

Aleksandra Wilczyńska

METODY OZNACZANIA AKTYWNOŚCI ANTYOKSYDACYJNEJ MIODÓW PSZCZELICH

Katedra Towaroznawstwa i Ładunkoznawstwa Akademii Morskiej w Gdyni
Kierownik: prof. dr hab. inż. P. Przybyłowski

Jednym z naturalnych składników diety, wykazującym działanie antyoksydacyjne, jest miód pszczeleli. Jest to produkt o uznanym działaniu dietetycznym lub leczniczym, natomiast wiedza na temat aktywności antyoksydacyjnej miodów pszczelich jest jeszcze niewielka. Podobnie jak w przypadku innych produktów spożywczych, do oznaczania aktywności antyoksydacyjnej miodów można zastosować szereg metod badawczych. Najczęściej stosuje się metody oparte o właściwości redukcyjne antyoksydantów. W artykule dokonano przeglądu metod stosowanych do oznaczania właściwości antyoksydacyjnych miodów pszczelich.

Hasła kluczowe: miód pszczeleli, właściwości antyoksydacyjne, FRAP, DPPH, ABTS, ogólna zawartość polifenoli.

Key words: honey, antioxidant activity, FRAP, DPPH, ABTS, total phenolics content.

Ze względu na coraz liczniej występujące choroby cywilizacyjne, w ostatnich czasach wzrosło zainteresowanie właściwościami antyoksydacyjnymi produktów spożywczych. Jednym z najbardziej wartościowych składników diety jest miód pszczeleli – bogate źródło naturalnych związków biologicznie czynnych, których właściwości profilaktyczne i lecznicze są uwarunkowane m.in. przez aktywność przeciwutleniającą. Właściwości takie posiadają niektóre enzymy, witaminy, kwasy fenolowe występujące w miodach – kwas kawowy, ferulowy, galusowy, elagowy, a także flawonoidy. Na podstawie istniejącego stanu wiedzy można stwierdzić, że związki fenolowe zawarte w miodach mogą wzmacniać naturalne mechanizmy obrony przed szokiem tlenowym i chemicznym. W świetle tych faktów zalecane jest spożywanie miodu w zapobieganiu zachorowaniom na choroby sercowo-naczyniowe czy nowotwory.

Miód pszczeleli zdobywa coraz większe zainteresowanie jako ważne źródło różnorodnych związków aktywnych biologicznie. Zawartość tych związków zależy od wielu czynników: pochodzenia botanicznego miodu, czynników środowiskowych i klimatycznych, a także przebiegu procesu pozyskiwania miodów (1, 2, 3, 4).

Doniesienia naukowe na temat aktywności antyoksydacyjnej polskich miodów pszczelich są nieliczne i nie dają jednoznacznej odpowiedzi, od czego ona zależy. Jedną z przyczyn tego stanu rzeczy jest różnorodność metod stosowanych do oznaczania aktywności antyoksydacyjnej miodów oraz brak ich standaryzacji. Celem niniejszego opracowania było zebranie i podsumowanie informacji na temat metod stosowanych do oznaczania aktywności antyoksydacyjnej miodów pszczelich.

METODY

Aby ocenić aktywność przeciwutleniającą produktów spożywczych najczęściej stosuje się testy *in vitro*, w których wykorzystywana jest zdolność antyoksydantów do dezaktywacji wolnych rodników. Do oznaczania aktywności antyoksydacyjnej (AA) stosuje się dwie kategorie metod polegających na:

1. redukcji jonów metali do jonów o niższym stopniu utlenienia przez badany antyoksydant (FRAP, CUPRAC);
2. zmiatanie wolnych, stabilnych rodników (ABTS⁺, DPPH) (5,6).

Metody te są metodami uzupełniającymi się. Metoda FRAP obejmuje najwięcej składników antyoksydacyjnych w próbce, zaś metoda DPPH tylko część najbardziej reaktywnych, metoda ABTS – wartości pośrednie (6). Do wyznaczania aktywności antyoksydacyjnej miodów pszczelich można zastosować wszystkie w/w metody.

Metoda FRAP

Zasada oznaczenia całkowitej aktywności oksydacyjnej tą metodą polega na określeniu zdolności redukcji jonów Fe³⁺ do jonów Fe²⁺, które są kompleksonowane przez TPTZ (2,4,6-tris(2-pirydylo)-1,3,5-triazyn) z wytworzeniem intensywnego, niebieskiego zabarwienia o maksimum absorbancji przy 593 nm. Zdolność antyoksydacyjną próbki określa się przez porównanie zmian absorbancji ΔA z wartością ΔA roztworu wzorcowego Fe²⁺. Jednostka FRAP określa zdolność redukcji 1 mola Fe³⁺ do Fe²⁺.

