

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Srovnání profilu organických látek v různých druzích  
meu stejného regionálního původu**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Tereza Komárková**

**Obor studia: Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce: Mgr. Petr Maršík, Ph. D.**



## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Srovnání profilu organických látek v různých druzích medu stejného regionálního původu" 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 26.4. 2021.

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu práce Mgr. Petrovi Maršíkovi, Ph. D. za jeho odborné vedení, trpělivost, cenné rady, věcné připomínky a čas, který strávil nad touto diplomovou prací. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

# Srovnání profilu organických látek v různých druzích medu stejného regionálního původu

## Souhrn

Med patří mezi nejznámější a nejdůležitější včelí produkt. Definujeme ho jako sladkou směs, pro kterou je základním materiálem v oblasti našeho mírného pásma nektar nebo medovice, kterou sbírají včely. Obsahuje kolem 200 různých látek. Fenolické látky spolu s dalšími sloučeninami vytváří organoleptické vlastnosti medu a lze jejich obsah v medu stanovit. Fenolické látky jsou předmětem mnoha studií a jejich charakteristika a zastoupení v medu je často zkoumána.

Cílem diplomové práce bylo srovnání profilu organických látek v různých druzích medu stejného regionálního původu. Stanovenou hypotézou bylo, že by se profil organických látek v různých druzích medu stejného regionálního původu neměl výrazně lišit. V rámci práce bylo analyzováno deset vzorků různých druhů medu, kdy devět vzorků bylo stejného regionálního původu CHKO Český les a jeden vzorek z regionu v okolí hlavního města Prahy. Těchto deset vzorků medu bylo analyzováno ve třech opakováních. Nejprve byla provedena extrakce na pevnou fázi (SPE) a poté byly profily organických látek stanoveny pomocí metody LC-MS. Následné vyhodnocení vícerozměrnými statistickými metodami poskytlo informace stanovení fenolických látek, které bylo možné využít při porovnání profilů vzorků medu.

Dále byl stanoven profilový screening na přítomnost pesticidů. Nejvíce zastoupené pesticidy ve vzorcích medu byly Triazamát, Aminocarb, Pirimicarb a Icaridin.

Mezi nejčastěji nalezené fenolické látky patřil pinocembrin, kaempferol, pinobanksin a kvercetin.

**Klíčová slova:** med, organické sloučeniny, fenolické látky, chromatografie, LC-MS

# Comparison of organic compound profile in different honey of identical geographic origin

## Summary

Honey is one of the most well-known and significant bee products. It is defined as a sweet substance produced by bees from nectar or other secretions such as honeydew. About 200 compounds can be found in honey, phenolic compounds which are, among others, also responsible for its organoleptic properties. Phenolic compounds are the subject of many studies. The studies are concerned with the description of the compounds' characteristics and its occurrence in honey.

The aim of this diploma thesis is to compare the profile of organic compounds in various types of honey with the same region of origin. According to the hypothesis, the difference in the profile of organic compounds in various types of honey with the same region of origin should not be significant. For the analysis conducted in this thesis, ten samples of honey were used. Nine samples are from the region of Český les Protected Landscape Area and one sample is from the region of the capital city Prague. The aforementioned ten samples of honey were analysed three times. First and foremost, the solid phase extraction (SPE) was used and subsequently the profiles of organic compounds were established using the LC-MS technique. Afterward, the assessment conducted by multidimensional statistical methods provided information regarding the phenolic compounds, which were later used in the comparison of the honey samples.

Furthermore, a screening for the presence of pesticides was performed. The most commonly found pesticides in the honey samples were Triazamate, Aminocarb, Primicarb and Icaridin.

Pinocembrin, kaempferol, pinobanksin and quercetin were among the most commonly found phenolic compounds.

**Keywords:** honey, organic compounds, phenolic compounds, chromatography, LC-MS

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>2</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Med.....</b>	<b>3</b>
3.1.1 Nutriční význam medu.....	3
3.1.2 Antioxidační aktivita.....	4
3.1.3 Antimikrobiální aktivita.....	4
<b>3.2 Druhy medů .....</b>	<b>5</b>
3.2.1 Jednodruhové medy .....	5
<b>3.3 Složení medu .....</b>	<b>6</b>
3.3.1 Voda.....	6
3.3.2 Sacharidy .....	7
3.3.3 Bílkoviny a aminokyseliny .....	7
3.3.4 Fenolické sloučeniny .....	8
3.3.5 Organické kyseliny .....	8
3.3.6 Vitaminy .....	9
3.3.7 Minerály.....	9
<b>3.4 Nežádoucí kontaminanty v medu .....</b>	<b>10</b>
3.4.1 Pesticidy.....	10
3.4.2 Antibiotika .....	11
3.4.3 Hydroxymethylfurfural.....	11
<b>3.5 Ostatní včelí produkty .....</b>	<b>12</b>
3.5.1 Propolis .....	12
3.5.2 Mateří kašička.....	12
3.5.3 Včelí jed.....	13
<b>3.6 Falšování medu.....</b>	<b>13</b>
<b>3.7 Metody analýzy medu .....</b>	<b>13</b>
3.7.1 Příprava vzorků.....	13
3.7.2 Senzorická analýza .....	14
3.7.3 Moderní analytické metody .....	14
3.7.3.1 Hmotnostní spektrometrie.....	14
3.7.3.2 Chromatografie .....	15
<b>4 Experimentální část .....</b>	<b>17</b>
<b>4.1 Stanovení profilu organických látek pomocí LC/MS .....</b>	<b>17</b>
4.1.1 Použitý materiál .....	17
4.1.2 Použitá zařízení a pomůcky .....	18

4.1.3	Použitý software .....	18
4.1.4	Příprava vzorků.....	18
<b>4.2</b>	<b>Analýza.....</b>	<b>19</b>
4.2.1	Statistická analýza.....	20
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>21</b>
5.1	Výsledky analýzy fenolových látek v medu .....	21
5.2	Výsledky analýzy pesticidů.....	27
<b>6</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>29</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>31</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>32</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů.....</b>	<b>41</b>
<b>10</b>	<b>Samostatné přílohy .....</b>	<b>I</b>



# 1 Úvod

Med je celosvětově využívaná surovina a patří mezi nejznámější a nejdůležitější včelí produkt. Pro své léčivé, terapeutické a výživové vlastnosti je používán už od starověku. Je používán pro průmyslové účely, v potravinářství, gastronomii, kosmetice a pro jeho nutriční a léčivé účinky, které jsou předmětem mnoha zkoumání. Med pochází z rostlinného nektaru a producentem medu je včela medonosná (*Apis mellifera*). Existují dva druhy medu, první z nich je nektarový (květový med), jehož základem je rostlinný nektar a druhým je mednicový med, který se získává ze sekretu hmyzu sajícího na rostlinách. V rámci každého z těchto dvou hlavních druhů medu můžeme rozeznávat mnoho variací v závislosti na jeho fyzikálně – chemických vlastnostech a organoleptických vlastnostech

Med je přírodní potravin a skládá se především z vody a cukrů a kromě těchto složek obsahuje i mnoho dalších jako jsou enzymy, bílkoviny, aminokyseliny, minerály a další. Z organických látek patří mezi jeho významné složky také fenolické kyseliny a flavonoidy, které jsou známé svými antioxidačními vlastnostmi. Je také považován za přírodní antibiotikum a přirozený imunostimulant.

Vysoká cena a omezená dostupnost medu zapříčinily zvýšený zájem o jeho falšování, kdy dochází ke klamání spotřebitele za účelem zisku výrobce či prodejce. Med vyžaduje standardy a normy, které zajišťují jeho kvalitu a identitu. Velký důraz je kladen na zdravotní nezávadnost medu a je proto nutné, aby splňoval legislativou nařízená kritéria.

Pro analýzu medu se v současné době využívá řada metod zahrnujících senzoricou analýzu, biologické, fyzikálně-chemické metody a moderní analytické metody. Výčet těchto metod používaných pro stanovení kritérií kvality medu je uveden v Evropské normě nebo v Kodexu Alimentarius.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Cílem této práce je přiblížení chemické podstaty medu, stanovení a srovnání profilu obsahu organických látek v různých druzích medu stejného regionálního původu

Hypotéza: Profil organických látek v různých druzích medu stejného regionálního původu by se neměl výrazně lišit.

## 3 Literární řešerše

### 3.1 Med

Med patří mezi nejznámější a nejdůležitější včelí produkt (Veselý 2013). Definujeme ho jako sladkou směs, pro kterou je základním materiálem v oblasti našeho mírného pásma nektar nebo medovice, kterou sbírají včely (Dobrovoda 1986).

Jedná se o přírodní produkt s různým složením ovlivněný mnoha faktory jako je zeměpisný a botanický původ, klima, manipulace včelařů a další (Al-Mamary et al. 2002). Je to komplexní směs sacharidů (fruktóza, maltóza, glukóza a sacharóza), vody, organických sloučenin, kyseliny gluonové, dusíkatých sloučenin, fenolických kyselin, minerálních látek, flavonoidů, bílkovin, vitamínů, aminokyselin, enzymů a fyto-sloučenin. (Wang et al. 2004; Bertonecelj et al. 2007).

Přeměna medovice či nektaru v med zahrnuje jak chemické, tak i fyzikální procesy. Nektar je vylučován z aktivních žláz květů rostlin, které mají za úkol lákat hmyz, tím si tak rostlina zajišťuje opylení.

Med je dělen dle původu na mednicový a květový a dále dle státu dělen podle způsobu získávání (National Honey Board 2018). Mednicové medy produkuje mnoho různých mšic a hmyzu na velké škále rostlin, které pocházejí převážně z jehličnatých stromů, a to ze smrku, jedle a borovice. Na trh jsou uváděny se specifickým označením a v Evropě se považují za vysoce ceněné (Oddo et al. 2004). Květové medy vznikají z nektaru, který sbírají včely (Manzanares et al. 2011).

Zbarvení medu se pohybuje v široké škále od bledě žluté po tmavě červenou jantarovou až po téměř černou. Barva medu je způsobena především rostlinným zdrojem, ze kterého med pochází. V některých případech ovlivňuje barvu i klima (White 1980)

Chuť a vůně medu je značně variabilní a jednotlivé odlišnosti jsou způsobeny jeho botanickým původem. Světlý med má obecně jemnější chuť a tmavší výraznější (White 1980).

#### 3.1.1 Nutriční význam medu

Med se v historii používal zejména jako zdroj energie, konzervant a jako přírodní sladidlo. Světová produkce medu se ročně pohybuje kolem 1,2 milionu tun (Alvarez – Suarez et al. 2010). Byl a je široce přijímán jako jídlo všemi generacemi a civilizacemi (Ajibola et al. 2012). Poukazuje se na to, že med má několik pozitivních výživových účinků, pokud je konzumován v dávkách od 50 g až 80 g (Bogdanov et al. 2008). Hlavní složkou, která souvisí s výživou a zdravím jsou sacharidy, které jsou potřebným zdrojem energie jak pro děti, tak zejména pro sportovce (Alvarez-Suarez et al. 2010).

V posledních letech se medu připisuje mnoho pozitivních účinků na lidské zdraví. Poukazuje se na to, že med má velmi příznivé účinky na gastrointestinální trakt, játra, střevní mikroflóru, slinivku břišní a snižuje spojenou glykemii a metabolické poruchy. U pacientů se sníženou tolerancí glukózy a diabetem mellitu prokázaly různé studie, že byl med lépe snášen než většina běžných cukrů a snižoval hladinu glukózy v krvi. Na základě těchto důkazů jsou navrženy možné mechanismy působení antidiabetického účinku medu (Erejuwa et al. 2012).

Nutriční význam medu má roli i v kojenecké výživě. V posledních stoletích byla aplikace medu ve výživě kojenců doporučována. Je uváděno několik zajímavých pozorování, v kterých kojenci s dietou, která obsahovala med měli lepší krevní obraz, vyšší přírůstek hmotnosti a med byl pro kojence i lépe chuťově přijatelnější než při podávání sacharózy. Kojenci při medovém režimu byli méně náchylní k nemocem, trávicím potížím a trpěli méně na průjmová onemocnění (Bogdanov et al. 2008).

Nevýhodou byla obava ohledně přítomnosti *Clostridium botulinum* v medu, protože přítomnost této bakterie je v přírodních potravinách všudypřítomná (Bogdanov et al. 2008). Spory jsou schopné produkovat botulotoxin a tento stav u batolat s nedostatečně vyvinutým trávicím traktem pak může vést až ke smrti (Brown 2000). Existují studie, které poukazují na možnou alergii vyvolanou konzumací medu. Alergické reakce byly způsobeny alergeny ze včelích produktů, jejich metabolismu, nektaru či propopolisu a také reakce na bílkoviny nacházející se v medu, které mohou vyvolat řadu alergických reakcí (Guan, Li a Yin 2016).

### 3.1.2 Antioxidační aktivita

Med, který díky přítomnosti vyššího množství antioxidantních sloučenin jako jsou bioaktivní peptidy, enzymy, organické kyseliny, fenoly a flavonoidy, má schopnost předcházet různým chorobám. Několik studií poukazuje na důkaz antioxidační aktivity, což je parametr pro možný terapeutický účinek. Příjem medu zvyšuje hodnotu vitamínu C v krvi, B – karoten a glutathion reduktázu (Schramm et al. 2003). Je využíván v kardiovaskulárních onemocněních, zánětlivých stavech, léčbě infekcí a chirurgických pooperačních ran (Ahmad et al. 2017).

Flavonoidy jsou sekundární metabolity rostlin využívané ve farmakologii pro své antibiotické, protialergické, a hypoglykemické účinky (Gheldof & Engeseth 2002) a fenoly jsou v současné době zkoumány v oblasti lékařské a potravinové výživy zejména kvůli jejich funkčním vlastnostem. Fenoly vychytávají volné radikály, a tak jsou účinným imunomodulátorem a inhibítorem působení hormonů (Havsteen 2002).

### 3.1.3 Antimikrobiální aktivita

Antimikrobiální léčivá aktivita medu je známá již od starověku a jeho léčivý význam je dokumentován v nejstarších lékařských literaturách na světě (Mandal 2011). Aristoteles (384–322) př.n.l. se zmiňoval o medu jako o balzámu na bolavé oči a rány. Po dobu 2700 let byl med používán lidmi k léčbě různých onemocněních, ale teprve nedávno byla objevena jeho antimikrobiální vlastnost (Israili 2014).

Klinické studie prokázaly, že léčivé vlastnosti medu jsou způsobeny jeho antibakteriální aktivitou. Vytváří ochrannou bariéru, aby se zabránilo infekci a při těžce infikovaných kožních ranách aplikace medu odstraňuje infekci z rány a zlepšuje hojení tkání.

Antibakteriální vlastnost medu je způsobena enzymatickou produkcí peroxidu vodíku a odvozena od osmotického účinku, vysokého obsahu cukru a nízkého obsahu vlhkosti s antiseptickými vlastnostmi (Vallianou et al. 2014).

Medy pro lékařské účely mají in vitro silnou baktericidní aktivitu proti bakteriím rezistentním na ATB, které způsobují několik život ohrožujících infekcí. Byl prokázán antibakteriální účinek proti bakteriím jako je *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Protizánětlivé účinky medu mohou být užitečné i při prevenci aterosklerózy a

diabetu mellitu. Výsledky studií také poukazují na uklidňující účinky při popáleninách. Z aplikace medu zatím nebyla hlášena žádná infekce a má potenciální terapeutickou roli i při léčbě periodontálních onemocnění (Khan 2007).

