



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Analýza medu z území ČR pomocí NMR**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor: **Natalia Sikorová**  
Studijní program: B1501 Experimentální biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.**  
Termín odevzdání práce: 2024

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Natalia Sikorová
Název práce	Analýza medu z území ČR pomocí NMR
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra chemické biologie
Vedoucí práce	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024
Abstrakt	Bakalářská práce se zabývá zavedením metodiky pro analýzu geografického původu medu pomocí nukleární magnetické rezonance s následným statistickým vyhodnocením metodou analýzy hlavních komponent. Teoretická část je věnována složení medu a analýze jeho kvality v návaznosti na platnou evropskou a z ní vycházející českou legislativu. Experimentální část se zabývá vypracováním metodiky zpracování vzorků medů a jejich analýzou pomocí nukleární magnetické rezonance. Výsledky byly vyhodnoceny metodou analýzy hlavních komponent. Tato statistická metoda umožnila rozlišit české vzorky od zahraničních.
Klíčová slova	med, nukleární magnetická rezonance, analýza hlavních komponent, geografický původ medu
Počet stran	39
Počet příloh	1
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Natalia Sikorová
Title of thesis	NMR analysis of honey from Czech Republic
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Chemical Biology
Supervisor	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.
The year of presentation	2024
Abstract	<p>This Bachelor's thesis deals with the implementation of a methodology for the analysis of the geographical origin of honey by nuclear magnetic resonance with subsequent statistical evaluation by principal component analysis. The theoretical part focuses on the composition of honey and the analysis of its quality in relation to the current European and resulting Czech legislation. The experimental part deals with the elaboration of the methodology of honey samples processing and their analysis by means of nuclear magnetic resonance. The results were evaluated by the method of principal component analysis. This statistical method made it possible to distinguish Czech samples from foreign ones.</p>
Keywords	honey, nuclear magnetic resonance, principal component analysis, geographical origin of honey
Number of pages	39
Number of appendices	1
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Panu Mgr. Tomáši Pospíšilovi, Ph.D. patří poděkování  
za rady, trpělivost, ochotu a vědomostí rozdávání.

Každé včele, která denně křídla roztahuje  
a obětavým včelařům má osoba děkuje.

Děkuji též za života dar Bohu,  
že každý den svět poznávat mohu.

Díky mé patří přátelům i rodině,  
kteří jsou mi oporou v každé hodině.

## Obsah

Seznam zkratk .....	8
1 Úvod a cíle práce .....	9
2 Teoretická část .....	10
2.1 Med .....	10
2.2 Legislativa.....	10
2.2.1 Členění a označování medu .....	11
2.2.2 Český med.....	12
2.3 Složení a analýza medu.....	12
2.3.1 Obsah sacharidů.....	13
2.3.2 Obsah vody .....	14
2.3.3 Kyselost a pH.....	15
2.3.4 Aminokyseliny .....	15
2.3.5 Hydroxymethylfurfural (HMF).....	15
2.3.6 Elektrická vodivost .....	16
2.3.7 Optická otáčivost .....	16
2.3.8 Vitamíny.....	17
2.3.9 Enzymy .....	17
2.3.10 Pyl .....	17
2.3.11 Botanický původ medu .....	18
2.3.12 Geografický původ medu.....	19
2.4 NMR .....	19
2.4.1 <sup>1</sup> H NMR spektrum medu .....	20
2.5 Analýza hlavních komponent .....	20
3 Materiál a metodika .....	22
3.1 Chemikálie .....	22
3.2 Přístroje a vybavení .....	22
3.3 Příprava vzorků.....	22
3.4 Měření NMR spekter .....	24
3.5 Úprava NMR spekter .....	24
3.6 Statistické metody.....	25
4 Výsledky .....	26
5 Diskuze .....	30
6 Závěr .....	36
Seznam literatury .....	37

Přílohy..... 40

## **Seznam zkratek**

HCA – hierarchická shluková analýza

HMF – 5-hydroxymethylfurfural (podle IUPAC 5-(hydroxymethyl)furan-2-karbaldehyd)

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IHC – International Honey Commission

NMR – nukleární magnetická rezonance

PCA – analýza hlavních komponent

PLS-DA – diskriminační analýza parciálních nejmenších čtverců



# 1 Úvod a cíle práce

Med je jedním z produktů včely medonosné (*Apis mellifera*), který lidstvo využívá po mnoha staletí. Pro včely je zdrojem potravy. Také lidé jej zařadili do svého jídelníčku nejen jako potravinu s lahodnou chutí, ale rovněž kvůli jeho pozitivnímu vlivu na organismus.

Pokud se včelař rozhodne med prodávat, je nutné dodržovat požadavky na složení, které jsou uvedeny v platné legislativě. V České republice se medem zabývá vyhláška č. 76/2003 Sb. (upravena vyhláškou č. 43/2005 Sb. a dále vyhláškou č. 148/2015 Sb.), případně také norma jakosti č. ČSV 1/1999, která je svazovou normou českých včelařů a stanovuje podmínky pro prodej medu pod označením „český med“ (případně slezský či moravský). V rámci evropské legislativy požadavky stanovuje směrnice Evropské rady 2001/110/EC, ze které vychází i dříve zmiňovaná česká vyhláška. Na poli světového obchodu se požadavky na kvalitu medu nacházejí v dokumentu Codex Alimentarius, konkrétně Codex standard for honey.

Složení medu se liší v závislosti na tom, zda se jedná o med květový nebo medovicový. Dále také na jeho botanickém původu, běžně se setkáváme s medy akátovými, lipovými nebo řepkovými. Složení kolísá rovněž u medů, které pocházejí z různých lokalit, což je odrazem rozdílných geografických podmínek.

Některé parametry si jsou schopni včelaři zjistit sami, jedná se např. o kyselost nebo obsah vody. Jiné vyžadují měření v laboratoři s využitím moderních analytických metod.

Cíle práce:

1. Provedení literární rešerše na téma med, jeho složení a analýza.
2. Vypracování metodiky na zpracování vzorků medů pro analýzu pomocí NMR.
3. Změření vzorků medů pomocí NMR a jejich statistické zpracování.
4. Vytvoření základní databáze pro analýzu medů pocházejících z území ČR.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Med

Med je sladká potravina produkovaná včelami. Vzniká z nektaru nebo medovice. Nektar je produkován sítkovicemi a vylučován nektariemi. Ta se vyskytují nejen na květech, ale i na jiných rostlinných orgánech, výjimkou jsou pouze kořeny. Medovice je roztok sacharidů produkovaný mšicemi, mery a červci. Tento hmyz se živí mizou rostlin, která obsahuje velké množství cukrů. Pro hmyz jsou však důležitější dusíkaté látky, kterých ale míza neobsahuje mnoho. Nadbytečná tekutina, která prošla trávicím traktem, je vystřikována zpět na listy rostlin. Tuto tekutinu jsou včely schopné využít pro tvorbu medu.

Včely sbírají nektar a medovici ve vzdálenosti 2-3 kilometry od úlu. K tvorbě 1 kg medu obvykle uletí kolem 150 000 kilometrů a sesbírají nektar z asi miliónu květů (Pleva M., 2021). Včela přinese nektar nebo medovici v medovém váčku do úlu, kde jej předá sosákem další včele. Takto si nektar či medovici postupně předávají a tím se do právě vznikajícího medu dostávají enzymy a aminokyseliny ze žláz a také dochází k odpařování vody, a tedy zahušťování vznikajícího medu. Když je vznikající med dostatečně hustý, je uložen do včelí buňky v úle, kde dochází vlivem vysoké teploty (kolem 35 °C) k dalšímu zahušťování. Až když se vlhkost medu pohybuje kolem 17 %, včely med v buňkách zavíčkují, čímž dojde k jeho konzervaci.

Pro včely je med zdrojem potravy, zvláště cukrů. Jelikož lidé med včelám odebírají, je nutné (zvláště v zimním období) včely dokrmovat cukerným roztokem (Pleva M., 2021). Med je získáván z plástů různými způsoby. Běžně se využívá tzv. medometu, který využívá odstředivé síly (Texl, 2023). Tento způsob může med poškodit, jelikož se do něj dostávají vzduchové bublinky, jenž způsobují rychlejší krystalizaci. Dalším přístupem je vykapávání, při němž jsou plásty nejdříve rozrušeny, poté dochází k samovolnému vykapávání. Jak již název napovídá je plástečkový med získáván i s plásty. Tato metoda je běžně využívána u medů, které se špatně vytácejí.

### 2.2 Legislativa

Med je potravina živočišného původu, a proto kontrolu kvality v České republice zajišťuje primárně Státní veterinární správa (Lstibůrek, 2022). V případě, že je med

prodáván, povinnost kontroly již spadá pod Státní zemědělskou a potravinářskou správu. Hlavním cílem kontrol je odhalit falšované potraviny a zamezit dodávce nebezpečných potravin spotřebiteli.

V České republice požadavky na jakost medu, způsob jeho členění a označování upravuje vyhláška č. 76/2003 Sb., která byla upravena vyhláškou č. 43/2005 Sb. a dále vyhláškou č. 148/2015 Sb. Česká legislativa je založena na směrnici evropské rady 2001/110/EC. V platném znění výše zmíněné vyhlášky se medem rozumí „*potravina 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.*“

### **2.2.1 Členění a označování medu**

Výše zmíněná vyhláška člení medy dle původu na med květový a medovicový. Dle způsobu získávání nebo obchodní úpravy se dělí na med vytočený, plástečkový, lisovaný, vykapaný, med s plástečky, filtrovaný, pastový a pekařský.

Při uvádění medu na trh je nezbytné jej náležitě označit a to původem, způsobem jeho získávání nebo obchodní úpravy. Výjimku tvoří med vytočený, lisovaný či vykapávaný, v těchto případech je možné výrobek prodávat pouze pod označením med, bez udání způsobu získávání či obchodní úpravy.

Všechny medy musí mít na etiketě uvedenou zemi původu. V případě, že byl med připraven smícháním medů z více zemí, lze uvést jeden z následujících údajů: směs medů ze zemí EU, směs medů ze zemí mimo EU případně směs medů ze zemí mimo EU a směs medů ze zemí EU.

Dále lze medy (s výjimkou filtrovaného a pekařského) popsat regionálním označením původu (v případě, že lze s jistotou deklarovat jeho zdroj původu), názvem jednodruhový nebo smíšený, druhem rostlin, případně specifickými kritérii jeho jakosti. Medy se označují jako jednodruhové pouze v případě, že pochází výhradně nebo převážně z jednoho druhu nektaru. Běžně je možné na trhu vidět medy lipové, akátové, řepkové. Označení medu jako jednodruhový neznamená, že by nemohl obsahovat i nektar jiného druhu, ten by však měl být zastoupen jen ve velmi malé míře (Pleva M., 2021). Jednodruhové medy by měly splňovat organoleptická, fyzikálněchemická a

mikroskopická kritéria pro daný druh.

