



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

AUTOREFERAT

Piotr Marek Kuś

Katedra i Zakład Farmakognozji i Leku Roślinnego
Wydział Farmaceutyczny z O. Analityki Medycznej
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wrocław, 2019

1. Imię i nazwisko

Piotr Marek Kuś

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2014 stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych w zakresie farmakognozji
Wydział Farmaceutyczny z O. Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich
we Wrocławiu (UMW)

Tytuł pracy doktorskiej: „*Charakterystyka fitochemiczna i klasyfikacja wybranych polskich
miodów oraz ocena ich aktywności biologicznej*”

Promotor: dr hab. Zbigniew Sroka, prof. nadzw.

2009 tytuł zawodowy magistra farmacji

Wydział Farmaceutyczny z O. Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich
we Wrocławiu

Tytuł pracy magisterskiej: „*Wyodrębnianie i oczyszczanie mangiferyny z *Belamcandae rhizoma* –
azjatyckiego surowca leczniczego*”

Promotor: prof. dr hab. Adam Matkowski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2015 – obecnie adiunkt w Katedrze i Zakładzie Farmakognozji i Leku Roślinnego

4. **Osiągnięcie naukowe*** (w rozumieniu art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dziennik Ustaw 2016, poz. 882 ze zmianami Dz. U. 2016, poz. 1311.):

a) **Tytuł osiągnięcia naukowego:**

Badania fitochemiczne produktów pszczelich i substancji roślinnych przetwarzanych przez pszczoły: tożsamość, jakość i różnorodność

b) **Lista publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (autor/autorzy, tytuł, nazwa czasopisma, rok publikacji, tom, strony).**

Podstawę osiągnięcia naukowego stanowi cykl dziesięciu powiązanych tematycznie publikacji oryginalnych (H1- H10):

H1. Piotr M. Kuś*, Maciej Włodarczyk, Carlo I.G. Tuberoso.: Nitrogen compounds in *Phacelia tanacetifolia* Benth. honey: first time report on occurrence of (-)-5-epi-lithospermoside, uridine, adenine and xanthine in honey
Food Chem. 2018 Vol.255; 332-339 (IF₂₀₁₇ = 4.946, MNiSW = 40 pkt)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu, wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie próbek, opracowanie metody, wykonanie eksperymentów, przygotowanie próbek, walidacja, identyfikacja składu, izolacja nie w pełni zidentyfikowanego związku), analizie i interpretacji danych, udziale w ustalaniu dokładnej struktury, przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 75%.

H2. Piotr M. Kuś*, Igor Jerković, Zvonimir Marijanović, Marina Kranjac, Carlo I.G. Tuberoso.: Unlocking *Phacelia tanacetifolia* Benth. honey characterization through melissopalynological analysis, color determination and volatiles chemical profiling
Food Res.Int. 2018 Vol.106; 243-253 (IF₂₀₁₇ = 3.520, MNiSW = 40 pkt)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie próbek, przygotowanie i analiza części próbek), analizie i interpretacji danych (opracowanie danych z chromatografii gazowej, analiza statystyczna) oraz przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 70%.

H3. Piotr M. Kuś*, Igor Jerković, Zvonimir Marijanović, Carlo I.G. Tuberoso.: Screening of Polish fir honeydew honey using GC/MS, HPLC-DAD, and physical-chemical parameters: benzene derivatives and terpenes as chemical markers
Chem.Biodivers. 2017 Vol.14 no.9; e1700179 (IF₂₀₁₇ = 1,617, MNiSW = 20 pkt)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie próbek, opracowanie i interpretacja wyników pomiarów chromatograficznych GC) oraz przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 50%.

H4. Igor Jerković, Piotr M. Kuś.: Headspace solid-phase microextraction and ultrasonic extraction with the solvent sequences in chemical profiling of *Allium ursinum* L. honey
Molecules 2017 Vol.22 no.11; 1909 (IF₂₀₁₇ = 3,098, MNiSW = 30 pkt)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i wykonaniu części eksperymentalnej (opracowanie sposobu i przygotowanie próbek) oraz udziale w interpretacji danych, identyfikacji związków i przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 50%.

H5. Piotr M. Kuś*, Zvonimir Marijanović, Igor Jerković.: Evaluation of HS-SPME and ultrasonic solvent extraction for monitoring of plant flavours added by the bees to herbhoneys: traceability biomarkers
Food Addit. Contam. Part A-Chem. 2015 Vol.32 no.11; 1761-1771 (IF₂₀₁₅ = 1,878, MNiSW = 25 pkt)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie i przygotowanie próbek) oraz opracowaniu i interpretacji danych, identyfikacji związków i przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 80%.

H6. Piotr M. Kuś*, Igor Jerković.: New Sample Preparation Method for Honey Volatiles Fingerprinting Based on Dehydration Homogeneous Liquid-Liquid Extraction (DHLLE)
Molecules 2018 Vol.23 no.7, 1769 (IF₂₀₁₆ = 3,098, MNiSW = 30 pkt)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu, wykonaniu części eksperymentalnej (opracowanie metody, wykonanie eksperymentów, przygotowanie próbek, walidacja), analizie i interpretacji danych (opracowanie danych z chromatografii gazowej), przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 80%.

H7. Piotr M. Kuś*, Saskia van Ruth.: Discrimination of Polish unifloral honeys using overall PTR-MS and HPLC fingerprints combined with chemometrics
LWT-Food Sci. Technol. 2015 Vol.62 no.1 part 1; 69-75 (IF₂₀₁₅ = 2,711, MNiSW = 35 pkt)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie, przygotowanie, analiza próbek), udziale w opracowaniu i interpretacji danych oraz przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 80%.

H8. Igor Jerković, Zvonimir Marijanović, **Piotr M Kuś**, Carlo I.G. Tubero.: Comprehensive study of mediterranean (Croatian) propolis peculiarity: headspace, volatiles, anti-varroa-treatment residue, phenolics, and antioxidant properties
Chem. Biodivers. 2016 Vol.13 no.2; 210-218 (IF₂₀₁₆ = 1,440, MNiSW = 20 pkt)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na interpretacji danych i udziale w przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 20%.

H9. Piotr M. Kuś*, Igor Jerković, Martina Jakovljević, Stela Jokić.: Extraction of bioactive phenolics from black poplar (*Populus nigra* L.) buds by supercritical CO₂ and its optimization by response surface methodology
J.Pharm.Biomed.Anal. 2018 Vol.152; 128-136 (IF₂₀₁₇ = 2,831, MNiSW = 35 pkt)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (opracowanie metody analitycznej UHPLC-DAD, przeprowadzenie oznaczeń chromatograficznych i kolorymetrycznych), opracowaniu i interpretacji wyników pomiarów, udział w analizie danych i interpretacji oraz na przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 70%.

H10. Piotr M. Kuś*, Piotr Okińczyc, Martina Jakovljević, Stela Jokić, Igor Jerković.: Development of supercritical CO₂ extraction of bioactive phytochemicals from black poplar (*Populus nigra* L.) buds followed by GC-MS and UHPLC-DAD-QqTOF-MS

J.Pharm.Biomed.Anal. 2018 Vol.158; 15-27 (IF₂₀₁₇ = 2,831, MNiSW = 35 pkt)

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (opracowanie metody analitycznej UHPLC-DAD-QqTOF-MS, przeprowadzenie oznaczeń, pozyskanie olejku eterycznego), opracowaniu i interpretacji wyników pomiarów chromatograficznych (GC i LC), udziale w analizie i interpretacji pozostałych danych oraz na przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 70%.

*** - artykuły, w których jestem autorem korespondującym**

Współczynnik wpływu (IF) i liczba punktów MNiSW za publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe:

Sumaryczny współczynnik wpływu (IF): **27,97**

Łączna suma punktów MNiSW: **310**

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania:

I. Wprowadzenie i motywacja badań

Od wieków, substancje pochodzenia naturalnego były wykorzystywane przez człowieka w celach leczniczych i odżywczych, ale także jako inspiracja do rozwijania nowych leków. Podobnie do ludzi, również zwierzęta używają i przekształcają preferowane substancje roślinne w celu konsumpcji czy konstrukcji swoich gniazd. Spożywają te, które poprawiają ich kondycję, a także stosują je w celach leczniczych, w prewencji chorób (np. aby zwalczać pasożyty, bakterie i wirusy). Nauka zajmująca się samoleczeniem zwierząt została nazwana “zoofarmakognozą”, w analogii do farmakognozji, która jest nauką o lekach pochodzących z roślin i innych źródeł naturalnych [1]. Szczególnym przykładem są pszczoły miodne, które zgodnie ze swoimi preferencjami wykorzystują i zbierają specyficzne, wartościowe substancje pochodzenia roślinnego, takie jak nektar kwiatowy, spadź, pyłek, balsamy i żywice. Substancje te pełnią rolę wartościowego pożywienia, ale też są używane jako substancje konstrukcyjne, np. propolis jest stosowany do uszczelniania ula i profilaktyki infekcji [2,3]. Różne produkty pszczele, takie jak miód, pyłek pszczeli, pierzga, propolis (które są przetworami roślinnymi wytworzonymi przez pszczoły) bądź воск, były stosowane od prehistorii zarówno jako żywność jak i tradycyjne leki lub ich składniki [2–4]. Propolis wykazuje m.in. znaczące działanie przeciwutleniające, przeciwo proliferacyjne, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, a także wspiera regenerację tkanek i leczenie ran, dlatego m.in. znajduje liczne zastosowania np. w dermatologii [5–7]. Produkty pszczele znalazły również liczne zastosowania w medycynie tradycyjnej i konwencjonalnej oraz farmacji i technologii farmaceutycznej. Miód i воск pszczeli są ujęte w bieżącym wydaniu Farmakopei Europejskiej (monografie 01/2008:2051 and 01/2008:0069, 01/2008:0070). Jednakże, odmiany miodu nie są rozróżnione, mimo że ich ogólnie pojęte właściwości (w tym aktywność) znacznie się różnią zależnie od pochodzenia botanicznego. Ta zmienność dotyczy również innych produktów pszczelich [8–10]. Ostatnie badania wskazują, że szczególnie interesujące są m.in. aktywność przeciwutleniająca, przeciwzapalna, przeciwbakteryjna oraz poprawiająca gojenie ran, wykazywane przez miód i propolis [5,6,11,12]. W ostatnich latach, wartość miodu i innych produktów pszczelich wydaje się być ponownie odkrywana na nowo. Na rynku, pojawiają się liczne produkty zawierające miód jako główny składnik czynny bądź pomocniczy, w tym m.in. miody medyczne i opatrunki na rany. Badania nad miodem pozwoliły na rozróżnienie jego bardziej i mniej aktywnych odmian [13], spośród nich m.in. miodu chabrowego, jodłowego, kasztanowego i manuka [14–17]. Niektóre z nich (np. miód manuka, kasztanowy) są obecne na rynku w formie miodów medycznych i opatrunków na rany. Podobnie, miód jodłowy wykazał wysoki potencjał (aktywność przeciwbakteryjna, przeciwbiofilmowa, hamująca MMP-9) do zastosowania medycznego, również w badaniach klinicznych (leczenie zakażonych przetok, profilaktyki zapalenia wnętrza gałki ocznej) [15,17–22]. Jest to szczególnie interesujące, gdyż produkty pszczele nie tylko są skuteczne przeciwko wyizolowanym szczepom klinicznym, w tym lekoopornym szczepom chorobotwórczych bakterii i grzybów, ale także wspierają gojenie zainfekowanych ran [23,24]. Potrzeba rozwijania takich produktów, użytecznych jako alternatywne, lub uzupełniające leczenie różnych schorzeń zwiększa się z rosnącą lekoopornością i wzrastającą liczbą przypadków niepowodzenia konwencjonalnej terapii [12,19,24].

Miód jest otrzymywany przez pszczoły poprzez zbiór nektaru lub spadzi, mieszanie ze śliną, odparowanie, natomiast propolis powstaje z różnych wosków, żywic, balsamów i innych wydzielin roślinnych. Produkty pszczele w dużej mierze zależą więc od dostępnych danym okresie i lokalizacji źródeł botanicznych. Ze względu na to, cechują się one wyraźnym zróżnicowaniem [6,8]. Skutkuje to również znaczną zmiennością aktywności biologicznej, która jest ściśle powiązana ze składem, co dla niektórych odmian miodu pozostaje nadal niezbadane. W kilku badaniach (w większości nie ujętych w prezentowanym cyklu), stwierdziłem bardzo duże zróżnicowanie aktywności (np. przeciwbakteryjnej, przeciwutleniającej) analizowanych próbek, związane z odmiennym pochodzeniem botanicznym [8,24–27]. Wskazuje to na konieczność potwierdzania tożsamości i jakości konkretnych odmian. Z uwagi na brak możliwości pełnej kontroli nad pszczołami i źródłami z których one korzystają oraz ze względu na złożoność chemiczną produktów pszczelich, badanie składu i zróżnicowania tego typu substancji jest sporym wyzwaniem. Podobnie jak rozwój metod użytecznych w celu klasyfikacji, standaryzacji, oznaczenia tożsamości i jakości w oparciu o markery aktywne bądź analityczne, charakterystyczne profile chemiczne, parametry fizyko-chemiczne, itp. Obecnie rozróżnienie pomiędzy odmianami miodów jest oparte głównie na analizie pyłkowej i jest dość powszechne w przemyśle spożywczym. Posiada ono jednak wady i ograniczenia związane z potrzebą wykonania analiz przez wyspecjalizowanego analityka oraz ryzykiem fałszywie pozytywnych lub negatywnych wyników np. ze względu na niedoreprezentację lub nadreprezentację charakterystycznych ziaren pyłku [28]. Ostatnio, nowe metody takie jak chromatograficzny odcisk palca (ang. *fingerprinting*), markery chemiczne, metody wieloczynnikowe, itp. okazały się efektywne w celu potwierdzenia autentyczności i standaryzacji odmian miodu [29–31]. Niektóre z wspomnianych metod są obecnie stosowane w celu oznaczenia tożsamości i kontroli jakości leków roślinnych i są zawarte w wytycznych Europejskiej Agencji Leków bądź monografiach farmakopealnych.

Innym interesującym tematem jest próba stworzenia przetworów roślinnych inspirowanych produktami pszczelimi w celu uzyskania podobnych, produktów które mogłyby być jednocześnie bardziej powtarzalne, standaryzowane w łatwiejszy sposób oraz wolne od możliwych zanieczyszczeń z uwagi na przygotowanie kontrolowanych warunkach. Przykładem takich produktów biotechnologicznych uzyskanych z pomocą pszczół są ziołomiody. Produkty te są dostępne na rynku, a uzyskiwane poprzez karmienie pszczół syropami wzbogaconymi w ekstrakty roślinne. Okazało się, że wykazują znaczące działanie przeciwutleniające oraz przeciwbakteryjne [32,33]. Niemniej jednak, profil chemiczny tego typu produktów, które już są dostępne na rynku nie został jeszcze w pełni scharakteryzowany.

Propolis, podobnie do miodu, jest również bardzo zmiennym produktem z uwagi na różną dostępność substancji źródłowych [6], ponadto może być zanieczyszczony różnymi substancjami stosowanymi przez pszczelarzy w celu wyeliminowania infekcji w ulach, np. tymolem bądź innymi substancjami [9], co może być ograniczeniem biorąc pod uwagę potencjalne zastosowanie medyczne. Z uwagi na fakt, iż najbardziej powszechny i najbardziej aktywny typ propolisu w Europie pochodzi z topoli czarnej [34] interesującym sposobem by uzyskać bardziej powtarzalny, podobny produkt mogłaby być ekstrakcja jej pąków, naturalnego źródła propolisu. Takie próby zostały podjęte przez innych badaczy, z użyciem różnych metod włączając w to ekstrakcję wodą i CO₂ nadkrytycznym, jednakże proces ten nie był zoptymalizowany i nie był nakierowany na maksymalizację ekstrakcji najbardziej aktywnych

związków [35,36]. Podejście skupiające się na zoptymalizowanej ekstrakcji (z użyciem metody przyjaznej środowisku i akceptowalnej z punktu widzenia bezpieczeństwa do użytku przez ludzi) z substancji roślinnej, może zapewnić bardziej powtarzalne preparaty do zastosowań medycznych. Może to zostać osiągnięte z zastosowaniem ekstrakcji CO₂ w fazie nadkrytycznej i optymalizacji tego procesu z użyciem statystycznej metody projektowania eksperymentów. Takie podejście może pozwolić uzyskać wartościowy ekstrakt bogaty w nietlotne (głównie flawonoidy, fenolokwasy) ale również lotne, aktywne składniki (głównie seskwiterpeny). Te ostatnie, są mniej obfite w przeciętnych ekstraktach propolisu uzyskanych z zastosowaniem metody, które obejmują odparowanie rozpuszczalników o stosunkowo wysokiej temperaturze wrzenia, takich jak woda czy etanol. Warto wspomnieć, że przetwory z pąków topoli znajdowały zastosowanie już od czasów starożytnych np. w postaci maści topolowej stosowanej m.in. w leczeniu chorób skórnych i hemoroidów [37].

Powyżej wspomniane zagadnienia, wskazują na potrzebę oceny różnych rodzajów i gatunków produktów pszczelich, zbadania ich chemii, znalezienia połączenia między pochodzeniem botanicznym, składem i aktywnością, poszukiwania metod pozwalających na standaryzację, odróżnianie, potwierdzanie autentyczności, kontrole jakości. Ponadto, istnieje potrzeba badania i rozwoju nowych preparatów inspirowanych naturą, o wysokiej powtarzalności, co jest ważnym krokiem pozwalającym na odblokowanie ich potencjału dla dalszych badań i skutecznych nowych zastosowań.

II. Cel i zakres badań

Cele:

- Rozwój nowych i istniejących metod stosowanych w ocenie jakości, tożsamości i klasyfikacji wybranych, wcześniej nie badanych produktów pszczelich i substancji roślinnych przetwarzanych przez pszczoły.
- Rozwój nowych metod ekstrakcji frakcji miodu, opartych na zasadach QuEChERS (ang. *Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe* – szybki, prosty, tani, wydajny, wytrzymały, bezpieczny) i ekologii (mniejsze zużycie substancji szkodliwych).
- Uzyskanie nowej wiedzy o składzie badanych substancji, poprzez szczegółową analizę fitochemiczną z użyciem współczesnych chromatograficznych, spektrometrycznych i spektroskopowych technik instrumentalnych:.
- Zastosowanie chemometrii w powiązaniu ze szczegółowymi profilami chemicznymi, danymi fizykochemicznymi bądź chemicznymi „odciskami palca” w celu klasyfikacji i kontroli jakości miodów odmianowych.
- Oznaczenie charakterystycznych profili chemicznych (z uwzględnieniem fazy nadpowierzchniowej, związków lotnych /półlotnych i/lub nietlotnych) wybranych, niezbadanych miodów odmianowych.
- Badanie profili fitochemicznych (z uwzględnieniem fazy nadpowierzchniowej, lotnych/półlotnych i celowanej analizy związków nietlotnych) wybranych próbek propolisu, ziołomiodów i ekstraktów pąków topoli.
- Poszukiwanie markerów chemicznych i związków bioaktywnych w próbkach.
- Uzyskanie zoptymalizowanych ekstraktów pąków topoli mogących znaleźć zastosowanie jako substancja czynna.

Zasięg / zakres badań:

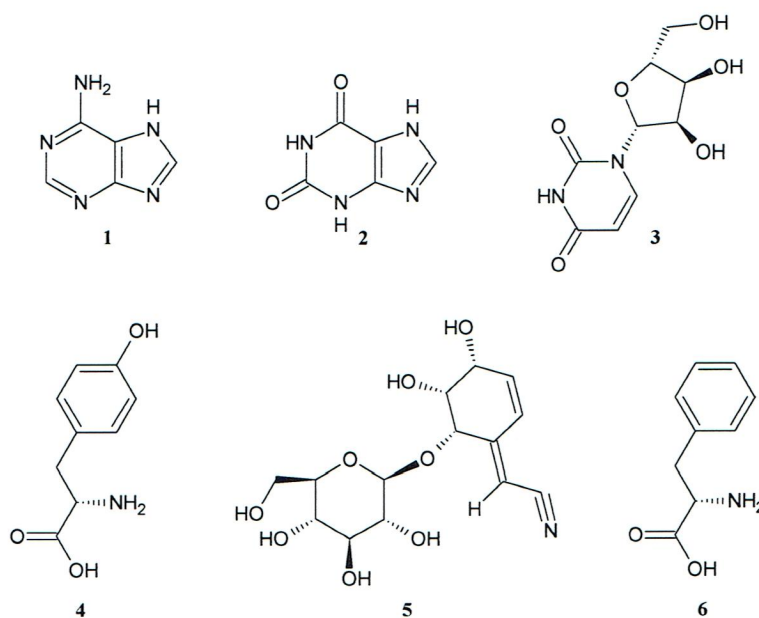
- Badanie profili chemicznych wybranych miodów odmianowych (faceliowy, ze spadzi jodłowej, z czosnku niedźwiedziego) za pomocą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS) (**H2, H3, H4**), chromatografii cieczowej z matrycą diodową (LC-DAD) i/lub spektrometrią mas (LC-DAD-QqTOF-MS) (**H1, H3**), określenie związków markerowych i identyfikacja związków aktywnych biologicznie, badanie wybranych, typowych parametrów fizykochemicznych.
- Analiza wcześniej niezbadanych lotnych profili chemicznych różnych ziołomiodów (sosnowy, tymiankowy, głogowy, aloesowy, pokrzywowy, kawowy, cytrynowy) dostępnych na rynku (**H5**). Porównanie wyników z danymi literaturowymi dotyczącymi odpowiadającym im naturalnym miodom odmianowym i roślinom, identyfikacja markerów pochodzenia i możliwych związków o aktywności biologicznej.
- Rozwój nowej, efektywnej, „zielonej” (tj. przyjaznej środowisku) metody ekstrakcji związków lotnych z miodu (**H6**) do analiz GC-MS. Skupienie się na rozwoju kosztowo efektywnej metody opartej na małych objętościach i ekstrakcji ciecz-ciecz z użyciem mieszających się cieczy, zaadaptowanej do ekstrakcji związków lotnych i półlotnych z miodu, które mogłyby być użyte do jakościowych badań przesiewowych. Uwzględnienie selektywnej ekstrakcji i oczyszczania ekstraktów w celu uniknięcia nadmiaru substancji zakłócających analizę i aby zapewnić zadowalającą ekstrakcję istotnych związków lotnych oraz dobrą jakość uzyskanych chromatogramów.
- Rozwój nowych i zmodyfikowanych metod LC-DAD / LC-DAD-QqTOF-MS (**H1**) do analiz różnych grup związków np. w miodzie i pąkach topoli.
- Zastosowanie metod wieloczynnikowych w połączeniu z GC-MS, spektrometrii masowej z jonizacją poprzez przeniesienie protonu (PTR-MS) i HPLC-DAD w celu rozróżniania, klasyfikacji i oceny jakości odmian miodu (**H2, H7**). Ocena danych za pomocą analizy statystycznej w celu odnalezienia trendów i określania cech próbek odmianowych, w oparciu o analizę wieloczynnikową (**H2**). Rozwój metody klasyfikacyjnej opartej na całkowitych chemicznych odciskach palca /profilach chemicznych uzyskanych różnymi technikami analitycznymi i chemometrii, w celu rozróżniania pochodzenia botanicznego polskich miodów (**H7**).
- Badanie składu i bioróżnorodności propolisu (**H8**) włączając w to zastosowanie różnych metod izolacji związków lotnych, monitorowanie pozostałości naturalnego akarycydu stosowanego w zwalczaniu warrozy (tymol), ocenę aktywności przeciwutleniającej, składu (testy kolorymetryczne, celowana analiza LC-DAD) oraz badanie możliwych korelacji między zidentyfikowanymi związkami a źródłami naturalnymi.
- Badanie składu fitochemicznego pąków topoli z użyciem UHPLC-DAD, UHPLC-DAD-QqTOF-MS i GC-MS. Rozwój zoptymalizowanych warunków w celu uzyskania ekstraktów bogatych w biologicznie aktywne związki z zastosowaniem „zielonej”, efektywnej metody (ekstrakcja CO₂ nadkrytycznym) (**H9, H10**). Optymalizacja procesu ekstrakcji z zastosowaniem metody powierzchni odpowiedzi (RSM) opartej na różnych grupach związków, wydajności ekstrakcji, aktywności przeciwutleniającej. Ocena składu uzyskanych ekstraktów, w porównaniu z odpowiadającym olejkiem eterycznym, danymi literaturowymi na temat podobnych produktów, propolisu typu topolowego i aktywności głównych zidentyfikowanych związków.

III. Podsumowanie głównych wyników opisanych w publikacjach stanowiących osiągnięcie naukowe:

H1. Piotr M. Kuś*, Maciej Włodarczyk, Carlo I.G. Tuberoso.: Nitrogen compounds in *Phacelia tanacetifolia* Benth. honey: first time report on occurrence of (-)-5-*epi*-lithospermoside, uridine, adenine and xanthine in honey, Food Chem. 2018 Vol.255; 332-339.

Miód faceliowy jest pozyskiwany z nektaru facelii błękitnej (*Phacelia tanacetifolia* Benth.), jednorocznej rośliny należącej do rodziny Boraginaceae - ogórecznikowatych (również klasyfikowana w rodzinie Hydrophyllaceae – faceliowate), pochodzącej z terenu Kalifornii i Teksasu [38,39]. Roślina ta jest wykorzystywana jako roślina okrywowa, nawóz zielony i doskonały pożytek pszczeleli dostarczający wysoki plon nektaru w każdej ciepłej porze roku [38–40]. Ostatnio, zyskuje ona większą popularność jako nawóz zielony, stosowany szczególnie w rolnictwie organicznym bądź jako pasza dla zwierząt, która może być uprawiana jako międzyplon bądź poplon, nadający się do uprawy bezorkowej [38–41]. W ten sposób, zwiększona dostępność dużych monokultur tej doskonałej rośliny nektarodajnej pozwala pozyskiwać częściej jednokwiatowy miód faceliowy, który nadal jest dość rzadką odmianą. Dodatkowo, wcześniejsze badania ujawniły, że niektóre próbki tej odmiany wykazywały znaczące działanie przeciwbakteryjne [26]. Dlatego też coraz bardziej aktualnym problemem staje się badanie jego składu pod kątem potencjalnie korzystnych związków, jak również markerów pochodzenia botanicznego przydatnych do zapewnienia jego jakości. Dotychczas, niewiele było wiadomo na temat składu chemicznego tej odmiany.

