

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*ДЕПАРТАМЕНТ НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ
ПОЛИТИКИ И ОБРАЗОВАНИЯ*

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

**ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ
ИНСТРУМЕНТ ЭКСПЕРТНОЙ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА МЁДА**

Исследовательская работа

Игошин Александр Сергеевич

студент группы П-33-170

Института пищевых производств

**Научный
руководитель**

Лесовская М.И.,
доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры товароведения
и управления качеством продукции АПК

Красноярск 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА I. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ВЫЯВЛЕНИЯ	
ФАЛЬСИФИКАЦИЙ МЁДА	4
1.1. Пищевая ценность натурального мёда.....	4
1.2. Основные способы фальсификации мёда	7
1.3. Проблема выявления фальсифицированного мёда	8
ГЛАВА II. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ АНАЛИЗА.....	11
2.1. Объекты анализа.....	11
2.2. Методика хемилюминесцентного анализа	11
2.3. Методики аналитического определения компонентов мёда.....	12
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	15
3.1. Антиоксидантная активность	
фермерских и ритейл-образцов мёда	15
3.2. Содержание редокс-активных компонентов	
в фермерских и ритейл-образцах мёда.....	17
3.3. Хемилюминесцентный анализ влияния мёда	
на продукцию биогенных радикалов.....	24
3.4. Отличия фермерских и ритейл-образцов	
от референтных значений.....	26
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	27
ВЫВОДЫ	28
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	29
ПРИЛОЖЕНИЯ	32

ВВЕДЕНИЕ

Пчелиный мёд представляет собой редкое сочетание вкусовых, ароматических и целебных свойств. Мёд востребован и как ценный ингредиент, и как самостоятельный продукт питания, представлен неограниченным множеством сортов вследствие особенностей образования в условиях уникальной биофабрики, какой является организм медоносной пчелы, при бесконечной вариативности природного сырья – цветочной пыльцы. Натуральный мёд был валютой в Древнем Египте, Древнем Риме и в Древнерусском государстве, и в наше время остаётся дорогостоящим продуктом питания, поскольку пчеловодство несовместимо с крупным агропромышленным производством и, по-видимому, всегда будет сохранять крафтовый характер. Поддержание высокого качества продукции при этом подвержено множественным рискам. Качество природного мёда может снижаться по ряду объективных причин: размывание генотипа пчелиных семей при ненаправленной селекции и стихийном районировании; пожары и задымление, когда пчёлы гибнут целыми семьями; проправы медоносов пестицидами и агрохимикатами; токсичные препараты против пчелиных болезней, снижающие мёдообразующую способность пчёл.

Сопутствующим технологическим фактором издавно было использование искусственных подкормок пчёл сахарным сиропом, что позволяло недобросовестным производителям извлекать прибыль. Масштабы подобных и иных фальсификаций многократно возросли на современном этапе, когда при обезличенных поставках в торговую сеть недобросовестные изготовители используют различные разбавители и добавки, подменяющие природный пчелиный мёд суррогатом. Существующие методы распознавания фальсификата неспецифичны и мало информативны. Рекомендации покупать мёд на пасеках подходят не всем. Поэтому высоко востребованы надёжные инструментальные методы оценки качества мёда.

Целью настоящей работы было оценить перспективы применения хемилюминесцентного анализа для первичного скрининга и выявления образцов мёда с негарантированным качеством.

ГЛАВА I. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ФАЛЬСИФИКАЦИЙ МЁДА

1.1. Пищевая ценность натурального мёда

Мёд является наиболее древним лакомством, сладкий вкус которого стал известен человеку задолго до появления сахарозы. Древние греки называли мёд амброзией («пищей богов»), Ксенофонт Аквинский описал свойства опьяняющего мёда из олеандра, азалии, аконита, лавра и наперстянки в Колхиде (долина Батуми), средневековый целитель Авиценна называл его лекарством «алтерантией», сберегающим молодость и доставляющим удовольствие, в Китае получали твёрдые пластинки целебного женщиневого мёда [1]. Бортничество, древний славянский промысел, со временем перерос в современное пчеловодство, по экипировке немногим отличающееся от старинного ремесла.

На современном этапе лучшими отечественными разновидностями мёда с выраженной биологической активностью считаются светлые сорта: донниковый, акациевый (в жидком виде – прозрачный, в засахаренном – белые кристаллы), липовый (светло-желтый или зеленоватый); яблоневый (светло-желтый). В темных сортах содержится больше минеральных солей (*Mn, Fe, Cu*). К этой группе относится гречишный мёд (от темно-желтого до красноватого и темно-коричневого), который наиболее богат белками и железом, он «щекочет» горло при дегустации. Есть специфические ароматические сорта, например цитрусовый. Есть сорта с неприятным запахом, например табачный мёд. Если около пасеки нет нектарных источников, пчелы собирают падь – сладковатую жидкость, выделяемую насекомыми-фитофагами (тли, червецы и др.). Такой мёд имеет очень темный цвет и горьковатый привкус, его используют в кондитерском производстве [2].

Мёд относится к числу функциональных нутриентов, традиционно входящих в сбалансированный рацион человека. В соответствии с ГОСТ 19792-2017 мёд определяют как продукт, предназначенный для употребления в пищу, реализации через торговую сеть и предприятия общественного питания, а также для

использования в пищевой промышленности [3, с.1]. Мёд является источником природных моносахаридов и богатого набора биологически активных компонентов различной химической природы.

Мёд имеет высокую энергетическую ценность в диапазоне 280...322 ккал (в среднем 300 ккал/100 г) при суммарном содержании белковых веществ 0,1...0,8 г%, углеводов – 77,0...80,3 г%; растворённых веществ – 80% при влажности не более 20% [4]. Рекомендуемая доза суточного приёма – до 70 г взрослым и до 40 г детям в смеси с фруктовыми и овощными соками, чаем и молоком, минеральной водой.

По химическому составу мёд представляет собой инвертную смесь глюкозы и фруктозы, поскольку в присутствии фермента инвертазы дисахариды гидролизуются на сладкую смесь равных количеств глюкозы и фруктозы); ферменты (доминируют витамин С, тиамин и каротин); макро- и микроэлементы (*Ca, Na, K, Mg, Fe, Cl, P, S, I*), при этом содержание и соотношение элементов близко к таковому в сыворотке крови человека; органические кислоты (яблочная, лимонная, щавелевая, молочная, винная); белки с гормональной активностью; витамины *B₂, B₆, H, K*, пантотенат, фолат; биогенные стимуляторы. Мед обладает антибактериальными свойствами, никогда не плесневеет, несмотря на прекрасную питательную среду для дрожжевых клеток. Этот феномен объясняют высоким содержанием сахара в сочетании с ферментами и ингибиторами окислительно-восстановительных процессов, в первую очередь свободно-радикальных [5].

При высокой гетерогенности компонентов мёда их объединяет функциональная способность регулировать скорость окислительно-восстановительных процессов, основы поддержания гомеостаза на всех уровнях биологической организации. В наибольшей степени этими свойствами обладают гидрофильные витамины (в первую очередь аскорбиновая кислота), минеральные компоненты (приоритетно ионы Fe^{2+}/Fe^{3+}), железосодержащие ферменты – цитохромы, редуцирующие соединения (моносахара и большинство дисахаридов), а также полиморфный комплекс органических кислот, гликозидов и биофлавоноидов.

Среди биологических редокс-процессов особое значение имеют цепные реакции, связанные с выработкой биогенных свободных радикалов. Разнообразные сочетания в составе мёда большого числа компонентов, в зависимости от условий стимулирующих или тормозящих продукцию свободных радикалов, формирует антиоксидантную или прооксидантную способность как один из параметров качества мёда в целом. Оценка этой способности является необходимым компонентом интегральной биологической ценности данного продукта.

В соответствии с действующим ГОСТ 19792-2017 инструментальная оценка качества мёда основана на полипараметрическом подходе, когда состав и содержание химических компонентов определяют по отдельности (сахароза, редуцирующие сахара, свободная кислотность и др.). Так, в числе контролируемых параметров находятся, в частности, показатели активной кислотности (отражает содержание органических кислот), содержания аскорбиновой кислоты, сахарозы, общего железа (окисленная форма), суммарного количества редуцирующих соединений (являющихся донорами электронов в редокс-процессах). На рис. 1.1 объединены усреднённые данные, полученные в исследованиях различных авторов с использованием природного мёда подтверждённой аутентичности и соответственно гарантированного качества [6–8].

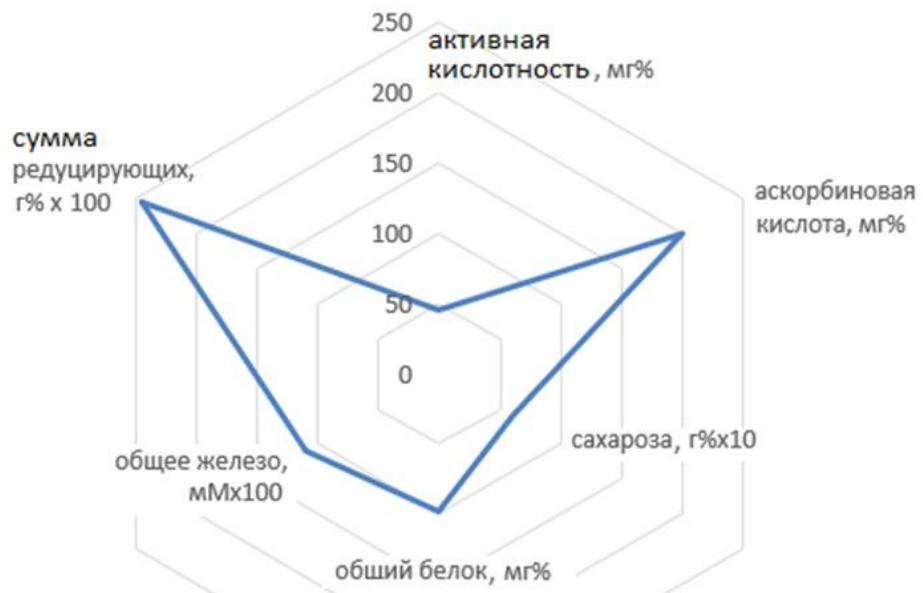


Рис. 1.1. Обобщённые показатели качества натурального мёда (по данным литературы, пояснения в тексте)

1.2. Основные способы фальсификации мёда

Фальсифицированный мёд – это продукт, созданный без участия пчёл полностью или частично. Мёд является продуктом, фальсифицируемым настолько часто, что существует целая классификация способов подделки. Различают видовую (ассортиментную), качественную, количественную (квалиметрическую), стоимостную информационную фальсификации. Наибольшее значение имеет ассортиментная подделка, при которой происходит полная или частичная замена компонентов единицами другого вида или наименования с сохранением сходства по одному или нескольким признакам [9].

