

# APARATURA

## BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

### **Badanie korelacji pomiędzy zawartością polifenoli ogółem a zdolnością do dezaktywacji rodników DPPH w wybranych miodach pszczelich**

*EWA MAJEWSKA, JOLANTA KOWALSKA, BEATA DRUŻYŃSKA, DOROTA DEREWIAKA, MARTA CIECIERSKA*

**SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO W WARSZAWIE, WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOŚCI, KATEDRA BIOTECHNOLOGII, MIKROBIOLOGII I OCENY ŻYWNOŚCI, ZAKŁAD OCENY JAKOŚCI ŻYWNOŚCI**

**Słowa kluczowe:** miód pszczeli, polifenole, DPPH, korelacja

#### **STRESZCZENIE**

Celem pracy było wyznaczenie współzależności między zawartością polifenoli ogółem i zdolnością do dezaktywacji rodników DPPH wybranych miodów pszczelich. Materiał badawczy stanowiły 43 próbki nektarowych miodów pszczelich 12 różnych rodzajów, wśród których było 7 rodzajów miodów powszechnie spożywanych (wielokwiatowy, gryczany, akacjowy, lipowy, wrzosowy, nektarowo-spadziowy oraz rzepakowy) oraz 5 rodzajów miodów „niszowych”. Wyniki badań pozwoliły stwierdzić, że istnieje silna dodatnia korelacja pomiędzy zawartością polifenoli ogółem a zdolnością do dezaktywacji rodników DPPH, o czym świadczy wysoki współczynnik korelacji  $r = 0,976$ .

#### **The study of correlation between total polyphenol content and the capacity to deactivate the DPPH radicals in selected honeys**

**Keywords:** honey, polyphenols, DPPH, correlation

#### **ABSTRACT**

The aim of this study was to determine the relationship between total polyphenol content and the ability to deactivate the DPPH radicals selected honeys. The material consisted of 43 samples of honey nectar 12 different types, of which there were seven types of commonly consumed honey (multi-flower, buckwheat, acacia, lime, heather, honeydew and rape) and five types of honey “niche”. The results allow for the conclusion that there is a strong positive correlation between total polyphenol content and the ability to deactivate the DPPH radicals as evidenced by the high correlation coefficient  $r = 0.976$ .

## 1. WSTĘP

Miód jako jeden z naturalnych produktów pszczelich odznacza się właściwościami odżywczymi, profilaktycznymi i leczniczymi, do których należą działania antybiotyczne, przeciwutleniające, przeciwzakrzepowe, przeciwzapalne, przeciwmutagenne, przeciwnowotworowe, odtruwające. Miód jest łatwo przyswajalny przez organizm, powodując ogólną poprawę stanu zdrowia człowieka. Swoje unikalne właściwości zawdzięcza składnikom biologicznie aktywnym, które regulują proces trawienia oraz czynność serca. W swoim składzie zawiera cukry, kwasy organiczne, aminokwasy, związki lotne, enzymy, witaminy, hormony, biopierwiastki oraz związki fenolowe.

Polifenole należą do związków naturalnie występujących w roślinach. Powstają z metabolitów pierwotnych, L-tyrozyny lub L-fenylalaniny, na drodze tzw. szlaku szikimowego. Do polifenoli wykazujących aktywność przeciwutleniającą zaliczamy flawonoidy i kwasy fenolowe. Związki te jako przeciwutleniacze mogą działać na kilka sposobów poprzez: eliminowanie reaktywnych form tlenu, zmiatanie (blokowanie) wolnych rodników, inhibicję enzymów z grupy oksydaz oraz chelatowaniu jonów metali (żelaza i miedzi). Ponadto polifenole wzmacniają działanie innych przeciwutleniaczy np. witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Przeciwutleniacze zabezpieczają w ten sposób organizm ludzki przed stresem oksydacyjnym, uszczelniają naczynia krwionośne oraz ochraniają frakcje LDL przed utlenianiem. Polifenole można podzielić pod względem struktury podstawowego szkieletu węglowego na kwasy fenylokarboksylowe (pochodne kwasu benzoowego), kwasy fenylopropenowe (pochodne kwasu cynamonowego) oraz flawonoidy, które dzielimy na wiele podklas w zależności od budowy pierścienia heterocyklicznego węgla. Do flawonoidów najczęściej spotykanych w miodach zaliczamy: chryzynę, apigeninę, luteolinę, kwercetynę, kemferol, izoramnetynę, pinocembrynę oraz pinobanksynę.