Zakres badań obejmował scharakteryzowanie profilu fitochemicznego, identyfikację i oznaczenie ilościowe głównych nietlonych składników odmianowego miodu faceliowego poprzez celowaną analizę UHPLC-DAD-QqTOF-MS, MS/MS i NMR w celu identyfikacji nieznanymi związków oraz w poszukiwaniu chemicznych markerów pochodzenia botanicznego i związków o aktywności biologicznej w miodzie. Skład miodu z facelii błękitnej został poddany analizie z użyciem nowo rozwiniętych metod UHPLC-DAD i UHPLC-DAD-QqTOF-MS. Celowana analiza ujawniła 6 głównych związków azotowych (Rycina 1) włączając w to aromatyczne aminokwasy (tyrozyna, 4; fenyloalanina, 6), pochodne puryn (adenina, 1; ksantyna, 2), nukleozyd (urydyna, 3) oraz rzadki niecyjanogeny cyjanoglukozyd, (-)-5-*epi*-litospermozyd ((2Z)-2-[(4R,5R,6S)-4,5-dihydroksy-6-(β-D-glukopiranozylo)oksycycloheks-2-en-1-ylideno]acetonitryl, 5). Ich tożsamość została potwierdzona różnymi technikami analitycznymi: HRMS, ko-chromatografię z wzorcem oraz kompleksowe analizy NMR. Wszystkie związki, oprócz aminokwasów, zostały opisane i oznaczone w miodzie po raz pierwszy. Zawartość wspomnianych związków (Tabela 1) była zbadana w 16 próbkach jednokwiatowych miodów faceliowych: adenina (18.45 ± 4.63 mg/kg), ksantyna (10.53 ± 2.98 mg/kg), urydyna (42.84 ± 9.26 mg/kg), tyrozyna (14.66 ± 10.22 mg/kg), (-)-5-*epi*-litospermozyd (70.61 ± 31.37 mg/kg) i fenyloalanina (20.41 ± 11.99 mg/kg). Zawartość (-)-5-*epi*-litospermozydu była istotnie skorelowana z zawartością procentową pyłku *P. tanacetifolia* ($R^2 = 0.5612$, $p < 0.001$) i została zaproponowana jako potencjalny marker pochodzenia botanicznego dla miodu faceliowego. (-)-5-*epi*-Litospermozyd może wykazywać aktywności biologiczne, jego izomery wzmagają aktywność antybiotyków oraz działały przeciwnowotworowo [42,43]. Według piśmiennictwa, urydyna działa nootropowo, polepsza pamięć, zdolność uczenia się, nastrój, redukuje deficyty poznawcze, ale jest również opatentowana w profilaktyce i leczeniu niektórych nowotworów [44–49]. Zawartość urydyny w miodzie faceliowym jest zbyt mała dla zastosowania strictly medycznego, ale może działać korzystnie jako źródło tego związku w diecie.



Rycina 1. Struktury związków azotowych zidentyfikowanych w miodzie z *Phacelia tanacetifolia* Benth.

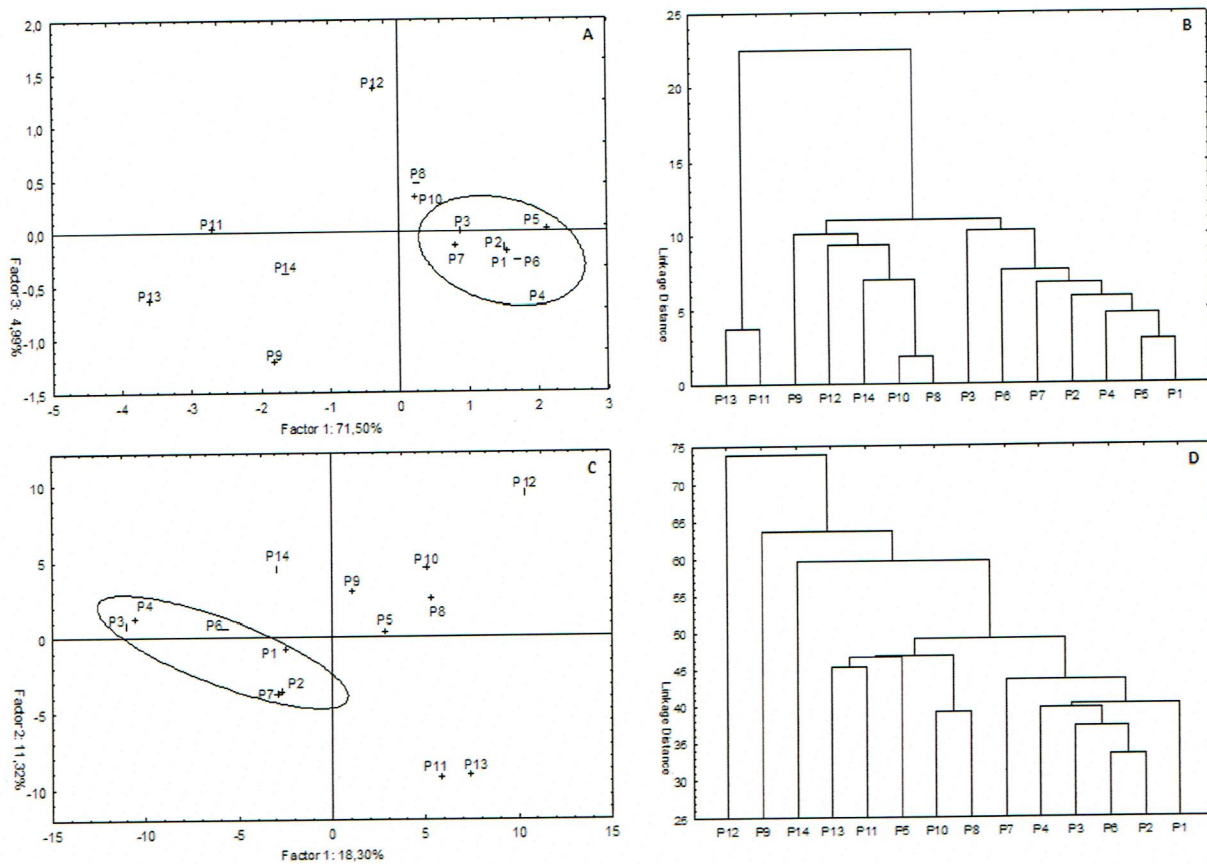
Tabela 1. Zidentyfikowane związki azotowe w próbkach miodu z *Phacelia tanacetifolia* Benth.

Próbka	pyłek <i>Phacelia</i> (%)	Adenina (mg/kg) (1)	Ksantyna (mg/kg) (2)	Urydyna (mg/kg) (3)	Tyrozyna (mg/kg) (4)	(-)-5- <i>epi</i> - Litospermyd (mg/kg) (5)	Fenylalanina (mg/kg) (6)
Ph1	74	20.40 ± 0.01	14.70 ± 0.24	57.23 ± 0.41	17.35 ± 1.50	43.45 ± 0.60	30.04 ± 1.23
Ph2	79	14.56 ± 0.05	8.14 ± 0.19	40.35 ± 0.14	12.65 ± 0.81	129.98 ± 0.72	11.60 ± 0.24
Ph3	63	23.33 ± 0.27	11.66 ± 0.25	52.32 ± 0.23	10.42 ± 2.46	43.56 ± 0.04	16.17 ± 1.08
Ph4	61	20.79 ± 0.18	10.82 ± 0.23	48.88 ± 0.01	9.80 ± 1.84	41.58 ± 0.04	14.98 ± 2.80
Ph5	79	26.59 ± 0.01	16.00 ± 0.19	44.94 ± 0.30	11.96 ± 1.11	70.77 ± 0.49	21.64 ± 0.85
Ph6	77	23.31 ± 0.29	13.64 ± 0.19	55.47 ± 0.29	10.50 ± 0.12	60.79 ± 0.32	17.76 ± 1.10
Ph7	77	12.26 ± 0.00	7.63 ± 0.00	33.32 ± 0.10	41.45 ± 0.42	128.79 ± 0.26	12.48 ± 0.49
Ph8	68	22.59 ± 0.00	10.89 ± 0.31	53.53 ± 0.21	19.64 ± 0.16	64.54 ± 0.43	24.17 ± 0.31
Ph9	69	14.08 ± 0.08	7.85 ± 0.14	38.19 ± 0.22	8.75 ± 0.40	71.49 ± 0.12	35.44 ± 0.39
Ph10	67	11.59 ± 0.02	8.84 ± 0.12	27.87 ± 0.59	4.08 ± 0.60	76.14 ± 0.02	5.58 ± 0.88
Ph11	66	15.55 ± 0.11	6.84 ± 0.17	37.28 ± 0.17	14.44 ± 1.21	48.66 ± 0.20	55.28 ± 0.21
Ph12	91	15.59 ± 0.10	9.42 ± 0.15	41.73 ± 0.14	9.03 ± 0.87	129.43 ± 0.09	22.06 ± 2.11
Ph13	78	20.63 ± 0.06	13.20 ± 0.18	38.49 ± 0.07	6.82 ± 1.38	69.83 ± 0.18	8.70 ± 1.25
Ph14	71	21.40 ± 0.05	12.41 ± 0.14	50.88 ± 0.04	8.59 ± 0.18	59.31 ± 0.09	15.50 ± 0.64
Ph15	64	19.59 ± 0.15	10.89 ± 0.31	33.59 ± 0.09	12.89 ± 4.18	51.58 ± 1.29	20.02 ± 1.23
Ph16	60	12.90 ± 0.30	5.58 ± 0.23	31.40 ± 0.37	36.24 ± 3.04	39.82 ± 0.66	15.15 ± 0.07
Min		11.59	5.58	27.87	4.08	39.82	5.58
Max		26.59	16.00	57.23	41.45	129.98	55.28
AV ± SD		18.45 ± 4.63	10.53 ± 2.98	42.84 ± 9.26	14.66 ± 10.22	70.61 ± 31.37	20.41 ± 11.99
LOD		0.14	0.18	0.33	0.37	0.28	0.28
LOQ		0.53	0.56	1.00	1.12	0.86	0.84

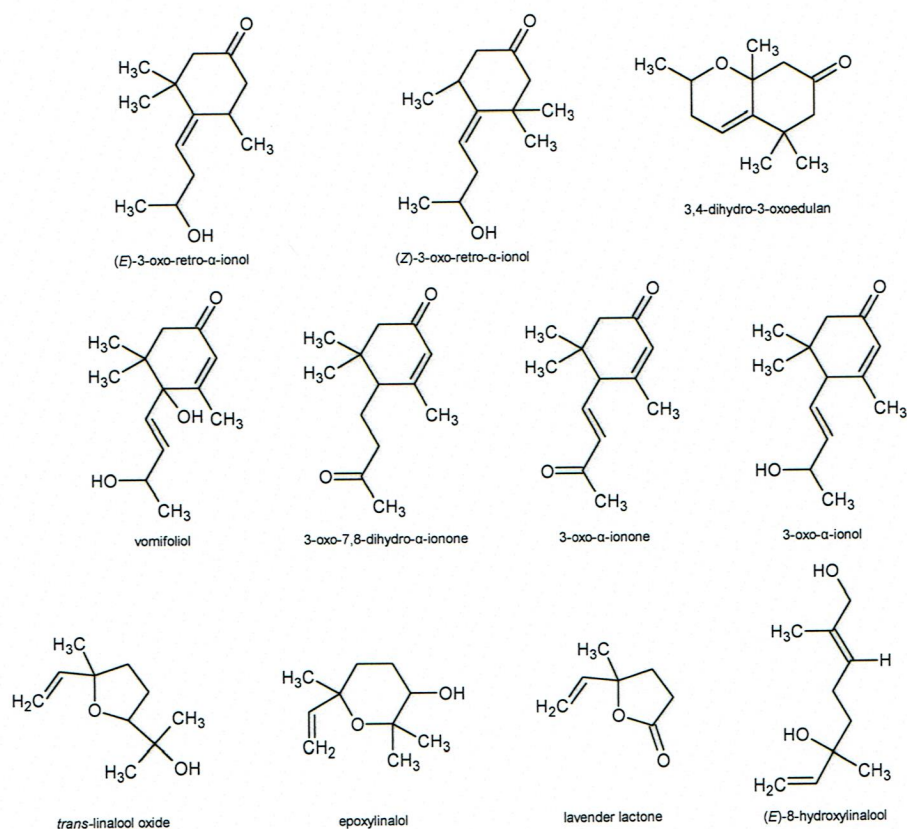
Zawartość związków jest wyrażona w miligramach na kilogram miodu jako średnia (AV) z trzech pomiarów ± odchylenie standardowe (SD).

H2. Piotr M Kuś*, Igor Jerković, Zvonimir Marijanović, Marina Kranjac, Carlo I.G. Tuberoso.: Unlocking *Phacelia tanacetifolia* Benth. honey characterization through melissopalynological analysis, color determination and volatiles chemical profiling, *Food Res.Int.* 2018 Vol.106; 243-253.

Celami pracy były: przebadanie próbek zebranych od zawodowych pszczelarzy, zadeklarowanych jako faceliowe, poprzez szczegółową analizę pyłkową, określenie charakterystyki barwy (koordynaty CIE $L^*a^*b^*C_{ab}^*h_{ab}^\circ$), chemicznych profili związków lotnych i półlotnych (poprzez zastosowanie komplementarnych technik: ekstrakcji rozpuszczalnikiem wspomaganej ultradźwiękami (USE), mikroekstrakcji fazy nadpowierzchniowej do fazy stałej (HS-SPME) i GC-MS ze szczególnym naciskiem na znalezienie potencjalnych biomarkerów chemicznych. Oprócz tego, dodatkowym zakresem badań była analiza uzyskanych danych z zastosowaniem różnych metod statystycznych w celu ukazania trendów i tworzenia się grup. Ponadto, aby wskazać najbardziej reprezentatywne próbki jednokwiatowe poprzez przecięcie grup utworzonych na podstawie różnych parametrów i aby przebadać korelację różnych parametrów miodu z zawartością pyłku w celu wskazania różnic między próbkami. Wybór grupy najczystszych próbek w oparciu o kombinację najwyższej zawartości procentowej pyłku, jednoczesnej jednolitości profilu chemicznego i koloru pozwala rozróżnić jednokwiatowe próbki od niepewnych, zanieczyszczonych innymi nektarami. Czternaście próbek miodów z *Phacelia tanacetifolia* Benth. zebranych w Polsce zostało scharakteryzowanych poprzez analizę melissopalinologiczną, określenie barwy (koordynaty CIE $L^*a^*b^*C_{ab}^*h_{ab}^\circ$) i składu związków lotnych. Te ostatnie zostały wyizolowane z zastosowaniem HS-SPME (dwa rodzaje włókien), USE (dwa różne rozpuszczalniki) i przebadane z użyciem GC-MS. W celu zobrazowania trendów i tendencji do tworzenia się grup oraz w celu wskazania najbardziej reprezentatywnych próbek odmianowych zastosowano analizę głównych składowych (PCA) i analizę skupień metodą drzewa hierarchicznego (HTC) (Rycina 2). Połączenie danych dotyczących parametrów kolorystycznych, udziału procentowego związków lotnych i zawartości pyłku pozwoliło na ustalenie cech jednokwiatowych miodów faceliowych. Charakteryzowały się one bardzo jasną, bladą, lekko zielonkawą barwą istotnie skorelowaną z zawartością pyłku *P. tanacetifolia*. Sześć próbek ze średnią zawartością charakterystycznego pyłku $74.9\% \pm 4.9$ i parametrami koloru ($L = 85.1$; $a^* = -0.8$; $b^* = 27.9$; $C_{ab}^* = 27.9$; $h_{ab}^* = 91.9$), które były istotnie skorelowane zostało wyszczególnionych. Łącznie 56 różnych związków lotnych zostało zidentyfikowanych w badanych próbkach. Profil substancji lotnych w fazie nadpowierzchniowej jest zdominowany przez pochodne linalolu. Wysoka zawartość tlenu *trans*-linalolu ($27.3\text{--}45.9\%$), który był istotnie skorelowany z zawartością pyłku, heksan-1-ol ($4.4\text{--}5.7\%$), lakton lawendowy ($0.8\% - 1.5\%$) były charakterystyczne dla ich fazy nadpowierzchniowej. Trzynastowęglowe norizoprenoidy, głównie (*E*)-/(*Z*)-3-okso-*retro*- α -jonol ($4.7\text{--}5.4\%$; $6.9\text{--}9.4\%$) i womifoliol ($9.0\text{--}13.0\%$) dominowały w ich ekstraktach (USE) i mogą być przydatne jako markery niespecyficzne (Rycina 3). Badania potwierdzają wcześniej zauważany problem znaczącego udziału różnych nektarów obecnych jako zanieczyszczenia, występujących w miodach faceliowych dostępnych na rynku, które to skutkują nie tylko zamianami w profilu fitochemicznym ale również modyfikacją barwy. Najbardziej obfitymi źródłami zanieczyszczających nektarów okazały się rośliny z rodziny kapustowatych oraz chaber bławatek. Związki siarkowe typowe dla nektaru roślin z rodziny kapustowatych, 3,4-dihydro-3-oksoedulan i pochodne *p*-cymenu charakterystyczne dla chabra bławatka zostały wykryte w próbkach zadeklarowanych jako odmianowe, nawet tych które zawierały $> 45\%$ pyłku *P. tanacetifolia*. Dlatego, minimalny poziom procentowy pyłku pozwalający na potwierdzenie odmianowości miodu faceliowego wymaga ustalenia na wyższym poziomie (np. $> 60\%$) i powinien być połączony z oznaczeniem także innych istotnych parametrów.



Rycina 2 Wykresy PCA i dendrogramy dla parametrów koloru (1A, 1B) oraz dla związków lotnych (1C, 1D) miodów z *Phacelia tanacetifolia* Benth.



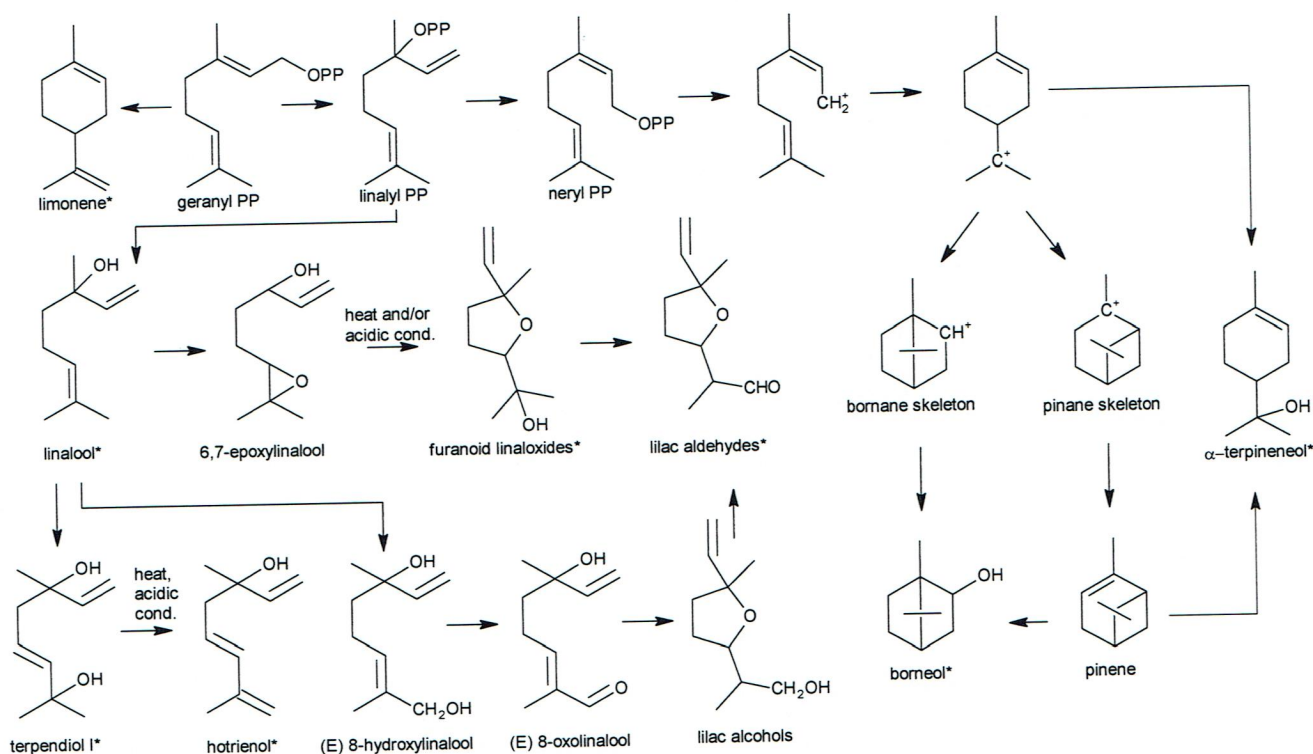
Rycina 3 Struktury wybranych związków wspomnianych w tekście.

H3. Piotr M Kuś*, Igor Jerković, Zvonimir Marijanović, Carlo I.G. Tuberoso.: Screening of Polish fir honeydew honey using GC/MS, HPLC-DAD, and physical-chemical parameters: benzene derivatives and terpenes as chemical markers, *Chem.Biodivers.* 2017 Vol.14 no.9; e1700179.

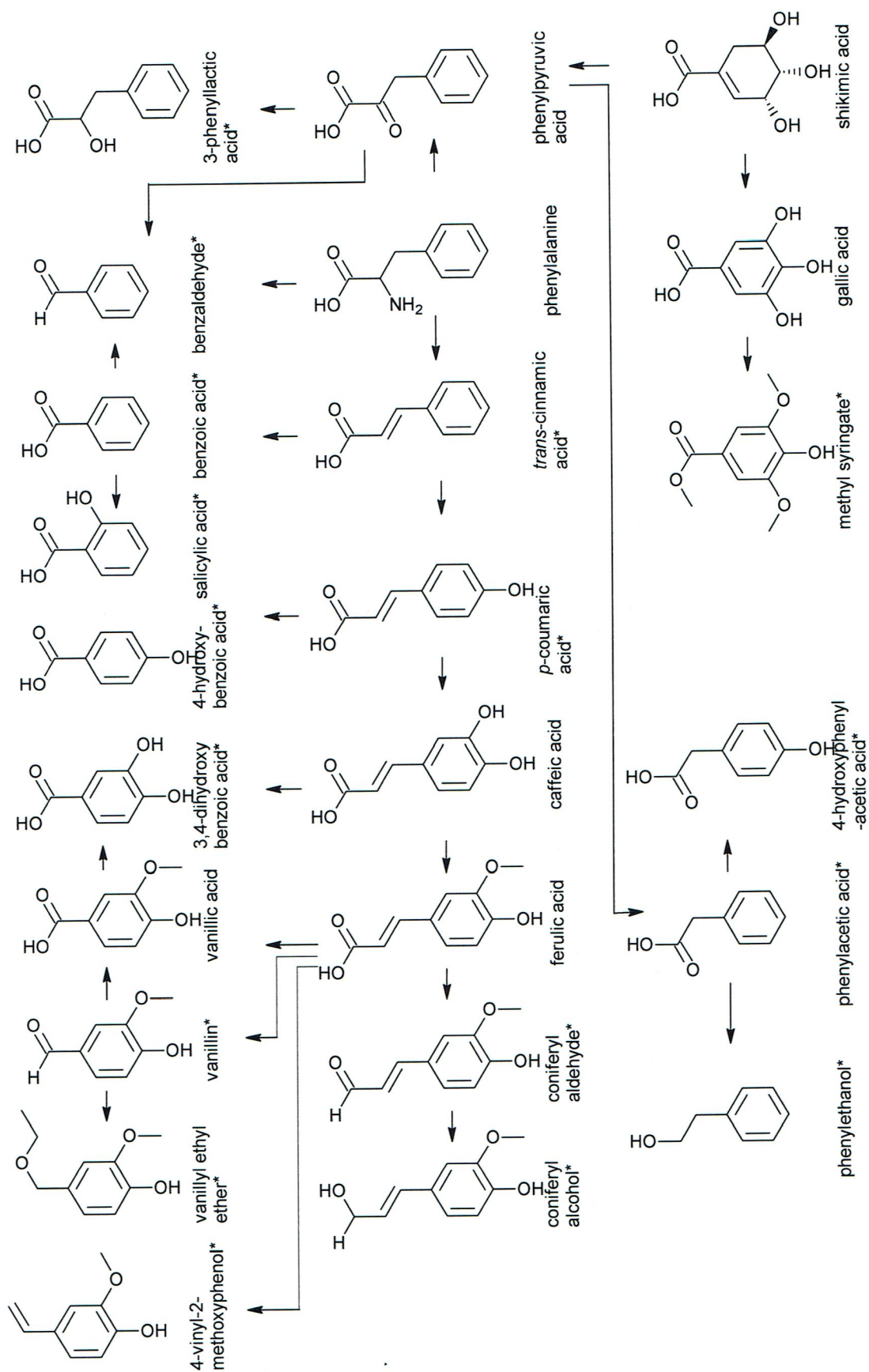
Miody spadziowe są produkowane przez pszczoły z bogatych w cukier wydzielin mszyc, które są sok z łyka zaatakowanych drzew. Znacznie różnią się one w składzie i właściwościach od bardziej powszechnych miódów nektarowych [50]. Miody te zwykle posiadają znaczną aktywność przeciwutleniającą i znaczny potencjał przeciwbakteryjny [51]. Z uwagi na to, ich znaczenie jako żywności funkcjonalnej oraz produktu leczniczego wzrasta wraz z nowymi odkryciami potwierdzającymi ich wartość praktyczną. Właściwości miodu są zmienne, w zależności od źródła botanicznego [17,52] które to dla miódów spadziowych jest jeszcze trudniejsze do potwierdzenia w porównaniu z miodami nektarowymi. Określenie pochodzenia botanicznego oparte na analizie pyłkowej nie może być zastosowane w tym przypadku. Miody spadziowe są zazwyczaj oznaczone jako pochodzące z drzew iglastych bądź liściastych, Miód ze spadzi jodłowej (*Abies alba* Mill.) (MSJ) jest jednym z bardziej znanych europejskich odmianowych miódów spadziowych. Charakteryzuje się on balsamicznym, ziołowym zapachem przypominającym żywicę [53], zielonkawymi, opalizującymi odcieniami koloru brązowego, delikatnym, słodkim smakiem z przyjemnym, delikatnie żywicznym posmakiem i aromatem oraz przewodnością powyżej 0.95 mS/cm [54]. Według doniesień ta odmiana spadzi posiada umiarkowanie-wysoką zawartość polifenoli oraz aktywność przeciwutleniającą [52,55,56]. MSJ ze Słowenii wykazywał wysoki potencjał przeciwbakteryjny przeciwko kilku szczepom bakterii [17] a Słowacki MSJ działał silnie przeciwko wielolekoopornym, szczepom klinicznym patogenu ran - *Stenotrophomonas maltophilia* [19] a także aktywność przeciw biofilmową [57]. MSJ i zawarte w nim związki fenolowe wykazują zdolność przeciwdziałania destrukcyjnym stanom zapalnym i przywracania normalnego gojenia się ran. Ekstrakt z miodu znacznie zredukował w keratocytach produkcję indukowanej TNF- α metaloproteiny-9 macierzy (MMP-9), która okazuje się być główną proteazą odpowiedzialną za degradację matrycy i czynników promujących wzrost w chronicznych ranach [15]. Ekstrakty greckiego MSJ, wykazywały znaczne hamowanie pierwszej cząstki adhezyjnej śródbłonna naczyniowego (VCAM-1) przy niskich stężeniach, ekspresję cząstki adhezyjnej indukowanej TNF- α oraz redukowały żywotność komórek nowotworu prostaty i piersi [52]. W warunkach klinicznych, MSJ został zastosowany z powodzeniem do leczenia zainfekowanych przetok pośladowodowych [20] i profilaktyki zapalenia wnętrza gałki ocznej [21]. Ponieważ właściwości fizykochemiczne i aktywność odmian miodu zależy głównie od pochodzenia botanicznego, poprawna klasyfikacja i metody pozwalające na potwierdzenie i standaryzację różnych odmian są bardzo ważne, szczególnie w przypadku miódów o potencjale medycznym. Jak wcześniej wspomniano, określenie pochodzenia botanicznego i jego czystości w przypadku miodu spadziowego nadal pozostaje wyzwaniem, trudniejszym niż w przypadku miódów nektarowych, ze względu na brak możliwości zastosowania rozwiązania w postaci analizy pyłkowej. Najbardziej obiecującą metodą charakteryzowania jest badanie profili związków lotnych i nielotnych, włączając w to poszukiwanie odpowiednich związków markerowych [29]. Dotychczas, w kilku badaniach podano profile fitochemiczne i parametry fizykochemiczne miódów ze spadzi jodłowej pochodzącej z różnych źródeł geograficznych, jednakże dane te są niespójne [53,56,58–64]. Ponadto, niewiele wiadomo o składzie fitochemicznym polskiego miodu ze spadzi jodłowej. Dopiero niedawno, dr hab. Rybak-Chmielewska, prof. nadzw. i wsp. opisała charakterystykę właściwości fizykochemicznych tej odmiany miodu oraz skład obecnych w nim cukrów [54].

