

## CHEMICZNE MARKERY MIODÓW ODMIANOWYCH CHEMICAL MARKERS OF UNIFLORAL HONEYS

**Izabela Jasicka-Misiak<sup>1</sup>, Paweł Kafarski<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> *Katedra Chemii Analitycznej i Ekologicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Opolskiego  
ul. Kopernika, 45-040 Opole*

<sup>2</sup> *Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej  
Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław  
e-mail: pawel.kafarski@pwr.wroc.pl*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Skład chemiczny miodu

2. Chemiczne markery miodów odmianowych i metody ich identyfikacji

3. Profile lotnych związków chemicznych jako markery odmian miodów

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---



**dr Izabela Jasicka-Misiak** urodziła się w roku 1971 w Oleśnie. Studiowała chemię ze specjalnością agrobiochemia w Instytucie Mat.-Fiz.-Chem. Uniwersytetu Opolskiego, gdzie w 1995 roku uzyskała stopień magistra (promotor prof. Kazimierz Wiech), a w roku 2005 stopień doktora (promotor prof. Paweł Kafarski).

Od roku 2005 jest zatrudniona jako adiunkt w Katedrze Chemii Analitycznej i Ekologicznej Wydziału Chemii UO. Prowadzi badania mieszczące się w nurcie chemii produktów naturalnych. Dokonuje izolacji, identyfikacji oraz badań właściwości i aktywności substancji pochodzenia naturalnego, między innymi substancji o właściwościach psychoaktywnych z grzybów oraz markerów autentyczności miodów odmianowych.



**prof. dr hab. inż. Paweł Kafarski** urodził się w roku 1949 w Gdańsku. Studiował chemię na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej, gdzie w 1977 roku uzyskał stopień doktora (promotor prof. Przemysław Mastalerz) a w roku 1990 stopień doktora habilitowanego. Tytuł profesora nauk chemicznych otrzymał w roku 2000. Od 1992 roku kieruje Zakładem Chemii Bioorganicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Od roku 1982 pracuje również na Uniwersytecie Opolskim. Sprawuje lub sprawował wiele funkcji typowych dla pracownika akademickiego. W latach 2006–2009 pełnił funkcje Prezesa Polskiego Towarzystwa Chemicznego. Jest współautorem blisko

trzystu prac naukowych, które są cytowane w literaturze ponad dwa i pół tysiąca razy. Był promotorem dwudziestu dwóch prac doktorskich. Jego zainteresowania naukowe obejmują projektowanie, syntezę i badanie wybranych właściwości biologicznych związków aminofosfonowych i ich pochodnych. Nurtem badań realizowanym na Uniwersytecie Opolskim jest chemia produktów naturalnych. Spośród nagród i wyróżnień szczególnie sobie ceni Medal im. Jana Hanusa nadany przez Czeskie Towarzystwo Chemiczne i medal im. Prof. Włodzimierza Trzebiatowskiego nadany przez Senat Politechniki Wrocławskiej. Na jego osobowość wyraźny wpływ miało dwóch nauczycieli – historyk dr Zbigniew Czarnuch (szkoła średnia) i chemik prof. Przemysław Mastalerz (opiekun akademicki).

---

**ABSTRACT**

Honey is a natural food product rich in variety of chemical compounds, which are responsible for its quality and aroma. Unifloral honeys are especially attractive for buyers and are quite frequently falsified. Thus, the assessment of their quality is indispensable. Today it relies on identification of the pollen and determination of honey physicochemical properties. In this paper the new methods for the assessment of honey quality are described. They rely on analysis and identification of volatile compounds typical for certain unifloral honeys. These compounds are called markers. These could be virtually all natural products with products of decomposition of phenylalanine, terpenes, flavonoids, aromatic acids, heterocycles, carotenoids and non-typical sugars. The second approach is to study the metabolome of these honeys. The most effective metabolomic studies rely on building up “finger-prints” of certain honey brands based on relative concentrations of a chosen set of volatile compounds.

Keywords: honey, food quality, breeding, natural products

Słowa kluczowe: miód, pszczelarstwo, jakość żywności, produkty naturalne

---

---

## WPROWADZENIE

Miód jest naturalnym produktem wytwarzanym przez pszczoły miodne z nektaru kwiatowego. Nektar jest słodkim sokiem roślinnym wydzielanym przez specjalne gruczoły zwane nektarnikami. Rośliny wytwarzające duże ilości tej wonnej cieczy są określane jako rośliny miododajne.

Drugim rodzajem surowca pszczelego jest spadź, która jest sokiem roślinnym wydzielanym przez owady. Mszyce, czerwce i muchówki nakłuwają liście i wysysają sok z rośliny, z którego pobierają głównie białka, a pozostałą ciecz wydalają. Dlatego smak, barwa, zapach i konsystencja miodu spadziowego zależy od gatunku owadów wydalających spadz.

Pszczoły pobierają surowce miodowe (pożytek) języczkiem i dodają do niego nieco wydzieliny swoich gruczołów ślinowych. Po powrocie do ula oddają go młodszemu pszczołom, które wciągają kropelkę nektaru do wola miodowego i wyrzucają pobraną ciecz na języczek. Czynność tę powtarzają kilka razy. Wymieszany ze śliną nektar umieszczają w jednej z dolnych komórek plastra, gdzie następuje częściowe odparowanie wody. Po pewnym czasie miód częściowo już zagęszczony zostaje przeniesiony do górnej części plastra. Po wypełnieniu komórek plastra zachodzi jego dojrzewanie, podczas którego następuje utrata wody. Do odparowywania wody pszczoły używają prądu powietrza wytwarzanego za pomocą skrzydeł. Odparowanie wody zapobiega fermentacji tego słodkiego produktu. Komórki z całkowicie dojrzałym miodem pszczoły zasklepiają wieczkiem woskowym [1, 2].

Miód jest bardzo popularnym i cenionym produktem spożywczym we wszystkich miejscach świata. Na przykład, w grobach Faraonów odnaleziono miód pszczeli i ziarna pszenicy. Owe produkty miały pełnić rolę pożywienia podczas wędrówki dusz. Zaskakujące jest to, że znaleziony miód uległ konserwacji do tego stopnia, że nadal nadawał się do spożycia [1].

