

ROBERT SOCHA, CELINA HABRYKA, LESŁAW JUSZCZAK

WPŁYW DODATKU PROPOLISU NA ZAWARTOŚĆ WYBRANYCH ZWIĄZKÓW POLIFENOLOWYCH ORAZ AKTYWNOŚĆ PRZECIWUTLENIAJĄCĄ MIODU

Streszczenie

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu wzbogacania miodu wielokwiatowego propolisem na zawartość związków fenolowych oraz aktywność przeciwutleniającą. Materiał doświadczalny stanowiły miody wielokwiatowe ($n = 5$) oraz miody wielokwiatowe wzbogacone propolisem ($n = 5$) pochodzące z pięciu wybranych pasiek południowej Polski. W próbkach oznaczono całkowitą zawartość polifenoli oraz flawonoidów, całkowitą aktywność przeciwutleniającą i aktywność przeciwrodnikową w reakcji z DPPH^{*} oraz zdolność redukcyjną metodą FRAP. Zawartość wybranych kwasów fenolowych oraz flawonoidów oznaczono metodą HPLC. Miody wielokwiatowe zawierały związki fenolowe na poziomie $23,52 \div 63,00$ mg GAE/100 g produktu oraz flawonoidy – $5,26 \div 14,39$ mg QE/100 g miodu. Wzbogacenie miodu propolisem istotnie zwiększyło zawartość polifenoli i flawonoidów ogółem w zależności od pochodzenia próbki. Maksymalna zawartość związków fenolowych w miodach wzbogaconych propolisem wyniosła $198,47$ mg GAE/100 g, natomiast flawonoidów – $135,51$ mg QE/100 g. Stwierdzono również istotny wzrost zawartości poszczególnych kwasów fenolowych i flawonoidów w próbkach wzbogaconych propolisem. Wśród kwasów fenolowych dominujący był kwas p-kumarowy, (maksymalnie $30,28$ mg/100 g), a wśród flawonoidów – galangina (maksymalnie $25,41$ mg/100 g). We wszystkich przypadkach wzbogacenie miodu propolisem wpłynęło istotnie na wzrost jego aktywności przeciwutleniającej, przeciwrodnikowej i zdolności redukcyjnej. Aktywność przeciwrodnikowa miodów wielokwiatowych ($5,65 \div 26,21$ %) wzrosła po ich wzbogaceniu propolisem do $26,50 \div 88,33$ %. Równocześnie zdolność redukcyjna miodów z dodatkiem propolisu ($7,83 \div 53,79$ μ M Fe(II)/100 g) była zdecydowanie większa niż miodów bez tego dodatku ($1,64 \div 6,61$ μ M Fe(II)/100 g). Stwierdzono również istotne korelacje liniowe pomiędzy całkowitą zawartością związków fenolowych i flawonoidów a aktywnością przeciwutleniającą i przeciwrodnikową oraz zdolnością redukującą.

Słowa kluczowe: miód, propolis, profil fenolowy, właściwości przeciwutleniające

*Dr R. Socha, mgr inż. C. Habryka, prof. dr hab. inż. L. Juszcak, Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności, Wydz. Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków.
Kontakt: r.socha@ur.krakow.pl*

Wprowadzenie

Miód oraz produkty pszczele są wartościowymi składnikami diety człowieka. Stanowią one cenne i bogate źródło związków biologicznie czynnych [5, 10, 26]. Stosowane są od wieków w tradycyjnej medycynie ludowej ze względu na szerokie spektrum działania przeciwbakteryjnego, przeciwrodnikowego, przeciwutleniającego, przeciwrakowego i wspomagającego w profilaktyce i leczeniu wielu chorób [6, 8, 9, 10, 28]. Produkty pszczele mogą stanowić również atrakcyjne składniki żywności prozdrowotnej i funkcjonalnej, ze względu na ich znaczny potencjał przeciwutleniający [11, 19, 25, 28]. Do składników miodu o aktywności przeciwutleniającej należą niektóre białka i aminokwasy, karotenoidy, związki fenolowe i flawonoidy, kwas askorbinowy, kwasy organiczne oraz produkty reakcji Maillarda [7, 10, 13, 18, 17, 27]. Skład miodów i pozostałych produktów pszczelich oraz ich aktywność biologiczna zależą od czynników takich, jak: źródło nektaru, pora roku, warunki klimatyczne i środowiskowe, czynniki genetyczne i inne [2, 13, 19, 20].

