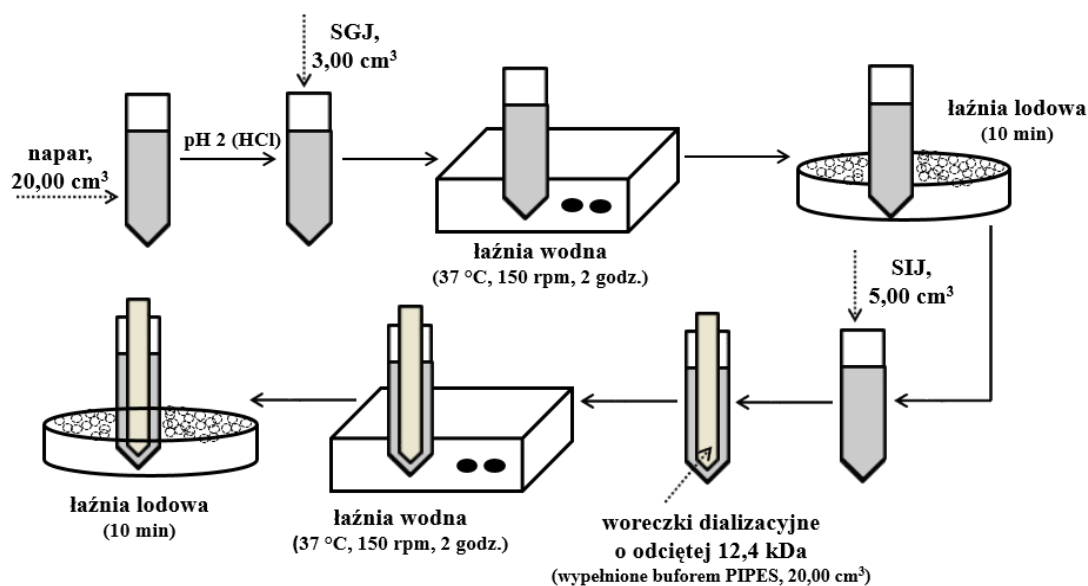
Rysunek 7. Wykres PC1 względem PC2 dla matrycy danych zawierającej stężenia pierwiastków w wydzielonych frakcjach: (a) <5 kDa (napary herbat) i (b) >100 kDa (napary kaw) [H12, H13].

HCT – herbata czarna torebkowa, HCL – herbata czarna liściasta, HZT – herbata zielona torebkowa, HZL – herbata zielona liściasta, KM – kawa mielona, KR – kawa rozpuszczalna.

Zastosowanie ultrafiltracji membranowej do frakcjonowania fizycznego oznaczanych pierwiastków pozwoliło jedynie pośrednio określić i oszacować stopień ich dostępności i przyswajalności z naparów analizowanych herbat i kaw. Aby określić rzeczywistą bioprzyswajalność metali stosuje się testy *in vivo* i/lub *in vitro*. Niestety badania *in vivo* są kosztowne, pracochłonne, wymagają szczególnej infrastruktury i często są ograniczone z etycznego punktu widzenia. Testy *in vitro*, symulujące naturalnie zachodzące procesy

trawienne w jamie ustnej, żołądka i jelitach, są znacznie prostsze, szybsze i tańsze, stanowią zatem dobrą alternatywę dla badań *in vivo*. W większości prac dotyczących oznaczania bioprzyswajalności pierwiastków z produktów żywnościowych stosowano do symulacji procesów trawienia żołądkowo-jelitowego dwuetapową procedurę z roztworami pepsyny, pankreatyny, soli żółciowych i związków nieorganicznych. Trawienie w żołądku zwykle odwzorowywano stosując roztwór pepsyny o stężeniach w zakresie 0,001-16% przygotowany w 0,08-0,10 mol/dm³ HCl. Następnym etapem, naśladującym trawienie jelitowe, często prowadzono stosując mieszaninę pankreatyny i soli żółciowych rozpuszczonych w 0,10 mol/dm³ roztworze NaHCO₃. Stężenia pankreatyny i soli żółciowych zwykle mieściły się w zakresie odpowiednio 0,015-4,04% i 0,15-2,8%. Wszystkie etapy symulujące trawienie w przewodzie pokarmowym przeprowadzono w temperaturze 37 °C (temperatura ciała ludzkiego). Czas inkubacji z łagodnym wytrząsaniem, naśladującym perystaltykę żołądka i jelit, zwykle wynosił 2 godziny. Po trawieniu w warunkach *in vitro*, pierwiastki uwolnione do roztworu ze strawionej enzymatycznie próbki w postaci wolnych jonów lub ich kompleksów oddzielano stosując wirowanie z filtracją (<0,45 µm), a znacznie rzadziej ultrafiltrację i/lub dializę [48,49,H15]. Zastosowanie wirowania z filtracją jako etapu symulacji wchłaniania składników odżywczych, następującym po procesie trawienia enzymatycznego, nie jest uzasadnione, ponieważ umożliwia wyznaczenie jedynie tzw. frakcji rozpuszczalnej (ang. *soluble fraction*) zawierającej pierwiastki w formach łatwych do pobrania przez organizm, a nie tych które zostaną wchłonięte przez organizm. W pracy [H15] wykazałam, że udział frakcji bioprzyswajalnej (ang. *bioaccessible fraction*) większości oznaczanych pierwiastków (Ba, Ca, Cr, Cu, Mg, Mn, P, Sr i Zn) jest od 1 do 3 razy mniejszy niż udział frakcji rozpuszczalnej tych pierwiastków, a w przypadku Fe nawet 23-krotnie niższy. Wynika z tego, że pierwiastki w większym stopniu są związane ze średnio- i wielkocząsteczkowymi ligandami organicznymi o różnej trwałości, co znacząco wpływa na stopień ich wchłaniania, a zarazem przyswajania przez organizm ludzki. Jak widać etap symulujący absorpcję pierwiastków przez kosmki jelitowe ma kluczowe znaczenie dla określenia rzeczywistej bioprzyswajalności składników mineralnych z produktów żywnościowych, a powszechnie stosowane wirowanie nie jest do tego celu odpowiednie. Dodatkowo udowodniłam, że stężenia enzymów w roztworach symulujących sok żołądkowy i jelitowy znacząco wpływają na oznaczenie frakcji rozpuszczalnej i bioprzyswajalnej pierwiastków.