V současné době se podávají medy se standardizovanou úrovní antibakteriálních aktivit kdy např. med *Leptospermu scoparium* – Manuka med, jeden z nejznámějších medů, původem z Nového Zélandu a Austrálie má inhibiční účinek dokonce až pro 60 bakteriálních druhů, včetně anaerobních a aerobních či G+, G – bakterií (Vallianou et al. 2014).

## 3.2 Druhy medů

Medy se dělí dle různých hledisek, nejčastěji podle rostlinného původu, dále pak podle druhu včel či způsobu získávání medu (Titěra 2013).

V Evropě se vyskytuje pouze včela medonosná *Apis mellifera*, proto na etiketách není nutné uvádět druh včely oproti tomu u dovozového medu by druh včel uveden být měl, např. v případě včely indické *Apis cerana* či ceněného léčivého medu jihoamerických, bezžihadlových včel rodu *Trigona* (Titěra 2013).

Dále se med dělí podle rostlinného původu na květový med (světlý) a mednicový med (tmavý), pokud nejsou nějakým způsobem medy narušeny, jsou stejně hodnotné. Květové medy jsou světlejší, obsahují mnoho bílkovin a jsou lépe stravitelné pro lidský organismus (Šefčík 2014). Mednicové obsahují větší množství minerálních látek a stopových prvků, mají ostřejší chuť a jsou tmavé barvy (Oddo et al. 2004).

Podle způsobu vytáčení se med dělí na vytáčený, lisovaný a plástečkový. Vytáčený med, je nejčastější a je to med odebraný ze včelstva ve zralém stavu a získaný po odvíčkování z plástů v čistém medometu bez působení tepla. Výhodou je minimální narušení a poškození včelího díla. Lisovaný med se získává lisováním, což je stará zanikající technologie a u nás se již nepoužívá (Titěra 2013). Plástečkový med se nevytáčí a jde o med zavíčkovaný a uložený včelami do čerstvě postavených bezplodových plástů (Švamberg 2003). Prodává se jako díl plástů nebo v celých uzavřených plástech (Kamler et al. 2006).

Květové medy bývají velmi často smíšené s medy mednicovými z důvodů různých lesních komplexů a včely kromě sběru medovice přinášejí do úlu také nektar a vznikají medy smíšené. Medy smíšené tvoří většinu medné produkce. Oproti tomu medy jednodruhové musí pocházet z jedné, výrazně převažující snůšky a mají proto přísně normativně určené vlastnosti, aby jako jednodruhové medy mohly být označovány (Švamberg 2003).

### 3.2.1 Jednodruhové medy

Jednodruhové medy, označovány jako monoflérní jsou vzácné. Tyto med lze získat z druhů rostlin, které nekvetou současně s jinými zdroji pro tvorbu medu. Pro tento jednodruhový med musí včelař vystihnout správný okamžik a v době, kdy je med zralý musí bez prodlení tento med vytočit. Původ těchto medů se většinou určuje podle pylových zrn, které jsou v nich obsaženy. (Titěra 2013). V Evropě se v menší míře produkuje jen několik typických druhových medů. Mezi ně se řadí med akátový, řepkový, jetelový, slunečnicový a maliníkový (Haragsim 2004).

Akátový med je na trhu poměrně častý a patří mezi ceněné medy, jelikož disponuje vysokým obsahem fruktózy (Orey 2011). Vzniká převážně v teplých oblastech Čech a Moravy a má zde až 20% podíl na medné produkci. Ovšem hlavními producenty tohoto druhu medu pro evropský trh jsou státy jako Maďarsko, Rumunsko a Bulharsko. V čistém stavu je bezbarvý až lehce nažloutlý, zůstává dlouho tekutý a je vhodný pro slazení nápojů (Švamberg 2003).

Jeden z hojně produkováných medů je med řepkový. Řepkový med je světlý, vhodný pro pastování, rychle krystalizující a po ztuhnutí téměř bílý (Titěra 2013). Chuť má aromatickou a liší se podle odrůdy řepky. Chuťové kvality doznaly během 20 let významného zlepšení díky zavedení bezerukových odrůd řepky olejky. Na trhu se objevují nejčistější řepkové medy z Francie a České republiky a na světovém trhu je významným dodavatelem Indie z řepáku olejného (*Brassica rapa*) (Švamberg 2003).

Jetelový med se v čisté podobě získává ze včelstev přisunutých k semenným porostům. Tento med je rychle tuhnoucí s výraznější nakyslou chutí než je tomu u řepkového medu (Titěra 2013). Krátce po vytočení se může v těchto medech vyskytovat vyšší obsah sacharózy. Je považován za výborný zdroj energie pro rekonvalescenty a sportovce díky vysokému obsahu glukózy. Evropská produkce je zcela nedostatečná a tento druh medu se dováží především z Kanady (Švamberg 2003).

Slunečnicový med z pohledu prodáváného množství je v podmínkách ČR téměř okrajou záležitostí. V Evropě je předním producentem slunečnicového medu především Francie, také Bulharsko, Rumunsko, Ukrajina a Mexiko. Tento med má typicky nažloutlou barvu díky květenství slunečnice. Podléhá rychlé krystalizaci a často se používá pro pastování.

Maliníkový med je spotřebiteli velmi ceněn a je často vyhledáván, avšak na tuzemském trhu zaujímá pouze malé procento a jeho nedostatek je kompenzován dovozem z Kanady. V tekutém stavu má světle žlutou barvu a velmi příjemné ovocné aroma. Rychle krystalizuje do bílé máslovité konzistence a je také vhodný pro pastování (Švamberg 2003).

### 3.3 Složení medu

Med se skládá z několika hlavních komponentů a mnoha dalších látek, které z něj dělají cennou součást stravy (Ball 2007). Díky rozvoji analytických metod bylo v posledních letech v medu popsáno více než několik set specifických látek. Tyto organické látky jednak produkují rostliny, některé jsou výsledkem vzájemných reakcí, jiné vznikají působením včelích enzymů (Titěra 2013). Med se proto liší nejen chemickým složením, ale také fyzikálními vlastnostmi, chutí a biologickou aktivitou (Kaškonienė et al. 2009). Nesmí obsahovat žádné škodlivé látky, aroma cizích látek, aditiva a žádná vlastní složka nesmí být odstraněna (Codex Alimentarius 2001).

Vzhledem k chemické komplexitě složení medu mohou v medu nastat změny ve složení během skladování, které mohou ovlivnit jeho kvalitu (např. Maillardova reakce) (Moreira et al. 2007, 2010).

#### 3.3.1 Voda

Med je poměrně suchou potravinou a voda tvoří asi 13–25% podílu v medu (Sima et al. 1983). Optimální obsah vody činí okolo 17 % - pokud má med více než 17 % vlhkosti a

obsahuje dostatečné množství spór kvasinek, podléhá kvašení. Takové medy musí být pasterizovány, tedy dostatečně zahřívány, aby došlo k usmrcení nežádoucích mikroorganismů (Dobrovoda 1986). Lze tedy zjednodušeně říct, že čím méně vody med obsahuje tím je kvalitnější (Titěra 2013). Množství vody je závislé na řadě faktorů, jako jsou vlastnosti nektaru, stupeň zrání, sezóna – vymetání, zeměpisný původ, množství včelstva atd. (Sabatini 2007; Pontara et al. 2012).

Velmi suchý med se obtížněji extrahuje a zpracovává, a naopak med s vyšším obsahem vody může zkvasit a chuťově se znehodnotit. (Titěra 2013). Po extrakci medu se obsah jeho vlhkosti může měnit v závislosti na podmínkách skladování. Proto je podíl vody jedna z nejdůležitějších charakteristik medu, která ovlivňuje jeho kvalitu (White 1980).

Obsah vody v medu se v laboratorích zjišťuje refraktometricky na základě indexu lomu, nicméně orientačně můžeme zjistit obsah vody v medu i tak, že stanovíme jeho hustotu přesným zvážením definovaného objemu (Titěra 2013).

### 3.3.2 Sacharidy

V sušině medu tvoří cukry asi 90 %. Z nich nejdůležitější jsou glukóza, fruktóza, sacharóza a dextriny (Dobrovoda 1986). Složení cukru závisí na druhu květin používaných včelami, na zeměpisném původu, klimatu a dalších podmínkách (Escuredo et al. 2014).

Glukózu a fruktózu řadíme do skupiny jednoduchých cukrů – monosacharidů a jsou nejdůležitějšími a nejvíce zastoupenými složkami medu, které podmiňují jeho fyzikální, chemické a biochemické vlastnosti (Dobrovoda 1986). Monosacharidy představují asi 75 % obsahu a disacharidy (maltóza a sacharóza) se pohybují v rozmezí 10–15 % a další množství ostatních cukrů. Obsah cukrů je odpovědný za jeho viskozitu, granulaci a energetickou hodnotu (Kamal & Klein 2011).

V medu jsou přítomné i některé oligosacharidy. Do skupinu trisacharidů se řadí maltotrióza, melecitóza a panóza a dokreslují jeho přirozený původ. Při obsahu trisacharidu melecitózy v medu způsobuje cementový med, což je jev, při kterém med krystalizuje tak rychle, že ztuhne již ve včelích plástech (Titěra 2013). Fruktooligosacharidy jsou zastoupeny v medu kolem 4-5 % a je jim připisován probiotický účinek (Al – Sheraji et al. 2013).

### 3.3.3 Bílkoviny a aminokyseliny

Mezi další složky medu patří bílkoviny jejichž stavebním prvkem jsou aminokyseliny. Jejich obsah se liší podle daného druhu včely. Med včely medonosné *Apis mellifera* obsahuje mezi 0,2 % - 1,6 % proteinů oproti tomu med *Apis cerana* obsahuje od 0,1 % do 3,3 % bílkovin. V sušině medu na 100 g je obsah aminokyselin asi 100 mg. Bílkoviny v medu pocházejí jak z rostlinných, tak i živočišných zdrojů jako je nektar či sekrety slinných žláz a hltnu včel. (Escuredo et al. 2013). Bílkoviny se v medu vyskytují zejména ve formě enzymů. Kromě proteinů a peptidů jsou v medu zastoupeny i volné aminokyseliny s výjimkou glutaminu a asparaginu. Hlavní aminokyselinou obsaženou v medu je prolin, který je primárně výsledkem sekrece slin včel a tvoří 50-85 % celkového obsahu aminokyselin (Iglesias et al. 2006). Prolin se používá jako parametr k hodnocení stupně zrání medu. Mezi další významně zastoupené aminokyseliny se řadí alanin, fenylalanin, leucin, izoleucin, a glutamová k. (Herminosín et al. 2003).

Enzymy obsažené v medu pocházejí od včel nebo jsou rostlinného původu z nektaru či medovice. V medu hrají významnou roli a ovlivňují především fyzikálně-chemické reakce. Nejvýznamnějšími enzymy v medu jsou glukózooxidáza, invertáza, diastáza (od včel), mezi méně významné patří např. fosfatáza či kataláza (z nektaru a medovice) (Sak – Bosnar & Sakac 2012, Won et al. 2008). Diastáza rozkládá škrob nebo glykogen na menší jednotky cukru a invertáza rozkládá sacharózu na glukózu a fruktózu (Bogdanov 2016). Významný enzym glukózooxidáza za přítomnosti vzduchu mění množství glukózy na kyselinu glukonovou a peroxid vodíku. Působí proti růstu bakterií a je jejich inhibitorem (Weiß 2010).

### 3.3.4 Fenolické sloučeniny

Fenolické sloučeniny jsou další důležitou složkou medu vzhledem k jejich funkčním vlastnostem. Patří mezi sekundární metabolity rostlin a hub (Heleno et al. 2015). Jedná se o chemicky heterogenní skupinu zahrnující několik různých tříd sloučenin podle chemické struktury (Andersen & Markham 2006). Základem jejich struktury je aromatický kruh s jednou nebo více hydroxylovými skupinami a mohou se lišit od jednoduchých po složité (Pyrzyska & Biesaga 2009). Zahrnují rozšířenou skupinu přírodních látek jako jsou fenolické kyseliny, flavonoidy, taniny a stilbenoidy (Manganaris et al. 2014). Fenolové kyseliny a flavonoidy vykazují škálu biologických účinků a působí jako přírodní antioxidanty (Alqarni et al. 2012). Organismus chrání před volnými radikály. Společně s fenolickými sloučeninami působí v medu i jako antioxidant vitamin C a katalasa (Maridonneau – Parini et al. 1986, Ferrali et al. 1997).

Fenolové kyseliny se dělí na deriváty hydroxybenzoové kyseliny (gallová, protokatechová, syringová, vanilinová k.) a skořicové kyseliny (ferulová, sinapová, kávová k.) (Estevinho et al. 2008).

Flavonoidy odvozeny z latinského slova flavus (žlutý) dodávají rostlinám barvu (Frank 2010). Jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu, který je tvořen dvěma benzenovými jádry, spojenými heterocyklickým pyranem. Flavonoidy jsou hlavní funkční složkou a přináší blahodárné účinky na lidské zdraví a výrazně přispívají k antioxidační aktivitě (Alvarez – Suarez et al. 2012).

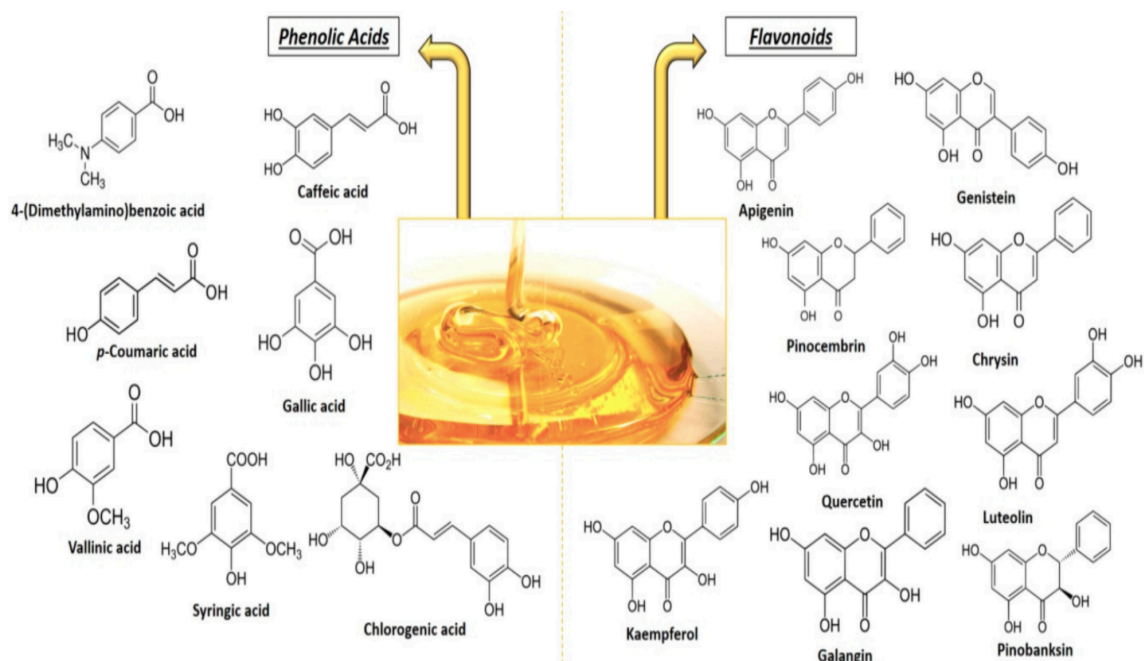
Jsou nedílnou součástí antioxidačního systému, kde likvidují volné kyslíkové radikály, zabraňují peroxidaci lipidů a mohou vázat a inaktivovat některé prooxidační kovové ionty (Pyrzyska & Biesaga 2009). Flavonoidy se dále klasifikují podle stupně oxidace C kruhu na falvonoly, flavony, flavanonoly, flavonoly, isoflavony, antokyany a antokyanidiny. Nejvíce jsou v medu zastoupeny flavony, falvanoly a flavonoly (Estevinho et al. 2008)

### 3.3.5 Organické kyseliny

Organické kyseliny představují kolem 0,6 % obsahu a jsou důležitou součástí medu, kdy ovlivňují jeho chuť a stabilitu a také mají řadu cenných vlastností (Olaitan et al. 2007). Podle obsahu kyselin v medu se liší jeho původ. Některé organické kyseliny se řadí k přirozeným antioxidantům. V medech bylo identifikováno více než 30 organických kyselin. Mezi tyto kyseliny se řadí především glukonová kyselina, která je výsledkem enzymatického štěpení glukózy, dále jablečná k. a citronová k. a pyrohroznová k. Obsah těchto kyselin při kvašení nezralého medu vzrůstá, a proto jsou pro jejich obsah stanoveny limity. Současná naše i evropská norma připouští kyselost do 50 mval na kg (Viuda – Martos et al. 2010).