Poněkud zvláštním druhem medu je med pekařský nebo také průmyslový, který není určen k přímé konzumaci. Tento druh medu je možné používat v průmyslu nebo jej přidávat do jiných potravin. Na rozdíl od ostatních medů je možné ho prodávat i přes známky počínajícího kvašení, přítomnost cizí chuti, případně pachu. Neposuzuje se ani aktivita enzymů, ty mohly být poškozeny vlivem zahřívání, které u tohoto druhu medu není zakázáno. Na etiketě musí být uvedeno, že je možné ho používat jen na vaření, pečení nebo jiné zpracování. Pokud je pekařský (průmyslový) med složkou jiné potraviny, její název může obsahovat pouze označení „med“, ve složení je však nutné uvést „pekařský med“ nebo „průmyslový med“.

Jelikož je pyl přirozenou součástí medu, med, který o něj byl významně ochuzen vlivem úpravy spočívající v odstranění nerozpustných látek pomocí filtrace, musí být označen jako filtrovaný med. V případě, že do medu je přidán pekařský nebo filtrovaný med, je nutné takto připravený med označit jako pekařský, resp. filtrovaný med.

### **2.2.2 Český med**

Označení český med (příp. slezský nebo moravský) se může použít, pokud byly dodrženy požadavky svazové normy Českého svazu včelařů (norma jakosti č. ČSV 1/1999), která vyžaduje splnění přísnějších kritérií, než jsou uvedena ve vyhlášce č. 76/2003 Sb. Med s tímto označením musí být vyprodukován včelstvy z území České republiky. Pekařský ani filtrovaný med nesmí být označován jako český med, jelikož nevyhovuje podmínkám normy.

## **2.3 Složení a analýza medu**

Složení medu se liší v závislosti na tom, zda byl vytvořen z nektaru, medovice nebo jejich směsi (Pleva M., 2021). V závislosti na druhu rostlin, ze kterých byl med vyroben, se běžně rozlišují medy akátové, lipové, vřesové, řepkové, pampeliškové, jedlové a další. Jednotlivé druhy medů se vzájemně liší barvou, chutí, vůní a způsobem krystalizace.

Med uváděný na trh by neměl obsahovat žádné přidané látky a neměl by být žádných látek zbaven (Codex Alimentarius). Fermentace medu, pění či znehodnocení cizími látkami při jeho přípravě a skladování jsou rovněž nepřipustné. Nežádoucí změnu složení způsobí také zahřívání. Úprava medu chemickou či biochemickou cestou s cílem

ovlivnit jeho krystalizaci je z hlediska stanovování kvality medu rovněž nepřijatelná.

V rámci analýzy medu se sleduje obsah cukrů (glukosy, fruktosy, sacharosy), ve vodě nerozpustné pevné látky, elektrická vodivost, případné přidané cukry. Dále se pro zjištění kvality medu může stanovovat volná kyselost, obsah 5-hydroxymethylfurfuralu (HMF), aktivita enzymů diastasy a invertasy.

### 2.3.1 Obsah sacharidů

Sacharidy jsou dominantní složkou medu. Mezi nejčastěji se vyskytující patří monosacharidy glukosa a fruktosa, dále také manosa či rhamnosa (Schievano, 2020). Z disacharidů se v medu nachází např. sacharosa, turanosa, maltosa, maltulosa a mezi trisacharidy, které můžeme v medu nalézt patří isomaltotriosa, rafinosa, melesitosa.

Legislativa řeší pouze obsah nejčastěji se vyskytujících sacharidů, tedy glukosy, fruktosy a sacharosy. Součet glukosy a fruktosy v květovém medu by měl být nejméně 60 %, v medu medovicovém pak alespoň 45 %. Maximální přípustná koncentrace sacharosy v Českém medu je 5 g na 100 g medu. V již zmiňované české vyhlášce i směrnici evropské rady rovněž nalézáme tento limit, pro který ovšem existují výjimky, které svazová norma českých včelařů nebere v potaz. U jednodruhových medů z akátu, vojtěšky, banksie (Obrázek 1), kopyšníku, blahovičnicku, židelníků a citrusů se povoluje obsah sacharosy do 10 g na 100 g medu, u medu z levandule a brutnáku je to dokonce 15 g.



Obrázek 1: Fotografie méně známých druhů rostlin. Vlevo brutnák lékařský (*Borago officinalis*; staženo 1.3.2024 z [http://www.stridvall.se/flowers/gallery/Boraginaceae\\_1/648\\_11](http://www.stridvall.se/flowers/gallery/Boraginaceae_1/648_11)), vpravo banksie (*Banksia aemula*; staženo 1.3.2024 z <http://www.stridvall.se/flowers/gallery/album03/AAAA4599>)

Jelikož jsou sacharidy dominantní složkou medu, patří mezi sloučeniny, pomocí kterých se běžně zjišťuje pravost medu. Zvláště se stanovuje koncentrace glukosy a fruktosy. Falšování medu přidavkem cukerného roztoku není ovšem v tomto případě

lehké rozeznat, protože glukoso-fruktosové sirupy, které jsou do medu za účelem zvýšení množství přidávány, se snaží co nejvíce napodobit přirozenou koncentraci těchto sacharidů v medu a nemusí způsobovat žádnou výraznou změnu v jejich obsahu či vzájemném poměru (Schievano, 2020).

Stanovení sacharidů se tradičně provádí pomocí chromatografických metod, kapalinové nebo plynové chromatografie (Bogdanov, 2009). Jak je uvedeno výše, běžně se zjišťuje součet glukosy a fruktosy a dále obsah sacharosy. Pokud je nutné provést analýzu některých méně zastoupených sacharidů (např. isomaltosa, melezitosa), je možné použít stejné metody při použití vhodných standardů.

### **2.3.2 Obsah vody**

Obsah vody patří mezi důležité měřené veličiny, jelikož přímo ovlivňuje kvalitu medu. Med s nižším obsahem vody je vhodnější pro dlouhodobé skladování (Kružík et al., 2022). Při obsahu vody vyšším než 20 % narůstá riziko kvašení medu. Tuto hranici najdeme také v již dříve zmiňované vyhlášce č. 76/2003 Sb. Ve směrnici Evropské rady 2001/110/ES je navíc uvedena výjimka pro medy z vřesu a pekařské medy obecně, kde horní hranice obsahu vody je vyšší, konkrétně nesmí přesáhnout 23 %, dále je specifikován pekařský med z vřesu, v němž je maximální přípustná hodnota 25 %. Norma pro Český med je, co se týče obsahu vody, nejpřísnější, její maximální obsah je 18 %.

Vlhkost medu je ovlivněna celou řadou příčin. Obsah vody je zvýšen v příliš brzo stáčeném medu, který neměl tedy dostatek času pro dozrání (Kružík et al., 2022). Vliv může mít také počasí při vytáčení medu. Pokud je vysoká relativní vzdušná vlhkost, může se také odrazit na vyšší vlhkosti získávaného medu.

Obsah vody je jedním z parametrů, které si může včelař změřit v domácích podmínkách. Běžně se pro stanovení obsahu vody využívá refraktometrie, tedy metody, která zjišťuje index lomu, jenž je závislý na obsahu pevných látek ve vzorku (Kružík et al., 2022). Toto měření nevyžaduje žádnou složitou přípravu vzorku. Jediným požadavkem je zbavit med pevných částic, čehož se dosáhne filtrací medu. Pokud je med zkrystalizovaný, je nutné ho zahřát, aby došlo k rozpuštění krystalků. Hodnoty získané tímto způsobem měření však neposkytují přesný obsah vody, výsledky jsou obvykle nižší než při použití titrace dle Karla Fischera (Bogdanov, 2009). Využití refraktometrie je ale v praxi stále velmi používané pro svoji jednoduchost a vysokou reprodukovatelnost.

Další možností je stanovit obsah vody na základě hustoty, kterou zjistíme

měřením hmotnosti a přesného objemu vzorku, případně pomocí hustoměru (Kružík et al., 2022).

### **2.3.3 Kyselost a pH**

Hodnota pH medu se běžně pohybuje mezi 3,2 a 4,5 (Pleva M., 2021). Obsah volných kyselin se vyjadřuje v miliekvivalentech (milimolech) kyseliny na kilogram medu. Tato hodnota se v medu může zvyšovat, pokud dochází k nechtěné fermentaci. Evropská a z ní vycházející česká legislativa uvádí jako maximální množství 50 miliekvivalentů na kilogram medu. Pokud se jedná o med pekařský, je povolené vyšší množství, a to 80 miliekvivalentů na kilogram medu.

Pro stanovení obsahu volných kyselin se používá vodný roztok medu (Bogdanov, 2009). Po rozpuštění vzorku (10 g medu v 75 ml vody) je nejdříve odečtena hodnota pH a poté se vzorek titruje pomocí 0,1M hydroxidu sodného na pH 8,3. Ze spotřebovaného objemu zásady v ml se obsah volných kyselin stanoví jako jeho desetinásobek.

### **2.3.4 Aminokyseliny**

Iglesias et al. (2006) uvádí, že obecně lze říci, že obsah aminokyselin je vyšší u medovicových medů než u květových. Dle jejich výzkumu výjimku tvoří histidin, tyrosin, fenylalanin a leucin. Obsah aminokyselin v medu se s prodlužující se dobou skladování mění. Prolin,  $\beta$ -alanin a aspartát vykazují v prvních měsících zvyšující se koncentraci. Teprve po 6 měsících jejich koncentrace postupně klesá. Jelikož jsou prolin a aspartát nejvíce zastoupenými aminokyselinami v pylu, dá se tento jev vysvětlit aktivitou enzymů, které štěpí proteiny nacházející se v pylu, čímž dochází k uvolňování aminokyselin. U zbylé většiny aminokyselin dochází k poklesu jejich koncentrace.

Prolin patří mezi nejčastěji vyskytující se aminokyselinu v rámci všech druhů medu. Jeho obsah je sledován, jelikož je vhodným ukazatelem zralosti medu a případného falšování přidáním cukerných roztoků.

### **2.3.5 Hydroxymethylfurfural**

Stanovení koncentrace hydroxymethylfurfuralu (HMF) se nejčastěji provádí pomocí HPLC (Bogdanov, 2009). Dalším možným přístupem, který uvádí harmonizované metody Mezinárodní komise pro med (IHC) je spektrofotometrické stanovení dle Whita

případně stanovení dle Winklera, ovšem tyto metody se v dnešní době již příliš často nepoužívají. Obsah HMF se uvádí v mg/kg medu.

Legislativní limity se v případě obsahu HMF vzájemně liší. Nejprísnější kritérium vyžaduje svazová norma Český med, pro kterou koncentrace HMF nesmí přesáhnout 20 mg/kg. Směrnice Evropské rady 2001/110/ES stanovuje maximální množství 40 mg/kg s výjimkou medů z tropických oblastí a směsí těchto medů, pro které je limitní množství 80 mg/kg, což je dáno obecně teplejším podnebím, které může mít vliv na tvorbu většího množství HMF v medu. Stejný požadavek je i ve vyhlášce č. 76/2003 Sb. Codex Alimentarius nerozlišuje medy z tropických oblastí, pro všechny stanovuje horní hranici na 80 mg/kg.

### **2.3.6 Elektrická vodivost**

Elektrickou vodivost ovlivňuje obsah popela a kyselin (Bogdanov, 2009). Mezi měřenými parametry (tedy obsahem popela a kyselin) a výslednou elektrickou vodivostí je přímá úměra.

