

## Wykorzystanie zjawiska wtórnej luminescencji do określania zawartości substancji bioaktywnych w miodach jasnych

**Streszczenie.** W artykule przedstawiono próbę identyfikacji poszczególnych gatunków miodów jasnych oraz określenia zawartych w nich substancji bioaktywnych, reprezentowanych przez całkowitą zawartość polifenoli, poprzez pomiar wtórnej luminescencji. Materiał badawczy stanowiły próbki miodu lipowego, wielokwiatowego i akacjowego. Otrzymane wyniki pozwalają sądzić, że metoda pomiaru liczby emitowanych fotonów może być wykorzystywana jako alternatywny sposób pomiaru ilości związków fenolowych w miodach jasnych, a ich charakterystyka emisji w funkcji czasu umożliwia identyfikację poszczególnych gatunków.

**Abstract.** The article presents an attempt to identify individual species of light honey and to determine the bioactive substances they contain, represented by the total polyphenol content, by measuring secondary luminescence. The research material were samples of linden, multi-flower and acacia honey. The obtained results allow to think that the method of measuring the number of emitted photons can be used as an alternative way to measure the amount of phenolic compounds in light honey, and their emission time characteristics enable to the identification of individual species. (The use of the phenomenon of secondary luminescence to determine the content of bioactive substances in light honey).

**Słowa kluczowe:** wtórna luminescencja, ultrasłaba emisja fotonowa, pole elektromagnetyczne, substancje bioaktywne, miód jasny  
**Keywords:** secondary luminescence, ultra-low photon emission, electromagnetic field, bioactive substances, light honey

### Wstęp

Miód pszczoły to jeden z najstarszych surowców pochodzenia zwierzęcego, produkowany przez pszczoły z pożytków roślinnych lub wydzielin owadów bytujących na roślinach, z dodatkiem substancji własnych [1]. W miodzie znajduje się ponad 300 różnych substancji, a wiele z nich to substancje biologicznie czynne [2, 3]. W walory odżywcze, a zwłaszcza prozdrowotne miodu, warunkowane są obecnością naturalnych, zróżnicowanych substancji bioaktywnych, a w szczególności związków polifenolowych [1]. Liczne opracowania [4, 5, 6] dowodzą występowania silnej korelacji pomiędzy odmianą miodu, a obecnością zawartych w nim polifenoli i flawonoidów. Zdaniem Nowakowskiego i in. [7], w charakterystyce miodów brane są pod uwagę następujące cechy: pH, zawartość: wody, białka i aminokwasów, popiołu, hydroksymetylofurfuralu, związków lotnych, cukrów, enzymów rozkładających cukry oraz właściwości elektryczne (przewodność elektryczna roztworu 20%). Autor ten wskazuje jednak na braki w literaturze dotyczące zastosowania do oceny miodu innych wielkości fizycznych, co jego zdaniem otwiera nowe możliwości badawcze. Pilotażowe badania dotyczące parametryzacji żywności metodami wykorzystującymi rejestrację zaników fluorescencji metodą skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów (ang. Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC) wykonano na produktach już przetworzonych obserwując zróżnicowanie emisji fotonów [8, 9]. Zjawisko emisji fotonowej odkryto w wielu mikroskopowych jak i makroskopowych układach [10-12], w tym m.in. w układach lipidowych, w bakteriach [13], w namnażających się drożdżach [14], w leukocytach [15], w komórkach nerwowych [16], w mitochondriach i chloroplastach [17], w komórkach nowotworowych [18], w tkance wątrobowej [19], w tkance nerkowej [20], w płynach ustrojowych [21]. Ostatnie badania wskazują, że ultrasłaba emisja fotonowa wydaje się być dobrą metodą do analizowania oddziaływania nanocząstek z różnymi obiektami biologicznymi [22]. Pomiar wypromieniowanego światła przeprowadza się w widzialnym zakresie widma o najwyższej czułości ( $> 10^{-17}$  W). Gałązka-Czarnecka i in. [23] wykorzystywali zjawisko ultrasłabej luminescencji do