Organické kyseliny způsobují kyselou chuť medu. Nejdůležitější kyselinou v medu je glukonová kyselina vznikající štěpením glukózy. Podílí se desetinami procenta na sušině medu a je obsažena v medu nejčastěji ve formě laktonu (Singhala kol. 1997)



Obrázek 1: Nejvíce zastoupené fenolové sloučeniny identifikované v medu (Převzato z Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits, Cianciosi et al. 2018)

### 3.3.6 Vitaminy

Vitaminy jsou v medu obsaženy v malém množství. Hlavním zdrojem vitaminů pro včely je pyl, proto jsou dominantními vitaminy v medu zejména vitaminy skupiny B, které pocházejí z pylových zrn (Titěra 2013). Řadí se mezi ně např. B1 thiamin, B2 riboflavin, B3 nikotinová kyselina, B5 pantothenová kyselina, B9 listová kyselina a další. V medu je přítomný také vitamín C, který se nachází téměř ve všech druzích medu. Významnou roli zde hraje díky svému antioxidačnímu účinku, nicméně patří mezi nestabilní indikátory, protože je náchylný na enzymatickou oxidaci a snadno podléhá změnám v důsledku působení různých faktorů jako je teplo, světlo či kyslík (Bonté & Desmouliere 2013). Také filtrace medu a oxidace kyseliny askorbové peroxidovými radikály způsobuje ztrátu vitaminů (Ciulu et al. 2011).

### 3.3.7 Minerály

Obsah minerálů se v medu pohybuje kolem 0,04 % u medů světlých a 0,2 % u medů tmavých. Mezi mikroprvky zastoupené v medu patří draslík, hořčík, vápník, sodík, železo, fosfor, selen, chrom a další prvky (Alqarni et al. 2012). Největší je obsah draslíku, který odpovídá 1/3 obsahu minerálů v medu, v menším množství je pak zastoupen sodík, železo, vápník, hořčík (Yucel & Sultanoglu 2013).

Příznivým účinkem těchto minerálů a stopových prvků je ovlivnění základních funkcí při udržování fyziologického stavu či jejich působení na celkový metabolismus. Naproti tomu, některé těžké kovy jako olovo nebo kadmium jsou při překročení maximálního limitu toxické.

Maximální obsah reziduí toxických těžkých kovů v medu nebyl stanoven, nicméně WHO a FAO navrhly přijatelné rozmezí (Ajtony et al. 2007).

Kvantifikace těchto toxických prvků je důležitá pro bezpečnost lidského zdraví i biomonitoring životního prostředí (Ajtony et al. 2007). Obsah těchto stopových prvků závisí na typu půdy, ze které rostlina vyrostla a včela z ní sbírala med. Některé studie klasifikují medy podle obsahu minerálů, kdy například ve Španělsku byl zjištěn vyšší obsah manganu v medu z květů vřesu, dále pak vzorky z Maďarska vykazovaly na nejnižší koncentrace kadmia, mědi, olova u lípy (Alqarni et al. 2012).

### 3.4 Nežádoucí kontaminanty v medu

Při sběru medovice či nektaru se mohou do medu dostávat i nejrůznější kontaminanty. Med může být kontaminován z různých zdrojů, mezi zdroje kontaminace se řadí i kontaminace samotnými včelami, kdy se v medu mohou objevit části jejich těl. Kontaminace může být způsobena i chybami při aplikaci včelařských postupů nebo prostředím.

Včelí produkty mohou být kontaminovány přímým a nepřímým způsobem. Přímým způsobem je med znečišťován kontaminanty pocházejícími ze včelařství, pesticidy, rezidui farmak, akaricidy používanými k tlumení chorob včel, materiálu úlu, včelími repelenty při sklizni medu či ochrannými prostředky na ošetření dřeva. Nepřímým způsobem dochází ke kontaminaci znečišťujícími látkami převážně ze zemědělských postupů a obecně z prostředí, pesticidy, polychlorované bifenyly (PCB), těžké kovy, bakterie, polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a radionuklidy (Kuwijski 2008).

Mezi hlavní kontaminující látky pocházejícími ze včelařství patří akaricidy, lipofilní syntetické sloučeniny a netoxické látky jako jsou organické kyseliny a složky éterických olejů, antibiotika používaná k potlačení chorob plodů zejména tetracykliny, streptomycin nebo sulfonamidy (Bogdanov 2006). Z tohoto důvodu by měl být med označen etiketou, aby bylo možné prozkoumat jeho původ a složení (Stanimirova et al. 2010).

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) jsou skupinou aromatických uhlovodíků s nejméně dvěma benzenovými jádry, které vznikají převážně během spalování fosilních paliv a organického odpadu. Jsou tak v životním prostředí všudypřítomné (Bostrom et al. 2002). Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou přítomny v medu hlavně z důvodu špatné manipulace a usazování PAH ze vzduchu na rostlinách (Corredera et al. 2014). Z toxikologického hlediska jsou PAH nebezpečné zejména kvůli svému mutagennímu a karcinogennímu účinku (Bostrom et al. 2002).

#### 3.4.1 Pesticidy

Pesticidy jsou celosvětově využívány k ochraně plodin, ke zvýšení produktivity zemědělství i pro kontrolu chorob a škůdců včel. Jejich používání je většinou nekontrolovatelné a aplikované bez schválených protokolů, což má za následek kontaminaci životního prostředí, zdravotní riziko pro mnoho druhů zvířat a lidí. Mezi zbytky pesticidů patří fungicidy, insekticidy, organické kyseliny, herbicidy a baktericidy. Potencionální riziko pro zdraví člověka představují pesticidy pro svou subakutní až chornickou toxicitu. Mnoho těchto kontaminantů je zakázáno kvůli zdravotnímu riziku především kvůli karcinogennímu účinku.

V Evropské unii dnes existuje na trhu přes 1100 registrovaných pesticidů (EU Pesticides database 2018).

Mezi nejčastější pesticidy v medu se řadí organosfosfáty a karbamáty. Rozsáhlá distribuce těchto skupin pesticidů způsobuje kontaminaci květů. Včely z těchto květů přenášejí rezidua do medu, a tak ohrožují zdraví konzumenta. (Mukherjee 2009). Organochlorové pesticidy jsou velmi toxické, karcinogenní látky a jsou vysoce odolné vůči biologickému rozkladu. Jsou detekovány v oblasti životního prostředí a díky své lipofilní povaze mohou být akumulovány v různých tkáních živých organismů (Zacharis et al. 2012).

Různé národy stanovily maximální koncentraci reziduí pesticidů povolené v medu, avšak aby med byl bezpečný pro spotřebu, musí být bez jakýchkoliv biologických či chemických kontaminantů (Pinho et al. 2010).

### 3.4.2 Antibiotika

Kontaminace antibiotiky je velice diskutovaný problém, který může pro člověka znamenat zdravotní riziko. Antibiotika se ve včelařství používají již několik desítek let. Tetracykliny, nitrofurany a makrolidy včelaři používají v zemědělství proti chorobám rostlin a včelaři tyto antibiotika používají v boji proti včelím chorobám. Z tohoto důvodu se rezidua antibiotik mohou v medu nacházet. Rezidua často pocházejí z různých zdrojů prostředí, či nesprávných včelařských postupů (Kummerer 2009).

V některých zemích EU je používání antibiotik nezákonné a není povoleno prodávat med, který obsahuje rezidua antibiotik a např. ve státech jako Švýcarsko, Velká Británie či Belgie byly MLR stanoveny pro každou třídu antibiotik (Hammel et al. 2008). Jelikož se med využívá pro nutriční i léčebné účely tak monitorování reziduí antibiotik v medu pomáhá předcházet potenciálnímu riziku pro člověka (Chen et al. 2000).

### 3.4.3 Hydroxymethylfurfural

Hydroxymethylfurfural (5-HMF) je cyklický aldehyd a vzniká v procesu Maillardovy reakce v průběhu tepelného zpracování a dlouhodobém skladování medu (Tornuk et al. 2013). V čistém stavu je to bezbarvá, krystalická látka, která ovlivňuje chuť i vůni včelího medu. (Přidal 2005). Vzniká jako rozkladný produkt monosacharidů, zejména fruktózy za vyšších teplot a za přítomnosti kyselin (Přidal 2003).

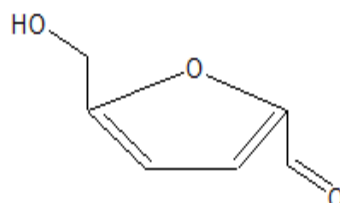
Tvoří se už během zrání v plástech za příznivých podmínek. HMF je důležitá chemická sloučenina, která slouží pro posouzení kvality a čerstvosti medu, kdy je HMF použit jako indikátor kvality. V medu jsou příznivé podmínky pro vznik HMF vzhledem k vysoké koncentraci sacharidů, nižší hodnota pH a přítomnost organických kyselin. V čerstvě vytočeném medu je obsažen v malém množství do 5 mg/kg a koncentrace se zvyšuje během skladování a když je med vystaven vyšší teplotě než 40 °C (Khalil et al. 2010).

Proces zahřívání přispívá k vytvoření nežádoucí karamelové chuti a ke snížení kvality medu. HMF je těkavý a toxický v závislosti na jeho koncentraci (Wang et al. 2009) a i když je považován za potenciální karcinogen, při denní dávce kolem 1 mg/kg tělesné hmotnosti se není třeba obávat zdravotního rizika (Kalábová et al. 2004)

V roce 2000 Codex Alimentarius zavedl limit, že obsah HMF v medu po zpracování nebo smíchání nesmí být vyšší než 80 mg/kg (Codex Alimentarius 2001), v tomto případě by byl

pozorován škodlivý efekt. Limitní hodnota pro obsah HMF je 40 mg/kg z důvodu nežádoucího tepelného ošetření, a každé zahřátí snižuje nutriční hodnotu medu (Kalábová et al. 2004)

Mezi metody pro stanovení HMF se řadí metoda HPLC a spektrofotometrické stanovení (Whiteova metoda). Metoda podle Winklera by se používat neměla, protože jedna z reagensů (p – toluidin) je karcinogenní (Bogdanov et al. 1997).



Obrázek 2: Strukturální vzorec hydroxymethylfurfuralu

## 3.5 Ostatní včelí produkty

### 3.5.1 Propolis

Propolis byl znám již ve starověku v Egyptě. Z počátku byl používán jako lepidlo a od té doby prošel mnoha teoriemi a výzkumy, jak propolis používat. Aristoteles označil propolis jako lék na modřiny a boláky, Řekové používali propolis jako hlavní složku parfému a staří Židé považovali propolis za lék. V současné medicíně je propolis používán jako antiseptikum, snižuje otoky, má uklidňující účinek na bolesti šlach a hojí rány. Je dostupný jako extrakt, v pastilkách, krémech nebo ve formě prášku (Bogdanov 2017).

Propolis je složen z rostlinných pryskyřic a výpotků které shromažďují včely. Chemické složení propolisu je různorodé a závisí na jeho botanickém a zeměpisném původu. Doposud bylo v propolisu identifikováno až 180 různých sloučenin, zejména polyfenolů (Dobrowolski et al. 1991). Obecně obsahuje minerály fenolové kyseliny či jejich estery, flavonoidy, terpeny, aromatické aldehydy a alkoholy, stilbeny a mastné kyseliny (Silva – Carvalho a kol. 2014). Dalšími sloučeninami v propolisu jsou aromatické kyseliny, vosky či těkavé oleje (Dobrowolski et al. 1991).

Propolis vykazuje mnoho účinků, které jsou přínosné pro zdraví člověka. Vykazuje antimikrobiální, hepatoprotektivní, imunostimulační a imunomodulační efekt. Antimikrobiální vlastnosti propolisu jsou dány především obsahem flavonoidů (pinocembrinu, pinobanksinu a galanginu). Řada těchto účinků poukazuje na důvody, proč se propolis používá při chronických a akutních zánětech dutiny ústní, při onemocněních horních a dolních dýchacích cest či při léčbě kožních vředů (Kosenko et al. 1990).

### 3.5.2 Mateří kašička

Včelí mateří kašička slouží primárně jako potrava pro včelí larvy, královny. Vylučují ji dělnice, které jsou staré 5-15 dní svými hltanovými žlázami (Bradbear 2009). Je to hustá, bílá

až nažloutlá tekutina, která má charakteristickou vůni. Obsahuje cukry, vodu, tuky, bílkoviny, vitamíny a minerální látky (Nagai & Inoue 2004). Využívá se v kosmetickém průmyslu, v lékárenství jako potravinářský doplněk a přidává se i do medu. Několik studií prokázalo, že mateří kašička má dezinfekční, protizánětlivé a vazodilatační účinky (Nagai et al. 2001).

### 3.5.3 Včelí jed

Včely používají žihadlo k obraně společenstva, při vlastním ohrožení a pro vytváření zásob. Z kádélka vajíček se u dělnic vyvinulo žihadlo a přibyla jedová žláza s váčkem, který obsahuje jed a tím se vyvinula i strategie obrany včelího společenství. Dělnice staré 2-3 týdny mají okolo 0,26 mg jedu. Včelí jed je bezbarvá kapalina, kyselé chuti a obsahuje biogenní aminy (histamin, dopamin, noradrenalin), polypeptidy (mellitin), který poškozuje erythrocyty a leukocyty, apamin působící na nervovou soustavu, enzymy (fosfolipázu, která způsobuje hemolýzu, hyaluronidázu) (Zeinrich 2003).

Složky jedu způsobují popraskání buněk a vylití mediátorů, které vyvolávají zánětlivý proces. Včelí jed má toxické účinky a působí také jako alergen. Působí baktericidně, neurotoicky a hemolyticky. Lokálně je účinný jako anestetikum, a snižuje krevní tlak. Pro člověka, který trpí alergií na včelí jed může být smrtelné i jedno žihadlo, u zdravého člověka je nebezpečná dávka 200-500 žihadel (Zeinrich 2003).

## 3.6 Falšování medu

Vysoká cena a omezená dostupnost medu způsobily zvýšený zájem o falšování medu (Puscas et al. 2013). Při falšování potravin dochází ke klamání spotřebitele za účelem zisku výrobce či prodejce. Med vyžaduje standardy a normy, které zajišťují jeho kvalitu a identitu (Codex Standard for Honey 2001).