Некоторые варианты подмены обнаруживаются визуально (механические примеси мела или муки), другие можно выявить только с помощью физических или физико-химических методов (избыточная влажность, добавление низкоценных заменителей, замена натурального продукта имитатором). Густой сахарный сироп (инвертный сахар [10]) подкрашивают в желтый или коричневый цвет, добавляют ложку натурального меда для аромата, а для видимости – кусочки сотов и пчелиный подмор.

При ассортиментной фальсификации используют различные заменители, как пищевые (манная крупа, мука, крахмал, крахмальная или глюкозная патока, сахарный сироп, декстрины, глицерин, желатин, сахарин, инвертный сироп), так и непищевые (гипс, мел, алебастр, известь, древесные опилки).

При качественной фальсификации подделка производится с помощью пересортицы, а также с использованием добавок, улучшающих органолептические свойства. Такими добавками являются патока, инвертный сироп, мёд с примесью сахарозы, а также сахарный мёд, полученный при искусственном подкармливании пчёл сахарным сиропом [11]. Несмотря на то, что сахарный мёд производят пчёлы, он не считается натуральным продуктом, а его продажа запрещена.

Квалиметрическая фальсификация меда заключается в частичной замене натурального продукта (например, добавление к новому мёду старого, иногда с недопустимыми дефектами – брожение, несвойственные привкусы и запахи).

1.3. Способы выявления фальсифицированного мёда

В качестве наиболее доступных и быстрых способов распознавания фальсифицированного мёда, которые тиражируются различными изданиями для информирования потребителей, предлагаются следующие манипуляции.

Для проверки на влажность предлагается окунуть в мёд химический карандаш и затем проверить, оставляет ли он на бумаге окрашенный синий след; предлагаются также варианты с промокательной бумагой или черным сухариком [12]. Серьёзные издания, учебники и даже рейтинговые популярные издания (например, журнал «Химия и жизнь-XXI век») не позволяют себе опускаться до критики такой очевидной мифологии, но рядовой потребитель принимает подобные советы всерьёз. В то же время элементарное знакомство с физикой и химией должно обнаружить несостоительность подобных советов. Действительно, химический карандаш оставит влажный след в любом случае, поскольку для размокания крахмалей в составе грифеля (эозин, родамин, азуролин) достаточно всего 5% влаги, количество которой в натуральном мёде составляет 14...20%. Если в поддельном мёде содержание воды превышает этот уровень, то в результате неустойчивости коллоидной системы, которой является мёд, нарушение водного баланса будет доступно визуальной оценке, без использования карандаша, промокательной бумаги или сухарика.

Распространённым приёмом на медовых рынках является определение вязкости мёда с помощью специальной деревянной нарезной ложки, в отсутствие которой пользуются обычными столовыми ложками. Мёд зачерпывают и быстро поворачивают вокруг оси. Полагают, что зрелый мед с нормальной влажностью при этом наворачивается на ложку тяжами, а незрелый (с повышенным содержанием воды) стекает струями. Как и предыдущий способ, этот приём больше относится к сфере иллюзиона, чем к реальной проверке качества. Вискозиметрическое определение качества мёда требует специального оборудования и узкого температурного диапазона для исследования образца [13].

Рекомендации по распознаванию загущающих примесей в мёде с помощью йода имеют большое распространение, но вызывают столь же большие сомнения.

Йодометрический способ определения суммарного количества окислителей является одним из видов редоксметрии, однако эта аналитическая процедура требует стандартизованных условий, статистического подтверждения и в домашних условиях не применяется.

Экспрессный органолептический анализ проводят по показателям вкуса, запаха и прозрачности [14]. В стеклянный стаканчик помещают 30–40 г меда, закрывают плотно крышкой и в течение 10 мин нагревают на водяной бане до 30–36°C. Затем крышку снимают и сразу же определяют запах меда. Для определения вкуса мед нагревают до 45–50°C. Для натуральных медов характерно раздражающее действие на слизистую оболочку полости рта и глотки различной интенсивности полифенольных соединений, перешедших в мед из нектара. Натуральный мед из-за присутствия белковых веществ имеет мутность (опалесценцию), которая увеличивается при зарождении кристаллов глюкозы. Прозрачность меда указывает на его возможную фальсификацию, т.е. подделку.

Наиболее сложно выявляется сахарный мёд. Для этого органолептически анализируют аромат (выявляют запах старых сот), консистенци (у свежеоткаченного меда – жидккая, при хранении – густая, клейкая, студнеобразная), вкус (пресный, пустой), а также пыльцевой состав (отсутствие доминирующей пыльцы одного вида растений). Показатель общей кислотности у фальсификата не превышает один градус, зольность – значительно ниже 0,1%, а поляриметрический анализ выявляет правое вращение плоскополяризованного света. Все эти методы либо плохо воспроизводимы (органолептика), либо требуют специализированных лабораторных условий (микроскопирование, поляриметрия).

Одним из наиболее распространённых химических способов выявления фальсификата является качественная реакция на оксиметилфурфурол. При соединении с концентрированной соляной кислотой он приобретает вишнево-красный цвет. Низкое диастазное число также является свидетельством фальсификации меда инвертированным сахаром. Суррогат, полученный на основе инвертного сиропа, легко распознается на вкус. Напротив, если пчел кормят сахарным сиропом, полученный мёд на вкус не отличим от настоящего, но целебными свойствами не

обладает. Для большинства видов ассортиментной фальсификации достоверные способы обнаружения отсутствуют. Так, при полифлёрной фальсификации под брендом «горный мёд» могут выдавать луговой или лесной, а под видом «башкирского» любой другой. Современные бортники широко используют передвижные пасеки, которые перемешаются в соответствии с календарём цветения медоносов, поэтому получаемый мёд принципиально не может быть монофлёрным. Теоретически проверка может быть проведена с помощью радиоуглеродного анализа, что на практике не осуществимо.

Наиболее актуальной проблемой является то, что множественный параметрический подход, равно как и органолептический анализ, не позволяют судить о биологической ценности продукта. При этом качество мёда определяется именно его биологической ценностью. Среди измеряемых параметров наиболее доступным может быть критерий функциональной активности в отношении биогенных свободных радикалов. Действительно, фальсификация мёда выражается в нарушении состава и соотношения природного набора биологически активных компонентов. Это приводит к потере природным продуктом функциональных свойств, которые не сводятся к сумме свойств компонентов смеси. Поэтому признаки фальсификации следует искать не в химическом составе мёда, а в его функциональной активности. В настоящее время количество фальсификаторов и суррогатов, распространяемых через торговую сеть, беспрепятственно нарастает в условиях отсутствия надёжных экспрессных инструментальных методов контроля качества.

Решение данной проблемы может быть связано с использованием хемилюминесцентного (ХЛ) анализа. Его принцип состоит в оценке антиоксидантной активности тест-объекта по его способности влиять на продукцию свободных радикалов в модельных условиях. Простой и удобной моделью является реакция свободнорадикального распада H_2O_2 (реакция Фентона). Энергия цепной химической реакции способна превращаться в световую форму с участием люминола $C_8H_7N_3O_2$; подсчёт числа выделяемых световых квантов может осуществляться с помощью хемилюминометра [15].

ГЛАВА II. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ АНАЛИЗА

2.1. Объекты анализа

Объектами исследования являлись пять видов мёда от индивидуальных предпринимателей-пчеловодов (фермер-образцы); четыре вида мёда, приобретённых в розничной сети (ритейл-образцы); инвертный сироп, приготовленный по общезвестному способу в качестве «нулевого контроля» (рис. 2.1).



Рис. 2.1. Объекты исследования

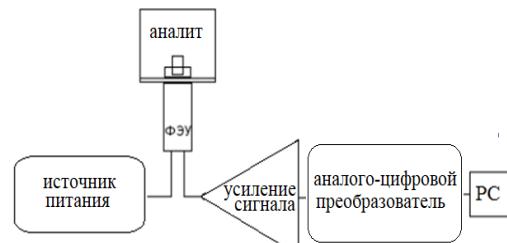
Лабораторную пробу мёда получали внесением и тщательным перемешиванием навески массой 5 г в 100 мл дистиллированной воды, объём аликовты составлял 5 мл.

2.2. Методика хемилюминесцентного анализа

В работе использован РС-управляемый биохемилюминометр БХЛМ-3607, СКТБ «Наука», Красноярск (рис. 2.2).



а



б

Рис. 2.2. Общий вид (а) и схема (б) автоматизированного комплекса

для хемилюминесцентного анализа

Прибор работает в режиме подсчета световых квантов. В работе использовали модель продукции активных форм кислорода (АФК), основанную на реакции Фентона по реакции [16]:



Источником свободных радикалов являлся 0,1 н. раствор пероксида водорода (100 мкл), распад которого инициировали внесением в инкубационную среду 50 мкл 1 мМ раствора FeSO_4 . Выработка АФК была многократно усиlena 1 мМ люминолом (150 мкл, все реагенты – «Сигма», Новосибирск). В инкубационную среду вносили 50 мкл дистиллированной воды (контроль) или анализируемых образцов мёда. Антиоксидантную (АО) или прооксидантную активность соединений оценивали по направлению изменения высоты, времени пика ХЛ (I, имп./с; T_{\max} , мин.) или светосуммы (S, тыс. имп.). Методика проведения анализа подробно описана [17, с. 39-42].

2.3. Методики аналитического определения компонентов мёда

Химический анализ редокс-активных соединений в составе исследуемых образцов мёда проводили с использованием аналитических и инструментальных методов, описанных в общедоступных источниках [18, 19] и регламентах государственных стандартов [20–22].

Уровень активной кислотности (содержание свободных катионов водорода в растворе, мера общей кислотности) определяли методом алкалиметрического титрования 0,1 н. раствором гидроксида натрия с фенолфталеином в качестве индикатора. Титрование проводили в нескольких повторностях до появления сходящихся значений.

Содержание витамина С определяли по реакции восстановления метиленовой сини под влиянием аскорбиновой кислоты (рис. 2.3) с последующим колориметрированием окрашенного раствора и определением концентрации по калибровочному графику (Приложение 1).

