
Minja Jovanović

Kvantifikovanje flavonskih heterozida u uzorcima livadskog meda

U uzorcima livadskog meda kvantifikovani su flavonski heterozidi, za koje je inače poznato da poseduju antioksidansni potencijal. Određen je njihov ukupni sadržaj u pet uzoraka pomoću metode bazirane na Priručniku Kineskog nacionalnog centra za kontrolu kvaliteta čaja. Potom je svakom uzorku određena ukupna antioksidansna aktivnost, antiradikalna aktivnost i intenzitet boje. Ukupni sadržaj polifenola uzoraka je u intervalu od 0.5 do 1.7 procenata. Rezultati pokazuju da med nije primarni dietarni izvor antioksidanasa, ali njegovo konzumiranje je značajno zbog neutralisanja slobodnih radikala, tj. sprečavanja oksidativnog stresa koji je uzročnik mnogih bolesti kao što su multipla skleroza, Parkinsonova bolest, kancer, koronarna oboljenja.

Uvod

Oksidacija je proces transfera elektrona sa jednog na drugi atom i predstavlja suštinski deo aerobnog metabolizma. U ovom sistemu jedini akceptor elektrona je kiseonik. Međutim, ukoliko u procesu metabolizma ili pod uticajem spoljašnjih faktora dođe do transfera nesparenih elektrona, sistem generiše slobodne radikale: superoksid (O_2^-), peroksil- (ROO), alkoksil- (RO), hidroksil- (HO) i azotni oksid (NO) radikale. To su izuzetno jaki oksidacioni agensi, koji brzo reaguju sa drugim molekulima (vreme poluzivota hidroksil-radikala je reda veličine 10^{-9} s) (Maksimović 2005). Slobodni radikali mogu biti vrlo štetni, jer reaguju sa lipidima ćelijskih membrana, proteinima tkiva, ugljenim hidratima i DNK, izazivajući oštećenja ćelijskih membrana i lizu ćelija, modifikaciju proteina, oksidaciju ugljenih hidrata i oštećenja DNK. Posledica aktivnosti slobodnih radikala je oksidativni stres, koji je u direktnoj vezi sa procesom starenja i razvojem mnogih oboljenja kao što su multipla skleroza, Parkinsonova bolest, kancer, koronarna oboljenja. Ljudski organizam se štiti od slobodnih radikala mehanizmom odbrane koji je razvijen kao odgovor na konstantnu izloženost oksidativnom stresu. Taj mehanizam čine antioksidansi – sup-

*Minja Jovanović
(1988), Smederevo,
Radoslava Mirkovića
1A/26, učenica 2.
razreda Gimnazije u
Smederevu*

*MENTOR:
Zoran Maksimović*

stance koje, u niskim koncentracijama, sprečavaju oksidaciju odgovarajućih supstrata tako što suzbijaju stvaranje reaktivnih vrsta kiseonika, neutrališu slobodne radikale vezujući ih za sebe i predajući ih drugima i prekidaju lančane reakcije koje slobodni radikali iniciraju. Neki antioksidansi se sintetišu u organizmu: enzimi (superoksid-dismutaza, katalaza i selen-zavisna glutation peroksidaza), neenzimski molekuli (glutation, histidin-peptidi, urati, transferin i feritin), neki hemijski elementi (cink i selen) i reparativni antioksidansi (enzimi proteaze, lipaze, transferaze i enzimi koji repariraju DNK). Antioksidanse je zato neophodno unositi i ishranom. Na ovaj način unesimo antioksidanse kao što su vitamini C, E, A, karotenoidi i polifenoli. Sposobnost antioksidanasa da spreče dejstvo slobodnih radikala naziva se antioksidantni potencijal.

Polifenoli su organska jedinjenja koja sadrže više hidroksilnih grupa vezanih za sistem benzenovih prstenova. U prirodi se najčešće javljaju vezani za šećere. U biljkama obavljaju niz funkcija: deluju kao antioksidansi, antimikrobni agensi, foto receptori, vizuelno privlače insekte važne za oprašivanje cvetova, odbijaju biljojede, štite tkiva od prekomernog UV-zračenja. U organizmu čoveka, polifenoli mogu ispolji različite pozitivne efekte. Inhibiraju enzime odgovorne za sintezu superoksid-anjona i zbog niskog redoks-potencijala sposobni su da redukuju slobodne radikale. Flavonoidi su podgrupa polifenola koji su u hemijskom smislu derivati flavana (2-fenil-benzo-dihidropirana). Njihova struktura daje im sposobnost neutralizacije slobodnih radikala (Maksimović 2005).