Stanovením hodnoty elektrické vodivosti můžeme medy na základě vyhlášky č. 76/2003 Sb. rozdělit do dvou skupin: květové (s hodnotou do 80 mS/m) a medovicové (nad 80 mS/m). Vlastní měření se provádí pomocí konduktometru s 20% absolutním vodným roztokem medu při 20 °C (Kružík et al., 2022).

Kromě rozdělení na medy medovicové a květové je možné odhadnout i botanický původ medu. Jednodruhové medy totiž vykazují jednotnou hodnotu elektrické vodivosti. Toto určení ovšem není stoprocentní a není možné se spoléhat pouze na něj. Pro jednoznačné zjištění druhu medu je potřeba provést ještě pylovou analýzu (Kružík et al., 2022).

Jak již bylo zmíněno elektrická vodivost koreluje s obsahem prvků v medu. Mezi nejvíce zastoupené prvky patří draslík, chlor, vápník, hořčík, sodík a železo (Almeida-Silva et al., 2011).

### **2.3.7 Optická otáčivost**

Všechny medy vykazují schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla, jelikož obsahují opticky aktivní sacharidy (Nanda et al., 2003). Měření optické otáčivosti umožňuje určit, zda se jedná o med květový nebo medovicový. Hodnota tohoto parametru je dána vzájemným poměrem glukosy a fruktosy. Vlevo stáčí rovinu polarizovaného světla medy



květové, jelikož obsah fruktosy (levotočivý sacharid) převažuje nad obsahem glukosy. Medovicové medy vykazují opačnou vlastnost, jsou tedy pravotočivé.

### **2.3.8 Vitamíny**

Navzdory obecnému přesvědčení, med neobsahuje příliš vysoké množství vitamínů (Ciulu et al., 2010). Při analýze pěti ve vodě rozpustných vitamínů (konkrétně šlo o vitamín C, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>9</sub>) výsledky ukázaly, že koncentrace vitamínu C nebyla příliš vysoká a u dvou medů nebyl detekován vůbec. Větší množství bylo zjištěno u vitamínu B<sub>3</sub>. Ostatní analyzované vitamíny nebyly detekovány u všech vzorků a jejich množství kolísalo v závislosti na botanickém původu medu.

### **2.3.9 Enzymy**

Enzymy se do medu dostávají během procesu jeho tvorby z včelích žláz, konkrétně se jedná o diastasu a invertasu. Jsou přirozenou součástí medu a jejich aktivita je sledována v rámci analýzy kvality medu. Při zahřívání medu enzymy ztrácejí svoji aktivitu. K jejich poškození dochází při zahřátí nad teplotu 40 °C (Ritter W., 2022).

IHC uvádí dva možné přístupy měření aktivity diastasy a to stanovení aktivity dle Schadeho a Phadebase. Při metodě Schadeho je substrátem enzymu škrob a výsledky jsou poté vyjadřovány v jednotkách Schade na gram medu. Přičemž legislativa uvádí minimální aktivitu 8 jednotek Schade s výjimkou medů, které mají přirozeně nízký obsah enzymů (citrusové medy) a obsah HMF maximálně 15 mg/kg. U těchto druhů je dolní mez 3 jednotky. Phadebasova metoda nevyužívá jako substrát škrob, ale umělý substrát (Phadebas tablety). Vyšší preciznost vykazuje druhá z popsaných metod, což může být dáno tím, že je používán definovaný substrát, naproti tomu u komerčně dostupného škrobu je složení proměnlivé.

Aktivita invertasy není parametrem, který by byl zakotven v legislativě a její stanovování proto není vyžadováno. V některých zemích (Německo, Švýcarsko) se však považuje za indikátor čerstvosti medu (Bogdanov, 2009).

### **2.3.10 Pyl**

Melissopalynologie je vědeckým odvětvím zabývajícím se analýzou pylu včelích produktů. Její přístupy umožňují získat informaci o hlavním druhu pylu, který se v medu vyskytuje a tím i určit jeho botanický a geografický původ (Gerginova et al., 2020).

Pylová analýza je však časově náročná, vyžaduje značné znalosti a zkušenosti pro správné vyhodnocení výsledků.

V rámci melissopalynologické analýzy jsou stanovovány následující parametry: absolutní obsah pylových zrn (vyjadřuje se v počtu pylových zrn na gram medu), rostlina, ze které pyl pochází a procentuální zastoupení pylových zrn (Škorpilová, 2023).

Pro zjištění absolutního obsahu pylových zrn se med filtruje přes membránový filtr a v získaném pylovém sedimentu se po vysušení stanovuje počet zrn pod mikroskopem. Výsledek se poté přepočítává na gram medu.

Při určování rostliny, ze které pyl pochází, se vzorek medu naředí a odstředí pro získání sedimentu, který obsahuje analyzovaný pyl, jenž se po zakápnutí glycerin želatinou pozoruje pod mikroskopem. Následně je původ určen na základě znalosti morfologie pylových zrn jednotlivých rostlin, příklady mikroskopických snímků pylu viz Obrázek 2.



Obrázek 2: Mikroskopické snímky pylu: vlevo vřes obecný (staženo 19.4.2024 <https://www.paldat.org/search/genus/Calluna>), vpravo trnovník akát (staženo 19.4.2024 <https://www.paldat.org/search/genus/Robinia>)

Procentuální zastoupení pylových zrn se stanovuje pro určení botanického původu medu. Med se obvykle označuje jako jednodruhový, pokud obsahuje alespoň 45 % pylu určité rostliny, i když pro některé medy existují výjimky.

### 2.3.11 Botanický původ medu

Jak již bylo uvedeno výše, potvrzení botanického původu medu se provádí zejména pomocí pylové analýzy spolu s vyhodnocením ostatních fyzikálně-chemických a organoleptických vlastností (Škorpilová, 2023a). Botanický původ medu lze rovněž zjistit na základě prvkové analýzy v kombinaci s měřením některých dalších fyzikálně-chemických vlastností jako je např. pH, obsah vody a sacharidů (Louppis et al., 2017). Mezi prvky vykazující významné rozdíly v závislosti na botanickém původu medu patří

hořčík, nikl, měď, mangan, hliník, baryum a vápník.

Kromě těchto tradičních metod se v dnešní době začínají používat také moderní přístupy analýzy medů (Škorpilová, 2023a). Metody, které se v tomto případě používají, jsou: infračervená spektroskopie, fluorimetrická spektroskopie a nukleární magnetická rezonance. Poslední z vyjmenovaných technik je zvláště prosazována, hlavně díky nedestruktivnímu přístupu a rychlosti zpracování dat.

Po získání informací z kterékoli zmíněné analytické metody, je nutné provést statistickou analýzu dat. Mezi nejčastěji používané přístupy patří analýza hlavních komponent (PCA), hierarchická shluková analýza (HCA) a diskriminační analýza parciálních nejmenších čtverců (PLS-DA).

### **2.3.12 Geografický původ medu**

Jedním z povinných údajů uváděným na etiketě prodávaného medu je země původu. V případě podezření na falšování medu přidáním medu z jiné země je potřeba provést jeho analýzu. Klasickým přístupem je pylová analýza spolu se statistickým vyhodnocením (Škorpilová, 2023a). Tato technika však neposkytovala požadované výsledky, zvláště pokud se jednalo o med obsahující pyl stejných rostlin.

Při zjišťování pravdivosti údaje o geografickém původu se proto využívá instrumentálních metod, mezi často používané patří hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem, která umožňuje měření více prvků najednou. Pomocí této metody jsme schopni určit geografický původ medu jen na základě měření obsahu olova, thalia, platiny, holmia a erbia (Batista et al., 2012).

Již v rámci analýzy botanického původu medu bylo uvedeno, že se čím dál častěji využívá metody nukleární magnetické rezonance. Nejinak je tomu v případě stanovování geografického původu medu. Pomocí naměřených dat a následné statistické analýzy je možné stanovit původ medu i touto instrumentální metodou (Škorpilová, 2023a).

## **2.4 NMR**

Metoda nukleární magnetické rezonance je založena na interakci jaderných spinů s vnějším magnetickým polem (McMurry, 2015). Tato interakce je možná u jader vykazujících magnetické vlastnosti. Tento požadavek splňují jádra, která mají lichý počet neutronů a protonů. Sudý počet protonů i neutronů znemožňuje získání signálu. Mezi

atomy s magnetickými vlastnostmi patří například  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ .

Polohy jednotlivých jader se označují jako chemický posun neboli stupnice delta ( $\delta$ ), která je vyjadřována v miliontinách (ppm) pracovní frekvence spektrometru. Výhoda uvádění chemických posunů ve stupnici delta oproti jednotkám frekvence (Hz) spočívá v nezávislosti výsledků na pracovní frekvenci spektrometru.

### 2.4.1 $^1\text{H}$ NMR spektrum medu

Měření vodíkového spektra medu nám poskytuje celkový profil látek obsažených v konkrétním vzorku a jejich vzájemné poměry (He et al., 2020). To nám umožňuje porovnat spektra různých vzorků a odhalit případné falzifikáty.

Vodíkové spektrum medu můžeme rozdělit do tří částí. První z nich je alifatická část s chemickým posunem 0,5-3,0 ppm. Mezi látky, jejichž signál se zde vyskytuje, patří aminokyseliny, organické kyseliny, alkoholy (zvláště ethanol, který vzniká při kvašení nesprávně skladovaného medu) a aminy. V další, sacharidové, části nacházející se v rozmezí chemického posunu 3,0-5,5 ppm, můžeme najít signály sacharidů (hlavně glukosa a fruktosa, ale i další), které jsou ve spektru medu dominantními komponentami. Třetí oblast – aromatická s chemickým posunem 5,5-10,0 ppm zahrnuje signály HMF, kyseliny mravenčí a aromatických aminokyselin.

Pokud je použit interní standard je možné z naměřeného vodíkového spektra stanovit koncentraci jednotlivých látek (Gauthier et al., 2023). V případě medu se používá TSP (3-trimethylsilylpropionan sodný), který poskytuje singletový signál v okolí 0 ppm. Kvantifikace se provádí po předchozí integraci spektra, při níž je důležité si uvědomit, že sacharidy se v roztoku vyskytují v  $\alpha$  i  $\beta$  formě. Tyto stereochemické rozdíly mají za následek odlišné chemické posuny jednotlivých izomerů. Při stanovování jejich koncentrace je nutné sečíst integrované píky obou stereoizomerů.

## 2.5 Analýza hlavních komponent

Analýza hlavních komponent (PCA) patří mezi statistické metody vícerozměrné analýzy. Jejím principem je redukce počtu rozměrů vícerozměrných dat, jelikož jejich analýza je obtížná, ne-li nemožná (Wallisch, 2014). Při práci v jednorozměrném prostředí totiž není možné odhalit vztahy mezi jednotlivými proměnnými, a tedy není možné zjistit jejich vliv na celkovou variabilitu dat. Toto zjednodušení je možné za předpokladu, že mezi

jednotlivými rozměry dat existuje korelace. Cílem PCA je tedy dostat co nejvíce variability do co nejmenšího počtu dimenzí při současné nejnížší možné ztrátě dat.

Z výše uvedeného principu vyplývá, že v rámci analýzy hlavních komponent jsou důležité proměnné, které se napříč pozorováními systematicky liší (Gauthier et. al., 2023). Popisujeme tedy celkovou variabilitu souboru dat. Na základě přítomnosti (nebo nepřítomnosti) těchto rozdílů mohou být podobné vzorky roztrženy do skupin.