Zgodnie z powyższym, do określenia rzeczywistej bioprzyswajalności pierwiastków z naparów kaw wykorzystałam badania *in vitro* w warunkach symulujących fizjologię żołądka i jelit [H14]. Kawa jest spożywana jako płyn i szybko przechodzi z jamy ustnej do żołądka, dlatego zdecydowałam się pominąć symulację trawienia tego odcinka przewodu pokarmowego. W celu odwzorowania trawienia w warunkach naturalnych zastosowałam sztuczny sok żołądkowy i jelitowy, natomiast absorpcję pierwiastków przez kosmki jelitowe symulowałam poprzez zastosowanie woreczków dializacyjnych o odciętej 12,4 kDa. Schemat trawienia żołądkowo-jelitowego w warunkach *in vitro* przedstawia Rysunek 8.



Rysunek 8. Schemat trawienia żołądkowo-jelitowego w warunkach *in vitro* (SGJ: sztuczny sok żołądkowy, SIJ: sztuczny sok jelitowy).

Jak dotąd w literaturze polskiej jak i zagranicznej nie ma znormalizowanej i w pełni zwalidowanej procedury przygotowywania roztworów po trawieniu żołądkowo-jelitowym w warunkach *in vitro* (dializaty – frakcja bioprzyswajalna i pozostałość – frakcja niezdializowana) do ich wielopierwiastkowej analizy metodami spektrometrycznymi. Opracowanie uproszczonego i zwalidowanego sposobu przygotowania tego rodzaju próbek jest ważne ze względu na wiarygodność informacji o bioprzyswajalności pierwiastków z naparów kaw. Dlatego też badania swoje rozpoczęłam od opracowania i zwalidowania procedury przygotowania roztworów po trawieniu enzymatycznym do oznaczenia zawartości Al, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Sr i Zn metodami ICP OES i FAAS. Następnie wybraną procedurę zastosowałam do określenia bioprzyswajalności oznaczanych pierwiastków z naparów kaw mielonych i rozpuszczalnych stosując symulację trawienia żołądkowo-jelitowego w warunkach *in vitro* dobranych w pracy [H15]. Należy tutaj podkreślić, że bioprzyswajalność pierwiastków tj. Al, Ba, Cr, Cu, Ni, Sr i Zn z naparów kaw została w niniejszej pracy określona przeze mnie po raz pierwszy; jak dotąd w literaturze fachowej tylko dwie prace, których jestem współautorem, poświęcono ocenie biodostępności/bioprzyswajalności pierwiastków z naparów kaw mielonych i rozpuszczalnych i dotyczyły one tylko Ca, Fe, Mg i Mn [50,51].

Jak wspomniałam, w pierwszym etapie pracy skupiałam się na opracowaniu procedury przygotowania roztworów po trawieniu żołądkowo-jelitowym do ich analizy metodami ICP OES i FAAS. W tym celu porównałam trzy procedury: rozkład na mokro w układzie otwartym przy użyciu stężonego roztworu HNO₃, pomiar bezpośredni i zakwaszenie stężonym roztworem HNO₃ (końcowe stężenie kwasu w próbce – 0,25 mol/dm³). Wyniki przeanalizowałam pod kątem podobieństwa wariancji grup wyników (test *F*-Snedecora, *p*=0,05, *F*_{krytyczne}=19,00), a następnie pod kątem statystycznie istotnych różnic pomiędzy sumą

średnich stężeń pierwiastków we frakcji bioprzyswajalnej i niezdializowanej a ich całkowitym stężeniem w naparach (test *t*-Studenta, $p=0,05$, $t_{krytyczne}=2,776$ lub test Cochrańa-Coxa, $p=0,05$, $C_{krytyczne}=4,303$). Na podstawie analizy statystycznej ustaliłam, że suma średnich stężeń pierwiastków w obu frakcjach oznaczona po zastosowaniu rozkładu na mokro w układzie otwartym i pomiar bezpośredni nie różni się w sposób statystycznie istotny od całkowitych stężeń tych pierwiastków w naparach. W tym przypadku dla wszystkich oznaczanych pierwiastków wartości $t_{obliczone}$ i $C_{obliczone}$ były niższe od wartości krytycznych obu testów. Brak różnic sugeruje, że rozkład na mokro i pomiar bezpośredni dają statystycznie identyczne wyniki. Dla procedury polegającej na zakwaszeniu stężonym roztworem HNO_3 , statystycznie istotne różnice między wynikami uzyskano dla Mg, Mn, Sr, Zn (w przypadku kawy mielonej) oraz dla Ba, Cr, Fe, Mg, Mn (w przypadku kawy rozpuszczalnej). Jak widać w Tabeli 5, rozkład na mokro i analiza bezpośrednia jako procedury przygotowywania roztworów frakcji bioprzyswajalnej zapewniają ilościowy odzysk dla wszystkich pierwiastków. Ponadto procedury te charakteryzują się porównywalnie wysoką precyzją, a uzyskane wartości granic wykrywalności i oznaczalności są zadawalające. W przypadku zakwaszenia stężonym roztworem HNO_3 uzyskano znacznie gorsze wartości wyznaczanych parametrów analitycznych, co wskazuje, że procedura ta była nieodpowiednia do przygotowania tego rodzaju próbek. Biorąc pod uwagę charakterystykę analityczną testowanych procedur, a także potrzebę analizy większej ilości próbek, do dalszych badań wybrałam procedurę polegającą na pomiarze bezpośrednim. Metoda ta jest znacznie szybsza, prostsza i tańsza w wykonaniu niż rozkład na mokro w systemie otwartym, a zarazem gwarantuje uzyskanie rzetelnych i wiarygodnych wyników.

