

Paweł M. WANTUSIAK*, **Paweł PISZCZ**,
Monika SKWAREK, **Bronisław K. GŁÓD**

Zakład Chemii Analitycznej, Instytut Chemii,
Wydział Nauk Ścisłych, Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach,
ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce
*e-mail: wantusiak@gmail.com

Właściwości antyoksydacyjne miodów wyznaczone metodami chromatograficznymi

Antioxidative properties of honeys determined
using HPLC techniques

Streszczenie: *Zarówno wolne rodniki jak i antyoksydanty można oznaczać metodami bezpośrednimi, do jakich zaliczamy EPR czy metody elektroanalityczne. Bardzo krótki czas życia spowodowany wysoką reaktywnością wielu rodników nie pozwala jednak na szerokie stosowanie metod bezpośrednich. Dlatego opracowano szereg metod pośrednich. Polegają one na badaniu produktów reakcji wolnych rodników z tzw. pułapkami spinowymi. Metody te zastosowane przez nas zostały do opracowania chromatograficznych metod oznaczania całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (CPA). CPA jest funkcją sumy iloczynów stężeń wszystkich antyoksydantów w próbce przez ich moc (stałe szybkości reakcji).*

W pracy przedstawiono wstępne wyniki chromatograficznego oznaczania CPA w różnych gatunkach miodów, zioło-miodów i miodów pitnych. Wyniki te skorelowane zostały z całkowitą zawartością polifenoli w próbce.

Słowa kluczowe: *wolne rodniki, antyoksydanty, całkowity potencjał antyoksydacyjny, miód, zioło miód, miód pitny*

Abstract: *Free radicals as well as antioxidants can be analyzed using direct methods, such as EPR or electroanalytical ones. However, very short life span, due to the high reactivity, does not allow for the extensive use of direct methods. Therefore, indirect techniques were elaborated. They are based on examination of the products of radicals reactions with the so-called spin traps. These methods were developed by us to elaborate total antioxidant potential (TAP) measurements, which is a function of the sums of products of all antioxidants in the sample by their reaction rate constants.*

The paper presents our preliminary results of the chromatographic determination of various honeys, herbal honeys and meads. These results were correlated with the, determined photometrically, total concentration of polyphenols.

Key words: *free radicals, antioxidants, total antioxidant potential, honey, herbhoney, mead*

1. Wstęp (Introduction)

Wszystkie organizmy aerobowe potrzebują do życia tlenu. Główną organellą komórkową wykorzystującą tlen, a jednocześnie odpowiedzialną za dostarczanie energii, jest mitochondrium. Całkowita redukcja tlenu cząsteczkowego poprzedzana jest etapami pośrednimi, w których udział biorą enzymy endogenne, pełniące rolę katalizatorów. W trakcie stopniowych przemian elektronowych część pobieranego przez organizmy żywe tlenu ($1\pm 4\%$) przekształcana jest w wolne rodniki (WR) tlenowe lub reaktywne formy tlenu (RFT). Źródłami wolnych rodników są również reakcje red/ox związków endo- lub egzogennych (zanieczyszczenie środowiska), szereg stanów chorobowych i zmiany podaży tlenu. Ich nadmiar narusza równowagę red/ox w organizmie przyczyniając się do wielu chorób, starzenia i śmierci [1-3].

Wolne rodniki są to cząsteczki, ich fragmenty, jony, atomy bądź też grupy atomów posiadające na swojej powłoce walencyjnej (według innej definicji – na ostatnim orbitalu) co najmniej jeden niesparowany elektron. Ten niesparowany elektron nadaje im właściwości paramagnetyczne i czyni je reaktywnymi [4-6].

Od wielu lat ludzkość poszukuje tzw. złotego środka, który mógłby zatrzymać lub chociaż spowolnić proces starzenia się organizmów żywych, szczególnie ludzi. Za proces ten w dużej mierze odpowiedzialne są wolne rodniki. Naturalną obroną są związki określane mianem antyoksydantów, które naturalnie występują w naszym organizmie. Antyoksydantem nazywany jest związek, który występując w bardzo małym stężeniu chroni aktywne biologiczne związki przed utlenianiem [5]. Niestety ich stężenia często okazują się, np. pod wpływem różnych chorób, niewystarczające. Ich niedobór może być uzupełniany przez pożywienie. Takim dostępnym źródłem antyoksydantów są różne wyroby pszczelarskie, w tym miody i ich pochodne.

Właściwości antyoksydacyjne miodu, wynikają z obecności w nim zarówno antyoksydantów enzymatycznych jak i nieenzymatycznych. Wśród enzymatycznych przeciwutleniaczy wyróżnić można katalazę i peroksydazę glutationową [7]. Główny enzym miodu, oksydaza glukozy, jest enzymem, którego działanie uaktywnia się dopiero w wodnym roztworze miodu. W obecności tlenu powoduje ona katalityczne utlenianie glukozy do glukono-1,5-laktonu z jednoczesnym wytworzeniem nadtlenu wodoru, H_2O_2 [7, 8]. Obecność nadtlenu wodoru, H_2O_2 , w połączeniu z jonami żelaza na plus drugim stopniu utlenienia, Fe(II), również obecnymi w miodzie jako jedne z mikroelementów, może początkować reakcje wolnorodnikowe i przez analogię do reakcji Fentona prowadzić do powstania wysoce reaktywnych rodników hydroksylowych, $\bullet OH$. Tworzenie rodników hydroksylowych może zostać zahamowane przez enzym katalazę, która redukuje nadtlenek wodoru, H_2O_2 , do wody i tlenu cząsteczkowego (jedna cząsteczka katalazy efektywnie redukuje około 6 milionów cząsteczek H_2O_2 /minutę). Im wyższe jest stężenie oksydazy glukozy oraz niższe stężenie katalazy w miodzie, tym wyższa jest zawartość w nim H_2O_2 [9].

Do antyoksydantów nieenzymatycznych zalicza się (i) flawonoidy (hesperytyna, trycetyna, myricetyna, pinocembryna, galangina, kampferol, kwercetyna, naryngenina, chrysyna, pinobanksina, luteolina), (ii) niearomatyczne kwasy organiczne (cytrynowy), (iii) kwasy fenolowe i ich estry (chlorogenowy, galusowy, cynamonowy, benzoesowy, kofeinowy, wanilinowy, ferulowy, abiscynowy, elagowy), (iv) wolne aminokwasy (głównie prolina), (v) witaminy (E - α -tokoferol, C - kwas askorbinowy), (vi) pochodne karotenoidów (vii) itp. [10-12].

Miód znany jest od starożytności, jako jedna z pierwszych naturalnych substancji słodzących. Jest on naturalnym produktem pszczelim, pozyskiwanym między innymi z nektaru kwiatowego, soków, żywicznych wydzielin roślin, rosy miodowej oraz materiałów wtórnych pochodzących z przeróbki nektaru roślinnego przez niektóre owady (tzw. *spadź*). Jest wonną, słodką, lepka i gęsta substancją o charakterystycznym zabarwieniu od jasnożółtego po ciemny brąz, występującą zarówno w postaci płynnej, jak i krystalicznej. Pod względem chemicznym jest przesyconym, wodnym roztworem cukru, zawierającym głównie monosacharydy glukozę i fruktozę. Zawiera cały szereg związków o różnym działaniu, w tym antyoksydanty. Jego skład zależy pochodzenia miodu, środowiska, klimatu, gleby, sposobu wytwarzania i przechowywania itp. [13].

Ziołomiód jest produktem miodopodobnym, pośrednio wytwarzanym przez pszczoły, których dieta opiera się głównie na sacharozie, wzbogacanej dodatkowo przez pszczelarzy wyciągami ziołowymi bądź też sokami owocowymi [14, 15].

Miód pitny jest otrzymywany z fermentacji wodnego roztworu miodu pszczelego (tak zwanej brzezki miodowej). Istnieje kilka kryteriów, według których można dokonać podziału dojrzałych miodów pitnych na kilka klas. Miody pitne dzielone są głównie ze względu na (i) sposób przygotowania brzezki miodowej (sycone, niesycone), (ii) stosunek zawartości miodu i wody w brzezce (półtorak, dwójniak, trójniak, czwórniak), (iii) dodatkowe składniki uzupełniające brzezkę (naturalne, korzenno-ziołowe, chmielowe, owocowe) oraz (iv) czasu leżakowania i dojrzewania [16, 17].