Med je u potpunosti prirodni proizvod koji pored najmanje 200 supstanci, uključujući šećere, proteine, vodu, vitamine, minerale, hidroksimetilfurfural (HMF), enzime, sadrži i polifenole (Kirk i Sawyer 1999) koji potiču iz biljaka i ne mogu ih sintetisati životinje i ljudi (flavonoidi nađeni u nekim životinjama uneti su putem ishrane biljkama), te ih nema u mesu, mleku, jajima, morskim plodovima... (Peterson i Dwyer 1998).

Cilj ovog rada je određivanje ukupnog sadržaja flavonskih heterozida u uzorcima livadskog meda i kvantifikacija njihovih antioksidantnih svojsta pomoću FRAP testa za određivanje antioksidantnog potencijala, DPPH testa za određivanje antiradikalnog potencijala, i intenziteta boje.

Materijal i metode

Od pet pčelara uzeti su uzorci livadskog meda i obeleženi brojevima na sledeći način:

- 1 – med sa Homolja
- 2 – med sa Rtnja
- 3 – med iz okoline Aleksinca
- 4 – med iz Deliblatske peščare
- 5 – med iz okoline Valjeva

Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

Uobičajene metode za determinaciju polifenola opisane su od strane mnogih istraživača (Roberts *et al.* 1956, 1957; Roberts & Myer 1958; Roberts & Smith 1961; Roberts 1962) i široko primenljive. Najpraktičnije su kolorimetrijske metode (Bhatia 1960; Bhatia & Ullah 1968; Harbowy 1997; Lakenbrink 2000). One se zasnivaju na redukcionim svojstvima polifenola, tj. na formiranju obojenih kompleksa. Metoda za određivanje ukupnih polifenola korišćena u ovom radu bazirana je na istraživanjima Roberta (1962) i na metodama iz Priručnika Kineskog nacionalnog centra za kontrolu kvaliteta čaja (CNC 1991), uz modifikacije (Yao *et al.* 1992; Harbowy & Balentine 1997; Muralidharan 1997). Princip metode je stvaranje kompleksa između jona Fe^{2+} i polifenola iz meda. Dobijeni kompleks je obojen, sa apsorpcionim maksimumom na 540 nm.

Pripremanje reagenasa

Šćerni analog meda: Izmereno je 4g fruktoze, 3 g glukoze i 1 g maltoze i rastvoreno u 2 mL destilovane vode uz mešanje i zagrevanje. Potom je zagrejana destilovana voda i rastvoreno je 2 g šćernog analoga u 100 mL zagrejane destilovane vode. Rastvor je držan 5 minuta na sobnoj temperaturi u ultrazvučnom kupatilu radi dobijanja bistrog rastvora.

Rastvori meda (osnovni rastvor): Uzorci meda su rastvoreni u toploj destilovanoj vodi (2 g/100 mL) i ostavljeni su u ultrazvučnom kupatilu 5 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se dobili bistri rastvori.

Rastvor K, Na-tartarata: rastvoreno je 5g $KNaC_4H_4O_6$ i 1.83 g $FeSO_4$ u malo destilovane vode u čaši, a potom kvantitativno preneseno u normalni sud od 1000 mL koji je dopunjen do crte. Rastvor je zatim prebačen u reagens bocu.

Pufer: Izmereno je 29.30g Na_2HPO_4 i rastvoreno u malo destilovane vode u čaši, a potom kvantitativno preneseno u normalni sud od 1000 mL koji je dopunjen do crte. Izmereno je i 9.09g KH_2PO_4 i rastvoreno najpre u malo destilovane vode, pa zatim kvantitativno preneseno u normalni sud od 1000 mL koji je dopunjen do crte. Rastvori Na_2HPO_4 i KH_2PO_4 pomešani su u odnosu 85:15.