Miód jest przede wszystkim wykorzystywany w żywieniu, medycynie i kosmetyce. Wykorzystanie miodu jest możliwe nie tylko dzięki jego walorom smakowym i odżywczym, ale przede wszystkim jest on łatwo dostępnym źródłem energii, makro i mikroelementów oraz posiada aktywność antybakteryjną i przeciwutleniającą [1–5]. Jego cechy pozwalają zaliczyć go do żywności „minimalnie przetworzonej”, miód poza standaryzacją nie jest poddawany żadnym technologicznym procesom.

Coraz większa świadomość konsumentów oraz rozwój apiterapii sprawia, że wzrasta znaczenie miodów odmianowych w przeciwieństwie do wielokwiatowych. Sondaże rynkowe dowodzą, że ok. 70% konsumentów preferuje miody odmianowe. Wciąż wzrasta zainteresowanie polskimi miodami odmianowymi, nie tylko w Polsce, ale także w krajach Unii Europejskiej bowiem polscy pszczelarze słyną z produkcji miodów wysokiej jakości.

Miód jest produktem fałszowanym od dawna i powszechnie. Najczęściej miód fałszuje się przez dodatek dekstryn skrobiowych, cukrów buraczanego i trzcinowego, otrzymanych z nich syropów lub ich hydrolizatów oraz kredy i krochmalu. Do fałszowania dochodzić może już na etapie pozyskiwania miodu, gdy dokarmia-

nie pszczoł w ulu przebiega z nadmiernym dodatkiem sacharydów. Falszowanie miodu dotyczy również mieszania różnych jego odmian lub też przypisywania miodom innego pochodzenia botanicznego lub innego rejonu geograficznego. Dlatego bardzo ważne jest kontrolowanie jakości miodów [6, 7].

Do identyfikacji odmianowej miodów stosowane są różne metody. Najważniejsze są badania właściwości sensorycznych (smak, zapach, konsystencja, barwa). Do najstarszych i powszechnie stosowanych należy metoda pyłkowa (przykład takiej analizy pokazano na Rysunku 1), polegająca na mikroskopowej ocenie jakościowej i ilościowej pyłku kwiatowego zawartego w miodzie [6].



Rysunek 1. Obraz mikroskopowy miodu wrzosowego (pyłek w tetradach)  
Figure 1. Microscopic study of heather honey (tetrad pollen)

Do identyfikacji pochodzenia botanicznego i geograficznego miodów stosuje się również metody fizyczne, chemiczne oraz biologiczne polegające na pomiarze wilgotności, zawartości popiołu, przewodności elektrycznej, kwasowości i aktywności enzymatycznej [7–9]. Na przykład, przewodność właściwa miodów nektarowych oraz nektarowo-spadziowych mieści się w granicach 0,45–0,8 mS/cm. Miody spadziowe, kasztanowe i ich mieszanki charakteryzuje przewodność wyższa niż 0,8 mS/cm. W przypadku miodów pochodzących z drzewa truskawkowego (*Arbutus unedo*), wrzośca (*Erica*), eukaliptusa, lipy (*Tilia spp.*), wrzosu pospolitego (*Calluna vulgaris*), leptospermum, czy drzewa herbacianego (*Melaleuca spp.*) nie określa się przewodności właściwej [9, 10].

Ponieważ metody te są zawodne w wielu krajach poszukuje się związków charakterystycznych dla konkretnej odmiany miodu (tu bada się głównie terpeny) lub tworzy się profile chemiczne konkretnej klasy produktów naturalnych (najczęściej fenylopropanoidów lub kwasów fenolowych), które stanowią coś w rodzaju „finger-printu” poszczególnych miodów odmianowych. Badania takie prowadzimy także w Opolu.

## 1. SKŁAD CHEMICZNY MIODU

Dojrzały miód jest gęstą, higroskopijną cieczą o ciężarze właściwym w granicach od 1,38 do 1,45 g/cm<sup>3</sup>. Miody posiadają konsystencję płynną (patok), lepka, częściowo lub całkowicie skryształizowaną (krupiec) [11].

Skład miodu jest bardzo złożony, zależy od wielu czynników. Jako jeden z najważniejszych wymienić należy gatunek rośliny, z której został zebrany nektar lub spadź. Skład miodu zależy również od warunków środowiskowych i klimatycznych. Miód zawiera około 300 substancji należących do różnych grup związków chemicznych [8, 12].

Poszczególne odmiany miodów różnią się pomiędzy sobą kolorystyką (Rys. 2), zapachem, smakiem oraz konsystencją. Miody nektarowe mają zazwyczaj barwę od białej (lipowy, rzepakowy) do ciemnobursztynowej (wrzosowy, gryczany) i są bardzo aromatyczne a ich zapach jest zbliżony do aromatu nektaru.



Rysunek 2. Barwy wybranych miodów  
Figure 2. Colours of chosen honeys

Miody spadziowe natomiast są ciemne i mogą posiadać odcień zielonkawy lub szary, charakteryzuje je intensywny zapach przypominający zapach żywicy lub igliwia. O intensywności kolorów miodu decydują w dużej mierze barwniki roślinne znajdujące się w nektarze. Należą do nich głównie karotenoidy i flawonoidy, które są również odpowiedzialne za właściwości przeciwutleniające miodu [4, 5]. Zazwyczaj im ciemniejszy miód tym silniejszy smak i lepsza jego jakość.

Zgodnie z normą międzynarodową zawartość wody w dojrzałym miodzie nie powinna przekraczać 20%. Wyjątkiem jest miód wrzosowy, dla którego dopuszczalna zawartość wody wynosi 23%. Większość miodów zawiera wodę w granicach 17–18%. Zależy to od wielu czynników, takich jak stopień dojrzałości miodu, sezon i pora zbioru, a także od warunków klimatycznych [14].

Najliczniejszą grupę związków chemicznych zawartych w miodzie stanowią cukry (średnio 77%). Zawartość węglowodanów w rodzimych miodach nektarowych i spadziowych waha się od 68 do 78%, przy czym przeważają cukry proste. Średnia zawartość glukozy wynosi 30%, a fruktozy 38%. We frakcji dwucukrów dominuje sacharoza. Sacharoza występuje w miodach odmianowych w granicach od 0,8% (miód wrzosowy i gryczany) do 7,7% (miód akacjowy). Drugim dwucukrem jest melitoza, której może być do 5,4%. W miodach spadziowych znajduje się też

trisacharyd melecytoza, której zawartość może być znaczna, bo aż do 28%. W różnych typach i odmianach miodu stwierdzono niewielkie ilości 22 innych cukrów: między innymi melibiozy, trehalozy, izomaltozy, i gencjobiozy [4, 9, 14, 15]. Charakterystycznym związkiem zawartym w miodzie powstającym na skutek kwasowego rozkładu cukrów prostych (głównie fruktozy) jest 5-hydroksymetylofurfural. Poziom tego związku rośnie wraz z wiekiem miodu.

Bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na wartość i smak oraz w znacznej mierze decydującym o dojrzałości miodu jest zawartość kwasów organicznych. W największej ilości występują kwasy: glukonowy, jabłkowy, cytrynowy, mlekowy, bursztynowy, winowy, szczawiowy, masłowy, propionowy, mrówkowy i octowy. Ponadto w miodzie spotyka się ponad 15 innych kwasów, w tym kwasy benzoosowy i pirogronowy [8, 16–18]. Zatem odczyn miodu jest kwaśny, niezależnie od jego geograficznego pochodzenia. Na przykład, wartość pH polskich miodów wynosi od 3,6 do 5,0; indyjskich od 3,7 do 4,4; miodów z Algierii od 3,4 do 4,5, zaś hiszpańskich miodów waha się od 3,6 do 5,0 [19, 20]. Najwyższą kwasowością cechują się miody gryczane, najniższą miody akacjowe i rzepakowe.

Związki azotowe występują w miodzie w niewielkich ilościach, około 0,6%, przy czym zawartość białka nie przekracza 0,5%. Największe jest stężenie albumin i globulin. Mimo, że występują one w minimalnych ilościach ważnymi białkami są enzymy. Pochodzą one głównie z wydzieliny gruczołów ślinowych pszczoł, ale niewielkie ich ilości mogą pochodzić z ziaren pyłku kwiatowego oraz ze spadzi. W miodzie stwierdzono obecność enzymów takich jak:  $\alpha$ - i  $\beta$ -amylazy, katalazy, inwertazy, maltazy, melacytazy, glukooksydazy, fosfatazy i lizozymu [9].  $\alpha$ -Amylaza (diastaza) jest enzymem, który odpowiada za proces hydrolitycznego rozpadu cukrów złożonych. W celu wykrycia przegrzania, fałszowania miodów lub innych niedozwolonych zabiegów, ustalono skalę Schade, która określa aktywność diastazy [16]. Miód zawiera również niewielkie ilości wolnych aminokwasów (do 0,03%), w różnych jego odmianach zidentyfikowano od 11 do 21 (miód wrzosowy) aminokwasów [21].

Związki mineralne występują w miodach w niewielkich ilościach i zależą od jego rodzaju. W miodach nektarowych substancje te stanowią 0,05–0,5%, natomiast w miodach spadziowych około 1%. Miód zawiera zaskakująco niewielką ilość witamin, a ich zawartość jest zmienna i zależy głównie od obecności pyłku kwiatowego i mlecza pszczelego.

Grupę związków decydującą o smaku i aromacie miodu, stanowią składniki olejków eterycznych pochodzące z nektaru. Wyodrębniono z miodu ponad 50 substancji aromatycznych, wśród których najważniejszymi są mono- i seskwiterpeny, wyższe alkohole alifatyczne, aldehydy, ketony, estry i związki polifenolowe.

Rolę barwników, przeciwutleniaczy, insektycydów i fungicydów pełnią związki fenolowe. Należą one do bardzo zróżnicowanej grupy substancji, jakie znajdują się w miodzie. Występują bowiem w postaci prostych związków, pochodnych, flawonoidów, garbników oraz jako glikozydy fenolowe w świeżych miodach. Ponadto,

wyróżnia się jeszcze estry fenolowe, pochodne karbonylowe, fenylopropanoidy, flawonoidy pochodzące z propolisu (kit pszczeli), czy też z nektaru i pyłku.

Właśnie propolis i pyłek stanowią, wraz z sterolami, fosfolipidami i kwasami tłuszczowymi te pozostałe składniki znajdujące w miodach. Ich zawartość na ogół nie przekracza 1%. Na przykład średnia liczba pyłków kwiatowych w gramie miodu wynosi około 3000, a zawartość mleczka pszczelego nie przekracza 1 mg na gram.

Warto wiedzieć, że w miodzie mogą występować substancje toksyczne dla człowieka. Na pierwszym miejscu wymienić należy diterpen andromedotoksynę (miód z azali żółtej), a także alkaloidy takie jak hioscyamina i skopolamina (z białunia indiańskiego), akonityna (z tojadu mocnego) czy kokaina (z krasnodrzewu pospolitego) [8, 22].

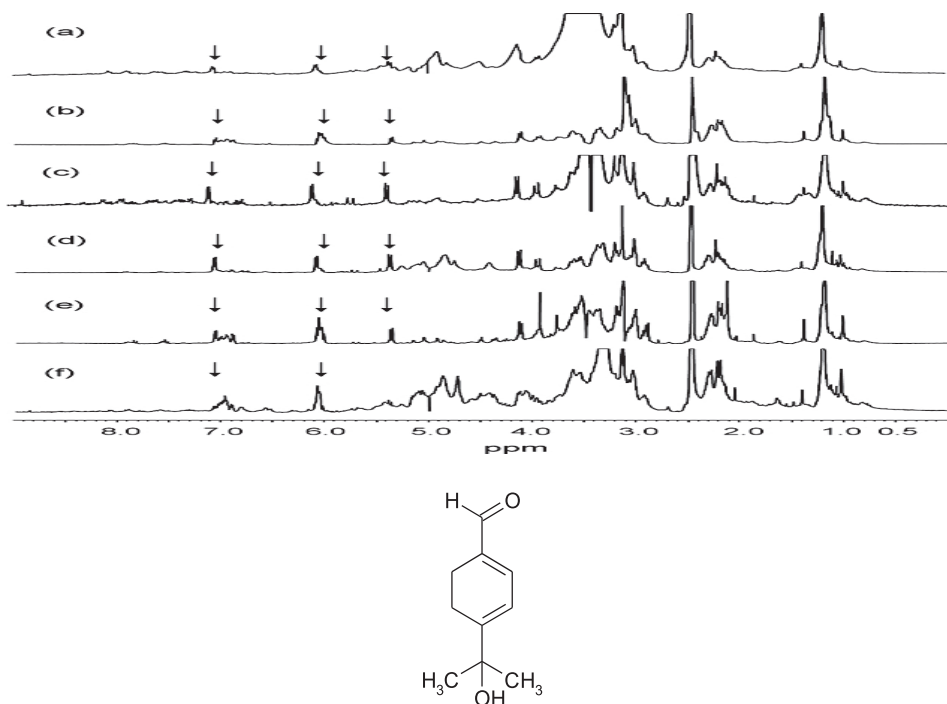
## 2. CHEMICZNE MARKERY MIODÓW ODMIANOWYCH I SPOSOBY ICH IDENTYFIKACJI

W ostatnich kilku latach nastąpił wzrost zainteresowania poszukiwaniem metod analitycznych, które mogą uzupełnić mikroskopową analizę pyłkową w celu określenia geograficznego i botanicznego pochodzenia miodu. Dlatego podejmuje się próby określenia profili chemicznych miodów odmianowych i identyfikacji markerów – substancji charakterystycznych dla danego gatunku miodu.