różnicowania składowych jaj kurzych pochodzących z różnych systemów chowu. Usa i in. [24] stwierdzili okresowe zmiany intensywności ultrasłabej luminescencji, stowarzyszone ze spontanicznym powierzchniowym potencjałem elektrycznym, dla rozwijającego się korzenia (wraz z hipokotylem) soi. Biorąc pod uwagę wymagania jakościowe współcześnie produkowanej żywności i stopień świadomości potencjalnego konsumenta identyfikacja cech oferowanego produktu jest fundamentalna. Dąży się do eliminacji kosztochłonnej badań na rzecz technologii pozwalającej podobnie sparametryzować produkt, ale jednocześnie rejestrującej synergiczne oddziaływanie różnych cech produktu świadczących o jego jakości, pochodzeniu czy sposobie produkcji. Dostrzeżono logiczne zależności między liczbą emitowanych fotonów przez badane produkty spożywcze a koncentracją w nich substancji biologicznie czynnych i stopniem przetworzenia. Wynika to z dostępności bardzo czułych instrumentów optycznych, które potrafią rejestrować pojedyncze fotony. Dotyczy to szczególnie produktów żywnościowych, które posiadają specyficzne walory i konieczne jest wyznaczenie w sposób obiektywny miary ich poziomu.

### Cel i metodyka badań

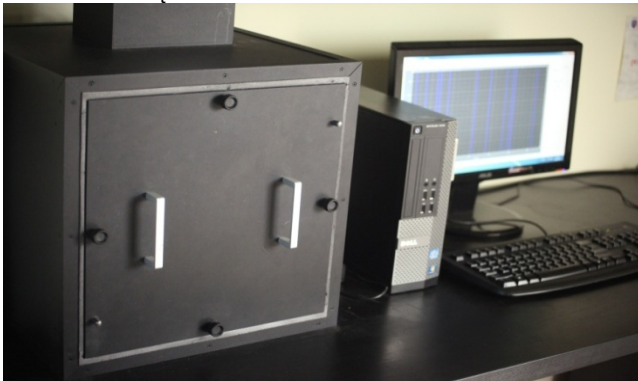
Celem badań było określenie możliwości zastosowania metody zliczania pojedynczych fotonów do identyfikacji wybranych gatunków miodów oraz określenie relacji między liczbą emitowanych fotonów a zawartością substancji określanymi jako prozdrowotne w postaci polifenoli.

Pomiar wtórnej luminescencji wykonano metodą Single Photon Counting (SPC). Posłużono się przy tym prototypowym stanowiskiem umożliwiającym rejestrację liczby fotonów. Metodyka opierała się na autorskiej procedurze badawczej, przygotowanej na potrzeby procesu akredytacyjnego w Laboratorium Eksperymentalnych Techniki Badawczych Surowców i Produktów Biologicznych Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie (rys. 1). Interwał czasowy operacji zliczania pojedynczych fotonów ustalany był doświadczalnie. Za minimalną właściwą długość interwału czasowego przebywania próbki w komorze światłoszczelnej przyjęto czas kiedy różnica liczby fotonów

zliczonych między dwiema bezpośrednio sąsiadującymi, jednonumitowymi interwałami czasowymi jest mniejsza niż 10%. Wynik pomiaru ultrasłabej emisji fotonowej stanowi bezwzględną różnicę między liczbą fotonów zarejestrowanych przez fotopowielacz w komorze światłoszczelnej z materiałem i liczbą fotonów zarejestrowanych przez fotopowielacza w tej komorze bez materiału, wg zależności (1)

$$(1) \quad L = A - B \text{ [foton]}$$

gdzie:  $L$  – liczba fotonów emitowanych przez badaną próbkę,  $A$  – liczba fotonów emitowana przez próbkę umieszczoną w komorze światłoszczelnej,  $B$  – liczba wskazań (fotonów) generowana przez pustą komorę światłoszczelną.



