

Magdalena BYTNIEWSKA, 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: bkg@onet.eu

Właściwości antyoksydacyjne miodów wyznaczone za pomocą HPLC-ED

Streszczenie: *Celem pracy było wstępne zbadanie możliwości oznaczenia właściwości przeciwutleniających miodów oraz miodów pitnych. Oznaczenie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (CPA) miodów, wykonano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją elektrochemiczną. Miara CPA było sumaryczne pole powierzchni wszystkich pików zarejestrowanych podczas ich anodowego utleniania.*

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

Antioxidative properties of honeys determined using HPLC-ED assay

Abstract: *The aim of the study was to investigate the possibility of determination of antioxidative properties of honeys and meads. The total antioxidant potential (TAP), was performed using high performance liquid chromatography with electrochemical detection. TAP measure was the total area of all peaks recorded during their anodic oxidation.*

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

1. Wstęp (Introduction)

Natura wolnych rodników i antyoksydantów oraz ich wpływ na organizm ludzki, od połowy XX wieku, stały się częstym tematem badań. Potwierdzeniem tego zainteresowania była nagroda Nobla przyznana w 1956 roku C. Hinshelwoodowi i N.N. Siemionowem za studia nad mechanizmem powstawania wolnych rodników. Obecnie uważa się, że wolne rodniki pełnią dwojaką rolę w organizmie, szczególnie te tlenowe, mogą być przyczyną wielu chorób a nawet obarcza się je odpowiedzialnością za starzenie się organizmu. Z drugiej strony jednak biorą one udział w wielu mechanizmach wewnątrzkomórkowych, np. pełnią funkcje przekaźników sygnałów [1].

Metabolizm tlenowy wykształcony w toku ewolucji pozwolił na dużo bardziej wydajne wykorzystanie energii wiązań chemicznych, umożliwiając w ten sposób powstanie nowych, bardziej skomplikowanych pod względem budowy organizmów. W trakcie oddychania tlenowego tlen cząsteczkowy powinien ulec całkowitej redukcji do 2 cząsteczek wody, przyłączając 4 protony i 4 elektrony. Jednakże nie zawsze tak się dzieje, a skutkiem niepełnej redukcji tlenu są RFT, powstające w kolejnych etapach redukcji tlenu [2]. W procesie tym ważną rolę pełnią enzymy antyoksydacyjne (katalizatory tych przemian) takie jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) czy peroksydaza glutationowa (GS-Px) [1]. WR i RFT mogą być generowane wewnątrz komórek, najważniejszym miejscem ich powstawania są mitochondria (organelle komórkowe, w których zachodzi proces oddychania komórkowego) bądź powstawać pod wpływem czynników zewnętrznych.

Żywe organizmy w toku ewolucji wykształciły mechanizmy broniące przed szkodliwymi zmianami wolnorodnikowymi. Żywność pochodzenia roślinnego jest bogatym źródłem zarówno substancji odżywczych jak i związków o właściwościach przeciwutleniających. Również popularne napoje takie jak: herbata, wino czy kakao są bardzo bogate w fenolowe fito-związki [3]. Najważniejsze znaczenie, jeżeli chodzi o antyoksydanty pochodzenia roślinnego, mają związki polifenolowe (kwasy fenolowe i pokaźna grupa flawonoidów wraz z antocyjanami), witaminy: A, C, tokoferole, karotenoidy, kwasy organiczne oraz biopierwiastki (np. wapń i selen) [4,5].

W literaturze opisane są metody pozwalające na oznaczenie stężenia zarówno wolnych rodników jak i antyoksydantów [1,2,6-8]. Nie we wszystkich próbkach skład antyoksydantów jest znanych. Niektóre z nich wykazują efekty synergiczne i/lub mogą między sobą reagować. W miodzie charakterystyczne na przykład jest współdziałanie flawanoidów z α -tokoferolem, powodujące wzrost mocy antyoksydacyjnej układu. Dlatego czasami korzystne jest oznaczenia sumarycznego stężenia wszystkich antyoksydantów czy wszystkich wolnych rodników, która pozwala ocenić moc układu antyoksydacyjnego oraz rozmiar stresu oksydacyjnego [1,9,10].

Miód od zamierzchłych czasów był uważany za źródło zdrowia. Już uczestnicy starożytnych olimpiad przed zawodami wzmacniali się porcją miodu, a przez długie wieki był on niezastąpionym środkiem wspomagającym gojenie ran. Również w Polsce był często stosowany. Jest naturalnym produktem pszczelim. Podstawowymi jego surowcami są nektary roślinne występujące w miodnikach, czyli gruczołach cukrowych ukrytych wewnątrz kwiatu oraz spadź. Spadź jest to substancja wydzielana przez mszyce i czerwy, zawierająca głównie niestrawione cukry [11]. W miodach wykryto ponad 300 różnych substancji [12]. Głównymi ich składnikami są monosacharydy, glukoza i fruktoza. Wszystkie węglowodany stanowią średnio 77% całego składu miodu.