Markerami odmian miodów mogą być: substancje lotne, produkty rozkładu fenyloalaniny, aromatyczne kwasy karboksylowe i ich estry, produkty degradacji karotenoidów, aromatyczne aldehydy, aminokwasy, związki heterocykliczne oraz związki fenolowe, nietypowe cukry, minerały i pierwiastki śladowe [9]. Zatem są to związki występujące w bardzo niewielkich stężeniach.

Techniką pozwalającą na bezpośrednie badanie miodu jest  $^1\text{HNMR}$ . Jednakże ze względu na wysoką zawartość glukozy i frukozy widma NMR są trudne do interpretacji. Jest to możliwe w zakresie widma gdzie nie występują piki pochodzące od cukrów. Nie mniej jednak końcowa identyfikacja markera i tak wymaga bądź jego wydzielenia i zdefiniowania jego struktury chemicznej, bądź zastosowania indywidualnego związku jako wzorca wewnętrznego [23–26]. Fakt, że analiza takich widm nie jest jednoznaczna dobrze pokazuje Rysunek 3, na którym pokazano widma  $^1\text{HNMR}$  sześciu próbek miodu lipowego [23]. Na podstawie tych widm stwierdzono, że charakterystycznym markerem tego miodu jest nietypowy kwas terpenowy, którego wzór również pokazano na tym rysunku.





Rysunek 3. Widmo  $^1\text{H}$ NMR sześciu próbek miodu lipowego. Strzałkami wskazano sygnały pochodzące od struktury pokazanego obok monoterpenu

Figure 3.  $^1\text{H}$ NMR spectrum of six samples of lime honey. Peaks corresponding to the structure of terpenic compounds shown in this Figure are indicated by arrows

Spektroskopię NMR stosuje się zatem raczej jako technikę pomocniczą. Na przykład została ona użyta jako metoda wspomagająca spektrometrię MS w identyfikacji markerów miodów pochodzących z Korsyki [26]. W wyniku analizy wykorzystującej różnorodne pomiary (1D,  $^1\text{H}$  i 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ; TOCSY) wykryto cztery związki występujące tylko w miodach z tego rejonu geograficznego. Jeden z nich, kwas kynureinowy, został zaproponowany jako charakterystyczny dla miodów z kasztanowca pochodzących z Korsyki.

Jako metod identyfikacji charakterystycznych składników miodów odmianowych znacznie częściej stosuje się spektrometrię masową i techniki chromatograficzne (chromatografia bibułowa, TLC, HPLC czy GC). Ponieważ matryca jaką stanowi miód odznacza się bardzo złożonym składem, a badane związki występują na niskim poziomie stężeń, bardzo ważne jest odpowiednie przygotowanie próbek.

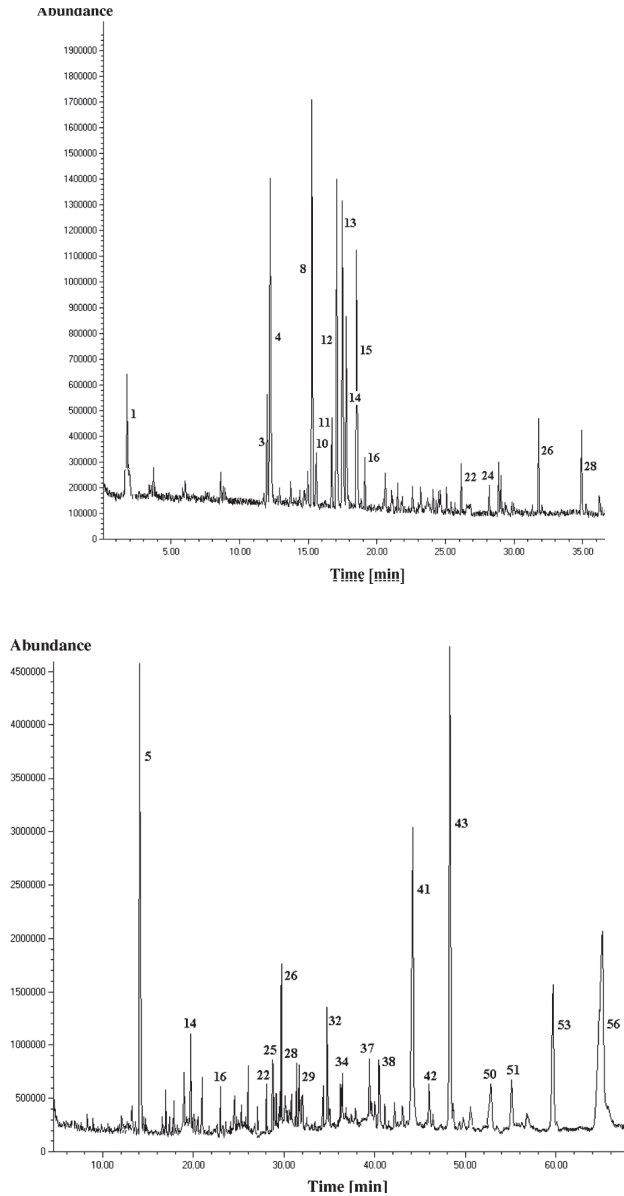
Najstarszą techniką wydzielenia mieszanin związków z miodów jest ekstrakcja, którą prowadzi się w układach: wodny roztwór miodu/rozpuszczalnik organiczny (najczęściej dichlorometan). Ekstrakcję dobrze jest wspomóc ultradźwiękami [27]. Można również ekstrahować miód bez uprzedniego rozpuszczania w wodzie, na przykład w aparacie Soxhleta. Stosowano również techniki kombinowane [28].