Starania indywidualnych producentów miodu pitnego, doprowadziły do powstania regulacji prawnej produkcji miodów pitnych oraz moszczów owocowych [18]. Spowodowało to wpisanie miodu pitnego na listę produktów tradycyjnych i regionalnych, i uzyskanie statusu Gwarantowanej Tradycyjnej Specjalności Unii Europejskiej [19, 20].

Wzrastające wymagania konsumentów co do jakości miodu spowodowały rozwój nowych technik i metod jej oceny. Główne z nich to badania zawartości wody i przewodnictwa elektrycznego, badania zawartości popiołu, analiza pyłku kwiatowego za pomocą TLC i GC, pomiar zawartości 5-metylohydroksyfurfuralu, HMF (obecność tego związku wzrasta w trakcie dłuższego przechowywania miodu) [21, 22].

Wolne rodniki jak i antyoksydanty można oznaczać metodami bezpośrednimi, wykorzystując ich właściwości paramagnetyczne (EPR w przypadku WR) lub łatwość utleniania/redukcji [23]. Bardzo krótki czas życia i wyso-

ka reaktywność wielu rodników bardzo utrudnia te pomiary. Dlatego opracowano szereg metod pośrednich. Polegają one na badaniu produktów reakcji wolnych rodników ze związkami naturalnie występującymi w organizmach żywych lub z tzw. pułapkami spinowymi [24]. Metody te przystosowaliśmy do opracowania chromatograficznych metod oznaczania całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (CPA), będącego funkcją sumy iloczynów stężeń wszystkich antyoksydantów w próbce przez ich moc (stałe szybkości reakcji).

W pracy przedstawiono wstępne wyniki chromatograficznego wyznaczania CPA różnych gatunków miodów, zioło-miodów i miodów pitnych. Jedną z technik polegała na generacji, w reakcji Fentona [25], rodników hydroksylowych i chromatograficznym oznaczaniu produktu ich reakcji z kwasem *p*-hydroksybenzoesowym w układzie RP-HPLC z detekcją UV-205. Miarą CPA drugiej techniki jest sumaryczne pole powierzchni pod wszystkimi pikami zarejestrowanymi na detektorze amperometrycznym przy określonym potencjale elektrody pracującej. Wyniki te skorelowane zostały z całkowitą zawartością polifenoli w próbce.

2. Część eksperymentalna **(Experimental)**

2.1. Aparatura **(Apparatus)**

Pomiar chromatograficzny wykonywano na wysokosprawnym chromatografie cieczowym (Knauer, Berlin, Niemcy) składającym się z butli z eluentem, modułu Smartline Manager 5000, pompy dwutłokowej Smartline 1000 (regulacja przepływu fazy ruchomej 0,001-50 ml/min), mieszadła magnetycznego, dozownika pętlicowego D-14163 (objętość pętli 20 µl), termostatu kolumn Smartline 4000 z zakresem temperatur 5 ÷ 85 °C, kolumny analitycznej Eurospher RP-18 (5 µm, 250 x 4 mm), detektora spektrofotometrycznego UV Smartline PDA 2800 z matrycą diodową DAD (zakres pracy lampy 190-1020 nm), detektora elektrochemicznego EC3000 (elektroda pracująca: elektroda z węgla szklistego; elektroda odniesienia: Ag/AgCl; elektroda pomocnicza: Pt), komputerowych systemów rejestracji i przetwarzania danych - Eurochrom 2000 oraz Clarity Chrom, zbiornika eluatu.

Ponadto w pracy stosowano spektrofotometr firmy ThermoSpectronic, Model: Helios Epsilon (USA) i pH-metr OP-208/1 firmy RADELKIS (Budapeszt, Węgry).

2.2. Materiały i odczynniki **(Materials and reagents)**

Przedmiotem badań całkowitego potencjału antyoksydacyjnego były próbki miodów i ziołomiodów z różnego rodzaju roślin, oraz próbki miodów pitnych. Próbki te zostały zakupione w sklepach, a niektóre z nich bezpośrednio nabyto od pszczelarzy. Wykaz wszystkich próbek, jak i miejsca ich pochodzenia szczegółowo przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Wykaz miodów stosowanych w badaniach
Table 1. List of tested honeys

Nr pasieki (No apiary)	Adres (Address)	Rodzajmiodu (Type of honey)
1	Gospodarstwo Pasieczne „Sądecki Bartnik”, 33-331 Stróże, woj. Małopolskie	aloesowy, aroniowy, głogowy, pokrzywowy, sosnowy, z propolisem, z pyłkiem
2	Pasieka Kazimierz Przestrzelski, 18-400 Łomża, woj. Podlaskie	akacjowy, lipowy, macierzankowy, spadziowy, wielokwiatowy, wierzbowy, wrzosowy
3	Pasieka Władysław Jezior, 21-200 Parczew, woj. Lubelskie	akacjowy, gryczany, lipowy, mniszkowy, rzepakowy, wielokwiatowy
4	Gospodarstwo Pasieczne „Kuszka”, Krzysztof Fujerski, 78-550 Czaplonek, woj. Zachodnio - Pomorskie	akacjowy, gryczany, spadziowy
5	Pasieka „Pod Dębami”, Józef Niedźwiecki, 14-500 Braniewo, woj. Warmińsko - Mazurskie	lipowy, spadziowy, wielokwiatowy
6	Pasieka Helena Wernerowa, Seroczyn, 08-110 Siedlce, woj. Mazowieckie	lipowy, wielokwiatowy
7	Pasieka „Namysłowski Bartnik”, Antoni Teuerle, 57-315 Przeczów, woj. Dolnośląskie	akacjowy, gryczany, spadziowy
8	Pasieka „PH Barć”, Włodzimierz Cyc, 23-425 Biszczka, woj. Lubelskie	lipowy, wielokwiatowy
9	Pasieka „Leśny Dar” Szymaniak Jerzy Chodów, 08-110 Siedlce, woj. Mazowieckie	akacjowy, lipowy, gryczany
10	Spółdzielnia Pszczelarska „Apis”, 20-471 Lublin, woj. Lubelskie	– półtorak „Jadwiga” – dwójniak „Kurpiowski” – trójniak „Piastowski” – czwórniak „Korzenny”
11	Costel S. Pietro Terme VIA. G.P. Piana, 1450, Włochy	wielokwiatowy

W pomiarach zastosowano kwas 4-hydroksybenzoesowy (p -HBA), kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy (3,4-DHBA), kwas 3,4,5-trihydroksybenzoesowy (3,4,5-THBA), siarczan(VI) żelaza(II) i buforowany (pH 7,4) roztwór soli fizjologicznej w tabletkach (Sigma – Aldrich, Niemcy); diwodorooortofosforan sodu, wodorooortofosforan potasu, wodorotlenek sodu, brom, 3% wodny roztwór nadtlenu wodoru, wolframian sodowy, molibdenian sodowy, węglan sodowy bezwodny, 85% kwas ortofosforowy, kwas solny oraz siarczan litu (POCh, Gliwice, Polska).

2.3. Warunki pomiarowe (Measurement parameters)

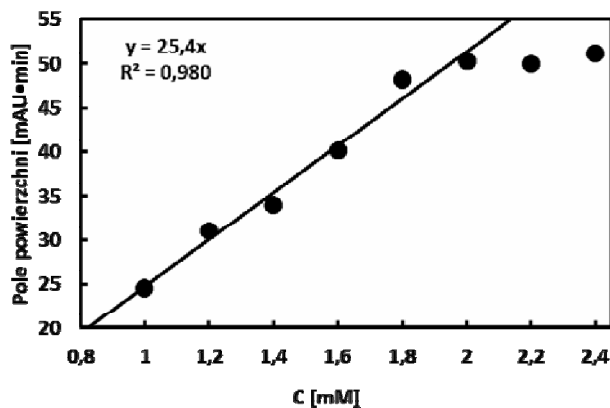
Pomiary chromatograficzne przeprowadzono w układzie faz odwróconych (RP–C18) stosując bufor fosforanowy (pH 6,6) jako fazę ruchomą. Objętość dozowanej na kolumnę próbki wynosiła 20 μ l, zaś szybkość przepływu fazy ruchomej 1 ml/min. Pomiary przeprowadzono w temperaturze 20°C. W pomiarach zastosowano dwa rodzaje detektorów: fotometryczny (długość fali 205 nm) i elektrochemiczny (zakres potencjału, $E = 0 \div 1,2$ V).