Do kwasów hydroksycynamonowych zaliczamy głównie kwas kawowy, ferulowy, zaś do kwasów hydroksybenzoesowych kwas galusowy, waniliny i protokatecholowy. Polifenole przedostają się do miodu z pyłkiem kwiatowym oraz propolisem.

## 2. METODYKA I MATERIAŁ BADAWCZY

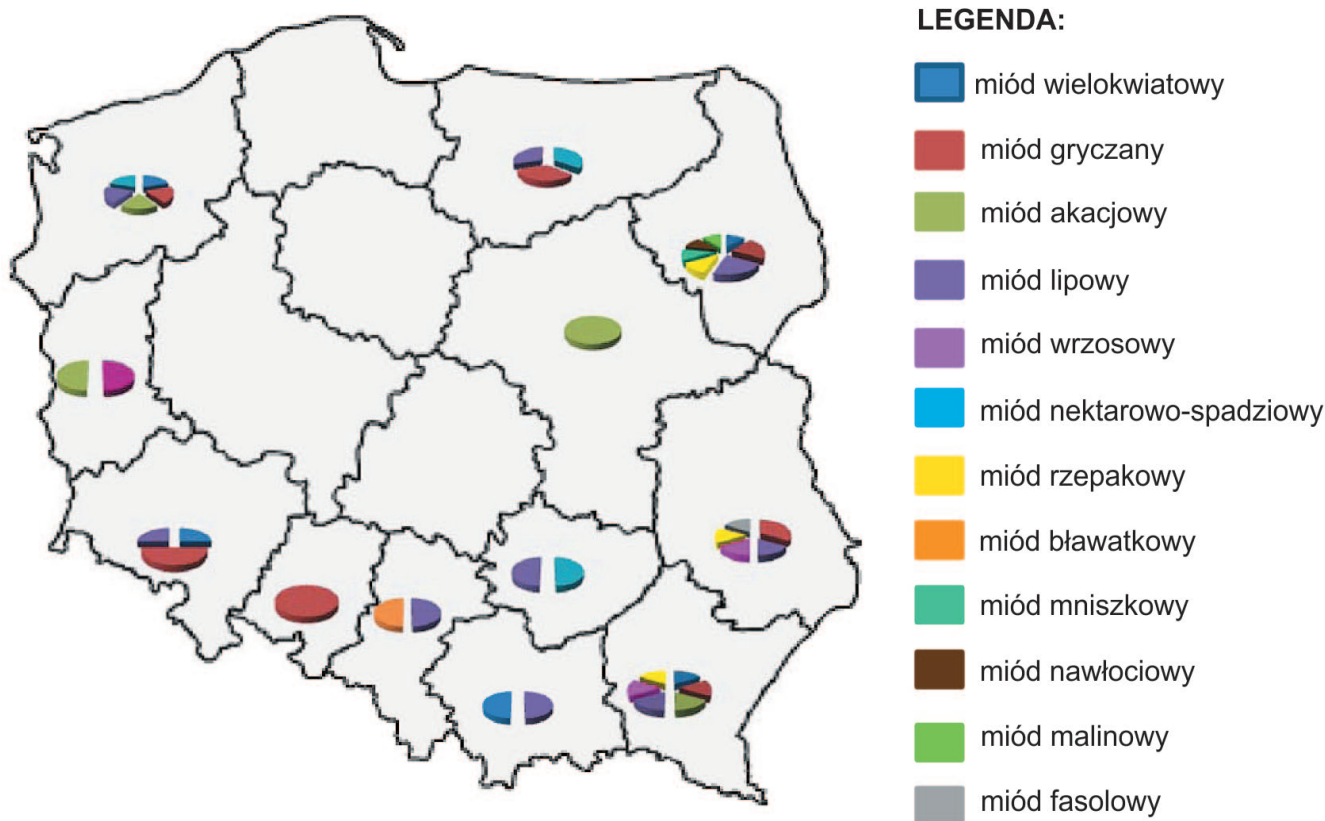
Materiał badawczy stanowiły 43 próbki nektarowych miodów pszczelich 12 różnych rodzajów, wśród których było 7 rodzajów miodów powszechnie spożywanych (wielokwiatowy, gryczany, akacjowy, lipowy, wrzosowy, nektarowo-spadziowy oraz rzepakowy) oraz 5 rodzajów miodów „niszowych”. Ponadto pochodziły one z różnych regionów Polski: warmińsko-mazurski, podlaski, mazowiecki, lubelski, podkarpacki, świętokrzyski, małopolski, śląski, opolski, dolnośląski, lubuski i zachodniopomorski (Rys. 1). Próbkę miodów były zbierane w latach 2010-2012. Różna liczebność próbek poszczególnych odmian uwarunkowana była dostępnością danego miodu w danym roku. Największą liczbę próbek zebrano spośród miodów lipowego i gryczanego, gdyż są to odmiany najczęściej spotykane na rynku. Wszystkie miody zostały pozyskane od lokalnych pszczelarzy z gwarancją pochodzenia i produkcji. Posiadały także określone pochodzenie botaniczne. Próbkę zbierane były w czystych szklanych słoikach typu twist-off. Do chwili oznaczeń przechowywane były w ciemnym miejscu w temperaturze 4-5°C.