Mezi nejčastější formy manipulace s medem patří přidání levných sladidel jako je řepný cukr či maltózový sirup. Dalším způsobem falšování je také záměna směsných a méně hodnotných medů za medy kvalitnější a dražší. Medová chuť se může falšovat i zahříváním roztoku monosacharidů s fenylalaninem, protože téměř všechny fenylactové estery mají medovou chuť. Proto je nezbytná znalost chemického složení medu za účelem identifikace kvality a bezpečnostního opatření pro spotřebitele (Puscas et al. 2013).

## 3.7 Metody analýzy medu

V praxi se uvádí řada metod pro kontrolu kvality potravin. Analýza medu se provádí za účelem ověření kvality či zjištění botanického a zeměpisného původu. Nejběžnějšími metodami je senzorická analýza, biologické a fyzikálně-chemické metody.

Pro stanovení obsahů prvků ve zkoumaném vzorku slouží především analytické metody. Jsou používány především pro vysokou citlivost, rychlost a vysokou selektivitu (Klouda 2016).

### 3.7.1 Příprava vzorků

Příprava vzorků je zásadním krokem celé analýzy a je téměř nezbytná. Přípravy vzorku jsou závislé na typu analyzovaného materiálu a na typu analytických metod. Pro přípravu a

čištění vzorků fenolických látek lze použít různé metody. Vzorky fenolických látek lze připravit homogenizací, kapalnou extrakcí, filtrací nebo centrifugací. Extrahovaná složka se v rozpouštědle rozpustí a získá se následným odpařením a výsledným produktem je extrakt vzorku, který je obohacený o všechny složky, které chceme zkoumat (Valentová 2012). Postupy však musí zajistit kvantitativní výtěžnost těchto látek, aby nedocházelo k chemickým změnám, či degradaci (Robards 2003). Teplota, pH či rozpouštědlo mohou mít významný vliv na druh a množství fenolických látek. Rozpouštědlo se volí v závislosti na typu požadovaných flavonoidů. Méně polární flavonoidy se extrahují chloroformem, dichlormethanem, dethyletherem či ethylacetátem, kdežto flavonoidní glykosidy a polární aglykony se extrahují alkoholy či směsí alkoholu a vody (Andersen & Markham 2006).

Řada autorů odborných publikací uvádí doposud nejvhodnější metodu volby extrakci na pevné fázi (SPE) (Soler et al. 1995). Je založena na principu navázání hledaných analytů na pevnou fázi (tuhý sorbent) (Pirad et al. 2007) a následné eluci analytů, od rušivé matrice vhodnými rozpouštědly (Petrus et al. 2011). Extrakce na pevné fázi se provádí pomocí komerčně dostupných SPE kolonek na jedno použití na bázi chemicky modifikovaných částic silikagelu (Klouda 2016). Výhodou této metody je jednoduchost, rychlost a nízká spotřeba rozpouštědel (Pulcini et al. 2006).

Extrakce vzorků z kapaliny do kapaliny (LLE) je jednou z nejběžnějších extrakčních a purifikačních technik. Spočívá v přechodu extrahované složky z jedné kapalné fáze do druhé. V případě rozpouštědla volíme vodu nebo vodný roztok a druhým roztokem je organické rozpouštědlo s vodou nemísitelné (Klouda 2016). LLE je využívána především pro stanovení pesticidů v medu. Tato metoda však vyžaduje velké množství rozpouštědla, je časově náročná a tak se jako alternativa využívá již zmiňovaná extrakce na pevnou fázi (Barker et al. 2000).

Dále si pro analýzu fenolických látek našly cestu i novější techniky přípravy vzorků jako jsou extrakce superkritickou tekutinou (SFE) extrakce tlakovou kapalinou (PLE) (Rissato et al. 2004) a mikroextrakce na pevné fázi (SPME) (Jiménez et al. 1998). Pro tyto metody je typické, že jsou snadněji automatizovány, snižuje se spotřeba rozpouštědla a doba analýzy, což má za následek vyšší výkon a minimalizuje se degradace sloučenin vzorku. (Pirad et al. 2007).

### **3.7.2 Senzorická analýza**

Senzorické vlastnosti medu jako je barva, vůně a chuť medu se liší v závislosti na květinovém zdroji, geografických a sezónních podmínkách. Senzorickou analýzu lze použít jako doplněk fyzikálně – chemických a pylových analýz. Provádí se za účelem ověření nepřítomnosti vad, bezpečnosti, posouzení kvality a jakosti, organoleptických vlastností medu a hodnocení preferencí spotřebitelů (Marcazzan et al. 2018). Senzorickou analýzou rozumíme hodnocení potravin bezprostředně našimi smysly. U vzorků medů se hodnotí vzhled, konzistence, barva, vůně a chuť (Ball 2007).

### **3.7.3 Moderní analytické metody**

#### **3.7.3.1 Hmotnostní spektrometrie**

Hmotnostní spektrometrie (MS) je moderní analytická metoda, která je často využívána ke kvantitativní a kvalitativní chemické analýze při minimální spotřebě vzorku (McLafferty & Tureček 1993). Poskytuje mnoho informací o vzorku a jeho složení (Klouda 2016)

Hmotnostní spektrometr je univerzální detektor, který dokáže dosáhnout velmi vysoké citlivosti a poskytuje informace o strukturních vlastnostech a především o molekulové hmotnosti měřených analytů. Skládá se z iontového zdroje, který umožňuje ionizaci – převádění neutrálních analytů na nabitě částice, analyzátoru hmotnosti, který rozděljuje ionty v plynné fázi ve vakuu podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) a z detektoru, který slouží k detekci příslušných iontů (Milata & Segla 2004).

V posledních letech byl zaznamenán velký pokrok v případě separačních a spektrálních technik, kdy se směs látek rozdělí separační metodou a následně se pomocí spektrální metody získají strukturní informace o jednotlivých sloučeninách (Holčapek 2001). Mezi nejčastější a nejvyužívanější metody založené na hmotnostní spektrometrii patří kapalinová a plynová chromatografie, dále pak ionizace laserem za přítomnosti matrice. Moderní metody hmotnostní spektrometrie jsou velmi vhodné pro analýzu malých organických molekul včetně fenolických látek (Watson & Sparkman 2007).

### 3.7.3.2 Chromatografie

Chromatografie je fyzikálně – chemická separační metoda, při které se složky vzorku rozdělují mezi dvě nemísitelné fáze. Je to především metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku. Vzorek je unášen pohyblivou mobilní fází přes nepohyblivou stacionární fázi a složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány a tím zdrženy. Metody chromatografie se rozdělují do určitých skupin podle několika hledisek a to dle skupenství mobilní fáze, podle uspořádání stacionární fáze a podle povahy děje, který převládá při separaci (Klouda 2016).

V dřívějších dobách patřily metody chromatografie na tenké vrstvě (TLC), papírová elektroforéza a polyamidová chromatografie mezi hlavní metody stanovení fenolických látek. Dnes se přechází k modernějším metodám chromatografie jako je kapalinová chromatografie či plynová chromatografie (Andersen & Markhem 2006).

Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) je velmi účinnou metodou pro analýzu přírodních produktů a lze s touto metodou separovat i netěkavé a tepelně nestabilní sloučeniny (Klouda 2016). Principem kapalinové chromatografie je separace složek mezi stacionární a mobilní fází, přičemž mobilní fáze je kapalina. Jako mobilní fáze se využívají organická rozpouštědla, deionizovaná voda či pufr (Lei et al. 2011). Čas, který stráví analyt v jedné nebo druhé fázi je závislý na jeho afinitě buď k mobilní nebo stacionární fázi. Podle uspořádání stacionární fáze se pak rozlišuje chromatografie na kolonovou, tenkovrstvou a papírovou. Samotná metoda se vyznačuje vysokou citlivostí a robustností a umožňuje tak analyzovat prakticky veškeré organické látky ve velkém rozpětí relativních molekulových hmotností (Klouda 2016).

V současné době je pro analýzu fenolických sloučenin hojně využívána vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC (Nollet 2004). HPLC je analytická separační metoda, která dosahuje vysoké účinnosti použitím stacionárních fází, obsahující částice malé velikosti a pravidelného tvaru, které homogenně vyplňují kolonu a průtok mobilní fáze je poháněn vysokým tlakem. Je vhodná pro separaci tepelně nestálých a netěkavých sloučenin. (Štulík

2004). V případě HPLC s hmotnostní spektrometrií je tato metoda velice účinným analytickým nástrojem pro hledání stopových prvků v řádech  $\mu\text{g-ng/kg}$  (Turnipseed et al. 2011; Hu et al. 2014).

Plynová chromatografie (GC) je vysoce účinná analytická metoda, kde se látky od sebe separují na základě vnesení vzorku mezi dvě nemísitelné fáze – stacionární a mobilní. Mobilní fází je u plynové chromatografie proud inertního plynu, který unáší vzorek přes stacionární fázi. Vzorek, který je transportován se musí ihned přeměnit na plyn a poté se v koloně látky separují na základě afinity na stacionární fázi. Pro přeměnu analytů v plyny můžeme separovat látky, které jsou tepelně stálé a mají relativní molekulovou hmotnost menší než 1000 (Klouda 2016). Plynová chromatografie (GC) se používá zejména pro separaci plyných látek, těkavých látek, tepelně stabilních kontaminantů, organokovových látek a pevných organických molekul (Hachenberg & Schmidt 1997). Ve spojení s hmotnostní spektrometrií bývala plynová chromatografie nejpoužívanější technikou pro analýzu pesticidů v potravinách (Farré et al. 2014).



## 4 Experimentální část

### 4.1 Stanovení profilu organických látek pomocí LC/MS

#### 4.1.1 Použitý materiál

K analýze bylo podrobena 10 vzorků medu. Vzorky pocházely z různých lokalit v rámci Českého lesa. Devět vzorků (1-9) medu bylo poskytnuto od stejného včelaře a jeden vzorek byl odlišný (10). Většina vzorků medu byla nektarového původu.

Vzorek č. 1 – Pila

Vzorek č. 2 – Sezemín

Vzorek č. 3 – Ranč

Vzorek č. 4 – Jindřichovka

Vzorek č. 5 – Bystřice

Vzorek č. 6 – Novosedly

Vzorek č. 7 - Valtířov

Vzorek č. 8 -Mýtnice

Vzorek č. 9 - Spálenec

Vzorek č. 10 - Čisovice

#### Chemikálie:

Methanol, čistota > 99,99%, HiPerSolv CHROMANORM pro LC-MS, VWR International, ČR

Acetonitril, čistota > 99,9%, Honeywell pro LC-MS, Německo

Deionizovaná voda, vodní purifikační jednotka Direct- Q 3 UV

Ethylacetát, čistota 99%, Fisher Scientific, USA

**Standardy** – PESTANAL, Sigma-Aldrich, USA

#### Deriváty kyseliny skořicové:

kávová k.

chlorogenová k.

ferulová k.

sinapová k.

*p* – kumarová k.

skořicová k. deuterovaná

skořicová k.

#### Deriváty kyseliny hydroxybenzoové:

gallová k.

salicylová k.

vanillová k.

syringová k.

3,4 – dihydroxybenzoová k.

4-hydroxybenzoová k.

3-hydroxybenzoová k.

4 - methoxybenzoová k.

3,4,5 – trimethoxybenzoová k.

#### Flavanony

naringenin

naringin

#### Flavanoly

epikatechin

katechin

#### Flavony

#### Flavonoly

luteolin  
luteolin – 7 - glukosid

kvercetin  
myricetin  
kemferol

#### Flavanonoly

taxifolin

#### **Vnitřní standard**

Thiacloprid – (thiazolidin ring – d4) > 98% (HPLC), Sigma – Aldrich, USA

#### **4.1.2 Použitá zařízení a pomůcky**

Automatická pipeta, 10 - 20 µl, Eppendorf, Německo  
Automatická pipeta, 100 - 1000 µl, Eppendorf, Německo  
Centrifuga, Rotanta 460 R, Hettich, Německo  
Kónické zkumavky určené pro centrifugy s víčky, 15 ml, VWR  
Kónické zkumavky určené pro centrifugy s víčky, 50 ml, VWR  
Kolonky, Waters OASIS HBL Cartridge, USA  
Předvážky Kern, EMB 600 – 2, 600/ 0,01 g  
Laboratorní váhy, XPR6UD5, Mettler Toledo, Švýcarsko  
Mikrozkumavky, 2 ml, Eppendorf, Německo  
SPE Vacuum Manifold, MilliporeSigma, USA  
Ultrazvuková lázeň, RA1680, Tesla ČR  
Vialky s víčky, 2 ml, Agilent technologies, CN  
Vysokorychlostní multitřepačka Vortex, RS – VF10, Phoenix Instruments, USA  
Zdroj vakua pro SPE  
Dusíkový koncentrátor, NDK200 – 2, Hang – Zhou Miu Instruments, Čína  
Membránová vakuová pupma KNF Neuberg, Německo (zdroj vakua pro SPE)

#### **Chromatografické kolony**

Acclaim TM RSLC, 120 C18, 120A, 2,2 µm, 120A, 100x2,1 mm, Thermo Fisher Scientific, USA

#### **4.1.3 Použitý software**

TasQ client 4.3, Bruker Daltonik GmbH, USA  
Compass DataAnalysis 5.2, Bruker Daltonik GmbH, USA  
Compass ootofControl 5.2, Bruker Daltonik GmbH, USA  
Compass HyStar 5.1, Bruker Daltonik GmbH, USA  
PesticideScreener 2.0, Bruker Daltonik GmbH, USA  
Statistica 12, Statsoft, USA

#### **4.1.4 Příprava vzorků**

Od každého vzorku medu bylo do kónických centrifugačních zkumavek naváženo na laboratorních předvážkách cca 1 g ve třech opakováních. Vzorky ve zkumavkách byly

rozmíchány s 10 ml deionizované vody. Aby došlo k dokonalému rozpuštění vzorků, byly několik minut třepány na vysokorychlostní třepačce vortex a poté na 1 min. vloženy do ultrazvukové lázně. Následně byly vzorky centrifugovány (20 °C, 4000 otáček, 15 min) a byly tak zbaveny pevných částic, aby nedocházelo k ucpávání SPE kolonek.

Po sestavení zařízení pro SPE extrakci byla každá kolonka promyta 5 ml methanolu a poté kondicionována 10 ml deionizované vody. Vzorky byly převedeny ze zkumavek do SPE kolonek. Některé vzorky obtížně protékaly přes sorbent a proto byly promývány pomocí sníženého tlaku připojením membránové vakuové pumpy k SPE zařízení. Po prosátí vzorků byly kolonky se sorbovanými analyty promyty 10 ml deionizované vody. Aby se minimalizovalo množství vody ve vzorku, byla následně v chodu ponechána vakuová pumpa a poté osušeny jehly kolonek. Pod kolonky byly umístěny čisté zkumavky, kam byly vzorky z kolonek vymyty nejprve 3 ml methanolu, poté 3 ml acetonitrilu a následně ještě 2 ml acetonitrilu. Obě frakce byly zachyceny do jedné centrifugační zkumavky. Směs promytých látek, acetonitrilu a methanolu byla vysušena při 40 °C na koncentrátoru proudem dusíku, aby vzorek neoxidoval. Vzorky byly uchovány v mrazničce při -18 °C. Před měřením byly vzorky rozpuštěny v 1 ml methanolu za pomoci vortexu a ultrazvukové lázně. Následně byly jednotlivě vzorky převedeny pomocí pipety do mikrozkušavek a vloženy do centrifugy (4 °C, 11500 otáček, 5 minut). Výsledný supernatant byl přepipetován do 1,5 ml vialek a ihned analyzován na LC-MS.