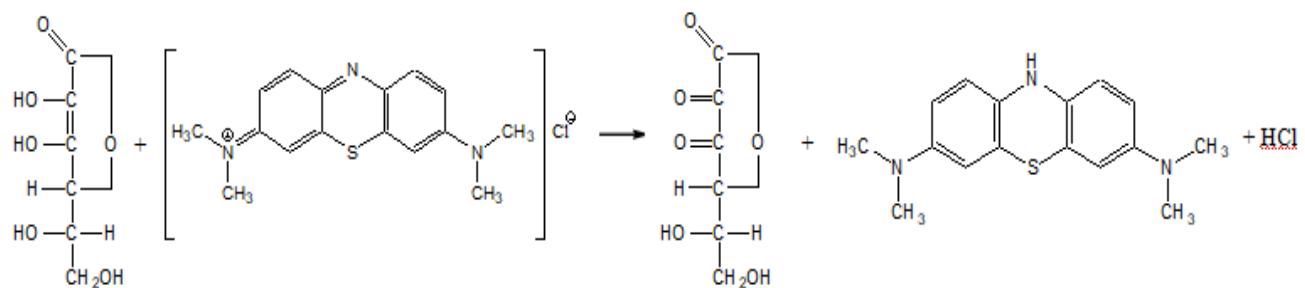


Рис. 2.3. Реакция восстановления метиленовой сини
при взаимодействии с аскорбиновой кислотой

В работе были использованы 001% раствор метиленовой синей и 10%-ный раствор бикарбоната натрия. Для приготовления контрольных и анализируемых растворов 2,5 мл раствора метиленовой сини смешивали с 2,5 мл раствора бикарбоната натрия, добавляли 5 мл пробы и нагревали над пламенем горелки. С помощью калибровочного графика определяли содержание аскорбиновой кислоты в образцах.

Содержание сахарозы определяли с помощью рефрактометра *RZ113Brix-ATC* с автоматической компенсацией температуры в диапазоне 10...30°C (рис. 2.4).

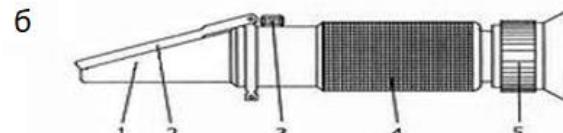


Схема рефрактометра **RHW-25Brix-ATC**

1—призма, 2—стеклянная крышка,

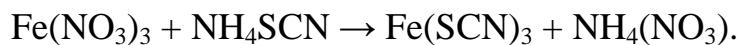
3—регулировочный винт, 4—корпус, 5—окуляр

Рис. 2.4. Рефрактометр *RZ113Brix-ATC*
для измерения содержания сахарозы в растворе

Содержание белковых соединений определяли биуретовым методом, который основан на образовании фиолетового биуретового комплексного соединения посредством координационных связей пептидных групп с двухвалентными ионами меди. Готовили биуретовый реактив, последовательно растворяя 1,5 мл 10 н. раствора KOH и 2,5 г сегнетовой соли (натриево-калиевой соли винной кислоты) в 90 мл дистиллированной воды в колбе объёмом 100 мл. Затем при медленном пе-

ремешивании добавляли 3 мл 4%-ного раствора CuSO_4 и доводили объём раствора до метки. К аликовотам стандартных растворов известной концентрации, а также анализируемых образцов добавляли равный объём биуретового реагента. Полученный раствор колориметрировали на ФЭК при 540 нм, затем с помощью калибровочного графика (Приложение 2) определяли концентрацию белковых соединений.

Суммарное содержание железа в максимальной степени окисления определяли методом роданометрии по реакции:



К аликовоте (5 мл) добавляли 5 мл разб. HNO_3 , на 20 минут помещали на водяную баню при 50...60°C, затем колбу оставляли до остывания, после чего раствор колориметрировали на ФЭК при 540 нм. Для выполнения работы готовили серию стандартных растворов известной концентрации, по результатам колориметрического измерения строили калибровочный график (рис. Приложение 3), с помощью которого затем определяли концентрацию железа в анализируемой пробе.

Содержание редуцирующих соединений определяли перманганатометрическим титрованием. Концентрацию титранта (KMnO_4) стандартизировали по 0,1 н раствору щавелевой кислоты. К аликовоте (5 мл) добавляли 5 мл 1 н. раствора H_2SO_4 , колбу помещали на 2...3 мин на водяную баню (70...80°C), затем титровали в нескольких повторностях до получения не менее двух сходящихся значений.

2.3. Статистическая обработка результатов

Запись и хранение результатов, статистическую обработку кинетограмм выполняли с использованием пакета программ BLM07 и BLM07PR. Статистическая обработка (расчёт средневыборочных величин и ошибки средней, определение значимости межвыборочных различий) проводилась с применением критерия Стьюдента (распределение выборочных данных нормальное, дисперсии сопоставимы) с доверительной вероятностью 0,95.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Антиоксидантная активность фермерских и ритейл-образцов мёда

На рис. 3.1а,б (интенсивность ХЛ) и 3.1в (светосумма) представлены результаты измерения антиоксидантной активности различных образцов натурального мёда от пасечников (фермер-образцы) и мёда от сетевых поставщиков (ритейл-образцы). Сводные кинетограммы по всем образцам приведены в Приложении 4.

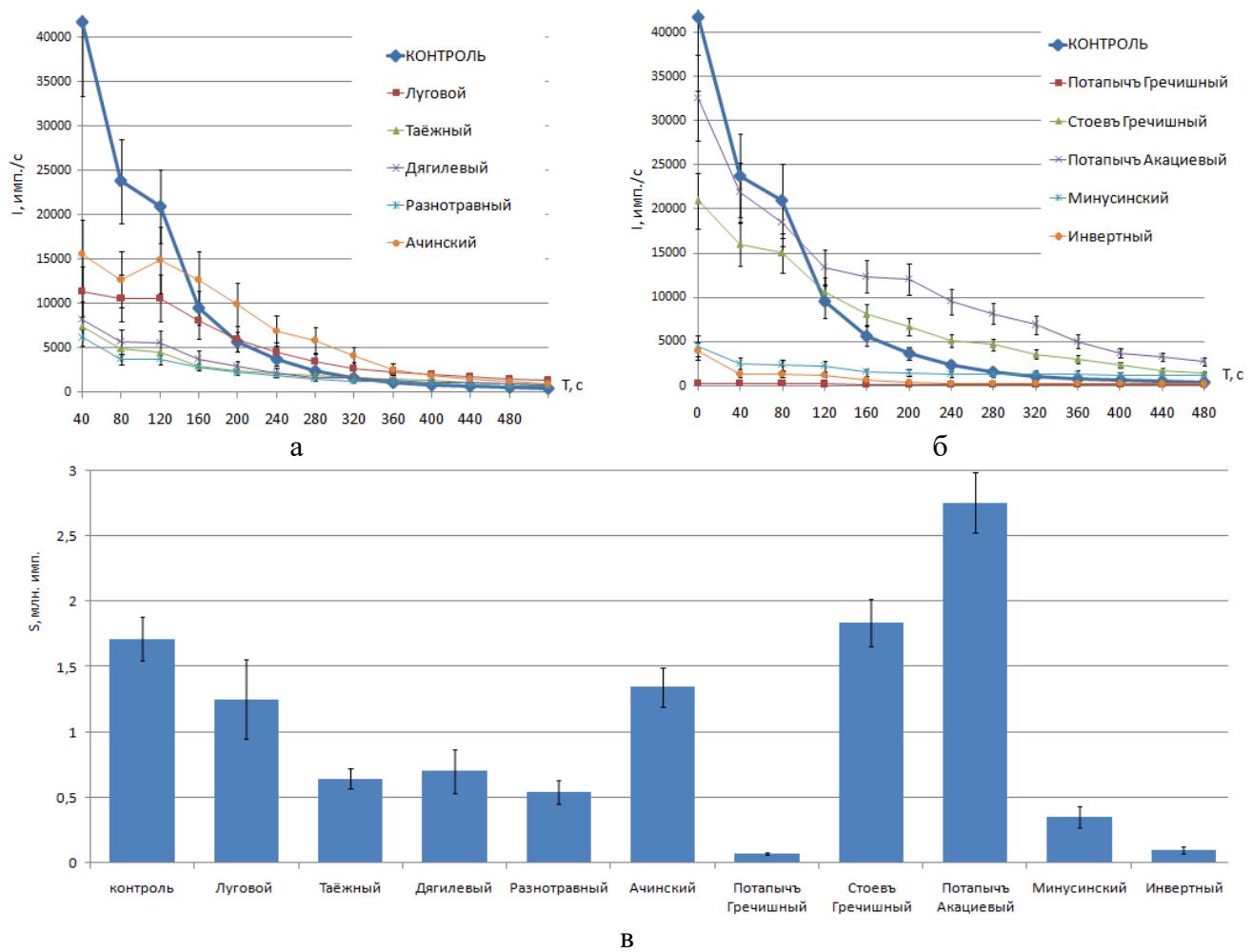


Рис. 3.1. Тушение хемилюминесценции в модели Фентона под влиянием различных образцов мёда: а – ХЛ-активность фермер-образцов, б – ХЛ-активность ритейл-образцов, в – светосумма

Общей особенностью кинетики процесса в большинстве случаев было снижение скорости продукции АФК. В контроле, где реакционная среда не содержит никаких антиоксидантов, удаление свободных радикалов происходит по наиболее простому механизму – рекомбинация и взаимное уничтожение радикальных ча-

стиц после свободнорадикального распада H_2O_2 [23]. На фоне контроля другие кинетограммы имеют более сложный характер. Это связано с тем, что в модельную систему добавляется органический продукт, содержащий большое количество биологически активных соединений: витаминов, органических кислот, ферментов, микроэлементов, углеводов, полифенолов. Все перечисленные группы соединений обладают регуляторной способностью влиять на скорость окисительно-восстановительных процессов, включая цепное свободнорадикальное окисление. Поэтому по высоте пика, светосумме и характеру кинетограммы можно судить о суммарном содержании антиоксидантов и прооксидантов в образце, а также об их соотношении и преобладающем характере влияния объекта на продукцию свободных радикалов.