Rastvori meda: U normalnim sudovima od 25 mL pripremani su rastvori tako što je otpipetirano 1 mL osnovnog rastvora meda, 4 mL destilovane vode i 5 mL rastvora tartarata. Normalni sud je dopunjen do crte puferom.

Postupak

Svim rastvorima merena je apsorbanca na UV/VIS spektrofotometru (GBC Spectral, Cintra 10) na talasnoj dužini od 540 nm uz slepu probu

koju čini 1 mL šećernog analoga, 4 mL destilovane vode, 5mL rastvora KNa-tartarata i pufer do 25 mL. Urađena su po tri ponavljanja. Rezultati su izraženi u procentima polifenola u odnosu na ukupnu zapreminu uzorka.

Ukupna antioksidansna aktivnost: FRAP-test

FRAP-test (Ferric Reducing Antioxidant Power) se zasniva na redukciji [Fe(III)-TPTZ] (TPTZ – 2,4,6-Tripiridil-s-Triazin) kompleksa do [Fe(II)-TPTZ] u prisustvu redukjućeg sredstva pri niskoj pH. Nagrađeni kompleks ima intenzivnu plavu boju čiji se intenzitet određuje merenjem apsorbance na 593 nm. Rezultati se izražavaju u $\mu\text{M Fe}^{2+}$, što predstavlja koncentraciju jona Fe^{2+} koju oslobodi odmerena količina ispitivanog ekstrakta.

Priprema reagenasa

Rastvori meda: Uzorci meda su rastvoreni u toploj destilovanoj vodi (1 g/10 mL) i ostavljeni 5 minuta u ultrazvučnom kupatilu na sobnoj temperaturi kako bi se dobili bistri rastvori.

Acetatni pufer, 200 mmol/L, pH 3.6. Odmereno je 0.30 g kristalnog natrijum – acetata ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) i prebačeno u staklenu čašu u koju je otpipetirano 1.6 mL glacijalne sirćetne kiseline. Nakon rastvaranja u 20 mL vode rastvor je kvantitativno prenesen u normalni sud od 100 mL koji je zatim do crte dopunjen destilovanom vodom.

Rastvor HCl, 40 mmol/L. Otpipetirano je 0.35 mL koncentrovane HCl u normalni sud od 100 mL koji je do crte napunjen destilovanom vodom.

TPTZ-reagens: Odmereno je 0.078 g TPTZ i dopunjeno do 25 mL rastvorom HCl.

Rastvor FeCl_3 , 20 mmol/L. Odmereno je 1.3515 g $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ i preneto u normalni sud koji je dopunjen destilovanom vodom do 25 mL.

FRAP – reagens: Pomešaju se acetatni pufer, rastvor TPTZ – reagens a i rastvor FeCl_3 u zapreminskom odnosu 10:1:1 (100 : 10 : 10 mL).

Rastvor FeSO_4 : Odmereno je 0.0665 g $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i prebačeno u normalni sud koji je dopunjen do 250 mL. Tako je dobijen **osnovni rastvor** koji se koristi za konstruisanje kalibracione kirve.

Postupak

Najpre je konstruisana kalibraciona kriva. Korišćen je osnovni rastvor. Odmereno je 20, 40, 60 i 80 mL osnovnog rastvora i dopunjeno do 100 mL destilovanom vodom. Po 0.1 mL standardnih rastvora FeSO_4 je preneto u epruvete i dodato je 3.0 mL FRAP-reagens a. Sve epruvete su inkubirane 30 minuta na temperaturi od 37° C. Apsorbanca je merena na 593 nm. Dobijene apsorbance i preračunate koncentracije standardnih ras-

tvora iskorišćene su za konstrukciju krive. Antioksidantni potencijal uzoraka meda određen je merenjem apsorbanci na 593 nm rastvora koji su sadržali 0.1 mL rastvora meda i 3.0 mL FRAP-reagensa uz slepu probu koja je umesto meda sadržala 0.1 mL rastvora šećernog analoga. Na osnovu kalibracione krive i dobijenih apsorbanci dobijene su koncentracije Fe²⁺ jona.