Zakres badań obejmował szczegółowe oznaczenie składu związków lotnych w miodzie ze spadzi jodłowej (*Abies alba* Mill.) pochodzącym z Polski, za pomocą dwóch komplementarnych technik: HS-SPME i ekstrakcji wspomaganiej ultradźwiękami (USE) z zastosowaniem włókien

i rozpuszczalników o różnej polarności i analizą GC/MS oraz celowanymi analizami HPLC-DAD w poszukiwaniu istotnych markerów pochodzących z rośliny. Innymi celami było badanie typowych parametrów fizykochemicznych próbek miodu i porównanie danych uzyskanych dla próbek miodu z Polski z dostępnymi danymi literaturowymi o miodach jodłowych z różnych lokalizacji. Analiza GC-MS ekstraktów -HS-SPME i uzyskanych rozpuszczalnikami oraz celowana analiza HPLC-DAD polskiego miodu ze spadzi jodłowej (*Abies alba* Mill.) (MSJ), były zastosowane w celu określenia profili chemicznych i potencjalnych markerów pochodzenia botanicznego. Dodatkowo, typowe parametry fizykochemiczne zostały również określone. Wartości ustalone dla MSJ były następujące: przewodność (1.2 mS/cm), zawartość wody (16.7 g/100 g), pH (4.5), oraz koordynaty chromatyczne CIE ($L^* = 48.4$, $a^* = 20.6$, $b^* = 69.7$, $C^* = 72.9$, i $h^\circ = 73.5$). MSJ zawierał średnio-wysoką całkowitą zawartość związków polifenolowych (533.2 mg GAE/kg) oraz aktywność przeciwutleniającą (1.1 mmol TEAC/kg) oraz (3.2 mmol Fe^{2+} /kg) w testach DPPH i FRAP. Chemiczne profile były zdominowane przez pochodne benzenu (Rycina 4) pochodzące najprawdopodobniej z rośliny źródłowej: kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy (do 8.7 mg/kg, HPLC/r-r miodu), syringinian metylu (do 14.5%, GC/ekstrakty) i benzaldehyd (do 43.7%, GC/faza nadpowierzchniowa). Innymi markerami były terpeny włączając w to norizoprenoidy (4-hydroksy-3,5,6-trimetylo-4-(3-oksobut-1-enylo)cycloheks-2-en-1-on, do 20.3%, GC/ekstrakty) oraz monotereny, głównie pochodne linalolu (do 49%, GC/faza nadpowierzchniowa) oraz borneol (do 5.9%, GC/faza nadpowierzchniowa) (Rycina 5). Zastosowanie różnych technik pozwoliło na pełną charakterystykę MSJ. 4-Hydroksy-3,5,6-trimetylo-4-(3-oksobut-1-enylo)cycloheks-2-en-1-on, alkohol koniferylowy, borneol i benzaldehyd zostały po raz pierwszy zaproponowane jako markery do badań przesiewowych MSJ. Kwas protokatechowy może być potencjalnym markerem FHH niezależnie od pochodzenia geograficznego.



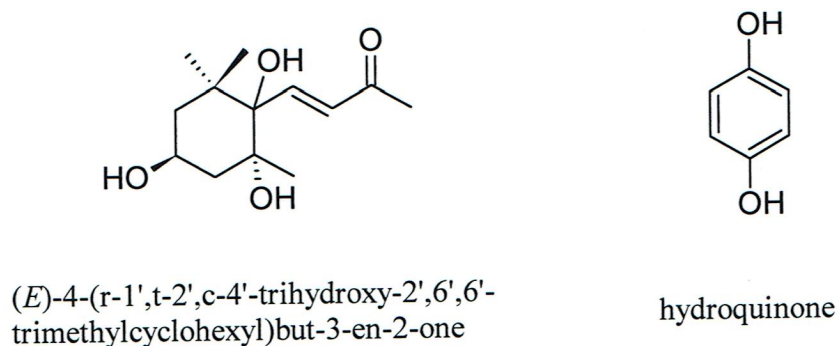
Rycina 4 Zależności między pochodnymi terpenów występującymi w miodzie jodłowym (związki oznaczone gwiazdką)



Rycina 5 Zależności między pochodnymi benzenu znalezionymi w miodzie ze spadzi jodłowej (związki zaznaczone gwiazdką)

H4. Igor Jerković, **Piotr M Kuś.**: Headspace solid-phase microextraction and ultrasonic extraction with the solvent sequences in chemical profiling of *Allium ursinum* L. honey, *Molecules* 2017 Vol.22 no.11; 1909.

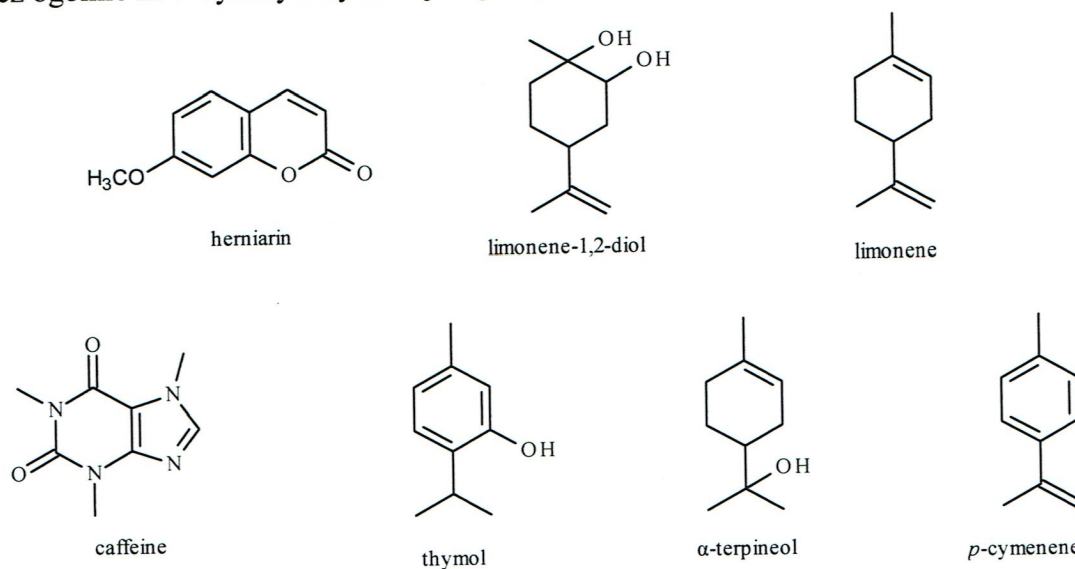
Przedmiotem tej pracy był niezbadany dotychczas profil związków lotnych i półlotnych (LZO) rzadkiego miodu z czosnku niedźwiedziego (*Allium ursinum* L.). Został on zbadany poprzez zastosowanie komplementarnych metod pozwalających na szeroki zakres związków: HS-SPME i USE i GC-FID/GC-MS. Faza nadpowierzchniowa była zdominowana przez pochodne linalolu: tlenki *cis*- i *trans*-linalolu (25.3%; 9.2%), hotrienol (12.7%), i linalol (5.8%). Oprócz bezpośredniej ekstrakcji chlorkiem metylenu oraz mieszaniną pentanu i eteru dietylowego, zastosowano dwie sekwencje ekstrakcji rozpuszczalnikami (I: pentan → eter dietylowy; II: pentan → pentan/eter dietylowy (1:2, v/v) → chlorek metylenu). Zaobserwowano znaczne różnice między uzyskanymi profilami chemicznymi. Ekstrakty uzyskane z użyciem eteru dietylowego zawierały hydrochinon (25.8–36.8%) i kwas 4-hydroksybenzoesowy (11.6–16.6%) jako główne związki, podczas gdy (*E*)-4-(*r*-1',*t*-2',*c*-4'-trihydroksy-2',6',6'-trimetylcycloheksyl)but-3-en-2-on dominował w ekstraktach uzyskanych z użyciem chlorku metylenu (18.3–49.1%) (Rycina 6). Z uwagi na to, kombinacja różnych rozpuszczalników była istotna dla kompleksowej analizy związków lotnych w tej odmianie miodu. Wcześniej wspomniana, szczególnie pochodna megastigmanu została wcześniej opisana jedynie w miodzie tymiankowym, a hydrochinon w miodzie z żmijowca zwyczajnego, podczas gdy kombinacja wspomnianych dominujących związków jest unikalna dla miodu z czosnku niedźwiedziego. Dodatkowo, hydrochinon jest znany jako związek o działaniu przeciwdrobnoustrojowym [65].



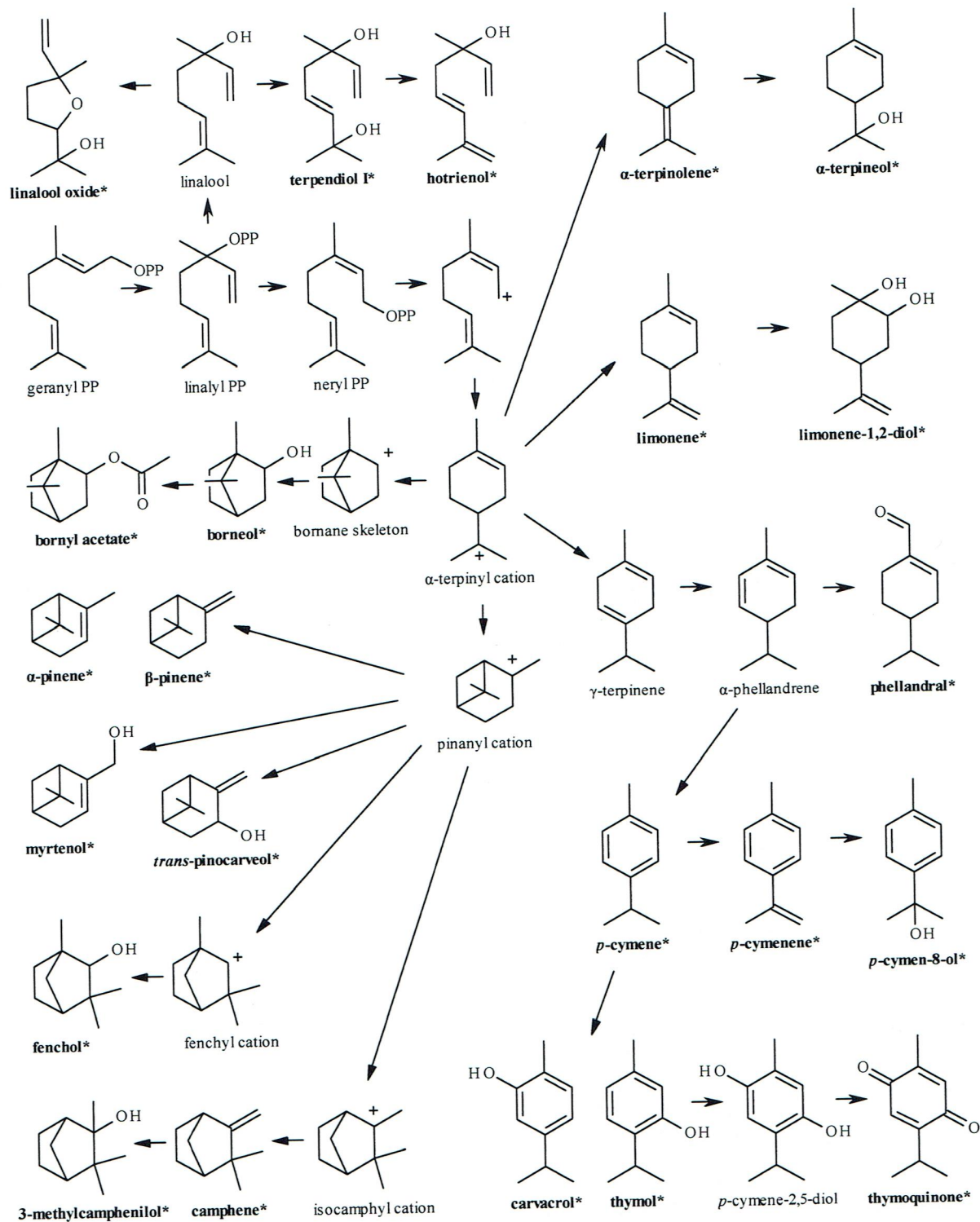
Rycina 6. Struktury głównych związków zidentyfikowanych w miodzie z czosnku niedźwiedziego.

H5. Piotr M. Kuś*, Zvonimir Marijanović, Igor Jerković.: Evaluation of HS-SPME and ultrasonic solvent extraction for monitoring of plant flavours added by the bees to herbhoneys: traceability biomarkers, *Food Addit. Contam. Part A-Chem.* 2015 Vol.32 no.11; 1761-1771.

Ziołomiody (ZM) są biotechnologicznymi produktami podobnymi do miodu otrzymywanymi poprzez podkarmianie pszczół syropem opartym na sacharozie z dodatkiem różnych ekstraktów roślinnych bądź soków z owoców i mogą być uznawane jako nowa kategoria produktów pszczelich [33,66]. Celem badań było zbadanie składu związków lotnych ZM pochodzących z różnych źródeł botanicznych, a także porównanie wyników z danymi literaturowymi dotyczącymi odpowiadających im miodów odmianowych i/lub roślin. Ponadto, celem było zidentyfikowanie biomarkerów identyfikowalności dla różnych ZM oraz ewentualne wskazanie pośród nich związków o możliwym działaniu biologicznym. Skład związków lotnych 21 próbek ziołomiodów z siedmiu źródeł botanicznych został scharakteryzowany po raz pierwszy. USE i HS-SPME w połączeniu z GC-MS zostały z powodzeniem zastosowane jako uzupełniające się metody, w celu monitorowania związków lotnych. ZM wykazały znaczną różnorodność składu związaną z pochodzeniem botanicznym, a dodatkowo zostały wytypowane związki, które mogłyby służyć jako biomarkery identyfikowalności. Najważniejszymi zaobserwowanymi związkami o wysokiej zawartości były (E, ekstrakt; H, faza nadpowierzchniowa): kofeina (do 68.7%, E) i tlenek *trans*-linalolu (do 26.0%, H) w ZM kawowym, α -terpineol (do 8.2%, E; 27.1%, H) i octan bornylu (do 3.1, E; 11.9%, H) w ZM sosnowym, tymol (do 3.1%, E; 55.4%, H) w ZM tymiankowym. ZM głógowy charakteryzował się obecnością herniaryny (do 13.4%, E), ZM cytrynowy zawierał limonen (do 1.6%, E; 33.2%, H) (Rycina 7, 8). Inne ZM (pokrzywowy i aloesowy) zawierały mniejsze ilości związków lotnych i ich profile były niespecyficzne. We wszystkich ZM, znaleziono syrynginian metylu i było go najwięcej w ziołomiodzie tymiankowym (do 17.4%, E). Syrynginian metylu m.in. posiada znaczną aktywność przeciwutleniającą i hamuje wzrost komórek różnych komórek nowotworowych [67]. Frakcje lotne ZM wykazały znaczne podobieństwa, ale też różnice w porównaniu z substancjami roślinnymi, z których pochodzą. Potwierdza to przenoszenie w niezmienionej postaci związków chemicznych pochodzenia roślinnego za pośrednictwem pszczół do produktu końcowego, ale również możliwą biotransformację niektórych z nich. Dodatkowo, zaobserwowano kilka podobieństw do odpowiadających im miodów naturalnych, lecz ogólnie ZM wykazywały mniej bogate profile lotne.



Rycina 7 Struktury wybranych biomarkerów identyfikowalności znalezione w ziołomiodach.



*- związki znalezione w ziołomiodach

Rycina 8 Relacje biosyntetyczne terpenoidów zidentyfikowanych w badanych ziołomiodach.

H6. Piotr M. Kuś*, Igor Jerković.: New Sample Preparation Method for Honey Volatiles Fingerprinting Based on Dehydration Homogeneous Liquid-Liquid Extraction (DHLLE), *Molecules* 2018 Vol.23 no.7, 1769

Badanie substancji zapachowo czynnych zostało uznane za szczególnie interesujące do potwierdzenia autentyczności, ponieważ są one ściśle związane z pochodzeniem botanicznym miodu, jak również z ich właściwościami sensorycznymi (silnie związanymi z jego wartością leczniczą i rynkową) [29,68]. Jednakże ze względu na ich niewielkie zawartości i dużą różnorodność klas związków oraz wysoką lepkość miodu, ekstrakcja lotnych związków organicznych (LZO) z miodu pozostaje wyzwaniem. Dotychczas opracowano i stosowano różne metody izolacji lotnych związków organicznych, takie jak ekstrakcja cieczerw-cieczowa (LLE), ekstrakcja do fazy stałej (SPE), mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME), analiza fazy nadpowierzchniowej metodą dynamiczną (DHS), mikroekstrakcja do fazy stałej z przestrzeni nadpowierzchniowej (HS-SPME), ekstrakcja z użyciem ultradźwięków (USE), a także hydrodestylacja (HD) i jednoczesna mikrofazowa destylacja parowa z ekstrakcją rozpuszczalnikami (MSDE). HS-SPME, USE, HD i MSDE zostały poddane porównaniu i ocenie przez Alissandrakis i wsp. [69]. Zarówno HD, jak i MSDE, bardzo powszechne w przypadku izolacji LZO z innych matryc, nie nadawały się do miodu, ponieważ stosowane drastyczne warunki doprowadziły do degradacji niektórych związków i powstawania artefaktów. Najbardziej użyteczne okazało się USE, które jest ulepszoną techniką LLE i zapewnia najbardziej reprezentatywny profil lotnych związków organicznych, ponieważ nie stosowano ogrzewania próbki. Również HS-SPME okazał się być odpowiedni, jednak okazał się bardzo selektywny, a uzyskany profil przestrzeni nadpowierzchniowej został w znacznym stopniu uzależniony od rodzaju włókna i nie był odpowiedni dla związków półlotnych [69]. Castro-Vázquez i wsp. porównała metody MSDE, LLE i SPE, stwierdzając, że metoda LLE jest zalecana, ponieważ zapewnia dobrą wydajność oraz niskie odchylenia standardowe dla większości analizowanych związków [70]. Niedawno Castro-Vázquez i wsp. zaproponowała zoptymalizowaną metodę ekstrakcji LZO z miodu z użyciem SPE [71]. Najlepszymi metodami zapewniającymi najbardziej reprezentatywne profile lotnych i półlotnych związków miodu są dotychczas USE i SPE, jednak techniki te są nie tylko czasochłonne, ale również wymagają dość znacznej ilości rozpuszczalników (ok. 60 ml chlorku metylenu lub pentanu/ eteru dietylowego na próbkę 20-40 g) [71-73]. W ostatnich dekadach coraz więcej uwagi poświęca się wpływowi wywieranemu przez człowieka na środowisko oraz pilnej potrzebie wdrażania i rozwoju zrównoważonych technik. Dlatego też w ostatnich kilku latach zintensyfikowano wysiłki mające na celu nie tylko opracowanie metod efektywnych czasowo i kosztowo, ale również bardziej ekologicznych metod pozyskiwania i przygotowywania próbek. [74].