### 2.1 Przygotowanie ekstraktów

Ważono po 3 g miodu, pyłku kwiatowego i propolisu (do ekstraktów wodnych – EW) oraz 3 g miodu i 0,5 g pyłku kwiatowego, propolisu oraz miodów z dodatkami (do ekstraktów etanolowych – EE), z dokładnością 0,001 g, rozpuszczano w wodzie lub etanolu w stosunku 1:10 w kolbach stożkowych i wytrząsano przez 30 minut. Ekstrakty pozostawiano na 24 h w temperaturze pokojowej. Przed przystąpieniem do oznaczeń ekstrakty sączono.

### 2.2 Oznaczenie całkowitej zawartości polifenoli

W celu oznaczenia zawartości polifenoli w badanych ekstraktach wodnych i etanolowych produktów pszczelich wykorzystano zdolność do barwnej reakcji polifenoli z odczynnikiem Folina-Ciocalteu. W metodzie tej intensywność zabarwienia badanych ekstraktów z dodanym odczynnikiem mierzono przy dł. fali 735 nm. Całkowitą zawartość polifenoli wyrażano w przeliczeniu na kwas galusowy, dla którego wykonano krzywą wzorcową w zakresie stężeń 0-100 mg/dm<sup>3</sup>.



Rysunek 1 Mapa dystrybucji badanych miodów  
Figure 1 Map of the distribution of respondent honey

### 2.3 Oznaczenie aktywności przeciwutleniającej wobec rodników DPPH:

Do próbek odmierzano 4 cm<sup>3</sup> ekstraktu (EW lub EE). Jedną z nich traktowano jako próbkę ślepa, a pozostałe jako próbki właściwe. Równolegle do jednej próbki odmierzano 4 cm<sup>3</sup> wody lub etanolu (próbka kontrolna). Do próbki ślepej dodawano 1 cm<sup>3</sup> metanolu, a do kontrolnej i właściwych po 1 cm<sup>3</sup> roztworu rodników DPPH. Po 30 minutach od dodania rodników mierzono absorbancję przy dł. fali 517 nm. Aktywność przeciwutleniającą (A) wobec rodników DPPH obliczano ze wzoru:

$$A = \frac{A_k - A_{wt}}{A_k} \times 100\%$$

gdzie: A<sub>k</sub> – absorbancja próby kontrolnej, A<sub>wt</sub> – absorbancja próby właściwej.