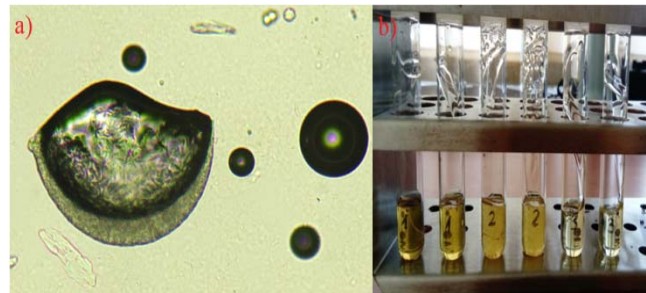
Rys.1. Układ do pomiaru wtórnej luminescencji

Po uruchomieniu układu pomiarowego w pierwszej fazie o interwale czasowy 120 s następowała stabilizacja układu zapobiegająca zakłóceniom wynikającym z chwilowej destabilizacji warunków standardowych. Po fazie wstępnej następowała faza główna (pomiarowa), której interwał czasowy wynosił 500 sekund a częstotliwość zapisywania wyników wynosiła 4 Hz, czyli każdy zapisany wynik był sumą fotonów zliczonych w czasie 0,25 sekundy. Parametry te określono jak wspomniano wcześniej w drodze eksperymentów wstępnych, ale również uwzględniono minimalny czas ekspozycji konieczny do obserwacji prowadzących do istotnych statystycznie wyników badań. Po fazie głównej następuje faza końcowa pomiaru w której następuje zatrzymanie, ale nie wyłączenie pracy ciągu pomiarowego. Cały proces pomiaru jest monitorowany w czasie rzeczywistym poprzez oryginalną aplikację wykonaną w programie LabView.

Wyniki pomiarów całkowitej zawartości polifenoli zaczerpnięto z literatury. We wszystkich przypadkach autorzy posłużyli się powszechnie stosowaną metodą spektrofotometryczną Folina-Ciocalteu'a. Otrzymane wyniki podano w przeliczeniu na kwas galusowy.

### Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły trzy rodzaje miodów jasnych, nektarowych, pochodzących z gospodarstwa pasiecznego zlokalizowanego na południu Polski, w miejscowości Stróże. Do gatunków objętych badaniami należał miód: lipowy, wielokwiatowy i akacjowy (rys. 2). Dodatkowo, w celu weryfikacji czy dany produkt pochodzi jedynie z kwiatów roślin, które zostały wskazane przez producenta, wykonano badanie wszystkich analizowanych gatunków miodu, przy użyciu metody melitopalynologicznej [16]. Przykładowy pyłek kwiatowy miodu wielokwiatowego przedstawiono na rysunku 2a).



Rys.2. Badane próbki miodu: a) widok mikroskopowy próbki miodu wielokwiatowego w powiększeniu 150x; b) widok w trakcie badań: (od lewej) miód akacjowy, wielokwiatowy i lipowy

### Wyniki badań

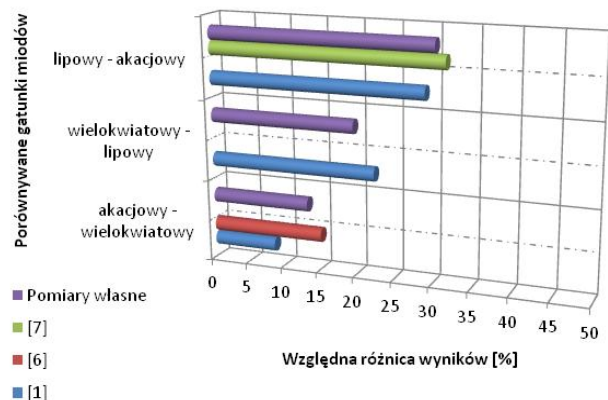
W tabeli 1 zestawiono całkowitą zawartość polifenoli wyrażoną w mg kwasu galusowego przypadającego na 1000 [g] produktu. Dodatkowo do ostatniej kolumny wprowadzono wartość średnią emisji fotonowej z dziesięciu powtórzeń dla każdego analizowanego gatunku miodu. Ponieważ jednym z głównych czynników wpływających na rodzaj i ilość substancji zawartych w miodzie jest substrat w postaci nektaru kwiatowego, to też w przeprowadzonej analizie, aby wykluczyć różnorodność botaniczną, wzięto pod uwagę jedynie miody jasne i nektarowe pochodzenia polskiego. Ponadto materiał badawczy pochodził od tego samego producenta, co w badaniach innych autorów [1].

