

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Vývoj  $^1\text{H}$  NMR metody na určení botanického původu  
medu  
Diplomová práce**

**Bc. Dominika Hrabáková**

**Obor studia Kvalita a zpracování zemědělských produktů**

**Vedoucí práce doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.**

© 2020 ČZU v Praze

## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vývoj  $^1\text{H}$  NMR metody na určení botanického původu medu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 23.07.2020

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za skvělý přístup, ochotu a trpělivost při vedení této práce. Děkuji také PaedDr. Ing. Anně Mascellani, Ing. Lucii Rysové, Ing. Saet Byeol Lee a všem ostatním z katedry kvality a bezpečnosti potravin, kteří mi vždy ochotně poradili, když jsem potřebovala. Poděkování také patří všem z Výzkumného ústavu včelařského, s.r.o., Dol, zejména Ing. Haně Vinšové, Ph.D. a Ing. Daliboru Titěrovi, CSc., kteří na mě byli moc milí a vždy mi se vším pomohli.

Chci poděkovat celé mojí rodině, zejména Bc. Kateřině Hrabákové, mojí mamince, a sestře Kateřině Hrabákové za jejich hlubokou lásku, nesmírnou trpělivost, podporu, laskavost, toleranci, radost a vytrvalé modlitby. Dále bych chtěla poděkovat členům sboru AC Plzeň, zejména Adrianě Šromové, Jindřišce Kubešové, Lucii Hřebíkové, Gabriele Mentlíkové, Michalu Královi a všem ostatním za jejich vytrvalé modlitby, přátelství, starost, slova povzbuzení a víry. A děkuji také Bohu, díky kterému jsem na své životní cestě mohla dojít až sem.

# Vývoj $^1\text{H}$ NMR metody na určení botanického původu medu

## Souhrn

Med je luxusní potravina a často podléhá falšování původu a nevhodné manipulaci, které ohrožují jeho kvalitu, klamou spotřebitele a negativně ovlivňují čestné výrobce. Neustále se vyvíjí nové metody, které by byly schopné levně a efektivně testovat kvalitu a autenticitu medu. V této práci byly na základě  $^1\text{H}$  NMR spekter vytvořeny a testovány prediktivní schopnosti modelů vícerozměrné statistické analýzy (PCA, OPLS-DA), nakolik jsou od sebe schopny rozlišit české medovicové, řepkové a akátové medy, celkem 100 vzorků. Zároveň byla provedena pilotní studie pro studium účinků tepelného ošetření na  $^1\text{H}$  NMR spektra medu (2 vzorky). Spektra byla zaznamenána na 500 MHz spektrometru s pomocí pulzní sekvence 1d noesy (doporučené nastavení parametrů), zpracována Fourierovou transformací, automaticky upravena, zjednodušena pomocí binnů o šířce 0,04 ppm a použita pro necílovou analýzu. Plná spektra byla profilována s pomocí Chenomx, s využitím interní databáze látek a vlastní knihovny. Pomocí prediktivních modelů PCA a OPLS-DA od sebe byly snadno odlišeny květové a medovicové medy, utvořily jasně oddělené klastry. Řepkové a akátové medy si byly podobnější, přesto byl OPLS-DA model rozlišující mezi akátovým a řepkovým medem validní a vysoce prediktivní ( $Q^2 = 0,75$ ). Byly nalezeny potenciální biomarkery botanického původu – pro řepkový med to byl vyšší obsah aminokyselin valinu, leucinu, isoleucinu, vyšší obsah derivátu kyseliny benzoové a patrně niacinu; pro akátový med to byl vyšší obsah fruktosy, turanosy, sacharosy, maltosy, dále pravděpodobně pinocembrin, kyselina abscisová a také neznámá sloučenina s chemickým posunem 5,25 ppm. Tepelné ošetření vedlo ke změnám ve složení medu, ale vzhledem k malému počtu vzorků se nedala určit univerzální změna.  $^1\text{H}$  NMR metabolomika se jeví jako vhodná metoda ověřování pravosti a kvality medu, ale pro její použití v běžné praxi bude ještě nutné provést obsáhlejší výzkum na více vzorcích.

**Klíčová slova:** Med, metabolomika,  $^1\text{H}$  NMR, nukleární magnetická rezonance

# Development of $^1\text{H}$ NMR method for assessment of botanical origin of honey

## Summary

Honey, as a luxury food, is often subject to deception as to origin and improper handling, which threatens its quality, deceives consumers, and negatively impacts honorable producers. New methods are constantly being developed that will enable testing of the quality and authenticity of honey with reasonable cost and efficiency. In this work the predictive abilities of models of multidimensional statistical analysis (PCA, OPLS-DA) were created and tested based on  $^1\text{H}$  NMR spectra to determine to what extent they are able to distinguish Czech honeydew, rapeseed and acacia honeys in a total of 100 samples. At the same time, a pilot study was performed to assess the effects of heat treatment on the  $^1\text{H}$  NMR spectra of honey (2 samples). The spectra were recorded on a 500 MHz spectrometer using a 1d noesy pulse sequence (recommended parameter settings), processed by Fourier transform, automatically adjusted, simplified with 0,04 ppm bins, and used for non-target analysis. Full spectra were profiled with the help of Chemomx, using an internal database and library of substances. Using predictive models PCA and OPLS-DA, blossom and honeydew honeys were easily distinguished from each other, forming clearly separated clusters. Rapeseed and acacia honeys were more similar, however, the OPLS-DA model distinguishing between acacia and rapeseed honey was evaluated valid and highly predictive ( $Q^2 = 0.75$ ). Potential biomarkers of botanical origin were found – for rapeseed honey it was a higher content of amino acids valine, leucine, isoleucine, a higher content of benzoic acid derivative and probably niacin; for acacia honey it was a higher content of fructose, turanose, sucrose, maltose, then probably pinocembrin, abscisic acid and also an unknown compound with a chemical shift of 5.25 ppm. Heat treatment led to changes in the composition of the honey, but due to the small number of samples, a universal change could not be determined.  $^1\text{H}$  NMR metabolomics seems to be a good method for verifying the authenticity and quality of honey, but for its use in common practice, more extensive research needs to be carried out on more samples.

**Keywords:** Honey, metabolomics,  $^1\text{H}$  NMR, nuclear magnetic resonance

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Definice medu .....</b>	<b>10</b>
<b>3.2 Složení medu.....</b>	<b>10</b>
3.2.1 Cukry .....	11
3.2.2 Kyseliny a kyselost medů .....	11
3.2.3 Dusíkaté sloučeniny – aminokyseliny, bílkoviny, peptidy a enzymy .....	11
3.2.4 Minerální látky a vitaminy.....	12
3.2.5 Fenolové sloučeniny .....	12
3.2.6 Barviva.....	13
3.2.7 Hydroxymethylfurfural (HMF) .....	13
<b>3.3 Produkce medu.....</b>	<b>13</b>
3.3.1 Světová produkce.....	14
3.3.2 Česká produkce.....	14
3.3.3 Získávání medu.....	15
3.3.4 Problémy produkce medu, které vedou k falšování.....	15
<b>3.4 Způsoby falšování medu, biomarkery falšování .....</b>	<b>16</b>
3.4.1 Způsoby falšování medu.....	17
3.4.1.1 Přímé falšování medu .....	17
3.4.1.2 Nepřímé falšování medu.....	19
3.4.1.3 Nesprávné označení botanického nebo zeměpisného původu .....	19
3.4.1.4 Fermentace.....	20
3.4.1.5 Přehřátí medu.....	20
<b>3.5 Vliv teploty na med .....</b>	<b>20</b>
3.5.1 Krystalizace medu .....	20
3.5.2 Viskozita medu .....	21
3.5.3 Vliv teploty na složení medu .....	22
3.5.3.1 Hydroxymethylfurfural (HMF).....	22
3.5.3.2 Enzymy .....	23
3.5.3.3 Antioxidační aktivita .....	24
3.5.3.4 Ostatní.....	24
3.5.4 Vliv délky a teploty skladování na složení medu .....	25
<b>3.6 Pečetě kvality a ochranné známky původu medu, biomed .....</b>	<b>25</b>
3.6.1 Značka „Český med“ .....	25
3.6.2 Značka „Med jak má být“ .....	26

3.6.3	Biomed.....	26
<b>3.7</b>	<b>Akátový med, medovicový med, řepkový med – specifita, biomarkery....</b>	<b>27</b>
3.7.1	Akátový med.....	27
3.7.2	Řepkový med.....	27
3.7.3	Medovicový med.....	28
<b>3.8</b>	<b>Použití NMR v určení chemického složení, původu a druhu medu, workflow NMR analýzy medu.....</b>	<b>28</b>
3.8.1	NMR spektroskopie.....	28
3.8.2	Workflow NMR analýzy medu.....	29
3.8.3	PCA.....	29
3.8.4	PLS-DA a OPLS-DA.....	30
<b>4</b>	<b>Metodika.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Celkový design experimentu.....</b>	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>Vzorky.....</b>	<b>31</b>
4.2.1	Vzorky k analýze biomarkerů botanického původu medu.....	31
4.2.2	Vzorky k analýze biomarkerů záhřevu medu.....	31
<b>4.3</b>	<b>Příprava vzorku pro NMR.....</b>	<b>32</b>
<b>4.4</b>	<b>Parametry měření <sup>1</sup>H NMR spekter.....</b>	<b>32</b>
<b>4.5</b>	<b>Statistické zpracování.....</b>	<b>33</b>
4.5.1	Analýza biomarkerů botanického původu.....	33
4.5.2	Analýza biomarkerů záhřevu.....	33
<b>5</b>	<b>Výsledky a diskuse.....</b>	<b>35</b>
<b>5.1</b>	<b>NMR analýza medu.....</b>	<b>35</b>
<b>5.2</b>	<b>Biomarkery botanického původu medu.....</b>	<b>37</b>
<b>5.3</b>	<b>Biomarkery záhřevu medu.....</b>	<b>42</b>
5.3.1	Lipový med – vliv teploty na integrály vybraných píků spektra.....	42
5.3.2	Lipový med – vliv času na integrály vybraných píků spektra.....	45
5.3.3	Medovicový med – vliv teploty na integrály vybraných píků spektra.....	48
5.3.4	Medovicový med – vliv času na integrály vybraných píků spektra.....	51
<b>6</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>Seznam obrázků.....</b>	<b>60</b>
<b>9</b>	<b>Seznam tabulek.....</b>	<b>61</b>

# 1 Úvod

Falšování potravin je problémem, který lidstvo řeší od nepaměti. Nejenže snižuje kvalitu potravin, má neblahý vliv na ekonomiku a hospodářskou soutěž, ale má také řadu negativních účinků na lidské zdraví. Testování autenticity potravin a detekce falšování různých potravinářských výrobků je tudíž nezbytná pro posouzení hodnoty a zajištění ochrany spotřebitele před podvodnými činnostmi (Bansal et al. 2017).

Protože podvodníci velmi pečlivě sledují vývoj nových postupů odhalování falšování potravin a neustávají ve vymýšlení nových taktik, jak tyto postupy obcházet, je potřeba neustále přicházet s novými metodami odhalování falšování potravin. Nové metody detekce falšování potravin by měly být co nejjednodušší, nejrychlejší, nejlevnější, nejpreciznější a zároveň by mělo být téměř nemožné je oklamat.

Med je jedním z nejstarších potravinářských produktů lidstva. Obsahuje řadu nutričně důležitých látek, které podporují dobré zdraví a regeneraci. Protože se jedná o exkluzivní a drahý výrobek, je oblíbenou komoditou padělatelů (Zábrodská & Vorlová 2015).

Kvalitu medu nicméně neohrožuje pouze vědomé falšování, ale také nevhodné skladování, nesprávné nakládání s medem a jeho nevhodná úprava, kterých se často nevědomky mohou dopouštět spotřebitelé a někdy i producenti.

Falšování i nevhodné nakládání s medem škodí jeho kvalitě, a tudíž snižuje jeho hodnotu. Nukleární magnetická rezonance (NMR) je moderní metodou, která se jeví jako vhodná ke zkoumání medu a ověřování jeho pravosti. Jedná se o nedestruktivní metodu s vysokou reprodukovatelností, snadnou přípravou vzorku a krátkou dobou analýzy, která má potenciál za rozumnou cenu poskytnout detailní informace o složení medu a stát se mocným nástrojem v boji s falšováním a špatnou kvalitou medu (Boffo et al. 2012; Schievano et al. 2019).



## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Výzkum odpovídal na následující otázky: 1) Existují biomarkery botanického původu, které jsou charakteristické pro jednotlivé druhy medů? Je rozdíl mezi medy s převahou nektaru z řepky (řepkové medy), medy s převahou nektaru z akátu (akátové medy) a medovicovými medy? 2) Existují biomarkery záhřevu medu? Je rozdíl mezi tepelným ošetřením zkrystalizovaného medu pomocí nižší teploty delší dobu nebo naopak vyšší teplotou kratší dobu?

Na základě výzkumných otázek byly stanoveny hypotézy: 1) Medy různého botanického původu se od sebe liší a tyto změny jsou detekovatelné s pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR). 2) Tepelné ošetření medu vede ke změnám složení medu a tyto změny jsou detekovatelné s pomocí NMR.

Cílem práce bylo: 1) S pomocí NMR zjistit, jestli je rozdíl mezi řepkovými, akátovými a medovicovými medy. Zjistit, jestli existují biomarkery botanického původu typické pro tyto jednotlivé druhy medů. 2) Zjistit, které látky se mění v průběhu záhřevu medu a zda je výhodnější ošetřovat zkrystalizovaný med pomocí nižší teploty delší dobu, nebo naopak vyšší teplotou kratší dobu.

### 3 Literární rešerše

Včelařství má nesmírný význam pro celou společnost. V oblasti opylování hmyzosubných rostlin, ale i zachování biodiverzity krajiny, je přínos tohoto odvětví často srovnáván s výnosem z prodeje medu. Produkce medu je ovšem jen malou součástí významu chovu včel jako takového. Přesto včelaři v České republice obvykle nedostávají žádnou finanční odměnu za opylování plodin, živí je hlavně prodej medu a dalších včelích produktů. V rámci Evropské unie je přitom přínos z chovu včel pro společnost vyčíslen částkou 14,2 miliardy eur ročně. Je velmi důležité si uvědomit, že 84 % druhů rostlin a 76 % potravinové výroby je závislé na opylování včelami. Chov včel také zásadním způsobem přispívá k zachování ekonomického přínosu pro společnost, zachování ekologické rovnováhy v krajině a ochraně biologické rozmanitosti (Ministerstvo zemědělství 2017).

Z tohoto důvodu je nesmírně důležité co nejvíce ochránit a zvýšit prestiž českých včelařů nejen pomocí dotací a finančních příspěvků, ale také zvýšením povědomí veřejnosti – například prostřednictvím pečeti kvality, ochranných známek a různých soutěží.

Jak už bylo zmíněno výše, cílem této diplomové práce je mj. za pomoci nukleární magnetické rezonance (NMR) od sebe odlišit jednotlivé druhy medů a nalézt pro ně specifické biomarkery, aby se do budoucna usnadnila a zrychlila analýza medů, odhalení falšování, přidělování značek kvality a ochranných známek pro jednodruhové medy.

#### 3.1 Definice medu

Med je podle vyhlášky č. 76/2003 Sb. upravené vyhláškou č.148/2015 Sb. potravinou přírodního sacharidového charakteru, složená převážně z glukosy, fruktosy, organických kyselin, enzymů a pevných částic zachycených při sběru sladkých šťáv květů rostlin (nektar), výměšků hmyzu na povrchu rostlin (medovice), nebo na živých částech rostlin včelami (*Apis mellifera*), které sbírají, přetvářejí, kombinují se svými specifickými látkami, uskladňují a nechávají dehydratovat a zrát v plástech (Vyhláška č. 76/2003 Sb.).

Codex Alimentarius definuje med velmi podobně, a to jako přírodní sladkou látku produkovanou včelami medonosnými z nektaru rostlin, ze sekretů živých částí rostlin nebo z exkretů hmyzu sajícího na živých částech rostlin, které včely shromažďují, transformují kombinací se specifickými látkami včelám vlastní, ukládají, dehydratují, skladují a nechávají v medové plástvi zrát a dozrát. Podle této normy med sestává z různých cukrů, převážně z fruktosy a glukosy, jakož i z dalších látek, jako jsou organické kyseliny, enzymy a pevné částice odvozené ze sběru medu. Do medu se nesmí přidávat žádná jiná potravinová složka, ani z něj nesmí být odstraňována žádná konkrétní složka (Mehryar & Esmaili 2011; Codex Alimentarius 2001).

#### 3.2 Složení medu

Obsah vody je základním kritériem kvality medu, za optimální obsah lze považovat 17–18 % vody, česká i evropská legislativa požaduje maximálně 19 % vody. Nicméně množství vody v medech se obecně pohybuje v rozmezí 15–21 %. Nevyzrálé medy mohou mít i nad 21 % vody, a proto jsou více náchylné ke kvašení (Veselý et al. 2013).

Zbylých přes 80 % medu tvoří sušina, která je z více než 95 % tvořena různými cukry. Z ostatních látek jsou v medu obsaženy bílkoviny, aminokyseliny, organické kyseliny, minerální látky, vitaminy, barviva, aromatické látky, látky hormonálního charakteru a další stovky přírodních látek (Veselý et al. 2013).

### 3.2.1 Cukry

Cukry jsou hlavními složkami medu. Celkový obsah cukrů v medech se nejčastěji pohybuje v rozmezí 45,3 až 86,0 g/100 g. Redukující cukry (glukosa, fruktosa a maltosa) se mohou vyskytovat v množství 43,3 až 93,70 g/100 g. Legislativa udává, že medy mají obsahovat nejméně 60 % redukujících cukrů. Medovicové medy mívají relativně méně redukujících cukrů, protože obsahují více cukrů složitějších. Invertní cukr se v medu může nacházet v množství 64,14 až 99,30 g/100 g (Mehryar & Esmaili 2011; Veselý et al. 2013).

Většinu cukerné sušiny medů tvoří fruktosa a glukosa. Téměř ve všech medech převažuje fruktosa nad glukosou. Obsah fruktosy se pohybuje v rozmezí 20,84 až 58,38 g/100 g a obsah glukosy leží mezi 13,5 a 50,77 g/100 g. Poměr fruktosy ke glukose je obvykle 0,78–1,75. Medy z akátu, vřesu a kaštanovníku setého mají poměr fruktosy ke glukose vyšší než 1,3. V medech se vyskytuje také sacharosa, která je přirozenou součástí nektaru i medovice, ale její obsah je nízký: 0,06–24,8 g/100 g. Sacharosa obvykle tvoří okolo 1 %, protože je štěpena invertázou obsaženou v hltanových žlázách včel. Vyšší cukry jsou obsaženy zejména v medovicových medech, jejich koncentrace bývá okolo 10 %. Nektarové medy mají oproti tomu pouze do 2–3 % vyšších cukrů. Dalším častým sacharidem obsaženým v medech je melecitosa. Melecitosa způsobuje krystalizaci medu v plástech během několika dnů, tento jev je označován jako cementový med (Mehryar & Esmaili 2011; Veselý et al. 2013).

### 3.2.2 Kyseliny a kyselost medů

Kyseliny jsou obsaženy ve všech druzích medů a způsobují kyselou reakci a chuť. Základní kyselinou je kyselina glukonová, vznikající z glukosy enzymatickou oxidací. Dále jsou v medech ve významném množství přítomny kyselina citronová, jablečná a jantarová, v malém množství kyseliny octová, mravenčí, máselná, mléčná, šťavelová, glykolová a alfa-ketoglutarová (Veselý et al. 2013).

Volná kyselost je důležitým parametrem spojeným se zhoršováním kvality medu. Je charakterizována přítomností organických kyselin v rovnováze s laktony, vnitřními estery nebo některými anorganickými ionty, jako jsou fosforečnany, sírany a chloridy. Codex Alimentarius povoluje pro volnou kyselost maximální hodnotu 50,00 meq/kg. Vyšší hodnoty mohou svědčit o fermentaci cukrů na organické kyseliny (da Silva et al. 2016).

Celkovou kyselost medu můžeme vyjádřit i jako pH. Medy mají průměrně pH od 3,9 do 4,0, nektarové medy jsou kyseléjší (i pH 3,4) a medovicové medy mohou dosahovat pH až 6,1. Příčinou menší aktivní kyselosti medovicových medů je vyšší obsah minerálních látek, které působí tlumivě na kyselost (Veselý et al. 2013).

### 3.2.3 Dusíkaté sloučeniny – aminokyseliny, bílkoviny, peptidy a enzymy

Aminokyseliny se významně podílejí na chuťových vlastnostech medů. Podle obsahu aminokyselin je možné určit i geografický původ medů. Nejvíce aminokyselin nacházíme

ve smíšených medech. Převažující aminokyselinou v medech je prolin, vyskytuje se v koncentraci 1,58–301 mg/100 g. Kromě prolinu můžeme v medech najít například kyselinu glutamovou, kyselinu asparagovou, histidin, glycin, threonin, glutamin,  $\beta$ -alanin,  $\alpha$ -alanin, tyrosin, leucin, isoleucin, lysin, methionin, arginin, tryptofan, serin, valin, trypsin a další (Mehryar & Esmaili 2011; Veselý et al. 2013; da Silva et al. 2016; Machado De-Melo et al. 2018).

Množství bílkovin různých medů se pohybuje v rozmezí 199 až 13 100  $\mu$ g/g. Molekulová hmotnost bílkovin v medech se pohybuje od 40 do 400 000. Dusík lze nalézt v koncentraci 0,000–0,133 g/100 g. Asi polovina dusíkatých látek v medu jsou nízkomolekulární látky, peptidy. Většina má biochemickou aktivitu – patří mezi enzymy. Významnými enzymy v medech jsou invertáza, diastáza, glukosaoxidáza, kataláza, medný enzym, kyselá fosfatáza a další (Mehryar & Esmaili 2011; Veselý et al. 2013).

### 3.2.4 Minerální látky a vitaminy

Med odráží chemické složení rostlin, ze kterých je shromažďován. Obsah stopových prvků přítomných v medu závisí na typu půdy, kde se nachází daná rostlina, a může naznačovat botanický původ konkrétního medu. Minerální látky jsou v medech zastoupeny do koncentrace 1,23 %, medovicové medy jsou na obsah minerálních látek bohatší než nektarové medy. Z makrobiogenních prvků absolutně převažuje draslík (51,6–21 600 ppm). Po něm následují sodík (4,3–727,79 ppm), vápník (6,24–900 ppm), hořčík (5,8–139 ppm) a fosfor (1,17–100,66 ppm). Ze stopových prvků jsou to především železo (1,13–407 ppm), měď (0,05–35 ppm), zinek (0,14–106 ppm) a mangan (0,07–10,2 ppm). České medy mají v porovnání s medy z jiných zemí vyšší obsah niklu (Mehryar & Esmaili 2011; Veselý et al. 2013; da Silva et al. 2016).

Med obsahuje vitaminy, které pocházejí hlavně z pylu z květín navštívených včelami, z nektaru nebo medovice. Množství vitaminů v medu je tak malé, že ho nelze považovat za dobrý zdroj těchto živin. Obsah vitaminů rozpustných ve vodě je vyšší než množství vitaminů rozpustných v tucích, protože med téměř neobsahuje lipidy. Nejzastoupenějším vitaminem medu je vitamin C, který má antioxidační účinek. V různých množstvích byly detekovány vitaminy skupiny B. Některé vitaminy rozpustné v tucích, jako je vitamin A, D, E a K, byly nalezeny ve velmi malém množství (Machado De-Melo et al. 2018).

### 3.2.5 Fenolové sloučeniny

Potenciální terapeutické vlastnosti medu jsou připisovány biologicky aktivním sloučeninám, které medu mimo jiné dodávají antioxidační, antibakteriální a protizánětlivé účinky. Většina z těchto látek patří mezi fenolové sloučeniny. Celkové množství polyfenolů v medech se pohybuje v rozmezí 2,00–285,7 mgGAE/100 g (GAE = ekvivalentů kyseliny gallové). Mnoho z těchto látek bylo navrženo jako markery botanického a/nebo geografického původu medu. Polyfenoly jsou rozděleny do několika tříd podle fenolických strukturních znaků. V medu jsou to hlavně flavonoidy, fenolické kyseliny a deriváty fenolických kyselin (Mehryar & Esmaili 2011; Machado De-Melo et al. 2018).