Při provádění analýzy hlavních komponent na základě dat naměřených pomocí NMR je potřeba převést spektrum do číselné podoby. Pro tento krok existují specializované programy, mezi něž patří program Delta NMR Processing and Control Software v6.2 pro Windows. V rámci své funkce Bucket Integration převádí spektra do číselné podoby tak zvaných bucketů odpovídajících určité šíři spektra.

## **3 Materiál a metodika**

### **3.1 Chemikálie**

D<sub>2</sub>O – deuterovaná voda (99,9 atom % D), Aldrich

TSP – 3-(trimethylsilyl)propionát sodný D<sub>4</sub> (98 atom % D), Acros Organics

DCl – deuterovaná kyselina chlorovodíková (35%), Aldrich

### **3.2 Přístroje a vybavení**

pH metr Eutech pH 700, třepačka Heidolph Reax Top, váhy KERN ABJ-NM/ABS-N, NMR spektrometr JEOL ECZ400R/S1, NMR kyvety Wilmad 5 mm Economy NMR Sample Tube

### **3.3 Příprava vzorků**

Medy byly získány buď přímo od včelařů nebo byly poskytnuty ze sbírky Mgr. Jiřího Danihlíka, Ph.D. z katedry biochemie. Vzorky byly připraveny navážením 50 mg medu a rozpuštěním v 500  $\mu$ l deuterované vody. Po důkladné homogenizaci bylo pH upraveno na hodnotu 3 pomocí 0,01M DCl (roztok připraven odměřením 4,6  $\mu$ l 35% DCl do 5ml odměrné baňky a doplněn po rysku deuterovanou vodou). Následně bylo ke vzorku přidáno 20  $\mu$ l standardu TSP, jehož roztok byl připraven rozpuštěním 122,6 mg této soli v 5 ml deuterované vody. Do NMR kyvety bylo přeneseno 550  $\mu$ l vzorku. Celkem bylo zpracováno 36 vzorků, z čehož 6 medů bylo zahraničních (Argentina, Afrika, Gruzie, USA, Slovensko, Španělsko) a zbylých 30 českých.

Tabulka 1: Seznam měřených vzorků medů, druh medu uváděn dle sdělení včelaře

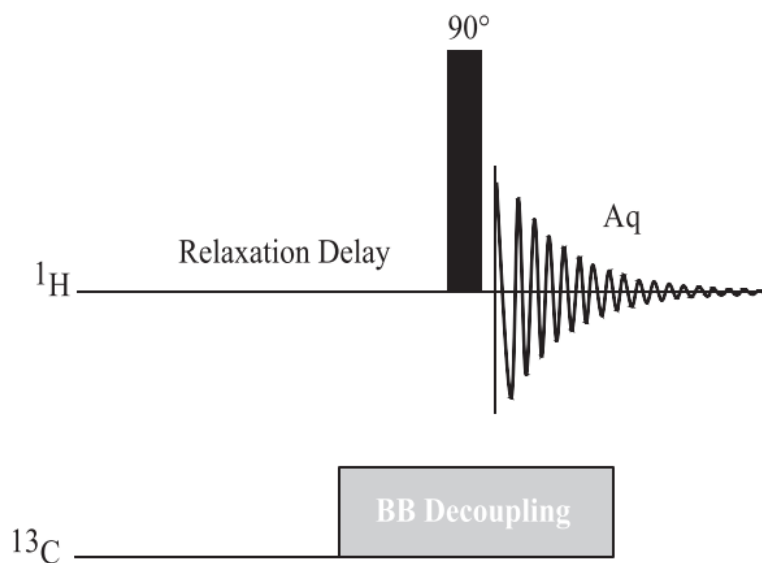
Vzorek č.	Označení	Země původu	Druh medu	Navážka [mg]	pH
1	NS-BA20xx-001	Afrika*	baobabový	50,10	3,27
2	NS-AR2015-001	Argentina		51,10	2,65
3	NS-GE2022-001	Gruzie		50,60	3,26
4	NS-OS2022-001	Slovensko	luční	50,80	3,32
5	NS-ZA20xx-001	Španělsko		49,30	2,98
6	NS-LU20xx-001	USA		50,00	3,02
7	NS-BT2022-001	ČR		50,50	3,22
8	NS-GO20xx-001	ČR	květový, luční	50,30	2,35
9	NS-GR2021-021	ČR		50,70	2,97
10	NS-GR2022-021	ČR		49,60	3,01
11	NS-HA2022-002	ČR	luční	49,70	3,36
12	NS-HB2023-001	ČR		49,70	3,24
13	NS-HL2022-001	ČR		49,30	2,96
14	NS-HS2016-001	ČR	medovicový	49,90	3,00
15	NS-JD20xx-021	ČR		49,50	2,88
16	NS-JP2022-001	ČR		50,60	2,51
17	NS-JP2022-002	ČR		51,10	3,04
18	NS-KB20xx-001	ČR		51,00	3,31
19	NS-KN2022-001	ČR	akátový	49,40	2,67
20	NS-KN2023-001	ČR	směs	50,00	3,12
21	NS-KO2022-001	ČR	akátový	51,30	3,05
22	NS-LC2022-022	ČR	lipový	50,20	3,12
23	NS-LC2023-001	ČR	květový	50,90	2,64
24	NS-LH2022-021	ČR	jarní	50,60	3,07
25	NS-LI2022-001	ČR		50,60	3,05
26	NS-LK20xx-001	ČR		50,90	3,21
27	NS-NV2022-001	ČR	jarní	50,60	3,05
28	NS-PK2022-001	ČR	květový	49,40	3,13
29	NS-RR2022-001	ČR		49,80	3,05
30	NS-SO2022-001	ČR	směs (lípa, kaštan)	50,90	3,16
31	NS-SV2016-001	ČR		50,00	2,79
32	NS-UO2022-021	ČR		51,00	2,93
33	NS-UO2022-022	ČR	květový	49,10	3,12
34	NS-VA2023-001	ČR		50,10	2,13
35	NS-VL2016-001	ČR	medovicový	49,60	3,01
36	NS-VT2022-001	ČR	luční, šlehaný	49,70	2,70

\*bližší informaci o zemi původu nebylo možné zjistit

### 3.4 Měření NMR spekter

Spektra byla získána měřením při frekvenci 400 MHz. Byla měřena vodíková spektra v experimentu qNMR (kvantitativní NMR), který zahrnuje decoupling uhlíku. Parametry měření byly nastaveny následovně:

offset	5 ppm
sweep	15 ppm
points	29 984
scans	16
prescans	2
relaxation delay	60 s
recvr gain	auto
temp	25 °C
angle	90 °
shimming	gradient autoshim
spin	off



Obrázek 3: Pulzní sekvence qNMR experimentu, upraveno dle softwaru Delta

### 3.5 Úprava NMR spekter

Získaná spektra byla zpracována v programu Delta NMR Processing and Control Software v6.2 pro Windows. Na spektra byl použit procesní list, který obsahoval úpravy spočívající v posunu píku standardu TSP na hodnotu 0,00 ppm, intenzita tohoto signálu byla stanovena na 10,0 %. Takto zpracovaná data byla uložena a dále použita pro statistické vyhodnocení.