### 3. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Związki fenolowe, które można znaleźć w miodzie pszczelim to przede wszystkim wolne fenole (związki lotne), kwasy fenolowe, polifenole (zwykle w postaci flawonoidów), antocyjany, procyjanidyny i pigmenty. Ich ilość zależy od gatunku

roślin, z których pszczoły zbierają nektar [4]. Polifenole są ważną grupą związków wpływających na wygląd i właściwości funkcjonalne miodu. Przyjmuje się, że związki fenolowe odgrywają ważną rolę w aktywności biologicznej miodów [5]. W niniejszej pracy najniższą zawartość polifenoli ogółem uzyskano w miodzie nektarowo-spadziowym NS1 (13,57 mg kwasu galusowego/100 g), najwyższą zaś w miodzie gryczanym G9 (126,14 mg kwasu galusowego/100 g) (Tab. 1). Wyniki te są porównywalne z wynikami innych badaczy. Średnia zawartość polifenoli ogółem w miodach z Burkina Faso wynosiła 74,38 mg kwasu galusowego/100 g [6]. W miodach tureckich parametr ten oscylował w przedziale 20,29-121,61 mg kwasu galusowego/100 g [7], zaś w miodach indyjskich 47-98 mg kwasu galusowego/100 g produktu [8].

Właściwości przeciwutleniające miodu są determinowane przez jego skład. Duży wpływ na nie mają polifenole, ale także peptydy, kwasy organiczne, enzymy, produkty reakcji Maillarda oraz inne związki [4]. Z badań przeprowadzonych w niniejszej pracy wynika, że najmniejszą zdolność do dezaktywacji rodników DPPH posiada miód lipowy L1 – 6,70%, natomiast największą

**Tabela 1** Zawartość polifenoli ogółem i zdolność do dezaktywacji rodników DPPH w badanych miodach (\*SD – odchylenie standardowe)  
**Table 1** Content of total polyphenols and ability to scavenge radicals DPPH in the studied honeys (\*SD – standard deviation)

Kod próbki/ sample code	Pochodzenie geograficzne Geographical origin	Zawartość polifenoli ogółem / Content of total polyphenols [mg <sub>kg</sub> /100 g]		Zdolność do zmiatania rodników DPPH/ Ability to scavenge radicals DPPH [%]			
		Średnia ± SD*	Min.	Max.	Średnia ± SD*	Min.	Max.
<i>MIÓD GRYCZANY/BUCKWHEAT HONEY</i>							
G1	zachodniopomorskie	125,20 ± 0,88	121,93	127,54	71,38 ± 0,00	71,29	71,55
G2	dolnośląskie	60,47 ± 0,26	59,65	61,40	41,12 ± 0,00	40,95	41,47
G3	dolnośląskie	71,11 ± 0,68	69,47	73,68	49,11 ± 0,01	48,71	49,91
G4	warmińsko-mazurskie	95,15 ± 0,26	94,21	95,96	56,55 ± 0,00	56,21	57,07
G5	opolskie	104,44 ± 0,90	101,05	106,67	68,28 ± 0,00	67,93	68,45
G6	lubelskie	41,64 ± 0,34	40,35	42,46	29,68 ± 0,01	28,62	30,52
G7	podlaskie	119,69 ± 0,37	109,53	129,98	75,02 ± 0,01	74,22	76,21
G8	podlaskie	114,74 ± 0,48	112,98	116,14	68,62 ± 0,01	67,41	69,66
G9	lubelskie	126,14 ± 0,46	125,09	127,89	75,86 ± 0,02	73,88	76,90
G10	podkarpackie	96,91 ± 0,49	94,74	97,57	63,33 ± 0,01	62,59	64,66
<i>MIÓD LIPOWY/LINDEN HONEY</i>							
L1	zachodniopomorskie	16,26 ± 0,12	15,79	16,49	6,70 ± 0,02	4,57	8,02
L2	małopolskie	14,15 ± 0,26	13,33	15,09	13,36 ± 0,02	12,33	15,09
L3	dolnośląskie	54,39 ± 0,21	53,68	55,09	34,31 ± 0,00	34,14	34,48
L4	warmińsko-mazurskie	20,70 ± 0,21	20,00	21,40	8,65 ± 0,01	7,76	9,31
L5	śląskie	28,19 ± 0,06	28,07	28,42	24,54 ± 0,01	24,05	25,17
L6	świętokrzyskie	21,05 ± 0,00	21,05	21,05	15,55 ± 0,02	13,19	17,07
L7	podlaskie	21,75 ± 0,18	21,40	22,46	21,06 ± 0,01	20,60	21,64
L8	podlaskie	37,43 ± 0,16	36,84	37,89	28,91 ± 0,01	27,41	29,91
L9	lubelskie	34,15 ± 0,22	33,33	34,74	22,87 ± 0,02	20,17	25,09
L10	podkarpackie	45,26 ± 0,46	43,51	46,32	24,89 ± 0,01	24,31	25,86
<i>MIÓD AKACJOWY/ACACIA HONEY</i>							
A1	zachodniopomorskie	13,68 ± 0,11	13,33	14,03	8,39 ± 0,00	7,93	8,88