Mezi fenolické kyseliny nacházející se v medu patří deriváty kyseliny benzoové (jako je kyselina gallová, ellagová a protocatechová) a deriváty kyseliny skořicové (jako je kyselina

kofeinová, sinapová, ferulová a kumarová). Flavonoidy jsou velkou skupinou rostlinných fenolových pigmentů. Obsahují několik fenolických hydroxylových funkcí vázaných na aromatické struktury. Množství flavonoidů v medech se pohybuje mezi 0,91 a 28,25 mgQE/100 g (QE = ekvivalentů kvercetinů). V závislosti na strukturální složitosti flavonoidů, zejména na oxidačním stavu centrálního aromatického kruhu, jsou flavonoidy rozděleny na flavonoly (myricitin, galangin, kvercetin, rutin a kaempferol), flavony (chrysin, tektochrysin, luteolin a apigenin), flavanoly (katechin), flavanony (hesperetin, naringenin, pinocembrin a pinobanksin), isoflavony, antokyany a chalkony (Mehryar & Esmaili 2011; Machado De-Melo et al. 2018).

### 3.2.6 Barviva

V medu výrazně převažují rostlinná barviva. Obecně lze v medech zjistit 11–13 různých barviv patřících mezi flavonoidy, antokyany a produkty degradace cukrů. Z flavonoidních rostlinných barviv byl v medu prokázán kvercetin a rutin. Další skupinou barviv v medech jsou látky mající původ ve zbytcích košilek po včelím plodu. Z aminokyseliny tyrosinu vznikají melanoidní barviva. Další aromatické aminokyseliny reagují s cukry (hlavně fruktosou) za vzniku hnědých barviv, z nichž některá mají specificky výrazné aroma (Veselý et al. 2013).

### 3.2.7 Hydroxymethylfurfural (HMF)

Při zahřívání medu dochází působením kyselin medu k rozkladu přítomných medů na 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd (HMF). HMF ovšem není přítomen pouze v medu; v různých koncentracích ho lze nalézt v tepelně zpracovaných potravinách obsahujících cukr, ve snídanových cereáliích, chlebu, mléčných výrobcích, ovocných šťávách atd. Bylo zjištěno, že HMF má hlavně negativní účinky na lidské zdraví, je cytotoxický pro sliznice, kůži a horní dýchací trakt, je mutagenní, způsobuje chromozomální aberace a je karcinogenní. V nedávných studiích se ovšem také ukázalo, že HMF má i některé pozitivní účinky, například účinky antioxidační, antialergické a protizánětlivé (Veselý et al. 2013; Shapla et al. 2018).

Přítomnost HMF je jedním z důležitých kritérií kvality medu. Čerstvé a v chladu skladované medy mají obsah HMF do 10 mg/kg. Obsah 40 mg na kg je na hranici, ale ještě vyhovuje normě – odpovídá zahřátí medu zhruba na 70 °C po dobu 5 hodin. Medy s obsahem několika stovek mg HMF na kg svědčí o několikanásobném nešetřeném zahřívání a jejich biologická hodnota je značně tím poškozena (Veselý et al. 2013).

## 3.3 Produkce medu

Spotřeba medu v posledních desetiletích neustále roste ze dvou hlavních důvodů:

- i) nárůst světové populace a
- ii) preference rostoucího počtu spotřebitelů včetně mladých lidí vybírat si přírodní potraviny.

S rostoucí světovou populací a poptávkou po přírodních a zdravých produktech mnoho zemí nemůže uspokojit svou poptávku po medu domácí produkcí a musí dovážet rostoucí objemy z exportních zemí. Zvýšená poptávka po medu zase vede k nárůstu celosvětového vývozu medu, který roste průměrně o přibližně 30 000 tun ročně (García 2018).

### 3.3.1 Světová produkce

Celosvětový objem výroby medu dosáhl v roce 2016 1,859 milionů tun a v roce 2017 dokonce 1,861 milionů tun. Světový trh s medem byl v roce 2016 oceněn asi na sedm miliard amerických dolarů. Stoupající trend lze vidět i v počtu včelstev, který ve světě od roku 2010 stoupl z asi 80 milionů na 90,5 milionů včelstev v roce 2016. Od roku 2016 vlastní největší počet úlů Indie, má jich okolo 12 milionů, následuje ji Čína a Turecko. Oproti tomu například Spojené státy mají pouze asi 2,8 milionů včelstev. I přes obrovský počet úlů v Indii převyšuje v objemu produkce Indii Čína, která v roce 2017 vyrobila asi 543 000 tun medu, což představuje 29 % objemu celosvětového trhu. EU je druhým největším producentem medu, v letech 2016 i 2017 bylo v Evropě vyprodukováno 230 000 tun medu, což odpovídá 12 % světové produkce medu. Mezi pět největších světových producentů medu patří ještě Turecko, Argentina a Irán (European Commission 2019; Shahbandeh 2019).

### 3.3.2 Česká produkce

Produkce medu v České republice se v posledních dvou letech výrazně zvedla. V roce 2016 přesáhla produkce hodnotu 10 000 tun. Od roku 2014 je to nárůst o 3 000 tun. Příčinou jsou mimo jiné vhodné klimatické podmínky v období snůšky a zejména změny ve složení osevních ploch kulturních rostlin s výrazným nárůstem pěstování olejnin. Podrobný vývoj produkce medu v České republice od roku 2010 je uveden v tabulce 1 (Ministerstvo zemědělství 2017).

Jedním z faktorů, který nepříznivě ovlivňuje české včelařství, je relativně nízká spotřeba včelích produktů, zvláště medu. V ČR se spotřeba medu pohybuje okolo 1 kg na obyvatele za rok. Spotřeba medu má z dlouhodobého hlediska setrvalý stav. Tento stav není pozitivní ani z pohledu včelařů ani z pohledu konečného spotřebitele, který nevyužívá všechny pozitivní účinky tohoto jedinečného přírodního produktu. Snahou je zvýšení spotřeby medu, a to kromě tradičního balení medu i větším výběrem výrobků, které obsahují med, jako jsou např. směsi ovoce s medem, masné výrobky (šunky, paštiky), pekárenské výrobky (perníčky a jiné pečivo) a různé druhy medoviny (Ministerstvo zemědělství 2017).

Tabulka 1: Vývoj produkce medu v ČR

Rok	Počet včelstev	Průměrný výnos medu [kg/včelstvo]	Celkový výnos medu [tuny]
2010	528 186	14,11	7 454,60
2011	569 419	19,99	11 301,60
2012	540 705	13,56	7 331,90
2013	553 040	14,58	8 063,00
2014	603 392	11,87	7 162,50
2015	596 313	15,48	9 228,10
2016	662 253	15,27	10 113,34

### 3.3.3 Získávání medu

Získávání medu včelami je dlouhý náročný proces. Létavky sbírají z květů nektar nebo medovici. Snůšku předají mladuškám, které opakovanou manipulací se sladinou postupně mění sladinu na med. Transformace sladiny na med vyžaduje následující kroky:

- i) Přidání enzymů (invertáza, diastáza, glukosa oxidáza a fosfatázy) létavkami a mladuškami.
- ii) Přidání dalších látek, které pocházejí ze slinných žláz včel.
- iii) Snížení pH produkcí kyselin v trávicím traktu včely.
- iv) Změny chemického složení, zejména poměrů cukru.
- v) Odpařování vody. Obsah vody v nektaru může být až 80 %, zatímco vlhkost medu by měla být mezi 16 % a 20 %.

Přeměna nektaru na med začíná venku, když létavky dokončují sběr snůšky, a končí uvnitř úlu. Přidělení a přemístění obsahu mnoha buněk plástve před konečným skladováním je součástí procesu zrání medu, který je ukončen, když je buňka zavíčkována (Veselý et al. 2013; García 2018).

Mezi létavkami a mladuškami ve včelstvu existuje dělba práce a kolonie může přizpůsobit rychlost sběru nektaru tím, že stimuluje, aby se z mladušek stávaly létavky. Pokud včelař sklídí nezralý med, snižuje se tím práce mladušek a mohou se z nich v raném věku stávat létavky, čímž se zvyšuje kapacita sklizně. Asijští včelaři často sklízí nezralý med s vysokým obsahem vody, což pro ně znamená vyšší výnosy a snížené náklady. Díky tomuto výrobnímu systému jsou zapotřebí „medové továrny“. V těchto továrnách se medy nejprve filtrují, ředí a odstraňují se z nich rezidua nežádoucích látek. Nakonec se produkt odvlhčuje a balí. Proces zrání a sušení medu tím částečně probíhá v továrně místo uvnitř úlu. Výsledný produkt patrně není nebezpečný pro zdraví spotřebitele, ale nemá některé z pozitivních vlastností typických pro med. Takto upravený med je v rozporu s evropskou legislativou, jedná se jeden typ falšování medu. Podrobněji je téma falšování medu rozebíráno v následujících kapitolách (García 2018).

### 3.3.4 Problémy produkce medu, které vedou k falšování

Neustálé zvyšování výrobních nákladů, snižující se výnosy medu na úl v důsledku růstu průmyslového zemědělství a klesající ceny medu vedou ke snižování zisků včelařů a k tomu, že výroba medu je v mnoha případech ekonomicky neatraktivní. Zdá se, že země, které se

zaměřují především na výrobu čistého medu pro vývoz, podléhají exportnímu modelu používanému asijskými zeměmi (zmíněný výše). Mnoho dovozců a balíren medů v různých zemích přijalo model dovozu levných medů, kdy med znovu přebalí a opět vyvezou, protože to má za následek krátkodobé zisky a nízké ceny prodáváného medu. Takovéto praktiky jdou proti snahám bránit image medu jako přírodního produktu a proti snahám ochránit poctivé včelařství, jež by mělo být zásadní součástí společenské odpovědnosti firmy. Děje se to také na úkor spotřebitelů, kteří často nedostávají produkt, za který platí. Celkovým výsledkem je ohrožení bezpečnosti potravin (tzv. food safety), zabezpečení potravinami (tzv. food security) a ekologické udržitelnosti (García 2018).

Udržitelnost poctivého včelařského průmyslu vyžaduje:

- i) vytvoření pozitivní agendy,
- ii) větší vědecký výzkum vlastností medu souvisejících s lidským zdravím,
- iii) marketing a propagaci zdravotních vlastností medů,
- iv) poskytování hlubšího povědomí o výhodách a hodnotách výrobků z medu spotřebitelům;
- v) nová použití medu v potravinách,
- vi) vytvoření světové referenční sbírky medu,
- vii) otevřenější databáze pro laboratoře zkoumající med,
- viii) harmonizace a validace testů falšování medu vnitrostátními orgány,
- ix) kontinuální výzkum technik screeningu,
- x) harmonizace norem pro med,
- xi) zlepšení systémů sledovatelnosti,
- xii) lepší a harmonizovanější předpisy o označování a
- xiii) neustálý boj proti falšování medu, který by měl zahrnovat média i právní orgány.

Tuto nepříjemnou situaci lze vyřešit pouze společným úsilím včelařů, poctivých obchodníků, vědců, soukromých a veřejných laboratoří a právních orgánů. Životní prostředí, včely, včelaři i spotřebitelé medu si zaslouží ochranu (García 2018).

### **3.4 Způsoby falšování medu, biomarkery falšování**

Včelí med je jedinečné sladidlo, které má významné nutriční a léčivé účinky. Med lze konzumovat přímo nebo jej lze použít jako složku různých zpracovaných potravinářských produktů. Díky své nutriční hodnotě, výjimečné chuti a omezené produkci je cena přírodního včelího medu velmi vysoká (Karthek et al. 2011; Ribeiro et al. 2014).

Falšování medu má vliv nejen na kvalitu medu, ale také na jeho výrobu, protože pokles prodeje snižuje včelařskou produkci. Falšování medu tak ovlivňuje celý ekosystém, protože včely jsou hlavními opylovači divokých i pěstovaných rostlin a přispívají k udržení biologické rozmanitosti. Ztráta včelstev představuje biologickou, zemědělskou, environmentální a ekonomickou katastrofu (Wu et al. 2017).

Podvody s medem se postupně staly fenoménem, který je dnes téměř mimo kontrolu. Dokud přetrvávají ekonomicky motivované falšování, celní podvody a porušování mezinárodních a národních obchodních zákonů, zůstává ohrožena prosperita a stabilita světové včelařské komunity (García 2018).



### 3.4.1 Způsoby falšování medu

Existuje mnoho způsobů, jak se lze prodejem medu nezákonně obohatit. Lze mezi ně zařadit:

- i) přídavek látek na bázi sacharidů do medu (řepného nebo třtinového cukru, částečně nebo zcela hydrolyzované sacharosy, sirupů vyrobených hydrolyzou škrobu apod.);
- ii) nedodržení jakostních požadavků uvedených v legislativě (přídavek vody, vysoký obsah vody v důsledku stáčení nezralého medu, stáčení nezralého medu a jeho mechanické odvlhčování, dlouhá doba skladování nebo skladování při zvýšené teplotě, přehřátí medu při technologii výroby);
- iii) použití iontoměničových pryskyřic k odstranění reziduí a zesvětlení medu
- iv) nedodržení hygienických požadavků – obsah nepovoleného množství reziduí antibiotik (např. sulfonamidů);
- v) nesprávné označení (chybné nebo nedostatečné označení země nebo oblasti původu; chybné nebo nedostatečné označení použitého způsobu zpracování/úpravy);
- vi) přikrmování včel cukrem nebo cukernými sirupy v době snůšky;
- vii) záměna botanického původu medu;
- viii) záměna medovicového a nektarového medu;
- ix) přídavek levnějších medů – v posledních letech je například akátový med často falšován přídavkem řepkového medu
- x) jiný entomologický původ – tj. „med“ produkovaný jiným druhem včel, než je *Apis mellifera*
- xi) prodej umělého medu, což je většinou zahřátý roztok sacharosy, nebo jiného cukerného sirupu, ke kterému se přidává karamel a přírodní nebo umělé medové aroma obsahující kyselinu fenyloctovou, estery kyseliny fenyloctové nebo kyselinu skořicovou (jedná se o extrémní způsob falšování) (Zábrodská & Vorlová 2015; Wu et al. 2017; Čížková 2017; García 2018)

Podrobněji se na některé z nich podíváme v následujících kapitolách.

#### 3.4.1.1 Přímé falšování medu

Přímé falšování je přidání cizích látek/látky přímo do medu. Rostliny, které jsou obvyklými zdroji látek používaných k falšování medu, lze podle jejich metabolismu uhlíku klasifikovat jako rostliny C3 nebo C4. C3 rostliny fixují atmosférický CO<sub>2</sub> pomocí Calvinova cyklu a mají nižší poměr izotopů uhlíku <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C než rostliny C4, které fixují CO<sub>2</sub> pomocí Hatch-Slackova cyklu. Většina rostlin, ze kterých se tvoří med, jsou C3 rostliny, patří mezi ně například rýže, pšenice a řepa. Mezi C4 rostliny řadíme kukuřici a cukrovou třtinu. Hatch-Slackův (C4) cyklus i Calvinův (C3) cyklus se souběžně vyskytují pouze u dvou rostlin – u hrušek a kaktusů. Med nejčastěji podléhá falšování levnými sladidly jako je rafinovaný třtinový cukr, řepný cukr, kukuřičný sirup s vysokým obsahem fruktosy, maltosový sirup, invertní sirup, inulinový sirup s vysokým obsahem fruktosy a další. Přidání těchto cukrů a sirupů je obtížné detekovat v laboratorních testech, protože sacharidové profily lze uměle

připravit tak, aby se velmi podobaly profilu pravého medu (Mehryar & Esmaili 2011; Ribeiro et al. 2014; Zábrodská & Vorlová 2015).

#### 3.4.1.1.1 Přídavek C3 cukrů

Falšování C3 cukry se provádí hlavně za použití rýžového, pšeničného a řepného sirupu. V České republice se med obvykle falšuje právě pomocí cukrů (případně sirupů) z rostlin C3 (Zábrodská & Vorlová 2015).

Falšování pomocí řepného cukru nelze detekovat zjištěním poměru uhlíkových izotopů  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  sacharidů a proteinů, ani stanovením profilu koncentrací sacharidů nebo sacharosy. Je však možné určit a identifikovat skupiny nepřírodních oligosacharidů a také prokázat přítomnost cizích enzymů, např. stanovením  $\beta$ -fruktofuranosidázy (Zábrodská & Vorlová 2015).

Odhalení falšování medu rýžovým sirupem je náročné. Jeho výroba totiž zahrnuje hydrolyzu polysacharidů a oligosacharidů, což ztěžuje detekci jeho přítomnosti v medu. Odhalení falšování rýžovým sirupem je nákladné a je založeno na detekci 2-acetyl-3-glukopyranosidu pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií (LC-MS/MS) (Zábrodská & Vorlová 2015; Wu et al. 2017).

#### 3.4.1.1.2 Přídavek C4 cukrů

K falšování medu C4 cukry se používá kukuřičný či třtinový cukr. Přidání třtinového cukru nebo kukuřičného sirupu je snadno detekovatelné, protože mění poměr izotopů uhlíku  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  v medu. Užívá se metoda SCIRA (stable carbon isotope ratio analysis), tj. analýza poměru stabilních izotopů uhlíku. Udává se, že obsah  $^{13}\text{C}$  je 21 ‰ až 32 ‰ pro C3 rostliny a 12 ‰ až 19 ‰ pro rostliny C4 (Tosun 2013; Zábrodská & Vorlová 2015; Wu et al. 2017).

Kukuřičný sirup s vysokým obsahem fruktosy (HFCS) se tvoří hydrolyzou a izomerizací kukuřičného škrobu. Hydrolyza může být kyselá nebo enzymatická, častěji se používá enzymatická cesta. Na základě obsahu fruktosy jsou HFCS klasifikovány jako: HFCS-42 (42 % fruktosy), HFCS-55 (55 % fruktosy), HFCS-90 (90 % fruktosy). Pro svou nízkou cenu a podobné složení jako med se používají k falšování medu. Někdy se HFCS využívá ke krmení včel – zejména v zimě a brzy na jaře (Zábrodská & Vorlová 2015).

Třtinový cukr a palmový cukr (tzv. jaggery) se běžně používají k falšování medu v Indii. Normální složení palmového cukru je až 50 % sacharosy, až 20 % invertních cukrů, až 20 % vody a zbytek tvoří nerozpustné látky jako jsou proteiny a vláknina. Nízké náklady na výrobu palmového cukru ho činí lákavým k padělání medu. Přírodně tmavě hnědá barva palmového cukru způsobuje, že je obtížné jej odlišit především od vícekvětého medu (Wu et al. 2017).

#### 3.4.1.1.3 Přídavek amoniak-sulfitového karamelu

Medovicový med se obvykle označuje jako „lesní med“ a často se do něj přidává barvivo amoniak-sulfitový karamel (E150d). Důvodem je zejména vyšší prodejní cena tmavších medů. Stanovení obsahu amoniak-sulfitového karamelu je možné pomocí LC-MS/MS. Koncentrace karamelu E150d nad limitem kvantifikačních metod (> 5 mg/kg) se považuje za porušení zákonných předpisů (Zábrodská & Vorlová 2015).

### 3.4.1.2 Nepřímé falšování medu

Nepřímého falšování medu se dosahuje tím, že se včely v období přirozené dostupnosti snůšky krmí průmyslovými cukry či dokonce krystalickou sacharosou. Nepřímé falšování je velmi obtížné odhalit a jedná se o obrovskou nespravedlnost jak pro spotřebitele, tak pro producenty čistého medu. Spotřebitel pak často čelí bezcenné náhražce, ale někdy také nebezpečnému koktejlu chemikálií, jako jsou antibiotika, barviva a HMF (Zábrodská & Vorlová 2015; Wu et al. 2017).

Detekce nepřímo falšovaného medu je náročná. Vystává mnoho problémů, protože stále není známo, jak včely zpracovávají komerční cukerné sirupy a jak se jejich cukry přeměňují, tj. jaké typy cukrů a v jakých koncentracích se vyskytují ve výsledném medu. Například oficiální metody ani vnitřní standardy pro zjišťování poměrů izotopů uhlíku nejsou účinné při detekci falšování medu vyrobeného krmením včel pomocí sirupů z C3 rostlin (Zábrodská & Vorlová 2015; Wu et al. 2017).

Jednou z možností, jak odhalit padělání medu krmením včel pomocí HFCS, je analýza fruktosylfruktosy. V medu vyrobeném včelami krmenými HFCS byla detekována fruktosylfruktosa ve větším množství než v medu pocházejícím od volně létajících včel (Zábrodská & Vorlová 2015).

Med falšovaný pomocí cukerných sirupů lze zjistit také jednorozměrnou (1D) a dvourozměrnou (2D) nukleární magnetickou rezonancí (NMR) spojenou s vícerozměrnými statistickými analýzami nebo pomocí vysoce účinné iontoměničové chromatografie s pulzní amperometrickou detekcí (HPAEC-PAD) v kombinaci s chemometrickými technikami pro zpracování chromatogramů (Bertelli et al. 2010; Zábrodská & Vorlová 2015).

### 3.4.1.3 Nesprávné označení botanického nebo zeměpisného původu

Botanický původ medu významně ovlivňuje jeho organoleptické vlastnosti. Kontrola a charakterizace kvality a botanického původu jednokvětých medů má ve včelařství velký význam. Nejčastěji dochází k záměně botanického původu medu nebo nedeklarovanému přídavku levnějšího medu (například akátový med je často falšován přídavkem řepkového medu). Stanovení jednotlivých ukazatelů, jako je HMF, vlhkost, enzymatická aktivita, mono- a disacharidy, obsah dusíku, zbytky léčiv a pesticidů, nám nedává informace o botanickém nebo zeměpisném původu medu. Botanický původ může být určen analýzou flavonoidů, pylu, aromatických sloučenin a dalších specifických složek. Nejdůležitějšími technikami pro stanovení původu medů jsou melissopalynologická analýza (analýza pylu) a hodnocení organoleptických charakteristik, ovšem obě tyto metody mají své limity a jejich výsledky nemusí být vždy odpovídající. Stále se hledají nové, levné a spolehlivější metody k určování botanického původu (Ohmenhaeuser et al. 2013; Zábrodská & Vorlová 2015; Kortesiemi et al. 2016; Čížková 2017).

Pro podvodníky je výhodné i falšování zeměpisného původu medu. Některé země mohou produkovat med během celého roku a celoroční produkce medu se samozřejmě projeví na ceně, obzvláště pokud daná země disponuje levnou pracovní silou. I přes náklady za přepravu na velkou vzdálenost může takový med stát mnohem méně než med vyráběný v České republice. Některé kvalitativní ukazatele medu ze vzdálených zemí se výrazně liší od ukazatelů tradičního

českého medu – to nutně neznamená, že cizí med má nižší kvalitu, ale nese s sebou určité riziko, že bude nestandardní. K určení zeměpisného původu medu je kromě flavonoidů, aromatických sloučenin a pylu možné použít i další látky, jako jsou oligosacharidy, aminokyseliny nebo stopové sloučeniny. Slibným přístupem k ověření geografického (i botanického původu) je spojení několika metod a detekce velkého počtu analytů. Vždy je však nutné zahrnout senzorické hodnocení medu (Zábrodská & Vorlová 2015).

#### 3.4.1.4 Fermentace

K fermentaci dochází často, když je med sklizen předčasně, což negativně ovlivňuje jeho kvalitu, protože obsah vody je vyšší. Zralý med by měl obsahovat do 19 % vody, med s vyšším obsahem vody je citlivý na kvašení. Vysoká vlhkost během skladování nebo zpracování může ředit horní vrstvu medu, což zvyšuje náchylnost k fermentaci. Vyšší skladovací teplota také znamená vyšší riziko kvašení. Fermentace může být detekována stanovením titrační kyselosti. Kyselost nad 50 meq/kg svědčí o kvašení medu (Zábrodská & Vorlová 2015; da Silva et al. 2016).