Wosk pszczeli jest naturalnym tłuszczowcem wydzielanym przez gruczoły woskowe młodych pszczół robotnic. Postać płynna zastyga na powierzchni płytek chitynowych odwłoka. Początkowo jest to przezroczysta łuseczka woskowa, która wykorzystywana jest jako materiał do budowy plastrów. Barwa plastrów z czasem ulega zmianie i uzależniona jest to od jakości surowca i sposobu jego przetworzenia. Początkowo jest biały, zmienia się na żółty lub nawet ciemnobrązowy ze wzrostem stężenia pyłku kwiatowego i propolisu (kitu pszczelego). W ulu wosk pszczeli nabiera szczególnej woni miodu (wyczuwalny jest również zapach kitu pszczelego). Składa się on z węglowodorów, alkoholi, wolnych kwasów (palmitynowy, mirycylowy, cerylowy, melisowy), estrów, polifenoli (małe stężenia) [13], itp. Wosk pszczeli stosowany był już w starożytności do otrzymywania odlewów. Stosowany też był do ochrony przed szkodliwym działaniem wody. W czasach średniowiecznych wykorzystywany był na przykład do produkcji łuków. Obecnie 60% produkcji wosku pszczelego wykorzystuje przemysł kosmetyczny i farmaceutyczny.

2. Część eksperymentalna (Experimental)

2.1. Aparatura (Instrumentation)

W pracy użyto zestaw wysokosprawnego chromatografu cieczowego (Knauer, Niemcy): butlae na eluent, moduł Smartline Manager 5000 zawierający degazer, pompa dwufunkcyjna Smartline 1000 (zakres

przepływu 0,001–50 ml/min), mieszadło magnetyczne, autosampler, lub dozownik o objętości pętli 20 µl, kolumna COSMOSIL 5 µm, 4,6x150 mm, 5C18-MS-II, detektor elektrochemiczny EC3000 (elektroda pracująca – elektroda z węgla szklatego, elektroda odniesienia - Ag/AgCl, elektroda pomocnicza - Pt), detektor UV/VIS z matrycą diodową (DAD) Smartline 2600, oprogramowanie do przetwarzania i obróbki danych Clarity Chrom V 2.6 2007 oraz Eurochrom 2000, odbieralnik fazy ruchomej. Pomiar fotometryczny wykonano na fotometrze Helios Epsilon (Thermo Spectronic, USA). pH mierzono na pH-metrze OP-208/1 (RADELKIS, Budapeszt, Węgry).

2.2. Odczynniki (Reagents)

W badaniach stosowano kwas 4-hydroksybenzoesowy (*p*-HBA) i 3,4-dihydroksybenzoesowy (3,4-DHBA), metanol czysty do HPLC, 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH) i siarczan(VI) żelaza(II) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), diwodorooortofosforan sodu, wodorooortofosforan potasu, brom, wolframian sodowy, molibdenian sodowy, węglan sodowy bezw., 85% kwas orto-fosforowy, siarczan litu i 3% nadtlenuk wodoru (POCh, Gliwice, Polska) oraz wodorotlenek sodu (Chempur, Piekary Śląskie, Polska).

2.3. Materiał badawczy (Samples)

Miody (lipowy, akacjowy, wielokwiatowy, gryczany oraz spadziowy) pochodziły z pasieki „Pod wiązami” (Siedlce, Polska). Do badań były rozcieńczane w stosunku 1:10 (10 mg/ml) i przesączone przez nylonowy sączek.

Roztwory otrzymywano z wody trójrotnie destylowanej z kwarcu. Roztwory miodów (0,1g/ml) były przesączone przez sączek nylonowy o grubości 0,45 µm.