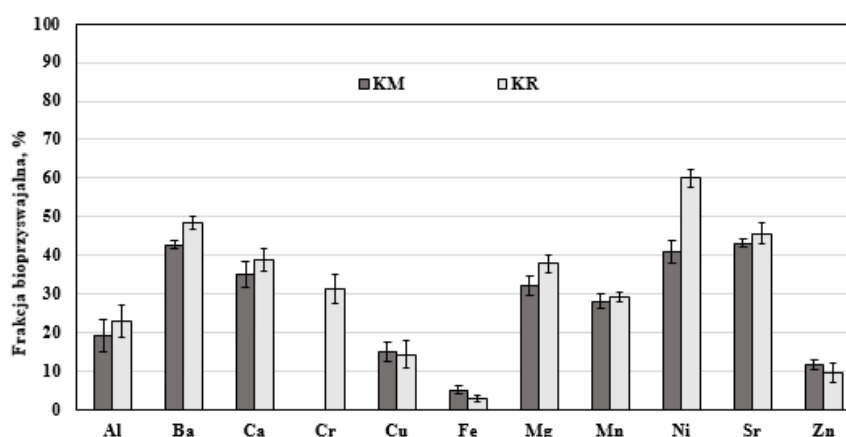
Tabela 5. Wybrane parametry analityczne testowanych procedur przygotowania frakcji bioprzyswajalnej pierwiastków [H14] z naparów kaw mielonych (KM) i rozpuszczalnych (KR) do ich wielopierwiastkowej analizy metodami ICP OES i FAAS.

	Procedura przygotowania próbki	Próbka	RSD, %	Odzysk, %	LOD, ng/cm ³	LOQ, ng/cm ³
P1	rozkład na mokro w układzie otwartym w stęż. roztworze HNO_3	KM	0,61-5,5	98,4-104	0,077-1,9	0,26-6,3
		KR	0,30-5,3	98,7-103		
P2	pomiar bezpośredni	KM	0,72-3,1	98,4-104	0,095-1,8	0,32-6,0
		KR	0,54-5,9	98,2-102		
P3	zakwaszenie stęż. roztworem HNO_3 do stężenia 0,25 mol/dm ³	KM	1,0-8,5	92,4-111	0,35-2,4	1,2-8,0
		KR	0,79-9,5	88,6-114		

Dokładność zastosowanej procedury trawienia enzymatycznego zweryfikowałam dokonując bilansu masy. Dla każdego oznaczanego pierwiastka sumę jego stężeń we frakcjach bioprzyswajalnej i niezdializowanej określonego naparu kawy porównałam z jego całkowitym stężeniem w tym naparze i wyraziłam jako odzysk (w %). Ustaliłam,

że odzysk ten dla poszczególnych pierwiastków w przypadku naparów kaw mielonych był ilościowy i wynosił od 96,3 do 108%. Podobne odzyski pierwiastków stwierdziłam dla naparów kaw rozpuszczalnych, tj. 95,9-105%. Precyzja wyników (RSD, %) była również zadawalająca i mieściła się w zakresie od 0,10% do 4,8% w przypadku kaw mielonych i od 0,10% do 6,0% dla kaw rozpuszczalnych.

Analizując otrzymane wyniki zauważyłam, że średni udział frakcji bioprzyswajalnej (Rysunek 9) wszystkich oznaczanych pierwiastków był niższy niż 50%. Jedynie dla Ni w przypadku kaw rozpuszczalnych wynosił około 60%. Bioprzyswajalność pierwiastków z naparów kaw mielonych była niższa niż z naparów kaw rozpuszczalnych dla Al, Ba, Ca, Cu, Mg, Mn, Ni i Sr lub wyższa jak w przypadku Fe i Zn.

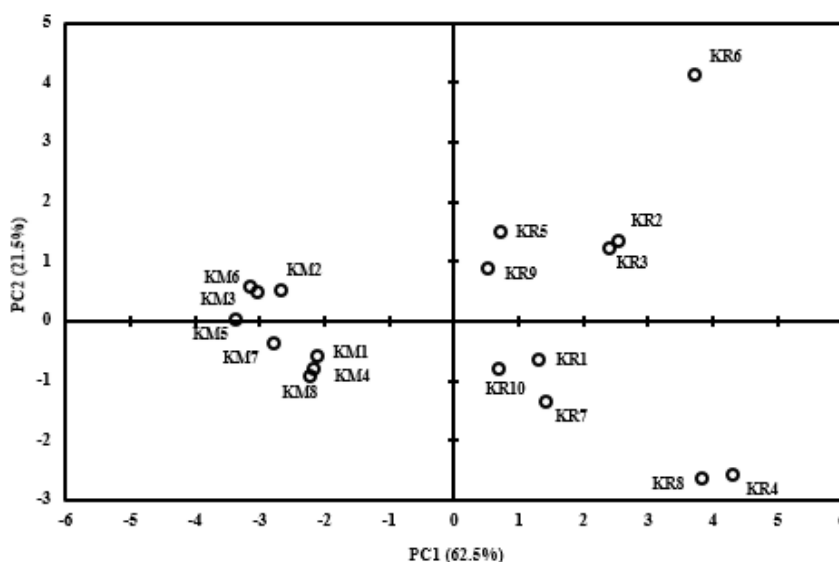


Rysunek 9. Średni udział frakcji bioprzyswajalnej (w %) oznaczanych pierwiastków w naparach kaw mielonych (KM) i rozpuszczalnych (KR).

Reasumując, średni udział frakcji bioprzyswajalnej pierwiastków w naparach kaw mielonych i rozpuszczalnych jest ogólnie niski i wynosi odpowiednio 5,1%-41% i 2,9-60%. Wyniki te w większości są zgodne z tymi uzyskanymi w toku frakcjonowania fizycznego [H13]. Wykazałam we wcześniejszych badaniach, że Al, Cu i Fe posiadają dominujący udział frakcji >100 kDa, co wskazuje na niską bioprzyswajalność tych pierwiastków z naparów kawowych. Dla Ba, Ca, Mn i Sr udziały frakcji >100 kDa i <5 kDa są porównywalne, co może świadczyć o średniej bioprzyswajalności tych pierwiastków.