Jest to metoda stosunkowo tania, szybka, reakcja jest mało zależna od badanego materiału, a otrzymywane wyniki powtarzalne (6). Metodę FRAP stosowano do oznaczania zdolności przeciwutleniającej płynów ustrojowych, a także komórek i tkanek, po raz pierwszy została zastosowana do oznaczenia aktywności antyoksydacyjnej osocza przez *Benzie* i współpr. (7), następnie zaś została przystosowana do oznaczania AA surowców roślinnych (8).

Procedura przygotowania próbek miodów do oznaczania całkowitej aktywności przeciwutleniającej metodą FRAP jest stosunkowo prosta: do mieszaniny reakcyjnej otrzymanej przez zmieszanie buforu octanowego (pH 3,6), roztworu TPTZ i FeCl₃ dodaje się odpowiednio rozcieńczoną próbkę miodu (0,1 g/cm³), mierzy absorbancję (A₀) przy długości fali 539 nm. Następnie, po czterominutowej inkubacji w temp. 37°C, ponownie mierzy się absorbancję (9). Wyznaczona wartość ΔA próbki jest wprost proporcjonalna do stężenia przeciwutleniacza. Zmiana absorbancji ΔA jest przeliczana na jednostki FRAP poprzez porównanie z roztworem wzorcowym wg wzoru:

$$\Delta A_{593\text{nm}} \text{ próbki} / \Delta A_{593\text{nm}} \text{ wzorca} \times \text{wartość FRAP wzorca (1000 } \mu\text{M)}.$$

Metoda ABTS

Zasada oznaczania aktywności antyoksydacyjnej polega na określeniu stopnia zmiatania rodników ABTS⁺ wytworzonych uprzednio podczas reakcji chemicznych (np. z ditlenkiem manganu, związkami ABAP oraz nadsiarczanem potasu). Wytworzone podczas reakcji rodniki mają barwę niebieskozieloną, antyoksydanty, redukując kationorodnik, powodują zanik barwy roztworu, przy czym spadek intensywno-

ności zabarwienia zależy od zawartości przeciwutleniaczy w roztworze. Zmiananie rodników śledzi się spektrofotometrycznie, najczęściej przy długości fali 734 nm. Zawartość przeciwutleniaczy wyrażana jest zwykle jako ilość równoważników Troloxu na jednostkę masy lub objętości (TEAC) (5, 6).

Do oznaczania potencjału antyoksydacyjnego miódów używa się tej metody niezmiernie rzadko, ponieważ nie daje ona jednoznacznych wyników. W miodach występują różne przeciwutleniacze: flawonoidy, fenolokwasy, terpeny, a także witaminy C i E oraz karotenoidy. Obecność tych ostatnich powoduje zafałszowywanie wyników. Także flawonoidy, które podczas reakcji dają produkty o silniejszych właściwościach antyoksydacyjnych niż związki macierzyste, są powodem uzyskiwania zawyżonych wyników (5, 9).

Metoda DPPH

Metodą wykorzystywaną najczęściej do oznaczania aktywności przeciwutleniającej miódów pszczelich jest metoda z użyciem roztworu DPPH. Rodnik DPPH w roztworze alkoholu ma barwę purpurową z maksimum absorbancji przy długości fali 515 nm. W czasie reakcji wychwytuje on elektrony od substancji antyutleniającej i przechodzi do słabo zabarwionego produktu, powodując zmianę barwy mieszaniny reakcyjnej na żółtą. Zmianę tę monitoruje się spektrofotometrycznie. Miara aktywności antyoksydacyjnej jest wartość parametru IC_{50} (EC_{50}), który określa stężenie antyoksydantu powodujące spadek początkowego stężenia rodnika o 50%. Zawartość przeciwutleniaczy w badanym produkcie można też wyrazić jako ilość równoważników substancji odniesienia (Radox, Trolox lub kwas askorbinowy) na jednostkę masy lub objętości (5, 10, 11).

Procedura pomiaru aktywności antyutleniającej miódów metodą DPPH jest stosunkowo prosta – wodny roztwór miodu (0,025 mg/ml) miesza się z roztworem DPPH w metanolu – wg różnych autorów o stężeniu 90 ppm lub 0,1 mM. Próbkę inkubuje się w temp. 25°C bez dostępu światła. Po upływie 5 do 60 minut mierzy się absorbancję przy długości fali 517 nm wobec metanolu (lub mieszaniny wody z metanolem 1:1, v:v) jako próby ślepej. Próbką kontrolną jest mieszanina roztworu DPPH z wodą destylowaną. Wyniki pomiaru są podawane najczęściej jako ilość równoważników substancji odniesienia lub jako stopień zmiatania (ułamek zaniku absorbancji) rodnika AA%:

$$AA\% = [(A_B - A_A)/A_B] \times 100,$$

gdzie A_A – absorbancja badanej próbki, A_B – absorbancja próby kontrolnej (4, 12).