На рис. 1а отображены результаты ХЛ-анализа образцов фермерского мёда («Луговой», «Таёжный», «Дягилевый», «Разнотравный», «Ачинский»). Судя по уровню светосуммы за время наблюдения (рис. 1в), снижение ХЛ (%) относительно контроля для этих образцов составило, соответственно: 26, 62, 59, 68, 21.

Из приведённых данных видно, что образцы натурального пасечного мёда в различной степени обладают антиоксидантной активностью. Минимальной АО-активностью характеризовались два образца мёда – «Ачинский» и «Луговой» (уровень светосуммы ниже контроля на 26 и 21%, соответственно). У трёх других образцов натурального мёда («Таёжный», «Дягилевый», «Разнотравный») выявлена высокая АО-активность. Уровень светосуммы был ниже контроля на 62%, 59% и 68% соответственно. Наиболее сильными АО-свойствами характеризовался мёд «Разнотравный». Судя по характеру кинетограмм, можно предположить, что в составе трёх указанных образцов содержится наибольшее количество соединений с антиоксидантной активностью различного механизма действия.

В отличие от группы крафтовых медов, результаты ХЛ-анализа группы промышленных образцов (рис. 3.1б) были неоднородными и указывали на наличие у тест-объектов диаметрально противоположных радикал-направленных свойств. Так, под их влиянием двух образцов мёда («Стоев Гречишный» и «Потапов Акациевый») производство АФК в реакционной среде увеличилось на 7% и 60%, со-

ответственно. Таким образом, у этих объектов выявлены прооксиданные свойства. Напротив, под влиянием двух других образцов мёда («Потапов Гречишный» и «Минусинский») производство АФК резко подавлялось на 95% и 80%, соответственно. По сравнению с уровнем антиоксидантной активности, установленной у образцов натурального мёда, такие эффекты выглядят аномально и вызывают обоснованные сомнения в том, что исходное природное качество природного продукта не подвергалось технологическим вмешательствам (фальсификациям).

Таким образом, все образцы натурального мёда в большей или меньшей степени характеризовались антиоксидантной активностью. Образцы, приобретённые через розничную сеть, характеризовались широким диапазоном и разнонаправленностью влияния на продукцию свободных радикалов. Логично предположить, что это может быть связано не только с природной основой продукта, но и с различными способами фальсификации меда, поступающего в розничную сеть.

Среди наиболее распространённых способов фальсификации мёда известны добавки сахарного сиропа, крахмальной и свекловичной патоки, сахарины, мела, муки, желатина и других веществ [24]. Поэтому для подтверждения и интерпретации результатов, полученных с помощью ХЛ-анализа, необходимо сравнить исследуемые образцы по таким субстратам редокс-активности, как содержание органических кислот, сахарозы, аскорбиновой кислоты, суммарного белка, ионов железа в различной степени окисления.

3.2. Содержание редокс-активных компонентов

в фермерских и ритейл-образцах мёда

3.2.1. Уровень активной кислотности

В тех случаях, когда фальсификация продукта осуществляется добавлением инвертного сиропа к природному мёду (либо добавлением природного мёда к инвертному сиропу) следует ожидать, что в поддельном продукте уровень кислотности будет выше среднего уровня, соответствующего природным образцам [25]. На рис. 3.2 отражены результаты определения активной кислотности исследуемых образцов мёда.

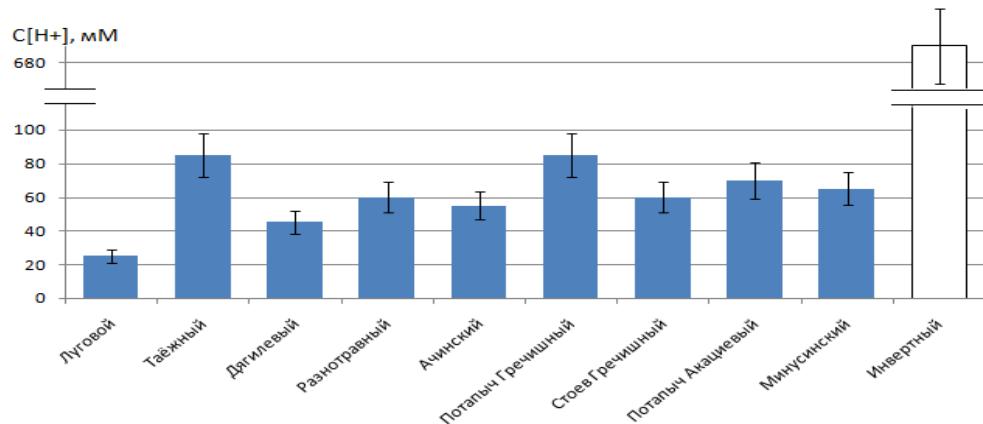


Рис. 3.2. Активная кислотность образцов мёда

В качестве фоновой величины приведена активная кислотность инвертного сиропа, для получения которого проводят кислотный гидролиз сахарозы. Уровень активной кислотности данного объекта был ожидаемо высоким, исходя из технологии приготовления сиропа с использованием лимонной кислоты. Образцы фермерского и сетевого мёда различались по среднему значению активной кислотности, хотя эти различия не были статистически достоверными (рис. 3.3).

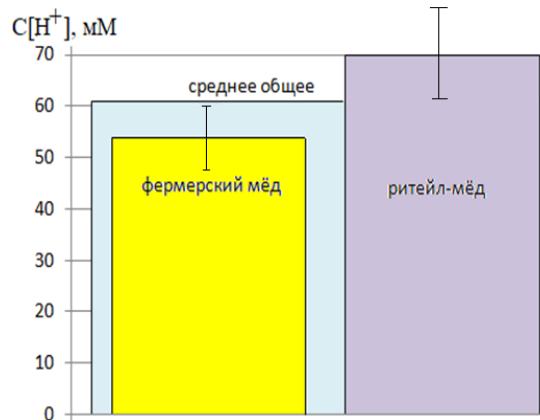


Рис. 3.3. Среднее значение активной кислотности по рассмотренным выборкам

Можно предполагать, что в образцах мёда, приобретённого в магазине, могли присутствовать подкисляющие добавки нетоксичных и экономически доступных соединений, изначально не присутствовавших в природном продукте, например органические кислоты из числа биохимических компонентов гликолиза и цикла Кребса. Увеличение кислотности под влиянием продуктов брожения возможно при внесении в продукт фальсифицирующих добавок в виде водных растворов

[26], среди которых одним из самых распространённых является раствор аскорбиновой кислоты.

Действительно, содержание данного компонента в обеих группах образцов различалось в широком диапазоне (рис. 3.4).

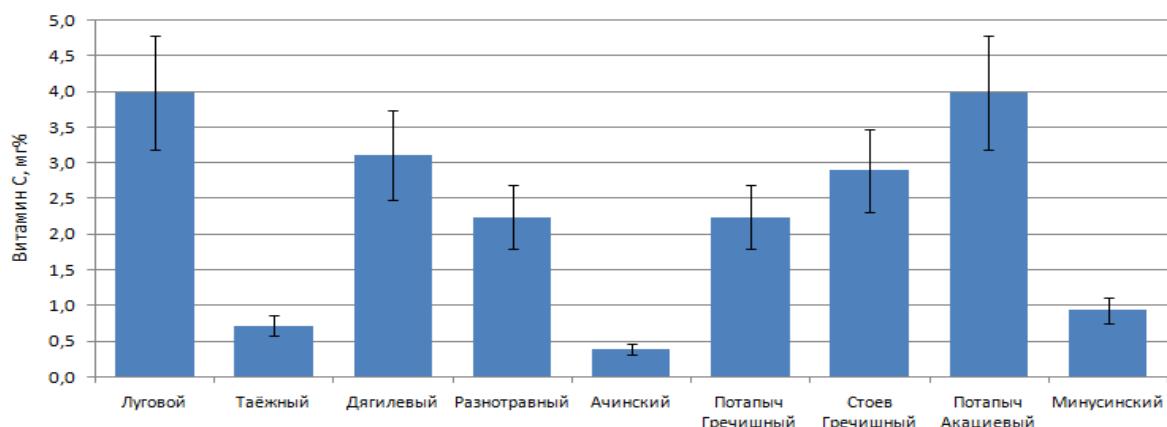


Рис. 3.4. Содержание аскорбиновой кислоты в образцах мёда

Средние значения составили: по всем исследованным образцам – 4,6 мг%; по ритейл-образцам – 2,5 мг%, по фермер-образцам – 2,1 мг% ($p<0,05$) (рис. 3.5).

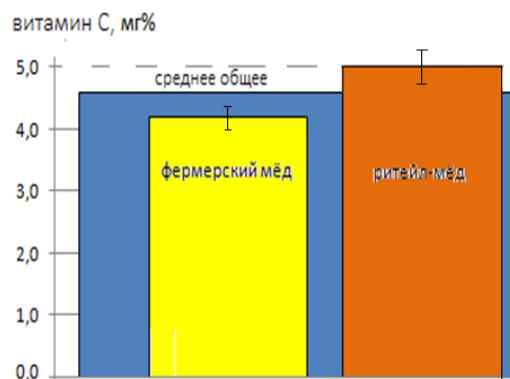


Рис. 3.5. Средние значения содержания аскорбиновой кислоты по всем образцам и раздельно по выборкам

Различие между средними показателями не столь велико, но позволяет делать предположения о возможных добавках витамина С в продукт пчеловодства. Два вида магазинного мёда «Потапыч Акациевый» и «Стоев Гречишный» являлись в этом отношении «подозрительными». В этих образцах обнаружено наибольшее содержание аскорбиновой кислоты. Именно данные аналиты характеризовались прооксидантным эффектом в модельной системе

Фентона. Аскорбиновая кислота относится к соединениям с наиболее лабильной радикал-направленной функцией, способным в зависимости от условий и концентрации из антиоксидантнов превращаться в прооксиданты [27].

В группе фермер-образцов относительно высоким содержанием аскорбиновой кислоты характеризовался мёд «Дягилевый», у которого были выявлены АО-свойства, как и у всей группы рассмотренных натуральных медов. В то же время у ритейл-образцов «Стоевъ Гречишный» и «Потапычъ Акациевый», напротив, были выявлены прооксидантные свойства (усиливающие продукцию свободных радикалов).

Таким образом, по результатам проведённого анализа можно высказать предположение, что повышенное содержание аскорбиновой кислоты в указанных образцах обусловлено не природными причинами, а технологическими манипуляциями. При этом с помощью ХЛ-анализа эти отклонения были выявлены сразу.