Jednym z ważnych produktów pszczelich jest propolis – substancja produkowana przez pszczoły z żywiczno-woskowych wydzielin roślin w postaci żywiczno-balsamicznej masy o charakterystycznym zapachu i gorzkim, cierpkim smaku. Propolis ma silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe, przeciwzapalne, immunostymulujące, chemoprewencyjne, cytotatyczne i proapoptotyczne [3, 28]. Związki fenolowe występujące w propolisie hamują tworzenie rodników aminowych, tlenowych i nadtlenowych, kompleksują jony metali przejściowych, przerywają reakcje wolnorodnikowe i zapobiegają peroksydacji lipidów [14, 21]. Z właściwościami przeciwutleniającymi propolisu wiąże się także jego aktywność przeciwkancerogenna, ponieważ może on hamować namnażanie się komórek rakowych i powodować ich apoptozę. Największe znaczenie w prewencji nowotworów ma ester fenyloetylowy kwasu kawowego (CAPE), jednak warunkiem jego aktywności jest synergiczne działanie wszystkich składników zawartych w propolisie [3]. Propolis może być wprowadzany do miodu w formie zagęszczonego ekstraktu alkoholowego [23]. Ze względu jednak na intensywny zapach oraz smak możliwa jego ilość do wprowadzenia jest ograniczona. Jak podają Osés i wsp. [14], ilość propolisu wprowadzonego do miodu nie powinna przekraczać 1 % ze względu na jego niekorzystny wpływ na charakterystykę sensoryczną miodu.

Produkty pszczele zdobywają coraz większe uznanie konsumentów ze względu na zawartość związków bioaktywnych. Wśród nich znaczącą grupę stanowią związki polifenolowe o charakterze naturalnych przeciwutleniaczy, których bogatym źródłem jest propolis. Najbardziej naturalnym sposobem wprowadzenia propolisu do diety człowieka wydaje się być jego dodatek do miodu [14, 23].

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu wzbogacenia miodu wielokwiatowego propolisem na zawartość wybranych kwasów fenolowych i flawonoidów oraz jego właściwości przeciwutleniające.

Material i metody badań

Material doświadczalny stanowiły miody wielokwiatowe ($n = 5$) oraz miody wielokwiatowe wzbogacone propolisem ($n = 5$). Próbkki miodów pochodziły z pasiek południowej Polski: Pasieki Barć w Kamiannej, woj. małopolskie (producent A), PH Barć w Biszczy, woj. lubelskie (B), Gospodarstwa Pasiecznego „Sądecki Bartnik” w Stróżach, woj. małopolskie (C), Pasieki pod Pilskiem w Korbielowie, woj. śląskie (D) i Gospodarstwa Pasiecznego w Sułkowicach, woj. małopolskie (E). Próbkki pochodzące z każdej pasieki obejmowały miód wielokwiatowy oraz miód wielokwiatowy wzbogacony propolisem w ilościach: próbka A – 0,5 %, próbka D – 0,88 %, próbki B, C, E – 1 %, zgodnie z deklaracją producenta zamieszczoną na etykiecie.

Ekstrakcja

Ekstrakcję składników o charakterze polifenoli wykonywano metodą opisaną przez Sochę i wsp. [19]. Próbkki miodów rozpuszczano w wodzie dejonizowanej, zakwaszano do $\text{pH} = 2$, a następnie wysycano NaCl (POCH, Polska). Uzyskany roztwór ekstrahowano trzykrotnie octanem etylu (POCH, Polska). Następnie uzyskane ekstrakty łączono i rozpuszczalnik oddestylowywano w wyparce próżniowej (RVO 200, Ingos, Republika Czeska) w temp. $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ w atmosferze argonu. Uzyskaną pozostałość rozpuszczano w metanolu (POCH, Polska) i przechowywano w temp. $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do czasu wykonywania oznaczeń całkowitej zawartości polifenoli i flawonoidów ogółem, całkowitej aktywności przeciwutleniającej i przeciwrodnikowej, zdolności redukcyjnej oraz profilu polifenolowego.

Metody analityczne

Całkowitą zawartość związków fenolowych oznaczano spektrofotometrycznie w reakcji z odczynnikiem Folina-Ciocalteu’a [12]. Do sporządzenia krzywej wzorcowej użyto kwasu galusowego (Sigma-Aldrich, Niemcy). Pomiary absorbancji wykonywano za pomocą spektrofotometru V-630 (Jasco, Japonia) przy długości fali $\lambda = 760\text{ nm}$. Wyniki wyrażano w mg kwasu galusowego (GAE) na 100 g miodu.

Całkowitą zawartość flawonoidów oznaczano spektrofotometrycznie w reakcji z chlorkiem glinu [1]. Do sporządzenia krzywej wzorcowej użyto kwercetyny (Sigma-Aldrich, Niemcy). Pomiary absorbancji wykonywano przy długości fali $\lambda = 510\text{ nm}$. Wyniki wyrażano w mg kwercetyny (QE) na 100 g miodu.