I tak, jedna z procedur polegała na wstępnej ekstrakcji miodu acetonem, a następnie zastosowaniu destylacji z parą wodną. Miód koniczynowy z Kanady analizowano używając specjalnie w tym celu skonstruowanej aparatury gdzie izolowanie związków lotnych polegało na jednoczesnej destylacji próbki miodu z parą wodną oraz ekstrakcji krążącego w aparacie rafinatu [29].

Inne sposoby przygotowania próbki polegają na usunięciu cukrów i związków polarnych, czyli rozdzieleniu analitów od matrycy, a następnie zateżeniu badanych związków. W tym celu najczęściej stosuje się technikę ekstrakcji do fazy stałej (ang. *Solid Phase Extraction*, SPE) [30, 31]. Polega ona na tym, że próbkę miodu przepuszcza się przez kolumnkę wypełnioną odpowiednim adsorbentem i przemyma wodą celem usunięcia cukrów i związków polarnych. Badane mieszaniny związków adsorbują się na nośniku skąd wymywane są innym rozpuszczalnikiem, na przykład roztworem wodnym metanolu [30, 31]. W badaniach tych najczęściej używa się jako adsorbenta żywic jonowymiennych typu Amberlite [32, 33]. Oczywiście skład otrzymanej mieszaniny związków jest silnie zależny zarówno od tego jakiego użyć adsorbenta, jak i od tego jakich rozpuszczalników używa się w procesie elucji próbki i jej odzysku z fazy stałej [34].

Mikroekstrakcja do fazy stałej stanowi szybką, bezrozsączalnikową i niedrogą technikę pozwalającą na analizę związków lotnych zawartych w miodach [35–37]. Metoda ta polega na stabilizacji próbki miodu umieszczonej w fiolce – ustala się wtedy równowaga pomiędzy fazą stałą i gazową. Następnie związki lotne adsorbowane są na włóknie szklanym. Po termicznej desorpcji z włókna mieszaninę tych substancji analizuje się za pomocą GC-MS.

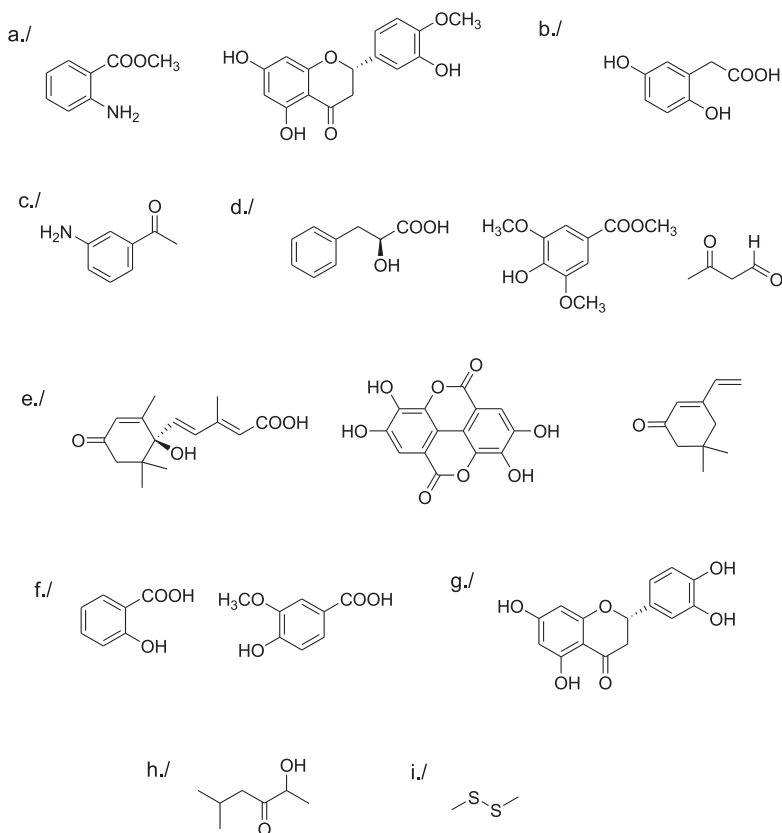
Popularne w ostatnim czasie stało się połączenie dwóch metod: mikroekstrakcji do fazy stałej ze wspomaganą ultradźwiękami ekstrakcją rozpuszczalnikiem, jako wstępne przygotowanie próbek przed analizą GC-MS. Technika tą badano próbki miodów pozyskanych z dwukolczaka śródziemnomorskiego (*Paliurus spina-christi* Mill.), pochodzących z Chorwacji [38]. Mikroekstrakcja do fazy stałej umożliwia bowiem selektywną izolację związków lotnych, zaś ekstrakcja rozpuszczalnikiem pozwala na izolację większej gamy związków o zróżnicowanej polarności. Jak pokazano na Rysunku 4 profil substancji zawartych w tym miodzie uzyskany za pomocą mikroekstrakcji do fazy stałej różni się istotnie od profilu substancji uzyskanego za pomocą ekstrakcji eterem dietylowym [38].



Rysunek 4. Chromatogramy gazowe otrzymane dla substancji lotnych izolowanych z miodu z *Paliurus spina-christi* otrzymanych przez mikroekstrakcję do fazy stałej (lewy panel; włókno PDMS/DVB), oraz przez ekstrakcję mieszaniną pentanu i eteru dietylowego (prawy panel).

Figure 4. Gas-chromatograms obtained for *Paliurus spina-christi* honey after isolation of volatile substances by solid phase microextraction (left panel; PMDS/DVB fiber) and by extraction to mixture of pentane and diethyl ether (right panel)

Tak zwana technika P&T (ang. *purge and trap*) składa się z dwóch operacji realizowanych jednocześnie: wymywania i wychwytywania analitów na złożu stałego sorbenta. Lotne związki organiczne wydziela się z próbki przez przepuszczanie przez nią obojętnego gazu (zazwyczaj jest to hel). Substancje, które znalazły się w fazie gazowej wyłapuje się przepuszczając ten gaz przez kolumnę z sorbentem. Kolumnę z sorbentem desorbuje się termicznie, przemywa gazem obojętnym, który kieruje się na kolumnę chromatograficzną [39].