A2	lubuskie	15,32 ± 0,52	13,33	16,46	9,68 ± 0,01	8,36	10,60
A3	mazowieckie	18,48 ± 0,40	17,54	20,00	7,18 ± 0,00	6,72	7,50
A4	podkarpackie	25,85 ± 0,06	25,61	25,96	13,53 ± 0,02	11,72	14,74
<i>MIÓD WIELOKWIATOWY/FLOWER HONEY</i>							
WK1	dolnośląskie	52,75 ± 0,12	52,28	52,98	28,05 ± 0,00	27,93	28,28
WK2	zachodniopomorskie	39,30 ± 0,32	38,25	40,35	29,37 ± 0,00	29,22	29,48
WK3	małopolskie	19,42 ± 0,16	18,95	20,00	7,87 ± 0,01	6,72	8,62
WK4	podkarpackie	65,61 ± 0,56	64,21	67,72	45,89 ± 0,01	44,83	47,07
<i>MIÓD RZEPAKOWY/RAPE HONEY</i>							
RZ1	podlaskie	45,50 ± 0,58	43,51	47,37	28,19 ± 0,01	27,59	29,05
RZ2	lubelskie	66,78 ± 0,58	64,91	68,77	44,08 ± 0,02	42,07	45,34
RZ3	podkarpackie	52,40 ± 1,61	49,12	58,60	29,03 ± 0,01	28,53	29,83
<i>MIÓD WRZOSOWY/HEATHER HONEY</i>							
W1	lubuskie	34,85 ± 0,58	32,63	36,14	23,48 ± 0,01	22,84	23,88
W2	lubelskie	28,65 ± 0,06	28,42	28,77	19,60 ± 0,02	17,33	21,72
W3	podkarpackie	48,77 ± 0,18	48,42	49,47	31,95 ± 0,01	31,38	33,02
<i>MIÓD NEKTAROWO-SPADZIOWY/NECTAR-HONEYDEW HONEY</i>							
NS1	świętokrzyskie	13,57 ± 0,06	13,33	13,68	13,36 ± 0,03	10,34	15,00
NS2	warmińsko-mazurskie	16,26 ± 0,12	15,79	16,49	10,63 ± 0,02	8,79	11,72
NS3	zachodniopomorskie	25,61 ± 0,18	25,26	26,32	19,60 ± 0,02	17,67	21,12
<i>MIÓD BŁAWATKOWY/BLUEBOTTLE HONEY</i>							
B	śląskie	25,50 ± 0,68	23,86	28,07	13,59 ± 0,01	12,16	14,40
<i>MIÓD MALINOWY/RASPBERRY HONEY</i>							
MA	podlaskie	41,29 ± 0,22	40,70	42,10	27,53 ± 0,00	27,33	27,76
<i>MIÓD NAWŁOCIOWY/GOLDENROD HONEY</i>							
N	podlaskie	37,89 ± 0,55	35,79	38,95	19,94 ± 0,01	19,22	20,95
<i>MIÓD MNISZKOWY/DANDELION HONEY</i>							
ML	podlaskie	50,88 ± 0,32	49,82	51,93	28,65 ± 0,01	28,02	29,05
<i>MIÓD FASOLOWY/BEAN HONEY</i>							
F	lubelskie	50,76 ± 0,44	49,12	51,93	25,40 ± 0,01	23,97	26,90