Tabela 1. Całkowita zawartość polifenoli

Gatunek miodu	Całkowita zawartość polifenoli [mg/1000g miodu]*			Emisja fotonowa [szt./1800s] Pomiary własne
	[1]	[6]	[7]	
Lipowy	815,1*	-	390*	245
Wielokwiatowy	633,1*	625*	-	197
Akacjowy	579,2*	531*	267*	171

\*w przeliczeniu na kwas galusowy

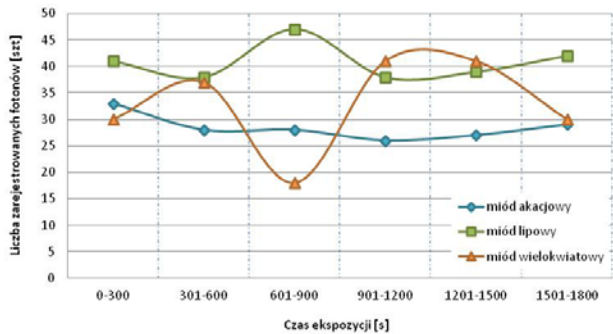
Stwierdzono, że wszystkie otrzymane wyniki (dla każdego ze wskazanych autorów – tabela 1) układają się w ciąg rosnący, w którym najmniejszymi wartościami charakteryzuje się miód akacjowy, a najwyższymi miód lipowy. Ze względu na niewielką liczbę gatunków miodu branych pod uwagę w analizie, określono tylko względną różnicę procentową pomiędzy poszczególnymi gatunkami miodu (rys.3).



Rys.3. Względna różnica procentowa pomiędzy porównywanymi gatunkami miodu

Porównując otrzymane różnice procentowe można zauważyć, że występują bardzo wyraźne rozbieżności (od 8,5% do 15%) pomiędzy wynikami miodu akacjowego i wielokwiatowego. Nie tylko pomiary emisji fotonowej, ale również źródła literaturowe wskazują na duże zróżnicowanie zawartości związków bioaktywnych w tych gatunkach badanego surowca. Zestawiając ze sobą dwa skrajne pod względem otrzymanych wyników gatunki miodu, tj. lipowy i akacjowy odnotowano, że względna różnica, zarówno w przypadku przytaczanych autorów, jak i pomiarów własnych wynosiła średnio 30,2%. Wnioskowanie w trzeciej możliwej do porównania parze jest możliwe jedynie dla jednego autora ([3]) oraz dla otrzymanych wyników pomiaru ultrasłabej luminescencji. Również w tym przypadku wartości są do siebie zbliżone, choć różnica między nimi wynosi 2,7%. Nieco inaczej wygląda możliwość identyfikacji poszczególnych gatunków miodów oraz określenie ich walorów prozdrowotnych przy wykorzystaniu metody zliczania pojedynczych fotonów, jeżeli analizie zostanie poddana emisja fotonów w funkcji czasu. Stwierdzono, że pomimo sumarycznie zbliżonej liczbie fotonów dla niektórych miodów, charakterystyki emisji fotonów w czasie pozwalają na wyodrębnienie punktów węzłowych emisji i w konsekwencji identyfikację pożądanых cech.

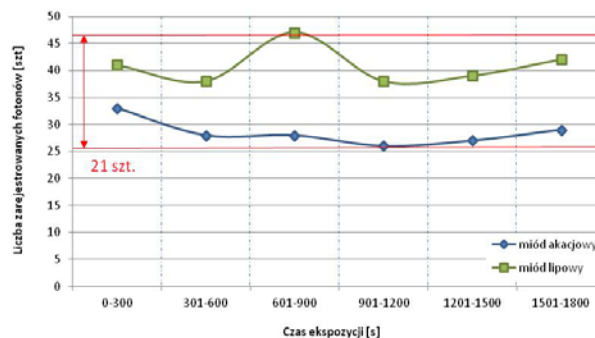
Przebieg czasowy emisji fotonowej analizowanych próbek został przedstawiony graficznie na rysunku 4.