Głównym etapem pomiaru CPA jest wygenerowanie rodnika hydroksylowego, $\cdot\text{OH}$, w reakcji analogicznej do reakcji Fentona [25]. Krótki czas życia rodnika hydroksylowego oraz jego duża reaktywność nie pozwalają na jego bezpośrednie oznaczanie. Możliwe jest natomiast uzyskanie bardziej stabilnego produktu reakcji tego rodnika z antyoksydantem (pułapka spinowa), a co za tym idzie jego pośrednie oznaczanie. Gdy substratem reakcji jest kwas *p*-hydroksybenzoesowy wówczas jej produktem jest kwas 3,4-dihydroksybenzoesowy. Reakcję pHBA z rodnikiem hydroksylowym przeprowadza się dwukrotnie, bez i po dodaniu badanej próbki do mieszaniny reakcyjnej. Miarą CPA jest zmniejszenie pola powierzchni pików kwasu 3,4-DHBA pod wpływem próbki.

Reakcje prowadzące do wygenerowania rodnika hydroksylowego oraz powstania kwasu 3,4-DHBA (reakcja podstawowa) przeprowadzono w układzie pomiarowym składającym się z 500 μ l buforu fosforanowego, pH=7,4; 100 μ l 1 Mm pHBA; 100 μ l 0,03% wody utlenionej; 100 μ l wody destylowanej i 200 μ l 2 mM siarczanu (V) żelaza (II). W przypadku układu zawierającego badaną próbkę, objętość wody destylowanej zmniejszono odpowiednio tak, aby ich sumaryczna objętość wynosiła 100 μ l. Pomiar chromatograficzny dokonywano po 7 minutach od zmieszania wszystkich reagentów, przy czym jako ostatni dodawany był siarczan żelaza. Po tym czasie obserwowano niewielkie zmiany wysokości pików *p*-HBA.

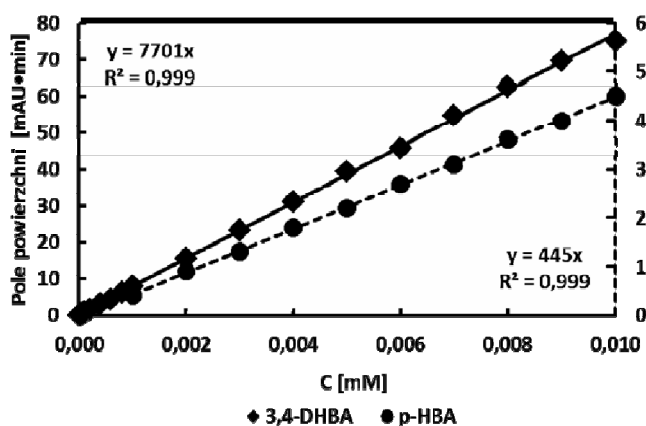
Pole powierzchni pików 3,4-DHBA jest proporcjonalne do jego stężenia w badanej próbce, które bezpośrednio zależy od ilości wygenerowanych rodników hydroksylowych. Na rysunku 1 przedstawiono zależność pomiędzy polem powierzchni 3,4-DHBA, a stężeniem jonów żelaza, użytym do wygenerowania rodników w reakcji Fentona. Powyżej 2 mM Fe^{2+} krzywa asymptotycznie zbliżała się do maksimum.

Krzywe kalibracyjne obu kwasów przedstawiono na rysunku 2. Próg wykrywalności, D_L , kwasu 3,4-DHBA wynosi $3 \cdot 10^{-5}$ mM, kwasu *p*-HBA $6 \cdot 10^{-4}$ mM dla stosunku sygnał/szum = 3, a zakres dynamiki liniowej od $3 \cdot 10^{-5}$ ($6 \cdot 10^{-4}$) do 0,01 mM dla kwasu 3,4-DHBA (*p*-HBA). Oznaczenie CPA przeprowadzono przy maksimum absorbancji kwasu 3,4-DHBA, tj. 205 nm.



Rys. 1. Zależność pola powierzchni kwasu 3,4-DHBA od stężenia Fe^{2+} użytego do generowania rodników w reakcji Fentona (stężenie wody utlenionej 0,03%, *p*-HBA 1 mM). Warunki chromatograficzne: kolumna Eurospher – C18 5 μm 250 x 4 mm (Knauer), temp 20°C, szybkość przepływu 1 ml/min, 100 mM bufor fosforanowy (pH 6.6), detektor UV 205 nm.

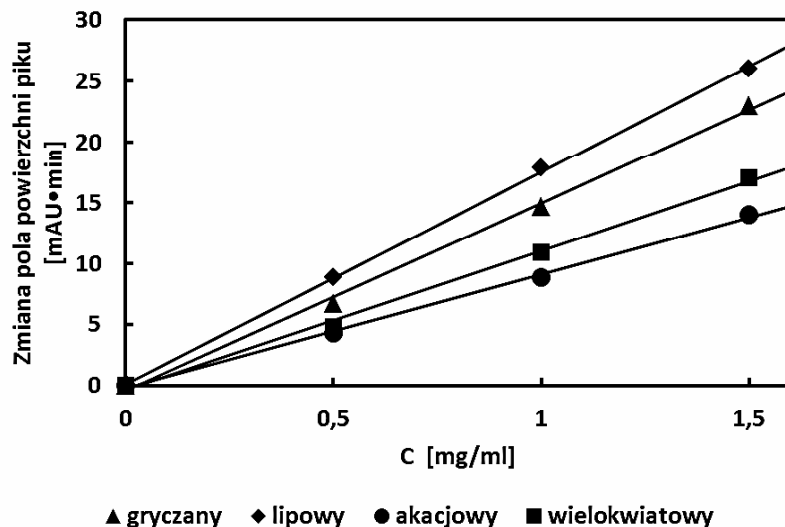
Fig. 1. Dependence of the surface area of 3,4-DHBA peak on the concentration of Fe^{2+} used to the radicals generation in Fenton reaction (concentration of hydrogen peroxide - 0.03%, *p*-HBA - 1 mM). Chromatographic conditions: column – Eurospher C18 5 μm , 250 x 4 mm I.D. (Knauer), temp. – 20°C, flow rate – 1 ml/min, mobile phase – 100 mM phosphate buffer (pH 6.6), UV detector – 205 nm.



Rys. 2. Krzywe kalibracyjne kwasu *p*-HBA (●) i 3,4-DHBA (◆). Warunki chromatograficzne jak na rysunku 1.

Fig. 2. Calibration curves of *p*HBA(●) and DHBA(◆). Chromatographic conditions as on figure 1.

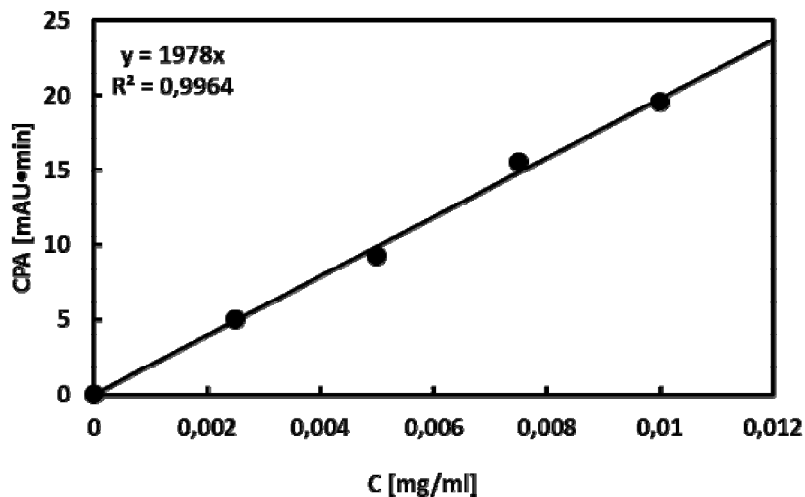
Na rysunku 3 przedstawiono zależność zmiany pola powierzchni pików od stężenia danego miodu. Zależności te mają przebieg liniowy w małym zakresie stężeń (0-1,5 mg/ml). Pozwala to na proste przeliczanie wartości CPA badanych próbek w celu ich późniejszego porównania. Zakres liniowy charakterystyczny jest dla wszystkich przeanalizowanych próbek.



Rys. 3. Wpływ stężenia miodu (pasieka nr 3) na zmianę pola powierzchni pików kwasu 3,4-DHBA. Warunki chromatograficzne jak narysunku 1.

Fig. 3. Influence of the concentration of honeys on the decrease of the surface area of DHBA peak. Chromatographic conditions as on figure 1.

Wartości CPA otrzymane dla wszystkich przeanalizowanych próbek miodów przeliczono na ekwiwalent kwasu galusowego (GAE = mg GA/g miodu). Obliczenia oparto o równanie krzywej wzorcowej wykonanej dla tego kwasu (rysunek 4).