Podobnie jak w przypadku stężeń pierwiastków w wydzielonych frakcjach fizycznych, stężenia pierwiastków we frakcji bioprzyswajalnej w znacznie lepszym stopniu charakteryzują rodzaj kawy (mielone i rozpuszczalne), aniżeli stężenia całkowite tych pierwiastków. W tym przypadku wszystkie napary kaw mielonych miały ujemne wartości PC1, podczas gdy wszystkie napary kaw rozpuszczalnych miały dodatnie wartości PC1 (Rysunek 10). Ponadto, stężenie Cu we frakcji bioprzyswajalnej było dodatnio skorelowane z naparami kaw mielonych i ujemnie skorelowane z PC1 (-0,77). Natomiast stężenia Al (0,75), Ba (0,81), Ca (0,94), Cr (0,91), Fe (0,73), Mg (0,96), Sr (0,86) i Zn (0,73) we frakcji bioprzyswajalnej były dodatnio skorelowane z PC1 (współczynniki korelacji podano w nawiasach) i w naparach kaw rozpuszczalnych. Ustaliłam, również że stężenia Al, Ca, Cr,

Fe, Mg i Sr skorelowane ze stężeniem Cu we frakcji bioprzyswajalnej pozwalają na efektywne grupowanie naparów kaw mielonych i rozpuszczalnych. W tym przypadku wszystkie pary pierwiastków, tj. Cu-Al, Cu-Ca, Cu-Cr, Cu-Fe, Cu-Mg i Cu-Sr, umożliwiły wyraźne oddzielenie naparów kaw mielonych od rozpuszczalnych. Stężenie obu pierwiastków we frakcji bioprzyswajalnej było skorelowane z PC1.



Rys. 10. Wykres PC1 względem PC2 dla badanych naparów kaw mielonych (KM) i rozpuszczalnych (KR) dla matrycy danych zawierającej stężenia pierwiastków w wydzielonej frakcji bioprzyswajalnej.

Podsumowanie:

Do najważniejszych moich naukowych osiągnięć ww. cyklu publikacji zaliczam:

1. Opracowanie nowych, w pełni zwalidowanych, tj. gwarantujących otrzymanie rzetelnych i wiarygodnych wyników, procedur przygotowania próbek żywności o różnym stopniu skomplikowania matrycy (bez konieczności ich uprzedniego całkowitego rozkładu) do wielopierwiastkowej analizy metodą ICP OES. Procedury te są znacznie szybsze i prostsze niż powszechnie stosowany rozkład na mokro w systemach zamkniętych lub otwartych, pozwalają skrócić czas i koszt analizy, redukują zużycie agresywnych stężonych odczynników eliminując tym samym kontaminację i straty analitów [**H1-H6**].
2. Kompleksową analizę herbat (czarne i zielone) oraz kaw (mielone i rozpuszczalne), która obejmuje opracowanie szeregu metodologii postępowania wpisujących się w nurt tzw. zielonej chemii analitycznej i umożliwiających oznaczanie całkowitych stężeń pierwiastków i ich form frakcyjnych. Unikatowość i wyjątkowość opracowanych rozwiązań i procedur polegała na:
 - szybkim i prostym przygotowaniu próbek herbat i kaw bez konieczności ich rozkładu, polegającym na UAE z wodą królewską w temperaturze pokojowej, do oznaczania

- całkowitych zawartości wybranych pierwiastków metodami ICP OES i FAAS [H8, H9],
- znacznie uproszczonym przygotowaniu naparów herbat i kaw, polegającym wyłącznie na ich zakwaszeniu stężonym roztworem HNO₃ przed wielopierwiastkową analizą metodami ICP OES i FAAS [H10, H11],
 - prostym schemacie frakcjonowania fizycznego pierwiastków w naparach herbat i kaw z zastosowaniem szeregowej filtracji membranowej wraz z oznaczaniem ich stężeń w otrzymanych filtratach metodami ICP OES i FAAS [H12, H13],
 - bardzo prostym przygotowaniu roztworów naparów kaw otrzymanych po trawieniu żołądkowo-jelitowym *in vitro* do ich wielopierwiastkowej analizy metodami ICP OES i FAAS [H14],
 - określeniu bioprzyswajalności wybranych metali z naparów kaw mielonych i rozpuszczalnych [H14],
 - wykazaniu, że formy frakcyjne pierwiastków lepiej opisują i charakteryzują różnice między herbatami i kawami aniżeli ich stężenia całkowite [H10-H14].

Literatura:

- [1] P. Pohl, E. Stelmach, M. Welna, A. Szymczycha-Madeja, Determination of the elemental composition of coffee using instrumental methods, *Food Analytical Methods* 6 (2013) 598-613.
- [2] A. Szymczycha-Madeja, M. Welna, D. Jedryczko, P. Pohl, Developments and strategies in the spectrochemical elemental analysis of fruit juices, *TrAC. Trends in Analytical Chemistry* 55 (2014) 68-80.
- [3] M. Salahinejad, F. Aflaki, Toxic and essential mineral elements content of black tea leaves and their tea infusions consumed in Iran, *Biological Trace Element Research* 134 (2010) 109–117.
- [4] D. Ramdani, A.S. Chaudhry, C.J. Seal, Chemical composition, plant secondary metabolites, and minerals of green and black teas and the effect of different tea-to-water ratios during their extraction on the composition of their spent leaves as potential additives for ruminants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (2013) 4961–4967.
- [5] P. Pohl, A. Bielawska-Pohl, A. Dzimitrowicz, P. Jamroz, M. Welna, A. Lesniewicz, A. Szymczycha-Madeja, Recent achievements in element analysis of bee honeys by atomic and mass spectrometry methods, *TrAC. Trends in Analytical Chemistry* 93 (2017) 67-77.
- [6] M. Soylak, M. Tuzen, A.S. Souza, M.G.A. Korn, S.L.C. Ferreira, Optimization of Microwave Assisted Digestion Procedure for the Determination of Zinc, Copper and Nickel in Tea Samples Employing Flame Atomic Absorption Spectrometry, *Journal of Hazardous Materials* 149 (2007) 264-268
- [7] M. Harmanakaya, S. Gezgin, M.M. Ozcan, Comparative evaluation of some macro- and micro-element and heavy metal contents in commercial fruit juices, *Environmental Monitoring Assessment* 184 (2012) 5415-5420.
- [8] J. Mierzwa, Y.C. Sun, Y.T. Chung, M.H. Yang, Comparative determination of Ba, Cu, Fe, Pb and Zn in tea leaves by slurry sampling electrothermal atomic absorption and liquid sampling inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Talanta* 47 (1998) 1263-1270.
- [9] I. Narin, H. Colak, O. Turkoglu, M. Soylak, M. Dogan, Heavy metals in black tea samples produced in Turkey, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 72 (2004) 844-849.
- [10] M. Memic, D. Mahic, S. Zero, T. Muhic-Sarac, Comparison of different methods of green and black tea at the Sarajevo market for the determination of the heavy metal content, *Journal of Food Measurement and Characterization* 8 (2014) 149–154.
- [11] M. Grembecka, E. Malinowska, P. Szefer, Differentiation of market coffee and its infusions in view of their mineral composition, *Science of The Total Environment* 383 (2007) 59-69.
- [12] J. Malik, J. Szakova, O. Drabek, J. Balik, L. Kokoska, Determination of certain micro and macroelements in plant stimulants and their infusions, *Food Chemistry* 111 (2008) 520-525.
- [13] R.B. Khouzam, R. Lobinski, P. Pohl, Multi-element analysis of bread, cheese, fruit and vegetables by double-focusing sector-field inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Methods* 3 (2011) 2115-2120.