Rys.4. Charakterystyka czasowa analizowanych próbek miodu

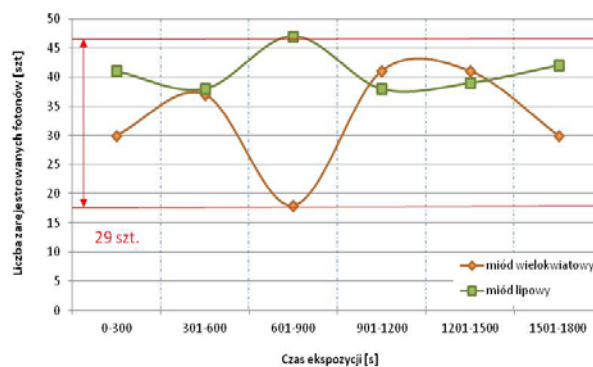
Charakterystyka czasowa miodu akacjowego jest stosunkowo jednostajna, z brakiem wyraźnych odchyżeń dla któregośkolwiek z przedziałów czasowych. Jedynie w pierwszym interwale zarejestrowana liczba fotonów przekracza 30 sztuk. Znacznie bardziej interesujący wydaje się jednak przebieg dwóch pozostałych krzywych. Na odcinku od 0 do 600 sekund oraz od 901 do 1800 sekund charakterystyki te są niemal symetryczne. Obie posiadają także po jednym wyraźnym punkcie przegięcia w przedziale 601-900 sekund. W chwili obecnej problem zmienności w czasie emisji fotonowej przez materiał biologiczny oraz zróżnicowanie tych charakterystyk nawet w obrębie surowców tego samego pochodzenia pozostaje wciąż w sferze badań. Porównanie poszczególnych charakterystyk czasowych zostało przedstawione na kolejnych wykresach (rys. 5 – 7).

Miód lipowy, cechujący się najwyższą całkowitą zawartością polifenoli spośród analizowanych gatunków w porównaniu z miodem akacjowym o najniższej zawartości substancji bioaktywnych, wykazuje wyższą emisję fotonową we wszystkich mierzonych przedziałach interwału czasowego (rys.5). Różnica w dwóch skrajnych punktach wynosiła 21 fotonów. Na rysunku 6 przedstawione zostały zmiany w czasie liczby fotonów emitowanych przez próbki miodu wielokwiatowego i lipowego. W trzech zarejestrowanych okresach, tj. 301-600; 907-1200 i 1201-1500 sekund, wykresy te przyjmują niemal te same wartości.



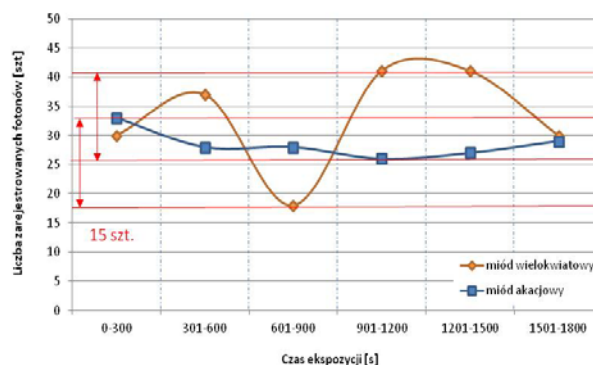
Rys.5. Porównanie charakterystyk czasowych próbek miodu akacjowego i lipowego

O sumarycznej różnicy na poziomie 48 fotonów decyduje przede wszystkim wyraźna różnica w trzecim z kolei przedziale czasu. Odnotowana rozbieżność między 601-900 sekundą wynosząca 29 fotonów, co stanowi ponad 60% wspomnianej różnicy między uzyskanymi wynikami.



Rys.6. Charakterystyka czasowa analizowanych próbek miodu wielokwiatowego i lipowego

Charakterystyki próbek miodu wielokwiatowego i akacjowego rozpoczynają i kończą się niemal w dokładnie tych samych punktach, oscylujących w pobliżu wartości 30 sztuk fotonów (rys.7). W pozostałych etapach przybierają jednak zupełnie odmienne wartości. Choć przebiegi czasowe są mocno zróżnicowane, to jednak występują w ich przypadku dwa jednakowe zakresy, oznaczające różnicę pomiędzy najwyższym punktem jednego wykresu, oraz najniższym drugiego, wynoszące 15 fotonów.