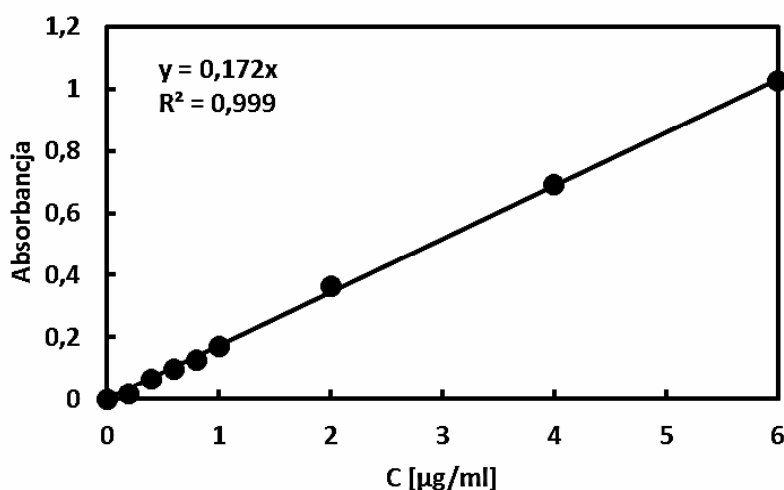


Rys. 4. Krzywa kalibracyjna kwasu galusowego. Warunki chromatograficzne jak na rysunku 1.

Fig. 4. Calibration curve of 3,4,5-THBA. Chromatographic conditions as on figure 1.

Oznaczenie CPA za pomocą detektora elektrochemicznego polegało na wykonaniu chromatogramu próbki miodu techniką HPLC w układzie faz odwróconych, z detekcją elektrochemiczną w dodatnim zakresie potencjałów, $E(V) = 0 \div 1,2$ V. Miara CPA^{ED} była sumaryczna powierzchnia pików powstałych do 20 minuty trwania analizy.

Do pomiaru całkowitej zawartości polifenoli w miodzie wykorzystano zmodyfikowaną metodę z użyciem odczynnika Folina – Ciocalteua (FCR) [26]. Odczynnik ten utlenia polifenole zawarte w próbce tworząc równocześnie barwne tlenki wolframu (W_8O_{23}) i molibdenu (Mo_8O_{23}) powstające z redukcji kwasu fosfowolframowego ($H_3PW_{12}O_{40}$) i kwasu fosfomolibdenowego ($H_3PMo_{12}O_{40}$). W wyniku reakcji powstaje niebieskie zabarwienie tlenków, które wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali 765 nm. Natężenie zabarwienia proporcjonalne jest do całkowitej zawartości polifenoli w badanej próbce. Zawartość polifenoli (PC) w próbce odczytano z krzywej wzorcowej wykonanej dla kwasu galusowego (rysunek 5). Wynik oznaczenia podano jako ekwiwalent tego kwasu w przeliczeniu na 1 g produktu.



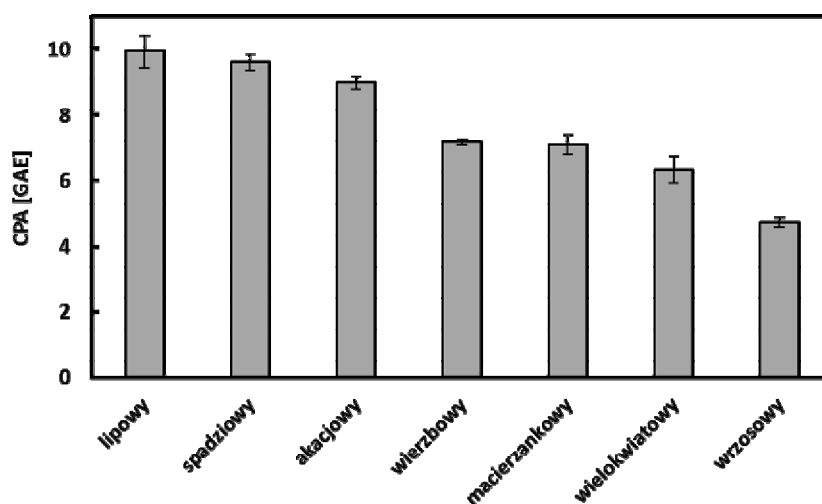
Rys. 5. Krzywa wzorcowa kwasu galusowego wyznaczona przy długości fali 765 nm
Fig. 5. Calibration curve of gallic acid determined at a wavelength of 765 nm

3. Wyniki i dyskusja (Results and discussion)

Zarówno wolne rodniki, RFT jak i antyoksydanty są z jednej strony szkodliwymi, z drugiej nieodzownymi składnikami organizmów żywych. Rozwój nauki i technik analitycznych pozwala na coraz dokładniejsze ich oznaczenie, a także wyjaśnienie ich wpływu na organizm człowieka. Jak wiemy, zasadniczy wpływ na zdrowie ma sposób odżywiania się. Zawarte w pokarmach antyoksydanty pozwalają skuteczniej bronić się przed szkodliwym działaniem wolnych rodników. W produktach pochodzenia pszczelego dużą grupę związków stanowią polifenole i ich pochodne. Jak wskazują da-

ne literaturowe [27], to właśnie ta grupa związków w dużej mierze odpowiedzialna jest za ich właściwości antyoksydacyjne. Przedstawione w pracy wyniki badań CPA umożliwiły wyznaczenie szeregu antyoksydacyjnego miódów, ziołomiodów oraz miódów pitnych pochodzących z różnych rejonów Polski.

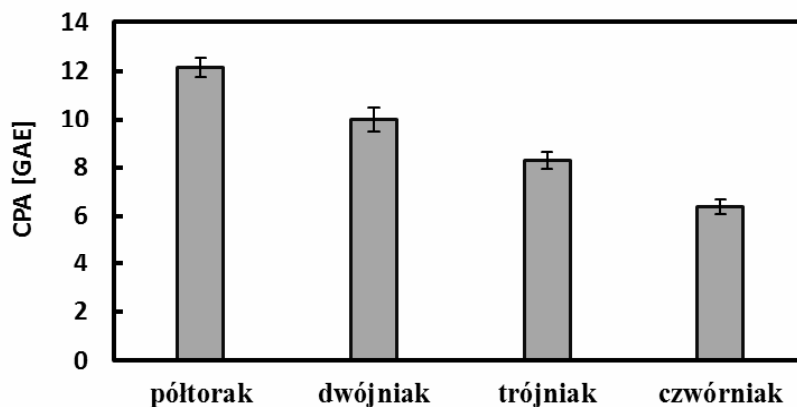
Miody można opisać różnymi parametrami. Między innymi, różne miody charakteryzują się różną konsystencją. Miody łatwiej się zestalające zawierają z reguły więcej antyoksydantów, a mniej wody. Dlatego miody, lipowy, spadziowy i akacjowy (rysunek 6), łatwiej się zestalające charakteryzują się wyższym CPA. W jaki sposób stan skupienia wpływa na właściwości antyoksydacyjnych miodu nie jest jeszcze dokładnie wyjaśnione chociaż wielokrotnie potwierdzone [28].



Rys. 6. CPA miódów (pasieka nr 2) o stężeniu 1 mg/ml. Wyniki przedstawiają średnie \pm SD z 3 niezależnych doświadczeń. Warunki chromatograficzne jak na rysunku 1.

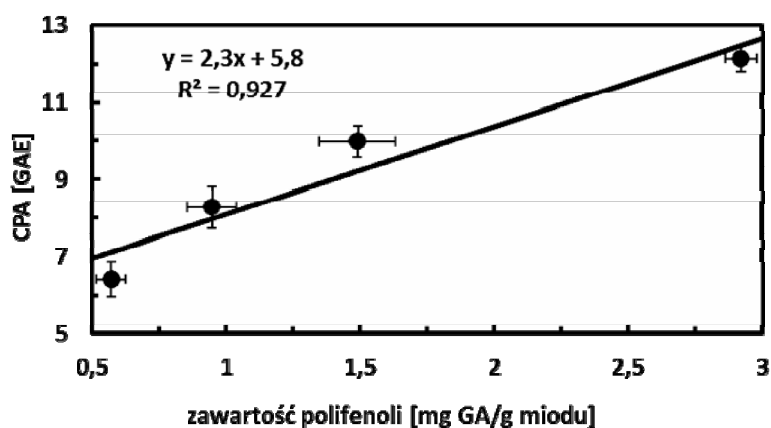
Fig. 6. TAP values (apiary no 2) of various honeys (final concentration 1 mg/ml). Data are presented as means from 3 independent experiments \pm SD. Chromatographic conditions as on figure 1.