#### 3.4.1.5 Přehřátí medu

Producenti medu med tepelně opracovávají ze dvou různých důvodů:

- i) kvůli usnadnění plnění a zpoždění procesu krystalizace;
- ii) aby byly zničeny mikroorganismy, které jej kontaminují (zralý med není vhodným substrátem pro mikroorganismy, mikrobiální kontaminace je doménou nezralých medů s vyšším obsahem vody).

Dlouhé ohřátí medu na teploty nad 50 °C ničí cenné látky v medu, což negativně ovlivní kvalitu medu. Přehřátý med ztrácí svou biologickou hodnotu a výrazně se snižuje množství vitamínů a enzymů. Kromě toho může přehřátí medu během zpracování vést k akumulaci zvýšených koncentrací hydroxymethylfurfuralu (HMF). Podrobněji se na vliv záhřevu a skladování na med podíváme v následující kapitole (Turkmen et al. 2006; Adriana & Purcarea 2011; Zábrodská & Vorlová 2015).

### 3.5 Vliv teploty na med

Jak již bylo ustanoveno, med je primárně zahříván kvůli usnadnění plnění, zpoždění procesu krystalizace a ke zničení kontaminujících mikroorganismů. Ovšem med se často používá i jako sladidlo v horkých nápojích a pečivech, sušenkách a jiných cukrářských výrobcích, které se více či méně tepelně zpracovávají. Tepelné ošetření způsobuje změny v nutriční hodnotě, chemickém složení, fyzikálních vlastnostech i v antioxidační aktivitě medu. Je dobře známo, že při tepelném zpracování mohou být přírodní živiny do značné míry ztraceny, protože většina biologicky aktivních látek je při vyšších teplotách relativně nestabilní (Turkmen et al. 2006; Subramanian et al. 2007; Šarić et al. 2013).

#### 3.5.1 Krystalizace medu

Hlavním důvodem, proč výrobci zahřívají med, je jeho krystalizace. Mnoho spotřebitelů předpokládá, že krystalizovaný med je falšovaný nebo nepřirodní. Krystalizace medu je ovšem

přirozený a spontánní proces, není na závadu. Většina čistého surového nezahřátého medu má přirozenou tendenci postupně krystalizovat. Krystalizovaný med není zkažený a zachovává si chuť a vlastnosti tekutého medu. Krystalizace ovlivňuje pouze barvu a texturu medu. Hlavním důvodem, proč med krystalizuje, je rovnováha glukosy a fruktosy. Zastoupení každé z nich určuje, zda med krystalizuje rychle nebo pomalu. Fruktosa je ve vodě rozpustnější než glukosa a zůstává tekutá, glukosa má nižší rozpustnost ve vodě a krystalizuje (Hamdan 2010).

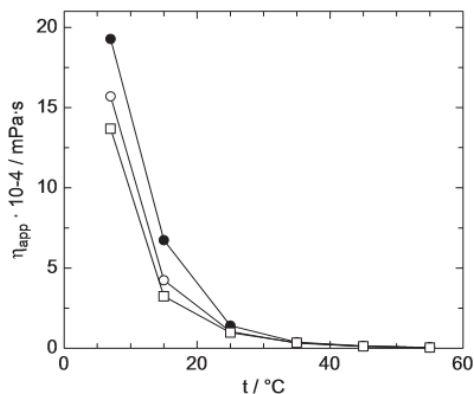
Krystalizovanému medu lze navrátit tekutou konzistenci jemným zahřátím. Zahřívání by mělo být nepřímé, nikoli například přímým plamenem dotýkajícím se nádoby. Teplota v úlu je standardně asi 35 °C a během letních období, kdy včely dozrávají med, se může zvýšit až na 40 °C. Udává se, že pro zkapalnění medu je nejlepší jej zahřát na 35–40 °C. Teplota zahřívání by neměla přesáhnout 40 °C, aby nedošlo k přehřátí. Jakkoli dlouhé přehřátí medu sníží jeho kvalitu ničením jeho enzymů, vede ke ztrátě jemné chuti, vůně a ztmavnutí medové barvy. Aby nedošlo ke ztrátě nutriční hodnoty medu, musí se med zahřívát s maximální opatrností. Krystalizovaný med je možné znovu zkapalnit bez poškození jeho kvality šetrným zahříváním ve vodní lázni nebo ve vyhřívané komoře. Nejlepší je ale med kvůli krystalizaci nezahřívát a spíše edukovat spotřebitele, že krystalizace nijak neškodí kvalitě medu (Turkmen et al. 2006; Hamdan 2010).

Alternativními metodami pro zastavení krystalizace medu mohou být například: skladování při teplotě –40 °C, mikrovlnný záhřev, odstranění vzduchových bublin, prachu a pylových částic filtrací, přidávání inhibitorů jako je isobutyryát a kyselina sorbová, úprava poměru glukosy a fruktosy nebo úprava obsahu vody. Jako prevence krystalizace medu bylo popsáno také ultrazvukové zpracování (Subramanian et al. 2007).

### 3.5.2 Viskozita medu

Dalším důvodem záhřevu je obtížná manipulace s medem způsobená jeho vysokou viskozitou (1,36 N·s/m<sup>2</sup> při 25 °C a 21,5 % vlhkosti), která představuje problémy při zpracování. Viskozita medu je ovlivněna několika faktory – kromě teploty a obsahu vlhkosti jsou rozdíly ve viskozitě připisovány složení jednotlivých cukrů a necukernému a koloidnímu materiálu. Když je med zahříván, zpočátku podléhá velmi rychlému poklesu viskozity (do teploty 30 °C), po které je změna viskozity mnohem pomalejší (Subramanian et al. 2007).

Průběh závislosti viskozity na teplotě u španělských medů zkoumali Gómez-Díaz a kol. (2009). Příklad experimentálních výsledků získaných pro tři různé vzorky medu použité v této studii jsou uvedeny na obrázku 1. Můžeme pozorovat, že při vysokých teplotách dosahuje viskozita medu téměř konstantních hodnot.



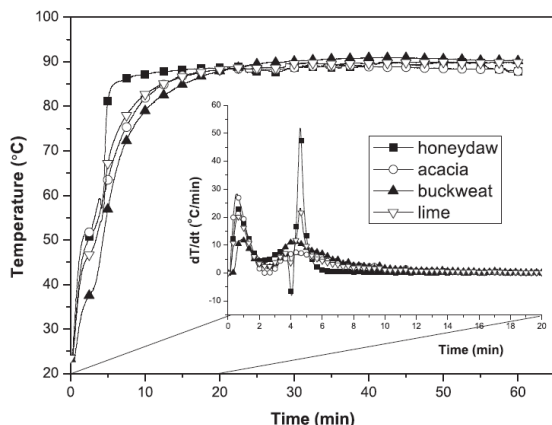
Obrázek 1: Závislost viskozity 3 španělských medů na teplotě, obrázek převzatý z článku Gómez-Díaz a kol. (2009)

### 3.5.3 Vliv teploty na složení medu

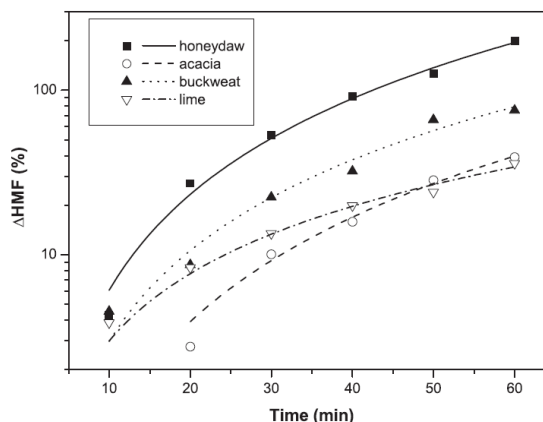
#### 3.5.3.1 Hydroxymethylfurfural (HMF)

Nekontrolované zahřívání medu mění nepříznivě obsah hydroxymethylfurfuralu (HMF) a enzymatickou aktivitu. HMF je považován za nejdůležitější degradační produkt zahřátého medu a vynikající ukazatel čerstvosti medu. Tvoří se dehydratací hexosy v kyselém prostředí nebo Maillardovou reakcí. Nadměrné množství HMF způsobuje ztmavnutí barvy a ztrátu čerstvosti medu. Počáteční obsah HMF v různých druzích medu se drasticky liší. Uvádí se, že neexistuje žádný přímý vztah/souvislost mezi složením medu a množstvím HMF, ale že botanický původ ovlivňuje rychlost jeho formování. Jak už bylo řečeno v předchozích kapitolách, obsah HMF v medu by měl být obecně nižší než 40 mg/kg (s výjimkou pekařského medu) a méně než 80 mg/kg u medů deklarovaného původu z oblastí s tropickým podnebím. Obsah 40 mg/kg HMF orientačně odpovídá záhřevu medu na 70 °C po dobu 5 hodin. Nicméně Adriana a Purcarea zjistili, že záhřev lipového a kaštanového medu na 70 °C po dobu 12 resp. 24 hodin nevedl ke zvýšení množství HMF nad 40 mg/kg (Nozal et al. 2001; Tosi et al. 2002; Turkmen et al. 2006; Subramanian et al. 2007; Adriana & Purcarea 2011; Veselý et al. 2013; Zábrodská & Vorlová 2015).

Kowalski (2013) analyzoval čtyři druhy medu (medovicový, lipový, akátový a pohankový). Vzorky medu byly podrobeny konvenčnímu ohřevu ve vodní lázni při 90 °C po dobu maximálně 60 minut. Na obrázku 2 je zobrazena závislost vzrůstající teploty na čase ohřevu medů ve vodní lázni, po přibližně 20 minutách teplota vzorků dosáhla hodnoty 90 °C. Na obrázku je zároveň znázorněna první derivace teploty v závislosti na čase  $dT/dt$ . Je jasně zobrazena přítomnost dvou maxim v  $dT/dt$ . U všech druhů medu je první maximum kolem první minuty a druhé mezi čtvrtou a pátou minutou zahřívání. Počáteční akumulace tepla by mohla souviset s vysokou viskozitou medu, a tedy s nízkou tepelnou vodivostí. Po snížení viskozity dochází k lepšímu přenosu tepla a teplotní kompenzaci s okolím. Přítomnost druhého maxima je pravděpodobně spojena s mechanismem konvenčního zahřívání, při kterém je přenos tepla z vnějšku do středu vzorku. Obrázek 3 pak ukazuje relativní nárůst koncentrace HMF během ohřevu.



Obrázek 2: Závislost teploty na čase ohřevu medu ve vodní lázni vč. první derivace, obrázek převzatý z článku Kowalski (2013)



Obrázek 3: Závislost relativního nárůstu koncentrace HMF během ohřevu, obrázek převzatý z článku Kowalski (2013)

Byly provedeny i další studie na toto téma. Tosi a kol. (2002) zkoumal obsah HMF v medech zahříváných nad 100 °C a došel k závěru, že jsou-li teploty záhřevu vyšší než 130 °C (i krátkodobě), dosahuje zvýšení HMF vyšších hodnot, než které jsou povolené legislativou. Takové ošetření medu se ale v praxi nepoužívá.

Turhan a kol. (2008) zahřívali vzorky medovicových i květových medů po dobu 15 až 90 minut při 75, 90 a 100 °C a analyzovali obsah HMF. Zahřívání květových medů na 90 °C po dobu až 90 minut a medovicových medů 75 minut nezpůsobilo významné zvýšení HMF (HMF nepřekročil úroveň 40 mg/kg). Výsledky naznačují, že nadměrný obsah HMF může souviset spíše s nevhodnými skladovacími podmínkami než s přehřátím (nadměrný obsah HMF může souviset s Maillardovou reakcí během nevhodného dlouhého skladování). Včelaři tedy nemusí med zahřívát při vysokých teplotách, mírné teploty postačují ke snížení viskozity a zabránění krystalizace.

### 3.5.3.2 Enzymy

Hlavními enzymy přítomnými v medu jsou invertáza, diastáza (amyláza) a glukosaoxidáza spolu s nepatrnými množstvími katalázy a kyselý fosfatázy. Enzymy štěpící škrob (diastáza) se používají jako indikátor kvality medu kvůli své citlivosti na teplo. Jejich obsah v medu se měří jako aktivita diastázy a vyjadřuje se diastázovým číslem (DN). Diastázové číslo (DN) se vyjadřuje v Schadeho jednotkách a je definováno takto: jedna diastázová jednotka odpovídá enzymatické aktivitě 1 g medu, který může za 1 h při 40 °C hydrolyzovat 0,01 g škrobu. Evropská legislativa stanovuje minimálně DN = 8 pro zpracovaný med (Subramanian et al. 2007; Sakač & Sak-Bosnar 2012).

### 3.5.3.3 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita přírodního medu je způsobena hlavně fenolovými antioxidanty (flavonoidy a dalšími fenolovými sloučeninami) pocházejícími z pylu kvetoucích rostlin a stromů a z medovice. Tyto látky jsou obvykle termolabilní. V důsledku tepelné úpravy medu se v něm mohou tvořit nové sloučeniny odolnější vůči vyšší teplotě, které mají antioxidační vlastnosti, například některé produkty Maillardových reakcí (Maillard reaction products neboli MRPs) (Turkmen et al. 2006; Šarić et al. 2013).

Antioxidační aktivita se po tepelném zpracování může nebo nemusí změnit. V určitých případech se antioxidační kapacita může zvýšit tepelným zpracováním. Změny antioxidační aktivity obecně závisí na dvou důležitých faktorech: chemickém složení zkoumané potraviny a teplotě a délce tepelného opracování. Výzkum Šarić a kol. (2013) ukázal, že krátké období tepelného ošetření akátového a kaštanového medu při 95 °C 5 min neovlivňuje jejich antioxidační aktivitu, takže typické použití medu v domácnosti by si mělo zachovat všechny jeho „dobré“ atributy.

### 3.5.3.4 Ostatní

Chua a kol. (2014) zkoumali vliv tepelného ošetření na složení tropických medů. Vzorky byly tepelně ošetřeny dvěma různými teplotami: 63 a 90 °C po dobu jedné hodiny. Během zahřívání byl monitorován kinetický profil snižování obsahu vody ve vzorcích. Protože bylo zjištěno, že účinek doby zahřívání je nepříznivější než teplota zahřívání (Subramanian et al. 2007), pro následující zkoumání zvolili nejkratší dobu zahřívání, která byla schopna snížit obsah vody na méně než 20 %. Obsah vody menší než 20 % je nutný pro snížení rychlosti fermentace a zvýšení stability medu. Zjistili, že ve vzorcích medu se po 30 minutách zahřívání na 90 °C snížil obsah vody na méně než 20 %.

V této studii (Chua et al. 2014) bylo dále zjištěno, že po tepelném zpracování mají vzorky nižší obsah bílkovin a tuků – bílkoviny a tuk jsou komplexní sloučeniny, které při zahřívání snadno degradují. Obsah popela nebyl tepelným zpracováním nijak ovlivněn, protože se skládá z minerálních látek a kovů, které nejsou termolabilní. Snížení obsahu vody zároveň vedlo ke zvýšení celkového procentuálního obsahu sacharidů a energetické hodnoty.

V jiné práci bylo zjištěno, že od teploty 80 °C začínají v medu karamelizovat cukry, při 90 °C dochází ke karamelizaci cukrů během pár hodin (Yener et al. 1987).

Med není potravinou bohatou na vitamíny, přesto se Chua a kol. (2014) ještě rozhodli zkoumat vliv tepelné úpravy na vitamíny rozpustné ve vodě, jako jsou vitamíny B2, B3, B5 a C. Vitamíny jsou totiž citlivé na teplo. Všechny vzorky medu zkoumané v této studii obsahovaly podobnou koncentraci vitamínu C, přibližně 20 mg/kg, ale vůbec nebyl detekován vitamin B3. Výsledky ukázaly, že po zahřátí na 90 °C po dobu 30 minut byla koncentrace vitamínu C snížena pouze asi o 11–14 %. Krátká doba zahřívání (30 minut) významně nedegradovala vitamin C dokonce ani při vysoké teplotě 90 °C. K tomuto jevu může přispívat vysoký obsah cukru v medu fungující jako stabilizátor. Toto vysvětlení však nebylo použitelné na vitamíny B2 a B5, protože oba byly degradovány z více než 50 % s výjimkou riboflavinu v akátovém medu.



### 3.5.4 Vliv délky a teploty skladování na složení medu

Studie Turhan a kol. (2008) naznačila, že za nadměrný obsah HMF v medech mohou být větším dílem zodpovědné Maillardovy reakce probíhající při nevhodném dlouhodobém skladování než krátkodobý záhřev medu.

Tyto závěry podporuje například starší článek z roku 2000, kde bylo provedeno srovnání změn HMF, pH, celkové kyselosti a obsahu volných kyselin ve slunečnicovém a eukalyptovém medu. Medy byly zahřáté na teploty 50–80 °C 15–60 minut a pak skladované při pokojové teplotě celkem 12 měsíců. U obou typů medu nejvýraznější účinek na obsah HMF vykazovala doba skladování následovaná teplotou a délkou zahřívání. Doba skladování ukázala nejvýraznější vliv také na celkovou kyselost a obsah volných kyselin (Bath & Singh 2000).

Castro-Vázquez a kol. (2012) provedli srovnávací studii vlivu teploty na fyzikálně-chemické parametry, složení těkavých látek a sensorickou kvalitu vřesového medu skladovaného 12 měsíců. Vyhodnocovaly se teploty skladování: chlazení (10 °C), pokojová (20 °C) a vysoká teplota (40 °C). Studie ukázala, že teplota uchovávání má hluboký dopad na kvalitu dlouhodobě skladovaného medu. Skladování vřesového medu v chladničce způsobilo zadržení některých těkavých sloučenin jako je „šeříkový“ (lilakový) aldehyd a nižší ztráty terpenových derivátů ( $\beta$ -damascenon, benzaldehyd a fenylacetaldehyd). Med uchovávaný při pokojové teplotě vykázal výrazné zvýšení hladin 2-furanmethanolu, furanolu, 2-methylfurankarboxylátu, maltolu a 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6methyl-4(H)-pyran-4-onu (DDMP). Tyto sloučeniny, jejichž koncentrace byly extrémně vysoké v medech podaných při 40 °C, byly navrženy jako užitečné ukazatele nevhodné skladovací teploty. Sensorická analýza ukázala, že nežádoucí pachy medu začaly být mírně vnímány již ve vzorcích skladovaných při pokojové teplotě, při teplotách 40 °C už byly jasně patrné, zatímco chlazené vřesové medy si udržovaly organoleptický profil a kvalitu podobné čerstvému medu.

Lze se tedy domnívat, že nejen teplota, ale také délka skladování medu má vliv na jeho složení. Při krátkodobém záhřevu medu a následném delším skladování patrně převažuje vliv doby skladování, zatímco při skladování medu za různých teplot je výraznější vliv teploty.

## 3.6 Pečetě kvality a ochranné známky původu medu, biomed

Posílení garance kvality medu na trhu lze mj. i zavedením dobrovolných, třeba národních nebo oborových kritérií vyšší kvality. Český svaz včelařů podniká kroky, jež mají poskytnout spotřebiteli garanci, že mu je nabízen skutečně kvalitní český med. V roce 1999 byla vydána svazová norma ČESKÝ MED, která stanovuje přísnější pravidla než vyhláška. Pojmy ČESKÝ MED, a také MORAVSKÝ MED a SLEZSKÝ MED uváděné na etiketách, jsou registrovaná označení, tedy slovní ochranné známky patřící Českému svazu včelařů. Právo užívání této známky mají včelaři, kteří se zavázali dodržovat stanovená pravidla; zpracovatelské firmy musí právo užívání vyjednat s Českým svazem včelařů (Dupal et al. 2015).

### 3.6.1 Značka „Český med“

Ochrannou známkou ČESKÝ MED může být označen pouze produkt, který má geografický původ na území České republiky a je bez jakékoli příměsi jiného, „cizího“ medu. Český med je ovlivněn genotypem včely medonosné i složením flóry na území ČR – tím je

dosaženo jeho jedinečného složení. Botanický původ medu tak silně ovlivňuje jeho organoleptické vlastnosti. Český med smí obsahovat maximálně 18 % vody (evropský limit je 20 %) a obsah HMF smí být maximálně 20 mg/kg (evropský limit je 40 mg/kg). Med takto označený nemusí být doložen laboratorním protokolem o rozboru, protože při dodržení správné včelařské praxe není třeba pochybovat o tom, že podmínkám Českého medu vyhovuje. Jedná se tedy o samo-deklaraci producenta-dodavatele, bez účasti nezávislé třetí strany na posouzení shody. Je to systém založený na důvěře spotřebitele v dodavatele (Dupal et al. 2015).

### 3.6.2 Značka „Med jak má být“

Projekt “MED JAK MÁ BÝT” představuje pozitivní aktivitu včelařů podpořenou státními orgány a výzkumnými institucemi. Byla registrována ochranná známka MED JAK MÁ BÝT s pečeti VÚVč Dol® (Výzkumný ústav včelařský, s. r. o., Dol). Včelař vybrané šarže medu zašle do laboratoře VÚVč Dol k podrobné analýze. Laboratoř zašle včelaři výsledek rozboru a limitovaný počet unikátně číslovaných pečeti určených na sklenice s medem analyzované šarže. Protokol o rozboru je k dispozici i spotřebitelům. Každý zákazník může vložit číslo pečeti do internetové stránky [www.medjakmabyt.cz](http://www.medjakmabyt.cz), a zde se mu ukážou podrobnosti o zakoupeném produktu. Při posuzování udělení pečeti se hodnotí kvalita medu podle ukazatelů určených legislativou. Kromě toho laboratoř ověřuje, zda med neobsahuje nežádoucí zbytky krmení (škroby) nebo přísady (karamel). Kvalitní med se posuzuje i sensoricky. Zákazník takový produkt pozná podle pečeti s textem ochranné známky “Med jak má být®” a jednoznačným číslem nalepeným na sklenici medu. Podle čísla pečeti si každý konzument může na internetu ověřit, že jde o úředně přezkoumaný kvalitní produkt. V případě nespokojenosti se lze obrátit na laboratoř VÚVč Dol, která archivuje vzorky od všech prověřovaných šarží (Dupal et al. 2015).

### 3.6.3 Biomed

Biomed se od konvenčně produkovaného medu liší podmínkami jeho vzniku, jedná se o med vyprodukovaný v certifikovaném a kontrolovaném ekologickém zemědělství. Jedině pak lze med a včelí produkty označit zákonem chráněnou značkou BIO. Včelař prodávající med pod značkou bio musí svá včelstva chovat v prostředí, kde se v okruhu 3 km zdroje nektaru a pylu skládají převážně z kultur pěstovaných ekologickým způsobem a/nebo divoce rostoucími rostlinami, a zajistit dostatečnou vzdálenost od všech nezemědělských zdrojů znečištění, která by mohla vést k zamoření. Musí vyloučit veškeré cizorodé látky, zejména pak některá léčiva. Je zakázáno umělé přikrmování včelstev, na konci období produkce je třeba včelstvům zajistit dostatečné zásoby medu a pylu k jejich přezimování. Umělá výživa včelstev je povolena, pokud je jejich přežití ohroženo extrémními klimatickými podmínkami. Umělá výživa musí sestávat z medu pocházejícího z ekologického zemědělství, přednostně z vlastního hospodářství, nebo z bio cukru. Všechny uvedené požadavky podléhají kontrole státních dozorových orgánů. Med i bez označení BIO může být při dodržení správné chovatelské praxe stejně kvalitní. BIO med však přináší spotřebiteli i další garance dané přísnými podmínkami ekologického zemědělství (Dupal et al. 2015).

### 3.7 Akátový med, medovicový med, řepkový med – specifita, biomarkery

Jednotlivé medy se liší nejen sensorickými vlastnostmi jako je barva, vůně a chuť, ale také svým složením, fyzikálně-chemickými vlastnostmi atd. Tato práce je zaměřena na studium akátových, řepkových a medovicových medů, resp. medů s převahou nektaru pocházejícího z akátu nebo z řepky (100 % snůšky z jednoho rostlinného druhu je v praxi velice málo pravděpodobné) a medovicových medů (Kaškonienė & Venskutonis 2010; Veselý et al. 2013).