Rysunek 5. Markery miodów: (a) cytrynowego (antranilan metylu [9] i hesperytyna [40]); (b) drzewa truskawkowego *Arbutus unedo* (kwas homogentyzynowy [24]); (c) z kasztowca (3-aminoacetofenon [12]); (d) manuka (kwas fenylomlekowy, syringinian metylu i metylglioksal [41]); (e) wrzosowego (kwasy abscyzynowy i elagowy [32] oraz 5,5-dimetylo-3-winylocykloheks-2-en-1-on [37,42]); (f) lipowy (kwasy salicylowy i waniliowy [33]); (g) lewandowego (naringenina [43]); (h) eukaliptusowego (2-hydroksy -5-metyloheksan-3-on [39, 44]); (i) rzepakowy (disiarczek dimetylowy [45])

Figure 5. Markers of honeys of: (a) lemon (methyl antranilate [9] and hesperetin [40]); (b) *Arbutus unedo* (homogentisic acid [24]); (c) chesnut (3-aminoacetophenone [12]); (d) *Manuka* (phenylacetic acid, methyl syringate and methylglyoxal [41]); (e) heather (abscisic and ellagic acids [32] and 5,5-dimethyl-3-vinylcyclohex-2-ene-1-one [37, 42]); (f) tilia (salicylic and vanilic acids [33]); (g) lavender (naringenin [43]); (h) eucaliptus (2-hydroxy -5-methylhexan-3-one [39, 44]); (i) rape (dimethyl disulfide [45])

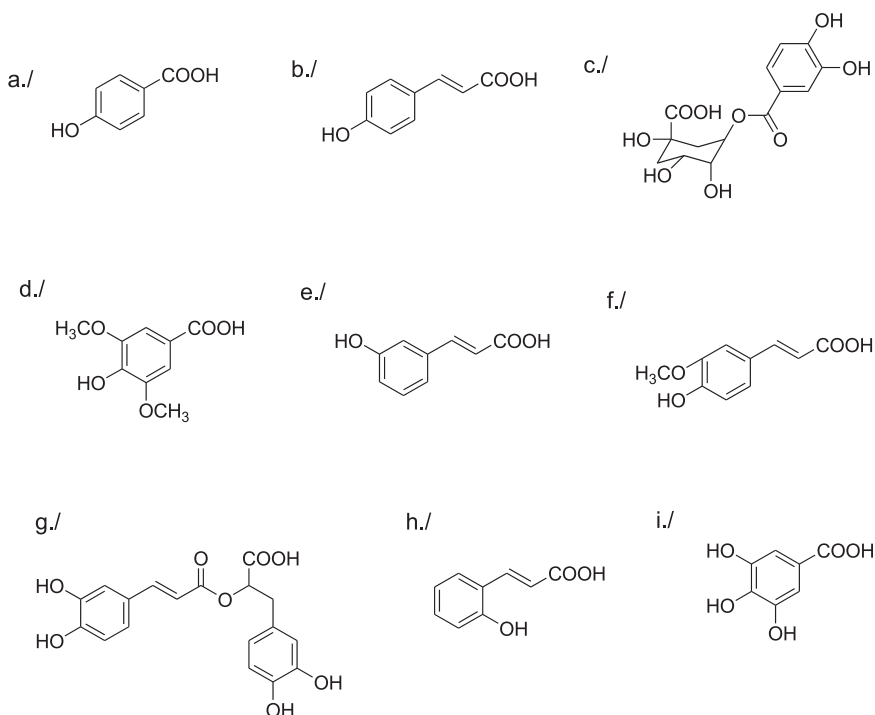
Zastosowanie określonej metody izolacji nigdy nie pozwala na wydzielenie wszystkich substancji zawartych w miodach. Co więcej, rodzaj i skład mieszaniny jest silnie zależny od użytej metody. Dlatego też w różnych pracach poświęconych poszukiwaniom markerów miodów odmianowych znajdowane są często różne substancje pełniące tę funkcję dla tej samej odmiany miodu. Za marker powinno się uznać substancję występującą we wszystkich miodach danej odmiany na określonym terenie. Powinny one występować w znaczącym stężeniu w porównaniu z innymi związkami otrzymanymi po przygotowaniu próbki do pomiarów. Na Rysunku 5 pokazano struktury chemiczne wybranych markerów różnych odmian miodów.

Jak widać na Rysunku 5 markerami miodów odmianowych są raczej proste produkty naturalne. W bardzo nielicznych przypadkach można powiedzieć, że rolę markera pełni jedna substancja występująca tylko i wyłącznie w konkretnej odmianie miodu. Warto zwrócić uwagę, że brak w próbce miodu związku, który występuje powszechnie w miodach wielu odmian jest także dobrym wskaźnikiem konkretnej odmiany. Na przykład w miodach lawendowych nie zauważono obecności, powszechnego w większości innych odmian, 3-metylobutanalu [36].

### 3. PROFILE LOTNYCH ZWIĄZKÓW CHEMICZNYCH JAKO WSKAŹNIKI ODMIAN MIODÓW

Efektem każdej analizy próbki miodu jest widmo otrzymane dowolną techniką (NMR, spektrometria mas, różne techniki chromatograficzne, elektroforeza kapilarna itp.). Takie widmo stanowi profil konkretnej próbki miodu. Jak pokazano na Rysunku 3 widma otrzymane dla poszczególnych próbek tej samej odmiany miodu, choć podobne, różnią się od siebie. Dlatego dopiero analiza serii widm pozwala opracować algorytm wskazujący z jakim miodem mamy do czynienia. Tak więc, jest to typowe badanie metabolomu i dlatego można by tu zastosować techniki chemometryczne [46]. Jak na razie nie stosowano technik metabolomiki do badania jakości miodów.

Klasyczne badania chemii produktów naturalnych polegają na tym, że dokonuje się identyfikacji możliwie jak największej liczby substancji zawartej w badanej mieszaninie, a następnie porównuje ich zawartości w określonych odmianach miodów. Uproszczeniem jest wybranie jednej tylko grupy związków i analiza ich obecności. Na przykład, badania miodów pochodzących z Francji, Grecji, Hiszpanii, Portugalii i Chin, pokazały, że występuje w nich 12 kwasów benzoesowych [43]. We wszystkich badanych miodach występował kwas kawowy, w 9 miodach występował kwas *p*-hydroksybenzoesowy i kwas *p*-kumarowy. Dość często wykrywano kwasy: chlorogenowy, syryngowy, *m*-kumarowy, ferulowy i waniliowy. Rzadko występował kwas *o*-kumarowy i kwas galusowy. Kwas elagowy znaleziono jedynie w miodzie wrzoścowym pochodzącym z Portugalii. Kwas rozmarynowy nie został wykryty w żadnym z badanych miodów. Wzory chemiczne tych kwasów pokazano na Rysunku 6.