- [14] N. Jalbani, T.G. Kazi, M.K. Jamali, B.M. Arain, H.I. Afridi, A. Baloch, A., Evaluation of aluminum contents in different bakery foods by electrothermal atomic absorption spectrometer, *Journal of Food Composition and Analysis* 20 (2007) 226-231.
- [15] R.E.S. Froes, W.B. Neto, N.O.C. Silva, R.L.P. Naveira, C.C. Nascentes, J.B.B. da Silva, Multivariate optimization by exploratory analysis applied to the determination of microelements in fruit juice by inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B* 64 (2009) 619-622.
- [16] N. Jalbani, F. Ahmed, T.G. Kazi, U. Rashid, A.B. Munshi, A. Kandhro, Determination of essential elements (Cu, Fe and Zn) in juices of commercially available in Pakistan. *Food and Chemical Toxicology* 48 (2010) 2737-2740.
- [17] I. Juranović-Cindrić, M. Zeiner, M. Kröppl, G. Stingeder, Comparison of sample preparation methods for the ICP-AES determination of minor and major elements in clarified apple juices, *Microchemical Journal* 99 (2011) 364-369.
- [18] L. Tormen, D.P. Torres, I.M. Dittert, R.G.O. Araújo, V.L.A. Frescura, A.J. Curtius, Rapid assessment of metal contamination in commercial fruit juices by inductively coupled mass spectrometry after a simple dilution, *Journal of Food Composition and Analysis* 24 (2011) 95-102.
- [19] M. Romdhane, C. Gourdon, Investigation in solid-liquid extraction: influence of ultrasound, *Chemical Engineering Journal* 87 (2002) 11-19.
- [20] M.D. Luque de Castro, M.P. Da Silva, Strategies for solid sample treatment, *Trends in Analytical Chemistry* 16 (1997) 16-24.
- [21] F. Chemat, N. Rombaut, A.G. Sicaire, A. Meullemiestre, A.S. Fabiano-Tixier, M. Aberta-Vian, Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanism, techniques, combinations, protocols and applications. A review, *Ultrasonics Sonochemistry* 34 (2017) 540-560.
- [22] Y. Chen, M. Yu, J. Xu, X. Chen, J. Shi, Differentiation of eight tea (*Camellia sinensis*) cultivars in China by element fingerprint of their leaves, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89 (2009) 2350-2355.
- [23] N. Aksuner, E. Henden, Z. Aker, E. Engin, S. Satik, Determination of essential and non-essential elements in various tea leaves and tea infusions consumed in Turkey, *Food Additives and Contaminants: Part B* 5 (2012) 126-132.
- [24] J.S. McKenzie, J.M. Jurado, F. de Pablos, Characterisation of tea leaves according to their total mineral content by means of probabilistic neural networks, *Food Chemistry* 123 (2010) 859-864.
- [25] M. Dambiec, L. Polechonska, A. Klink, Levels of essential and non-essential elements in black teas commercialized in Poland and their transfer to tea infusions, *Journal of Food Composition and Analysis* 31 (2013) 62-68.
- [26] A. Ashenef, Essential and toxic metals in tea (*Camellia sinensis*) imported and produced in Ethiopia, *Food Additives and Contaminants: Part B* 7 (2014) 30-36.
- [27] R.N. Gallaher, K. Gallaher, A.J. Marshall, A.C. Marshall, Mineral analysis of ten types of commercially available tea, *Journal of Food Composition and Analysis* 19 (2006) 53-57.
- [28] M. Tahir Soomro, E. Zahir, S. Mohiuddin, A. Nisar Khan, I.I. Naqvi, Quantitative assessment of metals in local brands of tea in Pakistan, *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11 (2008) 285-289.
- [29] L. Polechońska, M. Dambiec, A. Klink, A. Rudecki, Concentrations and solubility of selected trace metals in leaf and bagged black teas commercialized in Poland, *Journal of Food and Drug Analysis* 23 (2015) 486-482.
- [30] M. Jeszka-Skowron, M. Krawczyk, A. Zgola-Grzeskowiak, Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions. Influence of citric acid addition on extraction of metals, *Journal of Food Composition and Analysis* 40 (2015) 70-77.
- [31] B. Paz-Rodriguez, M.R. Dominguez-Gonzalez, M. Aboal-Somoza, P. Bermejo-Barrera, Application of high resolution-continuum source flame atomic absorption spectrometry (HR-CS FAAS): determination of trace elements in tea and tisanes, *Food Chemistry* 170 (2015) 492-500.
- [32] M. Welna, A. Szymczycha-Madeja, P. Pohl, A comparison of samples preparation strategies in the multi-elemental analysis of tea by spectrometric methods, *Food Research International* 53 (2013) 922-930.
- [33] A. Marcos, A. Fisher, G. Rea, S.J. Hill, Preliminary study using trace element concentrations and a chemometrics approach to determine the geographical origin of tea, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13 (1998) 521-525.
- [34] J.J. Powell, T.J. Burden, R.P.H. Thompson, In vitro mineral availability from digested tea: a rich dietary source of manganese, *Analyst* 123 (1998) 1721-1724.
- [35] Y. Ozdemir, S. Gucer, Speciation of manganese in tea leaves and tea infusions, *Food Chemistry* 61 (1998) 313-317.