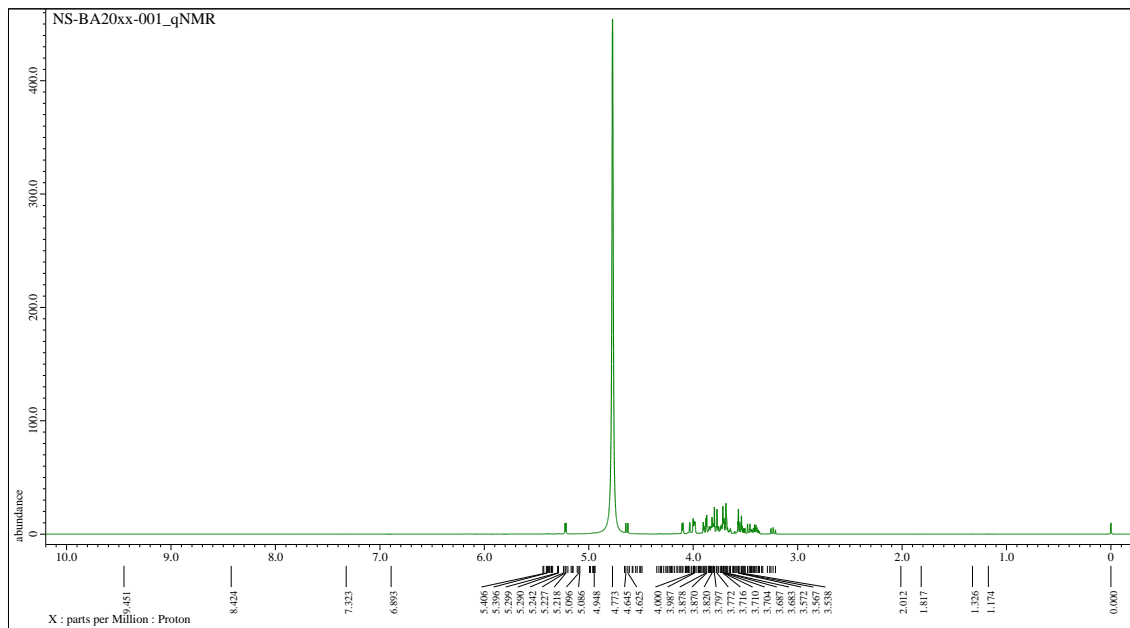


### 3.6 Statistické metody

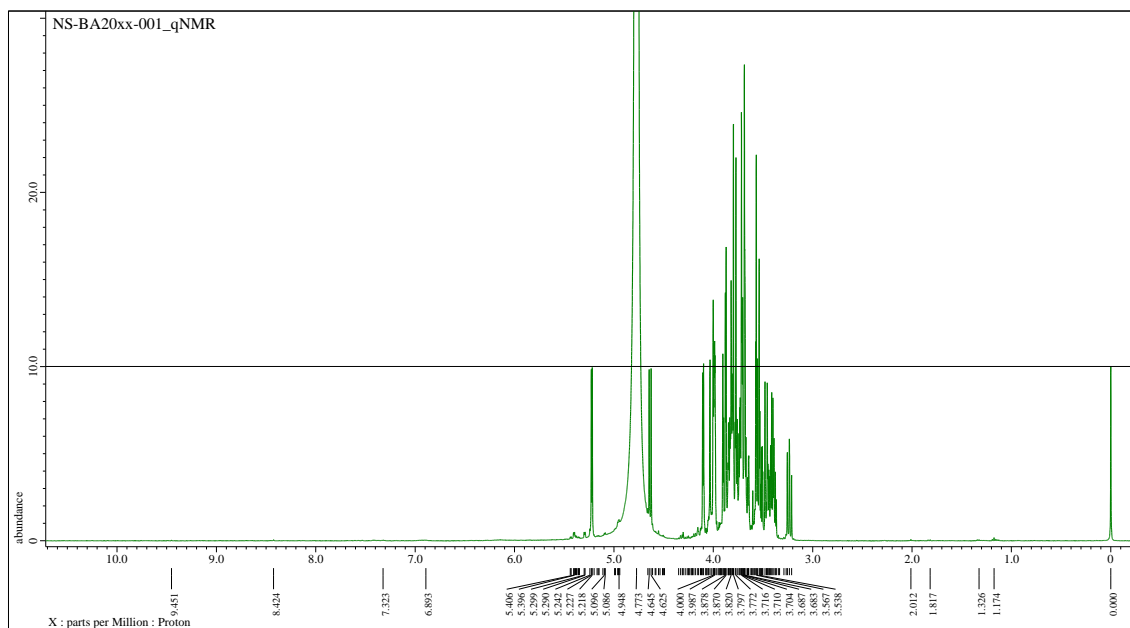
Zprocesovaná data všech 36 vzorků medů byla otevřena v již výše jmenovaném programu Delta NMR Processing and Control Software v6.2 pro Windows za využití funkce Chemometrics, která umožňuje vícerozměrnou statistiku, konkrétně analýzu hlavních komponent. Převod spekter do číselné podoby byl zprostředkován funkcí Bucket integration, která bere v potaz plochu mezi křivkou a baselinou v určité šíři (bucket – rozmezí ppm). Takto byly vygenerovány číselné hodnoty pro spektrum v rozmezí od 0,00 ppm po 10,00 ppm (první bucket má hodnotu 0,03 ppm, poslední 9,98 ppm). Šíře bucketu byla nastavena na 0,04 ppm. Zahraníční medy byly označeny na základě země původu, české zůstaly bez označení. Program Delta vzorkům bez označení automaticky přiřazuje název „nullgroup“ (rozdělení do skupin nijak neovlivňuje statistiku, slouží pouze pro lepší orientaci ve výsledném PCA). Škálování bylo provedeno pomocí funkce Auto Scale, která pro škálování využívá směrodatnou odchylku. Analýza hlavních komponent byla provedena s nastavením možnosti „Option Classical“. Skórový graf i zátěžový graf byl zobrazen pro první a druhou hlavní komponentu. Pro úpravu parametrů statistiky, tedy odstranění oblastí: ethanolu (1,19 ppm), sacharidů (3,20-4,12 ppm), vody (4,72-4,92 ppm) a HMF (9,46 ppm), byl vygenerován soubor CSV, ve kterém byly provedeny úpravy v programu LibreOffice Calc. Tento soubor byl následně opět nahrán do programu Delta a byla provedena statistika s výše uvedenými parametry.

## 4 Výsledky

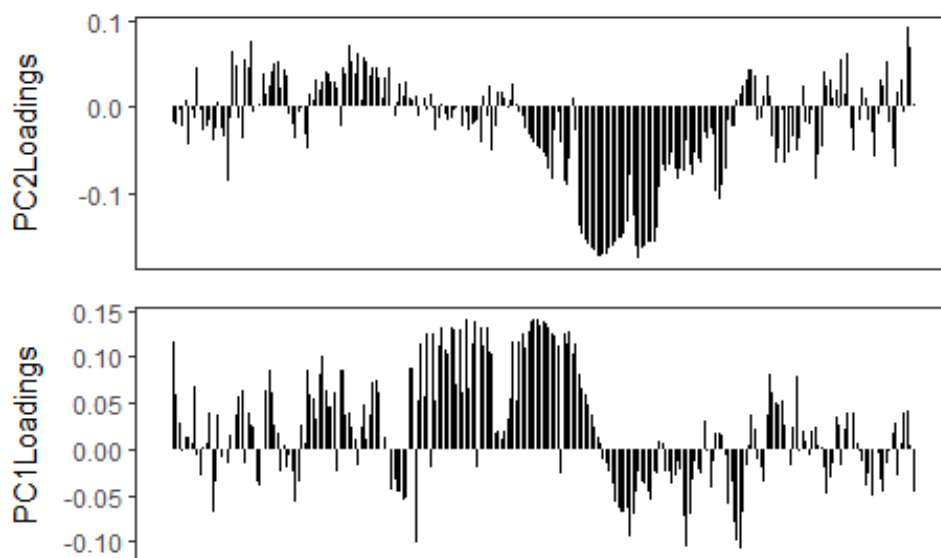
Přibližná spektra ostatních vzorků jsou vložena v přílohách.



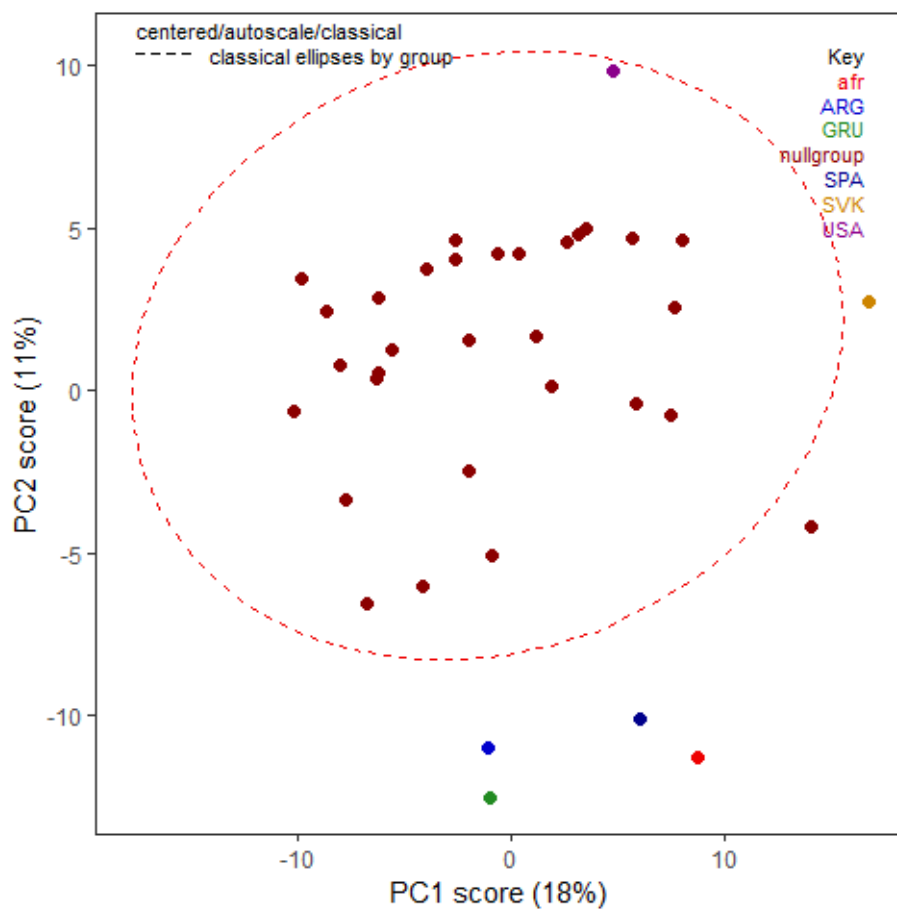
Obrázek 4: Celkové NMR spektrum medu



Obrázek 5: Přibližné NMR spektrum medu s vyznačením kalibrace standardu TSP na 10,0 %

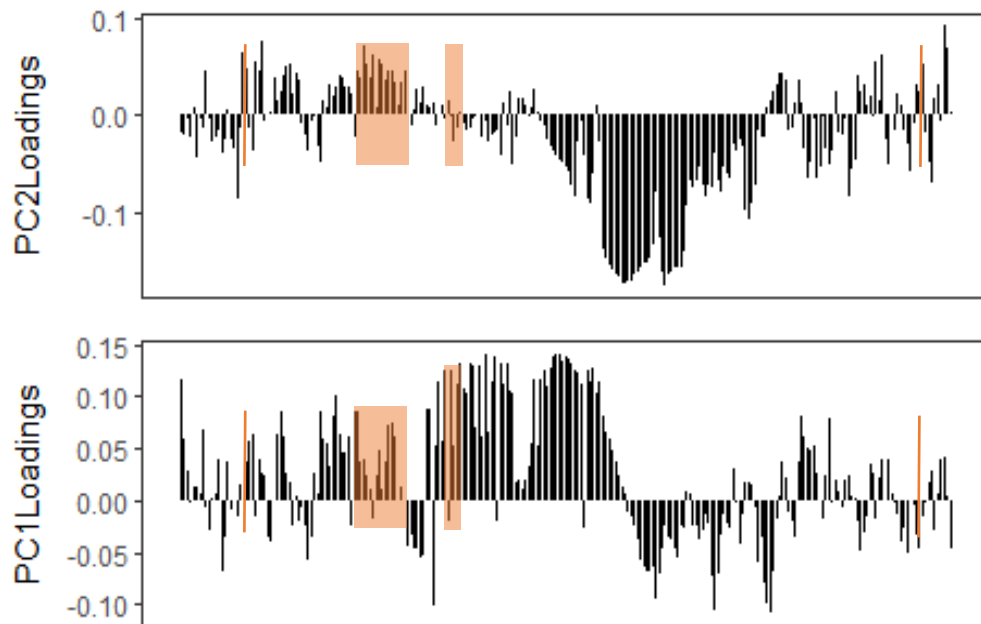


A

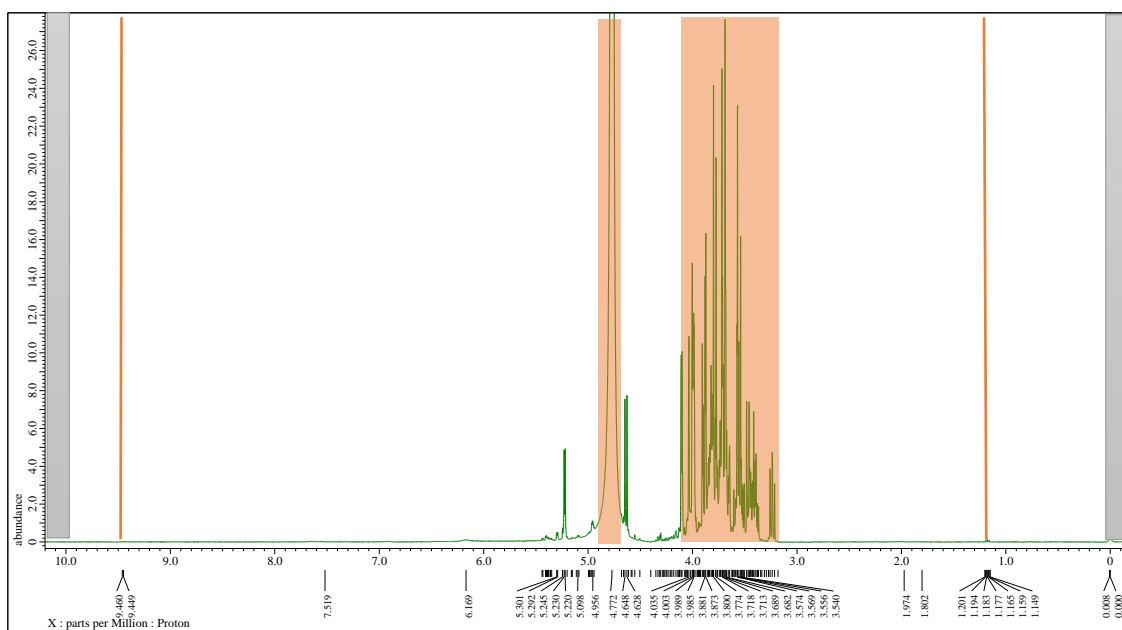


B

Obrázek 6: Analýza hlavních komponent 36 vzorků medů; obrázek A zátěžový graf, obrázek B skórový graf; vzorky české značeny jako nullgroup