V posledních letech bylo provedeno mnoho studií s cílem vyhodnotit možnosti charakterizovat vzorky medu různého botanického původu pomocí specifických chemických sloučenin, označovaných jako markery. Markery byly identifikovány a kvantifikovány pro řadu vzorků medu. Pokus o nalezení užitečných chemických markerů je založen na analýze údajů o složení těkavých sloučenin medu, fenolických kyselin, flavonoidů, sacharidů, aminokyselin a některých dalších složek. V současné době je poměrně obtížné najít spolehlivé chemické markery pro odlišení medů získaných z různých zdrojů, protože chemické složení medu závisí nejen na druhu rostliny, která produkuje medovici nebo nektar, ale také na dalších faktorech jako je zeměpisná oblast, sezóna sběru, počasí, způsob skladování, doba zrání medu, povaha včelích pastvin, režim skladování, podmínky a technologie sklizně, včelí druh, a dokonce i interakce mezi chemickými sloučeninami a enzymy medu. Kromě toho výsledky chemických analýz složek medu mohou také záviset na technikách přípravy a analýzy vzorků. V důsledku toho spolehlivější charakterizace medu vyžaduje stanovení více než jedné třídy sloučenin, ideálně v kombinaci s moderními statistickými metodami – například analýzou hlavních složek nebo shlukovou analýzou (Kaškonienė & Venskutonis 2010; Pita-Calvo & Vazquez 2018).

#### 3.7.1 Akátový med

Akátový med pochází z květů trnovníku akátu (*Robinia pseudacacia*). Jedná se o běžně konzumovaný nektarový med s mírným aroma. Akátový med je hutný, má jemnou chuť a nekrytalizuje, zůstává v tekutém stavu i několik let. Je téměř průhledný až světle žlutý s nazelenalým nádechem (Veselý et al. 2013; Wang 2014).

Akátové medy obsahují některé pro ně charakteristické látky. Mezi charakteristické těkavé sloučeniny v akátových medech patří *cis*-linalool oxid a heptanal, charakteristické pro akátové medy jsou také rhamnosidy kaempferolu, rhamnosyl-glukosidy, kyselina ferulová, akacetin, deriváty kyseliny skořicové, kyselina *cis*, *trans*- a *trans*, *trans*- abscisová a kyselina ellagová. Ve studii zabývající se hodnocením původu a složení medu evropského akátu na základě geografických květových markerů pomocí NMR se jako nejdůležitější markery akátového medu ukázaly sloučeniny pinocembrin, pinobanksin, alpinon, chrysin, kyselina abscisová a dále sloučenina v současnosti neznámé struktury s chemickým posunem 5,25 ppm. (Kaškonienė & Venskutonis 2010; Schievano et al. 2013; Machado De-Melo et al. 2018; Schievano et al. 2019).

#### 3.7.2 Řepkový med

Řepkový med má světlou jantarovou barvu, známe ho častěji v krystalické formě, obvykle krystalizuje již několik dnů po vytáčení. Je-li tekutý, má jasně žlutou barvu. Má nepříliš výraznou, ale zvláštní chuť s vůní řepky (Veselý et al. 2013; Wang 2014).

Pro řepkové medy je typický těkavý dimetyldisulfid, dále kyselina *cis*, *trans*- a *trans*, *trans*- abscisová, kaempferol a 8-methoxykaempferol. Jako marker řepkového medu byla navržena též kyselina fenylpropanová (Kaškonienė & Venskutonis 2010; Machado De-Melo et al. 2018).

### 3.7.3 Medovicový med

Medovicový med se vyrábí ze sekretů rostlin nebo z exkretů hmyzu převážně z čeledi mšice a červci (*Aphididae* a *Coccinea*) sajícího na živých částech rostlin. Medovice vylučovaná hmyzem nemůže být považována za výkaly, protože rostlinné mízy nejsou tráveny v žaludku hmyzu. Medovicový med se výrazně liší od nektarových medů jednak tmavší barvou, jednak pomalou krystalizací (s výjimkou medu s obsahem melecitosy). Má harmonickou chuť, což je dáno vyšším obsahem minerálních látek a menší kyselostí. Potravinový průmysl oceňuje silnou chuť tohoto druhu medu. Obchodní zájem o medovicové medy také roste, protože mají vyšší terapeutické vlastnosti než květové medy. Antibakteriální a antioxidační vlastnosti byly zjištěny více u medovicových medů oproti květovým medům (Veselý et al. 2013; Pita-Calvo & Vazquez 2018).

Medovicové medy mají obvykle vyšší hodnoty několika fyzikálně-chemických proměnných hodnocených při běžné kontrole kvality medů, jako je elektrická vodivost, kyselost, pH a obsah popela. Elektrická vodivost se používá při kontrole kvality k rozlišení mezi dvěma druhy medů. Další důležitou fyzikální vlastností, kterou lze použít k odlišení květových medů od medovicových medů, je optická rotace. Optická rotace závisí do velké míry na typech a relativním množství sacharidů přítomných v medu. Medovicové a falšované medy jsou obecně pravotočivé, zatímco květové medy jsou levotočivé. Medovicové medy mají také vyšší obsah oligosacharidů, hlavně melecitosy a rafinosy, a nižší obsah monosacharidů než květové medy. Melecitosa (trisacharid) je považována za charakteristický znak medovicových medů (Pita-Calvo & Vazquez 2018).

V literatuře lze najít některé specifické botanické markery medovicového medu, jako je například kyselina protokatechová, dále kvercitol a *trans*-oak lakton (dubový lakton) pro dubový medovicový med, 2-aminoacetofenon a propylanisol pro medovicový med z cesmínového dubu a 1-chlor-oktan a tridekan pro borovicový medovicový med (Machado De-Melo et al. 2018; Pita-Calvo & Vazquez 2018).

Mezi nejdůležitější charakteristické těkavé sloučeniny v medovicových medech patří n-dekan, nonanal,  $\alpha$ - $\alpha$ -dimethylfenylacetát, nonanol a kyselina 2-methylhexanová. Za marker medovicového medu se považuje také diacylglycerilether (Kaškonienė & Venskutonis 2010), (Schievano et al. 2012).

## 3.8 Použití NMR v určení chemického složení, původu a druhu medu, workflow NMR analýzy medu

### 3.8.1 NMR spektroskopie

Jednou z kvantových vlastností elementárních částic je jejich spin. Jádra s nenulovým spinem mají jaderný magnetický moment, jehož velikost je kvantována a jeho směr v prostředí bez vnějšího magnetického pole je náhodný. Při působení vnějšího magnetického pole se

jaderné magnetické momenty jádra zorientují buď shodně nebo nesouhlasně se směrem magnetické indukce – mluvíme o základním nebo excitovaném stavu, tj. v magnetickém poli se vytvoří dvě různé energetické hladiny. Jádro se točí a má moment hybnosti, točivý moment vyvíjený vnějším magnetickým polem má za následek cirkulární pohyb zvaný precese. Ve vnějším magnetickém poli vektor jaderného magnetického momentu vykonává precesní pohyb s frekvencí odpovídající rezonanční Larmorově frekvenci (Jacobsen 2007; Günther 2013; Moravec 2015; Záruba 2016; Holzgrabe et al. 2017).

Čím bude vnější magnetické pole silnější, tím bude i větší rozštěpení energetických hladin a také větší rozdíl v populaci jednotlivých hladin. Pokud spinový systém rozštěpený na dvě energetické hladiny začneme ozařovat radiofrekvenčním zářením, může dojít k absorpci a excitaci jednotlivých spinů na vyšší hladinu. Po ukončení ozařování dochází k deexcitaci, kterou následně měříme. NMR spektrum je tedy závislost intenzity interakce elektromagnetických vln s jádry některých atomů na frekvenci elektromagnetických vln, která je vyjádřena jako tzv. chemický posun. Lze měřit pouze NMR spektra molekuly obsahující atomy, jejichž jádra mají nenulové magnetické momenty. Mezi tato jádra patří proton  $^1\text{H}$ , uhlík  $^{13}\text{C}$ , fluor  $^{19}\text{F}$ , izotopy dusíku  $^{14}\text{N}$  a  $^{15}\text{N}$  a mnoho dalších (Novák & Hrabal 2011; Günther 2013; Moravec 2015).

### 3.8.2 Workflow NMR analýzy medu

Naměřená NMR spektra je před statistickou analýzou nutné upravit – úprava fáze, základní linie (tzv. baseline), reference atd. Ke zpracování spekter je vhodné využít program MestreNova, kde lze spektra mj. upravit, překrýt přes sebe, integrovat a uložit ve formě binů. Vhodnou velikostí binů je 0,04 ppm. Upravenou tabulku binů lze otevřít v programu MetaboAnalyst a provést statistickou analýzu PCA a OPLS-DA (resp. PLS-DA) (Olawode et al. 2018).

### 3.8.3 PCA

Prvním krokem v analýze dat jsou obvykle nesupervizované metody jako je analýza hlavních komponent (principal component analysis, PCA) – bez jakékoli předchozí znalosti třídy vzorků tato metoda umožňuje vizualizaci dat ve zmenšeném dimenzionálním prostoru založenou na odlišnostech mezi vzorky. Používá se pro shrnutí nebo redukci souboru dat na menší počet nezávisle proměnných. Původní data transformuje do nové soustavy malého počtu proměnných (hlavní komponenty, principal components, PC), které vystihují velké množství původní variability a navzájem nekorelují, a tudíž poskytují nezávislé informace o systému. Grafickými výstupy pro diagnostiku PCA jsou rozptylový diagram komponentních skóre (score plot, zobrazuje průmět objektů do roviny zvolených PC) a graf komponentních zátěží (loadings plot, vyjadřuje vztah původních proměnných k novým PC). Jinou možností je tzv. biplot kombinující oba předchozí. PCA je vynikajícím nástrojem pro průzkumnou analýzu dat a je jedním ze základů pro rozlišování, třídění a identifikaci vzorků během mnohorozměrné analýzy (Boffo et al. 2012; Wojtowicz et al. 2013; Olawode et al. 2018).

### 3.8.4 PLS-DA a OPLS-DA

Jedná se o supervizované metody analýzy dat. Supervizované postupy pracují jak s maticí naměřených dat ( $X$ ), tak s maticí tzv. prediktorů ( $Y$ ) – tedy předem známých informací. Úkol těchto metod zahrnuje zejména problém regrese (numerický výstup) a klasifikace (identifikace tříd). Metody PLS (Partial Least Square, metoda částečných nejmenších čtverců) a OPLS (orthogonal-PLS, ortogonální-PLS) zahrnují mnohonásobné lineárně regresní postupy založené na PCA, které kvantifikují vztah mezi  $X$  a  $Y$ . V případě klasifikace také existují příslušné metody diskriminační analýzy (DA, Discriminant Analysis) – PLS-DA, OPLS-DA (Wojtowicz et al. 2013).

## 4 Metodika

Výzkum medu byl zaměřen na dvě samostatné části. V rámci první bylo analyzováno 100 vzorků českých medů s cílem najít markery pro určování pravosti řepkového, akátového a medovicového medu potenciálně využitelné pro udílení známky kvality.

Druhá část byla zaměřena na problematiku rozehrívání medu. S pomocí NMR bylo zkoumáno, jaký má vliv kombinace času a teploty na změny profilu NMR spekter, a tedy potenciální vznik pro nás dosud neznámých produktů Maillardovy reakce. Jednalo se o pilotní studii, jejímž cílem je dospět k doporučení, zda je pro ohřev zkrystalizovaného medu výhodnější využití nižší teploty po delší dobu nebo naopak.

### 4.1 Celkový design experimentu

V první části práce bylo s pomocí  $^1\text{H}$  NMR zanalyzováno celkem 100 vzorků medů s cílem nalézt biomarkery pro jejich jednoznačné určení. Konkrétně se jednalo o 37 vzorků medovicových medů, 40 vzorků medů s převahou nektaru z řepky (dále označované jako řepkové) a 23 vzorků medů s převahou nektaru z akátu (dále označované jako akátové).

V druhé části práce byl proveden pilotní experiment – ošetření krystalizovaného medu 9 různými kombinacemi teploty záhřevu (40 °C, 50 °C a 60 °C) a doby záhřevu (24 h, 48 h a 96 h) v plně faktoriálním designu (3×3 matice), vždy v jednom opakování. Byly naměřeny také vzorky odpovídajících neošetřených kontrol. Tímto způsobem byly zanalyzovány dva medy – med s převahou nektaru z lípy (dále označovaný jako lipový) a medovicový med, celkem 20 vzorků. Metodika NMR analýzy a přípravy vzorku byla dříve publikována v diplomové práci Sládková (2019) s obměnami.

### 4.2 Vzorky

Všech 102 vzorků českých medů bylo získáno ze sbírky VÚVč Dol®. Všechny medy byly vytáčeny v roce 2019.

#### 4.2.1 Vzorky k analýze biomarkerů botanického původu medu

Vzorky medu byly odebrány do 15ml plastových kónických zkumavek (falkonky) pomocí kovové špachtle a byly uchovávány v temnu při pokojové teplotě. Před analýzou byly vzorky umístěny na 1 hodinu do termostatu, kde byly při 45 °C rozehrívány, aby došlo k jejich homogenizaci a rozpuštění vzniklých krystalů. Od každého vzorku bylo do mikrozkušavky naváženo 240 mg medu s odchylkou  $\pm 10$  mg (ultra mikrováhy XPR6UD5, Mettler Toledo, CH) a navážka byla zaznamenána.

#### 4.2.2 Vzorky k analýze biomarkerů záhřevu medu

Do menších sklenic o objemu 200 ml bylo pomocí lžice vloženo asi 50 g medu a sklenice byly umístěny do termostatu vytemperovaného na teplotu 40 °C, 50 °C nebo 60 °C. Po zadané době byly vzorky odebrány z termostatu (viz tabulka 2) a po zchladnutí na pokojovou teplotu umístěny do chladničky, kde byly dále uchovávány. Před analýzou již nebyly více zahřívány.

Od každého vzorku bylo do mikrozkušavky naváženo 240 mg medu s odchylkou  $\pm 10$  mg a navážka byla zaznamenána.

Tabulka 2: Odběry vzorků zahříváných medů, VÚVč Dol

	Lipový med	Medovicový med	Doba záhřevu [hod]	Teplota [°C]
Odběr č. 0	31.07.2019	31.07.2019	Blank, výchozí stav bez záhřevu	
Odběr č. 1	01.08.2019	01.08.2019	24	40
Odběr č. 2	02.08.2019	02.08.2019	48	40
Odběr č. 3	05.08.2019	05.08.2019	96	40
Odběr č. 1	01.08.2019	01.08.2019	24	50
Odběr č. 2	02.08.2019	02.08.2019	48	50
Odběr č. 3	05.08.2019	05.08.2019	96	50
Odběr č. 1	01.08.2019	01.08.2019	24	60
Odběr č. 2	02.08.2019	02.08.2019	48	60
Odběr č. 3	05.08.2019	05.08.2019	96	60

### 4.3 Příprava vzorku pro NMR

Ke každému vzorku medu bylo napipetováno 830  $\mu$ L deionizované vody (Millipore Direct-Q® 3, Merck Millipore, USA). S ohledem na specifickou hustotu medu byla výsledná koncentrace přibližně 240 mg/ml. Vzniklý roztok deionizované vody a medu byl vortexován, až do doby viditelného rozpuštění medu. Pro ještě lepší homogenizaci byly vzorky na 5 min umístěny do ultrazvukové lázně. Z takto připraveného roztoku bylo odpipetováno 540  $\mu$ L do čisté mikrozkušavky a k tomu bylo přidáno 60  $\mu$ L NMR pufru. NMR fosfátový pufr v D<sub>2</sub>O byl připraven přidáním 1,5M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 % NaN<sub>3</sub> a 5 mM TSP (kyselina trimethylsilylpropanová, která se díky chemickému posunu 0,0 ppm používá jako vnitřní standard NMR spektra). Hodnota pH byla upravena na 4,0 pomocí H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; pH bylo měřeno pH metrem inoLab® pH 7110 (WTW, Německo). TSP byla použita jako vnitřní standard pro kalibraci chemického posunu na 0 ppm. Chemikálie na výrobu pufru byly z firmy Lach-Ner, CZ, NaN<sub>3</sub> a TSP byly z firmy Merck, DE. Všechny mikrozkušavky se vzorky byly po dobu 10 s znovu vortexovány. Celkový objem 600  $\mu$ L vzorku byl kvantitativně pomocí pipety převeden do NMR kyvet (5 mm, high throughput, Norell, USA).

### 4.4 Parametry měření <sup>1</sup>H NMR spekter

Měření všech <sup>1</sup>H NMR spekter bylo provedeno na spektrometru Bruker AVANCE III HD 500 MHz (Bruker, DE), vybaveném 5 mm PA BBO 500S1 BBF-H-D-05 Z SP sondou s cívkami se Z gradientem a pracujícím při 500,23 MHz. Všechna měření byla provedena při teplotě 298 K. <sup>1</sup>H NMR spektra byla změřena s pomocí pulzní sekvence 1d noesy se supresí vody. <sup>1</sup>H NMR spektra byla snímána s následujícími parametry: počet skenů 128, počet datových bodů 64k, šířka spektra 16 ppm, relaxační prodleva 1 s, akviziční čas 4,1 s, směšovací čas 100 ms. Ladění, zamykání, kalibrace 90° pulzu a shimming byly automaticky optimalizovány pomocí standardních příkazů (atma, lock, pulsecal a topshim). Všechny vzorky byly vloženy do autosampleru a automaticky měřeny využitím nástroje Spooler v softwaru



Topspin (Bruker, DE). Všechna spektra byla zpracována za použití softwaru Topspin. Korekce fáze a korekce základní linie (tzv. baseline) byly provedeny manuálně pro každé jednotlivé spektrum. Reference byla upravena na signál TSP 0,00 ppm.

## 4.5 Statistické zpracování

### 4.5.1 Analýza biomarkerů botanického původu

Data získaná z binningu spekter provedeném v programu Mestrenova v. 14 (MNOVA, ES) od 0,50 do 10,00 ppm se šířkou jednoho binu 0,04 ppm, byla po odstranění oblasti suprese vody 4,60–4,70 ppm dále analyzována pomocí softwaru MetaboAnalyst 4.0 (Chong et al. 2018).

V softwaru MetaboAnalyst byla data normalizována podle sumy, logaritmičsky transformována a automaticky škálována. Z multivariačních statistických analýz byla nejprve použita analýza hlavních komponent PCA. Byla provedena normalizace na referenci TSP, log transformace a automatické škálování. Poté byla aplikována diskriminační analýza PLS-DA a OPLS-DA. I v tomto případě byla provedena normalizace na referenci TSP, log transformace a automatické škálování. Validace modelu byla provedena při 1000 permutacích. Pro zjištění významných binů (VIP), které odlišují jednotlivé třídy, byly  $p(\text{corr})$  hodnoty z OPLS-DA násobené směrodatnou odchylkou (SD) jednotlivých binů. Takto získaná data byla názorně zobrazena jako loadingplot. Loadingplot významných binů byl zobrazen také podle významnosti  $p$ -hodnot ( $p$ -value), obojí v programu Microsoft Excel 2016 (Microsoft, USA).

Přiřazení signálů  $^1\text{H}$  NMR spekter bylo prováděno na základě významných binů z loadingplotu OPLS-DA blíže upřesněných pomocí softwaru Chenomx NMR suite v. 8.3. (Chenomx Inc., CA) a také porovnáním s výsledky dostupné vědecké literatury.

### 4.5.2 Analýza biomarkerů záhřevu

V programu Topspin bylo všech deset spekter každého vzorku zobrazeno dohromady jako tzv. superimposed spectra a intenzita píků byla upravena tak, aby intenzita reference byla stejná u všech spekter. Ručně byly vytipovány píky, kde se od sebe jednotlivá spektra výrazněji lišila intenzitou nebo chemickým posunem. V programu Mestrenova byly vybrané píky zintegrovány bez korekce intenzity. Výsledky integrace byly uloženy jako integrální tabulka, která byla upravena v programu Microsoft Excel 2016 (Microsoft, USA). Úprava zahrnovala mj. i korekci na navážku a odstranění záporných hodnot.

Upravená integrální tabulka byla rozdělena na dvě – vliv závislosti na teplotě a vliv závislosti na čase tak, aby obě tabulky mohly být zvlášť analyzovány v softwaru MetaboAnalyst.

V softwaru MetaboAnalyst byla data normalizována podle sumy, logaritmičsky transformována a automaticky škálována. Z multivariačních statistických analýz byla nejprve použita analýza hlavních komponent PCA. Byla provedena normalizace na referenci TSP, log transformace a automatické škálování. Poté byla aplikována diskriminační analýza PLS-DA a OPLS-DA. I v tomto případě byla provedena normalizace na referenci TSP, log transformace a automatické škálování. Validace modelu byla provedena při 1000 permutacích. Pro zjištění významných binů (VIP), které odlišují jednotlivé třídy, byly  $p(\text{corr})$  hodnoty z OPLS-DA násobené směrodatnou odchylkou (SD) jednotlivých binů. Takto získaná data byla názorně

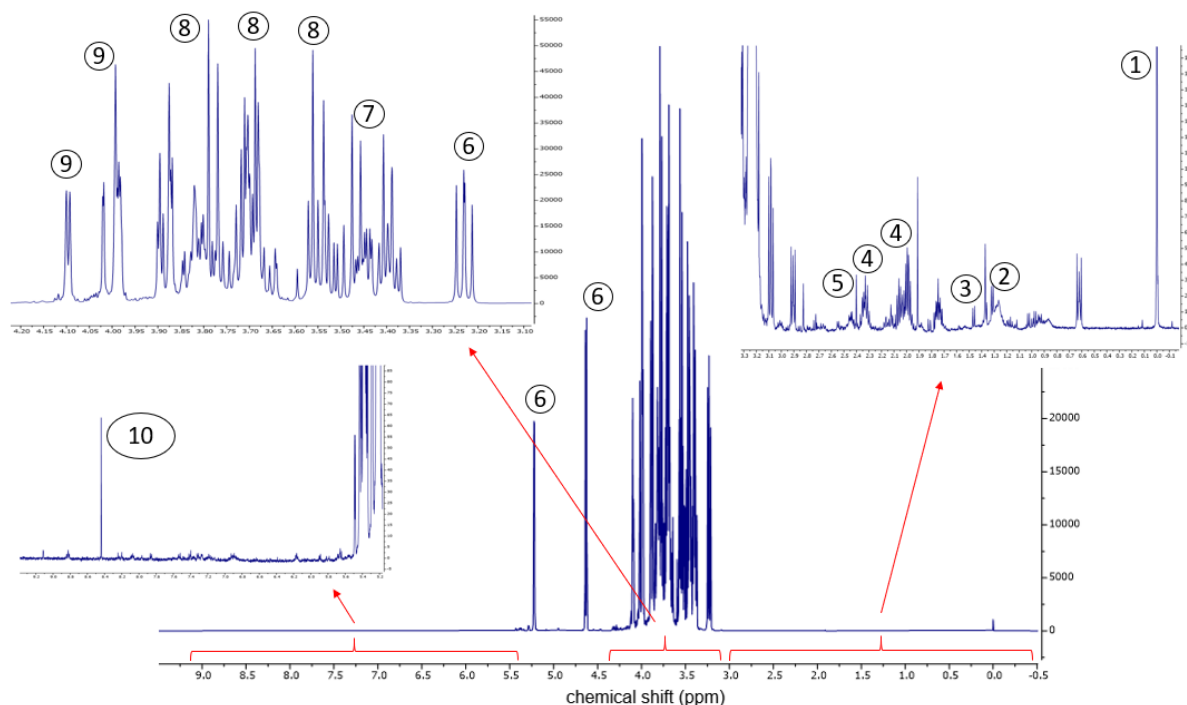
zobrazena jako loadingplot. Loadingplot významných binů byl zobrazen také podle významnosti p-hodnot (p-value), obojí v programu Microsoft Excel 2016.

Pro další statistický přístup byla ještě upravená integrální tabulka vyhodnocována v programu IBM SPSS Statistics 25 (IBM Corp., USA). Byly vytvořeny grafy změny integrálů vybraných píků se stoupající teplotou a časem a byla v nich hledána jakákoli lineární závislost. Grafy píků, které zobrazovaly lineární závislost, byly srovnány s významnými biny (VIP) získanými pomocí OPLS-DA v softwaru MetaboAnalyst.