Результаты определения массовой доли сахарозы в исследуемых образцах приведены на рис. 3.6.

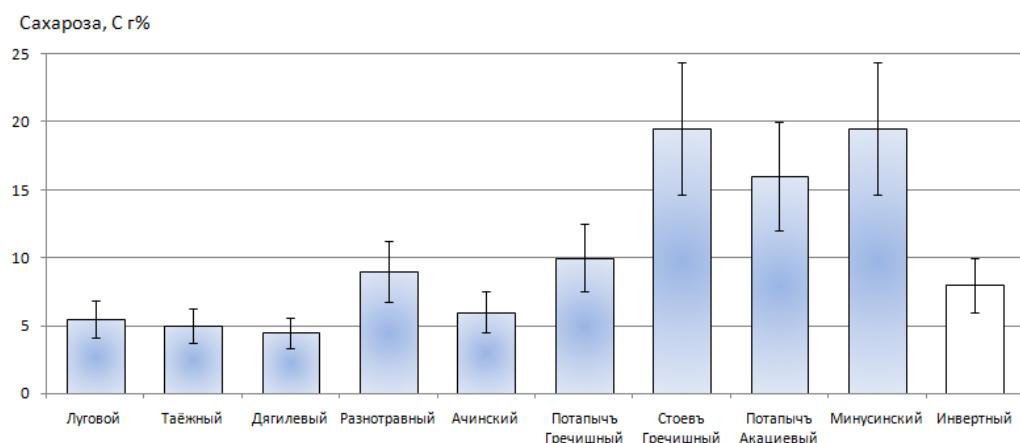


Рис. 3.6. Содержание сахарозы в образцах мёда

Как следует из полученных результатов, в магазинных видах мёда показатели содержания сахарозы превосходили значения в искусственно полученном инвертном сиропе с коэффициентом кратности от 1,4 («Потапычъ Гречишный») до 2,7 («Стоевъ Гречишный» и «Минусинский»). Напротив, содержание сахарозы в образцах фермерского мёда было ниже, чем в инвертном сиропе, на 30%

(«Ачинский»)...50–80% («Луговой», «Таёжный», «Дягилевый»), а в «Разнотравном» достоверно не отличалось от него. Таким образом, сопоставление результатов по выборкам показывает достоверное различие по содержанию сахарозы в фермерских и ритейл-образцах: 6,00 и 16,25 г%, соответственно. Повышенное содержание сахарозы в составе мёда могут быть следствием различных технологических причин – внесение сиропа или патоки в готовый продукт; незрелый мёд; искусственные подкормки пчёл и т.д. Общим результатом при этом будет снижение пищевой и биологической ценности мёда, т.е. потеря природного качества продукта.

Важно, что при проведении ХЛ-анализа наиболее «выпадающими» значениями (аномально низкая АО-активность, «Потапычъ Гречишный» и «Минусинский», либо прооксидантная активность – «Стоевъ Гречишный») характеризовались именно те ритейл-образцы, в которых содержание сахарозы кратно превосходило значения в группе фермер-образцов.

Из литературы известно, что наряду с внесением сиропа или патоки в фальсифицированный мёд добавляют сыворотку или мучную супензию. В этом случае в составе продукта будет увеличено содержание протеинов. Поэтому в исследуемых образцах было исследовано содержание общего белка. Полученные результаты представлены на рис. 3.7.

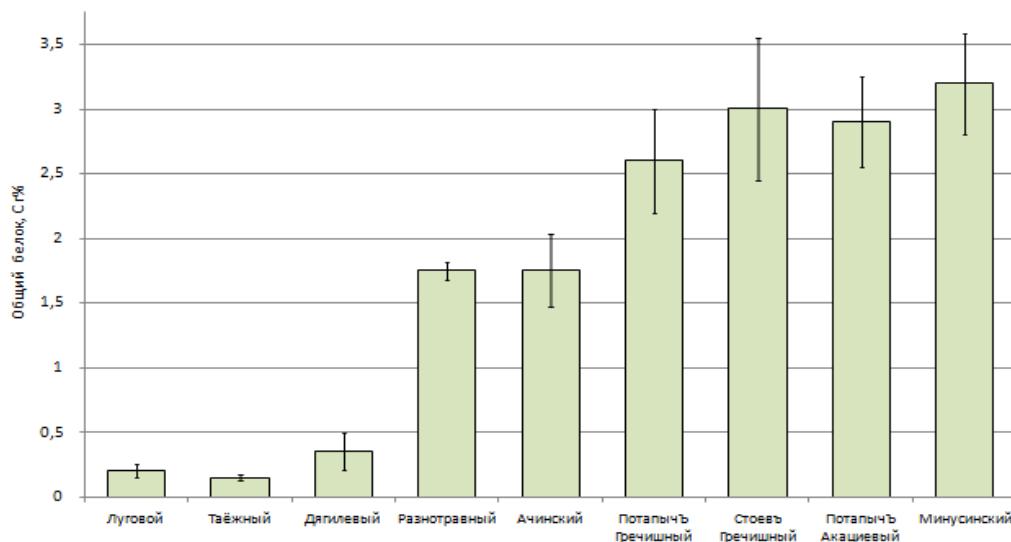


Рис. 3.7. Содержание общего белка в образцах мёда

Фермер-образцы характеризовались содержанием белковых соединений в пределах 0,2...1,75%; ритейл-образцы – в пределах 2,5...3,2%, т.е. превосходили

показатели фермерской выборки с кратностью 2...15. Подобное расхождение невозможно объяснить природными особенностями региона медосбора или ботанической характеристикой растений-медоносов. Более реальной представляется технологическая причина, связанная с внесением в продукт каких-либо наполнителей, например сыворотки, мучной суспензии или патоки.

Распространённым видом загущающих добавок при фальсификации мёда является сыворотка и патока чёрная (свёклосахарная) [28]. Эти субстраты богаты железом, поэтому его определение в биологических композициях является экспертизно значимым признаком. Результаты приведены на рис. 3.8.

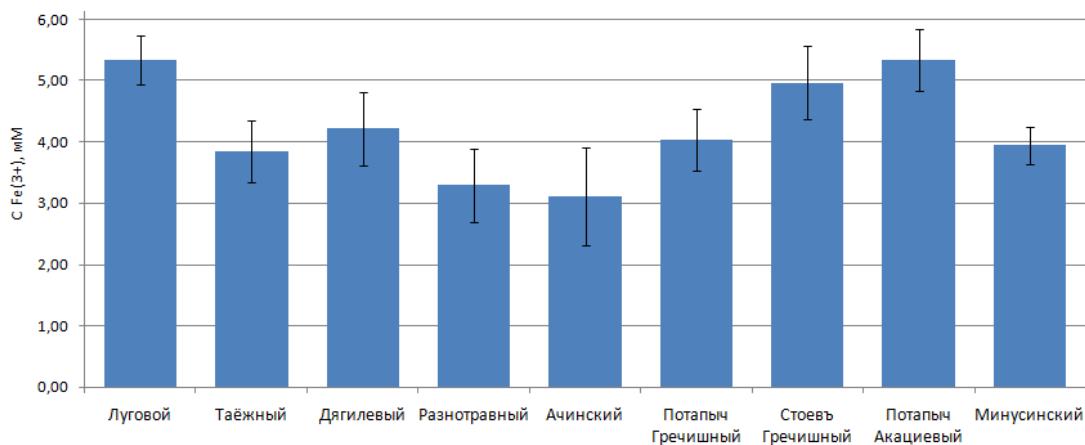


Рис. 3.8. Содержание общего железа в образцах мёда

Между выборками выявлены различия по уровню общего железа. Среднее значение по группе фермерских медов составило 3,96 мМ, по группе ритейл-медов – 4,57 мМ, т.е. на 15% выше при средней величине относительной ошибки измерений 10% ($p<0,05$). Судя по описанным данным, среди группы ритейл-образцов наибольшее сомнение вызывали магазинные меды «Стоевъ Гречишный» и «Потапыч Акациевый». Как показано выше, содержание аскорбиновой кислоты в тех же объектах также было повышенено. Известно, что аскорбиновая кислота переводит Fe^{3+} в двухвалентную форму, которая, в свою очередь, способна инициировать процессы цепного свободнорадикального окисления. Возможно, этим объясняются прооксидантные эффекты, полученные в ходе ХЛ-анализа. Таким образом, интегральный результат, полученный в ходе экспрессного хемилюминесцентного анализа, хорошо согласуется с данными химического анализа тех же объектов.

В образцах мёда было определено суммарное содержание редуцирующих соединений (восстановителей), обеспечивающих антиоксидантные свойства (серу-содержащие аминокислоты, пептиды, амины, ферменты, органические кислоты, аскорбиновая кислота, ионы железа Fe^{2+} , биофлавоноиды и пр.). Результаты определения суммы редуцирующих соединений (восстановителей) представлены на рис. 3.9.

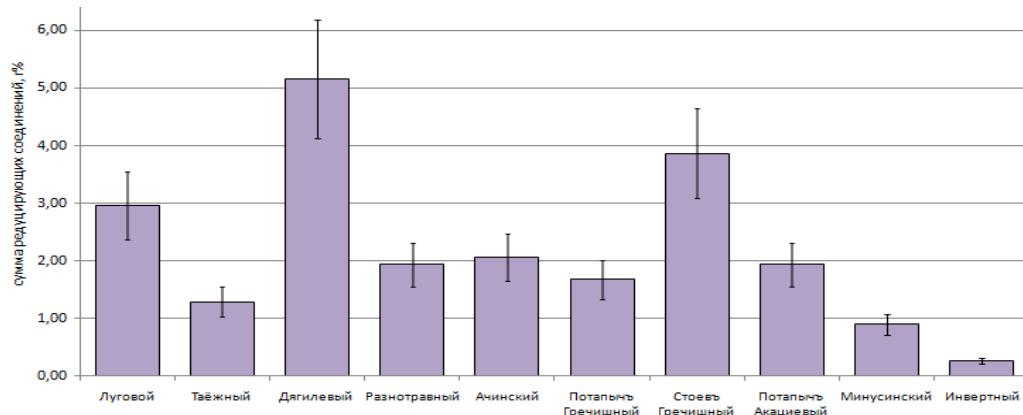


Рис. 3.9. Содержание суммы редуцирующих соединений в образцах мёда

В определении восстановителей использовали титрование сильным оксилителем, а в ацидометрическом – титрование щёлочью. Поэтому результаты, полученные в этих определениях, должны комплементарно соответствовать друг другу. Сопоставление результатов определения редуцирующих соединений с содержанием кислотных эквивалентов (встречный эксперимент) подтвердило методическую валидность (рис. 3.10).