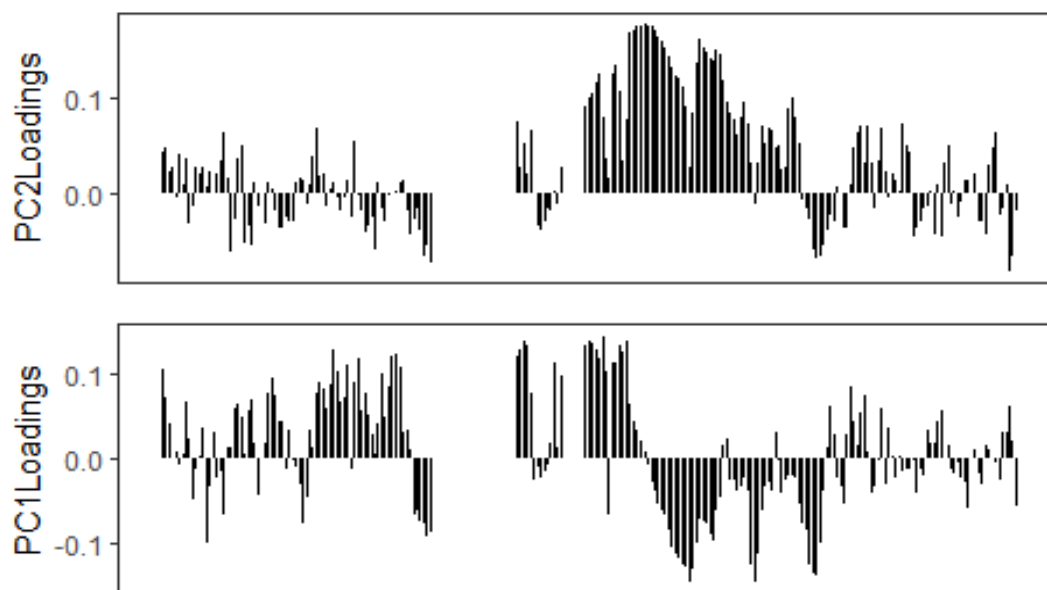


A

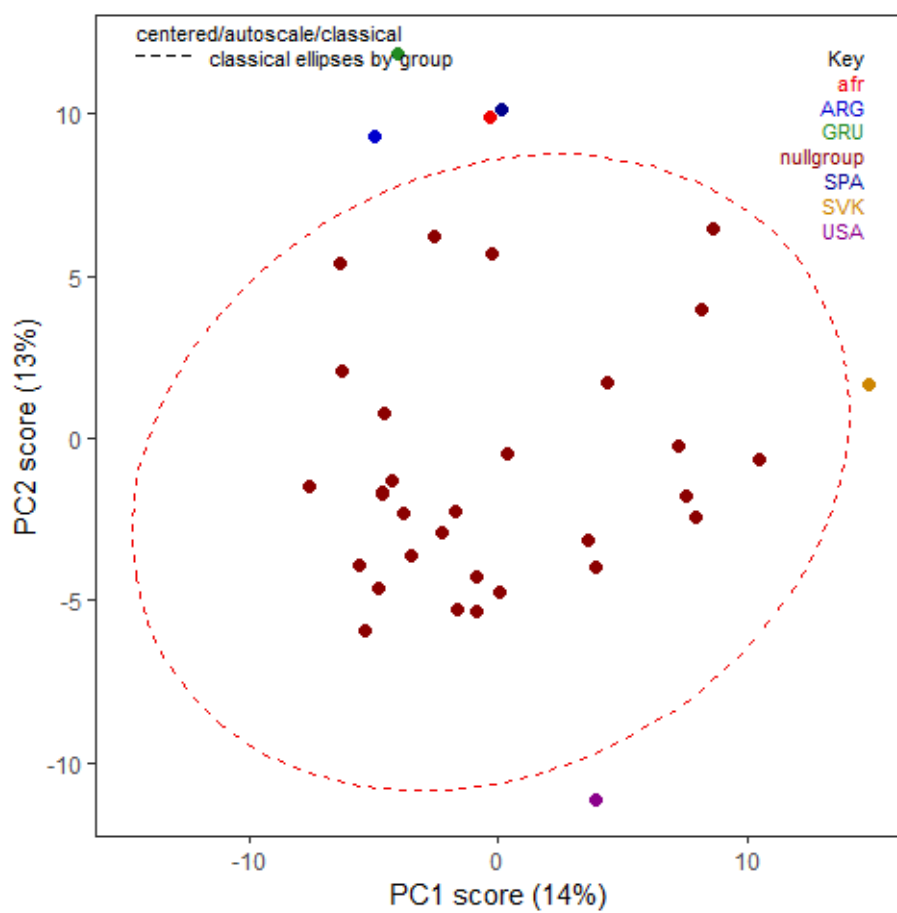


B

Obrázek 7: Zátěžový graf a NMR spektrum s oranžově vyznačenými odstraňovanými oblastmi. Zprava: oblast ethanolu (1,19 ppm), sacharidů (3,20-4,12 ppm), vody (4,72-4,92 ppm), HMF (9,46 ppm). Šedě značeny oblasti nezahrnuté do tvorby bucketů



A



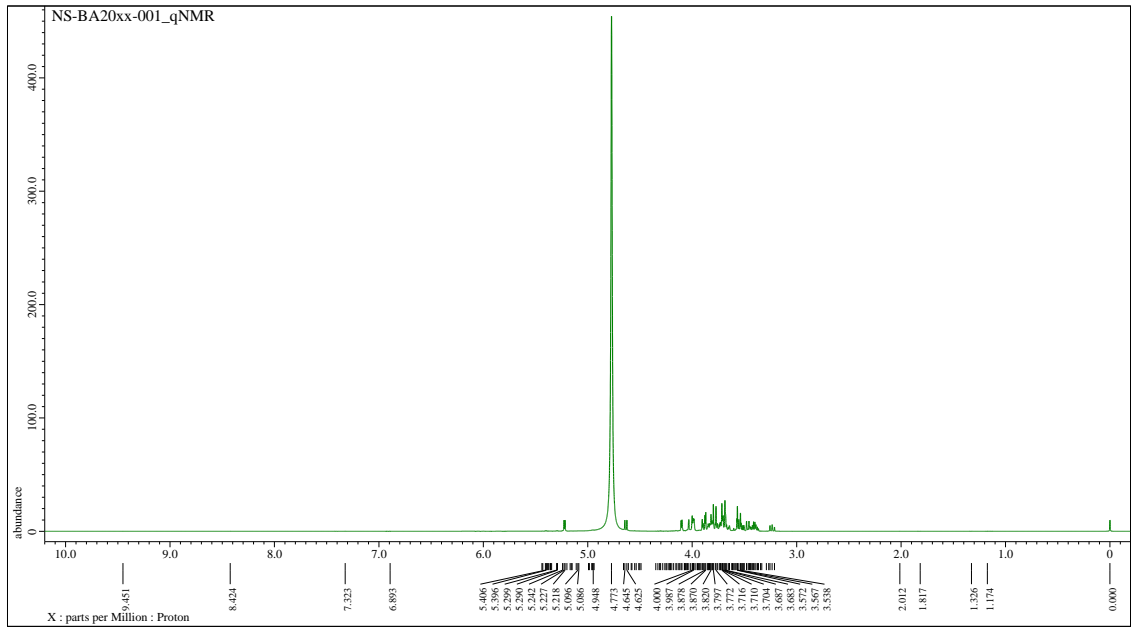
B

Obrázek 8: PCA 36 vzorků medů po odstranění bucketů ethanolu (1,19 ppm), sacharidů (3,20-4,12 ppm), vody (4,72-4,92 ppm) a HMF (9,46 ppm); české vzorky označeny jako nullgroup

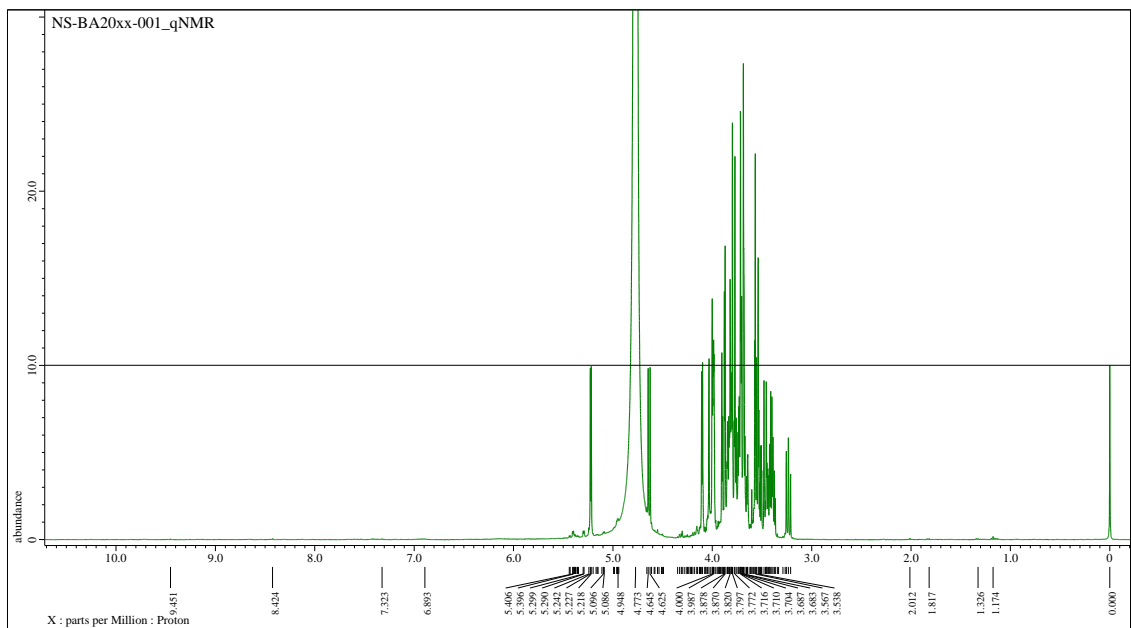
## 5 Diskuze

Med patří mezi nejčastěji falšované potraviny. Důvodem je zejména jeho omezená dostupnost, s čím se následně váže i vyšší cena (Čížková, 2017). Způsoby falšování jsou různé, řadíme mezi ně například přidávání sacharidů přímo do medu či příkrmování včel roztoky sacharidů. Dále se setkáváme s nesprávným uváděním země původu medu, který je jedním z povinných údajů uváděných na etiketě, pokud je med prodáván. Původ medu je nejčastěji kontrolován metodou hmotnostní spektrometrie s iontově vázaným plazmatem (Batista et al., 2012) či pomocí nukleární magnetické rezonance. Na základě dostupné literatury je známo, že měření NMR spekter s následným statistickým vyhodnocením je možné využít k určení geografického původu neznámého vzorku medu (Zheng et al., 2016). Mezi využívané statistické přístupy patří analýza hlavních komponent (PCA) či metoda nejmenších parciálních čtverců.