## 4.2 Analýza

Analytické šetření bylo provedeno pomocí systému UHPLC chromatografie ve spojení s hmotnostním analyzátozem (Q-TOF Impact II) s velmi vysokou přesností při stanovení molekulové hmotnosti pro hledané analyty.

Fenolické látky byly měřeny v pozitivním módu ionizace. Pro chromatografické rozdělení analytů byla použita gradientová eluce s mobilními fázemi 0.1% kys. mravenčí (fáze A) a 100% methanolem (fáze B) s průběhem: 0 min – 2% B, 2 min – 2%B, 15 min – 100% B, 20 min – 100% B, 21 min – 2% B, 26 min – 2% min. Separace probíhala na koloně C18 Acclaim (TM RSLC, 120, 2.2 μm, 120A, 100x2.1 mm, Thermo Fisher Scientific, USA) temperované na teplotu 35°C. Rychlost mobilní fáze byla nastavena na 250 μl/min. Nastříkovaný objem byl 5 μl a celková doba jedné analýzy byla 26 min.

Profilový screening přítomnosti pesticidů byl prováděn pomocí komerční standardizované metody PesticideScreener 2.0 poskytované firmou Bruker Daltonik včetně nastavení spektrometru a předepsaných parametrů chromatografické separace (kolona, mobilní fáze, gradient, nastavení teploty a průtoků apod.).

Analytická metoda vytvořená v programu otofControl definovala nastavení parametrů a kalibraci hmotnostního spektrometru. Parametry ionizace, kalibrace hmot a vlastní MS analýzy byly konfigurovány pomocí programu Compass otofControl (Bruker Daltonik). Nastavení datové sekvence a koordinace jednotlivých modulů (LC a MS) v rámci analýzy bylo provedeno programem HyStar 5.1 (Bruker Daltonik). Data byla předběžně zpracována a vyhodnocena pomocí software Compass DataAnalysis 5.2 (Bruker Daltonik).

Sekvence měření 10 vzorků pro určení přesného obsahu fenolických látek v medech byla provedena na třech opakováních. Tyto série byly vždy odděleny jednou analýzou čistého

rozpouštědla (solvent blank), aby bylo zabráněno případné kontaminaci mezi jednotlivými vzorky medu. Vždy po 10-ti nástřicích byl měřen kontrolní vzorek kontroly kvality vzorků (QC) připravený kombinací stejných objemů (30  $\mu$ L) všech analyzovaných vzorků. Na počátku a na konci sekvence byl navíc měřen vzorek kontroly kvality standardů (směs standardů o koncentraci 100 ng/mL v solventu) pro kontrolu stability systému. Pro tuto sekvenci byla použita osmibodová kalibrační řada roztoků o koncentracích 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300 a 500 ng/ml. Pro kvalitativní stanovení fenolických látek byly použity příslušné standady o koncentraci 500 ng/mL.

Všechny výstupy z měření byly zpracovány jako hrubá data v programu DataAnalysis, kde byly pro spolehlivou identifikaci porovnány retenční časy a spektra s komerčně dostupnými standardy. Kvantifikace a metodické vyhodnocení bylo provedeno v programu TasQ 4.3 (Bruker Daltonik).

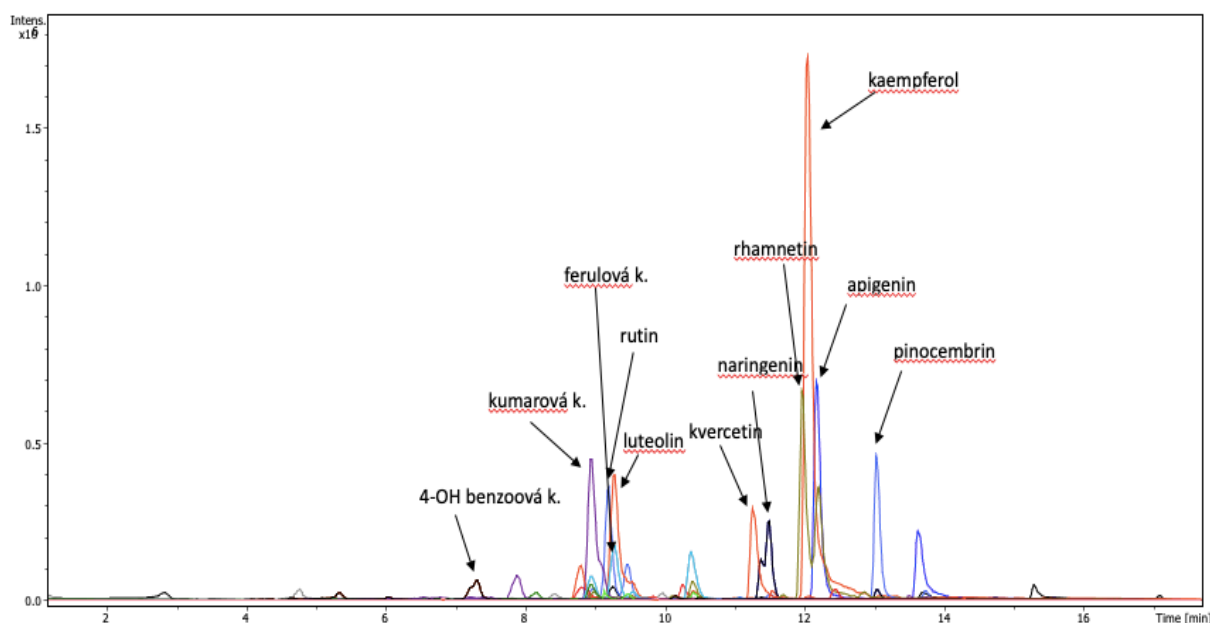
#### **4.2.1 Statistická analýza**

Pro observační statistické srovnání jednotlivých vzorků medů byly použity vícerozměrné statistické metody. Pro základní přehled podobnosti či odlišnosti vzorků medů a pro zhodnocení míry vlivu jednotlivých sledovaných látek na tyto rozdíly byla použita analýza hlavních komponent (PCA). Podobnosti ve složení medů a jejich zařazení do skupin s podobným zastoupením měřených látek byly vyjádřeny ještě pomocí klastrové analýzy, kde jeho shlukovací algoritmus byla použita Wardova metoda a euklidovské vzdálenosti pro vyjádření síly podobnosti. V obou analýzách byly použity jako proměnné velikosti ploch píků z důvodu zařazení látek stanovených pouze kvalitativně. Výpočet kalibračních závislostí a spolehlivosti jejich proložení byla použita metoda lineární regrese. Uvedené analýzy byly provedeny pomocí software Statistica 12.0.

## 5 Výsledky

### 5.1 Výsledky analýzy fenolových látek v medu

Výstupy analýzy fenolových látek, které byly analyzované LC-MS Q-TOF s vysokým rozlišením byly vyhodnocovány v programu Compass Data Analysis 5.2 (Bruker, Daltonik). Obrázek č. 1 představuje typický LC-MS výstup a ilustruje extrahovaný iontový chromatogram s vybranými píky m/z hodnot nejsilněji zastoupených látek. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 1., kde je uvedené průměrné množství látek ve vzorku se směrodatnými odchylkami.



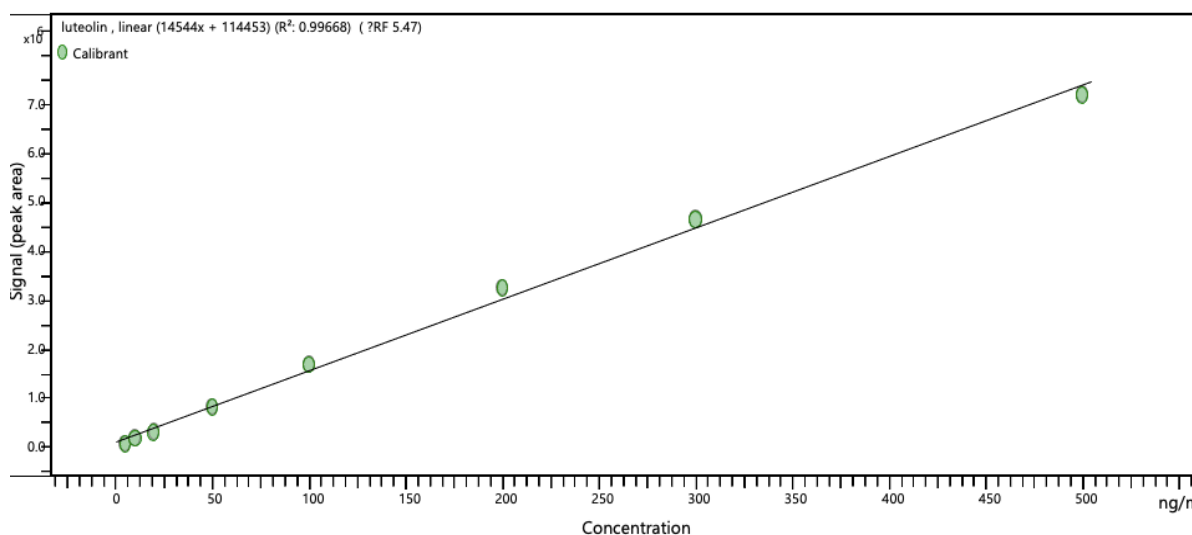
Obrázek 3: Chromatogram extrahovaných m/z hodnot iontů vybraných stanovovaných fenolických látek v reprezentativním vzorku (vzorek č.3)

[ng/g]	1. Píla	2. Sezemín	3. Ranč	4. Jindřichovka	5. Bystřice	6. Novosedly	7. Valtřov	8. Mýtnice	9. Spálenec	10. Čisovice
<u>Eriodictyol</u>	4,81 ± 1,48	2,80 ± 0,14	3,90 ± 0,57	3,54 ± 0,98	8,94 ± 1,29	3,13 ± 0,27	3,84 ± 0,48	3,60 ± 0,59	4,54 ± 0,21	3,10 ± 0,00
<u>Chlorogenová k.</u>	36,93 ± 7,35	9,35 ± 4,11	33,47 ± 2,50	34,64 ± 3,49	10,57 ± 4,90	41,69 ± 5,69	22,05 ± 1,96	49,73 ± 4,48	72,73 ± 5,68	<u>0.a.</u>
<u>Kaempferol</u>	76,82 ± 13,13	797,90 ± 94,93	361,70 ± 33,81	283,03 ± 78,64	152,10 ± 30,41	280,10 ± 4,68	639,25 ± 56,89	332,58 ± 47,92	321,33 ± 38,77	99,03 ± 11,48
<u>Kvercetin</u>	12,12 ± 1,40	236,05 ± 50,63	56,21 ± 13,73	71,05 ± 35,56	33,66 ± 14,84	65,55 ± 17,19	165,88 ± 39,24	58,48 ± 19,00	66,23 ± 16,69	31,21 ± 10,50
<u>Luteolin</u>	7,98 ± 0,77	5,98 ± 0,65	10,45 ± 1,37	13,33 ± 3,04	5,16 ± 0,87	13,76 ± 0,15	8,97 ± 0,64	16,12 ± 2,05	21,35 ± 1,64	7,48 ± 0,86
<u>Luteolin-glukosid</u>	29,76 ± 2,14	5,71 ± 0,64	15,76 ± 2,43	11,47 ± 1,93	20,53 ± 3,73	12,38 ± 1,46	9,48 ± 0,95	13,86 ± 0,79	12,16 ± 0,58	5,37 ± 0,44
<u>Naringenin</u>	22,68 ± 2,16	31,82 ± 6,32	39,61 ± 6,06	35,52 ± 8,18	21,62 ± 4,88	35,00 ± 0,89	38,81 ± 7,94	42,83 ± 1,91	52,13 ± 1,81	5,79 ± 0,78
<u>Pinobanksin</u>	62,86 ± 10,52	104,24 ± 10,00	64,18 ± 5,83	42,21 ± 5,28	72,20 ± 12,49	45,56 ± 2,47	83,17 ± 7,07	49,89 ± 4,67	42,77 ± 1,79	119,71 ± 21,76
<u>Pinocembrin</u>	162,52 ± 18,30	188,81 ± 21,82	159,02 ± 11,22	118,80 ± 16,38	177,75 ± 28,21	123,09 ± 5,77	186,91 ± 19,54	144,50 ± 14,41	109,57 ± 4,40	321,49 ± 35,01
<u>Rutin</u>	0,63 ± 0,00	1,72 ± 0,00	15,80 ± 1,97	2,31 ± 0,00	10,14 ± 9,02	21,50 ± 0,00	10,93 ± 0,34	8,53 ± 1,20	14,29 ± 1,39	3,65 ± 0,00
<u>Sinapová k.</u>	<u>0.c.</u>	9,35 ± 0,00	<u>0.c.</u>	5,59 ± 2,24	<u>0.c.</u>	7,18 ± 2,36	13,40 ± 0,00	7,56 ± 0,98	3,42 ± 1,70	<u>0.c.</u>
<u>Skořicová k.</u>	2,65 ± 0,00	2,02 ± 0,00	1,64 ± 0,00	2,49 ± 1,74	5,02 ± 0,14	1,83 ± 1,49	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	3,09 ± 0,87	8,35 ± 0,00
<u>Syringová k.</u>	6,45 ± 0,34	41,95 ± 4,51	11,19 ± 0,54	10,44 ± 1,74	11,99 ± 0,99	12,59 ± 0,99	24,13 ± 1,30	14,88 ± 1,03	10,86 ± 0,78	2,01 ± 1,49
<u>Taxifolin</u>	6,75 ± 0,00	<u>0.c.</u>	<u>0.c.</u>	<u>0.c.</u>	<u>0.a.</u>	<u>0.c.</u>	<u>0.c.</u>	<u>0.c.</u>	<u>0.c.</u>	0,05 ± 0,00
<u>Vitexin</u>	<u>0.c.</u>	<u>0.c.</u>	<u>0.c.</u>	<u>0.c.</u>	<u>0.c.</u>	<u>0.c.</u>	<u>0.a.</u>	<u>0.c.</u>	<u>0.a.</u>	<u>0.a.</u>

Tabulka 1: Průměrné hodnoty jednotlivých fenolových sloučenin v medech

- n.c. zkratka, která představuje látku, která nebyla detekovaná
- n.a. (not applicable/available) zkratka, která představuje látku, která ve vzorku byla ve stopovém množství, je přítomná a detekovaná ale není kvantifikovaná
- pod průměrem obsahu látek je uvedena směrodatná odchylka

Z fenolových sloučenin v jednotlivých vzorcích medu se nám podařilo kvantifikovat v určitém měřitelném množství eriodiocytole, chlorogenovou k., kaempferol, kvercetin, luteolin, luteolin-glukosid, naringenin, pinobaksin, pinocembrin, rutin, sinapovou k., skořicovou k., syringovou k., a taxifolin. Typický průběh kalibrační přímky je uveden na obrázku č. 4.