Zawartość kwasów fenolowych (chlorogenowego, ferulowego, galusowego, kawowego i p-kumarowego) oraz flawonoidów (chryzyny, galanginy, kempferolu

i kwercetyny) oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej przy użyciu układu HPLC LC-NetII/ADC (Jasco, Japonia) z detekcją spektrofotometryczną. W zależności od związku pomiar spektrofotometryczny wykonywano przy długościach fal: kwas galusowy i chryzyna – $\lambda = 280$ nm, kwas chlorogenowy, ferulowy, kawowy i p-kumarowy – $\lambda = 320$ nm oraz galangina, kwercetyna i kempferol – $\lambda = 360$ nm [18]. Rozdział oznaczanych polifenoli wykonywano w układzie odwróconych faz. Stosowano kolumnę Purospher ($25 \times 0,4$ cm, $5 \mu\text{m}$) (Merck, Niemcy) w temp. 30°C oraz elucję gradientową (2,5-procentowy roztwór kwasu octowego/acetonitryl (Merck, Niemcy) przy szybkości przepływu $1 \text{ cm}^3/\text{min}$. Jakościową identyfikację związków fenolowych wykonywano z użyciem detektora DAD MD-2018 plus (Jasco, Japonia) poprzez porównanie widm UV rozdzielanych substancji z odpowiednimi wzorcami. Zastosowane wzorce otrzymano z firm Fluka Chemie AG (Szwajcaria) oraz Sigma-Aldrich (Niemcy).

Całkowitą aktywność przeciwutleniającą oznaczano metodą polegającą na pomiarze absorbancji barwnego kompleksu, powstałego w reakcji polifenoli z mieszaniną reakcyjną zawierającą molibdenian(VI) amonu [16]. Całkowitą aktywność przeciwutleniającą wyrażano jako wartość absorbancji mierzonej przy długości fali $\lambda = 695$ nm.

Oznaczanie zdolności badanych miodów do dezaktywacji wolnych rodników wykonywano w reakcji z rodnikiem DPPH \cdot (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) (Sigma-Aldrich, Niemcy) [19]. Pomiary absorbancji wykonywano przy długości fali $\lambda = 515$ nm. Aktywność przeciwrodnikową wyrażano jako procent inhibicji rodnika DPPH \cdot .

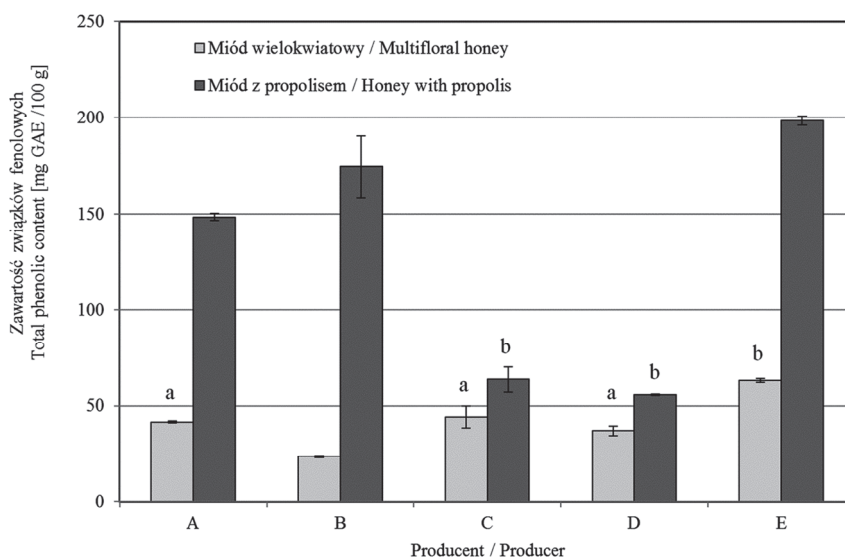
Zdolność redukcyjną oznaczano spektrofotometryczną metodą FRAP [20] polegającą na określeniu zdolności redukcji jonów żelaza(III), które są następnie kompleksowane przez odczynnik TPTZ (2,4,6-tris(2-pirydylo)-s-triazynę) (Sigma-Aldrich, Niemcy) z wytworzeniem intensywnego, niebieskiego zabarwienia. Pomiary absorbancji wykonywano przy długości fali $\lambda = 593$ nm. Wyniki wyrażano w $\mu\text{M Fe(II)}/100$ g miodu.

Analiza statystyczna

Wszystkie pomiary spektrofotometryczne wykonano w trzech powtórzeniach, natomiast analizy chromatograficzne dwukrotnie. W celu oceny istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi oznaczanych parametrów zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji oraz test Duncana przy poziomie istotności 0,05. Ponadto pomiędzy wybranymi parametrami obliczono współczynniki korelacji liniowej Pearsona, a ich istotność zweryfikowano testem t-Studenta przy poziomie istotności 0,05.

Wyniki i dyskusja

Wyniki całkowitej zawartości związków fenolowych w miodach wielokwiatowych oraz w miodach wzbogaconych propolisem przedstawiono na rys. 1. Zawartość tych związków w miodach naturalnych wahała się w zakresie $23,52 \div 63,00$ mg GAE/100 g, przy średniej zawartości 41,89 mg GAE/100 g. Uzyskane wartości są zgodne z danymi literaturowymi [13, 22, 26]. Całkowita zawartość związków fenolowych w miodach jest skorelowana z ich barwą; im jest ona ciemniejsza, tym większą zawartością polifenoli oraz aktywnością przeciwutleniającą charakteryzuje się miód [25]. Wśród polskich miodów odmianowych szczególnie bogate w związki fenolowe są miody gryczany oraz wrzosowy [26]. Wzbogacenie miodu propolisem w każdym przypadku istotnie wpłynęło na wzrost całkowitej zawartości związków fenolowych, w zależności od pochodzenia próbki (rys. 1). Maksymalna oznaczona zawartość polifenoli ogółem wynosiła 198,47 mg GAE/100 g, przy średniej ich zawartości w miodach wzbogaconych na poziomie 128,09 mg GAE/100 g.