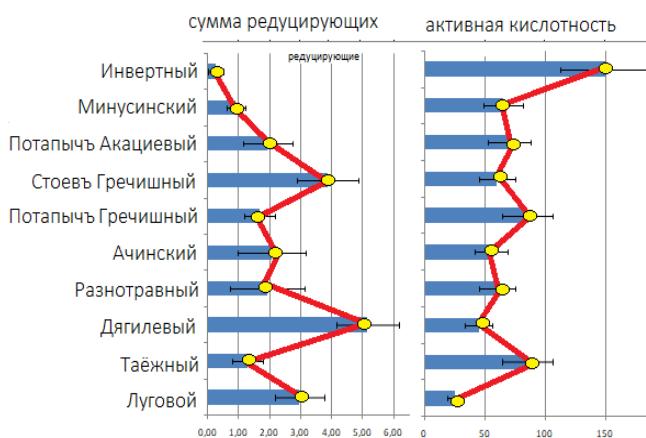


Рис. 3.10. Комплементарность редуцирующих соединений и кислотных эквивалентов в составе образцов мёда

Ождалось, что высокому содержанию кислотных эквивалентов будет соответствовать низкое содержание восстановителей, и наоборот. В итоге именно это и наблюдалось. Действительно, низкое содержание редуцирующих веществ в инвертном сиропе компенсировалось высоким содержанием H^+ -эквивалентов, образуемых в ходе кислотного гидролиза дисахарида. Данное сопоставление было необходимо для интерпретации результатов, полученных в ходе ХЛ-анализа. Судя по величине активной кислотности, сильными антиоксидантами должны быть образцы, характеризующиеся высоким содержанием как редуцирующих соединений, так и кислотных эквивалентов. Из числа фермерских медов этим условиям в высокой степени удовлетворяли «Дягилевый», «Таёжный» и «Разнотравный», а из числа ритейл-медов – «Потапыч Гречишный» и «Минусинский». Этим образцам соответствовала минимальная светосумма в ХЛ-анализе, что указывало на их высокую антирадикальную способность.

3.3. Хемилюминесцентный анализ влияния мёда на продукцию биогенных радикалов

Для эффективной оценки качества мёда необходимо учесть возможность экстраполяции результатов анализа антиоксидантной активности *in vitro* на уровень функциональных процессов в организме человека. Удобной моделью для решения данной задачи является использование модели Фентона, включающей биогенные свободные радикалы и клеточный источник их появления в крови – фагоцитирующие лейкоциты [29]. Для формирования данной биомодели требуются микротомы периферической крови человека (капля крови из пальца). Получаемые при этом результаты позволяют обеспечить как индивидуально значимую информацию по адаптогенным свойствам конкретного образца, так и сводные базы данных для выявления закономерностей и прогноза радикал-направленного влияния того или иного продукта *in vivo*.

На рис. 3.11 приведены данные ХЛ-анализа антиоксидантных свойств фермерского мёда «Ачинский» в сравнении с раствором глюкозы физиологической концентрации (5 мМ). В биогенной модели использовали микропробы крови практически здоровых людей ($n=5$). Контрольная ХЛ отражала

ранние стадии окислительного стресса, поскольку отличалась от стандарта (абсолютно здоровые люди, $n=70$) по параметрам высоты пика (превышение на 37%) и симметрии (время достижения пика $T_{max} = 52$ против 39 мин.).

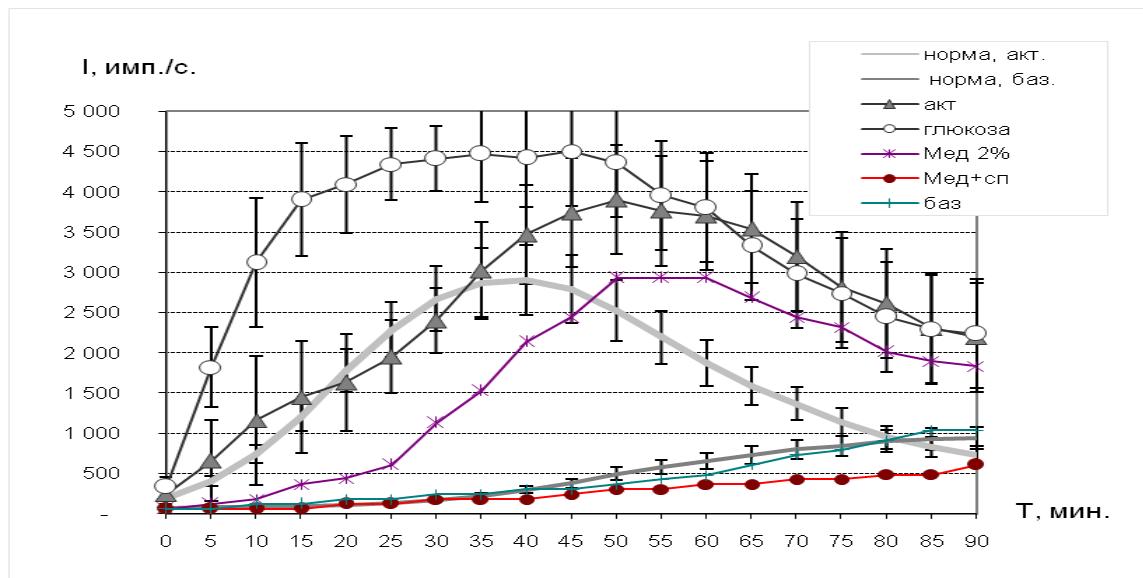


Рис. 3.11. Снижение продукции биогенных радикалов под влиянием мёда

Из рисунка видно, что под влиянием исследуемого образца мёда высота пика ХЛ-кинетограммы снизилась до нормы (2900 имп/с). При этом значимых изменений в характере кинетики не выявлено. Напротив, под влиянием глюкозы, одного из обязательных компонентов мёда, снижения высоты пика не наблюдалось, зато характер кинетики принципиально изменился. Левая ветвь кинетограммы под влиянием глюкозы приобретала выпуклую форму (угловой коэффициент 0,958 против 0,344 в контроле), что отражает резкое возрастание скорости продукции свободных радикалов, или прооксидантный эффект. Это согласуется с описанными выше результатами, указывающими на прооксидантные свойства тех образцов, в составе которых было установлено повышенное количество редуцирующих соединений, к которым относятся моносахариды и, в частности, глюкоза.

Результаты ХЛ-анализа образца «Ачинский» показали, что его интегральное действие осуществляется по скавенджерному механизму. Это означает, что в составе данного мёда преобладают прямые инактиваторы АФК. Они не регулируют ферментный комплекс фагоцитов, обеспечивающий выработку АФК.

Возможно, мёд других сортов будет оказывать влияние иного характера. Подобная информация необходима для научного обоснования рекомендаций и для обеспечения информированного выбора потребителями функциональных нутриентов не только высокого качества, но и максимально индивидуализированных по физиологическим показателям.

3.4. Отличия фермерских и ритейл-образцов от референтных значений

На рис. 3.12 а,б приведены лепестковые диаграммы, на которых усреднённые значения по каждой группе образцов соединены общей линией (пунктир). Полученные фигуры сопоставлены с аналогом, составленным по усреднённым литературным данным (стандарт, сплошная линия). Из рис. 3.12, а видно, что результаты по ритейл-образцам отличаются от стандарта по всем показателям, причём максимальное расхождение наблюдается по уровням общего белка и сахарозы. Не исключено, что в технологии изготовления этих образцов были использованы описанные в литературе способы фальсификации, например добавление крахмальной или мучной взвеси [30], а также сахарного сиропа, о чём свидетельствует двукратное превышение уровня сахарозы в ритейл-образцах относительно инвертного сиропа. При этом практически все параметры в группе фермер-образцов совпали со стандартом (рис.3.12, б).

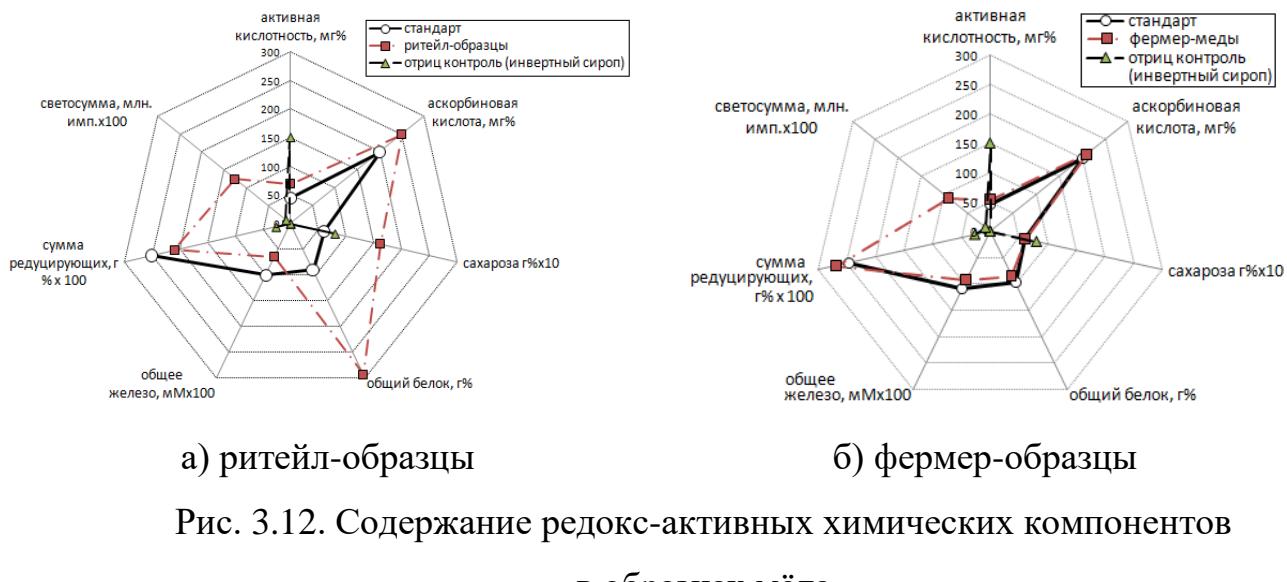


Рис. 3.12. Содержание редокс-активных химических компонентов в образцах мёда

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое исследование позволяет заключить, что мёд, приобретаемый через розничную торговую сеть, часто не имеет гарантированно высокого качества. Неизбежное в системе ритейла обезличивание продукта, поступающего от индивидуальных производителей, повышает вероятность фальсификации и потери специфических адаптогенных свойств, определяемых эволюционно заданным сочетанием и соотношением множества компонентов. Высокая цена натурального мёда обусловлена не углеводами, которые могут быть получены на современном этапе из более доступных и разнообразных источников. Пищевая ценность мёда обусловлена наличием природных адаптогенов, алиментарный дефицит которых становится всё более острым. Поэтому необходимы методы оценки биологической активности для подтверждения натуральности мёда.

