# STRESZCZENIE


## Charakterystyka aktywności antyoksydacyjnej krajowych miodów odmianowych

W ostatnich latach coraz większe zainteresowanie środowiska naukowego zyskują związki fenolowe, które powszechnie występują w produktach roślinnych. Charakteryzują się one cennymi właściwościami przeciwutleniającymi, wpływającymi na procesy zachodzące w komórkach organizmu człowieka, m.in. przeciwdziałają niekorzystnym zmianom związanym z procesami starzenia. Związki te są odpowiedzialne za uszczelnianie i wzmacnianie naczyń krwionośnych, obniżają ciśnienie, wykazują własności antybiotyczne, działanie przeciwalergiczne i przeciwzakrzepowe, biorą udział w budowie i wzmacnianiu układu immunologicznego.

Właściwości antyoksydacyjne krajowych miodów odmianowych oraz dokładny skład związków fenolowych odpowiedzialnych za ich właściwości antyoksydacyjne nie były do tej pory scharakteryzowane w sposób szczegółowy, w oparciu o dużą liczbę powtórzeń dla poszczególnych odmian. Literatura przedmiotu dotyczy głównie badań całkowitej zawartości związków fenolowych oraz właściwości przeciwutleniających (antyoksydacyjnych) w oparciu o techniki spektrofotometryczne. Rozwój nowych metod analitycznych z wykorzystaniem różnych technik chromatograficznych i metod detekcji pozwala na coraz dokładniejszy rozdział poszczególnych grup związków aktywnych biologicznie znajdujących się w miodzie, a co za tym idzie na dokładniejszą identyfikację związków o właściwościach przeciwutleniających w tym produkcie pszczelim.

Celem badań wykonanych w ramach niniejszej pracy było uzupełnienie charakterystyki krajowych miodów odmianowych o właściwości antyoksydacyjne i skład jakościowy i ilościowy kwasów fenolowych i flawonoidów. Łącznie w latach 2011-2015 oraz 2017-2018 przebadano 286 próbek miodów krajowego pochodzenia należących do następujących odmian: akacjowego (48), rzepakowego (55), nawłociowego (11), faceliowego (29), lipowego (46), wrzosowego (29), gryczanego (36), nektarowo-spadziowego (10) oraz spadziowego ze spadzi liściastej (11) i spadziowego ze spadzi iglastej (11). Badania objęły analizy właściwości antyoksydacyjnych wobec rodnika DPPH i całkowitej zawartość związków fenolowych metodą Folina-Ciocalteu oraz jakościowego i ilościowego składu związków fenolowych techniką HPLC-DAD. W pierwszym etapie dopracowano zastosowane w pracy metodyki badawcze oraz przeprowadzono ich walidację.

Wykonana mikroskopowa analiza pyłkowa potwierdziła pochodzenie botaniczne próbek miodów odmianowych nektarowych. Do klasyfikacji miodów spadziowych wykorzystano badania przewodności elektrycznej właściwej.

Wyniki badań aktywności antyoksydacyjnej dowiodły, że najwyższą zdolność do dezaktywacji rodnika DPPH wykazywały miody ciemne, takie jak: miód spadziowy ze spadzi iglastej (90,9%), miód spadziowy ze spadzi liściastej (84,0%), a w obrębie miodów nektarowych miód gryczany (89,0%) i wrzosowy (52,1%). Miody jasne, takie jak: miód faceliowy (19,2%), akacjowy (20,3%) oraz nawłociowy (24,1%), posiadały dużo niższą zdolność do dezaktywacji rodnika DPPH. Aktywność antyoksydacyjna wykazała dużą zmienność w obrębie każdej z badanych odmian miodu. Największa zmienność wystąpiła dla miodu nawłociowego, a najmniejsza dla miodu spadziowego ze spadzi iglastej i liściastej oraz miodu gryczanego.

W podobny sposób, jak przy aktywności antyoksydacyjnej, na wynik badania całkowitej zawartości związków fenolowych miało znaczenie pochodzenie botaniczne miodu (odmiana miodu). Całkowita zawartość zawiązków fenolowych w ciemnych miodach odmianowych (gryczanym - 127,0 GAE/100 g, spadziowym ze spadzi iglastej - 95,6 GAE/100 g, wrzosowym - 81,3 GAE/100 g) była wyższa w porównaniu z ich zawartością w jasnych miodach odmianowych (faceliowym - 18,6 GAE/100 g, akacjowym - 19,5 GAE/100 g, rzepakowym - 24,8 GAE/100 g). Parametr ten wykazywał największą zmienność dla miodu gryczanego (CV – 37,1%), a najmniejszą dla miodu nawłociowego (CV=15%).