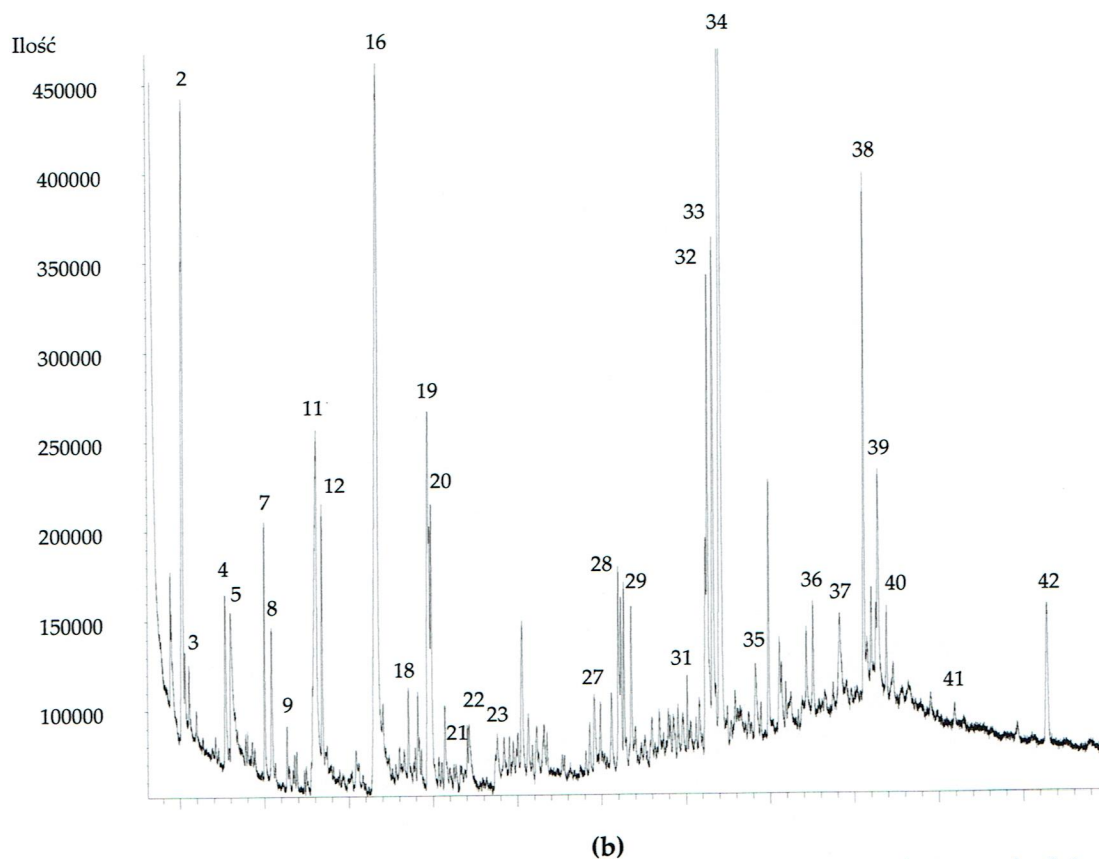
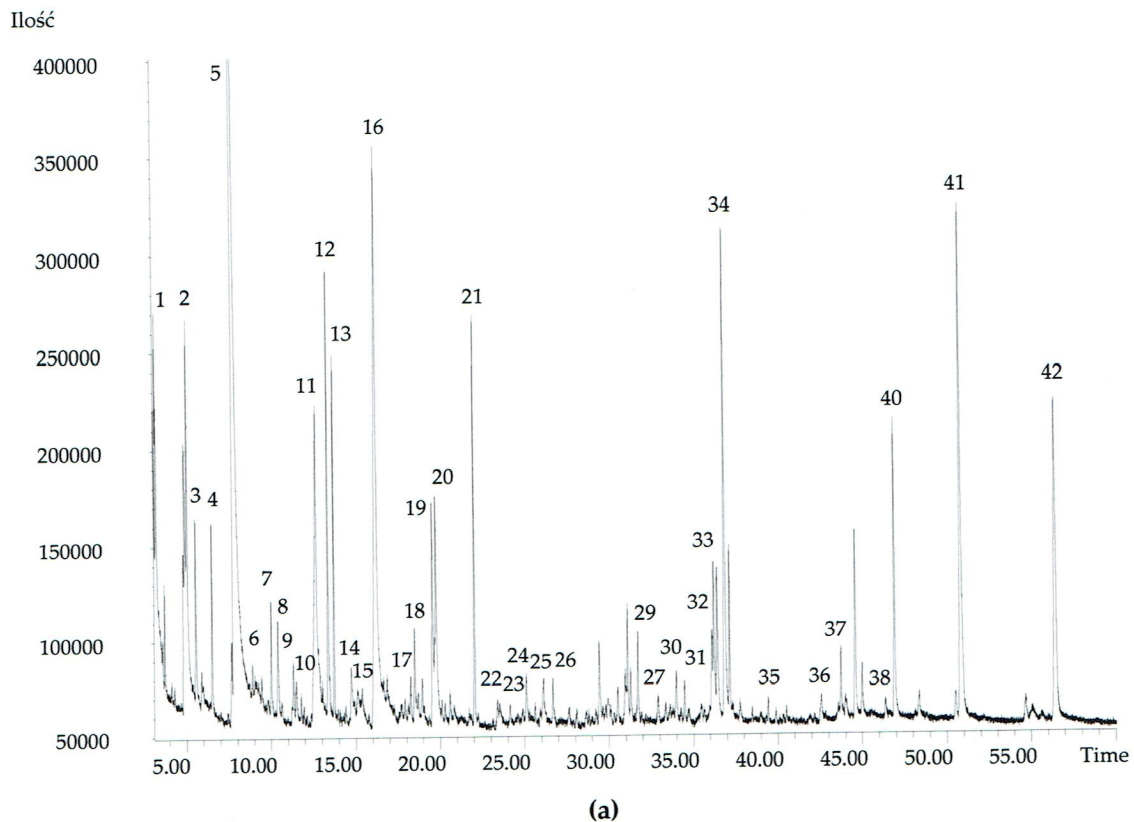
Głównym celem badań było opracowanie kosztowo-efektywnej, niskoobjętościowej metody opartej na ekstrakcji cieczerw-cieczowej w fazie jednorodnej (HLLE, ang. *homogenous liquid-liquid extraction*), przystosowanej do ekstrakcji lotnych i półlotnych związków z miodu, która mogłaby być efektywnie wykorzystana do jakościowych testów przesiewowych (ang. *screening*). Obejmuje to selektywną ekstrakcję i oczyszczanie ekstraktów w celu uniknięcia nadmiaru bardzo polarnych i bardzo hydrofobowych związków zakłócających (które skutkują przesunięciami linii bazowej, pokrywaniem pików oraz niską jakością widm MS w chromatografii gazowej i spektrometrii masowej (GC-MS)), lecz nieistotnych dla charakterystyki miodu. Dotychczas, analizy lotnych związków organicznych miodu koncentrowały się na jakościowym badaniu „chemicznego odcisku palca” (ang. *fingerprinting*) i identyfikacji charakterystycznych związków, w tym swoistych i nieswoistych biomarkerów chemicznych. W związku z tym, priorytetem przy opracowywaniu nowej metody było zmniejszenie ilości próbki i rozpuszczalników, jak również zapewnienie rozsądnej powtarzalności i odzysku badanych związków.

W wyniku prowadzonych badań, opracowałem nową metodę przygotowywania próbek opartą na ekstrakcji cieczowo-cieczowej w fazie jednorodnej z rozdziałem poprzez dehydratację (DHLLE, ang. *dehydrating homogenous liquid-liquid extraction*), uwzględniającą znaczne zmniejszenie zużycia rozpuszczalnika, w celu umożliwienia zastosowania do badań przesiewowych w zakresie lotnych i półlotnych substancji z miodu. Efektywną ekstrakcję uzyskano poprzez wdrożenie systemu ekstrakcji opartego na mieszających się cieczach (wodny roztwór miodu/izopropanol), a następnie ich oddzielenia poprzez odwodnienie za pomocą $MgSO_4$ oraz oczyszczenie poprzez zmianę polarności rozpuszczalnika (dodatek niewielkiej ilości CH_2Cl_2) i przemywanie wodą. Metodę poddano ewaluacji poprzez ocenę dokładności i precyzji. Metoda DHLLE umożliwiła zadowalający odzysk (75,2 do 93,5%) dla związków lotnych typowych dla różnych odmian miodu: linalolu, borneolu, terpinen-4-olu, α -terpineolu, aldehydu anyżowego, eugenolu i waniliny (Tabela 2). Wykazano również doskonałą powtarzalność z procentowym względnym odchyleniem standardowym (RSD%) w granicach 0,8-8,9%. W przypadku alkoholu benzylowego, syrynginianu metylu i kofeiny odzysk wynosił odpowiednio 54,3 do 63,9% i 67,3 do 77,7% przy niższych i wyższych poziomach wzbogacania próbki. Zastosowana do odmianowego miodu z nektaru jabłoni metoda DHLLE pozwoliła na identyfikację 40 związków, w tym terpenów, węglowodorów, fenylopropanoidów i innych pochodnych benzenu, co sprawia, że nadaje się do badań przesiewowych opartych na chemicznym odcisku palca i markerach. Uzyskane wyniki były porównywalne z tymi otrzymanymi z zastosowaniem powszechnie stosowanej metody - ekstrakcji ultradźwiękowej chlorkiem metylenu, zapewniając dodatkowo lepszą wizualną jakość chromatogramu (Rycina 9).

Tabela 2. Procent odzysku i względne odchylenie standardowe (%) lotnych związków w cukrowym roztworze modelowym (sztuczny miód) ekstrahowanym metodą DHLLE .

Związek	RI ¹	Poziom stężenia A (n=5)			Poziom stężenia B (n=5)		
		Odzysk ² [%]	SD	RSD%	Odzysk ² [%]	SD	RSD%
Alkohol benzylowy	1039	63.9	3.0	4.8	77.7	2.6	3.4
Linalol	1100	83.7	3.4	4.0	89.0	4.9	5.5
Borneol	1174	76.9	3.8	5.0	82.0	4.1	5.0
Terpinen-4-ol	1180	76.9	3.5	4.6	79.2	2.9	3.7
α -Terpineol	1193	85.7	4.7	5.5	85.9	2.1	2.4
Aldehyd anyżowy	1256	91.7	4.8	5.3	93.5	5.3	5.6
Eugenol	1361	78.7	4.3	5.5	75.2	3.2	4.3
Wanilina	1403	87.6	0.7	0.8	77.9	3.8	4.9
Syrynginian metylu	1773	54.3	3.8	7.1	75.2	1.3	1.7
Kofeina	1843	57.0	5.1	8.9	67.3	3.7	5.5

Poziom stężenia: terpinen-4-ol, α -terpineol, linalol, borneol (A: 300 μ g/L; B: 600 μ g/L); aldehyd anyżowy, eugenol, wanilina, syrynginian metylu, kofeina (A: 600 μ g/L; B: 1200 μ g/L); alkohol benzylowy A: 1000 μ g/L; B: 2000 μ g/L); ¹ RI: Wskaźniki retencji określone względem *n*-alkanów (C₉-C₂₅) na kolumnie HP-5MS; ² średnie wartości procentowe (n=5)

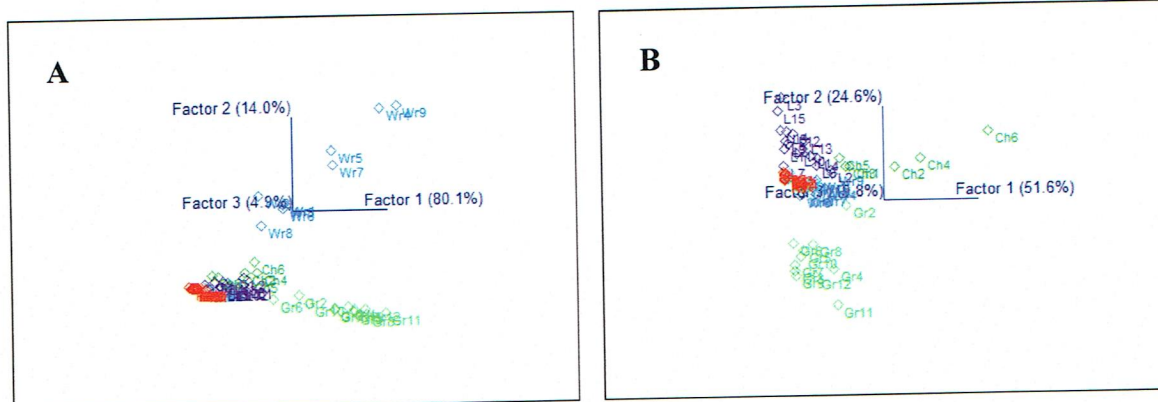


Rycina 9. Porównanie reprezentatywnych chromatogramów ekstraktów związków lotnych miodu jabłkowego otrzymanych przy użyciu proponowanej metody DHLLE (a) i ekstrakcji USE przy użyciu CH_2Cl_2 (b).

H7. Piotr M. Kuś*, Saskia van Ruth.: Discrimination of Polish unifloral honeys using overall PTR-MS and HPLC fingerprints combined with chemometrics, *LWT-Food Sci. Technol.* 2015 Vol.62 no.1 part 1; 69-75.

Celem badań było opracowanie metody opartej na chemometrii i całkowitych chemicznych odciskach palca do klasyfikacji miodów. W szczególności miało to na celu odróżnienie pochodzenia botanicznego miodów polskich na podstawie profili chromatograficznych uzyskanych poprzez badanie roztworów wodnych miodu techniką HPLC i rejestracji wyników przy różnych długościach fal oraz spektrów masowych ich fazy nadpowierzchniowej, analizowanej z użyciem spektrometrii masowej reakcji przenoszenia protonów (PTR-MS). Podejście uwzględniające wykorzystanie całych chemicznych odcisków palca obejmuje udział wszystkich związków mieszaniny złożonej i czyni metodę bardziej odporną. Podobnie ludzkie powonienie jest odbierane jako całościowy chemiczny odcisk palca i stosowana w formie analizy sensorycznej do oceny jakości wielu produktów spożywczych [75]. W ostatnich dziesięcioleciach opracowano elektroniczny nos w celu naśladowania ludzkiego zmysłu powonienia, który okazał się przydatny do klasyfikowania miodów w połączeniu z modelami opartymi na zastosowaniu sztucznych sieci neuronowych [76,77]. Podobną zasadę zapewnia technika PTR-MS, która umożliwia szybką, nierozdzielczą, dynamiczną analizę on-line, bez skomplikowanej obróbki wstępnej próbki i z wysoką czułością, co czyni ją dobrym narzędziem do fingerprintingu / chemicznego profilowania w połączeniu z nienadzorowanymi metodami klasyfikacji [78].

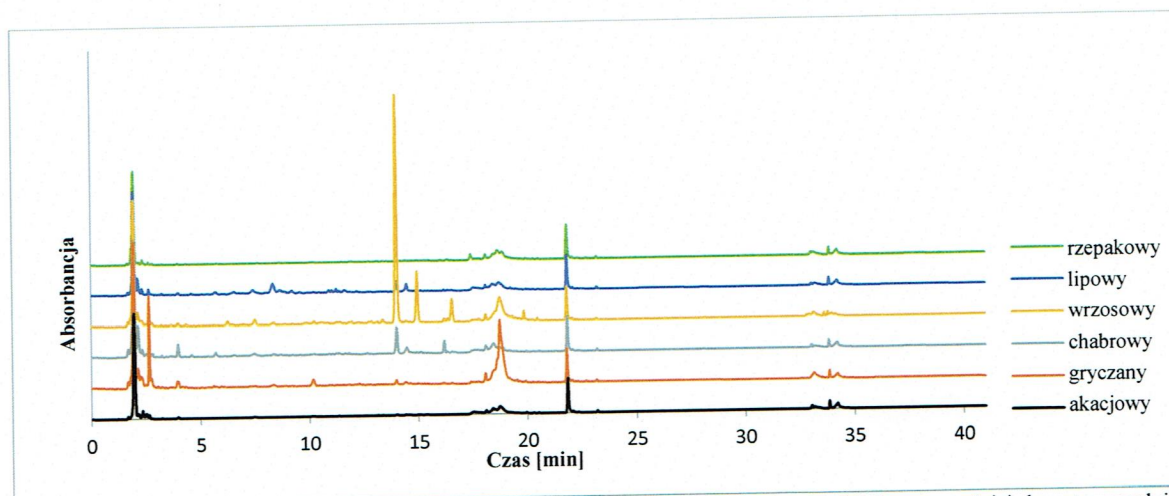
Łącznie przeanalizowano 62 próbki miodu pochodzących z sześciu źródeł botanicznych (rzepakowego, lipowego, wrzosowego, chabrowego, gryczanego i robinii akacjowej) za pomocą PTR-MS i HPLC-DAD przy różnych długościach fal. Dane zostały ocenione na podstawie analizy składowych głównych i klasyfikacji k-najbliższych sąsiadów (k-NN) w celu zbadania spójnych różnic w analitycznych odciskach palca pomiędzy różnymi miodami, umożliwiającymi ich rozróżnianie. Naturalne grupowanie próbek różniło się istotnie przy różnych długościach fal (Rycina 10). Ponadto zaobserwowano istotną zmienność odcisków palca pomiędzy różnymi odmianami miodu (Rycina 11). Badania wykazały, że obie techniki były w stanie odróżnić pochodzenie botaniczne, jednak HPLC wykazuje przewagę nad PTR-MS, zapewniając znacznie lepsze różnicowanie wszystkich analizowanych rodzajów miodu. Szczególnie chemiczne odciski palca (profile) uzyskane z użyciem HPLC i rejestrowane przy długości fali 210 nm były najbardziej odpowiednie do różnicowania pochodzenia botanicznego za pomocą analizy chemometrycznej. Uzyskane wskaźniki klasyfikacji były następujące: 100%, 93%, 100%, 100%, 83%, 100%, 100%, 100% (HPLC) i 69%, 67%, 78%, 67%, 100%, 100%, 88% (PTR-MS) odpowiednio dla rzepaku, lipy, wrzosu, chabra, gryki i robinii akacjowej. Mimo iż wydajność PTR-MS ogólnie była niższa niż HPLC, może być przydatna do szybkich badań przesiewowych stosowanych na bieżąco (ang. *on-line*) dla miodu gryczanego, który jest cenną odmianą miodu posiadającą jeden z najwyższych potencjałów przeciwutleniających.



(A) Wykres współrzędnych czynnikowych PCA na podstawie profili HPLC 62 próbek miodu przy 210 nm (pierwsze trzy czynniki, dane bez wstępnego przetwarzania); (B) Wykres współrzędnych czynnikowych PCA na podstawie profili HPLC 62 próbek miodu przy 360 nm (pierwsze trzy czynniki, dane wyśrodkowane); zmiennymi są czasy retencji, próbkowane 150 razy na minutę, a ich wartością absorbancja mierzona jest przy 210 nm (A) lub 360 nm (B).

R (niebieski) - miód rzepakowy; L (fioletowy) - miód lipowy; Wr (granatowy) - miód wrzosowy; Ch (ciemnozielony) - miód chabrowy; Gr (jasnozielony) - miód gryczany; A (czerwony) - miód z robinii akacjowej.

Rycina10. Analiza głównych składowych (PCA) - wykres współrzędnych czynnikowych oparty na profilach HPLC zarejestrowanych przy 210 nm i 360 nm dla 62 próbek miodu z sześciu źródeł botanicznych.



Chemiczne odciski palca (profile) uzyskano z chromatogramów zarejestrowanych przy długości fali 210 nm, wcześniej eksportowanych jako zestaw danych i wyrównanych.

Rycina 11. Porównanie reprezentatywnych odcisków palców/profilu HPLC każdego badanego typu miodu, zarejestrowanych przy 210 nm.

H8. Igor Jerković, Zvonimir Marijanović, **Piotr M Kuś**, Carlo I.G. Tuberoso.: Comprehensive study of mediterranean (Croatian) propolis peculiarity: headspace, volatiles, anti-*varroa*-treatment residue, phenolics, and antioxidant properties, *Chem.Biodivers.* 2016 Vol.13 no.2; 210-218.

Propolis (kit pszczeli) jest złożoną substancją składającą się z wosku, żywicy i wydzielin roślinnych zbieranych i mieszanych ze śliną przez pszczoły. Stosowany jest on przez nie jako uszczelniacz ula i ochrona przed chorobami, np. poprzez hamowanie wzrostu grzybów i bakterii oraz zapobieganie przedostawaniu się pasożytów do ula [79,80]. Do tej pory w propolisie zidentyfikowano ponad 200 związków, w szczególności polifenoli (flawonoidy, kwasy fenolowe i ich estry) oraz związków lotnych [81]. Propolis wykazał liczne działania biologiczne, takie jak działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, przeciwutleniające, neuroprotekcyjne, przeciwhepatotoksyczne, przeciwzapalne [82,83]. Ponadto propolis jak i niektóre z jego składników (np. ester fenylowy kwasu kawowego lub artepilina C) wykazywały działanie cytostaticzne i przeciwnowotworowe zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*. [79]. Skład propolisu jest zmienny w zależności od występującej na danym obszarze roślinności i pory roku. Dlatego też główne cele skupiały się na badaniu próbek ze znacznie zróżnicowanego obszaru Chorwacji: a) izolacji lotnych substancji za pomocą HS-SPME, jednoczesnej destylacji z parą wodną i ekstrakcji (SDE), a następnie analizy GC-FID i GC-MS oraz porównanie tych wyników, monitorowanie obecności tymolu (pozostałości po środkach przeciw warrozie), b) ukierunkowanej analizie HPLC-DAD koncentrującej się na składzie fenolowym i oznaczaniu całkowitej zawartości związków fenolowych (TP), aktywności przeciwutleniającej w testach DPPH i FRAP, a także wskazaniu możliwych powiązań między zidentyfikowanymi związkami i ich naturalnymi źródłami.

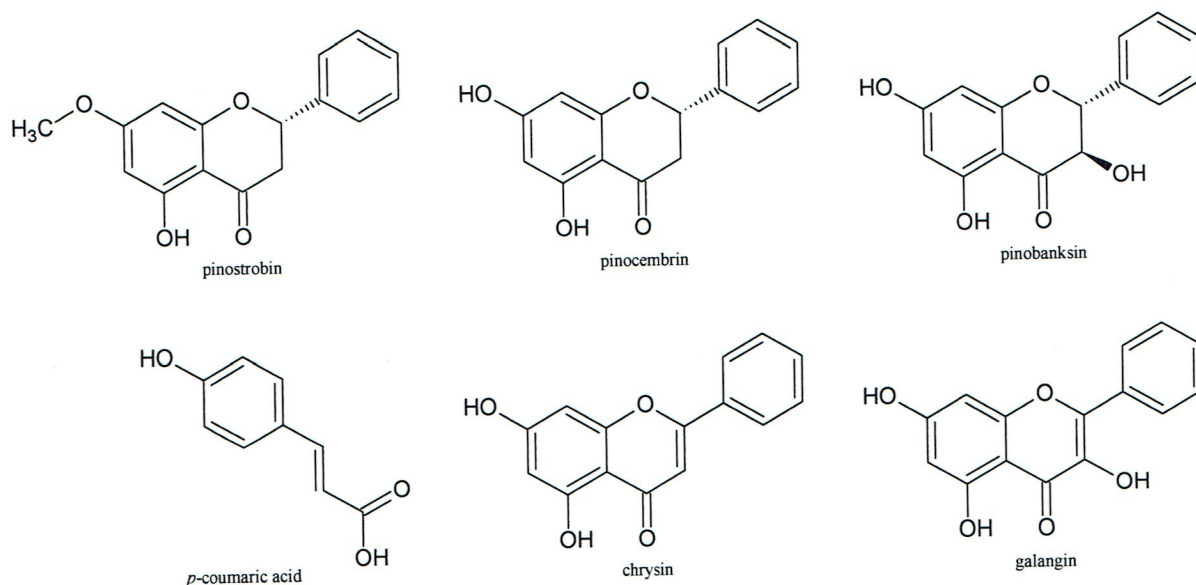
Szczegółowo przeanalizowano osiem próbek propolisu z Chorwacji w celu zbadania zawartości substancji lotnych, w tym pozostałości po preparatach przeciw warrozie zawierających tymol, związków fenolowych i aktywności przeciwutleniającej. Próbkę wykazywały wysoką zmienność jakościową/iłościową pod kątem profili chemicznych, całkowitej zawartości związków fenolowych (1589,3-14398,3 mg GAE (równoważnik kwasu galusowego)/L ekstraktu) oraz aktywności antyoksydacyjnej (11,1-133,5 mmol Fe²⁺/L ekstraktu i 6,2-65,3 mmol TEAC (równoważnik Trolox pojemności przeciwutleniającej)/L ekstraktu). Głównymi związkami fenolowymi oznaczanymi za pomocą HPLC-DAD przy 280 i 360 nm były wanilina, kwas *p*-kumarowy, kwas ferulowy, chryzyna, galangina i ester fenylowy kwasu kawowego. Głównymi związkami zidentyfikowanymi przez HS-SPME, SDE, a następnie analizy GC-FID i GC-MS były α -eudesmol (do 19,9%), β -eudesmol (do 12,6%), γ -eudesmol (do 10,5%), benzoesan benzylu (do 28,5%) oraz 4-winylo-2-metoksyfenol (do 18,1%). Wanilina została oznaczona jako składnik o nieco mniejszej zawartości przez SDE/GC-FID-MS i HPLC-DAD. Zidentyfikowane pozostałości tymolu użytego jako akarycyd, były widoczne w profilu HS-SPME/GC-FID-MS jako składnik procentowo około trzykrotnie obfitszy niż w tym uzyskanym poprzez SDE/GC-FID-MS, a metodą HPLC-DAD nie zostały wykryte.

H9. Piotr M Kuś*, Igor Jerković, Martina Jakovljević, Stela Jokić.: Extraction of bioactive phenolics from black poplar (*Populus nigra* L.) buds by supercritical CO₂ and its optimization by response surface methodology, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 2018 Vol.152; 128-136.

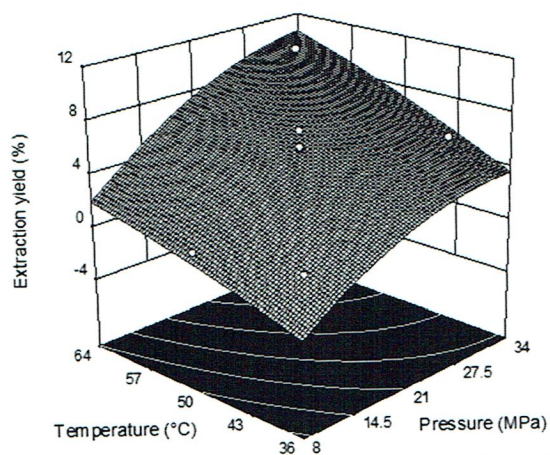
Pąki topoli (*Populi gemmae*) pozyskiwane są głównie z topoli czarnej (*Populus nigra* L.) lub topoli balsamicznej (*Populus balsamifera* L.) i od czasów starożytnych stosowane są zarówno jako naturalne substancje lecznicze jak i dodatki do żywności. [84]. Wykazują m.in. działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i przeciwzapalne [85], mają liczne tradycyjne zastosowania na przykład w leczeniu zapalenia skóry, infekcji górnych dróg oddechowych, reumatyzmu oraz jako główny składnik preparatów przeciw hemoroidom [37]. Pąki są bogate w związki fenolowe, głównie flawonoidy, jak również fenylopropanoidy i ich estry [86]. Obecne na pąkach wydzieliny żywiczne są głównym źródłem roślinnym wykorzystywanym przez pszczoły do tworzenia propolisu. Ten ostatni charakteryzuje się bardzo podobnym składem chemicznym i wykazuje również liczne działania biologiczne, m.in. przeciwbakteryjne, przeciwtleniające, przeciwzapalne, immunomodulacyjne, przeciwnowotworowe, hepatoprotekcyjne i kardioprotekcyjne [6]. Pąki topoli są również bardzo interesujące jako źródło związków bioaktywnych do zastosowań medycznych i w porównaniu z propolisem, który jest bardzo zmienny [9,87], znacznie łatwiej jest kontrolować ich skład chemiczny oraz je standaryzować, co ma kluczowe znaczenie dla zapewnienia powtarzalności i jakości. Ekstrakcja nadkrytycznym CO₂ (SC-CO₂) jest proponowana jako jedna z możliwych skutecznych i przyjaznych dla środowiska alternatyw dla izolacji związków czynnych z pąków poprzez macerację etanolem lub ekstrakcję w aparacie Soxhleta [36,37]. Do tej pory, według dostępnego piśmiennictwa tylko Mainar i wsp. [36] zbadała pąki topoli (*Populus nigra* L. oraz *Populus x euroamericana*) i porównała je z ekstraktami otrzymanymi za pomocą aparatury Soxhleta. Autorzy skupili się na związkach lotnych i składzie SC-CO₂ ekstraktów z pąków badanych z użyciem GC-MS. Proces ekstrakcji pąków topoli SC-CO₂ nie został jednak zoptymalizowany, a skład ekstraktu opisany dość ogólnikowo [36]. Związki fenolowe stanowią istotną grupę aktywnych biologicznie cząsteczek obecnych w pąkach topoli. W szczególności flawonoidy, takie jak pinostrobin, pinocembryna, pinobanksyna, galangina i chryzyna (Rycina 12), które już wcześniej wykazywały w badaniach m.in. znaczące działanie przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze, przeciwtleniające oraz przeciwzapalne [85,88]. Niektóre ze związków, takich jak np. pinostrobin, charakteryzują się wyższą lipofilnością, która jest jednym z najważniejszych czynników wpływających na wchłanianie, dystrybucję do tkanek i przenikanie bariery krew-mózg. Parametry te są kluczowe dla niektórych potencjalnych zastosowań terapeutycznych i czynią tę grupę związków szczególnie interesującą [88,89]. Ekstrakcja nadkrytycznym CO₂ jest „zieloną” (przyjazną środowisku) metodą zapewniającą dobrą selektywność dla lipofilnych lub umiarkowanie polarnych związków, którą z powodzeniem zastosowano do selektywnej ekstrakcji podobnych związków [90,91].