Wartości CPA miódów pszczelich jak i pitnych (rysunek 6 i 7) zależą głównie od stężenia polifenoli [27]. Okazało się, że ze wszystkich zbadanych próbek największymi stężeniami polifenoli charakteryzowały się miody pitne, półtorak i dwójniak. Oprócz miódów zawierają one szereg dodatków o silnych właściwościach antyoksydacyjnych. Istnieje wyraźna korelacja pomiędzy CPA, a zawartością polifenoli w miódach pitnych (rysunek 8).



Rys. 7. CPA miodów pitnych o stężeniu 1 mg/ml. Wyniki przedstawiają średnie \pm SD z 3 niezależnych doświadczeń. Warunki chromatograficzne jak na rysunku 1.

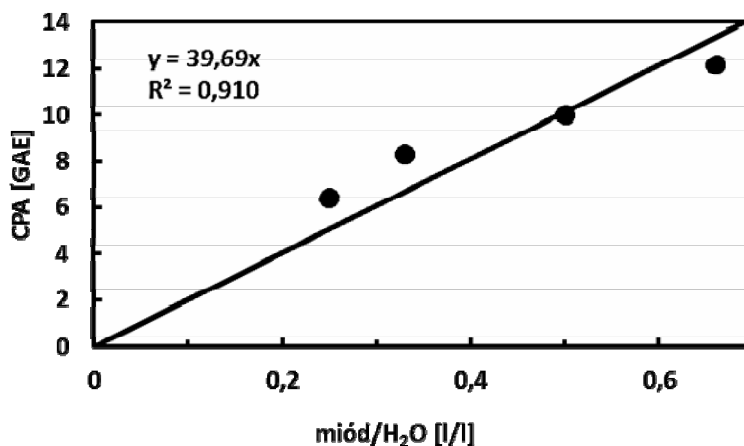
Fig. 7. TAP values of the various meads (final concentration 1 mg/ml). Data are presented as means from 3 independent experiments \pm SD. Chromatographic conditions as on figure 1.



Rys. 8. Korelacja wartości CPA i zawartości polifenoli w miodach pitnych. Badane miody pitne (według wzrostu zawartości polifenoli): czwórniak, trójniak, dwójniak, półtorak

Fig. 8. Correlation between CPA and concentration of polyphenols in meads.

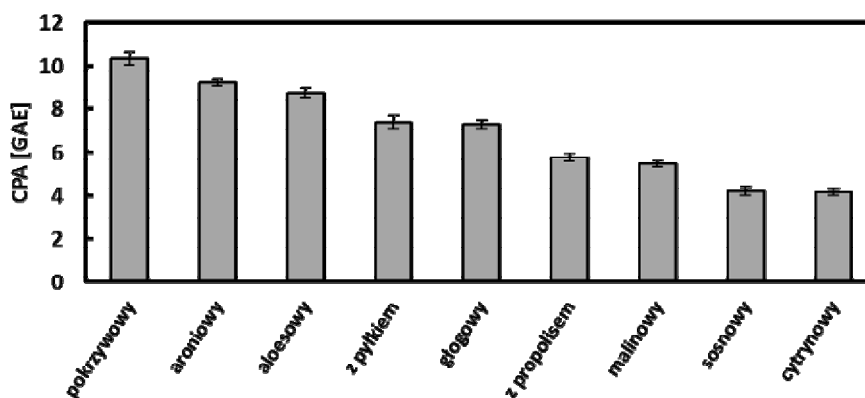
Właściwości antyoksydacyjne miodów pitnych nie zależą bezpośrednio od źródła botanicznego rośliny (jak w przypadku miodu pszczelego), tylko od sposobu przygotowania brzezki miodowej. Im większy jest udział miodu do wody w brzezce, tym większe są wartości CPA danego miodu pitnego. Zależność pomiędzy CPA a objętościowym stosunkiem miodu do wody przedstawiono na rysunku 9.



Rys. 9. Zależność CPA od stosunku objętościowego miodu do wody, użytych w procesie fermentacji. Badane miody pitne (według wzrostu CPA): czwórniak, trójniak, dwójniak, półtorak.

Fig. 9. Correlation between CPA and the ratio honey/water, used in fermentation process.

CPA oznaczono również w ziołomiodach. Największą zdolnością antyoksydacyjną charakteryzuje się ziołomёд pokrzywowy (rysunek 10), natomiast pomiar całkowitej zawartości polifenoli (tabela 2) klasyfikuje go na ostatnim miejscu. Okazuje się, że polifenole nie wpływają na wartości CPA ziołomiodów w sposób liniowy, tak jak w przypadku miodów i miodów pitnych, a CPA pochodzące od nie-polifenoli ma dużo większy wpływ.



Rys. 10. CPA ziołomiodów o stężeniu 1 mg/ml. Wyniki przedstawiają średnie \pm SD z 3 niezależnych doświadczeń. Warunki chromatograficzne jak na rysunku 1.

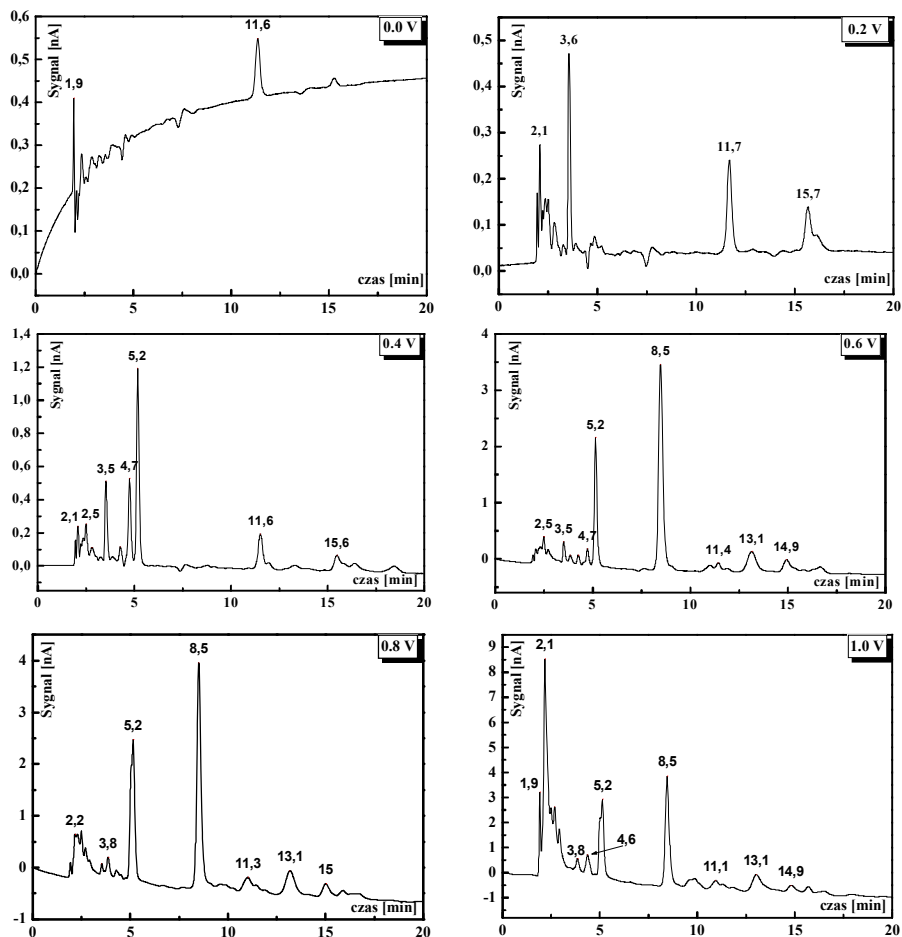
Fig. 10. TAPs of the various herbhoneys (final concentration 1 mg/ml). Data are presented as means from 3 independent experiments \pm SD. Chromatographic conditions as on figure 1.

Tabela 2. Całkowita zawartość polifenoli w ziołomiodach, w przeliczeniu na ekwiwalent kwasu galusowego (GA) w 1 g. Wyniki przedstawiają średnie \pm SD z 3 niezależnych doświadczeń.

Table 2. Total polyphenols content in herbhoney (expressed as gallic acid equivalent). The data represent means \pm SD of 3 independent experiments.