Přiřazení signálů  $^1\text{H}$  NMR spekter bylo prováděno na základě významných binů z loadingplotu OPLS-DA blíže upřesněných pomocí softwaru Chenomx NMR suite a také porovnáním s výsledky dostupné vědecké literatury.

## 5 Výsledky a diskuse

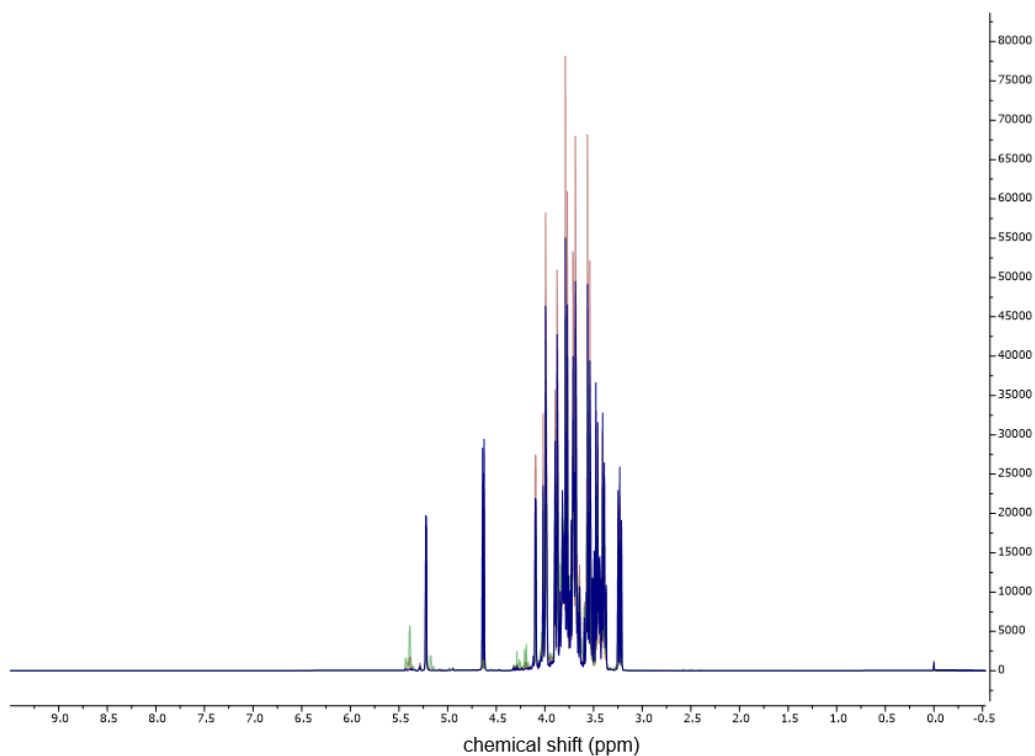
### 5.1 NMR analýza medu



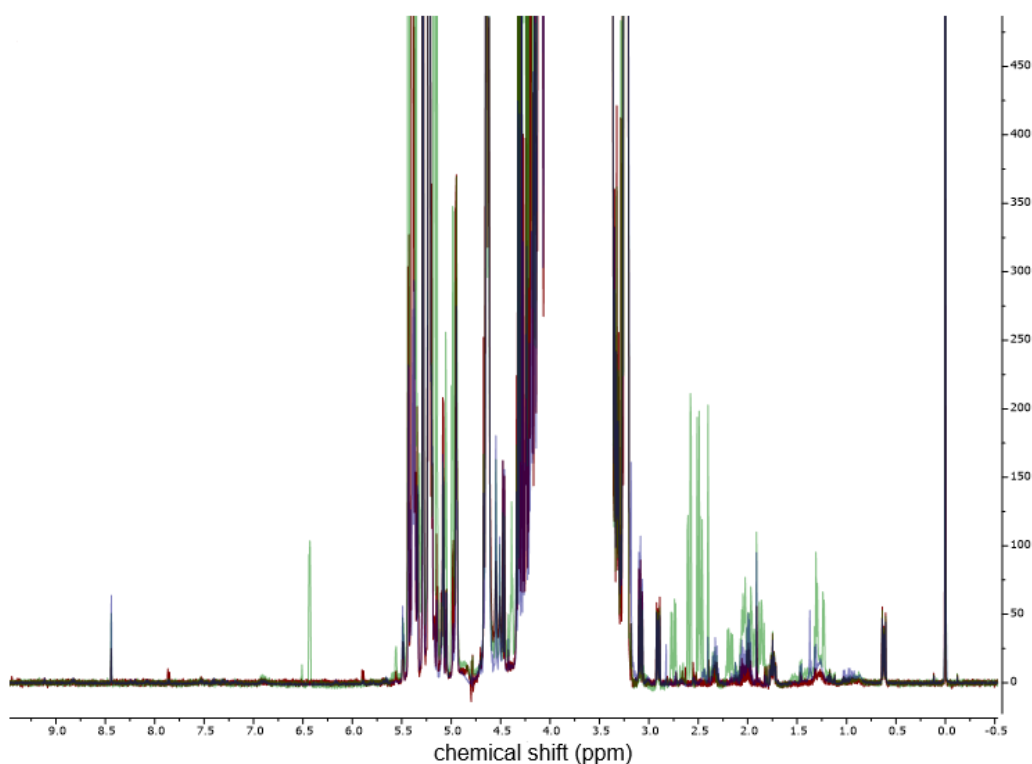
Obrázek 4: Ukázkové spektrum řepkového medu, 1, reference TSP, 2, kyselina mléčná, 3, alanin, 4, prolin, 5, kyselina jantarová, 6–9, oblast sacharidů, na signálech se obvykle podílí více sacharidů, 6, glukosa, 7, převaha glukosy, 8, signály hlavně glukosy a fruktosy, 9, převaha fruktosy, 10, kyselina mravenčí

Obecně jsou různé oblasti NMR spektra medu charakterizovány specifickými rezonancemi sloučenin, jako jsou alifatické sloučeniny (chemický posun  $\delta$  0,00–3,00 ppm), sacharidy ( $\delta$  3,00–6,00 ppm) a aromatické sloučeniny ( $\delta$  6,00–10,00 ppm) (Boffo et al. 2012).

Pro medy obvykle platí, že rozmezí chemických posunů mezi 0,5 a 3 ppm lze použít k pozorování signálů spojených s fermentačními nebo degradačními markery (zejména kyselinou jantarovou, octovou, mléčnou i ethanolom) souvisejícími s kvalitou a stářím medu. Kromě toho lze v této části spektra současně pozorovat dvě typické a významně zastoupené složky medů, kyselinu citronovou (okolo 2,80 a 2,95 ppm) a prolin (okolo 2,00 a 2,35 ppm). Oblasti sacharidů dominují monosacharidy – především glukosa a fruktosa. V oblasti sacharidů je zajímavou podoblastí úsek mezi chemickými posuny 4,9 a 5,5 ppm. Zde lze pozorovat signály spojené s typickými, ovšem méně zastoupenými cukry (tyto chemické posuny reprezentují především anomerní protony těchto cukrů), mezi nejvýznamnější z nich patří turanosa, isomaltosa, rafinosa, melecitosa, trehalosa, sacharosa, maltosa, maltotriosa, erlosa a kestosa. Kromě signálu turanosy může být většina píků pozorovaných v této oblasti způsobena příspěvkem několika cukrů (Boffo et al. 2012; Spiteri et al. 2015).



Obrázek 5: Srovnání rozdílů ukázkových spekter akátového (červená), řepkového (modrá) a medovicového medu (zelená)



Obrázek 6: Srovnání rozdílů ukázkových spekter akátového (červená), řepkového (zelená) a medovicového medu (modrá) ve větším přiblížení

Oblast aromatických sloučenin obsahuje méně intenzivní rezonance. V této oblasti mají všechny medy bez ohledu na zeměpisný a botanický původ dva významné markery – kyselinu

mravenčí (okolo 8,45 ppm) a HMF (9,45–9,50 ppm). Také zde lze pozorovat arylóvé signály (7,41 a 7,66 ppm) (Olawode et al. 2018).

Na obrázku 4 je zobrazeno ukázkové spektrum medu s převahou řepky (řepkového medu). Dominantní je pochopitelně oblast sacharidů (3–6 ppm), z nichž nejzastoupenější jsou glukosa, fruktosa a maltosa. V alifatické oblasti jsou na obrázku dobře viditelné například aminokyseliny prolin a alanin a kyseliny jantarová a mléčná. Signál 8,45 ppm patří kyselině mravenčí. Chemický posun 0,0 ppm patří kyselině trimethylsilylpropanové (TSP), která se používá jako vnitřní standard NMR spektra.

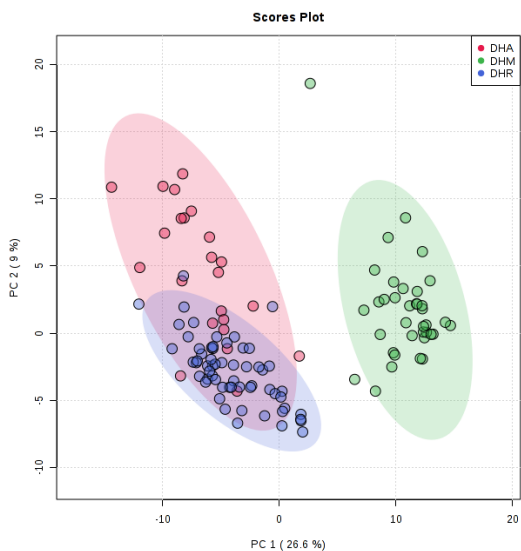
Grafické srovnání ukázkových spekter řepkových, akátových a medovicových medů je vyobrazeno na obrázcích 5 a 6. Lze si všimnout, že akátový med má nejvyšší koncentrace sacharidů, zatímco alifatická oblast je nejpestřejší u řepkového medu. Podrobněji se rozdíly mezi jednotlivými druhy medů budeme věnovat v následujících kapitolách.

## 5.2 Biomarkery botanického původu medu

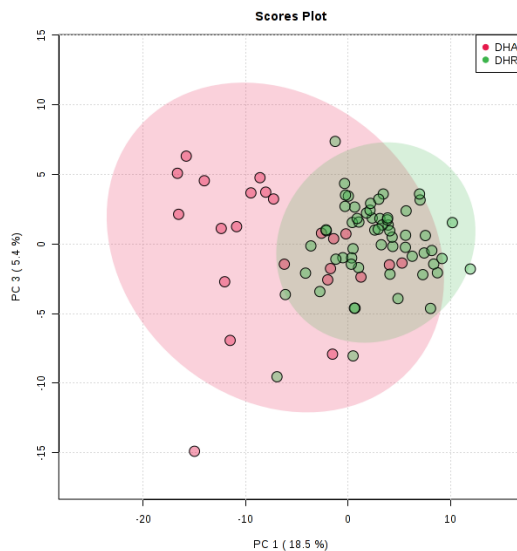
Naměřená spektra medovicových medů a medů s převahou nektaru pocházejícího z akátu nebo z řepky byla statisticky vyhodnocena pomocí PCA a OPLS-DA analýzy. Nejprve byla provedena nesupervizovaná PCA analýza, po ní následovala supervizovaná OPLS-DA analýza. Modely OPLS-DA (PLS-DA) jsou charakterizovány hodnotami  $R^2$  a  $Q^2$ . Hodnoty  $R^2$  kvantifikují, kolik původních dat je v modelu popsáno, zatímco hodnoty  $Q^2$  představují správnost modelu vypočtenou křížovou validací (Kew et al. 2019).

Provedená PCA analýza dvou hlavních komponent PC1 a PC2 (obrázek 7) ze softwaru jasně oddělila medovicové medy od nektarových medů. Komponenta PC1 interpretovala 26,6 % variace. Protože se medovicové medy ukázaly jasně odlišitelné od nektarových medů, byly dále zjišťovány pouze rozdíly mezi medy řepkovými a akátovými. Nejzajímavější výsledky poskytla PCA analýza hlavních komponent PC1 a PC3 (obrázek 8). Vzorky se nejvíce lišily dle komponenty PC1, která vysvětluje 18,5 % variability. Řepkové medy (označeny zelenou barvou) tvoří oproti akátovým medům (červená barva) těsnější klastr, což naznačuje menší variaci mezi vzorky.

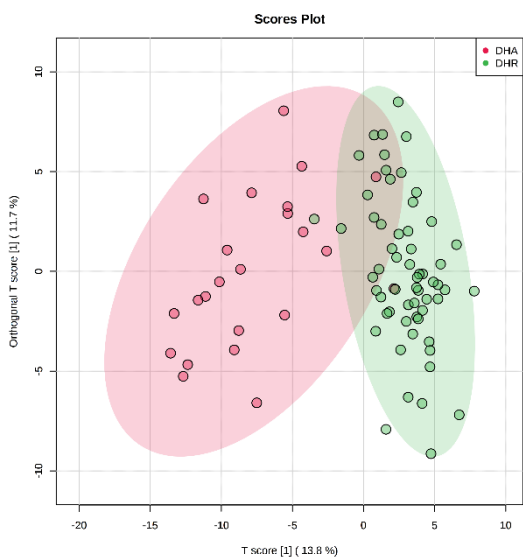
Výsledky OPLS-DA analýzy jsou zobrazeny na obrázku 9. Separace řepkových a akátových medů vykazuje oproti PCA modelu zlepšení, klastry jsou od sebe lépe odděleny. I v tomto případě si lze všimnout, že akátové medy tvoří méně semknutý klastr, což opět naznačuje větší variaci mezi vzorky. Model kvantifikuje 59 % původních dat ( $R^2$ ), správnost modelu vypočtená křížovou validací je 75 % ( $Q^2$ ).



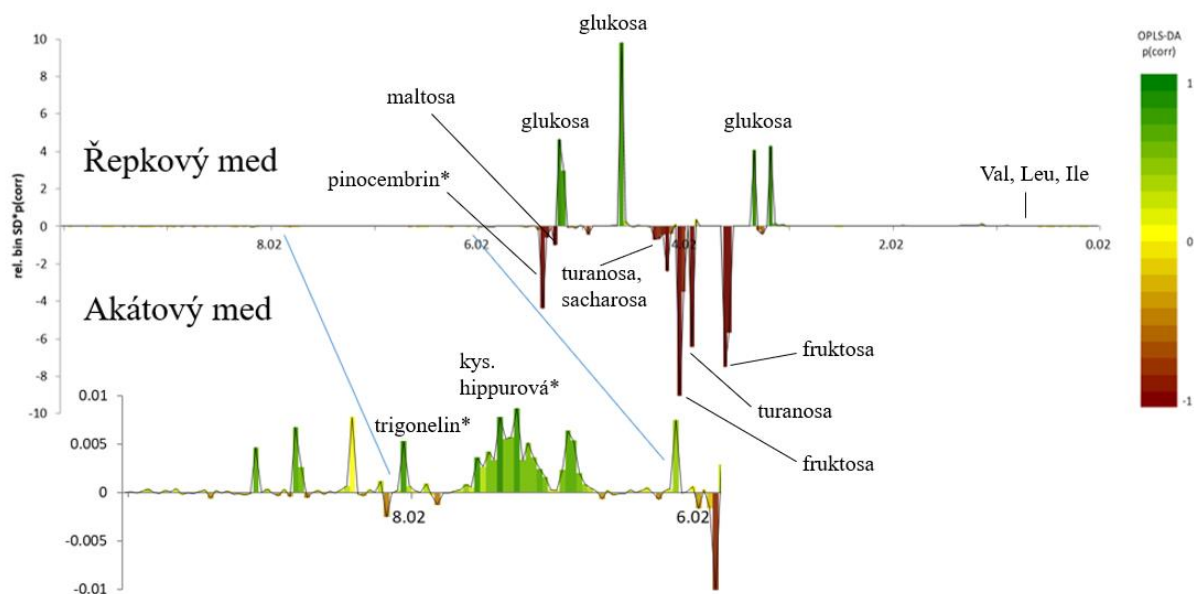
Obrázek 7: PCA analýza spekter řepkových, akátových a medovicových medů, PC1 26,6 % variace, DHA, akátový med, DHM, medovicový med, DHR, řepkový med



Obrázek 8: PCA analýza spekter řepkových a akátových medů, PC1 18,5 % variace, DHA, akátový med, DHR, řepkový med



Obrázek 9: OPLS-DA analýza spekter řepkových a akátových medů,  $Q^2 = 0,59$  a  $R^2 = 0,748$

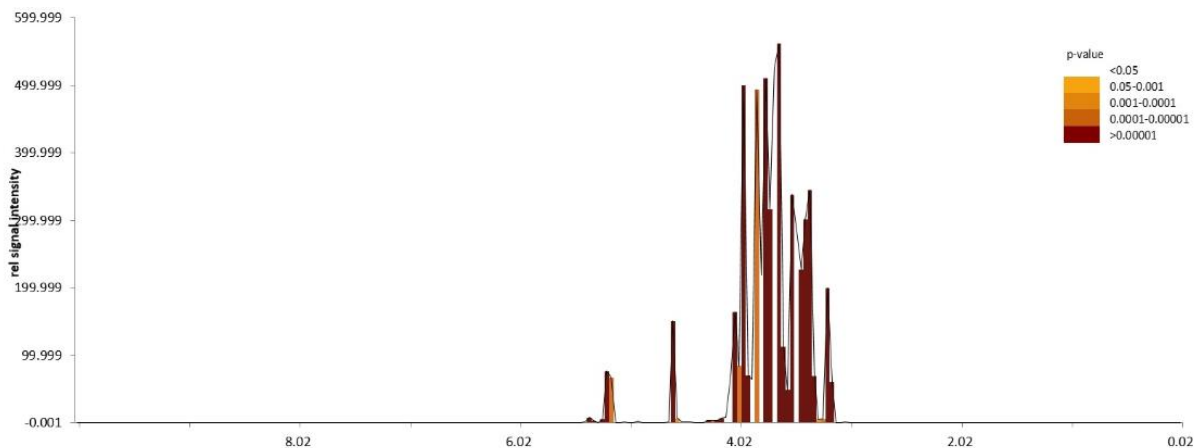


Obrázek 10: Komponentní zátěže (loadings) řepkového a akátového medu z OPLS-DA analýzy promítnuté do auto-normalizovaného NMR spektra, \*nejistá identifikace

Data z intervalů (binů) byla vizualizována také s pomocí sloupcového grafu do zjednodušeného NMR spektra (obrázek 10), kdy jeden bod spektra reprezentoval sumu signálu v intervalu 0,04 ppm. Tyto sumy signálu byly násobeny směrodatnou odchylkou v procesu tzv. auto-normalizace signálu. Normalizované signály byly dále násobeny komponentní zátěží (loadings) pro daný bin, loadings byly získány z OPLS-DA analýzy. Vzhledem k tomu, že loadings mohou nabývat negativních i pozitivních hodnot, takto modifikované spektrum má některé signály v minusových hodnotách a některé v pozitivních hodnotách v závislosti na tom, pro kterou skupinu je loadings význačné. Pro lepší přehlednost byly sloupce tohoto grafu barevně odlišeny v závislosti na hodnotě loadings binu. Interpretace grafu komponentních zátěží je tedy následující: píky směřují nahoru nebo dolů v závislosti, pro který med jsou více typické, a intenzita barvy označuje význam této závislosti. Velikost píků neodpovídá zcela jejich zastoupení v NMR spektru, ale významnější píky jsou proporcionálně zvětšeny.

Při bližším pohledu na zvětšený region aromatické části (6–9 ppm) můžeme vidět, že zde byly akátové medy velmi chudé, řepkové medy měly oproti akátovým v tomto úseku bohatší aromatu. Akátové medy naproti tomu obsahovaly více cukrů, což můžeme vidět v oblasti okolo 4 ppm.

Na obrázku 11 je zobrazeno průměrné NMR spektrum všech akátových i řepkových medů. Byl proveden t-test každého binu mezi akátem a řepkou. T-test může vyjít buď významně nebo nevýznamně, hodnota p (hladina významnosti) je vizualizovaná pomocí barevné intenzity – čím tmavší barva, tím menší hodnota p pro daný bin, a tudíž větší významnost. Bílá barva znamená, že bin nemá žádnou významnost. Ve spektru vidíme stejné biny jako na obrázku 10, jedná se pouze o jiný statistický přístup s pomocí párového srovnání.



Obrázek 11: Statistická významnost s pomocí párového srovnání mezi kategoriemi řepkový a akátový med (t-test)

Tabulka 3: Charakteristické biny/píky pro řepkový a akátový med, \*možná identifikace, rafinosa se v medu obvykle nevyskytuje

řepkový med [ppm]	řepkový med – potenciální biomarker	akátový med [ppm]	akátový med – potenciální biomarker
0,82	valin, leucin, isoleucin	3,58	fruktosa
0,86	valin, leucin, isoleucin	3,62	fruktosa
0,90	valin, leucin, isoleucin	3,94	turanosa nebo rafinosa
0,94	valin, leucin, isoleucin	4,02	fruktosa
0,98	valin, leucin, isoleucin	4,06	rafinosa
3,06	neznámá slouč.	4,18	sacharosa, turanosa, rafinosa
3,18	glukosa	4,22	sacharosa, turanosa, rafinosa
3,34	glukosa	4,26	turanosa
4,62	glukosa	4,30	turanosa
5,18	glukosa	4,94	rafinosa
5,22	glukosa	5,26	neznámá slouč.
7,26	neznámá slouč.	5,34	neznámá slouč.
7,38	neznámá slouč.	5,38	maltosa
7,54	kys. hippurová/ kys. benzoová*	5,54	neznámá slouč./ pinocembrin*
8,06	trigonelin/niacin*	5,86	uridin/kys. abscisová*

Nakonec byly nalezeny charakteristické píky (biny), které od sebe odlišovaly oba medy. V programu Chenomx byla prohledána in house databáze s cílem nalézt, které sloučeniny od sebe řepkové a akátové medy odlišují. Výsledky jsou zobrazeny v tabulce 3.

Pro řepkový med bylo vyhodnoceno několik klíčových sloučenin. Za multiplet 0,82–0,98 ppm je patrně zodpovědná kombinace aminokyselin valinu, leucinu a isoleucinu. Je pravděpodobné, že každá z těchto sloučenin určitou měrou přispívá k tomuto multipletu. Statisticky významné bylo i větší množství glukosy v řepkovém medu, glukosa byla zodpovědná za chemické posuny 3,18–5,22 ppm (tabulka 3). Co se týče chemického posunu



7,54 ppm, tak tam se možná v malé koncentraci projevuje kyselina hippurová nebo pravděpodobněji kyselina benzoová, případně některý z jejích dalších derivátů. Chemický posun 8,06 ppm by mohl patřit alkaloidu trigonelinu. Zbylé sloučeniny nebylo možné identifikovat, protože naše in house databáze bohužel obsahuje pouze omezený počet sloučenin k porovnání.

Řepkové medy stojí spíše mimo hlavní zájem a v literatuře NMR spekter medů o řepkovém medu není mnoho zmínek. Lze dohledat, že řepkové medy se odlišují vyšším obsahem glukosy, což odpovídá výsledkům této práce (Devillers et al. 2004; Machado De-Melo et al. 2018). Aminokyseliny valin, leucin i isoleucinu jsou v medech velice rozšířené, jedná se o nejdůležitější esenciální aminokyseliny vyžadované včelami medonosnými. Řepkový med se vyznačuje jejich vyšší koncentrací – obsah valinu je v průměru 5,3 mg/kg, leucinu 3,2 mg/kg a isoleucinu 3,8 mg/kg, což souhlasí s výsledky této práce (Cook et al. 2003; Cotte et al. 2004). Nikde v literatuře se nepodařilo najít důkaz o přítomnosti kyseliny hippurové. Jak už bylo řečeno výše, spíše se jedná o neznámý derivát kyseliny benzoové. Naproti tomu trigonelin je v malých koncentracích běžným metabolitem ve všech medech (Kortesniemi et al. 2016). Vzhledem ke koncentraci se ale možná může jednat o niacin nebo podobnou sloučeninu obsahující dusík v aromatickém kruhu. Ve výraznějších množstvích byl trigonelin zatím nalezen v pomerančových medech z Korsiky a v medech s obsahem nektaru z kávovníku (Dzolin et al. 2019).