Antiradikalna aktivnost: DPPH-test

Princip metode: Antioksidantna aktivnost ispitivanog rastvora u direktnoj je vezi sa njegovom sposobnošću da neutrališe stabilne slobodne radikale. Za ovaj test korišćen je DPPH slobodan radikal, čiji rastvor ima tamnoljubičastu boju (apsorpcioni maksimum na 517 nm) zbog nesparenog elektrona. Kada se ovaj elektron spari, apsorbanca se na 517 nm smanjuje i rastvor postaje bleđožut. Rezultati su izraženi u procentima inhibicije. Da bi se rezultati mogli uporediti, potrebno je izračunati IC₅₀ vrednosti. Ova vrednost označava koncentraciju uzorka potrebnu da se izvrši neutralizacija 50% DPPH radikala i izračunata je za svaki uzorak.

Priprema reagenasa

Rastvor DPPH, 130 μmol/L u apsolutnom etanolu. Odmereno je 0.0051 g DPPH i preneto u normalni sud od 100 mL, koji je dopunjen apsolutnim etanolom uz sonikaciju.

Acetatni pufer, 100 mmol/L, pH 5.5. Odmereno je 1.15 g kristalnog natrijum-acetata (CH₃COONa · 3H₂O). U staklenu čašu je otpipetirano 0.086 mL glacijalne sirćetne kiseline i dodato u normalni sud od 100 mL koji je do crte napunjen destilovanom vodom.

Rastvori meda: Od svakog uzorka napravljeno je po četiri rastvora sledećih koncentracija: 2%, 5%, 10% i 20%.

Postupak: Pripremljena su tri kontrolna rastvora (A₀) tako što je pomešano 1.9 mL 130 μmol/L rastvora DPPH u apsolutnom etanolu, 1 mL rastvora acetatnog pufera i 100 μL vode. Za uzorke meda napravljena su po dva rastvora za svaku koncentraciju. Pomešano je 1.9 mL rastvora DPPH, 1 mL acetatnog pufera i 100 μL rastvora meda. Smesa je dobro promućkana i ostavljena da se inkubira na sobnoj temperaturi u mraku tokom 12 h. Apsorbancija je merena na 517 nm uz slepu probu koju čini rastvor meda uz dodatak svih reagenasa, izuzev rastvora DPPH, kako bi se isključio uticaj boje meda. Inhibicija slobodnog radikala DPPH za svaki ispitivan rastvor izračunata je iz izraza:

$$\text{Inhibicija (\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Da bi se rezultati DPPH testa mogli uporediti, potrebno je izračunati IC₅₀ vrednosti. Izračunate vrednosti inhibicije unete su u koordinatni sis-

tem i izražene u funkciji koncentracije ispitivanog rastvora meda. Linearizacija krive izvršena je probit-analizom. Na ovaj način su dobijene IC₅₀ vrednosti. Manja vrednost IC₅₀ označava jaču antiradikalisku aktivnost.

Određivanje intenziteta boje

Flavonoidi su žute boje, te je boja meda u direktnoj vezi sa ukupnim sadržajem flavonoida u uzorcima, a samim tim i indirektni pokazatelj kvaliteta meda. Zbog toga je svakom uzorku određen intenzitet boje.

Postupak: Uzorci meda rastvoreni su u toploj destilovanoj vodi. Rastvoreno je 5g meda u 5 mL vode. Apsorbanca dobijenih rastvora merena je na 450 i 720 nm. Razlika ove dve vrednosti predstavlja intenzitet boje koji se izražava u mAU (AU – od Absorbance Unit – negativna vrednost desetičnog logaritma udela propuštene svetlosti).

Rezultati i diskusija

Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

U prvom delu istraživanja, ukupni sadržaj polifenola bio je ispitan uz pomoć modifikovane metode Kineskog nacionalnog centra za kontrolu čaja. Rezultati su izraženi u procentima polifenola u odnosu na ukupnu masu meda i to uz pomoć sledeće formule:

$$3.914 \cdot E \cdot \frac{V_0}{1000 \cdot W} \cdot V_1 \cdot 100$$

gde je E – očitana apsorbance sa spektrofotometra, V_0 – zapremina rastvora meda, V_1 – zapremina korišćena za pravljenje rastvora čija je apsorbance merena, a W – masa uzorka

Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 1. Ukupni sadržaj polifenola uzoraka je u intervalu od 0.5 do 1.7 procenata. To pokazuje da med nije primarni dietarni izvor antioksidanasa, pošto ih neke namirnice sadrže u mnogo većim koncentracijama.