Zakres badań obejmował zastosowanie ekstrakcji CO₂ nadkrytycznym, współczesnej "zielonej" techniki, w celu ekstrakcji umiarkowanie polarnych związków z topoli (*Populus nigra* L.), przeprowadzenia ukierunkowanej analizy UHPLC-DAD i oznaczenia ilościowego wybranych głównych związków fenolowych, charakteryzujących się wyższą lipofilnością, a także z wykorzystaniem metody powierzchni odpowiedzi (RSM), w oparciu o wydajność ekstrakcji, aktywność antyoksydacyjną FRAP (zdolność redukcji jonów żelaza), całkowitą zawartość fenoli (TP) oraz indywidualne stężenie wybranych bioaktywnych związków

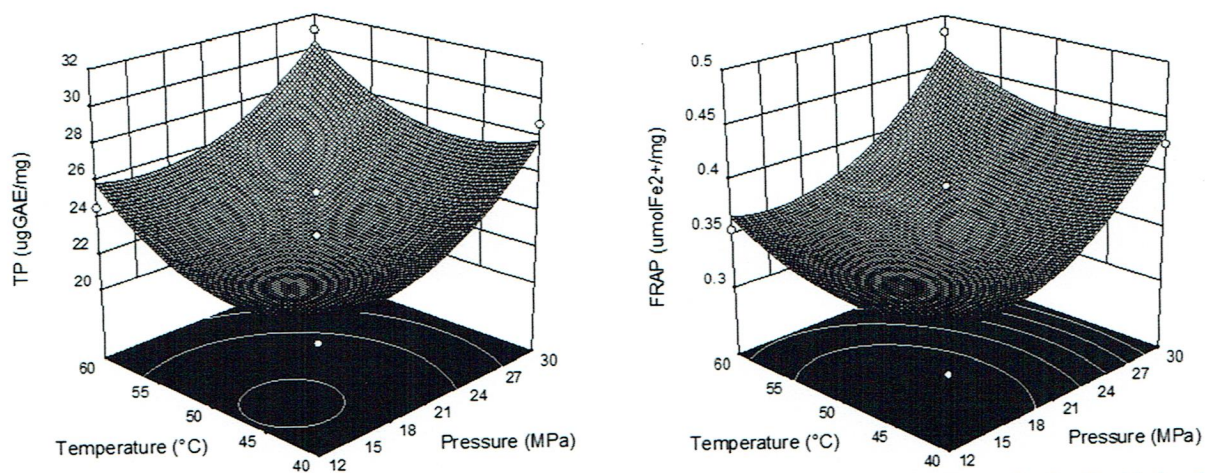
fenolowych. Ciśnienie i temperatura miały istotny wpływ na wydajność ekstrakcji (0,38-10,28 g/100 g pąków) (Rycina 13) oraz wyrażoną w μg na mg ekstraktu całkowitą zawartość polifenoli (21,62-31,09 μg GAE/mg), aktywność FRAP (0,30-0,48 $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /mg) (Rycina 14) oraz ilości kwasu *p*-kumarowego (0,33-1,52 μg /mg), pinocembryny (20,99-47,24 μg /mg) i galanginy (4,04-10,25 μg /mg). Na ekstrakcję pinostrobinu (51,73-79,56 μg /mg), pinobanksyny (0,41-1,55 μg /mg) i chryzyny (0,97-2,03 μg /mg) miało istotny wpływ jedynie ciśnienie robocze (Rycina 15). Zoptymalizowane parametry ekstrakcji (30 MPa i 60 °C) pozwalają na uzyskanie wyższej wydajności i ekstraktów wzbogaconych w biologicznie czynne związki fenolowe.



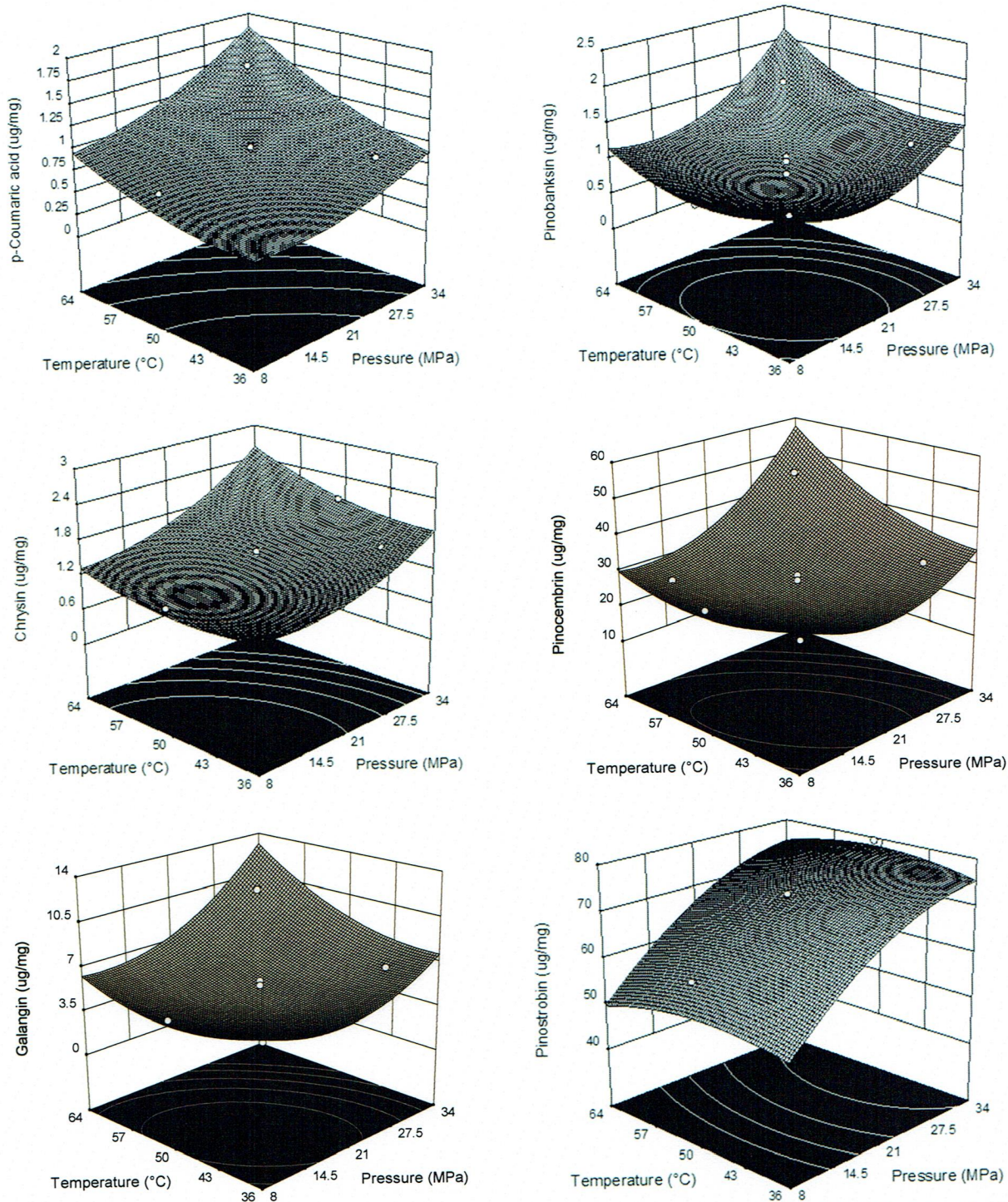
Rycina 12 Struktury wybranych związków fenolowych wykorzystywanych do optymalizacji ekstrakcji SC-CO₂ z pąków *P. nigra*



Rycina 13. Trójwymiarowe wykresy dla uzyskanej wydajności ekstrakcji w funkcji ciśnienia i temperatury ekstrakcji



Rycina 14. Trójwymiarowe wykresy dla uzyskanych wyników TP i FRAP w funkcji ciśnienia i temperatury ekstrakcji



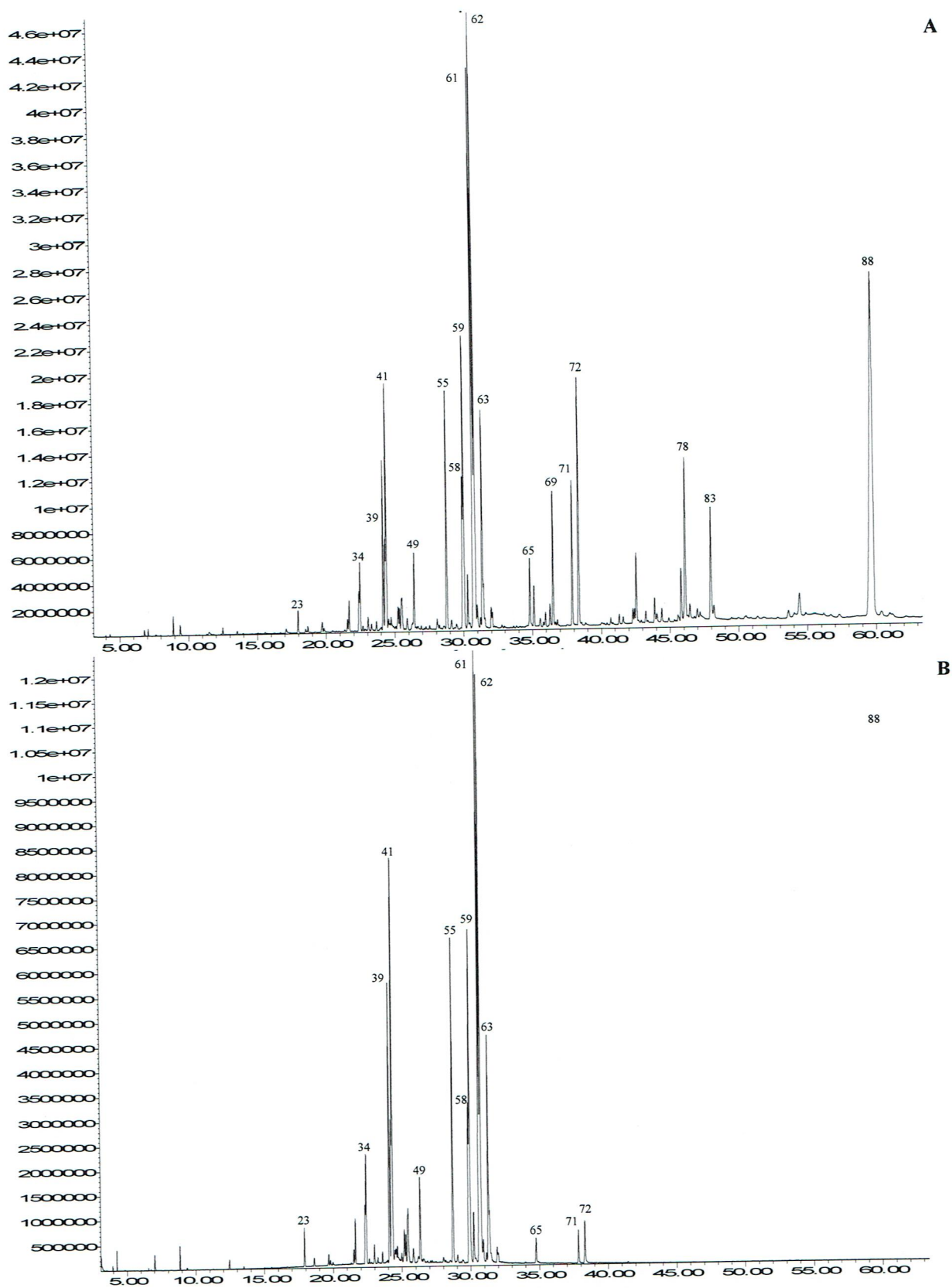
Rycina 15. Trójwymiarowe wykresy dla badanych składników ekstraktów SC-CO₂ jako funkcja ciśnienia i temperatury ekstraktu

H10. Piotr Marek Kuś*, Piotr Okińczyc, Martina Jakovljević, Stela Jokić, Igor Jerković.: Development of supercritical CO₂ extraction of bioactive phytochemicals from black poplar (*Populus nigra* L.) buds followed by GC-MS and UHPLC-DAD-QqTOF-MS, *J.Pharm.Biomed.Anal.* 2018 Vol.158; 15-27.

Zakres niniejszej pracy, będącej kontynuacją wcześniejszych badań, polegał na znalezieniu optymalnych ustawień ekstrakcji SC-CO₂, pozwalających na uzyskanie największej całkowitej ilości bioaktywnych substancji fitochemicznych (głównych związków lotnych i nielotnych) z pąków topoli przy zastosowaniu metodyki powierzchni odpowiedzi (RSM) oraz na zbadaniu składu fitochemicznego otrzymanych ekstraktów za pomocą GC-MS i UHPLC-DAD-QqTOF-MS. Ponadto zaobserwowano możliwe biosyntetyczne zależności między zidentyfikowanymi składnikami, a także omówiono dostępne doniesienia o aktywności biologicznej najważniejszych z nich. Kolejnym aspektem było porównanie składu lotnego otrzymanych ekstraktów uzyskanych przy pomocy SC-CO₂ i olejku eterycznego (OE) uzyskanego poprzez hydrodestylację z takiej samej próbki pąków. Proces ekstrakcji nadkrytycznym CO₂ pąków topoli czarnej (*Populus nigra* L.) został zoptymalizowany (ciśnienie, temperatura) w oparciu o uzysk głównych związków (lotnych i nielotnych). Optymalnymi ustawieniami okazały się ciśnienie 30 MPa i temperatura 60 °C. Głównymi związkami lotnymi oznaczonymi przez GC-MS w zoptymalizowanym ekstrakcie SC-CO₂ (mg równoważnika salicylanu benzylu (BSE) na 100 g pąków) były: chalkon pinostrobinu (1574,2), β-eudesmol (640,8), α-eudesmol (581,9), ester 2-metylo-2-butyloxy kwasu *p*-kumarowego (289,9), ester pentylowy kwasu *p*-kumarowego (457,0), γ-eudesmol (294,4) i salicylan benzylu (289,2). Zaobserwowano częściowe podobieństwo jakościowe między składem ekstraktów SC-CO₂ i odpowiadającego im olejku eterycznego uzyskanego drogą hydrodestylacji. Był on również zdominowany przez seskwiterpeny, ale o niższych zawartościach. Głównymi związkami (w mg na 100 g pąków) zidentyfikowanymi z zastosowaniem UHPLC-DAD-QqTOF-MS w zoptymalizowanym ekstrakcie SC-CO₂ były: pinostrobin (751,7), pinocembryna (485,6), octan 3-O-pinobanksyny i ester 2-metylo-2-butyloxy kwasu *p*-kumarowego (odpowiednio 290,2 i 144,9 równoważnika pinobanksyny i kwasu *p*-kumarowego) (Tabela 3). Ekstrakcja SC-CO₂ okazała się przydatna do skutecznej "zielonej" ekstrakcji zarówno lotnych jak i nielotnych, bioaktywnych związków z pąków topoli - prekursorów propolisu typu topolowego. Główne zidentyfikowane związki (lotne i nielotne) wykazują znane aktywności biologiczne, opisane w dostępnym piśmiennictwie naukowym. Wcześniej stwierdzono, że chalkon pinostrobinu wykazuje umiarkowaną do silnej aktywność względem ludzkich linii komórkowych raka przewodu pokarmowego [7] i bardzo znaczące działanie cytotoksyczne przeciw ludzkim komórkom nowotworowym, takim jak KB (linia komórkowa raka naskórka), MCF7 (linia komórkowa hormonozależnego raka piersi) i komórki CaSki (linia komórkowa raka szyjki macicy) (IC₅₀ o wartościach wynoszących odpowiednio 6,2, 7,3 i 7,7 μg/ml) [92]. Najobficiej występujące seskwiterpeny: α-, β- i γ-eudesmole stanowiące 26,7% OE i do 23,6% ekstraktu SC-CO₂, były wcześniej wskazywane jako czynniki przeciwnowotworowe. Związki te wykazywały aktywność cytotoksyczną (IC₅₀ < 25 μg/ml w większości przypadków) wobec linii komórkowych HL-60 (białaczka ludzka), MDA-MB-435 (czerniak ludzki), SF-295 (glejak ludzki) i HCT-8 (rak jelita grubego), natomiast α- i γ-eudesmol były znacznie aktywniejsze od izomeru β [93]. Z drugiej strony β-eudesmol wykazywał działanie antyangiogenne (nieprawidłowa angiogeneza jest związana z różnymi chorobami, w tym z rakiem i retinopatią cukrzycową) *in vitro* i *in vivo*, co może dodatkowo

wspomagać aktywność przeciwnowotworową [94]. Stwierdzono, że trzy izomery (α -, β - i γ -eudesmol) wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec szeregu patogennych bakterii i drożdży. Najniższe wartości MIC stwierdzono dla α - i β -eudesmolu w przypadku *Rhodococcus equi* (odpowiednio 100 i 125 $\mu\text{g/ml}$) oraz *Candida albicans* (125 $\mu\text{g/ml}$, oba; dla nystatyny 50 $\mu\text{g/ml}$). Ponadto α - i γ -eudesmol wykazywały znacznie silniejsze działanie przeciwbakteryjne wobec *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = odpowiednio 200 i 300 $\mu\text{g/ml}$) w porównaniu z chloramfenikolem znanym jako nieskuteczny wobec tej bakterii (MIC = 850 $\mu\text{g/ml}$) [95]. Zarówno α -, jak i β -eudesmol wykazywały również aktywność antytryptoanosomalną *in vitro*, ale była ona szczególnie wysoka dla izomeru α (EC_{50} = 0,10 $\mu\text{g/ml}$ (0,45 μM)) [96]. Ponadto stwierdzono, że α -eudesmol blokuje sterowane napięciem kanały Ca^{2+} wrażliwe na ω -agatoksynę IVA i może być przydatny w leczeniu neurogennego zapalenia w układzie trójdzielno-naczyniowym [97]. Wykazano również zdolność do hamowania uwalniania egzocytotycznego glutaminianu oraz do łagodzenia po niedokrwiennego uszkodzenia mózgu [98]. Z drugiej strony β -eudesmol wykazuje działanie przeciwzapalne poprzez hamowanie aktywacji kaspazy-1 w odpowiedzi zapalnej wywołanej przez mastocyty [99].

Zastosowanie techniki ekstrakcji SC-CO₂ pozwoliło na uzyskanie istotnych ilości bioaktywnych fitochemikaliów (lotnych i nielotnych związków) z pąków topoli. Wysokie podobieństwo składu chemicznego ekstraktu SC-CO₂ z propolisem typu topolowego sugeruje, że aktywność biologiczna pierwszego z nich może być bardzo podobna do drugiego. Zaletą ekstraktów z pąków topoli jest natomiast to, że ich skład może być znacznie lepiej kontrolowany i standaryzowany w porównaniu z propolisem, który jest zbierany przez pszczoły z różnych źródeł botanicznych. W ekstraktach znaleziono utlenione seskwiterpeny, estry fenylopropanoidów, chalkony i flawonoidy. W porównaniu z olejkim eterycznym otrzymywanym w procesie hydrodestylacji, oprócz obecności związków nielotnych, profil GC otrzymanych ekstraktów zawierał około 20 bardziej lotnych/półlotnych cząsteczek (Rycina 16). Wśród nich stwierdzono wysoki procent chalkonu pinostrobiny, estrów fenylopropanoidów, a także kilka dodatkowych seskwiterpenów i jeden diterpen. Dodatkowo ekstrakcja SC-CO₂ w różnych temperaturach i ciśnieniach pozwoliła uzyskać odmienny udział procentowy poszczególnych związków. W zoptymalizowanych warunkach wydajność kilku głównych składników lotnych była znacznie wyższa niż uzyskana w procesie hydrodestylacji. Dlatego też stwierdzono, że ekstrakcja SC-CO₂ w zoptymalizowanych warunkach (dla obu grup związków, 30 MPa i 60°C) jest skuteczną metodą uzyskiwania ekstraktów bogatych zarówno w bioaktywne związki lotne, jak i nielotne. Ich kombinacja w ekstraktach może być szczególnie korzystna, zwłaszcza, że według dostępnych doniesień w wielu przypadkach wydają się one zapewniać komplementarność działania w oparciu o różne mechanizmy. Dlatego takie ekstrakty mogą potencjalnie wykazywać silniejsze efekty biologiczne dzięki synergii.



Rycina 16. chromatogram GC reprezentatywnego ekstraktu SFE (A) i olejku eterycznego (B) otrzymanych z pąków topoli (*P. nigra* L.).

Tabela 3. Zawartość głównych związków zidentyfikowanych przez GC-MS w ekstraktach *Populus nigra* L. SC-CO₂ otrzymanych w różnych warunkach i w olejku eterycznym.

Przebieg	Ciśnienie (MPa)	Temperatura (°C)	Benzoosan prenylu	γ-Eudesmol	β-Eudesmol	α-Eudesmol	Salicylan benzylu	Ester pentylowy kw. <i>p</i> -kumarowego	Ester 2-metylo-2-butenylo-2-kw. <i>p</i> -kumarowego	Chalkon pinostrobinu	Suma
(mgBSE/ 100 g)*											
EO			44.0	43.4	71.7	67.9	5.8	0.0	0.0	0.0	232.7
1	33.7	50	170.4	216.8	447.1	431.4	198.7	170.9	122.3	948.9	2706.5
2	12	40	9.4	11.4	21.9	22.3	11.7	13.8	11.4	44.9	146.9
3	30	60	225.1	294.4	640.8	581.9	289.2	457.0	289.9	1574.2	4352.6
4	21	50	159.8	193.1	414.7	382.2	192.7	208.4	366.7	760.0	2677.6
5	21	50	147.9	182.7	369.2	334.8	157.7	172.7	174.9	545.3	2085.1
6	8.3	50	25.9	28.4	57.8	55.7	26.7	33.0	39.9	105.4	372.8
7	21	35.8	34.1	43.9	88.8	85.9	40.6	50.7	60.0	173.8	577.7
8	21	50	149.4	181.4	350.5	352.1	176.5	165.7	208.4	660.3	2244.2
9	12	60	62.4	65.7	136.6	128.0	60.4	88.2	103.0	236.9	881.2
10	21	64.1	189.8	227.6	469.8	449.9	228.4	315.2	223.4	1031.3	3135.4
11	30	40	113.9	141.6	284.5	288.4	140.2	174.6	220.0	606.4	1969.7
12	21	50	125.8	148.1	318.0	305.6	160.4	210.3	143.2	739.5	2150.9
13	21	50	156.2	181.0	388.1	370.4	206.4	312.1	217.7	1004.1	2836.1

* Ilości związków lotnych wyrażone są w mg równoważnika salicylanu benzylu (BSE) na 100 g pąków; EO - olejek eteryczny

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć

W ramach przeprowadzonych badań wskazanych jako osiągnięcie, przeanalizowano łącznie blisko sto próbek miodów odmianowych z 9 źródeł botanicznych, 21 ziołomiodów 7 odmian, 8 próbek propolisu oraz ekstrakty i olejek eteryczny uzyskane z pąków topoli. Zastosowano nowoczesne techniki analityczne, m.in. UHPLC-QqTOF-MS, HPLC/UHPLC-DAD, GC-FID, GC-MS, NMR, PTR-MS. W badaniach wykorzystano zaawansowaną analizę statystyczną, w tym m.in. metodę powierzchni odpowiedzi (ang. *response surface methodology*, RSM) w modelowaniu i optymalizacji procesu ekstrakcji, analizę głównych składowych (ang. *principal component analysis*, PCA), klasyfikację metodą algorytmu k najbliższych sąsiadów (ang. *k-Nearest neighbor classification*, k-NN), analizę skupień metodą drzewa hierarchicznego (ang. *hierarchical-tree clustering*, HTC). W wyniku przeprowadzonych badań:

- Zoptymalizowano metodę ekstrakcji nadkrytycznym CO₂ dla pąków topoli oraz po raz pierwszy szczegółowo scharakteryzowano skład fitochemiczny takiego ekstraktu, który może znaleźć zastosowanie jako wieloskładnikowa substancja czynna.
- Opracowano metody chromatograficzne do badania związków fenolowych, polarnych związków azotowych w miodach z zastosowaniem nowoczesnych metod analitycznych (UHPLC-QqTOF-MS, UHPLC-DAD).
- Opracowano nową, innowacyjną i wydajną, oszczędną i bardziej ekologiczną metodę izolacji frakcji lotnych miodu opartą na układzie mieszających się cieczy oraz ich rozdzielenie przez odwodnienie. Przygotowane wg procedury ekstrakty nadają się do badań przesiewowych próbek za pomocą GC.
- Opracowano metody oceny tożsamości i klasyfikacji miodów różnych odmian na podstawie analitycznych odcisków palca i profili chemicznych (HPLC-DAD, PTR-MS, GC-MS) oraz chemometrii.
- Scharakteryzowano profile chemiczne i wytypowano markery pochodzenia botanicznego dla wybranych odmian miodu – faceliowego, z czosnku niedźwiedziego, spadzi jodłowej. Dla miodu faceliowego: (-)-5-*epi*-litospermozyd, heksan-1-ol, lakton lawendowy, (*E*)-/(*Z*)-3-okso-*retro-α*-jonol, womifoliol; dla miodu z czosnku niedźwiedziego: hydrochinon, kwas 4-hydroksybenzoesowy, (*E*)-4-(*r*-1',*t*-2',*c*-4'-trihydroksy-2',6',6'-trimetylcykloheksylo)but-3-en-2-en-2-on; dla miodu jodłowego: 4-hydroksy-3,5,6-trimetylo-4-(3-oksobut-1-enylo)cykloheks-2-en-1-on, alkohol koniferylowy, borneol, benzaldehyd, kwas protokatechowy.
- Scharakteryzowano po raz pierwszy profile chemiczne związków lotnych różnych odmian ziołomiodów. W ziołomiodzie głogowym zidentyfikowano herniarynę, po raz pierwszy w przetworach tej rośliny.
- Wyizolowano i zidentyfikowano po raz pierwszy w miodzie rzadko występujący w naturze (-)-5-*epi*-litospermozyd. Ustalono jego dokładną strukturę z zastosowaniem HRMS, NMR (¹H, ¹³C, DEPT-90/-135, COSY, HSQC, HMBC, NOESY). Wskazano ten związek jako potencjalny specyficzny marker miodu faceliowego.
- Po raz pierwszy na świecie (wg dostępnego piśmiennictwa) zidentyfikowano i oznaczono w miodach zawartość (-)-5-*epi*-litospermozydu, urydyny, adeniny, ksantyny.