Objaśnienia: Explanatory notes:

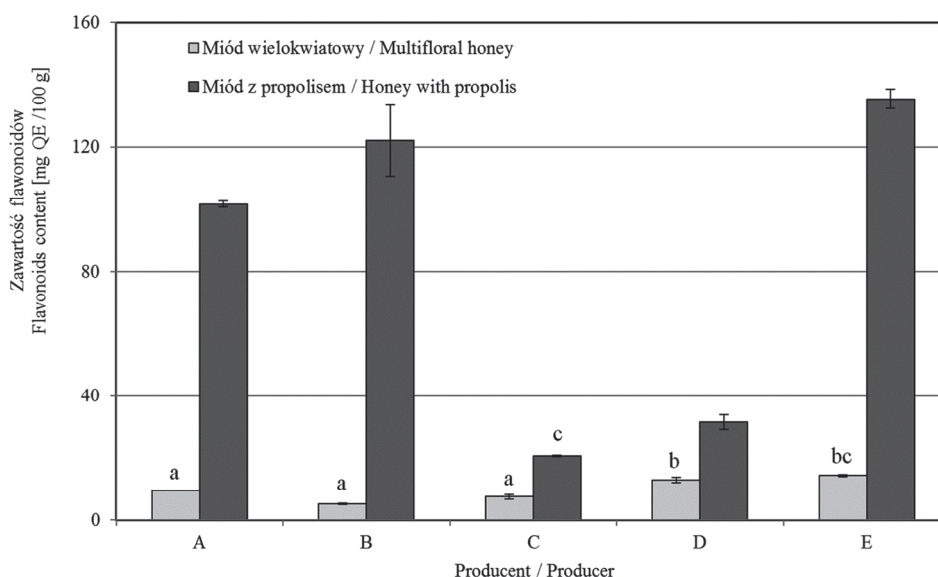
Na rysunku przedstawiono wartości średnie (w postaci słupków) i odchylenia standardowe (w postaci odcinków) / Figure shows mean values (bars) and standard deviations (line segments);

a, b – wartości średnie oznaczone takimi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie ($p > 0,05$) / Mean values marked with the same letter do not differ statistically significantly ($p > 0.05$).

Rys. 1. Zawartość związków fenolowych w miodach wielokwiatowych oraz w miodach wzbogaconych propolisem

Fig. 1. Content of phenolic compounds in multifloral honey and in propolis-enriched honey

Wyniki oznaczania całkowitej zawartości flawonoidów przedstawiono na rys. 2. Zawartość tej grupy polifenoli w miodach wielokwiatowych wahała się w zakresie 5,26 ÷ 14,39 mg QE/100 g, przy średniej zawartości 9,94 mg QE/100 g. Wartości te znajdują odzwierciedlenie w danych literaturowych [15, 24, 27]. Podobnie jak w przypadku polifenoli, wzbogacenie miodu propolisem wpłynęło na istotny ($p < 0,05$) wzrost zawartości flawonoidów, których zawartość wynosiła 20,80 ÷ 135,51 mg QE/100 g. Istotny wzrost zawartości flawonoidów w miodach wzbogaconych propolisem zaobserwowali także Osés i wsp. [14]. W badaniach własnych zaobserwowano, że wzbogacenie miodu propolisem w różnym stopniu wpływa na zawartość substancji bioaktywnych, w tym flawonoidów. W przypadku producentów C i D wzrost zawartości flawonoidów w miodach był około trzykrotny, natomiast w miodach z pasieki B zawartość flawonoidów po wzbogaceniu wzrosła około dwudziestopięciokrotnie.



Objaśnienia: Explanatory notes:

Na rysunku przedstawiono wartości średnie (w postaci słupków) i odchylenia standardowe (w postaci odcinków) / Figure shows mean values (bars) and standard deviations (line segments);

a, b, c – wartości średnie oznaczone takimi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie ($p > 0,05$) / mean values marked with the same letter do not differ statistically significantly ($p > 0.05$).

Rys. 2. Zawartość flawonoidów w miodach wielokwiatowych oraz w miodach wzbogaconych propolisem

Fig. 2. Content of flavonoids in multifloral honey and in propolis-enriched honey

Obserwowane zróżnicowanie wpływu propolisu na zawartość związków fenolowych może wynikać z samych różnic we właściwościach propolisu związanych z jego pochodzeniem [20]. Innym czynnikiem może być wpływ samej metody ekstrakcji propolisu z surowego materiału, w tym zastosowany rodzaj rozpuszczalnika oraz warunki (czas, temperatura, dostęp tlenu) jego usunięcia.