Ukupna antioksidansna aktivnost

Vrednosti FRAP-testa izraženi su u $\mu\text{M Fe}^{2+}$ jona u desetoprocentnom rastvoru meda. Svi rezultati se nalaze u intervalu od 2800 do 6900 $\mu\text{M Fe}^{2+}$ jona i prikazani su u tabeli 1.

Antiradikaliski potencijal

Dobijeni rezultati, izraženi pomoću IC₅₀ vrednosti, nalaze se u intervalu od 117 do 60571 (tabela 1). Jako su heterogeni, pa nije moguće izvući zaključak o antiradikalskoj aktivnosti ispitivanih uzoraka.

Tabela 1. Rezultati izvršenih testova

Vrsta meda	Sadržaj polifenola	Ukupna antioksidantsna aktivnost ($\mu\text{M Fe(II)}$)	Antiradikalni potencijal (IC_{50})	Intenzitet boje (mAU)
1	1.710 \pm 0.008	6900 \pm 800	117 \pm 1	501 \pm 1
2	1.650 \pm 0.009	5000 \pm 500	123 \pm 1	785 \pm 1
3	0.500 \pm 0.009	2800 \pm 700	60600 \pm 300	206 \pm 1
4	1.340 \pm 0.005	4300 \pm 500	5380 \pm 40	534 \pm 1
5	1.050 \pm 0.009	3600 \pm 400	202 \pm 2	230 \pm 1

Intenzitet boje

Apsorbanca pedesetoprocentnog rastvora meda kreće se od 206 mAU do 785 mAU. Ove razlike mogu ukazivati na prisustvo pigmenata sa antioksidantnom aktivnošću (karotenoidi). Uzorak broj 2 se po ukupnom sadržaju polifenola ne razlikuje značajno, a pokazao je znatno veću antiradikalnu moć u DPPH testu od ostalih uzoraka. Isto tako, njegova boja ima najveći intenzitet. Uzorak broj 3 ima najmanji ukupni sadržaj polifenola, što je u potpunosti u skladu sa rezultatima ostalih testova. Pokazao je najmanju moć redukcije i antiradikalnu moć, a što se tiče intenziteta boje i tu ima najmanje vrednosti.

Uzorak 1, koji ima najveću antioksidantnu moć potiče mahom od majčine dušice (*Thymus vulgaris* L.), mente (*Mentha sp.*) i hajdučke trave (*Achillea millefolium* L.), a uzorak 3, koji ima najmanju moć, od tikvinih cvetova (*Cucurbita pepo* L.). Kod uzoraka pet i tri dolazi do potpunih poklapanja u svim testovima.

Zaključak

Na osnovu rezultata zaključuje se da antioksidantna moć meda većinom zavisi od flore od koje vodi poreklo. Sami procesi proizvodnje imaju drugorazredni značaj. Što se tiče poklapanja rezultata testova i veze između njih, ukupni sadržaj polifenola i FRAP-test se u potpunosti poklapaju. S druge strane i DPPH test i intenzitet boje se u potpunosti poklapaju, što može navesti na to da je boja meda imala uticaj, i da slepa proba nije bila dobro pripremljena, tj. nije uspela da anulira boju meda. Međutim, snimanje spektra svih uzoraka meda pokazalo je da med na talasnoj dužini na kojoj su snimani uzorci u DPPH testu, ima nisku apsorpciju, što dovodi do pretpostavke da je boja meda indirektan pokazatelj njegovog kvaliteta.

Zahvalnost. Zahvaljujem mlađem saradniku Voinu Petroviću, studentu biohemije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na ukazanoj pomoći prilikom pripreme uzoraka i njihove analize.