В исследовании показано, что таким методом может быть хемилюминесцентный анализ. С его помощью возможно экспрессное выявление сомнительных образцов, показатели качества которых в наибольшей степени отклоняются от значений, установленных по регламентам ГОСТ. Традиционное аналитическое определение этих показателей требует лабораторного обеспечения и больших затрат материалов, труда, времени, а также должно сопровождаться последующей интерпретацией, чтобы свести воедино множество показателей. В отличие от множественного подхода, ХЛ-анализ сосредоточен на едином фундаментальном критерии – влиянии на свободнорадикальные процессы кислородного обмена. Радикал-направленная активность отражает комплексное свойство систем, не сводимое к сумме свойств её компонентов. Поэтому ХЛ-анализ позволяет получать результаты наглядно, быстро, экономично и воспроизводимо. ХЛ-анализ имеет высокий потенциал для первичного скрининга и отбора сомнительных образцов, чтобы при необходимости проводить скрупулезный и многоступенчатый анализ с ограниченным числом, а не с генеральной выборкой. Судя по эффективности данного анализа, он имеет перспективы для включения в перечень регламентов ГОСТ для предварительной экспертизы мёда по признаку биологической ценности.

ВЫВОДЫ

1. С помощью хемилюминесцентного анализа выявлены достоверные различия по антиоксидантной активности между образцами мёда с гарантированным качеством, полученными от известных индивидуальных производителей (фермер-образцы), и обезличенными ритейл-образцов.
2. Снижение хемилюминесценции под влиянием фермер-образцов не превышало 40...60% относительно контроля, превышения уровня контроля не наблюдалось ни в одном случае. В тех же условиях у ритейл-образцов наблюдался контрастный ответ: либо аномально высокая антиоксидантная активность (на 80...90% ниже контроля), либо прооксидантное действие (7...60% выше контроля).
3. Результаты ХЛ-анализа подтверждены традиционными аналитическими данными. Параметры фермер-образцов совпадали с референтными значениями. Напротив, аналитический профиль ритейл-образцов отличался от стандарта. Наибольшие отклонения наблюдались по содержанию белковых соединений, сахарозы и аскорбиновой кислоты, что указывает на возможность искусственного изменения состава природного продукта.
4. Хемилюминесцентный скрининг на начальном этапе экспертизы мёда необходим для выявления образцов с негарантированным качеством, что может значительно сократить затраты труда, времени, материального обеспечения и исходного материала.
5. Хемилюминесцентный анализ позволяет интегрально оценить биологическую ценность мёда по его антиоксидантной активности, а также пригоден для обеспечения индивидуального подбора сортов в соответствии с индивидуальными особенностями редокс-статуса организма потребителя.
6. Хемилюминесцентный анализ является перспективным инструментом экспертной оценки мёда и рекомендуется для включения в методики ГОСТ.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

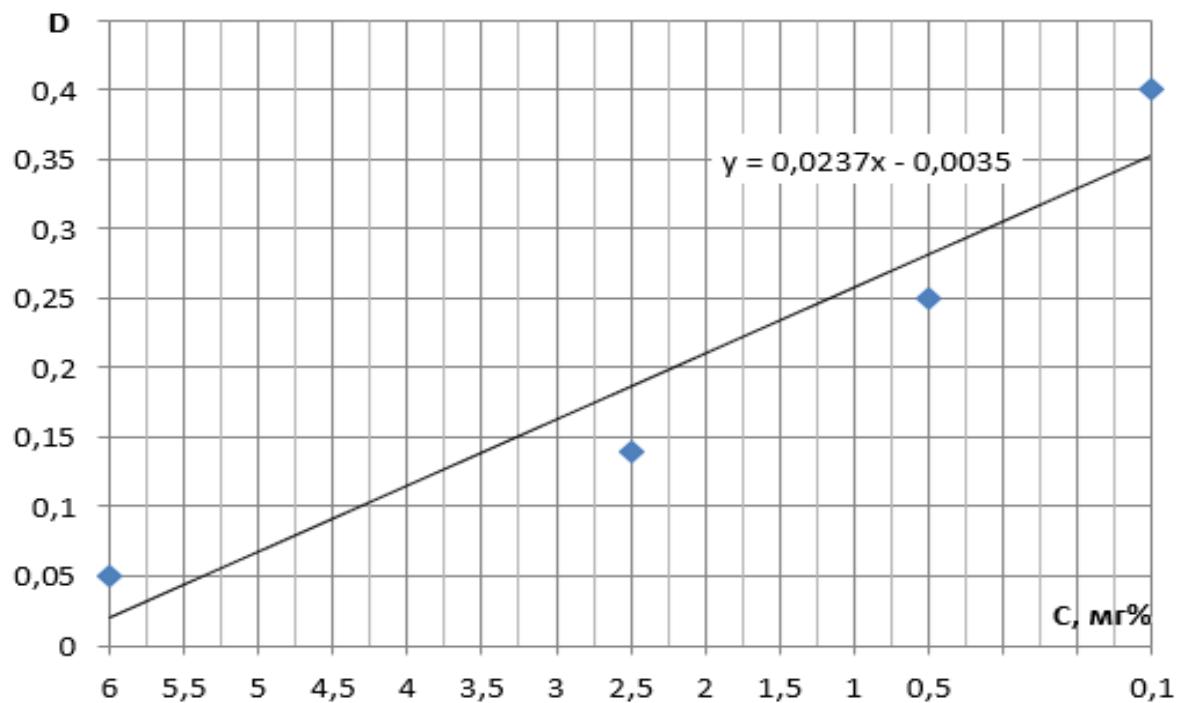
1. Корпачев В.В. Целебная фауна. М.: Наука, 1989. – 204 с.
2. Мотовилов О.К Табала Е.Б., Голуб О.В. Способ получения пищевого продукта из выжимок дикорастущих и культивируемых ягод с добавлением падевого меда: Патент РФ № RU2620303C2, заявл. 19.10.2015, опубл. 24.05.2017.
3. ГОСТ 19792-2017. Мёд натуральный. Технические условия (с поправкой): [Электронный ресурс] <http://docs.cntd.ru/document/1200157439>.
4. Пищевая ценность мёда: электронный калькулятор калорийности продуктов. М-лы сайта Health-diet. [Электронный ресурс] https://health-diet.ru/table_calorie/
5. Макарова Н.В. Лиманова В.С., Бординова В.П. Антиоксидантные вещества различных сортов мёда // Известия вузов. Пищевая технология. 2011, №1. С. 18–20.
6. Шмат Е.В., Диденко Н.В, Чеботарева Т.Ю., Ушакова Е.Л. Оценка качества и безопасности некристаллизованного меда южных районов Омской области // Вестник Красноярского ГАУ. – 2016, №6. – С. 154–159.
7. Абдуганиев Б.Ё., Аскarov И.Р., Имомова М.Е., Каримова С.А. Разработка экспресс-методов изучения химического состава мёда, определяющих критериальные параметры по ТН ВЭД // Проблемы современной науки и образования. – 2019, №12-2 (145). – С. 13–18.
8. Калинина И.В., Кобякова А.Ю. Исследование качества натурального мёда, реализуемого торговыми предприятиями г. Челябинска // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. 2015. Т. 3, №3. – С. 69–74.
9. Средства и способы фальсификации мёда. Методы их обнаружения. М-лы сайта Pchela-info [Электронный ресурс]. <https://pchela-info.ru/pcheloproduktsiya/myod/effektivnye-metody-falsifikatsii-medu>
10. Рудольф В.В., Кипарисова Т.А., ацева С.А., Сторчевая Т.Р., Сычёва Л.Ф. Способ приготовления инвертного сиропа. SU179610A1. Опубл. 01.01. 1966.
11. Бердова А.К. Идентификация и ветеринарно-санитарная оценка натурального цветочного мёда // Электронный научно-методический журнал Омского ГАУ. – 2016. – №3(6) июль-сентябрь. URL <http://e-journal.omgau.ru/index.php/2016-god/5/29-statya-2016-2/373-00123. - ISSN 2413-4066>.
12. Значение и способы определения качества мёда: м-лы сайта Пчела-Инфо.ру. [Электронный ресурс] <https://pchela-info.ru/pcheloproduktsiya/myod/znachenie-i-sposoby-opredeleniya-kachestva-medu>

13. Осовская И.И., Антонова В.С. Практическая вискозиметрия. – СПб.: Изд-во ВШТЭ СПбГУПТД, 2018. – 78 с.
14. Е.В. Шмат, Н.В. Диденко, Т.Ю. Чеботарева, ЕЛ. Ушакова Оценка качества и безопасности некристаллизованного меда южных районов Омской области // Вестник КрасГАУ. №6 2016
15. Владимиров Ю.А., Проскурина Е.В. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция // Успехи биологической химии. 2009. Т. 49. С. 341–388.
16. Аристова Н.А., Иванова И.П., Трофимова С.В., Пискарев И.М., Бурхина О.Е., Сошникова О.О. Механизмы хемилюминесценции в реакции Фентона // Исследовано в России: электронный научный журнал. – 909 <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2011/067.pdf>
17. Лесовская М.И. Методические проблемы тестирования биологической активности нутриентов. В кн.: Влияние влияние нутриентов на свободнорадикальный баланс крови *in vitro*. – М., 2015. – 31-37.
18. Васильев В.П. Аналитическая химия в 2-х томах, том 2. Физико-химические методы анализа. – Москва: Дрофа, 2004. – 384 с.
19. Виноградова А.А., Мелькина Г.М., Фомичёва Л.А. Лабораторный практикум по общей технологии пищевых производств – М. Агропромиздат, 1991. – 335 с.
20. ГОСТ 53126-2008 Мёд. Рефрактометрический метод определения воды: каталог ГОСТ [Электронный ресурс] <https://internet-law.ru/gosts/gost/48272/>
21. ГОСТ 54386-2011. Мёд. Метод определения активности сахаразы, диастазного числа, нерастворимого вещества: каталог ГОСТ [Электронный ресурс] <https://internet-law.ru/gosts/gost/52011/>
22. ГОСТ 53877-2010. Мёд. Метод определения водородного показателя и свободной кислотности: каталог ГОСТ [Электронный ресурс] <https://internet-law.ru/gosts/gost/50162/>
23. Денисов Е.Т., Денисова Т.Г. Физико-химические аспекты изомеризации свободных радикалов // Усп. хим., 2004. Т. 73, вып. 11. С 1181–1209.