Z dalších biomarkerů řepkových medů uváděných v literatuře lze jmenovat dimetyldisulfid, kyselinu *cis*, *trans*- a *trans*, *trans*- abscisovou, kaempferol a 8-methoxykaempferol. Jako marker řepkového medu byla navržena také kyselina fenylypropanová. Řepkové medy se mohou vyznačovat vyšším obsahem sodíku, barya a olova (Kaškonienė & Venskutonis 2010; Machado De-Melo et al. 2018). Ani jedna z uvedených látek ale v případě této práce nebyla vyhodnocena jako vhodný potenciální biomarker českých řepkových medů. Důvodem může mj. být i to, že Kaškonienė a Venskutonis se ve svém review zabývali biomarkery medů ze 150 zemí světa. I Machado De-Melo a kol. studovali medy z celého světa. Složení medů ovšem závisí kromě botanického původu i na původu geografickém a tak, co je charakteristické například pro řepkové medy ze Španělska, nemusí platit pro řepkové medy z České republiky. Dalším problémem je, že ne všechny tyto markery byly identifikovány pomocí NMR, ale v některých případech byly použity jiné metody. Posledním problémem byla nekompletní in house databáze.

U akátového medu byly též vyhodnoceny klíčové sloučeniny. Akátový med se vyznačoval větším množstvím fruktosy (3,58, dále 3,62 a 4,02 ppm). Za chemický posun 3,94 ppm byl zodpovědný sacharid, buď se jednalo o turanosu nebo rafinosu, ale vzhledem k tomu, že v akátovém medu se rafinosa obvykle nevyskytuje, pravděpodobnější bude turanosa (Devillers et al. 2004). Chemické posuny 4,06 a 4,94 ppm by také mohly odpovídat rafinose, ale opět to není pravděpodobné. Na dubletu 4,18–4,20 ppm se patrně podílelo více sacharidů, pravděpodobně sacharosa a turanosa (další možností byla ještě rafinosa, ale jak bylo řečeno výše, v akátovém medu se rafinosa běžně nevyskytuje). Dublet 4,26 a 4,30 ppm odpovídá turanose. Za chemický posun 5,86 ppm může být zodpovědný nukleosid uridin, ale opět to nelze říct s absolutní jistotou. Ostatní chemické posuny nebylo v programu Chenomx možné identifikovat opět z důvodu nekompletní databáze.

V článku Ohmenhaeuser a kol. (2013) našli u akátových medů v oblasti střední a nízké frekvence mezi 4,2 a 3,0 ppm velmi intenzivními signály hlavních monosacharidů (glukosy a fruktosy) a disacharidů (maltosy a sacharosy), což odpovídá i nálezům této práce. Turanosa se také běžně vyskytuje v akátových medech (Mădaş et al. 2019). V literatuře (Schievano et al. 2019) byla dále jako specifický marker akátového medu nalezena sloučenina s chemickým posunem 5,25 ppm, která ovšem nebyla konkrétně určena, což odpovídá i výsledkům této diplomové práce. Ve stejné práci byla za marker považována kromě dalších i kyselina abscisová s chemickým posunem v oblasti okolo 5,80 ppm a pinocembrin s chemickým posunem v oblasti 5,50 ppm. Přestože se uridin vyskytuje v medech v malých koncentracích běžně (Kortesniemi et al. 2016), v našem případě se možná pod chemickým posunem 5,86 ppm může skrývat kyselina abscisová a ne uridin a pod chemickým posunem 5,54 ppm pinocembrin (Schievano et al. 2019). Ani jedna z obou sloučenin totiž není součástí in house databáze, se kterou se tyto signály srovnávaly. Vyšší obsah pinocembrinu v akátových medech potvrzuje i další článek od Schievano a kol. (2012). Dalším markerem akátových medů je také chrysin s několika chemickými posuny mj. v oblastech 6,30 ppm, 6,47 ppm, 6,67 ppm a 7,90 ppm. Mimo pinocembrin, chrysin a kyselinu abscisovou byly mezi biomarkery akátových medů zařazeny ještě pinobanksin a alpinon s chemickými posuny v oblasti 4,50–6,10 ppm. Alpinon má ještě signály v místě chemického posunu 7,55 ppm a 12,05 ppm (Schievano et al. 2019). Tyto chemické posuny ale v případě této práce nebyly označeny za statisticky významné, přestože se zmiňovaná práce zabývala evropskými medy.

Jako další charakteristické sloučeniny akátových medů jsou uváděny *cis*-linalool oxid, heptanal, rhamnosidy kaempferolu, rhamnosyl-glukosidy, kyselina ferulová, akacetin, deriváty kyseliny skořicové a kyselina ellagová (Kaškonienė & Venskutonis 2010). Žádná z těchto sloučenin nebyla identifikována jako potenciální biomarker. I v tomto případě platí všechny problémy vztahující se k tomuto článku uvedené výše u řepkových medů.

### 5.3 Biomarkery záhřevu medu

Medy (lipový a medovicový) byly zahřívány po tři různě dlouhé časové úseky na tři rozdílné teploty a srovnány s blankem. Byl tedy zkoumán nejen vliv teploty, ale také času. Naměřená spektra byla statisticky vyhodnocena pomocí PCA a PLS-DA analýzy. Pomocí PLS-DA analýzy byly vyhodnoceny rozdíly mezi jednotlivými biny. U vytipovaných binů (píků) byly následně hledány lineární závislosti na teplotě nebo času.

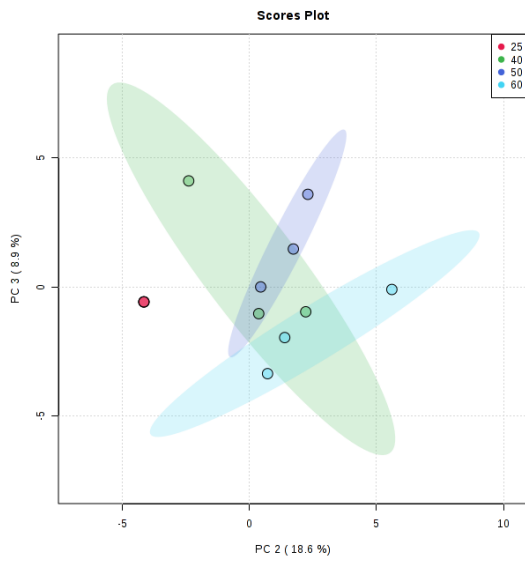
#### 5.3.1 Lipový med – vliv teploty na integrály vybraných píků spektra

Nejprve byl zkoumán vliv teploty na NMR spektra lipového medu.

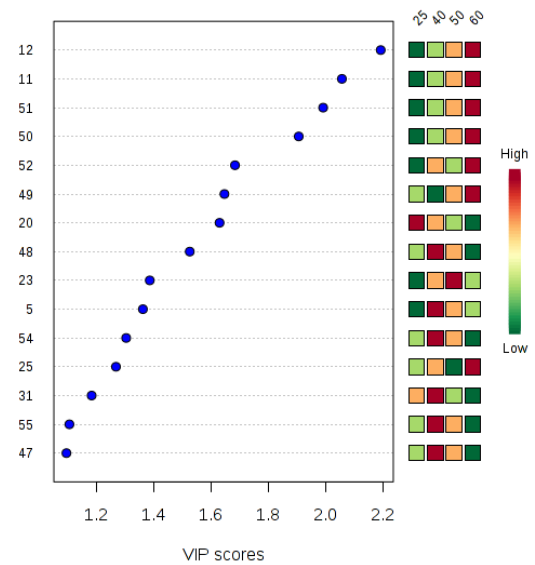
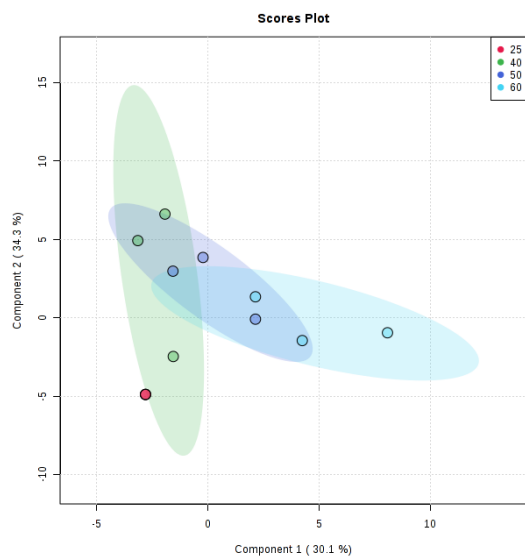
PCA analýza dvou hlavních komponent PC2 a PC3 zahřívajícího lipového medu (obrázek 12) byla schopná správně zařadit do klastrů medy zahřívající na rozdílné teploty. Komponenta PC2 vysvětluje 18,6 % celkové variability. Na výsledcích PCA analýzy můžeme vidět, že se vektor vzrůstající teploty v grafu pohybuje směrem zleva doprava.

PLS-DA analýza (obrázek 13a) – v tomto případě vede vektor teploty z levého dolního rohu směrem doprava nahoru. Model kvantifikuje 85 % původních dat ( $R^2$ ) a správnost modelu byla vypočtena jako 50 % ( $Q^2$ ). Pomocí PLS-DA analýzy bylo identifikováno tzv. VIP skóre (variable importance in projection, obrázek 13b), které vyhodnocuje rozdíly mezi jednotlivými

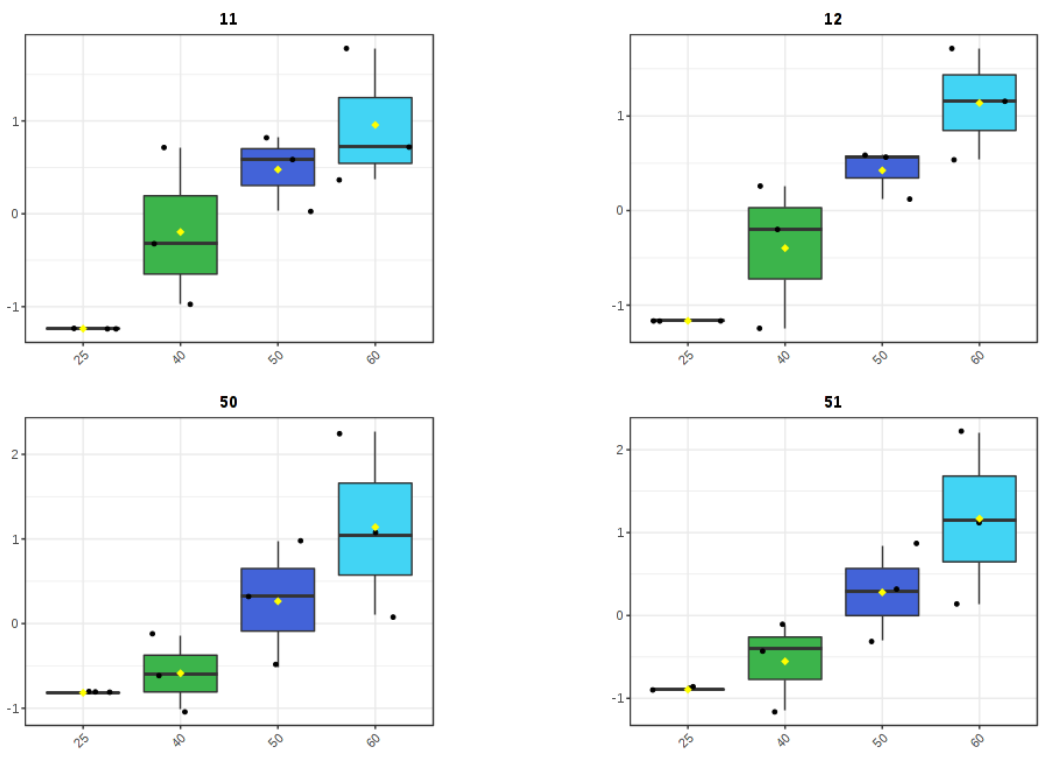
biny/píky. Za nejvýznamnější píky byly označeny píky č. 12, 11, 51 a 50, které všechny vykazují lineární závislost na teplotě.



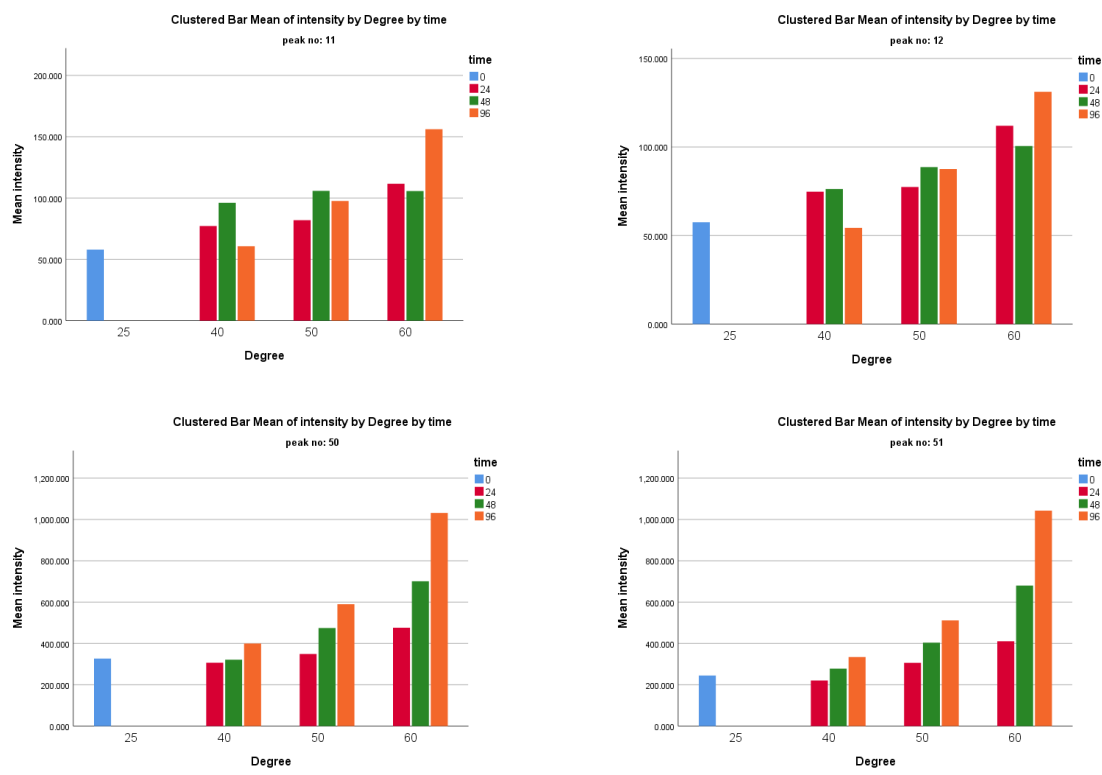
Obrázek 12: PCA analýza spekter lipového medu, závislost na teplotě, PC2 18,6 % variace



Obrázek 13: a) PLS-DA analýza spekter lipového medu, validační parametry  $R^2 = 0,85$  a  $Q^2 = 0,495$ , b) Seznam VIP score významných binů



Obrázek 14: Nárůst integrálů vybraných píků NMR spektra se stoupající teplotou záhřevu

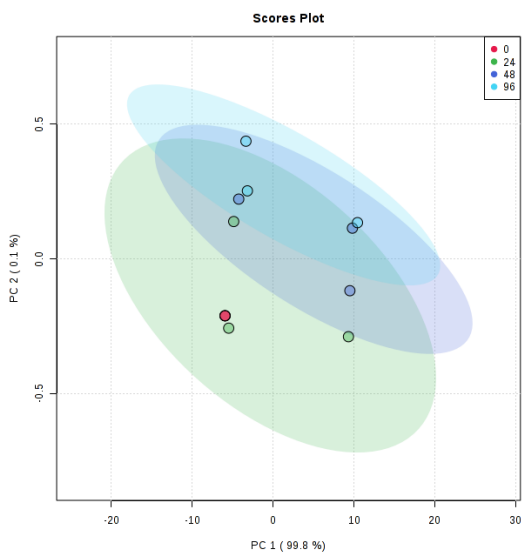


Obrázek 15: Změny integrálů vybraných píků se stoupající teplotou a časem

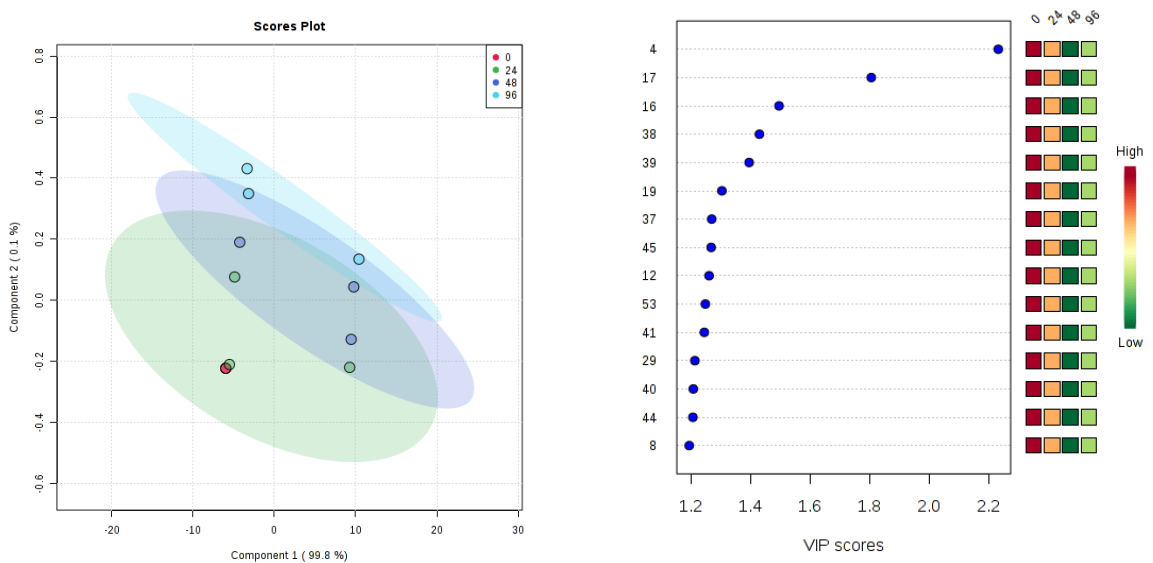
### 5.3.2 Lipový med – vliv času na integrály vybraných píků spektra

PCA analýza dvou hlavních komponent PC1 a PC2 zahřívajícího lipového medu (obrázek 16) správně zařadila zahřívání medu do klastrů dle vzrůstajícího času. Hlavní komponenta PC1 byla schopná vysvětlit dokonce 99,8 % celkové variability. Na výsledcích PCA analýzy můžeme vidět, že se lineární závislost času v grafu pohybuje zleva směrem nahoru a doprava.

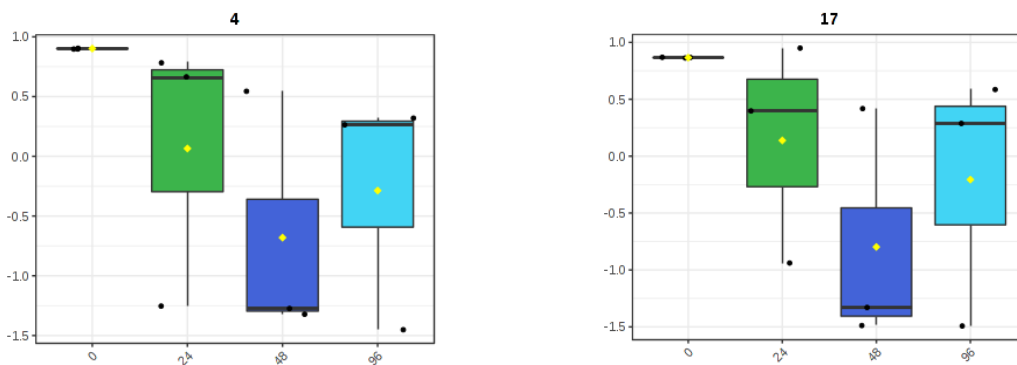
V případě PLS-DA analýzy vede vektor času z levého dolního rohu směrem nahoru doprava (obrázek 17a). Model kvantifikuje 91 % původních dat ( $R^2$ ) a správnost modelu byla vyhodnocena jako 77 % ( $Q^2$ ). PLS-DA analýzou bylo identifikováno také VIP skóre, pomocí kterého byly vyhodnoceny rozdíly mezi jednotlivými biny/píky a vytipovány klíčové biny/píky (obrázek 17b). Z obrázku je patrné, že za nejvýznamnější píky byly označeny píky č. 4 a 17. Z těchto 2 píků vykazoval lineární závislost na čase pouze pík č. 17.



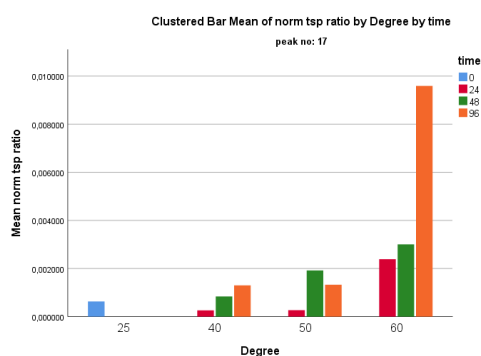
Obrázek 16: PCA analýza spekter lipového medu, závislost na čase, PC1 99,8 % variace



Obrázek 17: a) PLS-DA analýza spekter lipového medu,  $R^2=0,911$ ,  $Q^2 = 0,765$ , b) Seznam VIP score významných binů



Obrázek 18: Nárůst integrálů vybraných píků NMR spektra se stoupajícím časem záhřevu



Obrázek 19: Změny integrálů vybraných píků se stoupající teplotou a časem

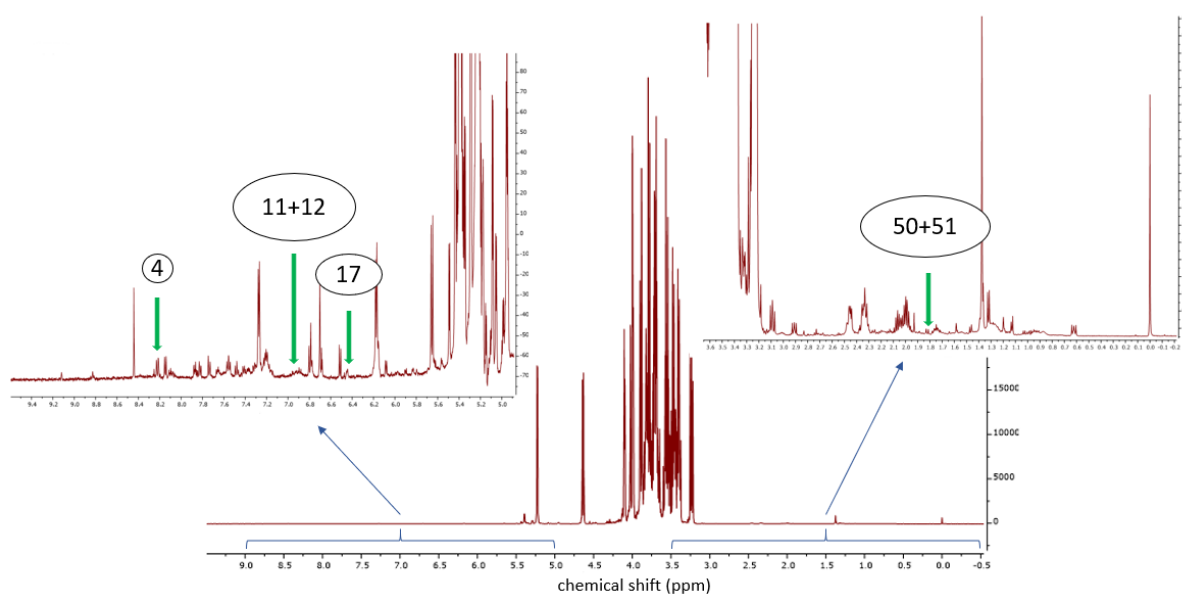
V tabulce 4 jsou zapsány chemické posuny významných píků, jejichž intenzita nebo chemický posun se lineárně měnily s teplotou. Opět byla prohledána in house databáze v programu Chenomx s cílem identifikovat nalezené potenciální biomarkery záhřevu.