Rys.7. Charakterystyka czasowa analizowanych próbek miodu wielokwiatowego i akacjowego

### Podsumowanie

Stwierdzono, że metoda zliczania pojedynczych fotonów pozwala na identyfikację analizowanych gatunków miodów, ale wymaga porównywania emisji fotonów w poszczególnych odcinkach czasowych, które charakteryzuje zróżnicowanie przedmiotowej emisji.

Zaobserwowano wyższą emisję fotonów w miodach, które zawierały wyższą zawartość polifenoli, co pozwala sądzić, że metoda pomiaru liczby emitowanych fotonów z próbki miodu może być wykorzystywana jako alternatywny sposób pomiaru ilości związków fenolowych. Należy jednak pamiętać, że źródła literaturowe wskazują na duże zróżnicowanie zawartości związków bioaktywnych w obrębie jednego gatunku miodu, co wymaga parametryzacji całego sortymentu pod względem emisji fotonów.

**Autorzy:** mgr inż. Ernest Popardowski, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Wydział Inżynierii Produkcji i Energetyki, ul. Balicka 116B, 30-149 Kraków, e-mail: ernest.popardowski@urk.edu.pl, dr inż. Piotr Nawara, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Wydział Inżynierii Produkcji i Energetyki, ul. Balicka 116B, 30-149 Kraków, e-mail: rtnawara@cyf-kr.edu.pl, prof. dr hab. inż. Tadeusz Juliszewski, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Wydział Inżynierii Produkcji i Energetyki, ul. Balicka 116B, 30-149 Kraków, e-mail: tadeusz.juliszewski@urk.edu.pl, dr inż. Karolina Trzyniec, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Wydział Inżynierii Produkcji i Energetyki, ul. Balicka 116B, 30-149 Kraków, e-mail: karolina.trzyniec@urk.edu.pl, mgr inż. Anna Miernik, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Wydział Inżynierii Produkcji i Energetyki, ul. Balicka 116B, 30-149 Kraków, e-mail: miernikanna07@gmail.com, prof. Stepan Kovalyshyn PhD Lviv National Agrarian University, Vol. Velykogo str., 1, 80381 Dubliany, Ukraine, e-mail: stkovalyshyn@gmail.com, Ing. Marián Bujna, PhD Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Engineering, e-mail: korenko@mech.uniag.sk