miód gryczany G9 75,86% (Tab. 1). Porównując otrzymane wyniki z danymi literaturowymi można zauważyć, że uzyskany przedział jest zdecydowanie większy, a dolna granica tego przedziału ma niską wartość. W miodach litewskich oznaczono aktywność przeciwutleniającą w granicach 31,1-94,0% [9], w miodach tureckich 36,11-90,73% [7], zaś w miodach indyjskich 44-71% [8]. Z danych literaturowych wynika, że miody ciemne (w szczególności miód gryczany) wykazują silniejsze działanie przeciwutleniające w porównaniu do miodów o jasnym zabarwieniu (np. miód akacjowy) [10, 11], co zaobserwować można także na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej pracy. Zależność taka wynika z większej zawartości w miodach ciemnych, w porównaniu z miodami jasnymi, związków fenolowych oraz innych wpływających na właściwości przeciwutleniające miodu.

Biorąc pod uwagę zawartość polifenoli ogółem i zdolność do dezaktywacji rodników DPPH stwierdzono istnienie silnej korelacji pomiędzy tymi parametrami (Rys. 2), co ilustruje wysoki współczynnik korelacji 0,976. Istnienie takiej korelacji zaobserwowali także inni badacze. Majewska i in. [12] badając polskie miody gryczane stwierdzili ścisłą korelację pomiędzy zawartością polifenoli ogółem i aktywnością przeciwutleniającą, o czym świadczył uzyskany wysoki współczynnik

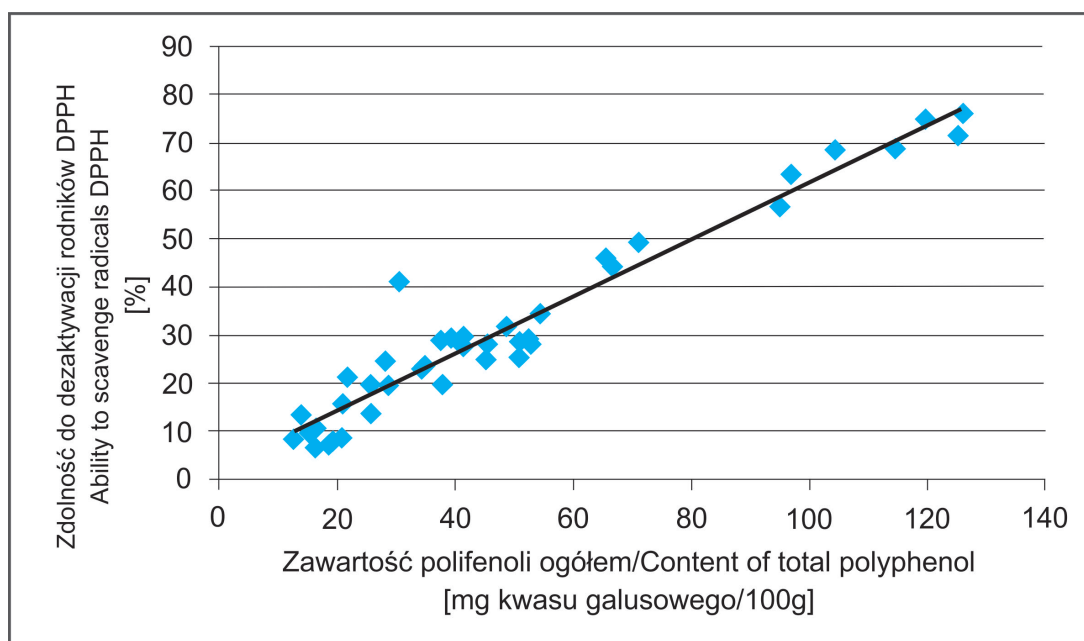
korelacji równy 0,98. Krpan i in. [13] analizując chorwackie miody akacjowe także zaobserwowali korelację pomiędzy tymi dwoma parametrami i uzyskali współczynnik korelacji równy 0,93. Bertonec i in. [14] badając słoweńskie miody odnotowali istnienie korelacji między zawartością polifenoli a aktywnością przeciwutleniającą, uzyskując współczynnik korelacji rzędu 0,93. W rumuńskich miodach stwierdzono korelację pomiędzy omawianymi parametrami i uzyskano współczynnik korelacji równy 0,86 [15], a Aljadi i Kamaruddin [16] w miodach malezyjskich odnotowali współczynnik korelacji 0,87.