Bohužel v případě lipového medu nebyla ani jedna ze sloučenin nalezena v Chenomx databázi (in house databáze). Další překážkou v identifikaci byla i nízká intenzita signálů, například píky s chemickým posunem 6,95 a 6,96 ppm (píky č. 11 a 12) měly tak malou intenzitu, že sloučeninu nešlo určit vůbec. Nicméně lze říct, že chemické posuny potenciálních biomarkerů záhřevu se v případě tohoto medu pohybují především v aromatické oblasti NMR spektra, a proto by bylo vhodné hledat biomarkery záhřevu právě zde.

Když se podíváme na možné identifikace námi nalezených látek do literatury, tak podle Beretta a kol. (2008) lipový med poskytuje rezonance v rozmezí 6,0–6,2 a 6,8–7,2 ppm (dublety) typické pro  $\alpha,\beta$ - $\gamma,\delta$  nenasycené karboxylové kyseliny. Pod těmito signály se nejspíše skrývají mono-terpenový derivát cyklohexa-1,3-dien-1-karboxylové kyseliny (CDCA) a jeho 1-O- $\beta$ -gentiobiosylester (CDCA-GBE), což by mohly být námi nalezené markery záhřevu poskytující dublet 6,95 a 6,96 ppm. Kvůli malé intenzitě to bohužel nelze potvrdit. V blízkém okolí chemického posunu 6,48 ppm jsou v literatuře identifikovány kyselina fumarová (6,53–6,55 ppm) a kyselina pyrohroznová (6,42–6,45 ppm), bude se tedy jednat nejspíše o látku podobného charakteru (Ohmenhaeuser et al. 2013).

Tabulka 4: Potenciální biomarkery záhřevu lipového medu

Významný pík číslo	Chemický posun [ppm]	Vliv teploty/času	Potenciální biomarker záhřevu
4	8,25	čas	neznámá slouč.
11	6,96	teplota	neznámá slouč.
12	6,95	teplota	neznámá slouč.
17	6,48	čas	neznámá slouč.
50	1,83	teplota	neznámá slouč.
51	1,81	teplota	neznámá slouč.



Obrázek 20: Spektrum lipového medu s vyznačenými píky potenciálních biomarkerů, 50 + 51, chemické posuny 1,81 a 1,83 ppm, 17, chemický posun 6,48 ppm, 11 + 12, chemické posuny 6,95 a 6,96 ppm, 4, chemický posun 8,25 ppm

Za hlavní biomarkery lipového medu se považují kyselina 4-(1-hydroxy-1-methylethyl)cyklohexa-1,3-dienkarboxylová a kyselina 4-(1-methylenyl)cyklohexa-1,3-dienkarboxylová s píky v oblastech 7,15; 6,13; 2,50 a 1,79 ppm pro první a 7,24; 6,19; 5,31; 5,18 a 2,52 ppm pro druhou (Schievano et al. 2012). Zdá se, že záhřev nemá přílišný vliv na tyto markery, nebo změna nemá lineární charakter kromě možná píku v oblasti okolo 1,80 ppm, kde se vyskytuje signál kyseliny 4-(1-hydroxy-1-methylethyl)cyklohexa-1,3-dienkarboxylové.

Obsah HMF (oblast okolo 9,45 ppm) se po tepelném ošetření příliš neměnil, k nepatrnému nárůstu došlo při ošetření nejvyšší teplotou (60 °C) po nejdelší dobu (96 hodin). Zdá se, že i když je tento způsob ošetření medu stále ještě relativně šetrný a výrazně nezvyšuje obsah HMF, už se mírně projeví v NMR spektru.

Pro zopakování uvedme, že krátkodobý záhřev květových ani medovicových medů v článku Turhan a kol. (2008) nevedl k významnému zvýšení obsahu HMF. Jednalo se o teploty 75, 90 a 100 °C po dobu 15 až 90 minut. Bylo zjištěno, že ani krátkodobé zahřívání na 90 °C (u květových medů po dobu až 90 minut, u medovicových medů až 75 minut) nezpůsobilo překročení obsahu HMF nad 40 mg/kg. Podobná zjištění potvrzuje i článek Adriana a Purcarea

(2011), kde bylo zjištěno, že záhřev lipového a kaštanového medu na 70 °C po dobu 12 resp. 24 hodin také nevedl ke zvýšení množství HMF nad 40 mg/kg. V další studii (Tosi et al. 2002) bylo zjištěno, že jsou-li teploty záhřevu vyšší než 130 °C (a to i krátkodobě), zvyšuje se obsah HMF nad hodnoty povolené legislativou (40 mg/kg). Takové ošetření medu se ale v praxi nepoužívá. Výsledky naznačují, že krátkodobé zahřátí medu na teploty do zhruba 100 °C nemá výraznější vliv na obsah HMF. Nadměrný obsah HMF patrně souvisí s nevhodnými skladovacími podmínkami, kdy dochází k Maillardovým reakcím.

Protože byla provedena suprese vody, nebyl sledován úbytek vody, ke kterému dochází vlivem záhřevu. Snížení obsahu vody logicky vede ke zvýšení celkového procentuálního obsahu sacharidů a energetické hodnoty. Vzhledem k nízkým teplotám záhřevu použitým v této práci ovšem nebylo sledováno významné zvýšení množství sacharidů. Z toho lze usuzovat, že ani úbytek vody nebyl nejspíše příliš výrazný. Tepelné zpracování snižuje obsah bílkovin a tuků, protože se jedná o komplexní sloučeniny, které při zahřívání snadno degradují. Obsah popela nebývá tepelným zpracováním nijak ovlivněn, protože se skládá z minerálních látek a kovů, které nejsou termolabilní (Chua et al. 2014).

### 5.3.3 Medovicový med – vliv teploty na integrály vybraných píků spektra

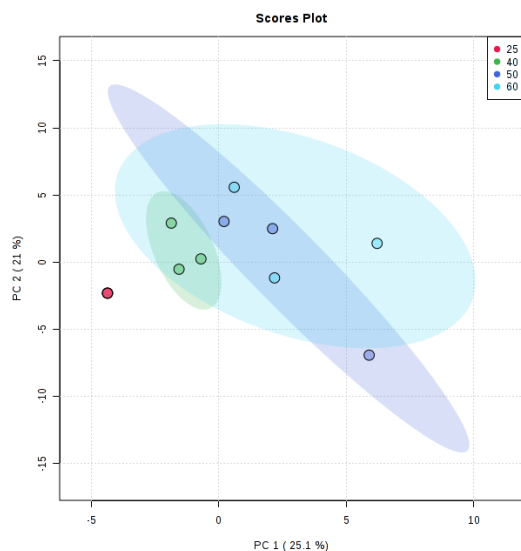
Byl zkoumán vliv teploty na NMR spektra medovicového medu.

PCA analýza dvou hlavních komponent PC1 a PC2 zahřívajícího medovicového medu (obrázek 21) byla schopná správně zařadit do klastrů medy zahřívající na rozdílné teploty. Komponenta PC1 vysvětluje 25,1 % celkové variability.

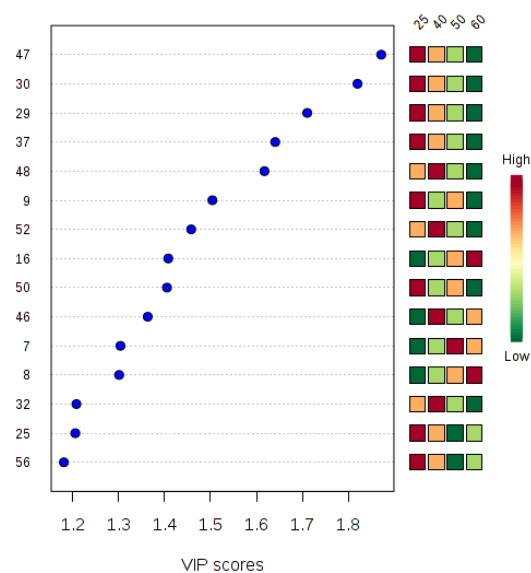
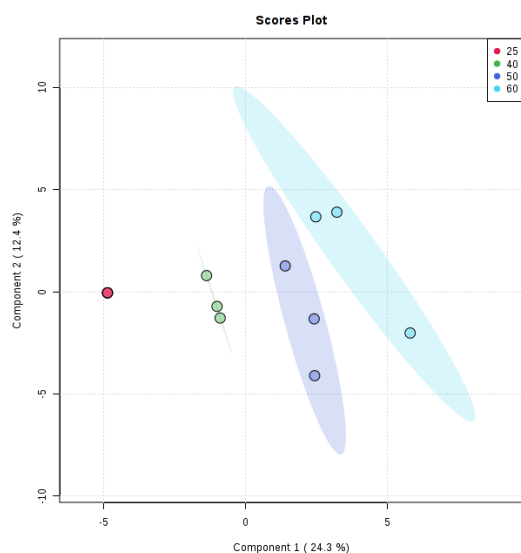
Na výsledcích PCA analýzy můžeme vidět, že se vektor vzrůstající teploty v grafu opět pohybuje směrem zleva doprava.

V případě PLS-DA analýzy (obrázek 22a) směřuje vektor vzrůstající teploty jasně zleva doprava. Model kvantifikuje 99 % původních dat ( $R^2$ ) a správnost modelu byla vypočtena jako 76 % ( $Q^2$ ). Pomocí PLS-DA analýzy bylo identifikováno tzv. VIP skóre (obrázek 22b), které vyhodnocuje rozdíly mezi jednotlivými biny/píky. Za nejvýznamnější píky byly označeny píky č. 47, 30, 29 a 37. Zajímavou závislost ještě vykazoval pík č. 16. Lineární vztah byl ještě u píku č. 9.

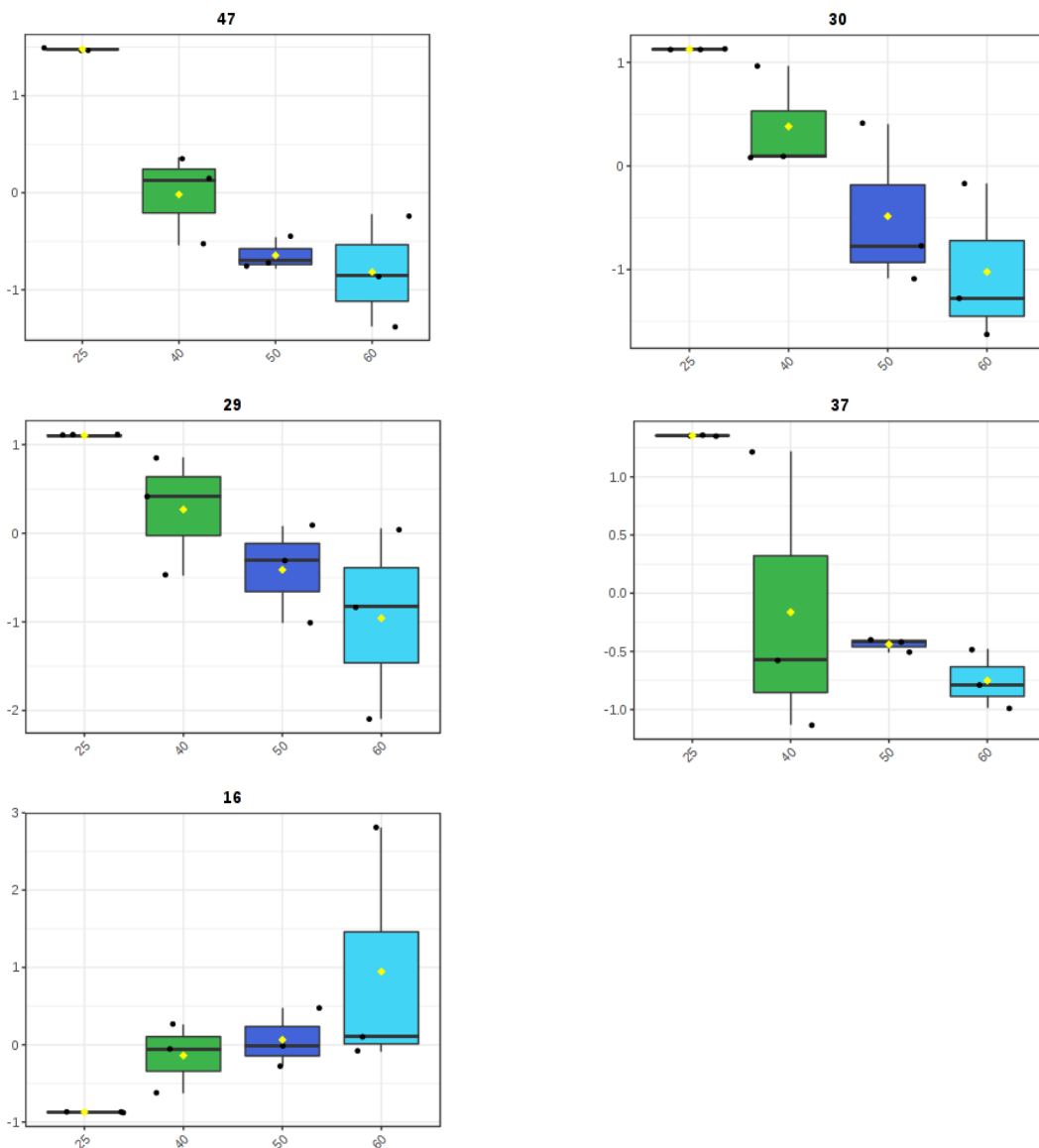




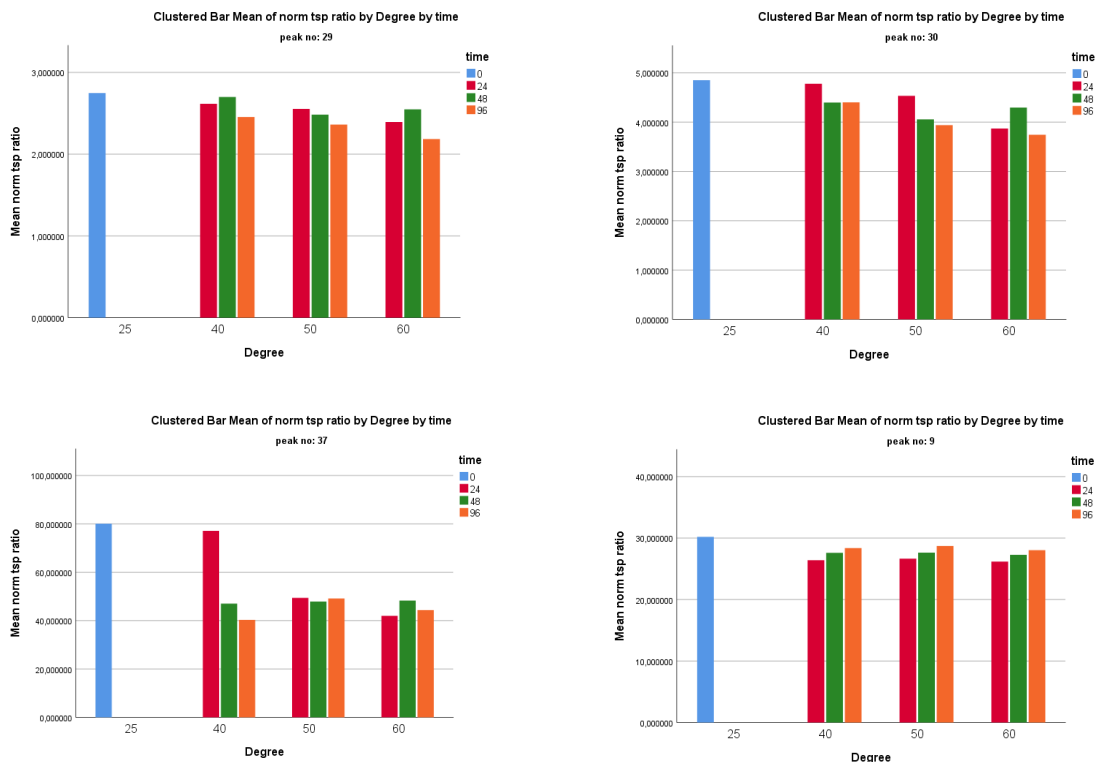
Obrázek 21: PCA analýza spekter medovicového medu, závislost na teplotě, PC1 25,1 % variace



Obrázek 22: a) PLS-DA analýza spekter medovicového medu;  $R^2 = 0,99$ ,  $Q^2 = 0,76$ , b) Seznam VIP score významných binů



Obrázek 23: Nárůst integrálů vybraných píků NMR spektra se stoupající teplotou záhřevu



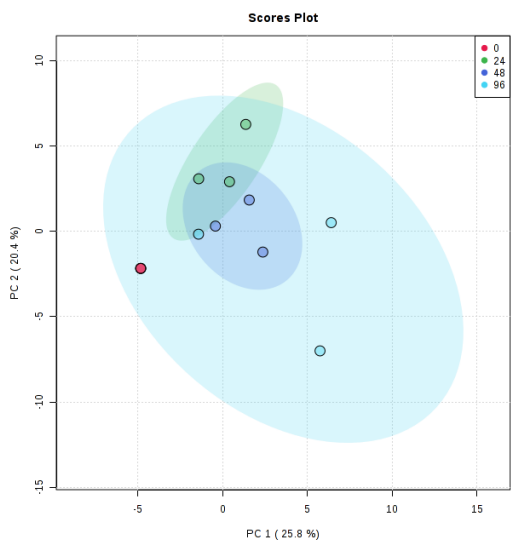
Obrázek 24: Změny integrálů vybraných píků se stoupající teplotou a časem

### 5.3.4 Medovicový med – vliv času na integrály vybraných píků spektra

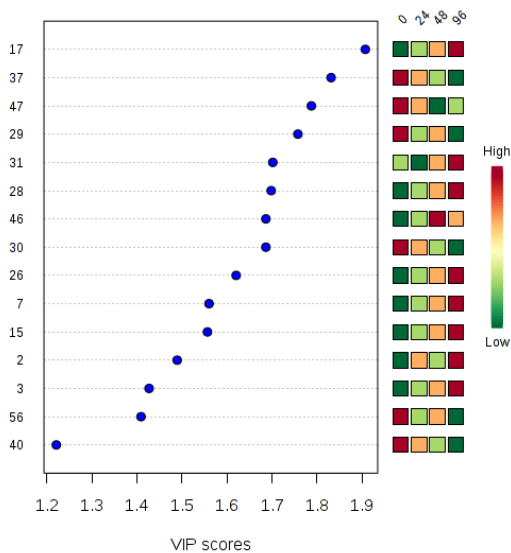
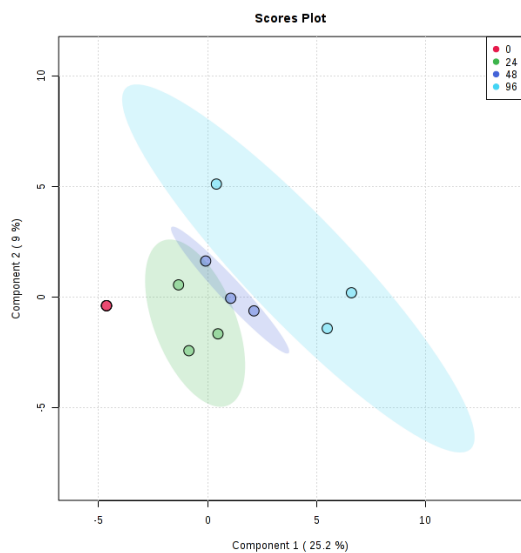
Poté byl zkoumán vliv času na NMR spektra medovicového medu.

PCA analýza dvou hlavních komponent PC1 a PC2 zahřívajícího medovicového medu (obrázek 25) zařadila vzorky do správných klastrů dle vzrůstajícího času. Hlavní komponenta PC1 byla schopná vysvětlit 25,8 % celkové variability.

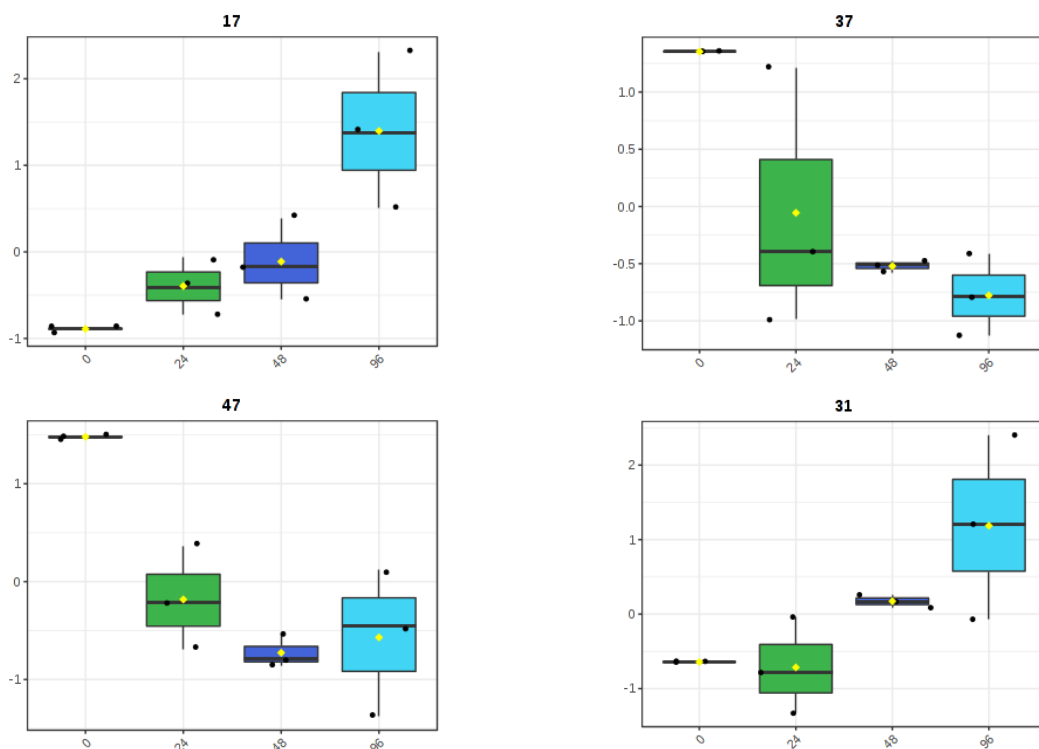
PLS-DA model kvantifikuje 80 % původních dat ( $R^2$ ) a správnost modelu byla vyhodnocena jako 51 % ( $Q^2$ ). Vektor času v tomto případě vede zleva doprava (obrázek 26a). PLS-DA analýzou bylo identifikováno také VIP skóre, pomocí kterého byly vyhodnoceny rozdíly mezi jednotlivými biny/píky a vytipovány klíčové biny/píky (obrázek 26b). Za nejvýznamnější píky byly označeny píky č. 17, 37, 47, 29 a 31.



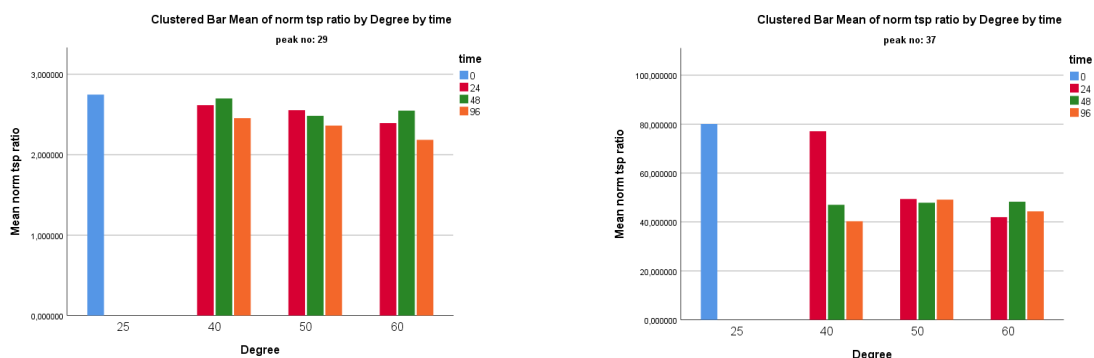
Obrázek 25: PCA analýza spekter medovicového medu, závislost na čase, PC1 25,8 % variace



Obrázek 26: a) PLS-DA analýza spekter medovicového medu;  $R^2 = 0,80$ ,  $Q^2 = 0,51$ ,  
b) Seznam VIP score významných binů



Obrázek 27: Nárůst integrálů vybraných píků NMR spektra se stoupajícím časem záhřevu



Obrázek 28: Změny integrálů vybraných píků se stoupající teplotou a časem

V tabulce 5 jsou zapsány chemické posuny významných píků, jejichž intenzita nebo chemický posun se měnily s teplotou. Opět byla prohledána in house databáze v programu Chenomx, aby byly nalezeny sloučeniny, které se lineárně mění při záhřevu medovicového medu.