Obrázek 4: Průběh kalibrační přímky

Pro flavanon eriodiocytole můžeme pozorovat zastoupení ve všech analyzovaných vzorcích medu. Nejvyšší zastoupení erydiocytole je ve vzorku č. 5 (lokalita Bystřice). V ostatních vzorcích (1,3,4,6,7,8,9,10) obsahuje průměrně stejné množství a nejmenší množství bylo naměřeno ve vzorku č. 2 (lokalita Sezemín)

Chlorogenová kyselina nebyla detekována ve vzorku č.10 (lokalita Čisovice) oproti tomu bylo nejvyšší množství naměřeno ve vzorku č. 9 (lokalita Spálenec). Dále bylo vyšší množství látky naměřeno u vzorku č. 8 z lokality Mýtnice a u vzorku č. 6. z lokality Novosedly Nejmenší množství můžeme pozorovat u vzorku č. 2 (lokalita Sezemín) a č. 5 (lokalita Bystřice) a nižší množství chlorogenové kyseliny také u vzorku č. 7 (lokalita Valtířov). Ve vzorcích č. (1,3,4) bylo množství chlorogenové kyseliny podobné.

Flavonol kaempferol byl nejvíce obsažen ve vzorku č. 2 (lokalita Sezemín) a č. 7 (lokalita Valtířov), nejmenší množství bylo zaznamenáno ve vzorku č. 1 (lokalita Pila) a č.10 (lokalita Čisovice). Nižší obsah může pozorovat také u vzorků č. 5 (lokalita Bystřice) a č. 6 (lokalita Novosedly). Výrazně vyšší množství bylo neměřeno také u vzorků č. (3,8,9)

Obdobně jakou u kaempferolu, můžeme pozorovat nejvyšší naměřené množství flavonolu kvercetinu u vzorku č. 2 (lokalita Sezemín) a č. 7 (lokalita Valtířov). Vyšší množství je obsaženo také ve vzorcích č. (4, 9,6, ,8 a 3) Nižší množství pak můžeme pozorovat u vzorku č. 5 a č. 10 a nejnižší naměřený obsah kvercetinu je ve vzorku č. 1 (lokalita Pila).

Flavon luteolin byl oproti předešlým vzorkům obsažen v medech v poměrně menším množství. Nejvyšší obsah byl naměřen u vzorku č. 9 (lokalita Spálenec), nejmenší pak u vzorku č. 5 (lokalita Bystřice) a č. 2 (lokalita Sezemín). Nižší obsah můžeme pozorovat také u vzorků č. (10, 1 a 7) a naopak vyšší množství je obsaženo u vzorků č. (3,4,6 a 8).

Obsah luteolin-glukosidu byl v nejvyšším množství zaznamenán u vzorku č. 1, lokalita Pila a výrazně vyšší množství bylo obsaženo také ve vzorku č. 5 (lokalita Bystřice). Vyšší množství můžeme pozorovat i u vzorků č. (3,8,6 a 9) a nejnižší obsah luteolin – glukosidu byl zaznamenán ve vzorcích č. 2 (lokalita Spálenec) a č. 10 (lokalita Čisovice).

Flavanon naringenin je obsažen v nejvyšším množství ve vzorku č. 9 (lokalita Spálenec) naopak v nejnižším množství lze naringenin pozorovat ve vzorku č. 10 (lokalita Čisovice). V ostatních vzorcích můžeme sledovat obdobné hodnoty naringenin.

Nejvyšší množství antioxidačního bioflavonoidu pinobanksinu můžeme pozorovat ve vzorcích č. 10 (lokalita Čisovice) a č. 2 (Sezemín). Vyšší obsah pinobanksinu obsahují vzorky č. (7, 5, 3 a 1) a v ostatních zbylých vzorcích mezi (4,9,8,6) se pinobanksin nachází v poměrně stejném o trochu nižším množství než v předešlých vzorcích.

Flavanon pinocembrin je ze všech stanovených fenolických látek obsažen ve vzorcích v nejvyšším množství. Rozdílný a nejvyšší obsah můžeme pozorovat u vzorku č. 10 (lokalita Čisovice) a nejmenší obsah u vzorků č. 9 (lokalita Spálenec) a č. 4 (lokalita Jindřichovka). V ostatních zbylých vzorcích se pinocembrin nachází zhruba ve stejném, vyšším množství.

Obsah glykosidu rutinu se ve vzorcích pohybuje v menším množství. Nejvíce naměřené množství rutinu je ve vzorku č. 6 (lokalita Novosedly) dále pak ve vzorku č. 3 (lokalita Ranč) a č.9 (lokalita Spálenec). Nejmenší obsah je stanoven ve vzorku č. 1 (lokalita Pila) a ve vzorcích č. (2, 4 a 10). V nižším množství můžeme rutin pozorovat i v ostatních zbylých vzorcích.

Sinapová kyselina nebyla detekována ve vzorcích č. (1, 3, 5 a 10). Nejvyšší obsah této kyseliny byl naměřen ve vzorku č. 7 (lokalita Valtířov). Ve vyšším množství byla sinapová kyselina obsažena také ve vzorcích č. (2, 6 a 9) a nižší obsah můžeme pozorovat u vzorku č. 4 (lokalita Jindřichovka) a 9 (lokalita Spálenec)

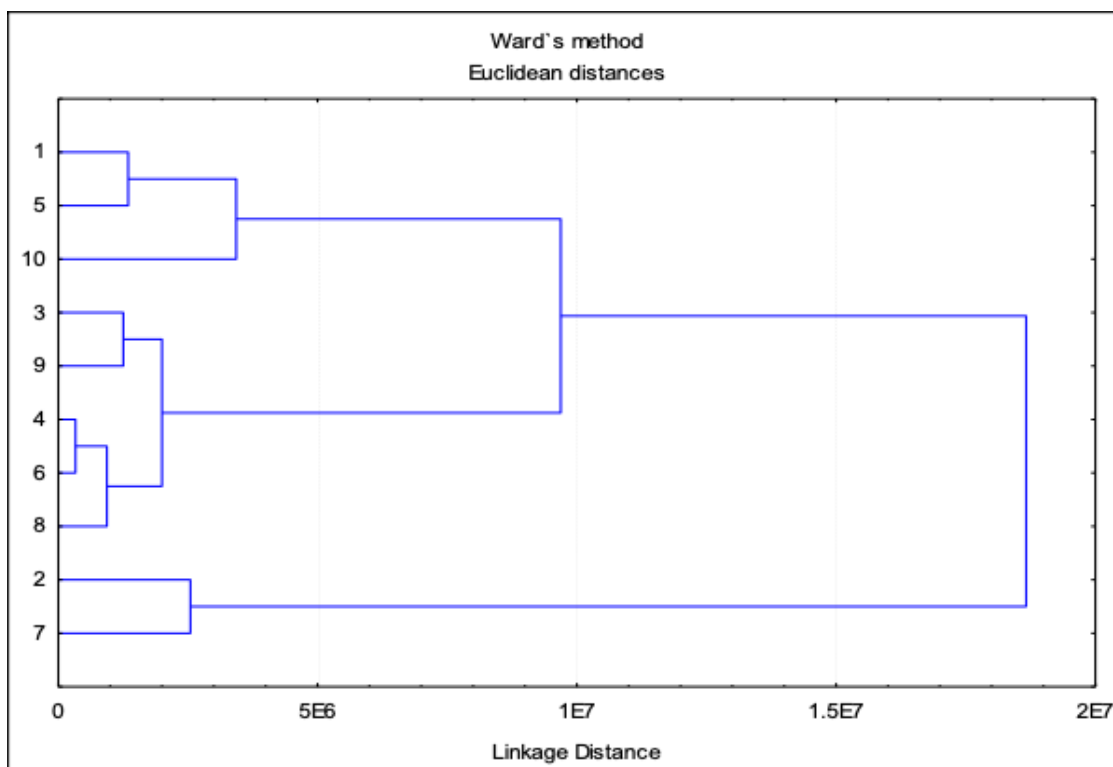
Skořicová kyselina byla naměřena ve všech vzorcích. Obsažena je ve vzorcích mezi v malém množství např. oproti pinocembrinu. Nejvyšší obsah skořicové kyseliny je ve vzorku č. 10 (lokalita Čisovice), dále pak ve vyšším množství ve vzorku č. 5 (lokalita Bystřice) a nejnižší obsah skořicové kyseliny byl naměřen ve vzorku č. 6 (lokalita Novosedly). V ostatních zbylých vzorcích byl naměřen podobný průměrný obsah skořicové kyseliny.

Syringová kyselina byla také obsažena ve všech vzorcích mezi. Nejmenší obsah syringové kyseliny byl naměřen ve vzorku č. 10 (lokalita Čisovice), dále pak ve vzorku č. 1 (lokalita Pila). Nejvyšší naměřené množství této kyseliny můžeme pozorovat u vzorku č. 2 (lokalita Sezemín). Vyšší hodnotu syringové kyseliny můžeme pozorovat u vzorku č. 7 (lokalita Valtířov) a v menším množství oproti naměřenému nejvyššímu je obsaženo ve zbylých vzorcích.

Obsah flavanonolu taxifolinu byl naměřen pouze ve vzorcích č. 1 (lokalita Pila) a ve vzorku č. 10 (lokalita Čisovice). V jednom vzorku č. 5 (lokalita Bystřice) byl taxifolin detekován, ale nekvantifikován a v ostatních vzorcích nebyl detekován vůbec.

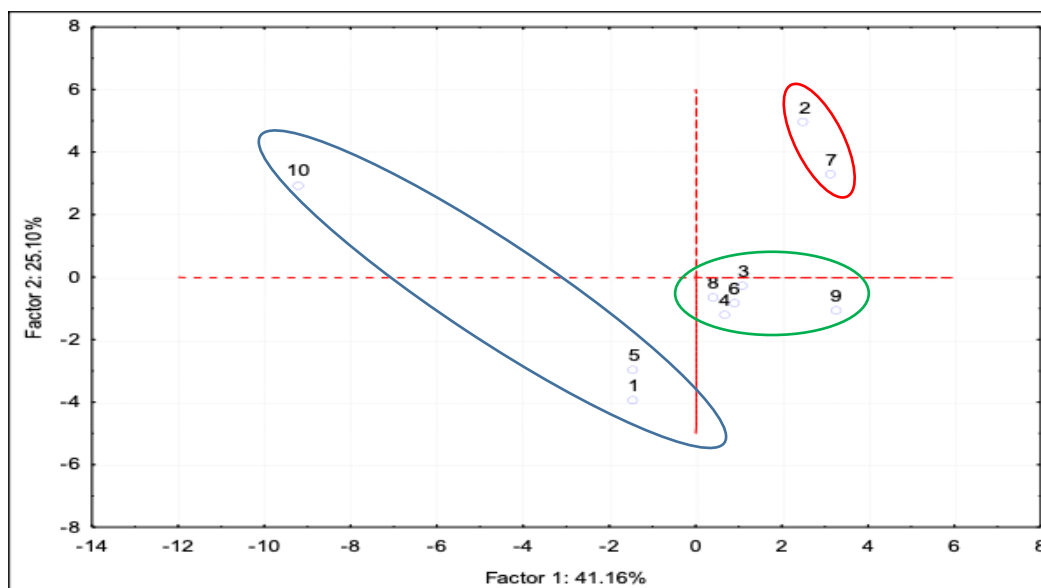
Pouze ve vzorcích č. (7, 9, 10) byl vitexin obsažen ve stopovém množství, ale nebyl kvantifikován. V ostatních vzorcích můžeme pozorovat, že vitexin nebyl detekován.





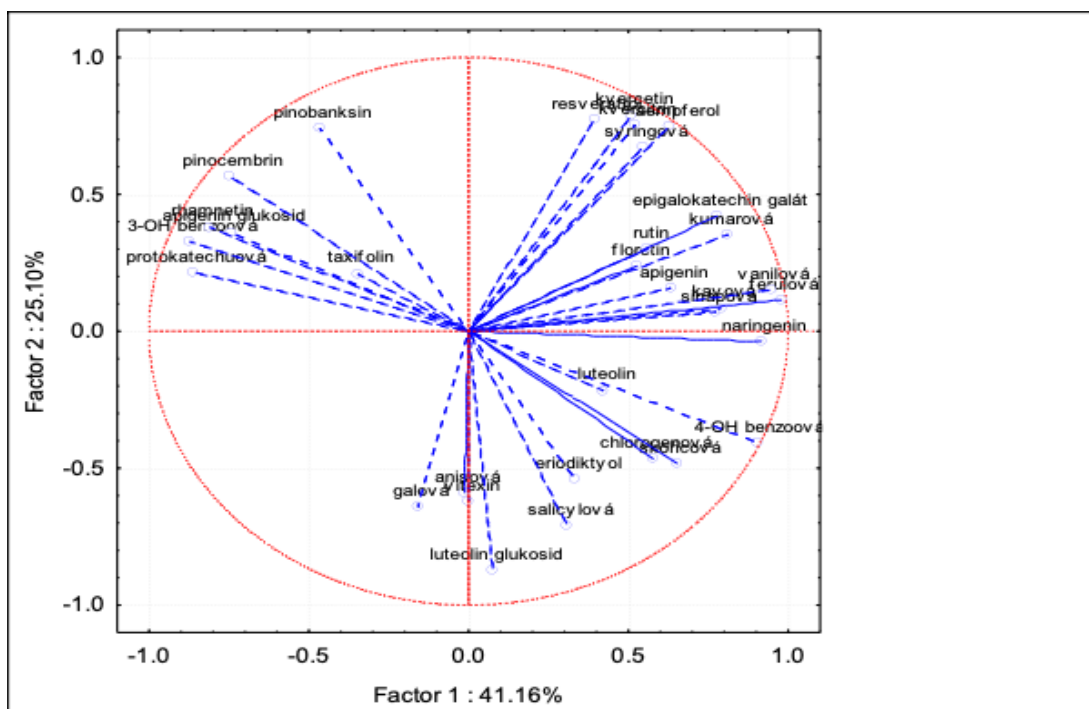
Obrázek 5: klastrová analýza vzorků shlukovaná na základě zastoupení vybraných proměnných. Čísla odpovídající číslu lokality v tabulce č.1

Na obrázku č. 5 jsou uvedeny výstupy klastrové analýzy vzorků, která je shlukovaná na základě zastoupení vybraných proměnných (obsahové látky), které byly ve vzorcích identifikovány. Jako shlukovací algoritmus byla použita Wardova metoda s euklidovskými vzdálenostmi. Tato analýza prezentuje, že se vzorky shlukované na základě vybraných fenolických látek rozdělily do tří odlišných skupin. Horizontální osa nám vyjadřuje odlišnost a vzdálenost mezi vzorky. Čím větší je vzdálenost, tím více se shluky odlišují, naopak je tomu u shluků, které jsou propojeny blízko sebe, to naznačuje podobnost vzorků. První skupina obsahuje vzorky č.1 (lokalita Pila), č.5 (lokalita Bystřice), č.10 (lokalita Čisovice). Druhá skupina obsahuje největší zastoupení vzorků, č. 3,4,6,8,9 a třetí skupina obsahuje poslední dva vzorky č.2 (lokalita Sezemín) a č. 7 (lokalita Valtířov).



Obrázek 6: diagram komponentního skóre vybraných proměnných, PC1 a PC2 s vyznačenými skupinami podle podobnosti složení. Čísla odpovídající číslu lokality v tabulce č. 1.