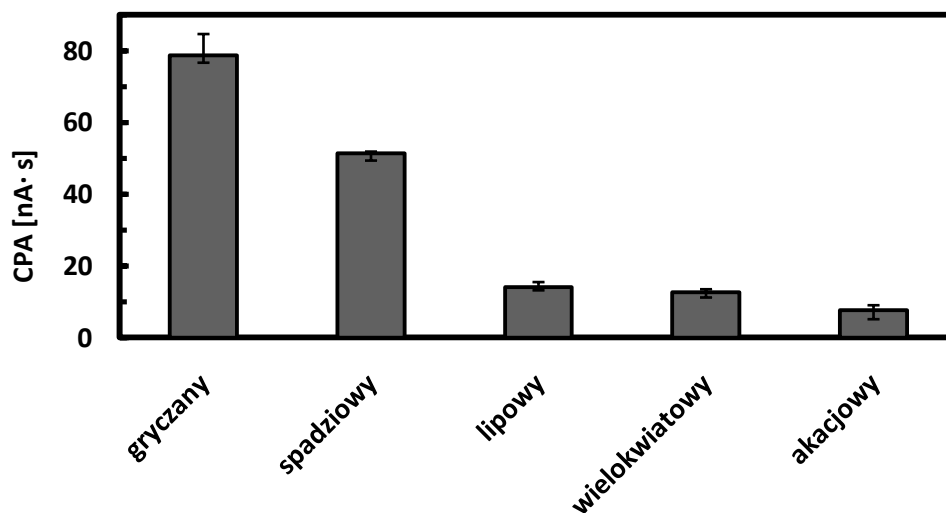
2.4. Warunki pomiarowe (Procedures)

Pomiary chromatograficzne przeprowadzono w układzie faz odwróconych (RP–C18) stosując bufor fosforanowy (pH 6,6) jako fazę ruchomą. W pomiarach zastosowano detektor elektrochemiczny w zakresie potencjału, $E = 0 \div 1,2$ V. Czas trwania analizy wynosił 30 min.

Miarą CPA jest sumaryczna powierzchnia pików chromatograficznych obserwowanych w zakresie anodowym elektrody pracującej. Pomiar wykonywano w układzie faz odwróconych przy dodatnich potencjałach elektrody w zakresie od 0V do 0,8V, a czas analizy wynosił 30 min. Jako fazę ruchomą zastosowano bufor fosforanowy o pH 6,6; nastrzyk próbki miodu (1mg/ml) - 20 µl. Oznaczenia wykonane były z wykorzystaniem detektora elektrochemicznego z elektrodą pracującą z węgla szklatego, elektrodą odniesienia - Ag/AgCl i elektrodą pomocniczą - Pt.

3. Wyniki i dyskusja (Results and discussion)

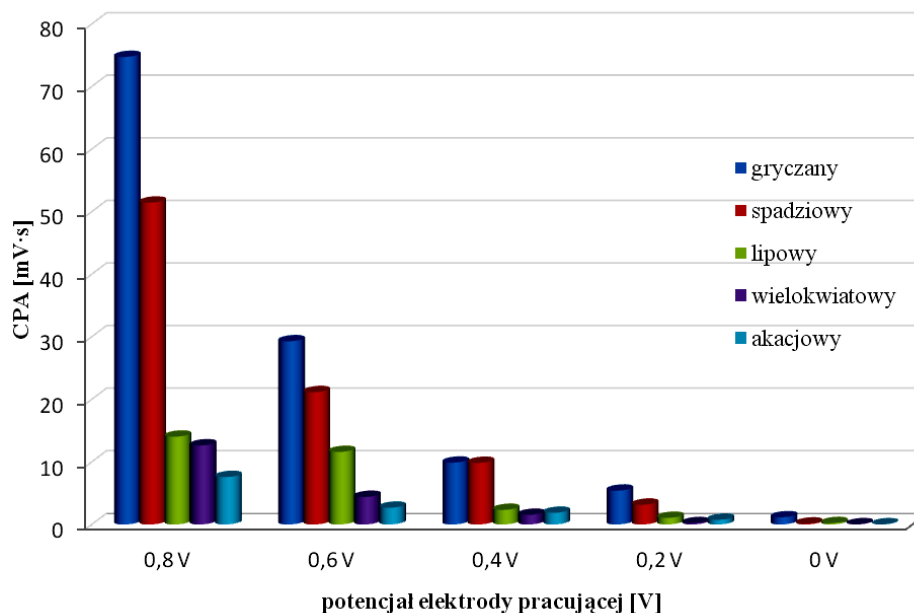
Antyoksydanty utleniane są na powierzchni elektrody. Zmieniając napięcie można uzyskać informacje tylko o mocnych bądź sumie mocnych i słabych antyoksydantach zawartych w próbce. Przy niskich potencjałach reakcji ulegają związki o silnych właściwościach redukujących, a przy wyższych potencjałach obserwujemy działanie zarówno tych słabszych jak i silnych przeciwutleniaczy. Charakterystyczna dla miodów jest duże sumaryczne pole powierzchni pików przy wysokim potencjale. Świadczy to o obecności znacznych ilości słabych przeciwutleniaczy, nie dających sygnałów przy niskich potencjałach. CPA miodów przy $E = 0,8$ V ilustruje Rys. 1.