Ważną grupą związków fenolowych występujących w miodach są kwasy fenolowe. Ich zawartość jest zmienna jakościowo oraz ilościowo i zależy od wielu czynników, w tym pochodzenia i odmiany miodu [19, 22, 27]. Zawartość poszczególnych kwasów fenolowych w badanych próbkach miodów wielokwiatowych i wzbogaconych przedstawiono w tab. 1. W przypadku miodów wielokwiatowych dominującym kwasem fenolowym był kwas galusowy. We wszystkich próbkach miodów stwierdzono również obecność kwasu ferulowego i p-kumarowego. Istotnymi czynnikami wpływającymi na obecność kwasów fenolowych w miodach są jego odmiana, zależna od rodzaju pożytku oraz warunki klimatyczne i środowiskowe. Według Wilczyńskiej [27] szczególnie bogate w kwasy fenolowe są miody: wrzosowy, wielokwiatowy i gryczany. Wzbogacenie miodu propolisem spowodowało istotny wzrost zawartości kwasów fenolowych. Największy wzrost zawartości zaobserwowano w przypadku kwasu p-kumarowego, którego ilość w skrajnym przypadku (pasieka B) wzrosła ponad osiemset razy. Obserwacje te znajdują odzwierciedlenie w danych literaturowych. Według Sochy i wsp. [20] dominującym kwasem fenolowym w próbkach propolisu pochodzących z różnych rejonów Polski jest właśnie kwas p-kumarowy. Jego zawartość waha się w przedziale $37,5 \div 116,9$ mg/g, przy średniej wartości 63,7 mg/g i zmienności na poziomie 37 %.

Zawartość pozostałych kwasów fenolowych była również istotnie większa w miodach wzbogaconych, ale wzrost ten był już znacznie mniejszy. Nie stwierdzono natomiast obecności kwasu chlorogenowego w badanych miodach wielokwiatowych, jednak ich wzbogacenie propolisem skutkowało istotnym wzrostem zawartości tego kwasu (tab. 1).

Wyniki zawartości poszczególnych flawonoidów w badanych miodach przedstawiono w tab. 2. We wszystkich miodach wielokwiatowych oznaczono chryzynę i w większości – kempferol. Nie stwierdzono natomiast obecności kwercetyny. Jak podaje Wilczyńska [27], najczęściej identyfikowanymi flawonoidami w miodach polskich są chryzyna, kwercetyna i kempferol. Świetlikowska i wsp. [22] nie stwierdzili obecności wolnej kwercetyny w miodach wielokwiatowych, natomiast oznaczyli jej pochodne w postaci glikozydów i rutynozydów. Wzbogacenie miodów propolisem spowodowało istotny wzrost zawartości wszystkich flawonoidów – największy chryzyny i galanginy. Obserwacje te znajdują odzwierciedlenie w danych literaturowych, gdyż według Sochy i wsp. [20] te dwa flawonoidy dominują w propolisie pochodzącym z różnych regionów Polski.

Tabela 1. Zawartość kwasów fenolowych w miódach wielokwiatowych oraz w miódach wzbogaconych propolisem
 Table 1. Content of phenolic acids in multifloral honey and in propolis-enriched honey

Producer	Rodzaj miodu Type of honey	Kwasy fenolowe [mg/100 g] / Phenolic acids [mg/100 g]					
		Chlorogenowy Chlorogenic	Ferulowy Ferulic	Galusowy Gallic	Kawowy Caffeic	p-Kumarowy p-Coumaric	
A	MW	n.d.	0,170 ^a ± 0,006	0,841 ^b ± 0,017	n.d.	0,055 ± 0,003	
	MP	0,334 ± 0,027	5,321 ^b ± 0,025	1,297 ^c ± 0,085	5,356 ^a ± 0,006	18,650 ^c ± 0,584	
B	MW	n.d.	0,157 ^a ± 0,004	0,786 ^a ± 0,058	n.d.	0,022 ^a ± 0,001	
	MP	0,397 ^a ± 0,034	7,142 ^c ± 0,900	1,060 ± 0,046	6,442 ± 1,157	18,101 ^c ± 2,464	
C	MW	n.d.	0,128 ^a ± 0,001	1,394 ^c ± 0,118	n.d.	0,111 ^b ± 0,007	
	MP	0,426 ^a ± 0,034	7,020 ^c ± 0,507	1,831 ^d ± 0,077	0,232 ± 0,001	11,433 ± 0,822	
D	MW	n.d.	0,071 ± 0,002	0,498 ± 0,009	0,053 ± 0,014	0,023 ^a ± 0,005	
	MP	0,232 ± 0,003	0,146 ^a ± 0,002	0,694 ^a ± 0,085	0,454 ± 0,003	0,234 ± 0,011	
E	MW	n.d.	0,229 ± 0,027	0,854 ^b ± 0,003	0,014 ± 0,003	0,093 ^b ± 0,010	
	MP	0,467 ^a ± 0,038	5,594 ^b ± 0,374	1,766 ^d ± 0,041	5,336 ^a ± 0,129	30,283 ± 0,326	

Objaśnienia / Explanatory notes:

MW – miód wielokwiatowy / multifloral honey; MP – miód wielokwiatowy z propolisem / multifloral honey with propolis.