Piśmiennictwo

1. Shurkin, J. News Feature: Animals that self-medicate: Proc. Natl. Acad. Sci. 2014, 111, 17339–17341, doi:10.1073/pnas.1419966111.
2. Bertrams, J.; Kunz, N.; Müller, M. Phenolic compounds as marker compounds for botanical origin determination of German propolis samples based on TLC and TLC-MS: Appl. Bot. 2013, 153, 143–153, doi:10.5073/JABFQ.2013.086.020.
3. Kędzia, B.; Hołderna-Kędzia, E. Miód: Skład i właściwości biologiczne; Rysiewicz, M., Gądkowska, M., Eds.; I.; Przedsiębiorstwo Wydawnicze “Rzeczpospolita” S.A.: Warszawa, 2008; ISBN 978-83-60192-82-5.
4. Linskens, H. F.; Horde, W. Pollen as Food and Medicine - A Review. Econ. Bot. 1997, 51, 78–86.
5. Marcucci, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie 1995, 26, 83–99.
6. Farooqui, T.; Farooqui, A. A. Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: A critical review. Curr. Nutr. Food Sci. 2010, 6, 186–199, doi:10.2174/157340110792389136r10.1093/ecam/nep112.
7. Catchpole, O.; Mitchell, K.; Bloor, S.; Davis, P.; Suddes, A. Antiproliferative activity of New Zealand propolis and phenolic compounds vs human colorectal adenocarcinoma cells. Fitoterapia 2015, 106, 167–174, doi:10.1016/j.fitote.2015.09.004.
8. Kuś, P. M.; Congiu, F.; Teper, D.; Sroka, Z.; Jerković, I.; Tuberoso, C. I. G. Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types. LWT - Food Sci. Technol. 2014, 55, 124–130, doi:10.1016/j.lwt.2013.09.016.
9. Jerković, I.; Marijanović, Z.; Kuś, P. M.; Tuberoso, C. I. G. Comprehensive Study of Mediterranean (Croatian) Propolis Peculiarity: Headspace, Volatiles, Anti-*Varroa*-Treatment Residue, Phenolics, and Antioxidant Properties. Chem. Biodivers. 2016, 13, 210–218, doi:10.1002/cbdv.201500053.
10. Isidorov, V. A.; Szczepaniak, L.; Bakier, S. Rapid GC / MS determination of botanical precursors of Eurasian propolis. Food Chem. 2014, 142, 101–106, doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.032.
11. Hadagali, M. D.; Chua, L. S. The anti-inflammatory and wound healing properties of honey. Eur. Food Res. Technol. 2014, 239, 1003–1014, doi:10.1007/s00217-014-2297-6.
12. Kwakman, P. H. S.; Van den Akker, J. P. C.; Güçlü, A.; Aslami, H.; Binnekade, J. M.; de Boer, L.; Boszhard, L.; Paulus, F.; Middelhoek, P.; te Velde, A. A.; Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E.; Schultz, M. J.; Zaat, S. A. J. Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization. Clin. Infect. Dis. 2008, 46, 1677–82, doi:10.1086/587892.
13. Kuś, P. M.; Szweda, P.; Jerković, I.; Tuberoso, C. I. G. Activity of Polish unifloral honeys against pathogenic bacteria and its correlation with colour, phenolic content, antioxidant capacity and other parameters. Lett. Appl. Microbiol. 2016, 62, 269–276, doi:10.1111/lam.12541.
14. Oelschlaegel, S.; Pieper, L.; Staufenbiel, R.; Gruner, M.; Zeppert, L.; Pieper, B.; Koelling-

- Speer, I.; Speer, K. Floral Markers of Cornflower (*Centaurea cyanus*) Honey and Its Peroxide Antibacterial Activity for an Alternative Treatment of Digital Dermatitis. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 11811–11820, doi:10.1021/jf303699t.
15. Majtan, J.; Bohova, J.; Garcia-Villalba, R.; Tomas-Barberan, F. a; Madakova, Z.; Majtan, T.; Majtan, V.; Klaudiny, J. Fir honeydew honey flavonoids inhibit TNF- α -induced MMP-9 expression in human keratinocytes: a new action of honey in wound healing. *Arch. Dermatol. Res.* 2013, 305, 619–27, doi:10.1007/s00403-013-1385-y.
 16. Weston, R. J.; Mitchell, K. R.; Allen, K. L. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. *Food Chem.* 1999, 64, 295–301, doi:10.1016/S0308-8146(98)00100-9.
 17. Kuncic, M. K.; Jaklic, D.; Lapanje, A.; Gunde-Cimerman, N. Antibacterial and antimycotic activities of Slovenian honeys. *Br. J. Biomed. Sci.* 2012, 69, 154–158.
 18. Mayer, A.; Slezak, V.; Takac, P.; Olejnik, J.; Majtan, J. Treatment of non-healing leg ulcers with honeydew honey. *J. Tissue Viability* 2014, 23, 94–7, doi:10.1016/j.jtv.2014.08.001.
 19. Majtan, J.; Majtanova, L.; Bohova, J.; Majtan, V. Honeydew honey as a potent antibacterial agent in eradication of multi-drug Rresistant *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cancer patients. *Phyther. Res.* 2011, 25, 584–587.
 20. Vlcekova, P.; Krutakova, B.; Takac, P.; Kozanek, M.; Salus, J.; Majtan, J. Alternative treatment of gluteofemoral fistulas using honey: a case report. *Int. Wound J.* 2012, 9, 100–3, doi:10.1111/j.1742-481X.2011.00844.x.
 21. Cernak, M.; Majtanova, N.; Cernak, A.; Majtan, J. Honey prophylaxis reduces the risk of endophthalmitis during perioperative period of eye surgery. *Phyther. Res.* 2012, 26, 613–616.
 22. Majtanova, N.; Vodrazkova, E.; Kurilova, V.; Horniackova, M.; Cernak, M.; Cernak, A.; Majtan, J. Complementary treatment of contact lens-induced corneal ulcer using honey: a case report. *Cont. Lens Anterior Eye* 2015, 38, 61–3, doi:10.1016/j.clae.2014.09.004.
 23. Brudzynski, K.; Lannigan, R. Mechanism of honey bacteriostatic action against MRSA and VRE involves hydroxyl radicals generated from honey's hydrogen peroxide. *Front. Microbiol.* 2012, 3, 1–8, doi:10.3389/fmicb.2012.00036.
 24. Szweda, P.; Gucwa, K.; Kurzyk, E.; Romanowska, E.; Dzierzanowska-Fangrat, K.; Zielińska Jurek, A.; Kuś, P. M.; Milewski, S. Essential Oils, Silver Nanoparticles and Propolis as Alternative Agents Against Fluconazole Resistant *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei* Clinical Isolates. *Indian J. Microbiol.* 2015, 55, 175–183, doi:10.1007/s12088-014-0508-2.
 25. Grecka, K.; Kuś, P. M.; Worobo, R. W.; Szweda, P. Study of the anti-staphylococcal potential of honeys produced in Northern Poland. *Molecules* 2018, 23, 1–23, doi:10.3390/molecules23020260.
 26. Kuś, P. M.; Szweda, P.; Jerković, I.; Tuberoso, C. I. G. Activity of Polish unifloral honeys against pathogenic bacteria and its correlation with colour, phenolic content, antioxidant capacity and other parameters. *Lett. Appl. Microbiol.* 2016, 62, doi:10.1111/lam.12541.
 27. Jerković, I.; Marijanović, Z.; Kuś, P. .; Tuberoso, C. I. G. Comprehensive Study of Mediterranean (Croatian) Propolis Peculiarity: Headspace, Volatiles, Anti-Varroa-Treatment Residue, Phenolics, and Antioxidant Properties. *Chem. Biodivers.* 2016, 13, doi:10.1002/cbdv.201500053.
 28. Bryant, V. M.; Jones, G. D. The R-Values of Honey : Pollen Coefficients. *Palynology* 2001,

25, 11–28.

29. Kaškonienė, V.; Venskutonis, P. R. Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2010, 9, 620–634, doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00130.x.
30. Beretta, G.; Caneva, E.; Regazzoni, L.; Bakhtyari, N. G.; Maffei Facino, R. A solid-phase extraction procedure coupled to ¹H NMR, with chemometric analysis, to seek reliable markers of the botanical origin of honey. *Anal. Chim. Acta* 2008, 620, 176–82, doi:10.1016/j.aca.2008.05.025.
31. Beretta, G.; Granata, P.; Ferrero, M.; Orioli, M.; Maffei Facino, R. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta* 2005, 533, 185–191, doi:10.1016/j.aca.2004.11.010.
32. Isidorov, V. A.; Bagan, R.; Bakier, S.; Swiecicka, I. Chemical composition and antimicrobial activity of Polish herbhoneys. *Food Chem.* 2015, 171, 84–88, doi:10.1016/j.foodchem.2014.08.112.
33. Juszczak, L.; Socha, R.; Rożnowski, J.; Fortuna, T.; Nalepka, K. Physicochemical properties and quality parameters of herbhoneys. *Food Chem.* 2009, 113, 538–542, doi:10.1016/j.foodchem.2008.07.098.
34. Bankova, V.; Popova, M.; Bogdanov, S.; Sabatini, A. G. Chemical composition of European propolis: Expected and unexpected results. *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 2002, 57, 530–533, doi:10.1515/znc-2002-5-622.
35. Rubiolo, P.; Casetta, C.; Cagliero, C.; Brevard, H.; Sgorbini, B.; Bicchi, C. *Populus nigra* L. bud absolute: A case study for a strategy of analysis of natural complex substances. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, 405, 1223–1235, doi:10.1007/s00216-012-6537-y.
36. Mainar, A. M.; Langa, E.; Berruoco, B.; Maestro, C.; Urieta, J. S. Antioxidant activity of supercritical extracts of *Populus* buds. In 11th European meeting on supercritical fluids new perspectives in supercritical fluids: nanoscience, materials and processing; Barcelona, 2008; pp. 2–7.
37. Calvo-Muñoz, C. Usos medicinales del chopo negro, (*Populus nigra* L.). *Med. Natur.* 2013, 7, 99–115.
38. Farkas, Á.; Zajác, E. Nectar production for the Hungarian honey industry. *Eur. J. Plant Sci. Biotechnol.* 2007, 1, 125–151.
39. von der Ohe, W.; von der Ohe, K. Phaceliahonig. *Das Bieneninstitut Celle Inf.* 1999, 3–5.
40. Trzybiński, S. Miód faceliowy i inne miody cz 2. *Pasieka* 2010, 2, 8.
41. Ponichtera, P. The sowing value of tansy phacelia (*Phacelia tanacetifolia* Benth.) seeds in the long-term storage. *Agric. Eng.* 2016, 20, 153–159, doi:10.1515/agriceng-2016-0053.
42. Ito, H.; Miyake, M.; Nishitani, E.; Mori, K.; Hatano, T.; Okuda, T.; Konoshima, T.; Takasaki, M.; Kozuka, M.; Mukainaka, T.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Yoshida, T. Anti-tumor promoting activity of polyphenols from *Cowania mexicana* and *Coleogyne ramosissima*. *Cancer Lett.* 1999, 143, 5–13, doi:10.1016/S0304-3835(99)00160-3.
43. de Farias, P. A. M.; Figueredo, F. G.; Lucas, A. M. B.; de Moura, R. B.; Coutinho, H. D. M.; da Silva, T. M. S.; de Aguiar Rocha Martin, A. L.; de França Fonteles, M. M. Antibiotic-modifying activity of riachin, a non-cyanogenic cyanoglycoside extracted from *Bauhinia*

- pentandra*. Drug Des. Devel. Ther. 2015, 9, 3067–3072, doi:10.2147/DDDT.S84676.
44. Holguin, S.; Martinez, J.; Chow, C.; Wurtman, R. Dietary uridine enhances the improvement in learning and memory produced by administering DHA to gerbils. FASEB J. 2008, 22, 3938–46, doi:10.1096/fj.08-112425.
 45. Wurtman, R. J.; Cansev, M.; Ulus, I. H. Synapse formation is enhanced by oral administration of uridine and DHA, the circulating precursors of brain phosphatides. J. Nutr. Heal. Aging 2009, 13, 189–197, doi:10.1007/s12603-009-0056-3.
 46. de Bruin, N. M. W. J.; Kiliaan, A. J.; de Wilde, M. C.; Broersen, L. M. Combined uridine and choline administration improves cognitive deficits in spontaneously hypertensive rats. Neurobiol. Learn. Mem. 2003, 80, 63–79, doi:10.1016/S1074-7427(03)00024-8.
 47. Kondo, D. G.; Sung, Y.-H.; Hellem, T. L.; Delmastro, K. K.; Jeong, E.-K.; Kim, N.; Shi, X.; Renshaw, P. F. Open-label uridine for treatment of depressed adolescents with bipolar disorder. J. Child Adolesc. Psychopharmacol. 2011, 21, 171–175, doi:10.1089/cap.2010.0054.
 48. Renshaw, P. Pyrimidines, such as uridine, in treatments for patients with bipolar disorder 2010, 20.
 49. Stover, P. J.; Field, M. S. Use of uridine and deoxyuridine to treat folate-responsive pathologies 2017.
 50. Jerković, I.; Marijanović, Z. Oak (*Quercus frainetto* Ten.) honeydew honey--approach to screening of volatile organic composition and antioxidant capacity (DPPH and FRAP assay). Molecules 2010, 15, 3744–56, doi:10.3390/molecules15053744.
 51. Martín, R. A. P.; Hortigüela, L. V.; Lozano, P. L.; Cortina, M. D. R.; Carretero, C. de L. *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of Spanish honeys. Int. J. Food Prop. 2008, 11, 727–737, doi:10.1080/10942910701586257.
 52. Spilioti, E.; Jaakkola, M.; Tolonen, T.; Lipponen, M.; Virtanen, V.; Chinou, I.; Kassi, E.; Karabournioti, S.; Moutsatsou, P. Phenolic acid composition, antiatherogenic and anticancer potential of honeys derived from various regions in Greece. PLoS One 2014, 9, e94860, doi:10.1371/journal.pone.0094860.
 53. Lusic, D.; Koprivnjak, O.; Curic, D.; Sabatini, A. G.; Conte, L. S. Volatile profile of Croatian lime tree (*Tilia* sp.), fir honeydew (*Abies alba*) and sage (*Salvia officinalis*) honey. Food Technol. Biotechnol. 2007, 45, 156–165.
 54. Rybak-Chmielewska, H.; Szczęsna, T.; Waś, E.; Jaśkiewicz, K.; Teper, D. Characteristics of Polish unifloral honeys IV. Honeydew honey, mainly *Abies alba* L. J. Apic. Sci. 2013, 57, 51–59, doi:10.2478/jas-2013-0006.
 55. Bertoncej, J.; Golob, T.; Kropf, U.; Korošec, M. Characterisation of Slovenian honeys on the basis of sensory and physicochemical analysis with a chemometric approach. Int. J. Food Sci. Technol. 2011, 46, 1661–1671, doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02664.x.
 56. Bertoncej, J.; Dobersek, U.; Jamnik, M.; Golob, T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. Food Chem. 2007, 105, 822–828, doi:10.1016/j.foodchem.2007.01.060.
 57. Majtan, J.; Bohova, J.; Horniackova, M.; Klaudiny, J. Anti-biofilm Effects of Honey Against Wound Pathogens *Proteus mirabilis* and *Enterobacter cloacae*. Phyther. Res. 2014, 28, 69–75.

58. Daher, S.; Gülaçar, F. O. Analysis of phenolic and other aromatic compounds in honeys by solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 5775–80, doi:10.1021/jf8006745.
59. Karabagias, I. K.; Badeka, A. V.; Kontakos, S.; Karabournioti, S.; Kontominas, M. G. Botanical discrimination of Greek unifloral honeys with physico-chemical and chemometric analyses. *Food Chem.* 2014, 165, 181–90, doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.033.
60. Tsiapara, A. V.; Jaakkola, M.; Chinou, I.; Graikou, K.; Tolonen, T.; Virtanen, V.; Moutsatsou, P. Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: Profile analysis of extracts. *Food Chem.* 2009, 116, 702–708, doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.024.
61. de la Fuente, E.; Sanz, M. L.; Martinez Castro, I.; Sanz, J.; Ruiz Matute, A. I. Volatile and carbohydrate composition of rare unifloral honeys from Spain. *Food Chem.* 2007, 105, 84–93, doi:10.1016/j.foodchem.2007.03.039.
62. Bertonec, J.; Polak, T.; Kropf, U.; Korošec, M.; Golob, T. LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey. *Food Chem.* 2011, 127, 296–302, doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.003.
63. Karabagias, I. K.; Badeka, A. V.; Kontakos, S.; Karabournioti, S.; Kontominas, M. G. Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Chem.* 2014, 146, 548–557, doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.105.
64. Karabagias, I. K.; Vavoura, M. V.; Nikolaou, C.; Badeka, A. V.; Kontakos, S.; Kontominas, M. G. Floral authentication of Greek unifloral honeys based on the combination of phenolic compounds, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Res. Int.* 2014, 62, 753–760, doi:10.1016/j.foodres.2014.04.015.
65. Cowan, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999, 12, 564–582.
66. Socha, R.; Juszczak, L.; Pietrzyk, S.; Fortuna, T. Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoney. *Food Chem.* 2009, 113, 568–574, doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.029.
67. Malenica Staver, M.; Ratkaj, I.; Broznić, D.; Jerković, I.; Marijanović, Z.; Željezić, D.; Pavelić Kraljević, S. Bioactivity of *Satureja montana* L. honey extracts and their profile screening 2. *RSC Adv.* 2014, 4, 47329–47340, doi:10.1039/C4RA08368G.
68. Jerković, I. Volatile Benzene Derivatives as Honey Biomarkers. *Synlett* 2013, 24, 2331–2334, doi:10.1055/s-0033-1338972.
69. Alissandrakis, E.; Tarantilis, P. A.; Harizanis, P. C.; Polissiou, M. Evaluation of four isolation techniques for honey aroma compounds. *J. Sci. Food Agric.* 2005, 85, 91–97, doi:10.1002/jsfa.1934.
70. Castro-Vázquez, L.; Pérez-Coello, M. S.; Cabezudo, M. D. Analysis of volatile compounds of rosemary honey. Comparison of different extraction techniques. *Chromatographia* 2003, 57, 227–233, doi:doi.org/10.1007/BF02491721.
71. Castro-Vázquez, L.; Díaz-Maroto, M. C.; Guchu, E.; Pérez-Coello, M. S. Analysis of volatile compounds of eucalyptus honey by solid phase extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.* 2006, 224, 27–31,

doi:10.1007/s00217-006-0284-2.

72. Alissandrakis, E.; Daferera, D.; Tarantilis, P. A.; Polissiou, M.; Harizanis, P. C. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. *Food Chem.* 2003, 82, 575–582, doi:10.1016/S0308-8146(03)00013-X.
73. Jerković, I.; Kuś, P. M.; Tuberoso, C. I. G.; Šarolić, M. Phytochemical and physical–chemical analysis of Polish willow (*Salix* spp.) honey: Identification of the marker compounds. *Food Chem.* 2014, 145, 8–14, doi:10.1016/j.foodchem.2013.08.004.
74. Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2015, 71, 2–8, doi:10.1016/j.trac.2014.12.011.
75. Dickinson, T. A.; White, J.; Kauer, J. S.; Walt, D. R. Current trends in ‘artificial-nose’ technology. *Trends Biotechnol.* 1998, 16, 250–258.
76. Ampuero, S.; Bogdanov, S.; Bosset, J.-O. Classification of unifloral honeys with an MS-based electronic nose using different sampling modes: SHS, SPME and INDEX. *Eur. Food Res. Technol.* 2004, 218, 198–207, doi:10.1007/s00217-003-0834-9.
77. Čačić Kenjerić, F.; Mannino, S.; Bennedetti, S.; Primorac, L.; Čačić Kenjerić, D. Honey botanical origin determination by electronic nose. *J. Apic. Res.* 2009, 48, 99–103, doi:10.3896/IBRA.1.48.2.03.
78. Luykx, D. M. A. M.; van Ruth, S. M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chem.* 2008, 107, 897–911.
79. Demestre, M.; Messerli, S. M.; Celli, N.; Shahhossini, M.; Kluwe, L.; Mautner, V.; Maruta, H. CAPE (caffeic acid phenethyl ester)-based propolis extract (Bio 30) suppresses the growth of human neurofibromatosis (NF) tumor xenografts in mice. *Phyther. Res.* 2009, 23, 226–230, doi:10.1002/ptr.
80. López, B. G.-C.; Schmidt, E. M.; Eberlin, M. N.; Sawaya, A. C. H. F. Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chem.* 2014, 146, 174–180, doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.063.
81. Castaldo, S.; Capasso, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 2002, 73, S1-6.
82. Barbarić, M.; Mišković, K.; Bojić, M.; Lončar, M. B.; Smolčić-Bubalo, A.; Debeljak, Z.; Medić-Šarić, M. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. *J. Ethnopharmacol.* 2011, 135, 772–778, doi:10.1016/j.jep.2011.04.015.
83. Santos, F. A.; Bastos, E. M. A.; Uzeda, M.; Carvalho, M. A. R.; Farias, L. M.; A, M. E. S.; Braga, F. C. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J. Ethnopharmacol.* 2002, 80, 1–7.
84. Bruch, G.; Wirth, E. H. Studies on Poplar Bud. *J. Am. Pharm. Assoc.* 1936, 15, 672–682.
85. Dudonné, S.; Poupard, P.; Coutière, P.; Woillez, M.; Richard, T.; Mérillon, J. M.; Vitrac, X. Phenolic composition and antioxidant properties of poplar bud (*Populus nigra*) extract: Individual antioxidant contribution of phenolics and transcriptional effect on skin aging. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 4527–4536, doi:10.1021/jf104791t.
86. Trudić, B.; Anđelković, B.; Orlović, S.; Tešević, V.; Pilipović, A.; Cvetković, M. HPLC/MS-TOF Analysis of Surface Resins from Three Poplar Clones Grown in Serbia. *South-east Eur.*

For. 2016, 7, 129–133, doi:10.15177/seeefor.16-12.

87. Bankova, V.; Popova, M.; Trusheva, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chem. Cent. J.* 2014, 8, 28, doi:10.1186/1752-153X-8-28.
88. Sayre, C. L.; Alrushaid, S.; Martinez, S. E.; Anderson, H. D.; Davies, N. M. Pre-clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of selected chiral flavonoids: Pinocembrin and pinostrobin. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2015, 18, 368–396.
89. Alavijeh, M. S.; Chishty, M.; Qaiser, M. Z.; Palmer, A. M. Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery. *NeuroRx* 2005, 2, 554–571, doi:10.1602/neurorx.2.4.554.
90. Shilpi, A.; Shivhare, U. S.; Basu, S. Supercritical CO₂ extraction of compounds with antioxidant activity from fruits and vegetables waste - a review. *Focus. Mod. Food Ind.* 2013, 2, 43–62.
91. Kong, Y.; Fu, Y. J.; Zu, Y. G.; Liu, W.; Wang, W.; Hua, X.; Yang, M. Ethanol modified supercritical fluid extraction and antioxidant activity of cajanin stilbene acid and pinostrobin from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. *Food Chem.* 2009, 117, 152–159, doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.091.
92. Malek, S. N. A.; Phang, C. W.; Ibrahim, H.; Wahab, N. A.; Sim, K. S. Phytochemical and cytotoxic investigations of *Alpinia mutica* rhizomes. *Molecules* 2011, 16, 583–589, doi:10.3390/molecules16010583.
93. Britto, A. C. S.; Oliveira, A. C. de A.; Henriques, R. M.; Cardoso, G. M. B.; Bomfim, D. S.; Carvalho, A. A.; Moraes, M. O.; Pessoa, C.; Pinheiro, M. L. B.; Costa, E. V.; Bezerra, D. P. *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria friesiana*. *Planta Med* 2012, 78, 409–414.
94. Tsuneki, H.; Ma, E. L.; Kobayashi, S.; Sekizaki, N.; Maekawa, K.; Sasaoka, T.; Wang, M. W.; Kimura, I. Antiangiogenic activity of β-eudesmol *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol.* 2005, 512, 105–115, doi:10.1016/j.ejphar.2005.02.035.
95. Costa, E. V.; Teixeira, S. D.; Marques, F. A.; Duarte, M. C. T.; Delarmelina, C.; Pinheiro, M. L. B.; Trigo, J. R.; Sales Maia, B. H. L. N. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatteria* species. *Phytochemistry* 2008, 69, 1895–1899, doi:10.1016/j.phytochem.2008.03.005.
96. Otaguro, K.; Iwatsuki, M.; Ishiyama, A.; Namatame, M.; Nishihara-Tukashima, A.; Kiyohara, H.; Hashimoto, T.; Asakawa, Y.; Mura, S.; Yamada, H. *In vitro* antitrypanosomal activity of plant terpenes against *Trypanosoma brucei*. *Phytochemistry* 2011, 72, 2024–2030, doi:10.1016/j.phytochem.2011.07.015.
97. Horak, S.; Koschak, A.; Stuppner, H.; Striessnig, J. Use-dependent block of voltage-gated Cav2.1 Ca²⁺ channels by petasins and eudesmol isomers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009, 330, 220–226, doi:10.1124/jpet.109.151183.
98. Asakura, K.; Matsuo, Y.; Oshima, T.; Kihara, T.; Minagawa, K.; Araki, Y.; Kagawa, K.; Kanemasa, T.; Ninomiya, M. omega-agatoxin IVA-sensitive Ca²⁺ channel blocker, alpha-eudesmol, protects against brain injury after focal ischemia in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2000, 394, 57–65, doi:S0014-2999(00)00102-3 [pii].
99. Seo, M. J.; Kim, S. J.; Kang, T. H.; Rim, H. K.; Jeong, H. J.; Um, J. Y.; Hong, S. H.; Kim, H. M. The regulatory mechanism of β-eudesmol is through the suppression of caspase-1

activation in mast cell-mediated inflammatory response. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2011, 33, 178–185, doi:10.3109/08923973.2010.491082.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

5.1. Nagrody i wyróżnienia za działalność naukową

(międzynarodowe i krajowe)

Nagrody

- Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców, Minister Nauki i Szkolnictwa Wyższego, 2017.
- Nagroda I stopnia J.M. Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, Rektor UMW, za ważne i twórcze osiągnięcia w pracy naukowej, 2016, 2018.
- Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego, MNiSW, za wybitne osiągnięcia dla doktorantów, 2014.
- Stypendium Prezydenta Wrocławia im. Ludwika Hirszfelda dla najlepszych doktorantów, Prezydent i Rada Miejska Wrocławia, za osiągnięcia w zakresie nauk biologicznych i medycznych, 2013.
- Stypendium pro-jakościowe dla doktorantów, 2013
- Stypendium JM Rektora dla najlepszych doktorantów, 2013, 2014
- Stypendium ze środków UE w ramach POKL (Program Operacyjny Kapitał Ludzki), 2011.