Odmiana miodu	mg GA/ 1 g miodu
z propolisem	0,53 \pm 0,06
z pyłkiem	0,43 \pm 0,04
sosnowy	0,36 \pm 0,02
aloesowy	0,33 \pm 0,03
głogowy	0,27 \pm 0,03
aroniowy	0,25 \pm 0,02
pokrzywowy	0,23 \pm 0,02

Antyoksydanty oznaczać można elektrochemicznie (reakcja utleniania), a więc również stosując detektor elektrochemiczny po ich chromatograficznym rozdzieleniu. W pracy zaproponowano alternatywną metodę pomiaru CPA – pomiar całkowitego pola powierzchni wszystkich pików zarejestrowanych na detektorze amperometrycznym (CPA^{ED}). W tym przypadku antyoksydanty nie są utleniane wygenerowanym rodnikiem, jak w opisywanej do tej pory metodzie, a na powierzchni elektrody. Do badań zastosowano elektrodę z węgla szklanego, dogodną do pracy w środowisku wodnym. Olbrzymią zaletą tej metody jest możliwość dokonywania pomiarów przy różnych potencjałach elektrody pracującej (rysunek 11). W pewnym sensie może to symulować oddziaływanie badanych próbek z różnymi rodnikami. Związki dające piki przy niskich potencjałach są silnymi antyoksydantami, przy wysokich – słabymi. Pomiar przedstawiony w pracy wykonywany był w układzie faz odwróconych. Retencja w tym przypadku jest wprost proporcjonalna do hydrofobowości próbki, która jest wprost proporcjonalna do jej pola powierzchni cząsteczkowej, a odwrotnie proporcjonalna do polarności (określonej np. przez moment dipolowy lub stałą dysocjacji). Oznaczenie CPA^{ED}, można odnieść do niskocząsteczkowych, polarnych związków, wymywanych w objętości martwej kolumny oraz niepolarnych dużych związków organicznych [29].



Rys. 11. Chromatogramy miodu gryczanego (paseka nr 3) o stężeniu 1 mg/ml. Wyniki przedstawiają średnie \pm SD z 3 niezależnych doświadczeń. Warunki chromatograficzne: kolumna Eurospher – C18 5 μ m, 250 x 4 mm (Knauer), temp. 20°C. Faza ruchoma: 100 mM bufor fosforanowy (pH 6.6), szybkość przepływu 1 ml/min, detektor elektrochemiczny (E = 0,0 – 1,0 V vs Ag/AgCl).

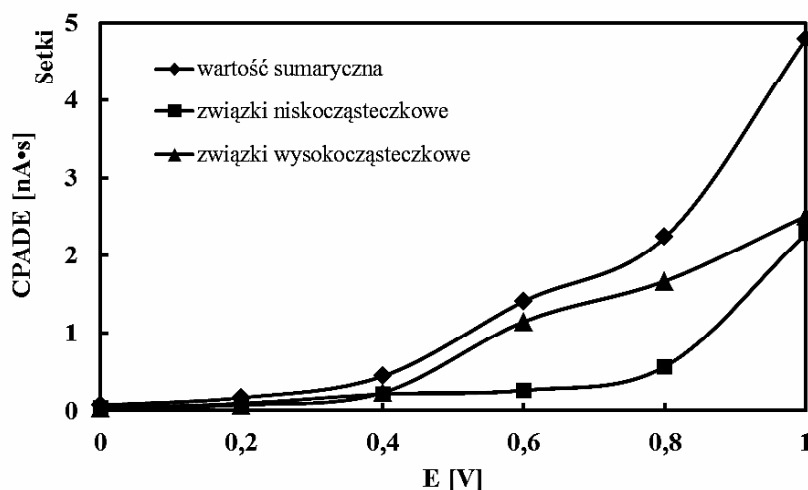
Fig. 11. HPLC chromatograms of the 1 mg/ml buckwheat honey. Chromatographic conditions: column – Eurospher C18 5 μ m, 250x4 mm I.D. (Knauer), temp. – 20°C, flow rate – 1.0 ml/min, mobile phase – 100 mmol/l phosphate buffer (pH 6.6), electrochemical detector with the working electrode potential (E = 0,0 – 1,0 V vs Ag/AgCl).

Z porównania chromatogramów przedstawionych na rysunku 11 wynika, że ze wzrostem potencjału następuje wzrost wysokości wszystkich pików chromatograficznych ale w różnym stopniu i startując od różnego potencjału.

Wysokość pików chromatograficznych proporcjonalna jest do stężenia antyoksydantu, zaś potencjał jego utleniania do mocy antyoksydacyjnej. Piki chromatograficzne dające sygnał przy czasie retencji 3,6, 11,7, 15,7 minuty,

pochodzą od silniejszych antyoksydantów, których stężenie (jak można sądzić po wysokości pików) jest niższe, aniżeli stężenie antyoksydantów pojawiających się w dalszych potencjałach. Z kolei piki pojawiające się przy potencjale 0,4 i 0,6 V (o czasie retencji 5,2 i 8,5 minuty) charakteryzują się słabszą mocą antyoksydacyjną, ale występują prawdopodobnie w większym stężeniu.

Miarą całkowitego potencjału antyoksydacyjnego jest sumaryczne pole powierzchni wszystkich zarejestrowanych pików. Jest to wielkość sumaryczna (w pewnym sensie uśredniona) w stosunku do wszystkich pików zarejestrowanych na chromatogramie. Pozwala ona śledzić CPA różnych klas związków, zarówno nisko- jak i wysokocząsteczkowych (rys. 12). Czasy retencji w pobliżu objętości martwej kolumny do 5 minuty, prawdopodobnie odpowiadają retencji niskocząsteczkowych związków polarnych, najprawdopodobniej nieorganicznych.



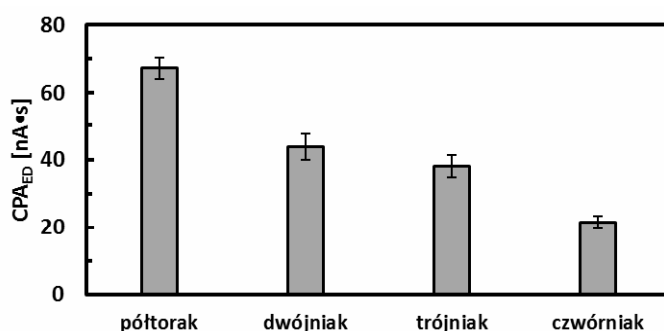
Rys. 12. Zależność CPA^{ED} od potencjału dla miodu gryczanego (pasieka nr 3) o stężeniu 1 mg/ml. Warunki chromatograficzne jak na rysunku 11.

Fig. 12. Dependence of CPA^{ED} on the potential, obtained for 1 mg/ml buckwheat honey from apiary No 1. Chromatographic conditions as on figure 11.

Optymalną wartością wybraną do oznaczeń był potencjał równy 0,8 V, ponieważ w wyższym potencjale nie zaobserwowano dodatkowych sygnałów elektrochemicznych (pochodzących ewentualnie od słabszych antyoksydantów), a jedynie wzrost całkowitego pola powierzchni. Dodatkowo w potencjale powyżej 1,0 V dochodzi do rozkładu wody na elektrodzie węglowej, co uniemożliwia dokładny pomiar CPA^{ED}.

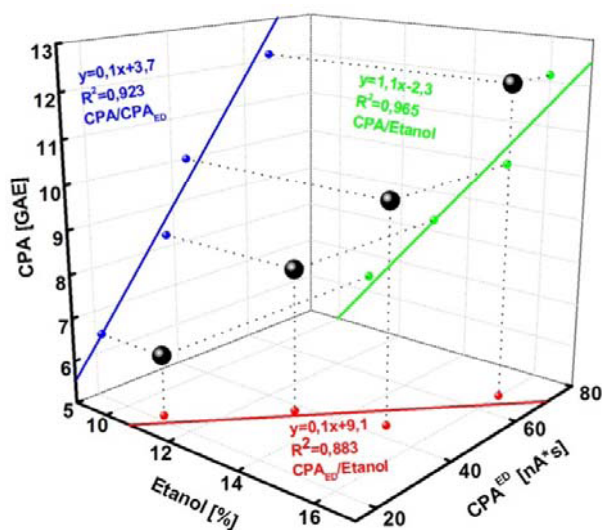
CPA^{ED} zależny jest od potencjału elektrody pracującej. Przy potencjałach z obszaru granicznego prądu dyfuzyjnego należałoby oczekiwać jego korelacji z oddziaływaniem próbki z silnymi rodnikami, np. hydroksylowymi (porównaj rysunki 7 i 13).