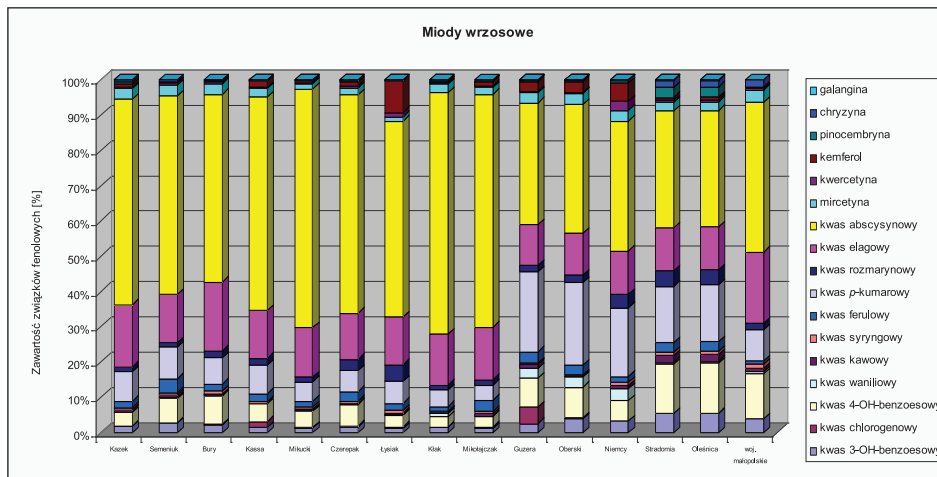
Rysunek 6. Struktury kwasów aromatycznych badanych w pracy [43]: (a) *p*-hydroksybenzoesowy; (b) *p*-kumarowy; (c) chlorogenowy; (d) syringowy; (e) *m*-kumarowy; (f) ferulowy; (g) rozmarynowy; (h) *o*-kumarowy i (i) galusowy. Wzory kwasów elagowego i waniliowego pokazano na Rysunku 5

Figure 6. Structures of aromatic acids studied in Ref. [43]: (a) *p*-hydroxybenzoic; (b) *p*-coumaric; (c) chlorogenic; (d) siringic; (e) *m*-coumaric; (f) ferulic; (g) rosmarinic; (h) *o*-coumaric and (i) gallic. Structures of elagic and vanilic acids are shown in Figure 5

Badając flawonoidy w argentyńskich miodach zidentyfikowano, między innymi, mircetynę, kwercetynę i luteolinę. Związki te były obecne we wszystkich badanych próbkach miodu, a dominującym flawonoidem była kwercetyna, która stanowiła około 45% całkowitej zawartości związków fenolowych. Różnice w zawartościach mircetyny, luteoliny i kwercetyny zależały od warunków klimatycznych i geograficznych Argentyny [47].

Jeszcze lepszym sposobem jest analiza porównawcza zawartości wybranych markerów miodów odmianowych. I tak, badając dolnośląskie miody wrzosowe, za pomocą HPLC określono w każdym z nich relatywne stężenie kwasów benzoowych (3-hydroksybenzoesowy, 4-hydroksybenzoesowy, chlorogenowy, kawowy, elagowy, syringowy, ferulowy, waniliowy, *p*-kumarowy i rozmarynowy), flawonoidów (mircetyna, kwercetyna, kemferol, pinocembryna, chryzyna i galangina), oraz kwasu abscyzynowego. Dla porównania badano też miody wrzosowe pochodzące z województwa małopolskiego i Niemiec [48]. Jak widać na Rysunku 7 wszystkie

z piętnastu analizowanych miodów wrzosowych charakteryzują się zbliżonym profilem związków fenolowych.



Rysunek 7. Relatywne procentowa zawartość badanych związków aromatycznych w miodach wrzosowych  
Figure 7. Relative percent content of studied aromatics in heather honeys

Kwas absycynowy oraz elagowy, charakterystyczne markery miodu wrzosowego, występują w największych stężeniach. W niektórych miodach występują większe zawartości kwasu *p*-kumarowego i 4-hydroksybenzoesowego. Użyteczność tej metody pokazuje dopiero porównanie profili miodów wrzosowych z profilami innych miodów odmianowych. I tak, w miodach lipowych największa jest zawartość pinocembryny, w miodach spadziowych iglastych – kwasu *p*-kumarowego, a spadziowych liściastych – kwasów elagowego, rozmarynowego i 4-hydroksybenzoesowego. Tak więc, zastosowanie jako markerów związków powszechnie występujących w świecie roślin pokazało, że różnice ich względnej procentowej zawartości są dobrym sposobem konstrukcji profili metabolicznych miodów odmianowych. Konstrukcja takich profili dla próbek wielu miodów tej samej odmiany pokazuje uderzające podobieństwa i zdecydowane różnice z profilami innych odmian.

## UWAGI KOŃCOWE

Miód jest bardzo cenionym i najstarszym produktem odżywczym i leczniczym. Roczna produkcja miodu na świecie wynosi około 1,4 milionów ton (FAO, 2005), co stanowi mniej niż 1% całkowitej produkcji cukru. Jest to także produkt stosunkowo drogi. Nie dziwi zatem fakt, że jest on często fałszowany.

Polskie miody cieszą się zasłużoną dobrą opinią. Warto wspomnieć, iż miód wrzosowy pochodzący z Borów Dolnośląskich, dzięki Janowi Biernackiemu (zob. bywca Certyfikatu Unii Europejskiej Nr 1/2008 na „*Miód wrzosowy z Borów Dolnośląskich*”), został wpisany do rejestru Chronionych Nazw Pochodzenia i Oznaczeń Geograficznych Unii Europejskiej [49]. Warto zatem chronić jakość polskich miódów. Pomóc w tym może stworzenie nowego sposobu ich oceny opartego na badaniu markerów odmian tych miódów.