V rámci této práce bylo změřeno 36 vzorků medů, z čehož 30 bylo od českých včelařů a zbylých 6 bylo zahraničních. Získaná NMR spektra (Obrázek 9 a Obrázek 10) byla zprocesována a takto upravená převedena do číselné podoby (buckety). Následně byla data podrobena analýze hlavních komponent. Tato metoda byla prováděna v programu Delta NMR Processing and Control Software v6.2 pro Windows, která ve své funkci Chemometrics nabízí vícerozměrnou statistiku. Program využívá jazyk R a umožňuje provádět analýzu hlavních komponent a hierarchické shlukování. V rámci PCA je možné zobrazit skórový i zátěžový graf. Dále je možné provést ortogonální a skór analýzu pro zjištění odlehlých hodnot. Byla prováděna „Classical“ PCA s využitím škálování „Auto Scale“. Tato funkce škáluje na základě směrodatné odchylky, program nabízí i „Pareto scale“ škálující dle druhé odmocniny směrodatné odchylky vzorků.

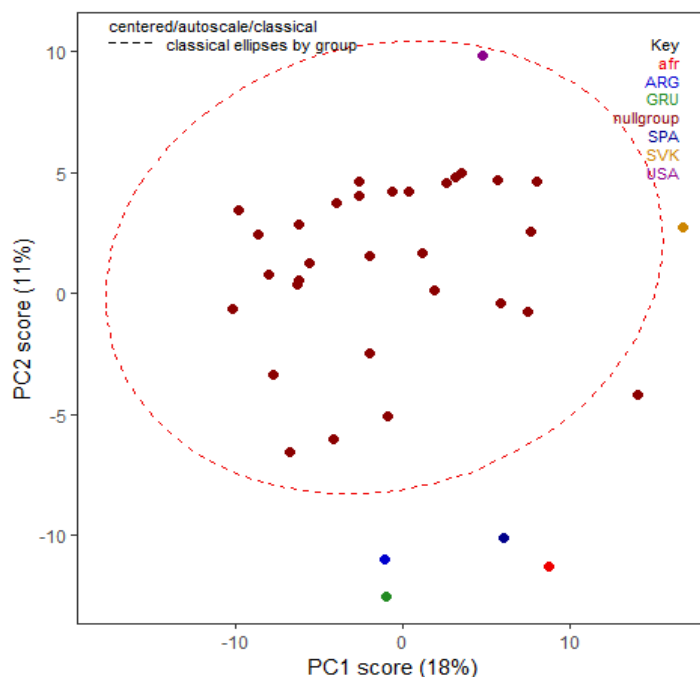


Obrázek 9: Celkové NMR spektrum medu



Obrázek 10: Přibližné NMR spektrum medu s vyznačenou kalibrační standardu

Analýza hlavních komponent byla aplikována na všech 36 vzorků medů při ponechání všech oblastí (bucketů). Analýza pro první a druhou hlavní komponentu souhrnně popisuje 29 % variability v rámci dat. Nedošlo však k úplnému rozdělení na vzorky zahraniční a české, i když je ve výsledném grafu patrná tendence k oddělení tuzemských medů od ostatních (Obrázek), jeden z českých medů zůstává mimo elipsu mezi vzorky zahraničními. Elipsa je konstruována na základě vícerozměrného normálního rozdělení a ohraničuje jeho 95% hranici. Dle této hranice se většina medů českých (konkrétně 95 %) vyskytuje v elipse, zatímco zbylých 5 % se vlivem náhody nachází mimo elipsu.



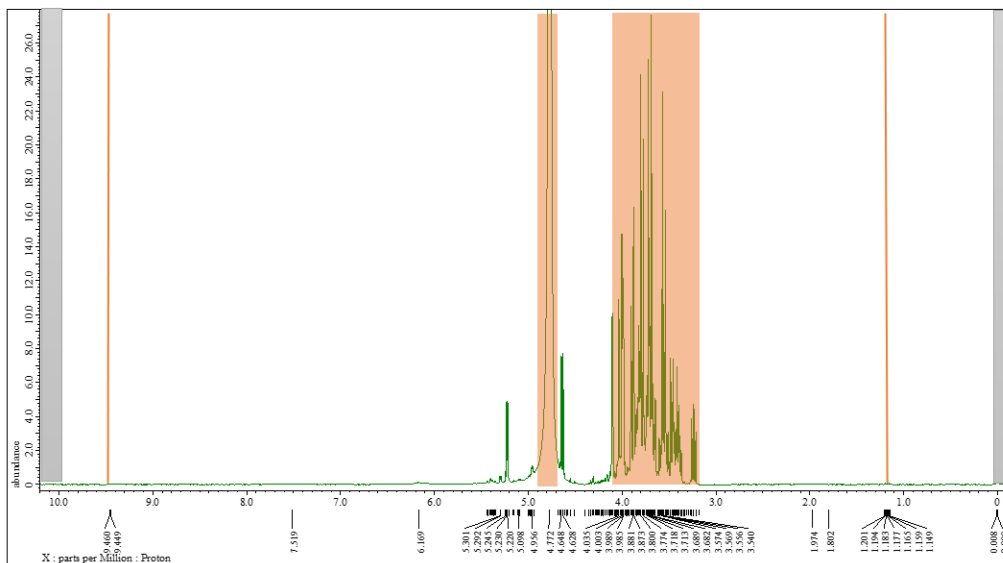
Obrázek 11: PCA 36 vzorků medů; české vzorky značeny jako nullgroup

Použití celkového NMR spektra není vhodné, protože se ve spektru nachází oblasti, které se v rámci jednotlivých vzorků liší jen minimálně a dále také oblasti, které nejsou závislé na geografickém původu medu, ale jsou spíše ukazateli jeho kvality jako je stáří či nesprávné skladování.

V následujícím kroku proto byly odstraněny určité oblasti (Obrázek 12). Mezi ně patřil region odpovídající vodě, který má vliv na výsledek, ale není závislý na geografickém původu. Pík obsahuje zbytkový signál rozpouštědla (těžké vody) a také signál vody, která je součástí medu. Buckety spadající do této oblasti byly odstraněny, konkrétně se jednalo o chemický posun 4,72-4,92 ppm. Další oblastí, která není směrodatná pro zjištění původu medu, je oblast obsahující signály sacharidů, jež jsou dominantními složkami medu. Jak již bylo zmíněno v teoretické části, sacharidová oblast



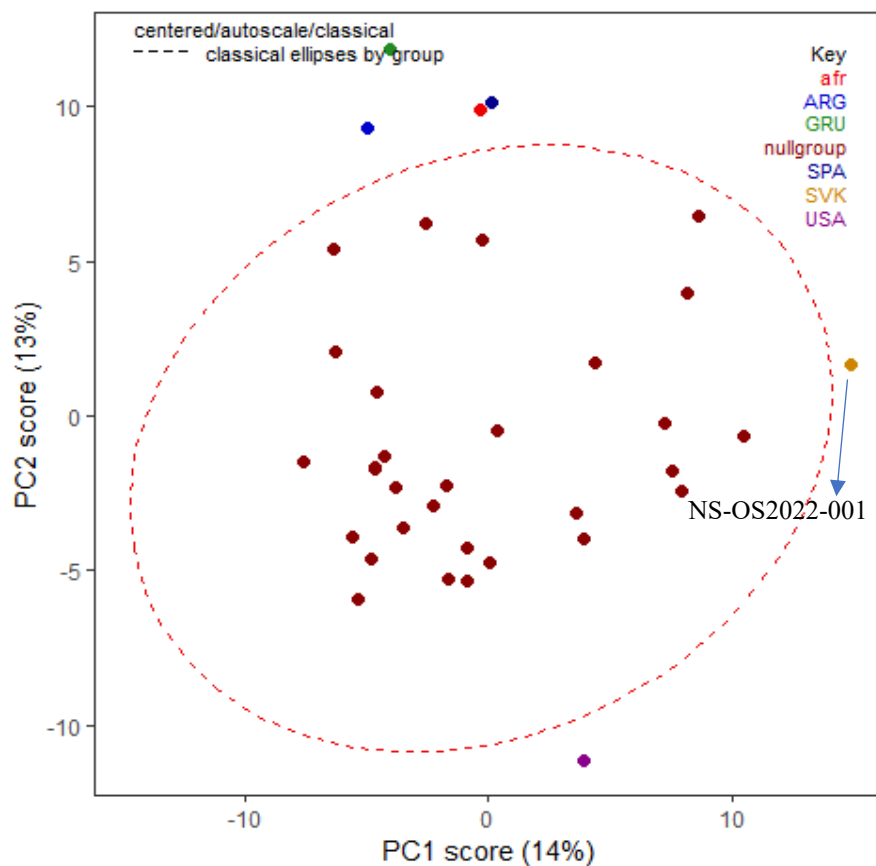
se ve spektru nachází v rozmezí chemického posunu 3,0-5,5 ppm. Na základě naměřených spekter byla v rámci této práce odstraněna oblast 3,20-4,12 ppm.



Obrázek 12: NMR spektrum s oranžově vyznačenými odstraňovanými oblastmi. Zprava: oblast ethanolu (1,19 ppm), sacharidů (3,2-4,12 ppm), vody (4,72-4,92 ppm), HMF (9,46 ppm). Šedě značené oblasti nezahrnuté do tvorby bucketů

Kromě těchto dvou oblastí (vody a sacharidů), které jsou v rámci jednotlivých vzorků velmi podobné, dále do statistiky nebyly zahrnuty buckety odpovídající signálům ethanolu a HMF. Konkrétně se jednalo o buckety s chemickými posuny 1,19 ppm pro ethanol a 9,46 ppm pro HMF. Obě tyto látky poukazují na nesprávné zacházení s medem. Můžou se v medu vyskytovat, pokud byl zahříván, případně jsou indikátory stáří medu či nevhodného skladování (Sanz, 2003). Jejich signály se můžou vyskytovat jak v medech zahraničních, tak v těch českých, tudíž nejsou směrodatné pro rozlišení geografického původu.

Odstraněním výše jmenovaných oblastí bylo dosaženo v rámci PCA požadovaného výsledku, tedy rozlišení medů českých od zahraničních. Výsledná analýza upravených dat pro první a druhou hlavní komponentu souhrnně popisuje 27 % variability v rámci dat. U medů českých došlo ke shluknutí, jelikož pocházejí z relativně malého území (Obrázek 13). Naproti tomu jsou medy ze zahraničí rozptýleny kolem elipsy ohraničující tuzemské medy, ale vyskytují se v její blízkosti. Pro jednoznačné zhodnocení geografického původu medu je potřeba analyzovat větší množství zahraničních vzorků, které by ideálně měly stejný geografický původ a využít regresního přístupu a diskriminační analýzy. Přesto je významným zjištěním oddělení slovenského medu z Oščadnice (NS-OS2022-001), která je příhraniční oblastí, a tudíž zde byl předpoklad, že nedojde k jeho rozlišení.