Wartości CPA^{ED} miodów pitnych (rysunek 13) są dużo mniejsze aniżeli czystych miodów. Spowodowane to jest oczywiście znacznym rozcieńczeniem miodów pitnych. W przypadku CPA obserwuje się raczej wyższą jego wartość dla miodów pitnych (rysunek 7) niż dla miodów nektarowych (rysunek 6). W tym przypadku rozcieńczenie miodów pitnych niwelowane jest powstawaniem etanolu w procesie fermentacji. Najniższe stężenie alkoholu etylowego jest w czwórniaku (11%), zaś najwyższe w półtoraku (16%). Na rysunku 14 przedstawiono korelację pomiędzy CPA, CPA^{ED} a procentową zawartością etanolu.



Rys. 13. CPA^{ED} miodów pitnych o stężeniu 1 mg/ml. Wyniki przedstawiają średnie \pm SD z 3 niezależnych doświadczeń. Warunki chromatograficzne jak na rysunku 11.

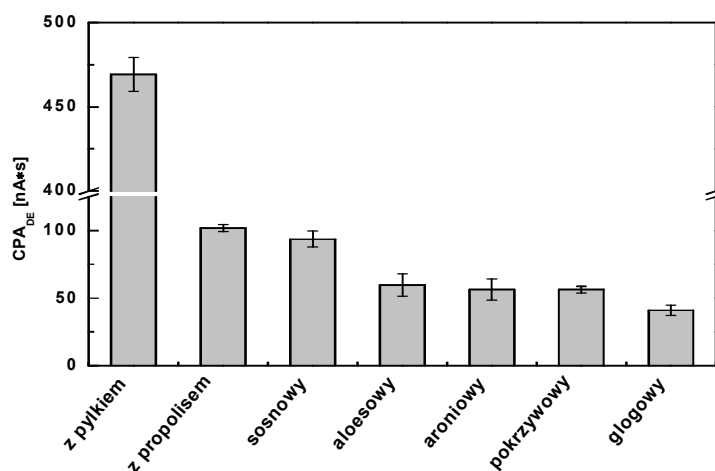
Fig. 13. TAP^{ED} values of various meads (final concentration 1 mg/ml). Data are presented as means from 3 independent experiments \pm SD. Chromatographic conditions as on figure 11.



Rys. 14. Korelacja między CPA, CPA^{ED} i stężeniem etanolu w miodach pitnych z rysunku 13.

Fig. 14. Correlation between CPA, CPA^{ED} and concentration of ethanol, in meads from figure 13.

Jak sugerują dane literaturowe [14, 15] właściwości antyoksydacyjne ziołomiodów również skorelowane są z ich zabarwieniem. Ziołomiody zielono-żółte (pokrzywowy, aloesowy), czerwone (aroniowy), powinny charakteryzować się większą zdolnością antyoksydacyjną aniżeli miody jasne. O ile takie założenia potwierdzają badania CPA (rysunek 10), to pomiar CPA^{ED} kształtuje szereg antyoksydacyjny ziołomiodów w innej kolejności (rysunek 15). Może to być spowodowane występowaniem związków nieorganicznych dających sygnał elektrochemiczny lecz nie reagujących z rodnikiem hydroksylowym.



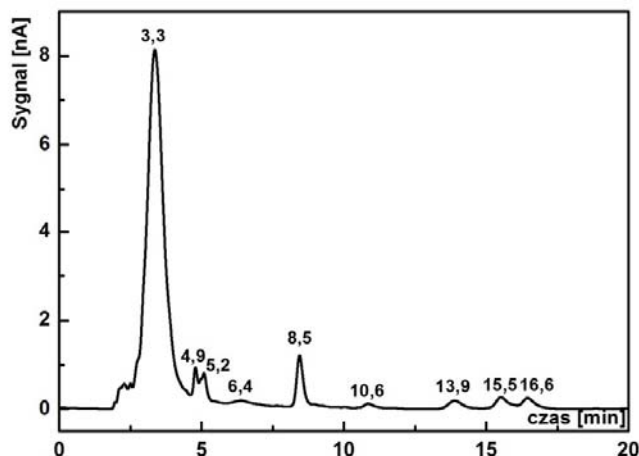
Rys. 15. CPA^{ED} ziołomiodów o stężeniu 1 mg/ml. Wyniki przedstawiają średnie \pm SD z 3 niezależnych doświadczeń. Warunki chromatograficzne jak na rysunku 11.

Fig. 15. TAP^{ED} values of the different herb honeys (final concentration - 1 mg/ml). Data are presented as means from 3 independent experiments \pm SD. Chromatographic conditions as on figure 11.

Duża wartość CPA^{ED} ziołomiodu z pyłkiem jest związana z występowaniem piku chromatograficznego przy czasie retencji 3,3 minuty, który stanowi 75,5% całkowitego pola powierzchni. Prawdopodobnie pik ten nie pochodzi od jednego związku, a jest wynikiem słabego rozdzielania chromatograficznego kilku różnych związków o podobnym czasie retencji (rysunek 16).

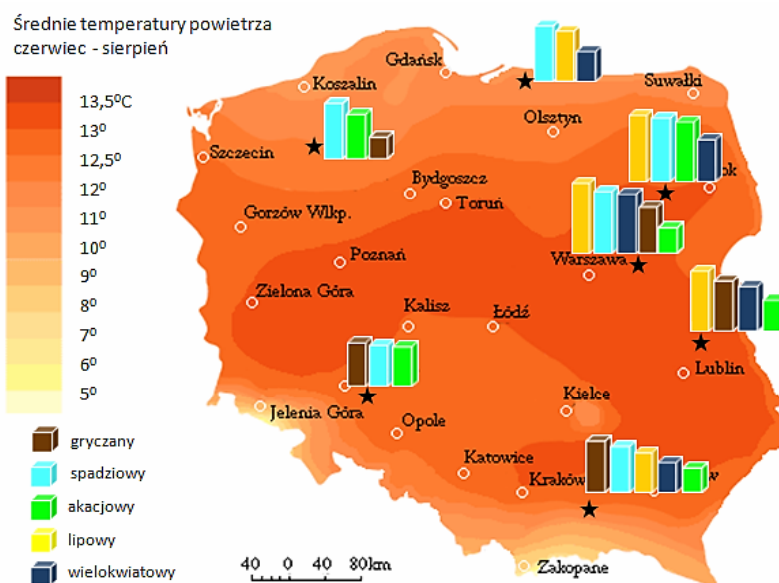
Właściwości antyoksydacyjne miodu w dużej mierze zależą od położenia geograficznego, a co za tym idzie, także i od warunków klimatycznych, w których jest on wytwarzany przez pszczoły.

Wyższe właściwości antyoksydacyjne miodu obserwowane są w strefach klimatu ciepłego. Warunki klimatyczne Polski nie stwarzają najlepszych warunków do produkcji miodu, ponieważ Polska leży w strefie klimatu umiarkowanego chłodnego. W ciągu roku znacznie więcej jest dni zimnych niż ciepłych. Z kolei większość dni ciepłych jest pochmurnych lub deszczowych. Okres, na jaki przypada produkcja miodu przez pszczoły obejmuje miesiące od kwietnia do października. Na rysunku 17 przedstawiono wartość CPA miodów z różnych rejonów kraju z zaznaczeniem rozkładu średnich temperatur od czerwca do sierpnia.



Rys. 16. Chromatogram miodu z pyłkiem o stężeniu 1 mg/ml. Wyniki przedstawiają średnie \pm SD z 3 niezależnych doświadczeń. Warunki chromatograficzne jak na rysunku 11.

Fig. 16. HPLC chromatogram of the 1 mg/ml pollen honey. Data are presented as means from 3 independent experiments \pm SD. Chromatographic conditions as on figure 11.



Rys. 17. Mapa Polski z zaznaczonym rozkładem średnich temperatur od czerwca do sierpnia i wartościami CPA miodów

Fig. 17. Map of Poland with the average temperatures (June to August) and CPAs of honeys

Miody pochodzące ze wschodniej części Polski, gdzie temperatury na przełomie czerwca – sierpnia są większe aniżeli temperatury na północnej

i południowej części Polski, charakteryzują się większymi wartościami CPA, które dokładnie podano w tabeli 3. Zależność tą doskonale widać na przykładzie miodu lipowego i spadziowego. W pracy przebadano również miód wielokwiatowy pochodzący z południowej części Włoch. Wartość jego całkowitego potencjału antyoksydacyjnego jest wyższa (CPA = 13,1 GAE) w porównaniu do miodów polskich (średnia wartość CPA dla miodu wielokwiatowego to 11,2 GAE), co najprawdopodobniej uwarunkowane jest cieplejszym klimatem tamtego regionu.