Obrázek č. 6 znázorňuje rozptylový diagram komponentního skóre vybraných proměnných pro první dvě komponenty. Prezentuje shlukování vzorků medů podle obsažených fenolických látek, kdy nejvzdálenější vzorky můžeme považovat za nejvíce odlišné. Mezi nejvzdálenější vzorky od počátku řadíme vzorky č. 10 (lokalita Čisovice) č. 2 (lokalita Sezemín) a č. 7 (lokalita Valtířov). Mezi vzdálené vzorky se také řadí vzorky č. 5 a č. 1. Naopak podobné a blízké jsou vzorky č. (3,4,6,8) a také o trochu vzálenější vzorek č. 9 (lokalita Spálenec). Rozdělení vzorků do shluků a jejich blízkost dobře korespondují s výstupem klasrové analýzy (obr. č. 6). Tento diagram doplňuje graf komponentních vah (PC1 a PC2) na kterém můžeme pozorovat jednotlivé rozmístění fenolických látek. Graf je zobrazen na obrázku č. 7.



Obrázek 7: Graf komponentních vah PC1 a PC2

Graf komponentních vah PC 1 a PC 2, který je na obrázku č. 7, ilustruje vztahy mezi jednotlivými fenolickými sloučeninami a jejich příspěvek k celkovým rozdílům mezi vzorky obsahuje rozmístění vzorků dle fenolických sloučenin. Z grafu můžeme pozorovat závislosti a podobnosti mezi znaky. V případě malé vzdálenosti jde o silnou korelaci - v našem případě jde o fenolické látky naringenin, luteolin, vanilová ferulová k. Opačným směrem se shlukovaly vzorky s obsahem pinobanksinu či pinocembrinu, eriodictolu, salicylové k., chlorogenové k. a pinocembrinu.

## 5.2 Výsledky analýzy pesticidů

Ve screeningu pesticidů bylo celkem 136 pozitivních záchytů různých pesticidů v 10 vzorcích medu. Nejvyšší počet (17) záchytů různých druhů pesticidů byl zaznamenán ve vzorku č. 7. Nejmenší počet záchytů (11), obsahoval vzorek č. 10. V jednom vzorku (č. 9) bylo zaznamenáno 16 záchytů. Dále pak obsah (15) záchytů pesticidů byl ve dvou vzorcích č. 2 a č. 4. Ve vzorku č. 6 bylo zaznamenáno (14) záchytů různých pesticidů a v jednom vzorku č. 8 bylo záchytů zaznamenáno 13. Zbylé tři vzorky č. 1, 3 a 5 obsahují 12 záchytů pesticidů. Na základě těchto výstupů byly vytvořeny tři kategorie, kdy počtem křížků je vyjádřena intenzita odezvy (plocha píků) vůči nejintenzivnějšímu naměřenému pro každou látku. Následující vyhodnocení (+) - nejnižší naměřená hodnota až 1/3 největšího píku, (++) - 1/3 - 2/3 největšího, (+++) – maximální zaměřená hodnota. Kompletní vyhodnocení screeningu reziduí 23 vzorků pesticidů uvádí tabulka č. 2. V této práci byly tyto pesticidy pouze identifikovány, protože pro jejich kvantifikaci jsme neměli k dispozici standardy.

Číslo vzorku	Lokalita	Ferimzon	Flusilazol	Triazamát	Atrazin (2-hydroxy)	Fensulfotion sulfon	Demeton-s	Icaridin	Hexazinon	Dicrotophos	Pirimicarb	Ethirimol	Aminocarb	Thiometon	Metazachlor	Methomyl	Famoxadon	Thiazopyr	Metaxyl	Fensulfotion sulfon	Butocaboxim	Fluxapyroxad	Thidiazuron	Pyriminobac-methyl
1	Pila	+	+++	+	+++			++	++		+++		+++	++	+++		+++		+					
2	Sezemín		+	+	+	++	+	+	+	+++	++	+++	+	++	+		+			++				
3	Ranč		++	+	++		+++	++	+		+++		+	++			++		+		+			
4	Jindřichovka		+	+++	+	+		+	+		+++		+	++	+	++	+		++	+	+++			
5	Bystřice		+	++	+			++	+++		+		+++	+	+	++	+++	++						
6	Novosedly		+	+++	++	+		++	+		+++		++	++	++	++	+++		++	+				
7	Valtířov		+	++	+	++	+	++	+	++	+++	+	+	++		+++	+		+	++	+++			
8	Mýtnice		+	++	+			+++	+		+++		++	+	+	+++	+		++		++			
9	Spálenec		+	+	+		++	++	+		+++		+	++	+	++	+	+++	+		+++	+++		
10	Čisovice	+++	+	+	+			+++	+		+		+						+++				+++	+++

Tabulka 2: Předběžně detekovaná rezidua pesticidů

## 6 Diskuze

Obsah fenolických sloučenin v medu je jednoznačně ovlivněn rostlinným a zeměpisným původem a také klimatickými podmínkami (Pyrzyska & Biesaga 2009). V této práci byla provedena analýza fenolických látek na základě hypotézy, že různé druhy medů stejného regionálního původu by měly obsahovat podobné zastoupení fenolických látek. Analýza byla provedena u devíti vzorků medu stejného regionálního původu a jednoho vzorku medu, který byl odlišný. U těchto devíti vzorků, stejného regionálního původu, které jsme měli k dispozici nebyl určen jejich rostlinný původ. Tyto vzorky pocházely z CHKO Český les. Pouze vzorek č. 10 z jiného regionu (lokalita Čisovice) byl určen jako lipový.

Medy rozdělujeme podle původu na medovicový (lesní) a květový (nektarový) (Vesna et al. 2019). Medovicový med vytváří včely z medovice a je obecně tmavý. Pochází zejména z jehličnanů (jedle, borovice, smrk) dále pak z listnatých stromů (dub, kaštan, bříza, vrba a lípa). Květový med vzniká z nektaru sbíraného včelami.

Vzhledem k tomu, že med je přírodní směs, která obsahuje velké množství sloučenin, je velmi obtížné provést diferenciaci a klasifikaci na základě porovnání fenolových sloučenin. Proto se v této práci snažíme pouze přiblížit o jaký druh medu by se mohlo jednat na základě jeho fenolického složení. V naší práci jsme z dostupných standardů fenolických látek kvantifikovali eriodicytol, chlorogenovou k., kaempferol, kvercetin, luteolin, luteolin-glukosid, naringenin, pinobanksin, pinocembrin, rutin, sinapovou k., skořicovou k., syringovou k. a taxifolin. Ostatní fenolické látky, které můžeme vidět v grafu komponentních vah z programu ProfileAnalysis z programu ProfileAnalysis byly identifikovány za základě předběžného určení bez použití standardů.

Vzorek medu č. 10 (lokalita Čisovice) je lipového původu. Obsahoval téměř všechny kvantifikované fenolické látky, kromě sinapové kyseliny. Nejvíce zastoupenou látkou v tomto vzorku byl pinocembrin. Zajímavá podobnost byla podle klastrové analýzy vybraných proměnných u vzorků č. 1 (lokalita Píla) a č. 5 (lokalita Bystřice) se vzorkem č. 10 (lokalita Čisovice), ovšem v zastoupeném množství fenolických látek dle rozptylového diagramu vzorků č. 1,5 a č. 10 se podobnost výrazně lišila. Podobnost zastoupeného množství fenolických látek můžeme pozorovat pouze u vzorků č. 1 a č. 5, což může částečně u těchto dvou vzorků stejného regionálního původu potvrzovat hypotézu, že by se stanovený profil fenolických látek neměl výrazně lišit. Oba tyto vzorky mají vyšší zastoupení pinocembrinu, kaempferolu a pinobanksinu. Z tohoto zastoupení bychom mohli usuzovat, že medy jsou spíše nektarového původu, ovšem ze široké škály obsahu dalších fenolických látek je to spíše diskutabilní.

Další vzdálenější vzorky byly č.2 (lokalita Sezemín) a č. 7 (lokalita Valtířov). U těchto vzorků můžeme pozorovat dle klastrové analýzy značnou podobnost. Graf komponentních vah nám poukazuje na zastoupení resveratrolu, kaempferolu, syringové k. a také kvercetinu. V zastoupení fenolických látek se liší v obsahu kaempferolu, který je ale zastoupen v obou vzorcích nejvíce, kvercetinu, pinobanksinu, rutinu a syringové kyseliny. U těchto vzorků bychom se mohli přiklánět spíše k směsnému medu, či nektarovému medu ovšem toto tvrzení je nejednoznačné.

Ostatní vzorky č. 3, 4, 6, 8 a 9 bychom mohli z hlediska grafu komponentních vah atedy obsahu naringeninu, eriodicytolu a luteolinu zařadit mezi medy nektarového původu. Tato

skutečnost poukazuje i na fakt, že dle výsledků průměrného zastoupení fenolických látek (tabulka č.1) obsahují tyto vzorky vysoké zastoupení kvercetinu, který je považován za slibný marker slunečnicových medů a vysoký obsah kvercetinu nalezneme také u medů řepkových (Tomás-Barberán et al. 2001).

Stanovená hypotéza, že by se různé druhy medů stejného regionálního původu neměly výrazně lišit byla potvrzena. Vzorky č. 1-9 byly v celku homogenní v porovnání s referenčním vzorkem č. 10 (lokalita Čisovice) a rozdíly ve vzorcích 1-9 z CHKO Český les v obsahu fenolických látek nebyly tak výrazné. Odlišnost obsahu přírodních látek může být ovlivněna řadou faktorů, jako je geografická lokace, doba sběru a značný vliv může mít také technologické zpracování (Al-Mamary et al. 2002). Případ této diplomové práce, kdy jsme neznali u vzorků č. 1-9 botanický původ a tudíž určení druhů medů bylo téměř nemožné, jelikož některé fenolické látky byly zavádějící, nás může vést k myšlence, že další vědecké výzkumy podle profilů fenolických látek mohou vést v budoucnosti ke stanovení fenolických látek jako indikátorů botanického původu (Alvarez-Suarez et al. 2013). Na základě těchto indikátorů by se mohly vzorky s neznámým botanickým původem snadněji určovat.

Screening pesticidů poukázal na pozitivní záchyt 136 různých pesticidů. Pesticidy jsou hojně využívány a mají zásadní vliv v moderním zemědělství. Různé druhy zemědělských plodin vyžadují také rozdílné spektrum a množství pesticidů. V této práci můžeme pozorovat, zastoupení Triazamátu, Aminocarbu, Pirimicarbu a Icaridinu ve všech vzorcích s poměrně velkou intenzitou těchto pesticidů. Ve všech vzorcích se prokázala také přítomnost Flusilazolu, Atrazinu a Hexazinonu, ovšem tyto pesticidy neměly tak značnou intenzitu.

Triazamát je insekticid, který se používá na hrách, cukrovou řepu, jablka a růžičkovou kapustu (Hetmanski et al. 2004). Obsažen byl nejvíce ve vzorku č. 4 (lokalita Jinřichovka) a č. 6 (lokalita). Vzhledem k obsahu fenolických látek, by nám tento obsah Triazamátu mohl poukazovat na to, že med je nektarového původu a zmíněná lokalita zřejmě leží v blízkosti drobného venkovského osídlení s obdělávanou zahradní plochou.

Aminocarb je insekticid, který se využívá k ochraně polí s obilím a lesů před napadením hmyzem (Dikshith 2010). Tento pesticid se objevil ve vysoké intenzitě ve vzorcích č. 1 a 5, což by mohlo poukazovat jak na původ medovicového, tak na původ nektarového medu.

Pirimicarb je využívaný pesticid k hubení mšic na obilí, ovoci a zelenině (Hardt et al. 1999) a jeho vysoká intenzita zastoupení poukázala na vzorky č.1, 3, 4, 6, 8, 9, které v obsahu fenolických látek poukazují také spíše na med nektarového původu.

Při identifikaci pesticidů bychom předpokládali, že vzorky 1-9 nebudou mít takovou četnost pozitivních záchytů pesticidů, protože se nacházejí v CHKO, ale můžeme poukázat na fakt, že včely sbírají nektar ze stovek různých zdrojů a také neznáme přesné místo, kde a u jakého zdroje se úly nacházejí.

Překvapivý je výsledek u vzorku č. 10 (lokalita Čisovice). Tento vzorek pochází z lokality, která se nachází poblíž hlavního města Prahy, hustě osídlené lokality, kde bychom předpokládali, že pozitivní záchyt pesticidů bude nejzastoupenější, ovšem jak můžeme vidět, v tomto vzorku se nachází nejmenší počet pozitivních záchytů. Můžeme zde pozorovat vysokou intenzitu zastoupení např. fungicidu Ferimzonu proti houbovým chorobám (Matsuura 1994) či Metalaxylu proti plísni bramborové z čehož můžeme usuzovat, že se tyto pesticidy mohly do vzorku dostat, z okolních zahrádkářských kolonií.

## 7 Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na srovnání profilu organických látek v různých druzích medu stejného regionálního původu. Hypotéza této diplomové práce byla, že by se různé medy stejného regionálního původu neměly výrazně lišit. Analýza fenolických látek byla provedena pomocí systému UPHLC chromatografie ve spojení s hmotnostním analyzátozem s vysokým rozlišením a přesností určení hmotnosti (Q-TOF Impact II). Dále byl prováděn profilový screening na přítomnost pesticidů pomocí komerční standardizované metody PesticideScreener 2.0 (Bruker Daltonik)

Pro statistické srovnání jednotlivých vzorků medů byly použity vícerozměrné statistické metody, které poskytly reprodukovatelné informace pro porovnání obsahu fenolických látek v různých druzích medu, přičemž hypotéza diplomové práce byla potvrzena.

Mezi nejvíce zastoupené fenolické látky patřil pinocembrin, kaempferol, pinobanksin a kvercetin. Profily zastoupení některých fenolických látek by mohly pomoci naznačit botanický původ medu. Z identifikovaných pesticidů byly nejvíce zastoupeny Triazamát, Aminocarb, Pirimicarb a Icaridin.

Závěrem nás tato diplomová práce přivedla na myšlenku, že v případě vzorků, u kterých nebyl jednoznačně definován botanický původ, by mohly fenolické látky obsažené v medu být indikátorem botanického původu a mohly by být použity jako doplňková metoda k jejich identifikaci.

## 8 Literatura

Ahmad RS et al. 2017. Phytochemistry, metabolism, and ethnomedical scenario of honey. *A International Journal of Food Properties* **20**:254–269.

Ajibola A, Chamunorwa JP, Erlwanger KH. 2012. Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. *Nutrition & Metabolism London* **9**:61.

Ajtony Z, Bencs L, Haraszi R, Szigeti J, Szoboszlai N. 2007. Study on the simultaneous determination of some essential and toxic trace elements in honey by multi-element graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta* **71**:683–690.

Al- Mamary M, Al-Meerri A, Al-Habori M. 2002. Antioxidant Activities and Total Phenolics of Different Types of Honey. *Nutrition Research* **22**:1041-1047.

Alqarni AS, Owayss AA, Mahmoud AA. 2012. Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *Journal of Saudi Chemical Society* **5**:618–625.

Al-Sheraji SH, Ismail A, Manap MY, Mustafa S, Yusof RM, Hassan FA. 2013. Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods* **5**:1542-1553.

Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Romandini S, Bertoli E, Battino M. 2010. Contribution of honey in nutrition and human health: A review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* **3**:15-23.

Alvarez-Suarez JM, Giampiera FG, Battino M. 2013. Honey as a source of dietary antioxidants: Structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic disease. *Current Medicinal Chemistry* **20**:621-638.

Andersen ØM, Markham KR. 2006. Flavonoids chemistry, biochemistry and applications. In *Separation and quantification of flavonoids. Angewandte Chemie International Edition* **45**:6786-6787.

Ball DW. 2007. The chemical composition of honey. *Journal of Chemical Education* **84**:1643-1650.

Bertoncelj J et al. 2007. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenia honey. *Food Chemistry* **105**: 822-828.