Wyróżnienia

- Wyróżnienie pracy doktorskiej, Rada Wydziału Farmaceutycznego z O. Analityki Medycznej, UMW, 2015.

5.2. Uczestnictwo w realizacji projektów badawczych

Projekty badawcze międzynarodowe

- „*BioProspecting of the Adriatic Sea*”, projekt realizowany w ramach centrum doskonałości w Chorwacji (Bio Pro Cro – center of excellence for Marine Bioprospecting) finansowany ze środków UE, 2017 – 2022, wykonawca.
- “*Research of Natural Products and Flavours: Chemical Fingerprinting and Unlocking the Potential (NaPro-Flav)*” HRZZ-IP-11-2013-8547, projekt finansowany przez Chorwacką Fundację Naukową (Hrvatska Zaklada za Znanost), 2014-2018; wykonawca.
- “*Essential oils and aromas – biologically active compounds and their modifications*” 011-0982929-1329, projekt finansowany przez Ministerstwo Nauki, Edukacji i Sportu Republiki Chorwacji, 2012-2013; wykonawca.

Projekty badawcze krajowe

A. Projekty finansowane ze środków NCN, NCBiR lub Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego

- „Charakterystyka i parametry jakościowe miodów odmianowych oraz produktów pochodnych”, projekt NCN 2014/15/N/NZ9/04058, PRELUDIUM 8, 2015-2018, kierownik.
- „Ocena możliwości wykorzystania produktów pszczelich oraz bakteriocyn syntetyzowanych przez mikroflorę tych produktów jako alternatywę lub uzupełnienie klasycznej antybiotykoterapii”, projekt NCN 2015/18/E/NZ6/00700, SONATA BIS 5, 2016-2021, wykonawca.

B. Projekty w ramach działalności statutowej Katedry i Zakładu Farmakognozji i Leku Roślinnego

- „Weryfikacja składu chemicznego i właściwości biologicznych wybranych farmakopealnych i nefarmakopealnych substancji roślinnych i ich przetworów” ST.D110.17.027, 2017 - 2019, wykonawca
- „Badanie fitochemiczne oraz właściwości biologiczne różnych gatunków miodów i propolisów” ST-857, 2014 – 2016, wykonawca.
- „Otrzymywanie frakcji fenolowej z miodów i badanie składu związków fenolowych oraz ich aktywności przeciw wolnorodnikowej” ST-577, 2011 – 2013, wykonawca

5.3. Współpraca naukowa

W ramach działalności naukowej współpracowałem i/lub nadal współpracuję z następującymi jednostkami naukowymi zagranicznymi:

- Wydział Chemiczno-Technologiczny, Uniwersytet w Splicie, Chorwacja.
- Katedra Nauk o Życiu i Środowisku, Uniwersytet w Cagliari, Włochy.
- Dział Chemii Organicznej i Biochemii, Instytut Rudjer Bozkovic, Zagrzeb, Chorwacja.
- Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet w Osijek, Chorwacja.
- Instytut ds. Żywnienia i Bezpieczeństwa Żywności, Uniwersytet w Barcelonie, Hiszpania.
- Instytut Bezpieczeństwa Żywności RIKILT, Uniwersytet w Wageningen, Holandia.

W ramach działalności naukowej współpracowałem i/lub nadal współpracuję z następującymi jednostkami naukowymi krajowymi:

- Katedra Technologii Leków i Biochemii, Politechnika Gdańska, Polska.
- Instytut Ogrodnictwa, Zakład Pszczelnictwa w Puławach, Polska.

- Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Nutraceutyków Roślinnych, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Polska.

5.4. Dorobek naukowy

(obejmujący autorstwo lub współautorstwo publikacji naukowych o międzynarodowym i krajowym zasięgu, w tym w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports - JCR, Web of Science - WoS, lub na liście European Reference Index for the Humanities - ERIH)

Ogólna liczba publikacji - **46**, w tym:

- oryginalnych prac naukowych **28** (**27** z *Impact Factor*, **5** jako pierwszy autor, **8** jako ostatni autor, **8** jako autor pierwszy i korespondujący),
- prac poglądowych **3** (**2** z *Impact Factor*, **1** jako pierwszy autor, **1** jako ostatni autor),
- rozdziałów w monografiach **1** (wyłącznie z punktacją MNiSW),
- streszczeń zjazdowych **14**, (**3** z wystąpień ustnych, **10** z komunikatów w formie plakatu, **1** pełnotekstowa publikacja pokonferencyjna; **5** krajowych, **9** zagranicznych; **10** jako pierwszy autor)

Mój dorobek naukowy po doktoracie obejmuje **21** pozycji, w tym:

- prac oryginalnych **18**,
- streszczeń zjazdowych **3**,

Za dorobek naukowy uzyskałem łącznie:

- **840** punktów MNiSW, **370** po doktoracie,
- **61,798** IF (**29** prac), **39,608** po doktoracie,
- Liczba cytowań **331** (**286** bez autocytowań) wg bazy Web of Science Core Collection,
- Indeks Hirscha ***h* = 11** wg bazy Web of Science Core Collection.

5.5. Omówienie dorobku naukowego

A. Przed uzyskaniem stopnia doktora

Główne kierunki badań dotyczyły poszukiwania chemicznych i fizykochemicznych markerów analitycznych, substancji o aktywności biologicznej i nowych źródeł znanych substancji czynnych. Początkowo, w ramach działalności w kole naukowym przy Katedrze Biologii i Botaniki Farmaceutycznej UMW, tematem badań były substancje roślinne stosowane w tradycyjnej medycynie chińskiej, szczególnie belamkandy chińskiej (*Iris domestica* (L.) Goldblatt & Mabb. (syn. *Belamcanda chinensis* (L.) DC.)), będącej źródłem mangiferyny, ksantonu o licznych właściwościach biologicznych m.in. aktywności przeciwbólowej, przeciwdrobnoustrojowej, cytoprotekcyjnej, przeciwzapalnej, przeciwalergicznej, promieniochronnej. Celem badań była ocena belamkandy chińskiej jako nowego źródła mangiferyny, opracowanie metodyki izolacji tego związku i badanie jego aktywności przeciwutleniającej. Następstwem badań nad belamkandą chińską, było m.in. oznaczenie tych właściwości i opracowanie procedury wyodrębniania mangiferyny z tego nowego, alternatywnego źródła (P14, P15, P22, P24, P25), a także zrealizowanie pracy magisterskiej, której promotorem był prof. dr hab. Adam Matkowski oraz opublikowanie artykułów przeglądowych o mangiferynie (P12, P13)

W dalszym okresie, w ramach studiów doktoranckich w Katedrze Farmakognozji UMW, głównym tematem podjętych badań stała się analiza fitochemiczna (frakcje lotne i nielotne), badanie właściwości fizykochemicznych, aktywności (przeciwutleniającej, przeciw-wolonorodnikowej) miodów odmianowych. Badania realizowane były m.in. w ramach zagranicznych pobytów badawczych na Uniwersytecie w Cagliari i na Uniwersytecie w Splicie we współpracy z prof. Carlo I. G. Tuberoso i prof. Igozem Jerkovićem. Tematem stały się zarówno bardziej znane jak i rzadkie, całkowicie nieprzebadane odmiany miodu.

Główne cele objęły:

- a) analizę profili chemicznych próbek należących do różnych odmian miodu, zarówno pod kątem związków lotnych, półlotnych i nielotnych z zastosowaniem różnych metod przygotowania próbek i technik analitycznych (mikroekstrakcja fazy nadpowierzchniowej do fazy stałej (HS-SPME), ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (USE) z użyciem rozpuszczalników o różnej polarności i analiza GC-MS/GC-FID; bezpośrednia analiza HPLC-DAD roztworów wodnych miodu),
- b) oznaczenie parametrów fizykochemicznych, koloru, całkowitej zawartości fenoli oraz aktywności przeciwutleniającej,
- c) identyfikację związków o potencjalnej aktywności biologicznej i/lub markerów chemicznych pochodzenia botanicznego.

Wynikiem prowadzonych badań było opracowanie profili chemicznych wybranych miodów odmianowych m.in. miodu z kwiatów jabłoni, wiśni, chabra bławatka, wierzby, kolendry, kawowca – obserwacje własne dotyczące składu chemicznego konkretnych odmian zostały opublikowane po raz pierwszy na świecie (P2, P3, P6, P7, P8, P9, P10, P16, P17, P18, P19, P20, P21, P23).

Innym aspektem badań było porównanie zróżnicowania również bardziej znanych odmian, pod kątem składu i aktywności, parametrów fizykochemicznych (P1, P4). Ponadto, umożliwiły one zidentyfikowanie w miodach związków o aktywności biologicznej oraz markerów analitycznych

pozwalających na klasyfikację i rozróżnianie odmian, co może być punktem wyjścia do opracowania metod standaryzacji. Wyniki badań zostały opublikowane zarówno w postaci 7 abstraktów konferencyjnych, jak i 9 prac pełnotekstowych w anglojęzycznych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. W poszczególnych odmianach zidentyfikowałem po kilkadziesiąt związków lotnych i nielotnych wskazując te, które mogą posłużyć jako markery chemiczne a także innych, mogących mieć wpływ na ostateczną aktywność biologiczną poszczególnych odmian.

Na przykład przebadany miód chabrowy cechował się dominującą obecnością 9- i 13-węglowych norizoprenoidów, szczególnie (*E*) i (*Z*)-3-okso-*retro-α*-jonolu, 3,4-dihydro-3-oksoedulanu (który zidentyfikowałem w miodzie po raz pierwszy w dostępnym piśmiennictwie) przydatnych jako chemiczne biomarkery tej odmiany miodu. Charakteryzował się również istotną zawartością lumichromu, ryboflawiny i kwasu fenylomlekowego (**P2**, **P9**, **P16**). Znaczenie tematu, potwierdziły równoległe badania innych badaczy stwierdzające wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową i przydatność w leczeniu ran.

Badania polskiego miodu wierzbowego zaowocowały zidentyfikowaniem związków charakterystycznych dla tej odmiany, m.in. borneolu, bicyklicznych monoterpenu z grupy pinanu (pinokarwon, myrtenal, werbenon), *trans-β*-damascenon, womifoliol, syrynginian metylu, 4-hydroksy-3-(1-metyloetyl)benzaldehyd, a także stosunkowo wysokiej zawartości izomerów kwasu absycsynowego (ABA), do 53,7 mg/kg (**P3**). ABA pełni rolę fitohormonu, ale według dostępnej literatury jest również substancją sygnałową w ludzkim organizmie. Już przy bardzo małych stężeniach, działa m.in. jako endogenny immunomodulator, stymuluje odpowiedź immunologiczną w leukocytach, uwalnianie insuliny z komórek trzustki, hamuje wzrost komórek nowotworowych i pobudza odpowiedź komórek na stres (ciepło, światło).

Profile związków lotnych miodu z drzew owocowych – jabłoni oraz z wiśni zostały zbadane po raz pierwszy na świecie. Miód jabłoniowy charakteryzował się wysoką zawartością procentową pochodnych szlaku kwasu szikimowego, a także terpenów, norizoprenoidów i innych związków, takich jak kumaran czy 1H-indolo-3-octan metylu (MeIAA), znalezione w miodzie po raz pierwszy. W roślinie związek ten może pełnić rolę nieaktywnej formy transportowej kwasu 1H-indolo-3-octowego (IAA), fitohormonu należącego do grupy auksyn. Zarówno w miodzie jabłoniowym, jak i z kwiatu wiśni w fazie nadpowierzchniowej dominowały benzaldehyd i aldehydy lilakowe, a w ekstraktach – womifoliol. Związki te występują także w innych odmianach, mogą więc służyć jedynie jako niespecyficzne markery pochodzenia botanicznego (**P8**, **P10**, **P17**, **P20**).

Pozostałe badania obejmowały analizę profili chemicznych miodu z kwiatów kawowca, w którym zidentyfikowano m.in. stosunkowo dużą zawartość kofeiny i teobrominy – odpowiednio do 83,59 i 93,11 mg/kg (**P6**), a także miodu z kwiatów kolendry – bogatego szczególnie w tlenki anhydrolinalolu, które mogą posłużyć jako jego markery (**P7**).

Oznaczono również wybrane parametry fizykochemiczne, w tym kolor (w układzie CIE $L^*a^*b^*C^*h$) i aktywność przeciwutleniającą w testach DPPH (rodnik 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylowy) i FRAP (test siły przeciwutleniającej redukującej jon żelazowy- ang. *ferric ion reducing antioxidant power*) i zawartość całkowitą polifenoli z użyciem zmodyfikowanej metody Folin-Ciocalteu zarówno dla wcześniej wymienionych, jak również częściej występujących odmian, takich jak miody nektarowe: z gryki (*Fagopyrum esculentum* Moench), lipy (*Tilia* spp.), nawłoci (*Solidago* spp.), robinii akacjowej (*Robinia pseudoacacia* L.), rzepaku (*Brassica napus* L.), i wrzосу (*Calluna vulgaris* L.). Przeprowadzone badania, mogą pozwolić na opracowanie skutecznych metod potwierdzania tożsamości, tj. konkretnej odmiany miodu, co jest istotne zważywszy na wielką

różnorodność składu chemicznego i aktywności biologicznej poszczególnych odmian, a także ich przydatności do różnych zastosowań. Badania potwierdzają również obecność w miodzie związków o aktywności biologicznej (P4). Temat oceny składowych chromatycznych, jako parametrów pozwalających na rozróżnianie poszczególnych europejskich odmian miodu został natomiast rozwinięty w osobnych badaniach (P1).

Prace dotyczące miodu chabrowego (P2, P9), wierzbowego (P3), wiśniowego (P10), jabłoniowego (P8) oraz porównania aktywności przeciwutleniającej, zawartości całkowitej związków fenolowych i profili popularnych odmian miodu (P4) stały się częścią pracy doktorskiej, której promotorem był dr hab. Zbigniew Sroka, prof. nadzw.

Wynikiem badań nad miodami była również praca przeglądowa dotycząca związków terpenowych w miodach, wraz z porównaniem ich składu jakościowego z głównymi związkami obecnymi w wyjściowej roślinie (P11).

Oprócz tego, inne badania obejmowały badanie fitochemii i aktywności przeciwutleniającej oleju z oliwek pozyskanego z różnych odmian uprawnych (P5).

B. Po uzyskaniu stopnia doktora

Główne kierunki badań po doktoracie obejmowały rozszerzenie wcześniejszego tematu fitochemii miodów o zupełnie inne odmiany, pochodzące z odmiennych źródeł botanicznych, rozwój nowych metod ekstrakcji, przygotowania próbek, nowych metod analitycznych, badanie nowych grup związków, a także zastosowanie chemometrii w celu klasyfikacji miodów odmianowych. Większość z badań została zrealizowana w ramach współpracy międzynarodowej i zagranicznych pobytów naukowych. Kierunki badań fitochemicznych zostały rozszerzone na inne produkty pszczelarskie i ich naturalne źródła roślinne, m.in. propolis (P36[H8]) i pąki topoli, ziołomiody, jak również we współpracy z dr Piotrem Szwedą (Politechnika Gdańska) badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej miodów odmianowych (P31, P37) oraz propolisu (P41). Badania skupiały się na opracowaniu nowych metod chromatograficznych (LC-DAD, LC-QqTOF-MS), analizie fitochemicznej (frakcje lotne i nielotne), scharakteryzowaniu właściwości fizykochemicznych, aktywności (przeciwutleniająca, przeciwwolnorodnikowa) kolejnych gatunków miodów odmianowych (P44), takich jak: miód faceliowy (P27[H1], P28[H2]), z czosnku niedźwiedziego (P35[H4]), spadzi jodowej (P33[H3], P46), kruszyny (P38), cząbrku (P39) oraz próbek ziołomiodów (P40[H5]) i propolisu (P36[H8]). W ten sposób uzyskano nową wiedzę o fitochemii miodów odmianowych, ziołomiodów, propolisu, ich zróżnicowania pod kątem składu i aktywności. W każdej z substancji zidentyfikowano po kilkadziesiąt związków należących do różnych grup chemicznych. Znaczna część badań była prowadzona w ramach współpracy międzynarodowej i/lub podczas pobytów badawczych za granicą.

Poznano szczegółowe profile chemiczne w zakresie związków lotnych wspomnianych odmian miodu i ziołomiodów (P40[H5]), a także główne związki nielotne zawarte w miodzie faceliowym (P27[H1], P28[H2]) i jodłowym (P33[H3]). Po raz pierwszy w dostępnej literaturze, w miodzie faceliowym zidentyfikowałem i opisałem obecność i zawartość m.in. urydyny, adeniny, a także 5-*epi*-litospermozydu, który może posłużyć jako marker tej odmiany (P27[H1]). Badania pozwoliły również na wytypowanie markerów (4-hydroksy-3,5,6-trimetylo-4-(3-oksobut-1-enylo)-cycloheks-2-en-1-onu, alkoholu koniferylowego, borneolu, benzaldehydu, kwasu protokatechowego), które mogą być pomocne w identyfikacji miodu jodłowego (P33[H3]), odmiany o wysokim potencjale medycznym potwierdzonym w badaniach klinicznych dostępnych w piśmiennictwie.

Zidentyfikowanie w miodach związków o aktywności biologicznej oraz markerów analitycznych pozwalających na klasyfikację i rozróżnianie odmian mogą być punktem wyjścia do opracowania metody ich standaryzacji.

Przeprowadzone testy aktywności przeciwdrobnoustrojowej 37 odmianowych próbek o 14 różnych typów miodu wykazały duże zróżnicowanie między ich poszczególnymi odmianami. Ponadto, zaobserwowałem istnienie istotnej korelacji między aktywnością przeciwdrobnoustrojową, a innymi parametrami miodu, takimi jak kolor czy zawartość polifenoli. Najbardziej aktywne były miody ciemniejsze, bardziej żółte, o wyższej przewodności i bogatsze w związki fenolowe. Wśród badanych próbek, najbardziej aktywnymi odmianami były miody tymiankowe, chabrowe i gryczane (P37).

Badania obejmowały również opracowanie nowej, innowacyjnej i efektywnej metody izolacji frakcji lotnej z próbek miodu, która umożliwi skuteczną ekstrakcję przy jednoczesnym ograniczeniu zastosowania toksycznych rozpuszczalników, obniżeniu kosztów i skróceniu czasu prowadzonych badań. Opracowałem metodę opartą na zastosowaniu mieszających się cieczy i ich rozdziale poprzez odwodnienie siarczanem magnezu oraz dalszych etapach zmiany polarności i oczyszczania próbki (P26[H6]).

Ponadto, badania objęły fitochemię pąków topoli (związki lotne i nielotne), pod kątem optymalizacji procesu ekstrakcji dwutlenkiem węgla w fazie nadkrytycznej w celu uzyskania wartościowego ekstraktu, który może stać się składnikiem preparatów leczniczych (P29[H10], P30[H9], P45). Proces ekstrakcji związków czynnych z pąków topoli ww. metodą został zoptymalizowany po raz pierwszy, a uzyskane ekstrakty zostały szczegółowo scharakteryzowane. Dzięki zastosowaniu ww. metody, możliwe jest uzyskanie frakcji wzbogaconych zarówno w biologicznie czynne związki fenolowe (głównie flawonoidy), jak i seskwiterpeny, które mogą działać synergistycznie. Takie ekstrakty mogą znaleźć zastosowanie jako bardzo cenne składniki preparatów leczniczych. Głównymi obecnymi w nim związkami były pinocembryna, octan pinobanksyny, pinostrobin a także chalkon pinostrobin i izomery eudesmolu o dobrze znanej aktywności biologicznej. Na przykład izomery eudesmolu, stanowiące blisko jedną czwartą ekstraktu, charakteryzują się m.in. działaniem przeciwnowotworowym i przeciwdrobnoustrojowym.

Dalsze kierunki badań obejmowały również zastosowania fingerprintingu oraz obrazowania hiperspektralnego wraz z metodami wieloczynnikowymi i metodami uczenia maszynowego do klasyfikacji miodów odmianowych. Tematy realizowane we współpracy międzynarodowej objęły m.in. zastosowanie danych z obrazowania w świetle widzialnym i podczerwonym (VIS/NIR) (P34, P43), analizy fazy nadpowierzchniowej z użyciem spektrometrii mas z jonizacją transferu protonu (PTR-MS), profili chromatograficznych (HPLC-DAD) zarejestrowanych przy różnych długościach fali światła widzialnego do różnicowania odmian polskiego miodu (P42[H7]). Wszystkie opracowane metody pozwalały na efektywną klasyfikację większości badanych odmian. Natomiast w badaniach nad miodem faceliowym, na podstawie profilu związków lotnych i charakterystyki kolorystycznej oraz z zastosowaniem analizy statystycznej wykazałem możliwość rozróżnienia miodów odmianowych od zanieczyszczonych nektarem z innych źródeł botanicznych (P28 [H2]).

Podsumowując, badania pozwoliły na zaobserwowanie zróżnicowania aktywności oraz składu chemicznego produktów pszczełich. Szczegółowe badania, pozwoliły na wytypowanie związków markerowych, jak i opracowanie metod opartych na chemometrii pomocnych w klasyfikacji poszczególnych odmian. Nowa metoda ekstrakcji pozwala natomiast na efektywne przygotowanie próbek do badań przesiewowych. Ma to znaczenie zarówno w potwierdzeniu tożsamości i jakości

w przypadku odmian o wysokich walorach medycznych jak i spożywczych. Miód jest substancją farmakopealną, jednak monografie nie uwzględniają pochodzenia botanicznego, które ma istotny wpływ na cenione od wieków walory prozdrowotne i lecznicze. Podjęte badania mogą ułatwić badanie i potwierdzanie pochodzenia botanicznego miodów, zapobiegać ich zafałszowaniom, umożliwić ich standaryzację opartą o skład fitochemiczny oraz przyczynić się do pełnego wykorzystania ich potencjału leczniczego, w tym do poszerzenia zastosowania miodów do celów farmaceutycznych, wprowadzenia nowych preparatów. Jest to ważne zarówno dla nauk farmaceutycznych, nauki o żywności jak i technologii żywności oraz przemysłu spożywczego ze względu na rosnące zainteresowanie jego funkcjonalnym i medycznym zastosowaniem, opartym na tradycji ale też na wiedzy popartej badaniami naukowymi. O rosnącym znaczeniu zastosowania miodów w farmacji, świadczą coraz liczniejsze preparaty produkowane na bazie miodu pojawiające się w obrocie aptecznym. Przykładem są opatrunki nasączone miodem i miody medyczne w tubce do stosowania na trudno gojące się i zakażone rany (np. odleżynowe, w zespole stopy cukrzycowej), w przypadku których konwencjonalne leczenie często zawodzi. Ponadto, dostępne są preparaty stosowane w kaszlu, przeziębieniach, infekcjach górnych dróg oddechowych, obniżonej odporności, w zaparciach, apteczne preparaty kosmetyczne. W technologii żywności, miód sprawdza się nie tylko jako naturalny słodzik i dodatek smakowy, ale również spełnia wiele innych funkcji np. jako w pełni naturalny i ekologiczny konserwant o działaniu przeciwdrobnoustrojowym i przeciwutleniającym.

Opracowanie zoptymalizowanych warunków ekstrakcji pąków topoli może być natomiast punktem wyjścia do wykorzystania uzyskanej frakcji wzbogaconej w substancje o wysokiej aktywności biologicznej, w nowoczesnych preparatach do zastosowań m.in. w leczeniu schorzeń dermatologicznych.

Inne, nowe kierunki badań, obejmują współpracę dotyczącą poznania fitochemii organizmów morskich (P32) zarówno w aspekcie ich różnorodności chemicznej, jak i poszukiwania nowych połączeń o potencjalnej aktywności biologicznej.