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations; n = 2; n.d. – poniżej granicy oznaczalności / below the limit of quantification;

a - d – wartości średnie w kolumnach oznaczone takimi samymi literami nie różnią się statystycznie istotnie ($p > 0,05$) / mean values in columns and denoted with the same letters do not differ statistically significantly ($p > 0,05$).

Tabela 2. Zawartość flawonoidów w miodach wielokwiatowych oraz w miodach wzbogaconych propolisem
 Table 2. Content of flavonoids in multifloral honey and in propolis-enriched honey

Producer	Rodzaj miodu Type of honey	Flawonoidy / Flavonoids [mg/100 g]			
		Chryzyna / Chrysin	Galangina / Galangin	Kempferol / Kaempferol	Kwercetyna / Quercetin
A	MW	0,033 ^b ± 0,007	n.d.	0,013 ± 0,000	n.d.
	MP	18,530 ± 0,945	25,405 ^b ± 1,530	1,666 ± 0,020	0,976 ± 0,026
B	MW	0,040 ^b ± 0,006	n.d.	n.d.	n.d.
	MP	24,196 ± 2,651	25,241 ^b ± 0,873	4,084 ± 0,279	1,615 ^b ± 0,127
C	MW	0,033 ^b ± 0,007	n.d.	0,099 ^b ± 0,000	n.d.
	MP	2,368 ± 0,062	3,562 ± 0,120	0,264 ± 0,038	0,318 ^a ± 0,053
D	MW	0,163 ^a ± 0,025	0,111 ^a ± 0,001	0,028 ^a ± 0,000	n.d.
	MP	0,261 ^a ± 0,007	0,387 ± 0,004	0,084 ^b ± 0,004	0,186 ^a ± 0,021
E	MW	0,017 ^a ± 0,001	0,034 ^a ± 0,003	0,036 ^a ± 0,005	n.d.
	MP	14,078 ± 0,261	4,641 ± 0,028	2,192 ± 0,028	1,764 ^b ± 0,036

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Analizowane miody odznaczały się różną aktywnością przeciwutleniającą, której największe wartości charakteryzowały próbki z pasiek A i E, natomiast najmniejsze – miód z pasieki D (tab. 3). Według Wilczyńskiej [26] aktywność przeciwutleniająca jest związana m.in. z barwą miodu. Im miód jest ciemniejszy, tym wykazuje większą aktywność przeciwutleniającą i przeciwrodnikową. Wśród polskich miódów szczególnie aktywne są miód gryczany i wrzosowy [26]. O aktywności przeciwutleniającej decyduje nie tylko ilość, ale również struktura związków fenolowych, a więc liczba i położenie grup hydroksylowych w cząsteczce. Innymi czynnikami mającymi wpływ na aktywność przeciwutleniającą mogą być: pochodzenie, warunki klimatyczne czy obróbka miodu po zbiorze. Wzbogacenie miódów propolisem istotnie zwiększyło ich aktywność przeciwutleniającą do najwyższego poziomu w przypadku próbek B i E, co dobrze koreluje ze wzrostem całkowitej zawartości polifenoli (rys. 1) oraz flawonoidów (rys. 2). Aktywność przeciwutleniająca miódów wielokwiatowych była dodatnio skorelowana z aktywnością przeciwrodnikową oraz zdolnością redukcyjną, przy czym najlepsze właściwości cechowały miody pochodzące z pasiek B i E, natomiast najniższą aktywność wykazywała próbka D. Wzbogacenie miodu propolisem istotnie zwiększyło zarówno aktywność przeciwrodnikową, jak i zdolność redukcyjną – w największym stopniu próbek A, B i E (tab. 3).

Tabela 3. Właściwości przeciwutleniające, przeciwrodnikowe i redukujące ekstraktów miódów wielokwiatowych oraz ekstraktów miódów wzbogaconych propolisem

Table 3. Antioxidant, antiradical, and reducing properties of multifloral honey and propolis-enriched honey extracts

Producent Producer	Rodzaj miodu Type of honey	Aktywność przeciwutleniająca Antioxidant activity [A_{695nm}]	Aktywność przeciwrodnikowa Antiradical activity [%]	Zdolność redukcyjna Reducing power [$\mu\text{M Fe(II)}/100\text{ g}$]
A	MW	$0,455^b \pm 0,009$	$17,71^a \pm 0,88$	$6,61^a \pm 0,34$
	MP	$1,707 \pm 0,023$	$86,51^c \pm 0,35$	$35,69 \pm 1,56$
B	MW	$0,307^a \pm 0,003$	$24,41^b \pm 1,30$	$8,89^a \pm 0,60$
	MP	$1,919^c \pm 0,169$	$84,34^c \pm 1,76$	$46,41 \pm 5,49$
C	MW	$0,295^a \pm 0,008$	$15,56^a \pm 1,83$	$6,99^a \pm 0,37$
	MP	$0,992 \pm 0,035$	$89,90^d \pm 0,34$	$17,70 \pm 2,16$
D	MW	$0,179 \pm 0,008$	$5,65 \pm 0,26$	$1,64 \pm 0,11$
	MP	$0,354^a \pm 0,018$	$26,50^b \pm 2,97$	$7,83^a \pm 1,14$
E	MW	$0,483^b \pm 0,002$	$26,21^b \pm 1,46$	$8,61^a \pm 0,40$
	MP	$1,883^c \pm 0,026$	$88,33^d \pm 2,25$	$53,79 \pm 1,34$