## PODZIĘKOWANIA

Autorzy pragną podziękować Panu Zdzisławowi Zieniewiczowi za zainteresowanie nas problemem jakości miódów i cierpliwe wyjaśnianie zawyłych problemów pszczelarstwa. Dziękujemy również Ministerstwu Nauki i Szkolnictwa Wyższego za finansowanie naszych badań ze środków statutowych.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] B. Kędzia, E. Hołderna-Kędzia, *Leczenie produktami pszczelimi*, Wydawnictwo Rolnicze i Leśne Warszawa 1994.
- [2] J. Lutowski, *Postępy Fitoterapii*, 2001, **4**, 2.
- [3] S. Bogdanov, *Lebensmittel-Wissensch. Technol.*, 1997, **30**, 748.
- [4] E. Hołderna-Kędzia, B. Sędzia, *Miody odmianowe i ich znaczenie lecznicze*, Wydawnictwo Duszpasterstwa Rolników WDR, Włocławek 2002.
- [5] K. Kluczyńska, M. Wasek, *Lek w Polsce*, 2004, **14**, 164.
- [6] D. Teper, Pasieka, 2004, **2**.
- [7] S. Popek, *Food Chem.*, 2002, **79** 401.
- [8] S. Popek, *Studium identyfikacji miódów odmianowych i metodologii oceny właściwości fizykochemicznych, determinujących ich jakość*, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Krakowie, Kraków 2001.
- [9] E. Anklam, *Food Chem.*, 1998, **63**, 549.
- [10] T. Szczęsna, Pasieka, 2003, **1**.
- [11] T. Kokocińska, *Miód: złoty cud natury*, Świat Książki, Warszawa 2009.
- [12] D. Arràez-Román, A.M. Gómez-Caravaca, M. Gómez-Romero, A. Segura-Carretero, *J. Pharm. Biomed. Analysis*, 2006, **41**, 1648.
- [13] L.R. Silva, R. Videira, A.P. Monteiro, P. Valentão, P.B. Andrade, *Microchem. J.*, 2009, **93**, 73.
- [14] S. Ouchemoukh, P. Schweitzer, M. Bachir Bey, H. Djoudad-Kadjji, H. Louaileche, *Food Chem.*, 2010, **121**, 561.
- [15] E. Fuente, M.L. Sanz, I. Martinez-Castro, J. Sanz, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1135**, 212.
- [16] M. Wojtacki M., *Produkty pszczele i przetwory miodowe*, PWRiL, Warszawa 1970.
- [17] S. Suarez-Luquea, I. Mato, J.F. Huidobro, J.S. Simal-Lozano, M.T. Sancho, *J. Chromatogr. A*, 2002, **955**, 207.
- [18] I. Mato, J.F. Huidobro, J.S. Simal-Lozano, M.T. Sancho, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 1541.
- [19] S. Saxena, S. Gautam, A. Dharma, *Food Chem.*, 2010, **118**, 391.



- [20] M. Madejczyk, A. Kanecka, D. Barańkiewicz, *Analityka*, 2006, **4**, 28.
- [21] L. Castro-Vázquez, M.S. Pérez-Coello, M.D. Cabezudo, *Chromatographia*, 2003, **57**, 227.
- [22] M.E. Zujko, A.M. Witkowska, A. Łapińska A., *Bromat Chem. Toksykol.*, 2005, **38**, 7.
- [23] G. Beretta, E. Caneva, L. Regazzoni, B.N. Golbamaki, F.R. Maffei, *Anal. Chem. Acta*, 2008, **620**, 176.
- [24] P. Cabras, A. Angioni, C. Tuberoso, L. Floris, F. Reniero, C. Guillou, S. Ghelli, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 4064.
- [25] A.M. Gómez-Caravaca, M. Gómez-Romero, D. Arràez-Romàn, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006, **41**, 1220.
- [26] J.A. Donarski, S.A. Jones, M. Harrison, M. Driffield, A.J. Charlton, *Food Chem.*, 2010, **118**, 987.
- [27] E. Alissandrakis, P.A. Tarantilis, C. Pappas, P.C. Harizanis, M. Polissiou, *Eur. Food Res. Technol.*, 2009, **229**, 365.
- [28] V. Kaškonienė, P.R. Venkūtonis, *Comrehens. Ri. Food Safety*, 2010, **9**, 620.
- [29] A. Bouseta, S. Collin, *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 1890.
- [30] N. Gheldof, X.-H. Wang, N. Engeseth, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 5870.
- [31] K. Pyrzyńska, M. Biesaga, *Trends Anal. Chem.*, 2009, **28**, 893.
- [32] I. Martos, M. Cossentini, F. Ferreres, F.A. Tomás-Barberá, *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 2824.
- [33] V.A. Isidorov, U. Czyżewska, E. Jankowska, S. Bakier, *Food Chem.*, 2011, **124**, 387.
- [34] A. Michałkiewicz, M. Biesaga, K. Pyrzyńska, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1187**, 18.
- [35] K.A. Aliferis, P. Tarantilis, P.C. Harizanis, E. Alissandrakis, *Food Chem.*, 2010, **121**, 856.
- [36] E. Majewska, A. Delmanowicz, *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **5**, 247.
- [37] A.C. Soria, J. Sanz, I. Martínez-Castro, *Eur. Food Res. Technol.*, 2009, **228**, 579.
- [38] I. Jerković, C.I.G. Tuberoso, Z. Marijanović, M. Jelić, A. Kasum, *Food Chem.*, 2009, **112**, 239.
- [39] A.C. Soria, I. Martínez-Castro, J. Sanz, *Food Res. Int.*, 2008, **41**, 838.
- [40] I. Martos, M. Cossentini, F. Ferreres, F.A. Tomás-Barberá, *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 2824.
- [41] R.J. Weston, L.K. Broclevbank, L. Yinrong, *Food Chem.*, 2000, **70**, 427.
- [42] L. Castro-Vázquez, M.C. Díaz-Maroto, M.A. González-Viñas, M.S. Pérez-Coello, *Food Chem.*, 2009, **112**, 1022.
- [43] P. Andrade, F. Ferreres, M.I. Gil, F.A. Tomas-Barbera, *Food Chem.*, 1997, **60**, 79.
- [44] I. Jerković, Z. Marijanović, J. Kezić, M. Gugić, *Molecules*, 2009, **14**, 2717.
- [45] B.S. Radovic, M. Carreri, A. Mangia, M. Musci, M. Gerboles, *E. Anslam. Food Chem.*, 2001, **75**, 511.
- [46] Z. Pan, H. Gu, D. Raftery, *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, 2008, str. 1–13.
- [47] M.O. Iurlin, A.I. Saiz, R. Fritz, M.D. Manrique, *Food Chem.*, 2009, **115**, 1141.
- [48] I. Jasicka-Misiak, A. Poliwoda, M. Dereń, P. Kafarski, *Food Chem.*, w druku.
- [49] J. Baczyński, *Pasieka*, 2, 2010.

Praca wpłynęła do Redakcji 2 września 2011