Chemické posuny 5,23 a 3,44 ppm odpovídají glukose. Za píky 4,94–4,95 ppm by mohla být zodpovědná sloučenina jménem melibiitol. Melibiitol je alditol, má roli metabolitu myši, jeho výskyt v medech nebyl prokázán. Melibiitol je produktem enzymu galaktosidáza, která je kromě galaktosy aktivní i na řadě dalších substrátů (například na galaktosidech) a jedním z jejích produktů může být právě melibiitol nebo rafinosa (PubChem 2005; Reed 2012). Spíš než o melibiitol se ovšem jedná o nějaký cukerný alkohol, produkt Maillardových reakcí. Na multipletu v oblasti 4,15–4,21 ppm se pravděpodobně podílela sacharosa s další neznámou nebo neznámými sloučeninami, nebylo možné to určit přesněji. Podle článku Kortesiemi a kol. (2016) se na multipletu v oblasti 4,15–4,23 ppm u medovicového medu mohou kromě

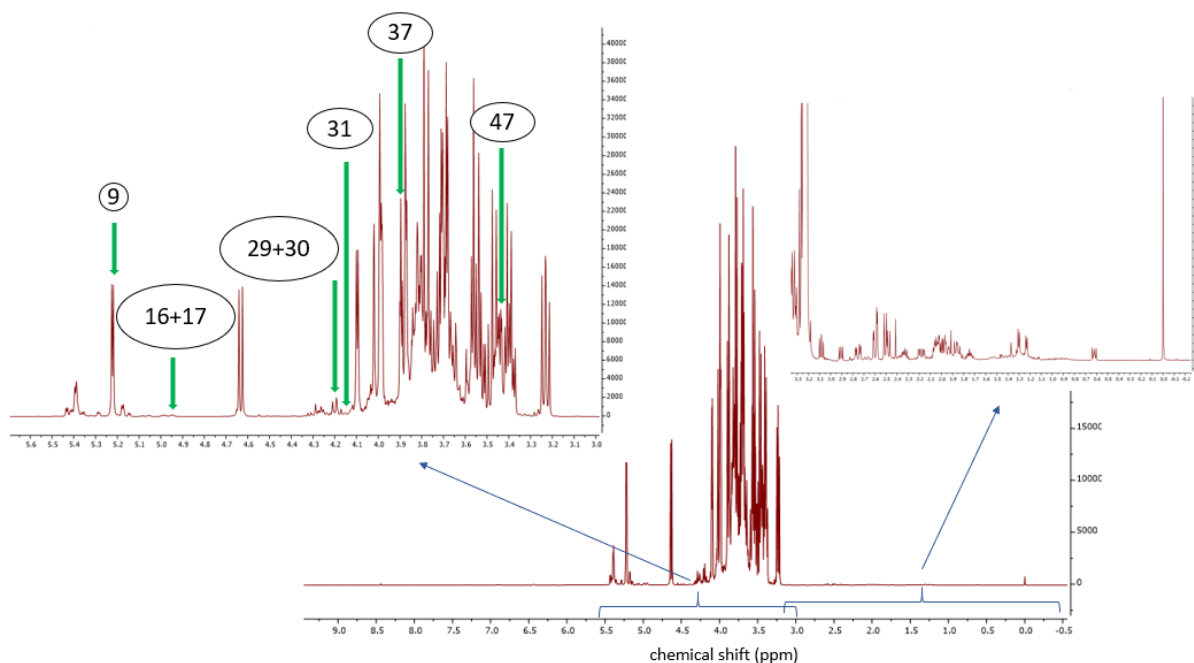
sacharosy ještě podílet: gentiobiosa, kestosa, maltulosa, rafinosa a turanosa, je tedy pravděpodobné, že se bude v našem případě jednat o některou nebo kombinaci několika z nich. Chemický posun v oblasti 3,88 ppm ovlivňovaly jak glukosa, tak fruktosa. U všech nalezených potenciálních biomarkerů lze pozorovat vliv teploty i času, což napovídá, že obojí je velice provázané.

Za biomarker medovicových medů je považován diacylglycerilether (mj. posuny 5,21; 4,18 a 3,45 ppm), na který ale záhřev patrně nemá významnější vliv (Schievano et al. 2012).

Co se týče změn obsahu HMF ve vzorcích a suprese vody, platily zde stejné principy jako u lipového medu (viz výše).

Tabulka 5: Potenciální biomarkery záhřevu medovicového medu, o melibitol se zde patrně nejedná

Významný pík číslo	Chemický posun [ppm]	Vliv teploty/času	Potenciální biomarker záhřevu
9	5,23	teplota	glukosa
16	4,95	teplota	melibitol
17	4,94	čas	melibitol
29	4,21	teplota i čas	sacharosa a další slouč.
30	4,19	teplota	sacharosa a další slouč.
31	4,15	čas	sacharosa a další slouč.
37	3,88	teplota i čas	glukosa a fruktosa
47	3,44	teplota i čas	glukosa



Obrázek 29: Spektrum medovicového medu s vyznačenými píky potenciálních biomarkerů, 47, chemický posun 3,44 ppm, 37, chemický posun 3,88 ppm, 31, chemický posun 4,15 ppm, 29 + 30, chemické posuny 4,19 a 4,21 ppm, 16 + 17, chemické posuny 4,94 a 4,95 ppm, 9, chemický posun 5,23 ppm

## 6 Závěr

Výzkumná část této diplomové práce měla dvě samostatné části. První část byla zaměřena na hledání biomarkerů pro určování pravosti řepkového, akátového a medovicového medu s cílem potenciálního využití těchto markerů pro udílení známek kvality.

Druhá část byla pilotní studie zaměřená na problematiku rozehrívání medu. Byl zkoumán vliv kombinace času a teploty na změny profilu NMR spekter. Cílem této pilotní studie bylo dospět k doporučení, zda je pro záhřev zkrystalizovaného medu výhodnější využití nižší teploty po delší dobu nebo naopak vyšší teploty kratší dobu.

Výsledky obou částí byly velmi zajímavé. Při hledání biomarkerů řepkových, akátových a medovicových medů bylo zjištěno, že medovicové medy se od květových odlišují výrazně, poskytují snadno odlišitelná NMR spektra, a proto byly primárně zkoumány rozdíly mezi akátovými a řepkovými medy. Byly nalezeny některé píky, které lze považovat přinejmenším za potenciální biomarkery těchto medů.

V případě řepkových medů se jednalo o vyšší koncentrace aminokyselin valinu, leucinu a isoleucinu, vyšší obsah derivátu kyseliny benzoové (7,54 ppm) a sloučeniny s chemickým posunem 8,06 ppm, mohlo se jednat o niacin, trigonelin nebo podobnou sloučeninu obsahující dusík v aromatickém kruhu. Oproti akátovým medům měly řepkové medy vyšší obsah glukosy.

Akátové medy měly vyšší obsah sacharidů fruktosy, turanosy, sacharosy a maltosy. Za potenciální biomarker lze považovat též neznámou sloučeninu s chemickým posunem 5,25 ppm, látku poskytující signál v oblasti 5,54 ppm, což byl pravděpodobně pinocembrin, a další látku s chemickým posunem 5,86 ppm, kdy se jednalo nejspíš o kyselinu abscisovou, případně uridin nebo jinou látku podobného charakteru.

Na výsledky prezentované zde tak bude možné navázat další studie s větším množstvím analyzovaných vzorků, aby byly validovány námi identifikované biomarkery a případně aby byl seznam biomarkerů rozšířen o další látky.

Závěry pilotní studie týkající se vlivu teploty a času záhřevu na NMR spektra medů naznačují, že při všech možných kombinacích záhřevu dochází k některým změnám ve složení medu. V ani jednom medu se ovšem neměnily stejné látky a změny nebyly univerzální – docházelo ke snižování i zvyšování intenzity některých píků a zároveň i ke změnám některých chemických posunů, zatímco jiné se významně neměnily. Při daném souboru vzorků se tedy nedala určit univerzální změna.

Ošetření pomocí nižší teploty po delší dobu nebo naopak vyšší teplotou kratší dobu se zdají být velmi odlišné, ale tato studie zatím nedokáže tyto rozdíly charakterizovat a odpovědět na otázku, jestli je některý z těchto postupů lepší. Můj osobní názor je, že mezi nimi není významný rozdíl, jednalo se o relativně nízké teploty (40, 50 a 60 °C) a všechny sledované změny byly spíše nepatrné.

Tato pilotní studie nicméně pokládá základy pro další výzkum, ve kterém bude patrně studováno více vzorků a kde nejspíš bude zkoumán i vliv vyšších teplot (do 100 °C) a kratších časů.

## 7 Literatura

- Adriana C, Purcarea C. 2011. The effect of thermal treatment on fresh monofloral honey types from Bihor county. *Analele Universității din Oradea, Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie și Tehnologii de Industrie Alimentară* **10**: 71-76.
- Bansal S, Singh A, Mangal M, Mangal AK, Kumar S. 2017. Food adulteration: Sources, health risks, and detection methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57**:1174-1189.
- Bath PK, Singh N. 2000. A research note chemical changes in *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey during storage. *Journal of food quality* **23**:443-451.
- Beretta G, Caneva E, Regazzoni L, Bakhtyari NG, Facino RM. 2008. A solid-phase extraction procedure coupled to <sup>1</sup>H NMR, with chemometric analysis, to seek reliable markers of the botanical origin of honey. *Analytica chimica acta* **620**:176-182.
- Bertelli D, Lolli M, Papotti G, Bortolotti L, Serra G, Plessi M. 2010. Detection of Honey Adulteration by Sugar Syrups Using One-Dimensional and Two-Dimensional High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**:8495-8501.
- Boffo EF, Tavares LA, Tobias ACT, Ferreira MMC, Ferreira AG. 2012. Identification of components of Brazilian honey by <sup>1</sup>H NMR and classification of its botanical origin by chemometric methods. *LWT* **49**:55-63.
- Castro-Vázquez L, Alañon ME, Gonzalez-Viñas MA, Pérez-Coello MS. 2012. Changes in the volatile fractions and sensory properties of heather honey during storage under different temperatures. *European Food Research and Technology* **235**:185-193.
- Codex Alimentarius C. 2001. Revised codex standard for honey. *Codex stan* **12**:1982.
- Cook SM, Awmack CS, Murray DA, Williams IH. 2003. Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecological Entomology* **28**:622-627.
- Cotte J-F, Casabianca H, Giroud B, Albert M, Lheritier J, Grenier-Loustalot M-F. 2004. Characterization of honey amino acid profiles using high-pressure liquid chromatography to control authenticity. *Analytical and bioanalytical chemistry* **378**:1342-1350.
- Čížková H. 2017. Falšování včelího medu. *Potravinyinfo.cz*. Available from <https://www.potravinyinfo.cz/33/falsovani-vceliho-medu-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4EtI668NLI3LvTgbnIXg2JUyMO6VlftQMFg/> (accessed February 2020).
- da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. 2016. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry* **196**:309-323.
- Devillers J, Morlot M, Pham-Delegue MH, Dore JC. 2004. Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food chemistry* **86**:305-312.
- Dupal L, Kamler F, Titěra D, Vořechovská M, Vinšová H. 2015. Jak poznáme kvalitu? MED. Sdružení českých spotřebitelů, z. ú. Available from <https://www.konzument.cz/users/publications/4-publikace/163-med.pdf> (accessed Mach 2020)



- Dzolin S, Ibrahim WAW, Mahat NA, Keyon ASA, Ismail Z. 2019. Unique signatures of honeys as a means to establish provenance. *Malaysian Journal of Analytical Sciences* **23**:1-13.
- European Commission. 2019. Honey Market Presentation. European Commission. Available from [https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/animals-and-animal-products/animal-products/honey\\_en](https://ec.europa.eu/info/food-farming-fisheries/animals-and-animal-products/animal-products/honey_en) (accessed October 2019).
- García NL. 2018. The Current Situation on the International Honey Market. *Bee World* **95**:89-94.
- Gómez-Díaz D, Navaza JM, Quintáns-Riveiro LC. 2009. Effect of Temperature on the Viscosity of Honey. *International Journal of Food Properties* **12**:396-404.
- Günther H. 2013. *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*. Wiley.
- Hamdan K. 2010. Crystallization of Honey. *Bee World* **87**:71-74.
- Holzgrabe U, Wawer I, Diehl B. 2017. *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*. Elsevier Science.
- Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, Wishart DS, Xia J. 2018. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic acids research* **46**:W486-W494.
- Chua LS, Adnan NA, Abdul-Rahaman NL, Sarmidi MR. 2014. Effect of thermal treatment on the biochemical composition of tropical honey samples. *International food research journal* **21**:773.
- Jacobsen NE. 2007. *NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*. Wiley.
- Kartheek M, Smith AA, Muthu AK, Manavalan R. 2011. Determination of adulterants in food: a review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **3**:629-636.
- Kaškonienė V, Venskutonis PR. 2010. Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **9**:620-634.
- Kew W, Goodall I, Uhrin D. 2019. Analysis of Scotch Whisky by <sup>1</sup>H NMR and chemometrics yields insight into its complex chemistry. *Food Chemistry* **298**:125052.
- Kortesniemi M, Slupsky CM, Ollikka T, Kauko L, Spevacek AR, Sjövall O, Yang B, Kallio H. 2016. NMR profiling clarifies the characterization of Finnish honeys of different botanical origins. *Food Research International* **86**:83-92.
- Kowalski S. 2013. Changes of antioxidant activity and formation of 5-hydroxymethylfurfural in honey during thermal and microwave processing. *Food Chemistry* **141**:1378-1382.
- Machado De-Melo AA, Almeida-Muradian LBd, Sancho MT, Pascual-Maté A. 2018. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research* **57**:5-37.
- Mehryar L, Esmaili M. 2011. Honey and honey adulteration detection: A review. *Proceedings of 11<sup>th</sup> International Congress on Engineering and Food*. Athens, Greece.
- Ministerstvo zemědělství. 2003. Vyhláška č. 76/2003 ze dne 6. března 2003, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. Pages 2470-2487 in *Sbírka zákonů České republiky, 2003, částka 32*. Česká republika.

- Ministerstvo zemědělství. 2017. Situační a výhledová zpráva Včely. Ministerstvo zemědělství, Praha. Available from [http://eagri.cz/public/web/file/578792/SVZ\\_Vcely\\_2017\\_A4\\_final.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/578792/SVZ_Vcely_2017_A4_final.pdf) (accessed July 2019).
- Moravec Z. 2015. Nukleární magnetická rezonance (NMR). ViBuCh – Vzdělávací ikurz pro budoucí chemiky. Available from <http://vibuch.math.muni.cz/upload/zadani/2015/Z2-NMR.pdf> (accessed March 2020)
- Mădaş NM, Mărghitaş LA, Dezmirean DS, Bonta V, Bobiş O, Fauconnier M-L, Francis F, Haubruge E, Nguyen KB. 2019. Volatile Profile and Physico-Chemical Analysis of Acacia Honey for Geographical Origin and Nutritional Value Determination. *Foods* **8**:445.
- Novák F, Hrabal R. 2011. Quantitative <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy of Humic Acids. *Chemické listy* **105**:752-760.
- Nozal MaJ, Bernal JL, Toribio L, Jiménez JJ, Martín MaT. 2001. High-performance liquid chromatographic determination of methyl anthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in honey. *Journal of Chromatography A* **917**:95-103.
- Ohmenhaeuser M, Monakhova YB, Kuballa T, Lachenmeier DW. 2013. Qualitative and Quantitative Control of Honeys Using NMR Spectroscopy and Chemometrics. *ISRN Analytical Chemistry* **2013**:1-9.
- Olawode EO, Tandlich R, Cambray G. 2018. (1)H-NMR Profiling and Chemometric Analysis of Selected Honeys from South Africa, Zambia, and Slovakia. *Molecules* **23**:1-19.
- Pita-Calvo C, Vazquez M. 2018. Honeydew Honeys: A Review on the Characterization and Authentication of Botanical and Geographical Origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **66**:2523-2537.
- PubChem. 2005. Melibiitol, CID=440655. PubChem Database. Available from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Melibiitol> (accessed March 2020).
- Reed G. 2012. *Enzymes in Food Processing*. Elsevier Science.
- Ribeiro RdOR, Mársico ET, Carneiro CdS, Monteiro MLG, Júnior CC, Jesus EFOd. 2014. Detection of honey adulteration of high fructose corn syrup by Low Field Nuclear Magnetic Resonance (LF 1H NMR). *Journal of Food Engineering* **135**:39-43.
- Sakač N, Sak-Bosnar M. 2012. A rapid method for the determination of honey diastase activity. *Talanta* **93**:135-138.
- Shahbandeh M. 2019. Topic: Honey market worldwide. Statista.com. Available from <https://www.statista.com/topics/5090/honey-market-worldwide/> (accessed October 2019).
- Shapla UM, Solayman M, Alam N, Khalil MI, Gan SH. 2018. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. *Chemistry Central journal* **12**:1-18.
- Schievano E, Morelato E, Facchin C, Mammi S. 2013. Characterization of Markers of Botanical Origin and Other Compounds Extracted from Unifloral Honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**:1747-1755.
- Schievano E, Stocchero M, Morelato E, Facchin C, Mammi S. 2012. An NMR-based metabolomic approach to identify the botanical origin of honey. *Metabolomics* **8**:679-690.

- Schievano E, Stocchero M, Zuccato V, Conti I, Piana L. 2019. NMR assessment of European acacia honey origin and composition of EU-blend based on geographical floral markers. *Food Chemistry* **288**:96-101.
- Sládková B. 2019. NMR profilování a analýza medů [MSc. Thesis]. Česká zemědělská univerzita, Praha.
- Spiteri M, Jamin E, Thomas F, Rebours A, Lees M, Rogers KM, Rutledge DN. 2015. Fast and global authenticity screening of honey using <sup>1</sup>H-NMR profiling. *Food Chemistry* **189**:60-66.
- Subramanian R, Umesh Hebbar H, Rastogi NK. 2007. Processing of Honey: A Review. *International Journal of Food Properties* **10**:127-143.
- Šarić G, Marković K, Vukičević D, Lež E, Hruškar M, Vahčić N. 2013. Changes of antioxidant activity in honey after heat treatment. *Czech Journal of Food Sciences* **31**:601-606.
- Tosi E, Ciappini M, Ré E, Lucero H. 2002. Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. *Food Chemistry* **77**:71-74.
- Tosun M. 2013. Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotope ratio analysis method. *Food Chemistry* **138**:1629-1632.
- Turhan I, Tetik N, Karhan M, Gurel F, Reyhan Tavukcuoglu H. 2008. Quality of honeys influenced by thermal treatment. *LWT - Food Science and Technology* **41**:1396-1399.
- Turkmen N, Sari F, Poyrazoglu ES, Velioglu YS. 2006. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. *Food Chemistry* **95**:653-657.
- Veselý V, Bacílek J, Čermák K, Drobníková V, Haragsim O, Kamler F, Krieg P, Kubišová S, Peroutka M, Ptáček V, Škrobal D, Titěra D. 2013. *Včelařství. Nakladatelství Brázda, s.r.o., Praha.*
- Wang J. 2014. Identification of Acacia Honey Adulteration with Rape Honey Using Liquid Chromatography–Electrochemical Detection and Chemometrics. *Food analytical methods* **7**: 2003-2012.
- Wojtowicz P, Janečková H, Friedecký D, Adam T. 2013. Metabolomic Techniques in Biomedicine. *Chemické listy* **107**:3-11.
- Wu L, Du B, Vander Heyden Y, Chen L, Zhao L, Wang M, Xue X. 2017. Recent advancements in detecting sugar-based adulterants in honey – A challenge. *Trends in Analytical Chemistry* **86**:25-38.
- Yener E, Ungan S, Özilgen M. 1987. Drying Behavior of Honey-Starch Mixtures. *Journal of Food Science* **52**:1054-1058.
- Zábrodská B, Vorlová L. 2015. Adulteration of honey and available methods for detection – a review. *Acta Veterinaria Brno* **83**:S85-S102.
- Záruba K. 2016. *Analytická chemie 2. díl. VŠCHT, Praha.*

## 8 Seznam obrázků

Obrázek 1: Závislost viskozity 3 španělských medů na teplotě, obrázek převzatý z článku Gómez-Díaz a kol. (2009) .....	22
Obrázek 2: Závislost teploty na čase ohřevu medu ve vodní lázni vč. první derivace, obrázek převzatý z článku Kowalski (2013) .....	23
Obrázek 3: Závislost relativního nárůstu koncentrace HMF během ohřevu, obrázek převzatý z článku Kowalski (2013).....	23
Obrázek 4: Ukázkové spektrum řepkového medu.....	35
Obrázek 5: Srovnání rozdílů ukázkových spekter akátového, řepkového a medovicového medu .....	36
Obrázek 6: Srovnání rozdílů ukázkových spekter akátového, řepkového a medovicového medu ve větším přiblížení.....	36
Obrázek 7: PCA analýza spekter řepkových, akátových a medovicových medů.....	38
Obrázek 8: PCA analýza spekter řepkových a akátových medů .....	38
Obrázek 9: OPLS-DA analýza spekter řepkových a akátových medů .....	38
Obrázek 10: Komponentní zátěže (loadings) řepkového a akátového medu z OPLS-DA analýzy promítnuté do auto-normalizovaného NMR spektra.....	39
Obrázek 11: Statistická významnost s pomocí párového srovnání mezi kategoriemi řepkový a akátový med (t-test) .....	40
Obrázek 12: PCA analýza spekter lipového medu, závislost na teplotě.....	43
Obrázek 13: a) PLS-DA analýza spekter lipového medu, b) Seznam VIP score významných binů .....	43
Obrázek 14: Nárůst integrálů vybraných píků NMR spektra se stoupající teplotou záhřevu ..	44
Obrázek 15: Změny integrálů vybraných píků se stoupající teplotou a časem .....	44
Obrázek 16: PCA analýza spekter lipového medu, závislost na čase.....	45
Obrázek 17: a) PLS-DA analýza spekter lipového medu, b) Seznam VIP score významných binů .....	45
Obrázek 18: Nárůst integrálů vybraných píků NMR spektra se stoupajícím časem záhřevu ..	46
Obrázek 19: Změny integrálů vybraných píků se stoupající teplotou a časem .....	46
Obrázek 20: Spektrum lipového medu s vyznačenými píky potenciálních biomarkerů .....	47
Obrázek 21: PCA analýza spekter medovicového medu, závislost na teplotě .....	49
Obrázek 22: a) PLS-DA analýza spekter medovicového medu, b) Seznam VIP score významných binů.....	49
Obrázek 23: Nárůst integrálů vybraných píků NMR spektra se stoupající teplotou záhřevu ..	50
Obrázek 24: Změny integrálů vybraných píků se stoupající teplotou a časem .....	51
Obrázek 25: PCA analýza spekter medovicového medu, závislost na čase .....	52
Obrázek 26: a) PLS-DA analýza spekter medovicového medu, b) Seznam VIP score významných binů.....	52
Obrázek 27: Nárůst integrálů vybraných píků NMR spektra se stoupajícím časem záhřevu ..	53
Obrázek 28: Změny integrálů vybraných píků se stoupající teplotou a časem .....	53
Obrázek 29: Spektrum medovicového medu s vyznačenými píky potenciálních biomarkerů ..	54

## 9 Seznam tabulek

Tabulka 1: Vývoj produkce medu v ČR .....	15
Tabulka 2: Odběry vzorků zahříváných medů, VÚVě Dol .....	32
Tabulka 3: Charakteristické biny/píky pro řepkový a akátový med .....	40
Tabulka 4: Potenciální biomarkery záhřevu lipového medu .....	47
Tabulka 5: Potenciální biomarkery záhřevu medovicového medu.....	54