#### LITERATURA

- [1] 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, Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego, 2 (2013), 65-69
- [2] White J.W., Composition of hone in Crane E., (Ed.), Honey: A comprehensive survey, (1979), 157-158
- [3] Wilczyńska A., Przybyłowski P.: Miód pszczoły-aktualne wiadomości, Zeszyty Naukowe Akademii Morskiej w Gdyni, 45 (2002), 114-119
- [4] Iglesias M.T., De Lorenzo M., Del Carmen Polo M., Martín-Alvarez P.J., Encarnacion P., Usefulness of amino acid composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area, Journal of agricultural and food chemistry, 52 (2004), 84-89
- [5] Krpan M., Marković K., Šarić G., Skoko B., Hruskar M., Vahčić N., Antioxidant activities and total phenolics of acacia honey, Czech Journal of Food Sciences, 27 (2009), 245-247
- [6] Zujko M.E., Witkowska A.M., Łapińska A., Właściwości antyoksydacyjne miodów pszczelich, Bromat. Chem. Toksykol., 38 (2005), n.1, 7-11
- [7] Nowakowski P., Łuczycza D., Howis M., Janiszewska K., Pruski K., Źródła pochodzenia miodu a jego wybrane cechy fizyko-chemiczne, Acta Agropychna 19 (2012), n.3, 641-651
- [8] Nawara P., Gliniak M., Popardowski E., Szczuka M., Trzyniec K., Control system of a prototype measurement system for the identification of ultra-low photonic emission of organic material, Progress in Applied Electrical Engineering, (2018), 176 – 180
- [9] Kielbasa P., Drózd T., Nawara P., Drózd M., Wykorzystanie emisji biofotonów do parametryzacji jakościowej produktów spożywczych, Przegląd Elektrotechniczny. 93 (2017), n.1, 153-156
- [10] Oziembłowski M., Drózd M., Kielbasa P., Drózd T., Gałowski A., Nawara P., Tabor S., Ultra słaba luminescencja (USL) jako potencjalna metoda oceny jakości żywności tradycyjnej, Przegląd Elektrotechniczny. 93 (2017), n. 12, 131–134.
- [11] Trzyniec K., Kielbasa P., Oziembłowski M., Drózd M., Nawara P., Posytek Z., Leja R. Using photons emission to evaluate the quality of apples. Przegląd Elektrotechniczny, (2017), nr 12, s. 183-187.
- [12] Borc R., Jaśkowska A., Dudziak A., Ultrasłaba emisja fotonowa z układów żywych, Politechnika Lubelska, (2015), ISBN 978-83-7947-164-5.
- [13] Laager F.M., Becker N.M., Park S.H., Soh K.S., Effects of Lac operon activation, deletion of the YhhA gene, and the removal of oxygen on the ultraweak photon emission of Escherichia coli, Electromagnetic Biology and Medicine, (2009), 28 pp. 240–249.
- [14] Nerudová M., Červinková K., Hašek J., Cifra M., Optical spectral analysis of ultra-weak photon emission from tissue culture and yeast cells, Proceedings of SPIE 2015, 9450, 94500O-1–94500O-7, doi: 10.1117/12.2069897.
- [15] Van Wijk E.P.A., Van der Greef J., Van Wijk R., Photon counts statistics in leukocyte cell dynamics, Journal of Physics Conference Series, (2011), 329, no. 012021
- [16] Salari V., Valian H., Bassereh H., Bókkon I., Barkhordari A., Ultraweak photon emission in the brain, Journal of Integrative Neuroscience (2015), 14, pp. 419-429.
- [17] Hideg E., Kobayashi M., Inaba H., Delayed Fluorescence and Ultraweak Light Emission from Isolated Chloroplasts (Comparison of Emission Spectra and Concentration Dependence), Plant and Cell Physiology, (1992), 33 pp. 689-693.
- [18] Karbowski L.M., Murugan N.J., Dotta B.T., Persinger M.A., Only 1% Melanoma Proportion in Non-Malignant Cells Exacerbates Photon Emissions: Implications for Tumor Growth and Metastases, International Journal of Cancer Research and Molecular Mechanisms, (2015), 1(2): doi http://dx.doi.org/10.16966/2381-3318.108
- [19] Kim J.D., Lim J., Sung B., Soh K.S., Biophoton Emission from Rat Liver, Journal of the Korean Physical Society, (2003), 42 pp. 427-430
- [20] Zhang J.G., Zhong L.F., Zhang M., Xia Y.X., Protection effects of procaine on oxidative stress and toxicities of renal cortical slices from rats caused by cisplatin in vitro, Archives of Toxicology, (1992), 66, pp. 354-358.
- [21] Kobayashi M., Takeda M., Sato T., Yamazaki Y., Kaneko K., Ito K.-I., Kato H., Inaba H., In vivo imaging of spontaneous ultraweak photon emission from a rat's brain correlated with cerebral energy metabolism and oxidative stress, Neuroscience Research, 1999, 34 pp. 103-113.
- [22] Hossu M., Ma L., Zou X., Chen W., Enhancement of biophoton emission of prostate cancer cells by Ag nanoparticles, Cancer Nanotechnology, 2013, 4 pp. 21–26.
- [23] Gałazka-Czarnecka I., Korzeniewska E., Czarnecki A., Sójka M., Kielbasa P., Drózd T. Evaluation of Quality of Eggs from Hens Kept in Caged and Free-Range Systems Using Traditional Methods and Ultra-Weak Luminescence. Applied Sciences, (2019), 9, 2430; doi:10.3390/app9122430.
- [24] Usa M., Kobayashi M., Scott R.Q., Hiratsuka R., Maeda T., Inaba H., Ultraweak biophoton emission and bioelectrical activity in plant tissues. Biological Luminescence, World Scientific Publishing, 1990, pp.117-130.