Rys. 1. CPA 1 mg/ml miodów wyznaczone dla potencjału elektrody pracującej 0,8 V. Warunki chromatograficzne: kolumna - COSMOSIL 5 μ m, 4,6x150 mm, 5C18-MS-II, faza ruchoma - bufor fosforanowy pH 6,6, szybkość przepływu - 1 ml/min, detektor elektrochemiczny (elektroda odniesienia - Ag/AgCl).

Fig. 1. TAP values of 1 mg/ml honeys obtained at 0.8V. Experimental conditions: column - COSMOSIL 5 μ m, 4,6x150 mm, 5C18-MS-II, mobile phase - phosphate buffer pH 6.6, flow rate - 1 ml/min, amperometric detection (reference electrode - Ag/AgCl).

Największe CPA otrzymano dla miodów, gryczanego i spadziowego. Oba te miody mają charakterystyczną ciemną barwę, co sugeruje wysokie stężenie polifenoli, np. flawonoidów z których większość zalicza się do antyoksydantów. Wartości CPA uzyskane przy potencjale 0,2 V sugerują, że największe stężenia silnych antyoksydantów występuje w miodzie gryczanym, najniższe w akacjowym (Rys. 2). Ze zmianą potencjału proporcje te niewiele się zmieniają (Rys. 2). Można więc stwierdzić, że miód gryczany zawierają największe stężenia zarówno silnych jak i słabych antyoksydantów.



Rys. 2. CPA miodów o stężeniu 1 mg/ml z pasieki „Pod więzami” w funkcji potencjału elektrody pracującej. Warunki chromatograficzne jak na Rys. 1.

Fig. 2. Dependence of TAP values of 1 mg/ml honeys from apiary „Pod więzami” on the working electrode potential. Experimental conditions as on Fig. 1.

Literatura (References)

1. B.K. Głód, P. Piszcz, I. Kiersztyn, A. Lamert, P. Zarzycki, *Zastosowanie HPLC do oznaczania wolnych rodników, antyoksydantów oraz całkowitego potencjału antyoksydacyjnego*, *Cam. Sep.*, 1(2009)41-66.
2. Q. Chen, E.J. Vazquez, S. Moghaddas, C.L. Hoppel, E.J. Lesnefsky, *Production of reactive oxygen species by mitochondria*, *J. Biol. Chem.*, 278(2003)36027-36031.
3. M.S. Fernandez-Pachon, D. Villano, M.C. Garcia-Parrilla, A.M. Troncoso, *Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition*, *Anal. Chim. Acta*, 513(2004)113–118.
4. B. Maniak, Z. Targowski, *Przeciwutleniacze naturalne występujące w żywności*. *Przem. Ferm.*, 4(1996)7-10.
5. A. Szajek, J. Borowska, *Właściwości przeciwutleniające żywności pochodzenia roślinnego*, *Żywność. Nauka Techn. Jakość*, 4(2004)5-28.
6. B.K. Głód, E. Olszewska, P. Piszcz, *Wolne rodniki a stres oksydacyjny*, *Tłuszcze Jadalne*, 41(2006)254-263.
7. A. Łuszczewski, E. Matyska-Piekarska, J. Trefler, I. Wawer, J. Łacki, P. Śliwińska-Stańczyk, *Reaktywne formy tlenu: Znaczenie w fizjologii i stanach patologii organizmu*, *Reumatologia*, 45(2007)284–289.
8. T. Laskowska-Kmita, *Wolne rodniki tlenowe i obrona przeciwutleniająca*, *Med. Wieku Rozw.*, 1(1997)43-5.
9. C. Buhmann, S. Arlt, A. Kontush, T. Moller-Bertram, S. Sperber, M. Oechsner, M. Stuerenburg, U. Beisiegel, *Plasma and CSF markers of oxidative stress are increased in Parkinson's disease and influenced by antiparkinsonian medication*, *Neurobiol. Diseases.*, 15(2004)160-170.
10. A. Rehman, M. Whiteman, B. Halliwell, *Scavenging of hydroxyl radicals but not of peroxynitrite by inhibitors and substrates of nitric oxide synthases*, *British J. Pharmacol.*, 122(1997)1702-1706.
11. L. Bornus, *Miód pszczoły od producenta do konsumenta*, PWRiL, Poznań 1986.
12. J.W. White, *Composition of honey*, w E. Crane, red., *Honey: A comprehensive survey*, str. 157-158, Heinemann, London 1979.
13. R.J. Weston, *The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review*. *Food Chem.*, 71(2000)235–239.
14. B.K. Głód, J. Strosznajder, *Wolne rodniki w starzeniu się mózgu i innych procesach biologicznych*, w M.J. Kossakowski, J. Strosznajder, red., *Mózg a starzenie*, Oświata UN-O, Warszawa 2001.