Metoda ta jest szybka i dokładna, a uzyskane wyniki odtwarzalne i porównywalne z wynikami otrzymanymi innymi metodami.

W licznych opracowaniach naukowych wykazano, że aktywność przeciwutleniająca miódów jest wprost proporcjonalna do ogólnej zawartości polifenoli. Bardzo często więc potencjał antyoksydacyjny wyraża się jako całkowitą zawartość polifenoli, oznaczaną za pomocą metody z zastosowaniem odczynnika *Folin-Ciocalteu*. Metoda opiera się na przeprowadzeniu reakcji barwnej pomiędzy związkami fenolowymi a odczynnikiem F-C oraz spektrofotometrycznym pomiarem natężenia barwy przy długości fali 670 nm. Wyniki pomiaru przedstawia się

jako ilość równoważników substancji odniesienia (w przypadku miodów jest to kwas gallusowy lub kwercetyna) (10, 11, 13). Jest to metoda szybka i prosta, ale mało specyficzna.

WNIOSKI

Podobnie jak w przypadku innych produktów spożywczych, do oznaczania aktywności przeciwutleniającej miodów pszczelich można zastosować szereg metod, trudno jednak wskazać, która z nich jest najlepsza. Najczęściej oznacza się całkowitą ilość polifenoli lub aktywność antyoksydacyjną metodą DPPH. Należy tu zwrócić uwagę na fakt, iż nie ma standaryzacji uzyskiwanych wyników, a stosowane warianty metod oznaczania różnią się warunkami przeprowadzania analizy (czas inkubacji próbki, stężenie roztworów) oraz sposobem prezentacji wyników, co często uniemożliwia przeprowadzanie analizy porównawczej.

A. Wilczyńska

METHODS APPLIED TO MEASURING OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF HONEY

Summary

Honey is natural food-stuff with antioxidant properties. Honey is well-known because of its dietic and health activity, but there is just some information about its antioxidant activity. Similarly to other food-stuffs, antioxidant power of honey is determined by using different techniques. The most common techniques are based on reducing ability of antioxidants. In article a review of the methods applied to evaluation of antioxidant activity of honey was made.

PIŚMIENNICTWO

1. Frankel S., Robinson G.E., Berenbaum M.R.: Antioxidant capacity and correlated characteristic of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research*, 37, 1, 1998, 27-31.
2. Chen L., Mehta A., Berenbaum M., Zangerl A.R., Engeseth N.J.: Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2000, 4997-5000.
3. Gheldof N., Wang X.H., Engeseth N.J.: Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2002, 5870-5877.
4. Turkmen N., Sari F., Poyrazoglu E.S., Velioglu S.: Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry*, 95, 2006, 653-657.
5. Cybul M., Nowak R.: Przegląd metod stosowanych w analizie właściwości antyoksydacyjnych wyciągów roślinnych. *Herba Polonica*, 54, 1, 2008, 69-78.
6. Barto H., Folta M., Zachwieja Z.: Zastosowanie metod FRAP, ABTS i DPPH w badaniu aktywności antyoksydacyjnej produktów spożywczych. *Nowiny lekarskie*, 74, 4, 2005, 510-513.
7. Benzie I.F.F., Strain J.J.: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 1996, 70-76.
8. Benzie I.F.F., Strain J.J.: Ferric reducing/antioxidant power assay – direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 1999, 15-27.
9. Aljadi A.M., Kamaruddin M.Y.: Evaluation of the phenolics contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, 84, 4, 2004, 513-518.
10. Al-Mamary M., Al-Meerri A., Al-Habibi M.: Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition research*, 22, 2002, 1041-1047.
11. Vela L., de Lorenzo C., Pérez R.A.: Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. *Journal of Science of Food and Agricultural*,

87, 1069-1075, 2007. – 12. *Baltrusaitė V., Venskutonis P.R., Ceksteryte V.*: Radical scavenging activity of floral origin honey and beebread phenolics extracts. *Food Chemistry*, 101, 2007, 502-514. – 13. *Borawska M.H., Piekut J.*: Wartość liczby diastazowej, potencjału antyoksydacyjnego i zawartość polifenoli w miodach pszczelich z regionu Podlasia. *Mat. XLIII Naukowej Konferencji Pszczelarskiej*, Puławy, 2006, 214-215.

Adres: 81-225 Gdynia, ul. Morska 81-87.