Obrázek 13: PCA 36 vzorků medů po odstranění oblastí ethanolu (1,19 ppm), sacharidů (3,20-4,12 ppm), vody (4,72-4,92 ppm) a HMF (9,46 ppm); české vzorky značeny jako nullgroup. Dále je vyznačen vzorek pocházející z Oščadnice (příhraniční oblast Slovenska)

Rozdílný botanický původ může ovlivňovat statistické vyhodnocení. Vzorky analyzované v rámci této práce mají různý původ, jak je patrné z Tabulka 1 (druh medu je uváděn na základě sdělení včelaře a má spíše orientační charakter). Při větším množství vzorků stejného druhu by bylo možné rozdělit medy i na základě jejich botanického původu (Gerginova et al., 2020), což v našich podmínkách může být komplikovanější, jelikož se většinou setkáváme s medy smíšenými.

Kromě většího množství analyzovaných medů by bylo vhodné využití jiného statistického přístupu. Jako jedna z možností se nabízí metoda analýzy nejmenších parciálních čtverců, která se řadí k přístupům regresní analýzy. Při této metodě uváděné rozdělení do skupin hraje roli, jelikož metoda pracuje se dvěma typy proměnných (závislé a nezávislé) a popisuje souvislost mezi nimi (Wold et al., 2001). Tento přístup tedy popisuje variabilitu systematickou místo celkové. V našem případě by se jednalo o variabilitu mezi skupinami medů zahraničních a českých. Metoda parciálních nejmenších čtverců se v literatuře rovněž hojně využívá a zdá se, že může poskytovat lepší výsledky

(Sun et. al., 2022). Pro využití tohoto statistického přístupu bude nutné využít jiný program, jelikož Delta umožňuje pouze provádění PCA a hierarchického shlukování.

Kontrola správnosti uvádění geografického původu je jen jedním z parametrů, jak odhalit případné klamání spotřebitele či vlastní falšování medu. Jelikož se v legislativě vyskytují maximální (případně minimální) přípustná množství určitých látek se dále nabízí provádět jejich kvantitativní analýzu pro zjištění vlastních falzifikátů. Spektra získaná v rámci práce budou dále využita i pro tuto analýzu, jelikož při přípravě byl ke vzorkům přidáván standard, známe přesné množství navážky medu a spektra byla měřena pomocí qNMR umožňující kvantifikaci látek. Další práce se bude zaměřovat na kvantitativní analýzu a stanovování koncentrace složek hlídaných v rámci kontroly kvality medu na základě vyhlášky č. 76/2003 Sb. Mezi tyto parametry patří součet glukosy a fruktosy, obsah sacharosy či dále stanovování látek přítomných v medech, se kterými nebylo správně zacházeno (byly zahřívány či dlouhodobě skladovány) jako je HMF či ethanol.

## 6 Závěr

Změřením 36 vzorků medů pomocí qNMR a jejich následným podrobením analýze hlavních komponent byla prokázána účinnost spojení této instrumentální metody se statistickým vyhodnocením pro zjišťování geografického původu medu.

Statistika byla prováděna v programu Delta NMR Processing and Control Software v6.2 pro Windows, který sice byl schopen rozdělit vzorky zahraniční od českých, ovšem disponuje pouze omezenými možnostmi pro statistické vyhodnocování. Rovněž úprava dat (odstraňování určitých oblastí spektra) byla poněkud komplikovaná, jelikož pro každou úpravu bylo nutné číselnou podobu spekter (buckety) stáhnout jako CSV soubor, odstranit požadované oblasti v programu LibreOffice Calc a dále opět nahrát do programu Delta a provést statistické vyhodnocení upravených dat.

Statistická metoda analýzy hlavních komponent (PCA) sice rozdělila medy na vzorky zahraniční a české, ale není dostatečná. Proto dále bude vhodné využít přístupu regresní analýzy například metodou nejmenších parciálních čtverců.

Analýza geografického původu medu pomocí nukleární magnetické rezonance spolu se statistickým vyhodnocením je metoda vhodná k dosažení přesvědčivých výsledků, ovšem vyžadující další práci a optimalizaci, zejména co se týče použité statistické metody a programu, v němž je analýza prováděna. Dále z naměřených spekter budou kvantifikovány klíčové látky pro kontrolu kvality medu (sacharidy, ethanol, HMF).

## Seznam literatury

- ALMEIDA-SILVA, M., CANHA, N., GALINHA, C., DUNG, H. M., FREITAS, M., C., SITO, T., Trace elements in wild and orchard honeys. *Applied Radiation and Isotopes*. 2011, **69**(11), 1592-1595. doi: 10.1016/j.apradiso.2011.01.013
- BATISTA, B.L., DA SILVA, L.R.S., ROCHA, B.A., RODRIGUES, J.L., BERRETTA-SILVA, A.A., BONATES, T.O., GOMES, V.S.D., BARBOSA, R.M., BARBOSA, F., Multi-element determination in Brazilian honey samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and estimation of geographic origin with data mining techniques. *Food Research International*. 2012, **49**(1), 209-215. doi: 10.1016/j.foodres.2012.07.015
- BOGDANOV, S., Harmonised methods of the international honey commission. *Bee Product Science*. 2009, <https://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf>
- CIULU, M., SOLINAS S., FLORIS, I., PANZANELLI, A., PILO, M. I., PIU, C. P., SPANO, N., SANNA, G., RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta*. 2011, **83**(3), 924-929. doi: 10.1016/j.talanta.2010.10.059
- CODEX ALIMENTARIUS. Codex standard for honey. FAO, Rome. 2001, str. 19-26
- ČÍŽKOVÁ, H., Falšování včelího medu. *Potraviný info*, 2017, [online]. [cit. 2024-05-11]. [https://www.potravinynfo.cz/33/falsovani-vceliho-medu-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4EstVtRjpnQxZqlZ3nlV8CI\\_2ZspOsA8wwA/](https://www.potravinynfo.cz/33/falsovani-vceliho-medu-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4EstVtRjpnQxZqlZ3nlV8CI_2ZspOsA8wwA/)
- GAUTHIER, J.R., BURNS, D., SHENG, J., D'EON, J.C., Exploring the Composition and Authenticity of Honey and Syrup Samples Using Quantitative NMR Spectroscopy and Principal Component Analysis in an Upper-Year Undergraduate Analytical Environmental Course. *Journal of Chemical Education*. 2023, **100**(1), 161-169. doi: 10.1021/acs.jchemed.2c00501
- GERGINOVA, D., SIMOVA, S., POPOVA, M., STEFOVA, M., STANOEVA, J.P., BANKOVA, V., NMR Profiling of North Macedonian and Bulgarian Honeys for Detection of Botanical and Geographical Origin. *Molecules*. 2020, **25**(20). doi: 10.3390/molecules25204687
- HE, Ch., LIU, Y., LIU, H., ZHENG, X., SHEN, G., FENG, J., Compositional identification and authentication of Chinese honeys by <sup>1</sup>H NMR combined with multivariate analysis. *Food Research International*. 2020, **130**. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108936
- IGLESIAS, M. T., MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J., POLO, M.C., DE LORENZO, C.,

- GONZÁLEZ, M., PUEYO, E., Changes in the Free Amino Acid Contents of Honeys During Storage at Ambient Temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, **54**(24), 9099-9104. doi: 10.1021/jf061712x
- KRUŽÍK, V., ŠKORPILOVÁ, T., Domácí kontrola kvality medu. *Moderní včelař*. 2022, **XIX**(08), 8-11.
- KRUŽÍK, V., ŠKORPILOVÁ, T., Stanovení obsahu vody v medu. *Moderní včelař*. 2023, **XX**(01), 24-26.
- LOUPPIS, A. P., KARABAGIAS, I. K., KONTAKOS, S., KONTOMINAS, M. G., PAPASTEPHANOU, C., Botanical discrimination of Greek unifloral honeys based on mineral content in combination with physicochemical parameter analysis, using a validated chemometric approach. *Microchemical Journal*. 2017, **135**, 180-189. ISSN 0026265X. doi: 10.1016/j.microc.2017.09.004
- LSTIBŮREK, J., 2022. Od kvality medu k medovině. *Moderní včelař*. 2022, **XIX**(02), 20-21.
- MCMURRY, J., 2015. *Organická chemie*. Přeložil BUDKA, J., přeložil CIBULKA, R., přeložil DVOŘÁK, D., přeložil KVÍČALA, J., přeložil LHOTÁK, P., přeložil SVOBODA, J., Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, Překlady vysokoškolských učebnic, svazek 5. ISBN 978-80-214-4769-1.
- NANDA, V., SARKAR, B.C., SHARMA, H.K., BAWA, A.S., Physico-chemical properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in Northern India. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2003, **16**(5), 613-619. doi: 10.1016/S0889-1575(03)00062-0
- PLEVA, M. *Rok včelaře*. Computer Media, Prostějov, 2021. ISBN 978-80-7402-420-7.
- RITTER, W., SCHNEIDER-RITTER, U., *Rok se včelami: včelaření podle 10 ročních období přírody*. Přeložil DIMTER, T., Brázda, Praha, 2022. ISBN 978-80-209-0445-4.
- SANZ, M.L., DEL CASTILLO, M.D., CORZO, N., OLANO, A., 2-Furoylmethyl Amino Acids and Hydroxymethylfurfural As Indicators of Honey Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, **51**(15), 4278-4283. doi: 10.1021/jf021235s
- SCHIEVANO, E., SBRIZZA, M., ZUCCATO, V., PIANA, L., TESSARI, M., NMR carbohydrate profile in tracing acacia honey authenticity. *Food Chemistry*. 2020, **309**. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125788
- SMĚRNICE RADY 2001/110/EC, ze dne 20. prosince 2001 o medu

- SUN, T., YANG, Z., XUAN, W., YU-YING, Z., ZHI, L., WEI, L., PIAO, CH., ZIHONG, Z., YONG-JIE, Y., Chemometric strategy for aligning chemical shifts in <sup>1</sup>H NMR to improve geographical origin discrimination: A case study for Chinese Goji honey. *Microchemical Journal*. 2022, **174**. doi: 10.1016/j.microc.2021.107062
- SVAZOVÁ NORMA ČESKÝ MED. Norma jakosti č. ČSV 1/1999
- ŠKORPILOVÁ, T., KRUŽÍK, V., Pylová analýza medu. *Moderní včelař*. 2023, **XX**(05), 30-31.
- ŠKORPILOVÁ, T., KRUŽÍK, V., Falšování medu. *Moderní včelař*. 2023a, **XX**(06), 24-26.
- TEXL, P., Získávání medu. *Moderní včelař*. 2023, **XX** (07), 19.
- VYHLÁŠKA č. 76/2003 Sb., Vyhláška, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony.
- WALLISCH, P., 2014. Principal Components Analysis. In: *MATLAB for Neuroscientists*. Elsevier, s. 305-315. ISBN 978-0-12-383836-0. doi: 10.1016/B978-0-12-383836-0.00017-5
- WOLD, S., SJOSTROM, M., ERIKSSON, L., PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2001, **58**, 109-130. doi: 10.1016/S0169-7439(01)00155-1
- ZHENG, X., ZHAO, Y., WU, H., DONG, J., FENG, J., Origin Identification and Quantitative Analysis of Honeys by Nuclear Magnetic Resonance and Chemometric Techniques. *Food Analytical Methods*. 2016, **9**(6), 1470-1479. doi: 10.1007/s12161-015-0325-1

# Přílohy

Naměřená qNMR spektra vzorků medů. Kódové označení vzorků uvedeno v levém horním rohu jednotlivých spekter