Wykazano istotną silną dodatnią korelację (r=0,798) między aktywnością antyoksydacyjną wobec rodnika DPPH, a całkowitą zawartością związków fenolowych oznaczonych metodą Folina-Ciocalteu.

Badania składu związków fenolowych techniką HPLC-DAD wykazały, że miody odmianowe różniły się również składem jakościowym i ilościowym kwasów fenolowych i flawonoidów. We wszystkich badanych odmianach zidentyfikowano i oznaczono ilościowo następujące kwasy fenolowe: wanilinowy, kawowy, p-kumarowy, trans-ferulowy, salicylowy oraz aldehyd wanilinę, a z flawonoidów pinocembrynę i chryzynę. Hesperydyny nie wykryto jedynie w miodzie akacjowym, rutyny w miodzie wrzosowym, a akacetyny w miodzie gryczanym oraz w miodzie spadziowym ze spadzi liściastej i iglastej. Luteolina, kwercetyna, hesperetyna, kemferol, izoramnetyna zostały wykryte tylko w niektórych odmianach miodu. Luteolina znajdowała się w miodzie lipowym oraz spadziowym ze spadzi liściastej i iglastej; kwercetyna - w miodzie lipowym,

nawłociowym, gryczanym, spadziowym ze spadzi iglastej i spadziowym ze spadzi liściastej; hesperetyna - w miodzie lipowym, wrzosowym, gryczanym, nawłociowym i spadziowym ze spadzi liściastej; kemferol – w miodzie rzepakowym, lipowym, faceliowym i nawłociowym; izoramnetyna – w miodzie spadziowym ze spadzi iglastej i ze spadzi liściastej oraz w miodzie akacjowym, rzepakowym, lipowym, faceliowym.

W grupie kwasów fenolowych najwyższe zawartości oznaczono dla kwasu salicylowego, od 30,3 µg/100 g w miodzie akacjowym do 483,2 µg/100 g w miodzie spadziowym ze spadzi iglastej. Zawartość tego kwasu charakteryzowała się dużą zmiennością w obrębie każdej z badanych odmian miodu. Współczynnik zmienności wynosił od 51,0% dla miodu spadziowego ze spadzi iglastej do 171,4% dla miodu rzepakowego. Najniższe zawartości oznaczono dla kwasu kawowego, od 87,1 µg/100 g (w miodzie faceliowym) do 197,0 µg/100 g (w miodzie nawłociowym). Suma zawartości kwasów fenolowych wynosiła od 581,6 µg/100 g (w miodzie akacjowym) do 1362,8 µg/100 g (w miodzie spadziowym ze spadzi iglastej). Miody spadziowe (spadziowy ze spadzi liściastej, spadziowy ze spadzi iglastej i nektarowo-spadziowy) i miód nawłociowy posiadały istotnie wyższą zawartość sumy kwasów fenolowych (1066,4-1362,8 µg/100 g) w porównaniu z niektórymi odmianami miodu nektarowego, tj. akacjowego, rzepakowego, faceliowego i gryczanego (suma zawartości kwasów fenolowych 581,6-667,4 µg/100 g).

W grupie flawonoidów najwyższe zawartości oznaczono dla hesperydyny, od 45,8 µg/100 g (w miodzie nektarowo-spadziowym) do 890,4 µg/100 g (w miodzie rzepakowym). Zawartość tego flawonoidu charakteryzowała się dużą zmiennością w obrębie każdej z badanych odmian miodu. Współczynnik zmienności wynosił od 58,0% (dla miodu wrzosowego) do 175,9% (dla miodu spadziowego ze spadzi liściastej). Najniższe zawartości oznaczono dla akacetyny, od 16,5 µg/100 g (w miodzie lipowym) do 103,0 µg/100 g (w miodzie akacjowym). Suma zawartości flawonoidów wynosiła od 418,4 µg/100 g (w miodzie wrzosowym) do 1500,1 µg/100 g (w miodzie rzepakowym). Różnice zarówno we właściwościach antyoksydacyjnych, jak i w składzie związków fenolowych krajowych miodów odmianowych można tłumaczyć zróżnicowaniem pożytku nektarowego i spadziowego towarzyszącemu głównemu pożytkowi w miejscu usytuowania pasiek, z których zostały pozyskane próbki do badań.