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono istotną liniową korelację pomiędzy całkowitą zawartością związków fenolowych a zawartością flawonoidów ($r = 0,99$), zawartością związków fenolowych a aktywnością przeciwutleniającą ($r = 0,96$), przeciwrodnikową ($r = 0,82$) oraz zdolnością redukcyjną ($r = 0,98$). Ponadto całkowita zawartość flawonoidów istotnie korelowała liniowo z aktywnością przeciwutleniającą ($r = 0,95$), przeciwrodnikową ($r = 0,79$) oraz zdolnością redukcyjną ($r = 0,97$). Również zawartość poszczególnych kwasów fenolowych i flawonoidów istotnie korelowała liniowo z aktywnością przeciwutleniającą, przeciwrodnikową oraz zdolnością redukcyjną. Tym samym potwierdzono dane literaturowe świadczące o istnieniu tego typu zależności [4, 11, 18, 19, 24, 26].

Wnioski

1. Wzbogacanie miodu propolisem jest najbardziej naturalnym sposobem wykorzystania jego potencjału w dostarczaniu do organizmu człowieka bogatej gamy związków bioaktywnych.
2. Dodatek propolisu, nawet na poziomie 1 %, powoduje istotny wzrost zawartości związków polifenolowych, w tym kwasów fenolowych i flawonoidów oraz poprawę właściwości przeciwutleniających, przeciwrodnikowych i redukcyjnych miodu.
3. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono istotną liniową korelację pomiędzy całkowitą zawartością związków fenolowych oraz flawonoidów a aktywnością przeciwutleniającą, przeciwrodnikową oraz zdolnością redukcyjną. Również zawartość poszczególnych kwasów fenolowych i flawonoidów istotnie korelowała liniowo z aktywnością przeciwutleniającą, przeciwrodnikową oraz zdolnością redukcyjną.

Badania zrealizowano w ramach DS/3700/WTŻ UR w Krakowie

Literatura

- [1] Ardestani A., Yazdanparast R.: Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. Food Chem., 2007, **104**, 21-29.
- [2] Baltrušaitytė V., Venskutonis P.R., Čeksterytė V.: Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. Food Chem., 2007, **101**, 502-514.
- [3] Czarnecki R.: Propolis w apiterapii. Wyd. Apiterapia Forum, Kraków 2015.
- [4] Gambacorta E., Simonetti A., Garrisi N., Intaglietta I., Perna A.: Antioxidant properties and phenolic content of sulla (*Hedysarum* spp) honeys from Southern Italy. Int. J. Food Sci. Technol., 2014, **49**, 2260-2268.
- [5] Hołderna-Kędzia E., Kędzia B.: Badania nad przeciwutleniającymi właściwościami miodu pszczelego. Acta Agrobotanica, 2006, **59**, 265-269.
- [6] Isidorov V.A., Bagan R., Bakier S., Swiecicka I.: Chemical composition and antimicrobial activity of Polish herbhoney. Food Chem., 2015, **117**, 84-88.