- [36] I. Mehra, C.L. Baker, Leaching and bioavailability of aluminium, copper and manganese from tea (*Camellia sinensis*), *Food Chemistry* 100 (2007) 1456-1463.
- [37] S. Tascioglu, E. Kok, Temperature dependence of copper and chromium transfers into various black and green tea infusions, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76 (1998) 200-208.
- [38] P. Pohl, E. Stelmach, A. Szymczycha-Madeja, Determination of total concentrations and chemical and physical fractionation forms of manganese in infusions of ground coffee, *Food Analytical Methods* 7 (2014) 676-682.
- [39] P. Pohl, E. Stelmach, A. Szymczycha-Madeja, Simplified sample treatment for the determination of total concentrations and chemical fractionation forms of Ca, Fe, Mg and Mn in soluble coffees, *Food Chemistry* 163 (2014) 31-36.
- [40] A.K. Flaten, W. Lund, Speciation of aluminium in tea infusions studied by size exclusion chromatography with detection by post-column reaction, *Science of the Total Environment* 207 (1997) 21-28.
- [41] T.P. Flaten, Aluminium in tea – concentrations, speciation and bioavailability, *Coordination Chemistry Reviews* 228 (2002) 385-395.
- [42] S.B. Erdemoglu, K. Pyrzynska, S.Gucer, Speciation of aluminium in tea infusion by ion-exchange resins and flame AAS detection, *Analytica Chimica Acta* 411 (2000) 81-89.
- [43] B. Kralj, I. Krizaj, P. Bukovec, S. Slejko, R. Milacic, Speciation of aluminium in tea infusions by use of SEC and FPLC with ICP-OES and ESI-MS-MS detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (2005) 467-475.
- [44] K.E. Odegard, W. Lund, Multi-element speciation of tea infusion using cation-exchange separation and size-exclusion chromatography in combination with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 12 (1997) 403-408.
- [45] C.P. Passos, M.R. Cepeda, S.S. Ferreira, F.M. Nunes, P.M. Evtuguin, P. Madureira, M. Vilanova, M.A. Coimbra, Influence of molecular weight on in vitro immunostimulatory properties in instant coffee, *Food Chemistry* 161 (2014) 60-66.
- [46] E. Verzelloni, D. Tagliacruzchi, D. del Rio, L. Calani, A. Conte, Antiglycative and antioxidative properties of coffee fractions, *Food Chemistry* 124 (2011) 1430-1435.
- [47] N. Reichardt, D. Gniechwitz, H. Steinhart, M. Bunzel, M. Blaut, Characterization of high molecular weight coffee fractions and their fermentation by human intestinal microbiota, *Molecular Nutrition & Food Research* 53 (2009) 287-299.
- [48] S.J. Hur, B.O. Lim, E.A. Decker, D.J. McClements, *In vitro* human digestion models for food application, *Food Chemistry* 125 (2011) 1-12.
- [49] M. Intawongse, J.R. Dean JR, *In-vitro* testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples, *TrAC. Trends in Analytical Chemistry* 9 (2006) 876-886.
- [50] E. Stelmach, P. Pohl, A. Szymczycha-Madeja, Evaluation of the bioaccessibility of Ca, Fe, Mg and Mn in ground coffee infusions by *in vitro* gastrointestinal digestion, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 25 (2014) 1993-1999.
- [51] E. Stelmach, P. Pohl, A. Szymczycha-Madeja, A simplified determination of total concentrations of Ca, Fe, Mg and Mn in addition to their bioaccessible fraction in popular instant coffee brews, *Food Chemistry* 197 (2016) 388-394.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

- Okres przed uzyskaniem stopnia doktora

W październiku 2003 roku rozpoczęłam stacjonarne studia doktoranckie w Zakładzie Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, prowadząc badania pod opieką naukową prof. dr hab. inż. Władysławy Mulak. Pracę doktorską pt.: *Ługowanie metali z zużytego katalizatora hydroodsiarczania w środowisku kwaśnym*, obroniłam we wrześniu 2007 roku, uzyskując stopień doktora nauk chemicznych w dyscyplinie chemia, specjalność chemia analityczna. Moja praca doktorska dotyczyła określenia charakterystyki fizykochemicznej zużytego katalizatora hydroodsiarczania na podstawie jego analizy chemicznej oraz morfologii i pokroju zobrazowanego skaningową mikroskopią elektronową z mikrosondą rentgenowską i transmisyjną mikroskopią elektronową. Przeprowadziłam ługowania tego katalizatora w roztworach kwasów szczawowego i siarkowego(VI) z dodatkiem nadtlenu wodoru. Zbadałam wpływ stężenia $H_2C_2O_4$, H_2SO_4 i H_2O_2 , temperatury, szybkości mieszania, wielkości ziaren katalizatora na szybkość ługowania Mo, V, Ni i Al. Stwierdziłam, że w roztworach $H_2C_2O_4$ z dodatkiem H_2O_2 zależność stopnia wyługowania (α) od czasu (t) opisana jest równaniem $1-(1-\alpha)^{1/2}=kt$ co wskazuje, że reakcja chemiczna na powierzchni katalizatora jest najwolniejszym etapem procesu ługowania metali. W przypadku roztworów H_2SO_4 z dodatkiem H_2O_2 krzywe kinetyczne opisywane są równaniem $\alpha+(1-\alpha)\ln(1-\alpha)=kt$, co oznacza, że szybkość ługowania metali kontrolowana jest dyfuzją poprzez nośnik katalizatora ($\gamma-Al_2O_3$).

- Okres po uzyskaniu stopnia doktora

W październiku 2007 roku zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta naukowo-dydaktycznego w Zakładzie Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej, a od października 2011 roku pracuję na stanowisku adiunkta naukowo-dydaktycznego w tym samym Zakładzie (od stycznia 2015 r. jest to Zakład Chemii Analitycznej i Metalurgii Chemicznej).

W czasie asystentury, w ramach prowadzonych badań, porównałam różne metody roztwarzania zużytego katalizatora hydroodsiarczania pod kątem ich przydatności w oznaczaniu wybranych pierwiastków głównych i śladowych, tj. Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, Ti, V, Zn, metodą ICP OES. Do tego celu zastosowałam dwie procedury rozkładu na mokro w układzie zamkniętym wspomaganym energią mikrofalową, stosując mieszaniny roztworów $HCl+HNO_3+H_2O_2$ i roztworów HNO_3+HF oraz dwie procedury rozkładu na mokro w układzie otwartym z zastosowaniem mieszaniny wody królewskiej+ NH_4F , a następnie roztworów HNO_3 z H_2SO_4 oraz roztworów $HF+HClO_4$ z dodatkiem roztworów H_3BO_3 i HCl [1].