Przeprowadzone badania pozwoliły na uzupełnienie charakterystyki fizykochemicznej krajowych miodów odmianowych o właściwości antyoksydacyjne i całkowitą zawartość związków fenolowych oraz o jakościowy i ilościowy skład kwasów

fenolowych i flawonoidów. Charakterystyka ta może być wykorzystana do wyznaczenia wymagań normatywnych w ocenie wartości biologicznej miodu. Opracowana metoda oznaczania związków fenolowych w miodzie techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem z matrycą fotodiodową (HPLC-DAD) może znaleźć zastosowanie w laboratoriach kontrolnych zajmujących się oceną jakości i wartości biologicznej miodu i innych produktów pszczelich. Udokumentowane właściwości antyoksydacyjne mogą być wykorzystane podczas promocji miodów odmianowych krajowego pochodzenia, co może przełożyć się na rozszerzenie możliwości wykorzystania miodu w dietetyce i żywieniu ludzi. Pozyskiwanie zaś większych ilości miodów odmianowych w krajowych pasiekach zwiększy korzyści ekonomiczne polskich pszczelarzy.

# SUMMARY

**Characteristics of the antioxidant activity of domestic varietal honeys**

During last years, scientific community has been gaining more and more interest in phenolic compounds, commonly found in plant products. They are characterized by valuable antioxidant properties, affecting processes taking place in the human body cells, e.g. counteracting unfavourable changes associated with the aging processes. These compounds are responsible for tightening and strengthening blood vessels, lowering blood pressure, have antibiotic, anti-allergic and anti-thrombotic properties, and are involved in building and strengthening the immune system.

The antioxidant properties of domestic varietal honeys and the exact composition of phenolic compounds responsible for their antioxidant properties have not been characterized in detail so far, based on a large number of repetitions for individual varieties. The literature on the subject concerns mainly on the studies of the total content of phenolic compounds and antioxidant properties based on the spectrophotometric techniques. Development of a new analytical procedures using various chromatographic techniques and detection methods allows for more accurate separation of individual groups of biologically active compounds found in honey, and thus for more accurate identification of compounds with antioxidant properties in this bee product.

The aim of the research carried out as part of this work was to supplement the characteristics of domestic varietal honeys with antioxidant properties and the qualitative and quantitative composition of phenolic acids and flavonoids. In total, during 2011-2015 and 2017-2018 years, 286 samples of domestic origin honey belonging to the following varieties were tested: acacia (48), rape (55), goldenrod (11), phacelia (29), linden (46), heather (29) buckwheat (36), nectar-honeydew honey10), deciduous honeydew honey (11) and coniferous honeydew honey (11). The research included analyses of antioxidant properties against the DPPH radical and the total content of phenolic compounds using the Folin-Ciocalteu method and the qualitative and quantitative composition of phenolic compounds using the HPLC-DAD technique. The first stage included refinement and validation of the research methodologies used in the below study.

The microscopic pollen analysis confirmed the botanical origin of the varietal nectar honey samples. The tests of electrical conductivity were used to classify honeydew honeys.

The results of the antioxidant activity tests showed that the highest ability to deactivate the DPPH radical was shown by dark honeys, such as: coniferous honeydew honey (90.9%), deciduous honeydew honey (84.0%), and in the case of nectar honeys, buckwheat honey (89.0%) and heather honey (52.1%). Pale honeys, such as: phacelia (19.2%), acacia (20.3%) and goldenrod (24.1%) had a much more lower ability to deactivate the DPPH radical. Antioxidant activity showed high variability within each of the tested honey varieties. The greatest variability occurred in goldenrod honey case, and the smallest for coniferous honeydew honey, deciduous honeydew honey and buckwheat honey.