Bonté F, Desmoulière A. 2013. Le miel: Origine et composition. *Actualités Pharmaceutiques*. **531**:18–21.

Bogdanov S. 2006. Contaminants of bee products. *Apidologie* **37**:1-18.

Bogdanov S. 2016. Honey as Nutrient and Functional food. *Bee Product Science*:1-27.



- Bogdanov S, Martin P, Lullmann, C. 1997. Harmonised methods of the european honey commisiion. *Apidologie*:1-59.
- Bogdanov S, Martin, P. 2002. Honey authenticity. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* **93**:232-254.
- Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. 2008. Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American College Nutrition*. **27**:677-689.
- Bogdanov S. 2017. Propolis: Composition, Health, Medicine. *Bee Product Science*
- Bostrom CE, Gerde P, Hanberg A, Jernstrom B, Johansson C, Kyrklund T, Rannug A, Tornqvist M, Victorin K, Westerholm R. 2002. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environmental Health Perspectives* **110**:451–488.
- Bradbear N. 2009. Bees and their role in forest livelihoods: a guide to the services provided by bees and the sustainable harvesting, processing and marketing of their products. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Brown KL.2000. Control of bacterial spores, *British Medical Bulletin*. Oxford University Press **56**:158–171.
- Ciulu M et al. 2011. RPHPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta* **83**: 924–929.
- Codex Alimentarius 2001. Codex standard 12. Revised Codex. Standard for Honey. *Standards and Standard Methods* **11**:1–7.
- Corredera L, Bayarri S, Pérez-Arquillué C, Lázaro R, Molino F, Herrera A. 2014. Evaluation of Heavy Metals and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Honeys form Different Origins. *Journal of Food Protection* **77**:405-509.
- Daher S. 2008. Analysis of Phenolic and Other Aromatic Compounds in Honeys by Solid-Phase Microextraction Followed by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**:4575-5780.
- Da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. 2016. Honey: Chemical Composition, Stability and Authenticity. *Food Chemistry* **196**:309-323.
- Dikshith TSS. 2010. Aminocarb. *Handbook of Chemicals and Safety*.
- Dobrovoda I. 1986. Včelie produkty a zdravie. *Príroda*, Bratislava.

Dobrowolski JW, Vohora SB, Kalpana S, Shah SH, Naqvi SAH, Dandiya PC. 1991. Effect of water extract from brown propolis on production of IFN after immunization against canine parvovirus (CPV) and canine coronavirus (CCoV). *Journal of Ethnopharmacology* **35**:77-82.

Erejuwa, Omotayo O, Siti A, Sulaiman, Mohd S. 2012. Honey: A Novel Antidiabetic Agent. *International Journal of Biological Sciences* **8**:913-934.

Escuredo O, Míguez M, Fernández-González M, Seijo MC. 2013. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chemistry* **138**:851–856.

Escuredo O, Dobre I, Fernández-González, M, Seijo MC. 2014. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry* **149**:84–90.

Estevinho L, Pereira AP, Moreira L, Dias LG, Pereira E. 2008. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology* **46**:3774-3779.

European Commission 2018. Pesticides database. European Commission, EU. Available from <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database> (accessed february 2021).

Farré M, Picó Y, Barceló D. 2014. Application of ultra-high pressure liquid chromatography linear ion-trap orbitrap to qualitative and quantitative assessment of pesticide residues. *Journal of Chromatography A* **1328**:66–79.

Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M. 1997. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters* **416**:123-129.

Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ. 2002. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**:5870-5877.

Hammel YA, Mohamed R, Gremaud E, Le Breton MH, Philippe AG. 2008. Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1177**: 58-76.

Haragsim O. 2004. Někteře cizokrajné druhové medy. *Moderní včelař, jaro*.

Hardt J, Appl U, Angerer J. 1999. Biological monitoring of exposure to pirimicarb: hydroxypyrimidines in human urine. *Toxicology Letters* **107**:89-93.

Havsteen BH. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* **96**:67-202.

Heleno SA, Martins A, Queiroz MJR, Ferreira IC. 2015. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds. *Food Chemistry* **173**:501-513.

Hermosín I, Chicón RM, Cabezud MD. 2003. Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food chemistry* **83**:263-268.

Hetmanski MT, Fussel RJ, Sykes MD, Vega AB, Sharma A. 2004. Deremination of triazamate in apples, peas and Brussels sprouts using high-performance liquid chromatography with tandem mass spektrometry. *Food additives and contaminants* **21**:447-456.

Holčapek M. 2001. Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. *Fakulta chemicko-technologická. Pardubice.*

Hu, FY et al. 2014. Determination of 26 veterinary antibiotics residues in water matrices by lyophilization in combination with LC/MS. *Journal of Chromatography* **949**:79–86.

Chen L, Mehta A, Berenbaum M, Zangerl AR, Engeseth NJ. 2000. Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 4997-5000.

Iglesias MT, Martín-Alvarez PJ, Polo MC, De Lorenzo C, González M, Pueyo E. 2006. Changes in the free amino acid contents of honey during storage at ambient temperature. *Journal of Agricultural and Food chemistry* **54**:9099-9104.

Israili ZH. 2014. Antimicrobial Properties of Honey. *American Journal of Therapeutics* **21**:304-323.

Jiménez JJ, Bernal JL, Nozal MJ, Martín MT, Mayorga AL. 1998. Solid-phase microextraction applied to the analysis of pesticide residues in honey using gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of Chromatography A* **829**:269-277.

Joska L, Příkrylová K. 1990. Speciální chemické a instrumentální analytické metody. VŠCHT, Praha.

Kalábová K, Vorlová L, Borkovcová I. 2004. Dynamika tvorby hydroxymethylfurfuralu v medu. Pages 104-108 in Massanyi P, Toman R, Lukác N, Capcarova M editors. Rizikové faktory potravinového reťazce IV. Slovenská zemědělská univerzita, Nitra.

Kamal MA, Klein P. 2011. Determination of sugars in honey by liquid chromatography. *Saudi Journal of Biological Sciences* **18**:17–21.

Kamler F, Veselý V, Titěra D. 2006. Produkce kvalitního medu. Výzkumný ústav včelařský v Dole, Měslovice.

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.

Khan FR, Ul Abadin Z, Rauf N. 200. Honey: nutritional and medicinal value. *Int J Clin Pract* **61**:1705-1707.

Khalil MI, Sulaiman SA, Gan SH. 2010. High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. *Food and Chemical Toxicology* **48**:2388–2392.

Klouda P. 2016. *Moderní analytické metody 3 vydání*. Pavko, Ostrava.

Kosenko SV, Kosovich TI, Sosnowski Z, Konopacki K. 1990. Propolis: MedlinePlus Supplements. *Stomatologia* **69**:27-29.

Kujawski MW et al. 2008. Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues. *Trends in Analytical Chemistry* **27**:785-793.

Kümmerer K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment. *Chemosphere* **75**:417-434.

Lei Z, Huhnam DV, Sumner LW. 2011. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *Journal of Biological Chemistry* **286**:25435-25442.

Mandal MD, Mandal S. 2011. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **1**:154-160.

Manganaris GA, Goulas V, Vicente AR, Terry LA. 2014. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **94**:825-833.

Manzanares AB, García ZH, Galdón BR, Rodríguez ER, Romero CD. 2011. Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. *Food Chemistry* **126**:664-672.

Maridonneau-Parini I, Braquet P, Garay RP. 1986. Heterogeneous effect of flavonoids on K<sup>+</sup> loss and lipid peroxidation induced by oxygen-free radicals in human red cells. *Pharmacological Research Communications* **18**:61-72.

Matsuura K, Ishida Y, Kuragano T. 1994. Development of a New Fungicide, Fermizone. *Journal of Pesticide Science* **19**:325-327.

Milata V, Segla P. 2004. *Spektrálne metódy v chémii*. Vydavateľstvo STU, Bratislava.

- Moreira RFA, Maria CAB, Pietroluongo M, Trugo LC. 2007. Chemical changes in the non-volatile fraction of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. *Food Chemistry* **104**:1236–1241.
- Moreira, RFA, Maria CAB, Pietroluongo M, Trugo, LC. 2010. Chemical changes in the volatile fractions of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. *Food Chemistry* **121**:697–704.
- Mukherjee I. 2009. Effect of organic amendments on degradation of atrazine. *Bulletin on Environmental contamination and toxicology* **83**:832-835.
- Nagai T, Sakai M, Inoue R, Inoue H, Suzuki N. 2001. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis *Food Chemistry* **75**:237-240.
- Nagai T, Inoue R. 2004. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food Chemistry* **84**:181-186.
- Nollet LML, 2004. *Handbook of food analysis. Methods and instruments in applied food analysis*. Marcel Dekker, New York.
- Oddo LP, Piana, L, Bogdanov S, Bentabol A, Gotsiou P, Kerkvliet J, Martin P, Morlot M, Valbuena AO, Ruoff K. 2004. Botanical species giving unifloral honey in Europe. *Apidologie* **35**:82-93.
- Olaitan PB, Adeleke OE, Iyabo OO. 2007. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African health sciences* **7**:159-165.
- Orey C. 2011. *A time for Honey. The healing powers of honey*. Kensington Books, New York.
- Petrus K, Schwartz H, Sontag G. 2011. Analysis of flavonoids in honey by HPLC coupled with coulometric electrode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **400**:2555–2563.
- Pirard et al. 2007. Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid–liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1152**:116–123.
- Pinho GP et al. 2010. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. *Food Control* **21**:1307-1311.
- Přidal A. 2005. *Včelí produkty 1. vyd. Mendelova zemědělská univerzita v Brně, Brno*.
- Přidal A. 2013. *Vznik, získávání, zpracování a kontrola medu. Mendelova univerzita v Brně, Brno*.

- Pulcini P, Allegrini F, Festuccia N. 2006. Fast SPE extraction and LC-ESI-MS-MS analysis of flavonoids and phenolic acids in honey. *Apiacta* **4**:21-27.
- Puscas A, Hosu A, Cimpoiu C. 2013. Application of a newly developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method to control honey adulteration. *Journal of Chromatography* **1272**:132–135.
- Pyrzynska K, Biesaga M. 2009. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry* **28**:893–902.
- Robards K. 2003. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruits and vegetables. *Journal of Chromatography* **1000**: 657.
- Sabatini AG, Bortolotti L, Marcazzan GL. 2007. *Conoscere il miele*. Avenue media.
- Sak-Bosnar M, Sakac N. 2012. Direct potentiometric determination of diastase activity in honey. *Food Chemistry* **135**: 827–831.
- Simal J, Huidobro J, Araquistain JL. 1983. Quality parameters of honey: Determination of water content. *Offarm* **2**:243-248.
- Singhal RS, Kulkarni PR, Rege DV. 1997. *Handbook of indices of food quality and authenticity*. Woodhead Publishing, Cambridge.
- Silva C et al. 2014. Antitumoural and antiangiogenic activity of Portuguese propolis in in vitro and in vivo models. *Journal of Functional Foods* **11**:160-171.
- Schmidt JO. 1997. *Bee Products: Properties, Applications, and Apitherapy*. Springer Science, Business Media, New York.
- Soler C, Gil MJ, García-Viguera C, Tomás-Barberán FA. 1995. Flavonoid patterns of French honeys with different floral origin. *Apidologie* **26**:53-60.
- Stanimirova I et al. 2010. Tracing the geographical origin of honeys based on volatile compounds profiles assessment using pattern recognition techniques. *Food Chemistry* **118**:171-176.
- Šefčík J. 2014. *Začínáme včelařit*. Grada Publishing, a.s., Praha.
- Štulík K. 2004. *Analytické metody*. Karolinum, Praha.
- Švamberk V. 2003. Druhy medu. *Včelařství roč. 56*. **8**:184-189.
- Turnipseed SB et al. 2011. Analyses of veterinary drugs and metabolites in milk using quadrupole time-of-flight liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* **59**:7569–7581.

The National Honey Board. 2018. Honey varietals. accessed Available from <http://www.honey.com/honey-at-home/learn-about-honey/%0Ahoney-varietals%0A> (accessed february 2021)

Titěra D. 2013. Včelí produkty mýtů zbavené: med, vosk, pyl, mateří kašička, propolis, včelí jed. Vyd. 2. Brázda, Praha.

Tomás-Barberán FA, Martos I, Ferreres F, Radovic BS, Anklam E. 2001. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**:485-496.

Tornuk F et al. 2013. Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops and Products* **46**:124–131.

Vallianou NG, Gounari P, Skourtis A, Panagos J, Kazazis C. 2014. Honey and its Anti-Inflammatory, Anti-Bacterial and Anti-Oxidant Properties. *General Medicine* **2**:132.

Veselý V. 2013. Včelařství. Vyd. 3. Brázda, Praha

Vesna V, Gašić U, Stanokovic D, Lušić D, Vukic-Lušić D, Milojkovic-Opsenica D, Tesić Ž, Trifkovic J. 2019. Towards better quality criteria of European honeydew honey: Phenolic profile and antioxidant capacity. *Food Chemistry* **274**:629-641.

Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Zaldivar-Cruz JM, Kuri V, Fernández-López J, Carbonell-Barrachina ÁA, Pérez-Álvarez J. 2010. Aroma profile and physico-chemical properties of artisanal honey from Tabasco, Mexico. *International Journal of Food Science & Technology* **45**:1111-1118.

Wang XH, Gheldof N, Engeseth NJ. 2004. Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. *Journal of Food Science* **69**:96-101.

Wang Y, Juliani R, Simon JE, Ho C. 2009. Amino acid-dependent formation pathways of 2-acetylfuran and 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanone in the Maillard reaction. *Food Chemistry* **115**:233–237.

Watson JT, Sparkman OD. 2007. Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation. John Wiley & Sons, Hoboken.

Weiβ K. 2010. Víkendový včelař: škola včelaření s nástavkovými úly 2 vydání. Víkend, Líbeznice.

White JW, Doner LW. 1980. Honey composition and properties: Beekeeping in the United States. *Agriculture Handbook* **335**:82-91.

Won SA, Li C, Kim J, Rhee H. 2008. Immunological characterization of honey major protein and its application. *Food Chemistry* **113**:1334–1338.

Yücel Y, Sultanoglu P. 2013. Characterization of honeys from Hatay region by their physicochemical properties combined with chemometrics. *Food Bioscience* **1**:16–25.

Zacharis E, Constantinos K, Fytianos K. 2012. Vortex-assisted liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spektrometry for the determination of organophosphate pesticides in environmental water samples and wines. *Journal of Separation Science* **35**:2422-2429.



## 9 Seznam použitých zkratk a symbolů

ČR	Česká republika
č.	číslo
EU	Evropská unie
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GC	plynová chromatografie
HMF	hydroxymethylfurfural
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHKO	chráněná krajinná oblast
k.	kyselina
LC	kapalinová chromatografie
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
ml.	mililitr
min.	minuta
MS	hmotnostní spektrometrie
MRL	maximální limity reziduí
např.	například
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PC	hlavní komponenta (principal component)
PCA	analýza hlavních komponent
PLE	extrakce za zvýšené teploty a tlaku

QC	vzorek kontroly kvality stanovení (quality control)
Q-TOF	hybridní analyzátor složená z kvadrupólu a analyzátoru doby letu
SFE	superkritická fluidní extrakce
SPE	extrakce na pevné fázi
SPME	mikroextrakce tuhou fází
TOF	analyzátor doby letu
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
UHPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie
WHO	World Health Organization
zákl.	základní

## **10 Samostatné přílohy**