Po zatrudnieniu na stanowisku adiunkta, swoje zainteresowania naukowo-badawcze skoncentrowałam na analizie pierwiastkowej oraz specjacji i frakcjonowaniu pierwiastków w próbkach żywności, jak również zastosowaniu metod ekstrakcyjnych w przygotowaniu próbek do pomiaru metodami spektrometrii atomowej. W ramach tych badań, współpracując

z prof. dr hab. inż. Pawłem Pohlem, dr inż. Mają Wełną i obecnie dr inż. Ewelina Stelmach, brałam udział w:

- opracowaniu szybkiej i prostej procedury przygotowania naparów kaw mielonych do oznaczenia w nich całkowitych stężeń Ca, Cu, Fe, Mg, Mn i Zn metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu (FAAS), polegającą na zakwaszeniu próbek stężonym roztworem HNO₃ [2],

- opracowaniu procedury przygotowania próbek kaw rozpuszczalnych do analizy zawartości Ca, Mg, Fe, Mn metodą FAAS, polegającej na ich rozpuszczeniu i zakwaszeniu stężonym roztworem HNO₃, jak również procedury frakcjonowania chemicznego oznaczanych pierwiastków w naparach kaw rozpuszczalnych z użyciem dwukolumnowej ekstrakcji do fazy stałej (SPE) [3],

- opracowaniu prostej i szybkiej metody oznaczania zawartości Mn w naparach kaw mielonych przy użyciu FAAS oraz procedury oznaczania frakcji dostępnej Mn w naparach kawy z zastosowaniem SPE na sorbencie niepolarnym (ODS) i silnie kwasowym wymienniaczu kationowym (SCX) oraz ultrafiltracji membranowej (membrany o odciętych mas 5, 10, 30, 50 i 100 kDa) [4],

- opracowaniu i zwalidowaniu procedury frakcjonowania chemicznego Al, Ba, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Sr i Zn w naparach herbat (czarne, zielone) oraz kaw (mielone, rozpuszczalne) z zastosowaniem SPE; stężenia pierwiastków w wydzielonych frakcjach chemicznych, tj. hydrofobowa, kationowa i pozostałych form, zmierzono metodą ICP OES [5,6],

- określeniu bioprzyswajalności Ca, Fe, Mg i Mn z naparów kaw mielonych i rozpuszczalnych z wykorzystaniem trawienia enzymatycznego *in vitro* odwzorowującego warunki panujące w układzie żołądkowo-jelitowym wraz z symulacją wchłaniania przez kosmki jelitowe na drodze ultrafiltracji z użyciem membran o odciętej mas 5 kDa lub 3 kDa; stężenia pierwiastków w wydzielonych frakcjach (<5 kDa lub <3 kDa) jak i wyjściowych naparach zmierzono metodą FAAS z wykorzystaniem niskorozdzielczego spektrometru z liniowym źródłem światła (LS-AAS, kawy mielone) lub wysokorozdzielczego spektrometru AAS z ciągłym źródłem promieniowania (HR-CS-AAS, kawy rozpuszczalne) [7,8],

- opracowaniu uproszczonej procedury przygotowania próbek naparów kaw zielonych do oznaczania w nich całkowitych stężeń Ca, Cu, Fe, Mg i Mn metodą HR-CS FAAS [9],

- opracowaniu procedury przygotowania świeżych i puszkowanych pomidorów do oznaczania śladowych ilości Sn techniką generowania wodorków (HG) z detekcją metodą ICP OES po uprzedniej mineralizacji próbek w układzie otwartym w mieszaninie HNO₃ i H₂O₂ [10],

- porównaniu różnych procedur (mineralizacja w układzie otwartym oraz zamkniętym, ekstrakcja w układzie ciało stałe-ciecz) przygotowania próbek pod kątem ich zastosowania w oznaczeniach całkowitych stężeń pierwiastków głównych (Ca, Mg, P) oraz śladowych (Ba,

Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, Sr i Zn) w orzechach brazylijskich metodą ICP OES i HG-ICP OES (Se) [11],

- opracowaniu szybkiej procedury przygotowania próbek klarowanych soków owocowych i przecierowych soków marchwiowo-owocowych do jednoczesnego oznaczania stężeń całkowitych As, Se i Sb metodą HG-ICP OES [12,13].

Jestem również współautorką 10 artykułów przeglądowych dotyczących zastosowania metod spektrochemicznych w analizie pierwiastkowej próbek żywności. W pracach tych:

- omówiono istotne aspekty analizy pierwiastkowej różnego rodzaju napojów (kawa, herbata, soki owocowe) oraz herbat ziołowych i ziół z uwzględnieniem procedur przygotowania próbek do pomiarów oraz sposobów zapewnienia i kontroli jakości uzyskiwanych wyników analizy [14-19],

- porównano metody spektrometrii atomowej i mas stosowanych do analizy wielopierwiastkowej destylatów alkoholowych i wódek, ze szczególnym uwzględnieniem sposobów przygotowania próbek do pomiaru i kalibracji stosowanych metod; przedstawiono też przykłady zastosowania informacji o składzie pierwiastkowym destylatów alkoholowych i wódek do kontroli ich jakości i autentyczności oraz identyfikacji i grupowania tych produktów o różnym pochodzeniu [20],

- omówiono najnowsze osiągnięcia (od 2012 r.) w analizie pierwiastkowej miodów pszczelich; skupiono się na różnych aspektach badawczych, m.in. na ocenie pochodzenia biologicznego i geograficznego miodu z wykorzystaniem metod chemometrycznych, jego jakości i bezpieczeństwa, a także przygotowaniu próbek przed analizą pierwiastkową metodami spektrometrii atomowej i mas; przedstawiono także sposoby kalibracji i zapewnienia jakości i kontroli wyników [21],

- omówiono i porównano metodologię postępowania przy oznaczaniu i specjacji As w ryżu metodami spektrometrycznymi z udziałem technik chromatograficznego i nie-chromatograficznego rozdzielania poszczególnych form tego pierwiastka; szczególny nacisk położono na omówienie postępowania stosowanego na etapie przygotowania próbek do analizy śladowej i specjacyjnej As [22],

- dokonano krytycznego przeglądu technik generowania lotnych połączeń metali przejściowych w reakcji z czterowodoroboranem sodu jako sposobu ich wydzielania i zateżania przed pomiarem metodami spektrometrii atomowej i mas [23].