#### 4. WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące stwierdzenia i wnioski:

Najwyższą zawartością polifenoli ogółem i zdolnością do zmiatania rodników DPPH charakteryzowały się miody gryczane, najniższą zaś miody akacjowe.

Zbadano zależności pomiędzy poszczególnymi wyróżnikami fizyko-chemicznymi i uzyskano silną liniową korelację (0,976) pomiędzy zawartością polifenoli ogółem i zdolnością do dezaktywacji rodników DPPH, czyli parametrami związanymi z właściwościami przeciwutleniającymi badanych miodów.



**Rysunek 2** Korelacja między zawartością polifenoli ogółem a zdolnością do dezaktywacji rodników DPPH w badanych miodach

**Figure 2** Correlation between total polyphenol content and the ability to deactivate radical DPPH studied honeys

## LITERATURA

- [1] Kumazawa S., Hamasaka T., Nakayama T., Antioxidant activity of propolis of various geographic origins, *Food Chem.*, 84, 2004, 329-339.
- [2] Kumazawa S., Tanigucki M., Suzuki Y., Shimura M., Kwon M.-S., Nakayama T., Antioxidant activity of polyphenols in carob pods, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2002, 373-377.
- [3] Yen G.-C., Chen H.-Y., Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity, *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1995, 27-32.
- [4] Al-Mamary M., Al-Meerri A., Al-Habori M., Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey, *Nutrition Research*, 22, 2002, 1041-1047.
- [5] Küçük M., Kolayh S., Karaoğlu S., Ulusoy E., Baltacı C., Candan F., Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia, *Food Chem.*, 100, 2007, 526-534.
- [6] Meda A., Lamien C. E., Romito M., Millogo J., Nacoulma O. G., Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity, *Food Chem.*, 91, 2005, 571-577.
- [7] Silici S., Sagdic O., Ekici L., Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys, *Food Chem.*, 121, 2010, 238-243.
- [8] Saxena S., Gautam S., Sharma A., Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys, *Food Chem.*, 118, 2010, 391-397.
- [9] Baltrušaitytė V., Venskutonis P. R., Čeksterutė V., Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts, *Food Chem.*, 101, 2007, 502-514.
- [10] Gheldof N., Engeseth N. I., Antioxidant capacity of honeys from various flora sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2002, 3050-3055.
- [11] Beretta G., Granata P., Ferraro M., Orioli M., Maffei Faciano R., Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics, *Anal. Chim. Acta*, 533, 2005, 185-191.
- [12] Majewska E., Kowalska J., Owerko B., Fizyko-chemiczne parametry wybranych miodów gryczanych dostępnych na rynku polskim, *Bromat. Chem. Toksykol.*, 45, 2012, 1233-1238.
- [13] Krpan M., Markonić K., Šarić G., Skoko B., Hruškar M., Vahčić N., Antioxidant activities and total phenolics of acacia honey, *Czech J. Food Sci.*, 27, 2009, 245-247.
- [14] Bertonecelj J., Doberšek U., Jamnik M., Golob T., Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey, *Food Chem.*, 105, 2007, 822-828.
- [15] Cimpoiu C., Hosu A., Miclaus V., Puscas A., Determination of the floral origin of some Romanian honeys on the basis of physical and biochemical properties, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 100, 2013, 149-154.
- [16] Aljadi A. M., Kamaruddin M. Y., Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys, *Food Chem.*, 85, 2004, 513-518.