Literatura

- Bhatia I.S. 1960. Application of chemical tests in manufacturing experiments. *Two and A Bud.*, **7**(1): 18.
- Bhatia I.S. and Ullah M.R. 1968. Polyphenols of tea. IV. Qualitative and quantitative study of the polyphenols of different organs and some cultivated varieties of tea plant. *J. Sci. Food Agric.*, **19**: 535.
- CNC. 1991. Handbook of the Inspection Techniques on Tea Quality. Hangzhou: Chinese National Centre of Tea Quality Control and Inspection: 242–243.
- Harbowy M.E., Balentine D.A. 1997. Tea chemistry. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **16** (5): 415.
- Lakenbrink C., Lapczynski S., Maiwald B. and Engelhardt U.H. 2000. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *J. Agric. Food Chem.*, **48**(7): 2848.
- Maksimović Z. 2005. Ispitivanje antioksidantnog potencijala meda. Laboratorijski priručnik. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu
- Muralidharan D. 1997. Spectrophotometric analysis of catechins and condensed tannins using Ehrlich's reagent. *J. Soc. Leather Techn. Chem.*, **81**(6): 231.
- Peterson J. & Dwyer J. 1998. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, **18** (12): 1995.
- Roberts E.A.H., Cartwright R.A. and Wood D.J. 1956. The Flavonols of Tea. *J. Sci. Food Agric.*, **7**(10): 637.
- Roberts E.A.H. 1957a. Oxidation--reduction potentials in tea fermentation. *Chem. Ind.* **12**: 1354.
- Roberts E.A.H. 1957b. Oxidative condensation of flavanols in tea fermentation. *Chem. Ind.*, **12**: 1355.
- Roberts E.A.H. and Myers M. 1958. Theogallin, a polyphenol occurring in tea. II. – Identification as a galloylquinic acid. *J. Sci. Food Agric.*, **9**: 701.
- Roberts E.A.H. and Smith R.F. 1961. Spectrophotometric measurements of theaflavins and thearubigins in black tea liquors in assessments of quality in teas. *Analyst.*, **86**: 94.
- Roberts E.A.H. 1962. Economic importance of flavonoid substances: tea fermentation. In: Geissman, T.A. (Ed). *The Chemistry of Flavonoid Compounds*. Pergamon press, Oxford, pp 409-512.
- Yao L.H., Cheng C., Chen Y. and Liu Y. 1992. The Kinetics of Green Tea Infusion. *J. Food Sci.* **1**: 3-6. *Chem. Abst. (USA)*, **117**: 672.

Quantifying of Flavonic Heterozides in Samples of Meadow Honey

Flavonic heterozides were quantified in samples of meadow honey. Total amount of heterozides was determined, as well as several parameters related to oxidative stress-total antioxidative potential, total antiradical activity and coloration. Results show that honey is not a primary dietary source of antioxidants, but that consumption can contribute to reducing oxidative stress, thus preventing various diseases.

Free radicals are chemical substances that have an unpaired electron. They are produced during oxidative metabolism. All aerobic organisms have mechanisms for dealing with free radicals, but they also have to ingest antioxidants from their surroundings. Antioxidants are substances that have the ability to suppress oxidative stress by eliminating free radicals. The most common antioxidants found in various food are vitamins (C, E, A), carotenoids and polyphenols.

Honey is a natural sweetener synthesised by bees from nectar. It contains various substances- sugars, water, minerals and flavonic heterozides. Flavonoids are a group of compounds based on flavan. They are known to exhibit antioxidative properties.

The goal of this research was to measure and compare antioxidative properties of flavonic heterozides from several samples of meadow honey.

Total amount of polyphenols was measured colorimetrically, measuring absorbance of Fe^{2+} ion-polyphenol complex. Total antioxidative ability was measured by using the FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) test, total antiradical activity was determined by DPPH test and coloration was measured spectrophotometrically.

Results show that antioxidative activity of honey mostly depends on the plants the honey was made of. The production itself is of lesser importance. Results from total polyphenol content and total antioxidative power match (i.e. samples that have a high content of polyphenols show stronger antioxidative properties). On the other hand samples that are more intensely coloured score higher on the DPPH test, which lead us to assume that the colour of honey is an indirect indicator of its quality. Due to better understanding of the examined topic further investigation ought to be performed.