24. Фальсификация меда: виды, способы и методы определения: [Электронный ресурс] / FB.ru: <https://fb.ru/article/380586/falsifikatsiya-med-a-vidyi-sposobyi-i-metodyi-opredeleniya>
25. Муратов К. Химический мёд из Китая [Электронный ресурс] / <http://chismi.ru>
26. Аганин А.В. Раннее распознавание брожения меда // Пчеловодство. — 1997, № 5. – С. 10.
27. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. Современные подходы при анализе окислительного стресса, или как измерить неизмеримое // Acta Biomedica Scientifica (Бюлл. ВСНЦ СО РАМН). 2016, Т.1, №3 (109), Ч. II. С. 174–180.
28. Патока: калорийность, состав. Материалы сайта Calorizator [Электронный ресурс] / <http://www.calorizator.ru/product/raw/syrup>
29. Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиосидантов // Химия растительного сырья. 2004. №3. С. 63–75.
30. Пономарёв А.С. Мировой рынок мёда: первые признаки дефицита / [Электронный ресурс]. <http://medovyi.spas9.ru>.

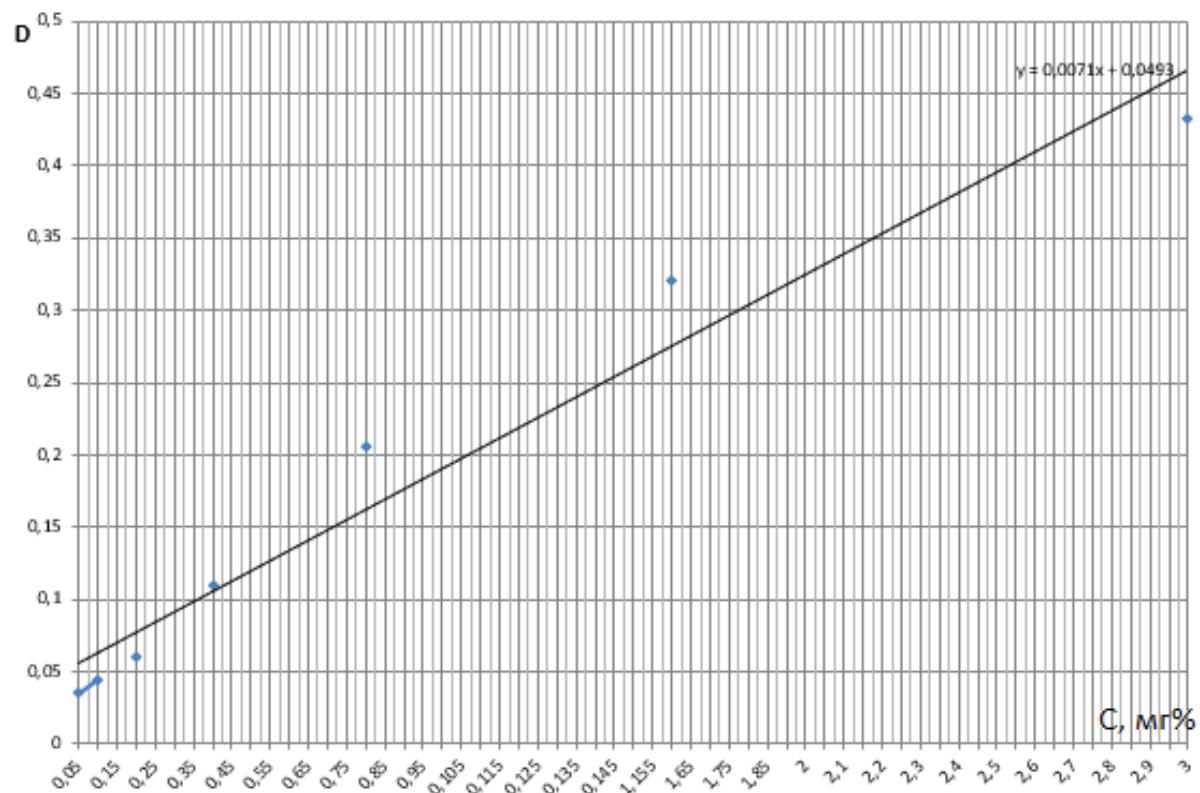
ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1



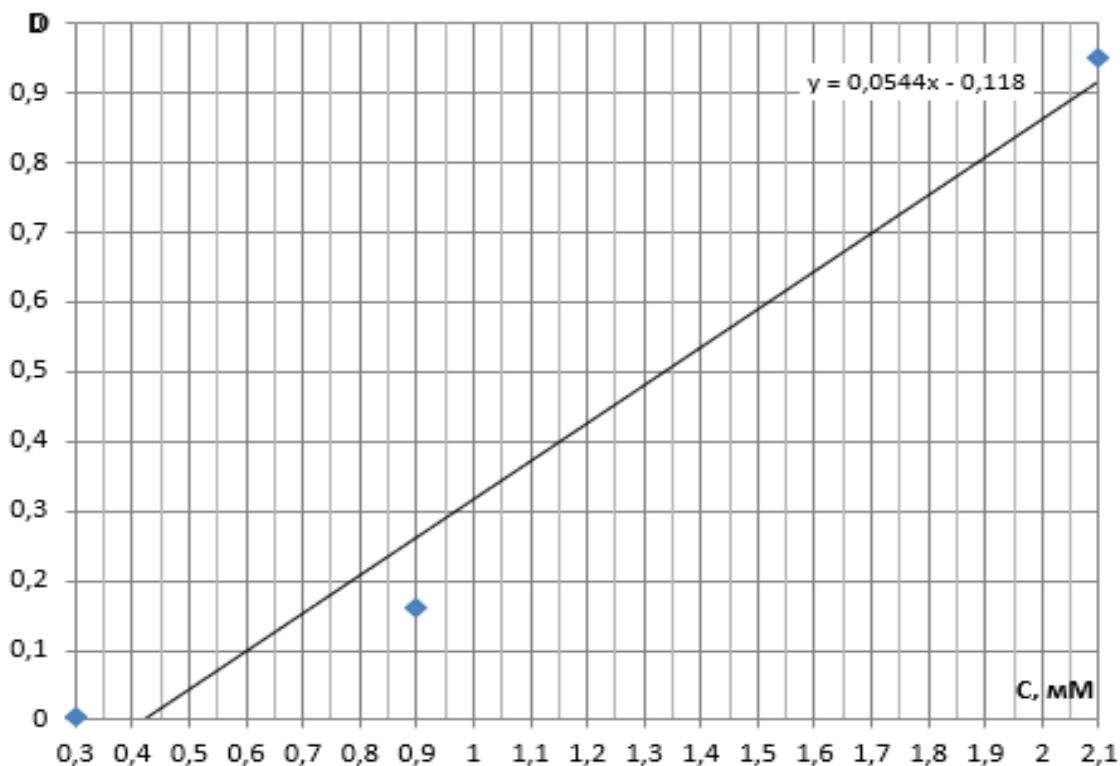
Калибровочный график для определения концентрации витамина С

Приложение 2



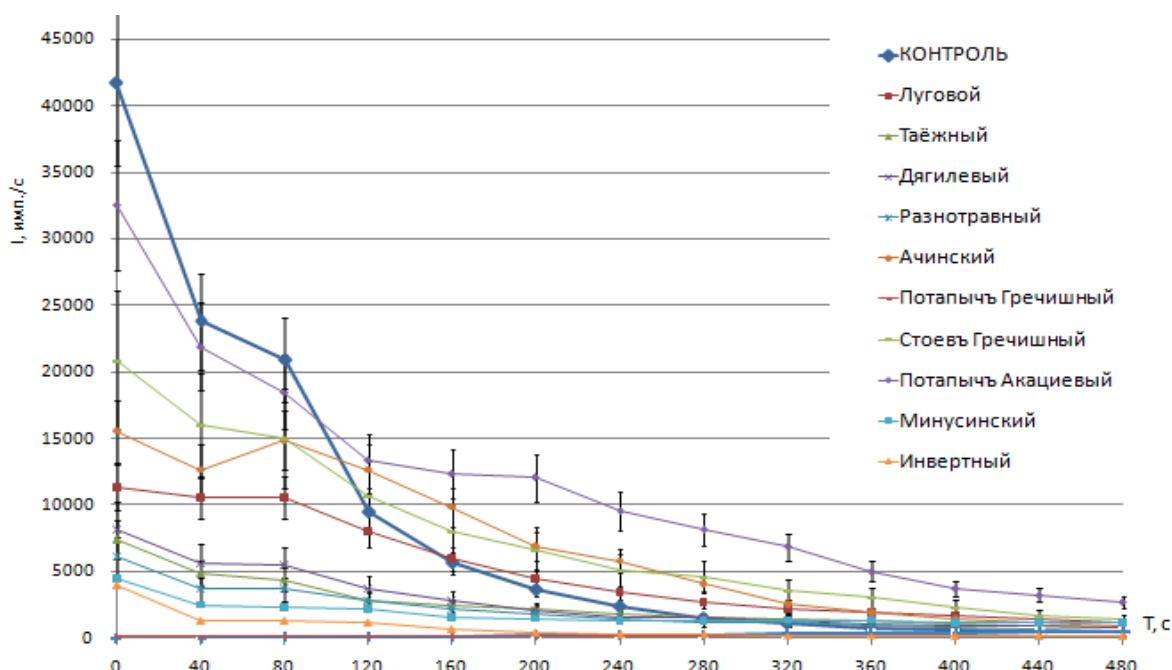
Калибровочный график для определения белка биуретовым методом

Приложение 3



Калибровочный график для определения содержания общего железа

Приложение 4



Кинетограммы ХЛ-реакции под влиянием исследуемых образцов