Tabela 3. CPA miodów o stężeniu 1 mg/ml. Wyniki przedstawiają średnie \pm SD z 3 niezależnych doświadczeń. Warunki chromatograficzne jak na rys. 1

Table 3. TAPs of 1 mg/ml honeys. The data represent means \pm SD of 3 independent experiments

miód województwo	CPA [GAE]				
	gryczany	spadziowy	lipowy	wielokwiatowy	akacjowy
Małopolskie	7,8	6,9	6,5	4,6	3,9
Podlaskie	–	9,6	9,9	6,3	9,0
Lubelskie	7,6	–	9,2	5,7	4,6
Zach.-Pom.	3,6	8,4	–	–	6,8
War.-Maz.	–	8,6	7,8	4,7	–
Mazowieckie	–	–	10,7	9,1	–
Dolnośląskie	6,7	6,6	–	–	5,8
Lubelskie	–	–	6,4	7,1	–
Mazowieckie	7,2	–	9,2	–	4,2
Włochy	–	–	–	13,1	–

Poza wpływem temperatury powietrza na wartość CPA rozpatrywanych miodów, duży wkład w te wartości ma również bogata szata roślinna oraz uprzemysłowienie danych regionów. Brak wyraźnego rozwoju przemysłu w regionach województwa podlaskiego i mazowieckiego, a co za tym idzie, brak znacznego zanieczyszczenia powietrza oraz duże zróżnicowanie gatunkowe roślin tych regionów przekłada się na wzrost wartości CPA badanych miodów. Średnia wartość CPA miodów dla województwa podlaskiego wynosi 8,7, zaś dla mazowieckiego 7,7 GAE. W regionach uprzemysłowionych wartość ta spada do 6,3 GAE (województwo dolnośląskie).

4. Wnioski (Conclusions)

1. Pomiar CPA^{ED} umożliwia oznaczanie antyoksydantów o różnej mocy z uwzględnieniem podziału (w oparciu o czas retencji) na nisko- i wysokocząsteczkowe.
2. Dla miodów pitnych znaleziono liniową korelację pomiędzy CPA odniesionym do rodnika hydroksylowego i mierzonym na detektorze elektrochemicznym.

3. Istnieje korelacja pomiędzy CPA, a stanem skupienia i barwą miodu. Miody krystaliczne i ciemne charakteryzują się większymi wartościami CPA aniżeli miody jasne, płynne.
4. Wartości CPA miodów i miodów pitnych w dużej mierze zależą od zawartości w nich związków polifenolowych. Zaobserwowano liniowy wzrost wartości CPA wraz ze wzrostem zawartości polifenoli.
5. Właściwości antyoksydacyjne miodu pitnego uzależnione są od stosunku miodu do wody w brzezce. Im większy jest udział miodu do wody, tym większe są jego wartości CPA.
6. Ze wzrostem procentowej zawartości etanolu następuje wzrost wartości CPA miodów pitnych.
7. Większymi właściwościami antyoksydacyjnymi charakteryzują się miody pochodzące z wschodnich regionów Polski.

5. Literatura (Literature)

1. A. Gendźwił, *Reaktywne formy tlenu i hiporeaktywność naczyń we wstrząsie septycznym. Część I – Reaktywne formy tlenu i hiporeaktywność naczyń*, Pol. Merk. Lek., XXIII, **136**(2007)280.
2. M. Gajewski, E. Kamińska, Ł. Wysocki, Sz. Szczepanik, G. Sygitowicz, M. Wojciechowski, J. Pachecka, S. Maśliński, *Gospodarka tlenowa w organizmie. Część I. Warunki normy fizjologicznej*, Życie Weterynaryjne, **80**(2005)380.
3. S. Ziemiański, M. Wartanowicz, *Rola antyoksydantów żywieniowych w stanie zdrowia i choroby*, *Pediatrics Współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka*, **1**(1997)97.
4. F.Ch. Cheng, J.F. Jen, T.H. Tsai, *Hydroxyl radical in living systems and its separation methods*, J. Chromatogr. B, **781**(2002)481.
5. M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, *Free radicals metals and antioxidants in oxidative stress – induced cancer*, Chem. Biol. Interac., **160**(2006)1.
6. B.K. Głód, E. Olszewska, P. Piszcz, *Wolne rodniki a stres oksydacyjny*, *Tłuszcze Jadalne*, **41**(2006)254.
7. B.R. D'Arcy, *Antioxidants in Australian Floral Honeys – Identification of health-enhancing nutrient components*, Australian Government, RIRDC, **05/40**(2005)1.
8. R.J. Weston, *The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review*, Food Chem., **71**(2000)235.
9. I.M. Emens, *A different and safe method of split thickness skin graft fixation: Medicinal honey application*, Burns, **33**(2007)782.
10. V. Baltrušaitytė, P.R. Venskutonis, V. Čeksterytė, *Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts*, Food Chem., **101**(2007)502.
11. G. Beretta, P. Granata, M. Ferrero, M. Orioli, R.M. Facino, *Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectropho-*

- tometric/fluorometric assays and chemometrics*, Anal. Chim. Acta, **533**(2005)185.
12. R. Socha, L. Juszcak, S. Pietrzyk, T. Fortuna, *Antioxidant activity and phenolic composition of herhoneys*, Food Chem., **113**(2009)568.
 13. J. Lachman, D. Koliňová, D. Miholová, J. Kořata, D. Titěra, K. Kult, *Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality*, Food Chem., **101**(2007)973.
 14. L. Juszcak, R. Socha, J. Różnowski, T. Fortuna, K. Nalepka, *Physico-chemicals properties and quality parameters of herhoneys*, Food Chem., **113**(2009)538.
 15. R. Socha, L. Juszcak, S. Pietrzyk, T. Fortuna, *Antioxidant activity and phenolic composition of herhoneys*, Food Chem., **113**(2009)568.
 16. J. Rogala, *Miody pitne, czyli jak w domowych warunkach najstarszy polski trunek przysposobić*, Wydawnictwo Baobab, Warszawa 2005.
 17. A. Gałuszka, *Miody pitne, krupniki i piwa miodowe*, Wydawnictwo Prószyński i S-ka, Warszawa 2006.
 18. Dz.U. Nr 272, poz. 2696, 2004.
 19. Dz.U. L 93 z 31.03.2006, str. 1.
 20. Dz.U. L 93 z 31.03.2006r., str. 12, z późn. zm.
 21. J.F. Cotte, H. Casabianca, S. Chardon, J. Lheritier, M.F. Grenier-Loustalot, *Application of carbohydrate analysis to verify honey authenticity*, J. Chromatogr. A, **1021**(2003)145.
 22. M. Zappalá, B. Fallico, E. Arena, A. Verzera, *Methods for the determination of HMF in honey: a comparison*, Food Control, **16**(2005)273.
 23. Y.L. Hu, Y. Lu, G.J. Zhou, X.H. Xia, *A simple electrochemical method for the determination of hydroxyl free radicals without separation process*, Talanta, **74**(2008)760.
 24. B.K. Głód, P. Grieb, *Modified Analytical Method for Hydroxyl Radicals Using Spin Trapping and Ion Exclusion Chromatography*, Chem. Anal. **47**(2002)399.
 25. B.K. Głód, E. Olszewska, P. Piszcz, *Całkowity potencjał antyoksydacyjny: jego oznaczanie oraz zastosowanie w badaniach biomedycznych*, Tłuszcze Jadalne, **41**(2006)264.
 26. C. Peri, G. Pompei, *An assay of different phenolic fractions in wines*, Am. J. Enol. Vitic., **22**(1971)55.
 27. B. Kędzia, E. Hołderna-Kędzia, *Występowanie związków fenolowych w miodzie pszczelim*, 4, 225-232, Wydawnictwo Medyczne Borgis, Warszawa 2008.
 28. M. Liviu Al, D. Daniel, A. Moise, O. Bobis, L. Laslo, S. Bogdanov, *Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania*, Food Chem., **112**(2009)863.
 29. M. Skwarek, Praca magisterska, „Mechanizm retencji kwasów karboksylowych na różnych kolumnach HPLC”, *Retention Mechanism of Carboxylic Acids on a Different HPLC Columns*, Akademia Podlaska, Siedlce 2008.