5.6. Wykaz osiągnięć w pracy naukowej

5.6.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora

I. Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe

A. w czasopismach posiadających IF

- P1. Carlo Ignazio Giovanni Tuberoso, Igor Jerković, Giorgia Sarais, Francesca Congiu, Zvonimir Marijanović, **Piotr Marek Kuś**.: Color evaluation of seventeen European unifloral honey types by means of spectrophotometrically determined CIE L*C*abhoab chromaticity coordinates
Food Chem. 2014 Vol.145; s.284-291

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie części próbek), udziale w analizie i interpretacji danych oraz przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 5%.

- P2. **Piotr Marek Kuś**, Igor Jerković, Carlo Ignazio Giovanni Tuberoso, Zvonimir Marijanović, Francesca Congiu.: Cornflower (*Centaurea cyanus* L.) honey quality parameters: chromatographic fingerprints, chemical biomarkers, antioxidant capacity and others
Food Chem. 2014 Vol.142; s.12-18

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu wstępnych założeń i udziale w planowaniu szczegółów badań, udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie próbek, przygotowanie próbek do analiz HPLC-DAD, GC-MS, analiza jakościowa HPLC-DAD, wykonanie testów kolorymetrycznych – całkowita zawartość fenoli, aktywność przeciwutleniająca), analizie i interpretacji danych (identyfikacja związków markerowych metodami HPLC i GC-MS, opracowanie danych z chromatografii gazowej, oznaczeń kolorymetrycznych, obliczenia statystyczne) oraz przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu (z uwzględnieniem większości tabel i rycin). Procent udziału własnego w pracę szacuję na 50%.

- P3. Igor Jerković, **Piotr Marek Kuś**, Carlo Ignazio Giovanni Tuberoso, Mladenka Sarolić.: Phytochemical and physical-chemical analysis of Polish willow (*Salix spp.*) honey: identification of the marker compounds
Food Chem. 2014 Vol.145; s.8-14

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu wstępnych założeń i udziale w planowaniu szczegółów badań, udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie próbek, przygotowanie próbek do analiz HPLC-DAD, GC-MS, analiza jakościowa HPLC-DAD, wykonanie testów kolorymetrycznych – całkowita zawartość fenoli, aktywność przeciwutleniająca), analizie i interpretacji danych (identyfikacja związków markerowych metodami HPLC i GC-MS, opracowanie części danych z chromatografii gazowej w formie tabeli 2) oraz udziale w przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 40%.

- P4. **Piotr Marek Kuś**, Francesca Congiu, Dariusz Teper, Zbigniew Sroka, Igor Jerković, Carlo Ignazio Giovanni Tuberoso.: Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types
LWT-Food Sci.Technol. 2014 Vol.55 no.1; s.124-130

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu wstępnych założeń i udziale w planowaniu szczegółów badań, udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie próbek, przygotowanie próbek, wykonanie testów kolorymetrycznych – całkowita zawartość fenoli, aktywność przeciwutleniająca), analizie i interpretacji danych (w tym obliczenia statystyczne) oraz przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu (z uwzględnieniem większości tabel i rycin, udziale w przygotowaniu ryciny 2). Procent udziału własnego w pracę szacuję na 60%.

- P5. Mladenka Sarolić, Mirko Gugić, Carlo Ignazio Giovanni Tuberoso, Igor Jerković, Marko Suste, Zvonimir Marijanović, **Piotr Marek Kuś**.: Volatile profile, phytochemicals and antioxidant activity of virgin olive oils from Croatian autochthonous varieties *Mašnjača* and *Krvavica* in comparison with Italian variety *Leccino*
Molecules 2014 Vol.19 no.1; s.881-895

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w analizie i interpretacji danych oraz udziale w przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 10%.

- P6. I. Jerković, C.I.G. Tuberoso, **Piotr Marek Kuś**, Z. Marijanović, M. Kranjac.: Screening of *Coffea* spp. honey by different methodologies: theobromine and caffeine as chemical markers
RSC Adv. 2014 Vol.4 no.105; s.60557-60562

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu wstępnych założeń i udziale w planowaniu szczegółów badań, udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie próbki, przygotowanie próbek do analiz GC-MS), udziale w analizie i interpretacji danych (identyfikacja związków markerowych metodą GC-MS, opracowanie części danych z chromatografii gazowej) oraz udziale w przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 20%.

- P7. Igor Jerković, Marina Obradović, **Piotr Marek Kuś**, Mladenka Sarolić.: Bioorganic diversity of rare *Coriandrum sativum* L. honey: unusual chromatographic profiles containing derivatives of linalool/oxygenated methoxybenzene
Chem.Biodivers. 2013 Vol.10 no.8; s.1549-1558

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w planowaniu badań i części eksperymentalnej (pozyskanie próbek), udziale w analizie i interpretacji danych oraz przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 25%.

- P8. **Piotr Marek Kuś**, Igor Jerković, Carlo Ignazio Giovanni Tuberoso, Mladenka Sarolić.: The volatile profiles of a rare apple (*Malus domestica* Borkh.) honey: shikimic acid-pathway derivatives, terpenes, and others
Chem.Biodivers. 2013 Vol.10 no.9; s.1638-1652

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zebraniu bibliografii, zaplanowaniu wstępnych założeń i udziale w planowaniu szczegółów badań, udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie próbek, przygotowanie próbek do analiz GC-MS, wykonanie testów kolorymetrycznych – całkowita zawartość fenoli, aktywność przeciwutleniająca), analizie i interpretacji danych (opracowanie i interpretacja danych z GC-MS, identyfikacja związków markerowych, obliczenia) przygotowanie manuskryptu wraz z wszystkimi tabelami i rycinami. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 40%.

- P9. **Piotr Marek Kuś**, Zvonimir Marijanović, Igor Jerković.: Headspace compounds from *Centaurea cyanus* L. honey: the occurrence of 3,4-dihydro-3-oxoedulan
Chem.Nat.Comp. 2013 Vol.49 no.5; s.961-964

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu wstępnych założeń i udziale w planowaniu szczegółów badań, udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie próbek), analizie i interpretacji danych (identyfikacja związków markerowych, w tym 3,4-dihydro-3-oksoedulanu, na podstawie danych literaturowych, opracowanie części danych z chromatografii gazowej) oraz udziale w przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 40%.

- P10. **Piotr Marek Kuś**, Igor Jerković, Carlo Ignazio Giovanni Tuberoso, Zvonimir Marijanović, Mladenka Sarolić.: GC-MS fingerprints and other physico-chemical characteristics of rare unifloral *Prunus cerasus* L. honey
Nat.Prod.Comm. 2013 Vol.8 no.5; s.651-654

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w planowaniu szczegółów badań, zebraniu bibliografii, udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie próbek, przygotowanie próbek do analiz GC-MS), analizie i interpretacji danych (opracowanie danych z GC-MS w formie tabeli) oraz przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu wraz z wszystkimi tabelami i rycinami. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 35%.

II. Prace poglądowe

A. w czasopismach posiadających IF

- P11. Igor Jerković, **Piotr Marek Kuś**.: Terpenes in honey: occurrence, origin and their role as chemical biomarkers
RSC Adv. 2014 Vol.4 no.60; s.31710-31728

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w planowaniu, zbieraniu bibliografii oraz przygotowaniu manuskryptu, napisaniu rozdziału 5 i sporządzeniu tabeli 2. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 40%.

- P12. Adam Matkowski, **Piotr Kuś**, Edyta Górska, Dorota Woźniak.: Mangiferin – a bioactive xanthonoid, not only from mango and not just antioxidant
Mini-Rev.Med.Chem. 2013 Vol.13 no.3; s.439-455

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w zbieraniu bibliografii i współudziale w pisaniu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 10%.

B. w czasopismach bez IF

- P13. **Piotr Kuś**, Edyta Górska, Dorota Woźniak, Adam Matkowski.: Mangiferyna - aktywny biologicznie ksanton i nie tylko
Post.Farm. 2011 nr 1; s.3-8

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w zbieraniu bibliografii i współudziale w pisaniu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 10%.

III. Rozdziały w monografiach, podręcznikach, skryptach

A. w języku polskim lub innym niż angielski

- P14. Dorota Woźniak, **Piotr Kuś**, Sylwester Ślusarczyk, Adam Matkowski.: Kłącze *Belamcanda chinesis* jako źródło biologicznie aktywnej mangiferyny
W:Substancje pochodzenia roślinnego oraz ich zastosowanie w terapii naturalnej i kosmetyce ; red. Adam Matkowski, Magdalena Rogóż, Alicja Noculak-Palczewska;
Wrocław : Wyższa Szkoła Fizjoterapii, 2008; s.51-55
ISBN 978-83-926553-4-3

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w planowaniu badań, przeprowadzeniu części praktycznej badań, opracowaniu metody izolacji mangiferyny i udziale w pisaniu tekstu pod opieką opiekunów naukowych. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 50%.

IV. Streszczenia A. ze zjazdów międzynarodowych

- P15. Adam Matkowski, **Piotr Kuś**, Bogdan Janda, Wiesław Oleszek, Dorota Woźniak.:
Isolation and antioxidant activity evaluation of mangiferin from *Belamcandae rhizoma*
Acta Biochim.Pol. 2009 Vol.56 suppl.2; s.14-15 poz.1.11
Conference of Bioactive Plant Compounds Structural and Applicative Aspects.
Puławy, Poland, September 2nd-4th, 2009

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w planowaniu badań, przeprowadzeniu części praktycznej badań, opracowaniu metody izolacji mangiferyny i udziale w pisaniu tekstu pod opieką opiekunów naukowych. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 50%.

- P16. **Piotr Marek Kuś**, Igor Jerković, Carlo I.G. Tuberoso, Zvonimir Marijanović.:
Volatile fingerprints biodiversity of cornflower and Phacelia honeys
W:The International Young Scientists Symposium "Plants in pharmacy & nutrition 2014". Wrocław, 30th May 2014; Wrocław : Wrocław Medical University, 2014;
s.34 poz.OP-08
ISBN 978-83-7055-590-0 wystąpienie ustne

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie i przygotowanie próbek do analiz), analizie i interpretacji danych (opracowanie i interpretacja danych GC-MS), przygotowaniu prezentacji, wystąpieniu ustnym. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 70%.

- P17. **Piotr Marek Kuś**, I. Jerković, Z. Marijanović, M. Sarolić.: GC-MS profiling of rare unifloral *Prunus cerasus* L. honey headspace
W:19th International Symposium on Separation Sciences "New achievement in chromatography". Poreč, Croatia, 25-28 September 2013. Książka streszczeń; s.81-82

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie i przygotowanie próbek do analiz), analizie i interpretacji danych (opracowanie i interpretacja danych GC-MS), przygotowaniu posteru. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 70%.

- P18. I. Jerković, M. Obradović, **Piotr Marek Kuś**, M. Sarolić.: Headspace solid-phase microextraction of rare *Coriandrum sativum* L. honey
W:19th International Symposium on Separation Sciences "New achievement in chromatography". Poreč, Croatia, 25-28 September 2013. Książka streszczeń; s.80

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i udziale w analizie i interpretacji danych, przygotowaniu posteru. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 15%.

- P19. **Piotr Marek Kuś**, Zvonimir Marijanović, Marina Obradović, Igor Jerković.: Volatile compounds of summer savory (*Satureja hortensis* L.) honey
W:International Scientific and Professional Conference - 15th Ružička Days "Today science - tomorrow industry". Vukovar, Croatia, 11th and 12th September 2014.
Książka streszczeń; s.62

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie i przygotowanie próbek do analiz), analizie i interpretacji danych (opracowanie i interpretacja danych GC-MS), przygotowaniu posteru. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 50%.

- P20. **Piotr Marek Kuś**, Zvonimir Marijanović, Igor Jerković.: Preliminary screening of rare apple (*Malus domestica* Borkh.) honey volatiles by ultrasonic solvent extraction
W:International Conference - 14th Ružička days "Today science - tomorrow industry". Vukovar, Croatia, September 13-15, 2012. Książka streszczeń; s.26

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie i przygotowanie próbek do analiz), analizie i interpretacji danych (opracowanie i interpretacja danych GC-MS), przygotowaniu posteru. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 60%.

- P21. **Piotr Kuś**, Zbigniew Sroka.: Antimicrobial phenolics in Polish rape honey
Sepsis 2011 T.4 nr 1; s.119
Polish-Ukrainian Weigl Conference "From microbiology to synthetic biology".
Wrocław, May 18-20, 2011

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i wykonaniu części eksperymentalnej (analiza próbek), analizie i interpretacji danych (opracowanie i interpretacja danych HPLC-DAD), przygotowaniu posteru. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 90%.

- P22. Dorota Woźniak, Wiesław Oleszek, Bogdan Janda, Ireneusz Kapusta, **Piotr Kuś**, Sylwester Ślusarczyk, Adam Matkowski.: Isolation and purification of mangiferin from *Belamcanda chinensis* - an alternative source of an antioxidant xanthone C-glucoside W:6th International Symposium on Chromatography of Natural Products (ISCNP) "The application of chromatographic methods in phytochemical & biomedical analysis". Lublin, 15-18 June 2008. Książka streszczeń; s.210 poz.P-146

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w planowaniu badań, przeprowadzeniu części praktycznej badań. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 30%.

B. ze zjazdów krajowych

- P23. **Piotr Marek Kuś**, Zvonimir Marijanović, Igor Jerković.: Headspace profile of *Centaurea cyanus* L. honey
W:XXIII Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers. Osijek, Croatia, April 21-24, 2013. Książka streszczeń; s.98

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie próbek), analizie i interpretacji danych (udział w opracowaniu i interpretacji danych GC-MS), przygotowaniu posteru. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 50%.

- P24. **Piotr Kuś**, Dorota Woźniak, Sylwester Ślusarczyk, Paweł Zieliński, Adam Matkowski.: Kłącze *Belamcanda chinensis* jako źródło biologicznie aktywnej mangiferyny
W:Międzyuczelniana Naukowa Konferencja Studencka "Związki pochodzenia roślinnego oraz ich zastosowanie w terapiach naturalnych". Wrocław, 12 stycznia 2008 r.; poz.E-5

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w planowaniu badań, przeprowadzeniu części praktycznej badań (opracowanie metody izolacji mangiferyny) i pisaniu tekstu pod opieką opiekunów naukowych. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 70%.

- P25. Dorota Woźniak, **Piotr Kuś**, Edyta Góralaska, Weronika Jamiołkowska, Adam Matkowski.: Antimutagenic and antioxidant properties of natural products from the Chinese Herbal Medicine - *Belamcandae rhizoma*
Acta Biochim.Pol. 2011 Vol.58 suppl.3; s.23-26 poz.L4.4
II Conference of Bioactive Plant Compounds - Structural and Applicative Aspects. Puławy, Poland, September 12nd-14th, 2011.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w przeprowadzeniu części praktycznej badań (izolacja frakcji, mangiferyny). Procent udziału własnego w pracę szacuję na 15%.

4.6.2. Po uzyskaniu stopnia doktora

V. Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe

A. w czasopismach posiadających *IF*

- P26. **(H6) Piotr Marek Kuś***, Igor Jerković.:New Sample Preparation Method for Honey Volatiles Fingerprinting Based on Dehydration Homogeneous Liquid-Liquid Extraction (DHLLE)
Molecules 2018 Vol.23 no.7; poz. 1769 11 s.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu, wykonaniu części eksperymentalnej (opracowanie metody, wykonanie eksperymentów, przygotowanie próbek, walidacja), analizie i interpretacji danych (opracowanie danych z chromatografii gazowej), przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 80%.

- P27. **(H1) Piotr Marek Kuś***, Maciej Włodarczyk, Carlo I.G. Tuberoso.: Nitrogen compounds in *Phacelia tanacetifolia* Benth. honey: first time report on occurrence of (-)-5-epi-lithospermoside, uridine, adenine and xanthine in honey
Food Chem. 2018 Vol.255; s.332-339

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu, wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie próbek, opracowanie metody, wykonanie eksperymentów, przygotowanie próbek, walidacja, identyfikacja składu, izolacja nie w pełni zidentyfikowanego związku), analizie i interpretacji danych, udziale w ustalaniu dokładnej struktury, przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 75%.

- P28. **(H2) Piotr Marek Kuś***, Igor Jerković, Zvonimir Marijanović, Marina Kranjac, Carlo I.G. Tuberoso.: Unlocking *Phacelia tanacetifolia* Benth. honey characterization through melissopalynological analysis, color determination and volatiles chemical profiling
Food Res.Int. 2018 Vol.106; s.243-253

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie próbek, przygotowanie i analiza części próbek), analizie i interpretacji danych (opracowanie danych z chromatografii gazowej, analiza statystyczna) oraz przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 70%.

- P29. **(H10) Piotr Marek Kuś***, Piotr Okińczyc, Martina Jakovljević, Stela Jokić, Igor Jerković.: Development of supercritical CO₂ extraction of bioactive phytochemicals from black poplar (*Populus nigra* L.) buds followed by GC-MS and UHPLC-DAD-QqTOF-MS
J.Pharm.Biomed.Anal. 2018 Vol.158; s.15-27

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (opracowanie metody analitycznej UHPLC-DAD-QqTOF-MS, przeprowadzenie oznaczeń, pozyskanie olejku eterycznego), opracowaniu i interpretacji wyników pomiarów chromatograficznych (GC i LC), udziale w analizie i interpretacji pozostałych danych oraz na przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 70%.

- P30. **(H9) Piotr Marek Kuś***, Igor Jerković, Martina Jakovljević, Stela Jokić.: Extraction of bioactive phenolics from black poplar (*Populus nigra* L.) buds by supercritical CO₂ and its optimization by response surface methodology
J.Pharm.Biomed.Anal. 2018 Vol.152; s.128-136

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (opracowanie metody analitycznej UHPLC-DAD, przeprowadzenie oznaczeń chromatograficznych i kolorymetrycznych), opracowaniu i interpretacji wyników pomiarów, udział w analizie danych i interpretacji oraz na przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 70%.

- P31. Katarzyna Grecka, **Piotr Marek Kuś**, Randy W. Worobo, Piotr Szweda.: Study of the anti-staphylococcal potential of honeys produced in northern Poland
Molecules 2018 Vol.23 no.2; art.260 23 s.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w badaniach właściwości przeciwtleniających oraz udziale w pisaniu (poprawki, uwagi do pierwszej wersji manuskryptu) i redakcji części pracy. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 10%.

- P32. Igor Jerković, Zvonimir Marijanović, Marin Roje, **Piotr Marek Kuś**, Stela Jokić, Rozelinda Coz-Rakovac.: Phytochemical study of the headspace volatile organic compounds of fresh algae and seagrass from the Adriatic Sea (single point collection)
PLoS One 2018 Vol.13 no.5; art.e0196462 13 s.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie próbek, przygotowanie i analiza części próbek) oraz udziale w przygotowaniu/poprawkach manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 5%.

- P33. **(H3) Piotr Marek Kuś***, Igor Jerković, Zvonimir Marijanović, Carlo I.G. Tuberoso.: Screening of Polish fir honeydew honey using GC/MS, HPLC-DAD, and physical-chemical parameters: benzene derivatives and terpenes as chemical markers
Chem.Biodivers. 2017 Vol.14 no.9; art.e1700179 13 s.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie próbek, opracowanie i interpretacja wyników pomiarów chromatograficznych GC) oraz przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 50%.

- P34. Saeid Minaei, Sahameh Shafiee, Gerrit Polder, Nasrolah Moghadam-Charkari, Saskia van Ruth, Mohsen Barzegar, Javad Zahiri, Martin Alewijn, **Piotr Marek Kuś**.: VIS/NIR imaging application for honey floral origin determination
Infrared Phys.Technol. 2017 Vol.86; s.218-225

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w planowaniu części eksperymentalnej, pozyskaniu i kwalifikacji serii próbek, udziale w interpretacji danych oraz przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 7%.

- P35. **(H4) Igor Jerković, Piotr Marek Kuś**.: Headspace solid-phase microextraction and ultrasonic extraction with the solvent sequences in chemical profiling of *Allium ursinum* L. honey
Molecules 2017 Vol.22 no.11; poz.1909 9 s.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i wykonaniu części eksperymentalnej (opracowanie sposobu i przygotowanie próbek) oraz udziale w interpretacji danych, identyfikacji związków i przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 50%.

- P36. **(H8) Igor Jerković, Zvonimir Marijanović, Piotr Marek Kuś**, Carlo I.G. Tuberoso.: Comprehensive study of mediterranean (Croatian) propolis peculiarity: headspace, volatiles, anti-varroa-treatment residue, phenolics, and antioxidant properties
Chem.Biodivers. 2016 Vol.13 no.2; s.210-218

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na interpretacji danych i udziale w przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 20%.

- P37. **Piotr Marek Kuś***, P. Szweda, I. Jerković, C.I.G. Tuberoso.: Activity of Polish unifloral honeys against pathogenic bacteria and its correlation with colour, phenolic content, antioxidant capacity and other parameters
Lett.Appl.Microbiol. 2016 Vol.62 no.3; s.269-276

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu badań, skompletowaniu materiału badawczego (próbki miodów), wykonaniu większości pomiarów kolorymetrycznych i fizykochemicznych, obliczeniach statystycznych, udziale w analizie i interpretacji wyników oraz pisanii i redakcji części pracy. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 40%.

- P38. Jerković, M. Kranjac, M. Suste, **Piotr Marek Kuś**, L. Svecnjak.: *Rhamnus frangula* honey: screening of volatile organic compounds and their composition after short-term heating
Chem.Nat.Comp. 2015 Vol.51 no.6; s.1174-1177

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w wykonaniu części eksperymentalnej i udziale w analizie i interpretacji danych oraz przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 10%.

- P39. Igor Jerković, Carlo Ignazio Giovanni Tuberoso, Goran Baranović, Zvonimir Marijanović, Marina Kranjac, Lidija Svecnjak, **Piotr Marek Kuś**.: Characterization of summer savory (*Satureja hortensis* L.) honey by physico-chemical parameters and chromatographic/spectroscopic techniques (GC-FID/MS, HPLC-DAD, UV/VIS and FTIR-ATR)
Croat.Chem.Acta 2015 Vol.88 no.1; s.15-22

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w planowaniu i w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie próbek, przygotowanie części próbek do analiz GC-MS), udziale w analizie i interpretacji danych oraz udziale w przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 10%.

- P40. **(H5) Piotr Marek Kuś***, Zvonimir Marijanović, Igor Jerković.: Evaluation of HS-SPME and ultrasonic solvent extraction for monitoring of plant flavours added by the bees to herbhoney: traceability biomarkers
Food Addit.Contam.Part A-Chem. 2015 Vol.32 no.11; s.1761-1771

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie i przygotowanie próbek) oraz opracowaniu i interpretacji danych, identyfikacji związków i przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 80%.

- P41. Piotr Szweda, Katarzyna Gucwa, Ewelina Kurzyk, Ewa Romanowska, Katarzyna Dzierżanowska-Fangrat, Anna Zielińska Jurek, **Piotr Marek Kuś**, Sławomir Milewski.: Essential oils, silver nanoparticles and propolis as alternative agents against fluconazole resistant *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei* clinical isolates
Indian J.Microbiol. 2015 Vol.55 no.2; s.175-183

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na pozyskaniu części próbek, udziale w przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 5%.

- P42. **(H7) Piotr Marek Kuś***, Saskia van Ruth.: Discrimination of Polish unifloral honeys using overall PTR-MS and HPLC fingerprints combined with chemometrics LWT-Food Sci.Technol. 2015 Vol.62 no.1 part 1; s.69-75

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie, przygotowanie, analiza próbek), udziale w opracowaniu i interpretacji danych oraz przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 80%.

B. nieposiadających IF

- P43. Sahameh Shafiee, Gerrit Polder, Saeid Minaei, Nasrolah Moghadam-Charkari, Saskia van Ruth, **Piotr Marek Kuś.**: Detection of honey adulteration using hyperspectral imaging
IFAC-PapersOnLine 2016 Vol.49 no.16; s.311-314

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na udziale w planowaniu części eksperymentalnej, pozyskaniu i kwalifikacji próbek, udziale w interpretacji danych oraz przygotowaniu manuskryptu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 10%.

VII. Streszczenia

A. ze zjazdów międzynarodowych

- P44. **Piotr Marek Kuś, Igor Jerković.**: Phytochemical diversity and specific features of varietal honeys
W:Medunarodni znanstveno-stručni skup 16. Ružičkine dani "Danas znanost - sutra industrija". Vukovar, Hrvatska, 21.-23. rujna 2016; Książka streszczeń; s.17
wystąpienie ustne

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu i udziale w wykonaniu części eksperymentalnej, analizie i interpretacji danych, przygotowaniu i wygłoszeniu prezentacji. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 70%.

B. ze zjazdów krajowych

- P45. **Piotr Kuś, Piotr Okińczyc, Anna Szczelina.**: Zastosowanie chromatografii cieczowej i spektrometrii mas do analizy pąków topoli
W:III Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Współczesne zastosowanie metod analitycznych w farmacji i medycynie". Wrocław, 9 kwietnia 2018 r. Książka streszczeń; s.28 poz.P11

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu badań i udziale w wykonaniu części eksperymentalnej oraz przygotowaniu plakatu. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 40%.

- P46. **Piotr Kuś, Zvonimir Marijanović, Igor Jerković.**: The headspace volatiles as chemical markers of fir honeydew honey with medical potential
W:2nd International Young Scientists Symposium "Plants in pharmacy and nutrition". Wrocław, 15-17 September 2016. Książka streszczeń; Wrocław :

Wrocław Medical University, 2016; s.38 poz.OP-6
ISBN 978-83-7055-591-7 wystąpienie ustne

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na planowaniu badań i udziale w wykonaniu części eksperymentalnej (pozyskanie próbek), analizie i interpretacji danych (udział w opracowaniu i interpretacji danych GC-MS), przygotowaniu i wygłoszeniu prezentacji. Procent udziału własnego w pracę szacuję na 50%.