- [7] Jasicka-Misiak I., Poliwoda A., Deren M., Kafarski P.: Phenolic compounds and abscisic acid as potential markers for the floral origin of two Polish unifloral honeys. *Food Chem.*, 2012, **131**, 1149-1156.
- [8] Kędzia B., Holderna-Kędzia E.: Produkty pszczele w żywieniu i suplementacji diety. *Postępy Fitoterapii*, 2006, **4**, 213-222.
- [9] Kędzia B., Holderna-Kędzia E.: Aktywność antybiotyczna krajowych miodów odmianowych. *Postępy Fitoterapii*, 2014, **2**, 67-70.
- [10] Kędzińska-Matysek M.: Produkty pszczele – znaczenie biologiczne i właściwości lecznicze. *Przem. Spoż.*, 2014, **68 (11)**, 34-37.
- [11] Kuś P.M., Congiu F., Teper D., Sroka Z., Jerković I., Tuberoso C.I.G.: Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types. *LWT - Food Sci. Technol.*, 2014, **55**, 124-130.
- [12] Korus J., Juszcak L., Ziobro R., Witeczak M., Grzelak K., Sójka M.: Black currant and strawberry seed residues as functional ingredients in gluten free bread. *J. Texture Stud.*, 2012, **43 (1)**, 29-39.
- [13] Maurya S., Kushwaha A.K., Singh S., Singh G.: An overview on antioxidative potential of honey from different flora and geographical origins. *Indian J. Nat. Prod. Resour.*, 2014, **5**, 9-19.
- [14] Osés S.M., Pascual-Maté A., Fernández-Muñoz M.A., López-Díaz T.M., Sancho M.T.: Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chem.*, 2016, **196**, 1215-1223.
- [15] Perna A., Intaglietta I., Simonetti A., Gambacorta E.: A comparative study on phenolic profile, vitamin C content and antioxidant activity of Italian honeys of different botanical origin. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2013, **48**, 1899-1908.
- [16] Prieto P., Pineda M., Aguilar M.: Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.*, 1999, **269**, 337-341.
- [17] Ramanauskienė K., Stelmakienė A., Briedis V., Ivanauskas L., Jakštas V.: The quantitative analysis of biologically active compounds in Lithuanian honey. *Food Chem.*, 2012, **132**, 1544-1548.
- [18] Socha R., Juszcak L., Pietrzyk S., Fortuna T.: Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneys. *Food Chem.*, 2009, **113**, 568-574.
- [19] Socha R., Juszcak L., Pietrzyk S., Gałkowska D., Fortuna T., Witeczak T.: Phenolic profile and antioxidant properties of Polish honeys. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2011, **46**, 528-534.
- [20] Socha R., Gałkowska D., Bugaj M., Juszcak L.: Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Nat. Prod. Res.*, 2015, **29**, 416-422.
- [21] Szeleszczuk Ł., Zielińska-Pisklak M., Goś P.: Propolis – panaceum prosto z ula. *Farmakoterapia*, 2013, **23 (6-7)**, 32-39.
- [22] Świetlikowska K., Hallmann E., Sławińska J., Rembiałkowska E.: Ocena zawartości związków polifenolowych ogółem, w tym kwasów fenolowych i flawonoidów w różnych odmianach miodów ekologicznych i konwencjonalnych. *Post. Techn. Przetw. Spoż.*, 2013, **2**, 65-69.
- [23] Ślawska E., Gołębiowski T.: Miody naturalne wzbogacane propolisem. Cz. 1. Zagadnienie optymalizacji dodatku ekstraktu propolisu do miodów. *Zesz. Nauk. AE w Krakowie*, 1986, **224**, 45-52.
- [24] Šarić G., Marković K., Major N., Krpan M., Uršulin-Trstenjak N., Hruškar M., Vahčić N.: Changes of antioxidant activity and phenolic content in acacia and multifloral honey during storage. *Food Technol. Biotechnol.*, 2012, **50**, 434-441.
- [25] Wilczyńska A., Przybyłowski P.: Colour, phenolic content and antioxidant activity of Polish honeys. *Zesz. Nauk. UE w Poznaniu*, 2010, **158**, 7-14.
- [26] Wilczyńska A.: Phenolic content and antioxidant activity of different types of Polish honey – A short report. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2010, **60 (4)**, 309-313.
- [27] Wilczyńska A.: Oznaczanie zawartości flawonoidów i fenolokwasów w odmianowych miodach pszczelich. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2012, **XLV (3)**, 892-896.
- [28] Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J.A.: Functional properties of honey, propolis and royal jelly. *J. Food Sci.*, 2008, **73**, 117-124.

EFFECT OF PROPOLIS AS ADDITIVE ON CONTENT OF SELECTED PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF HONEY**S u m m a r y**

The objective of the research study was to assess the effect of enriching multifloral honey with propolis on the content of phenolic compounds therein and on its antioxidant activity. The research material were natural multifloral honey ($n = 5$) and honey enriched with propolis ($n = 5$) derived from five selected apiaries in Southern Poland. The following parameters were determined in the samples: total contents of polyphenols and flavonoids, total antioxidant activity and antiradical activity towards DPPH^{*} as well as reducing power using a FRAP method. The contents of some phenolic acids and flavonoids were determined by a HPLC method. Natural multifloral honey contained from 23.52 to 63.00 mg GAE/100 g of total phenolic compounds and from 5.26 to 14.39 mg QE/100 g of flavonoids. The enrichment of honey with propolis significantly increased the content of polyphenols and flavonoids depending on the origin of the sample. The maximum content of phenolic compounds in the propolis-enriched honey was 198.47 mg GAE/100 g, and of flavonoids: 135.51 mg QE /100 g. Additionally, a significant increase was reported in the content of individual phenolic acids and flavonoids in the propolis-enriched honey samples. Of the identified phenolic acids, the p-coumaric acid was predominant (its maximum content was 30.28 mg/100 g) and of the flavonoids: galangin (its maximum content was 25.41 mg/100 g). In all the cases, the enrichment of honey with propolis significantly impacted the increase in the antioxidant and antiradical activities of honey, and in its reducing power. The antiradical activity of multifloral honey ($5.65 \div 26.21$ %) increased, after the propolis enrichment, to $26.50 \div 88.33$ %. At the same time, the reducing power of the propolis-enriched honey ($7.83 \div 53.79$ mM Fe (II)/100 g) was definitely higher than that of the honey without this additive ($1.64 \div 6.61$ mM Fe (II)/100 g). Moreover, significant linear correlations were found between the total contents of phenolic compounds and flavonoids and the antioxidant and antiradical activity as well as the reducing power.

Key words: honey, propolis, phenolic profile, antioxidant properties ☒