Literatura:

- [1] A. Szymczycha-Madeja, W. Mulak, Comparison of various digestion procedures in chemical analysis of spent hydrodesulfurization catalyst, *Journal of Hazardous Materials* 164 (2009) 776-780.
- [2] E. Stelmach, P. Pohl, A. Szymczycha-Madeja, The suitability of the simplified method of the analysis of coffee infusions on the content of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn and the study of the effect of preparation conditions on the leachability of elements into the coffee brew, *Food Chemistry* 141 (2013) 1956-1961.
- [3] P. Pohl, E. Stelmach, A. Szymczycha-Madeja, Simplified sample treatment for the determination of total concentrations and chemical fractionation forms of Ca, Fe, Mg and Mn in soluble coffees, *Food Chemistry* 163 (2014) 31-36.

- [4] P. Pohl, E. Stelmach, A. Szymczycha-Madeja, Determination of total concentrations and chemical and physical fractionation forms of manganese in infusions of ground coffee, *Food Analytical Methods* 7 (2014) 676-682.
- [5] P. Pohl, A. Szymczycha-Madeja, M. Welna, Direct ICP-OES multielement analysis of infused black and green teas and chemical fractionation of selected essential and non-essential elements prior to evaluation of their bioavailability and classification of teas by pattern recognition, *Arabian Journal of Chemistry* 2018, <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.02.013>
- [6] P. Pohl, A. Szymczycha-Madeja, M. Welna, Simple ICP-OES based method for determination of selected elements in brewed ground and soluble coffees prior to evaluation of their intake and chemical fractionation, *Food Chemistry* 263 (2018) 171-179.
- [7] E. Stelmach, P. Pohl, A. Szymczycha-Madeja, Evaluation of the bioaccessibility of Ca, Fe, Mg and Mn in ground coffee infusions by *in vitro* gastrointestinal digestion, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 25 (2014) 1993-1999.
- [8] E. Stelmach, A. Szymczycha-Madeja, P. Pohl, A simplified determination of total concentrations of Ca, Fe, Mg and Mn in addition to their bioaccessible fraction in popular instant coffee brews, *Food Chemistry* 197 (2016) 388-394.
- [9] E. Stelmach, P. Pohl, A. Szymczycha-Madeja, The content of Ca, Cu, Fe, Mg and Mn and antioxidant activity of green coffee brews, *Food Chemistry* 182 (2015) 302-308.
- [10] M. Welna, A. Szymczycha-Madeja, Evaluation of optimal conditions for determination of low tin content in fresh and canned tomato samples using hydride generation inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Food Analytical Methods* 7 (2014) 127-134.
- [11] M. Welna, A. Szymczycha-Madeja, Improvement of sample preparation procedure for multi-elemental determination in Brazil nuts by ICP-OES, *Food Additives and Contaminants: Part A* 31 (2014) 658-665.
- [12] M. Welna, A. Szymczycha-Madeja, Effect of sample preparation procedure for the determination of As, Sb and Se in fruit juices by HG-ICP-OES, *Food Chemistry* 159 (2014) 414-419.
- [13] M. Welna, A. Szymczycha-Madeja, P. Pohl, Optimization of sample preparation of carrot-fruit juice for determination of antimony, arsenic, and selenium by hydride generation - inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Analytical Letters* 47 (2014) 2104-2119.
- [14] M. Welna, A. Szymczycha-Madeja, P. Pohl, A comparison of samples preparation strategies in the multi-elemental analysis of tea by spectrometric methods, *Food Research International* 53 (2013) 922-930.
- [15] M. Welna, A. Szymczycha-Madeja, E. Stelmach, P. Pohl, Speciation and fractionation of elements in tea infusions, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 42 (2012) 349-365.
- [16] P. Pohl, E. Stelmach, M. Welna, A. Szymczycha-Madeja, Determination of the elemental composition of coffee using instrumental methods, *Food Analytical Methods* 6 (2013) 598-613.
- [17] A. Szymczycha-Madeja, M. Welna, D. Jedryczko, P. Pohl, Developments and strategies in the spectrochemical elemental analysis of fruit juices, *TrAC. Trends in Analytical Chemistry* 55 (2014) 68-80.
- [18] P. Pohl, A.P. Dzimitrowicz, D. Jedryczko, A. Szymczycha-Madeja, M. Welna, P. Jamroz, The determination of elements in herbal teas and medicinal plant formulations and their tisanes, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 130 (2016) 326-335.
- [19] P. Pohl, A. Bielawska-Pohl, A.P. Dzimitrowicz, K. Greda, P. Jamroz, A. Lesniewicz, A. Szymczycha-Madeja, M. Welna, Understanding element composition of medicinal plants used in herbalism - a case study by analytical atomic spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 159 (2018) 262-271.
- [20] A. Szymczycha-Madeja, P. Jamroz, M. Welna, A. Lesniewicz, P. Pohl, Advances in assessing the elemental composition of distilled spirits using atomic spectrometry methods, *TrAC. Trends in Analytical Chemistry* 64 (2015) 127-135.
- [21] P. Pohl, A. Bielawska-Pohl, A. Dzimitrowicz, P. Jamroz, M. Welna, A. Lesniewicz, A. Szymczycha-Madeja, Recent achievements in element analysis of bee honeys by atomic and mass spectrometry methods, *TrAC. Trends in Analytical Chemistry* 93 (2017) 67-77.
- [22] M. Welna, A. Szymczycha-Madeja, P. Pohl, Comparison of strategies for sample preparation prior to spectrometric measurements for determination and speciation of arsenic in rice, *TrAC. Trends in Analytical Chemistry* 65 (2015) 122-136.
- [23] P. Pohl, P. Jamroz, M. Welna, A. Szymczycha-Madeja, K. Greda, Chemical-vapor generation of transition metals through the reaction with tetrahydroborate in recent achievements in analytical atomic spectrometry, *TrAC. Trends in Analytical Chemistry* 59 (2014) 144-155.

Anna Szymczycha-Madeja