In a similar way as in the case of antioxidant activity, the botanical origin of the honey (variety of honey) had an influence on the result of the total phenolic compounds test. The total content of phenolic compounds in dark varietal honeys (buckwheat - 127.0 GAE/100 g, coniferous honeydew honey - 95.6 GAE/100 g, heather - 81.3 GAE/100 g) was higher compared to their content in light varietal honeys (phacelia - 18.6 GAE/100 g, acacia - 19.5 GAE/100 g, rapeseed - 24.8 GAE/100 g). This parameter indicated the highest variability for buckwheat honey (CV - 37.1%), and the lowest for goldenrod honey (CV = 15%).

A significant, strong positive correlation (r=0.798) was found between the antioxidant activity against the DPPH radical and the total content of phenolic compounds determined by the Folin-Ciocalteu method.

The results of the study of the composition of phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with a photodiode detector (HPLC-DAD) showed that the varietal honeys also differed in the qualitative and quantitative composition of phenolic acids and flavonoids. The following phenolic acids were identified and quantified in all tested varieties: vanillic, caffeic, p-coumaric, trans-ferulic, salicylic and vanillin aldehyde, and of the flavonoids pinocembrin and chrysin. Hesperidin was not detected only in acacia honey, rutin in heather honey, and acacetin in buckwheat honey, deciduous honeydew honey and coniferous honeydew honey. Luteolin, quercetin, hesperetin, kaempferol, isorhamnetin have been detected only in some varieties of honey. Luteolin was found in a lime, deciduous honeydew honey and coniferous honeydew honey; quercetin - in lime, goldenrod, buckwheat, coniferous honeydew honey and deciduous honeydew honey; hesperetin - in lime, heather, buckwheat, goldenrod and coniferous honeydew honey; kaempferol - in rape, lime, phacelia and goldenrod honey; isorhamnetin - in coniferous honeydew honey and deciduous honeydew honey as well as in lime, buckwheat and rape honey.

In the group of phenolic acids, the highest content was determined for salicylic acid, from 30.3 μg/100 g in acacia honey to 483.2 μg/100 g in coniferous honeydew honey. The content

of this acid was characterized by high variability within each of the examined varieties of honey. The coefficient of variation ranged from 51.0% for coniferous honeydew honey to 171.4% for rape honey. The lowest contents were determined for caffeic acid, from 87.1 μg/100 g (in phacelia honey) to 197.0 μg/100 g (in goldenrod honey). The total content of phenolic acids ranged from 581.6 μg/100 g (in acacia honey) to 1362.8 μg/100 g (in coniferous honeydew honey). Honeydew honeys (deciduous honeydew honey, coniferous honeydew honey and nectar-honeydew honey) and goldenrod honey had a significantly higher content of total phenolic acids (1066.4-1362.8 μg/100 g) compared to some varieties of nectar honey, i.e. acacia, rape, phacelia and buckwheat (sum of phenolic acid content 581.6-667.4 μg/100 g).

In the group of flavonoids, the highest content was determined for hesperidin, from 45.8 μg/100 g (nectar-honeydew honey) to 890.4 μg/100 g (rape honey). The content of this flavonoid was characterized by high variability within each of the examined varieties of honey. The coefficient of variation ranged from 58.0% (for heather honey) to 175.9% (for coniferous honeydew honey). The lowest contents were determined for acacetin, from 16.5 μg/100 g (linden honey) to 103.0 μg/100 g (acacia honey). The total content of flavonoids ranged from 418.4 μg/100 g (heather honey) to 1500.1 μg/100 g (rape honey). The differences in both the antioxidant properties and the composition of phenolic compounds of domestic varietal honeys can be explained by the differences in nectar and honeydew flow accompanying the main flow in the location of the apiaries from which the samples for the study were obtained.

The research carried out allowed to supplement the physicochemical characteristics of domestic varietal honeys with antioxidant properties and the total content of phenolic compounds as well as the qualitative and quantitative composition of phenolic acids and flavonoids. This characteristic can be used to determine the normative requirements for assessing the biological value of honey. The developed method for the determination of phenolic compounds in honey using high-performance liquid chromatography with a photodiode array detector (HPLC-DAD) can be used in control laboratories assessing the quality and biological value of honey and other bee products. Recorded antioxidant properties can be used in the promotion of varietal honeys of domestic origin, which may translate into expanding the possibilities of using honey in dietetics and human nutrition. Obtaining larger amounts of varietal honeys in domestic apiaries will increase the economic benefits of Polish beekeepers.