

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



NMR profilování a analýza medů

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Blanka Sládková

Obor studia: Kvalita a zpracování zemědělských produktů

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

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "NMR profilování a analýza medů" 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 12. 4. 2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za jeho vlídnost, ochotu, trpělivost a cenné rady při zpracování této diplomové práce. Rovněž bych chtěla velmi poděkovat za podporu a trpělivost Martinu Hájkovi, Dominice Schmidtové, Karolíně Veltruské a Anetě Venclové, za spolupráci a pomoc v laboratoři Karolíně Novákové a Andree Slavičkové. V neposlední řadě patří poděkování mé rodině za podporu během celého studia.

NMR profilování a analýza medů

Souhrn

Med je definován jako potravina přírodního sacharidového charakteru produkovaná včelami rodu *Apis mellifera*. Podle původu dělíme med na květový, který pochází zejména z nektaru květů a medovicový, pocházející z výměšků hmyzu sajícího z rostlin na živých částech rostlin nebo ze sekretů živých částí rostlin. Med je zároveň nejčastěji falšovanou potravinou.

Cílem práce bylo vytvoření databáze NMR spekter českých medů a nalezení markerů na klasifikaci medovicového a květového medu.

Celkem bylo hodnoceno 12 vzorků květového a 8 vzorků medovicového medu z České republiky získaného v roce 2017. Měření ^1H NMR spekter bylo provedeno na spektrometru Bruker AVANCE III HD 500 MHz s pomocí pulzní sekvence 1d noesy. Data byla zpracována v softwarech Topspin v. 3.5 pl7, Mestrenova v. 12.0.03, Chenomx v. 8.3 a statistické zpracování bylo provedeno v programu MetaboAnalyst 4.0 a Microsoft Excel 2016 s využitím analýzy hlavních komponent (PCA), diskriminační analýzy částečných nejmenších čtverců (PLS-DA), ortogonální diskriminační analýzy částečných nejmenších čtverců (OPLS-DA) a permutačních testů.

Pomocí permutačních testů byl model pro rozlišení květových a medovicových medů shledán jako validní. Byly nalezeny markery zodpovědné za separaci tříd. Květové medy se lišily vyšší intenzitou signálů glukózy a fruktózy. Pro medovicové medy byla významná melecitóza, trehalóza, erlóza, sacharóza, maltóza, maltotrióza, kyselina šikimová, prolin a kyselina jantarová. ^1H NMR umožnila dobré rozlišení mezi květovými a medovicovými medy a může být uplatněna pro rutinní analýzu medu.

Klíčová slova: NMR, med, metabolomika, falšování medu

Honey profiling and NMR quantitative analysis

Summary

Honey is defined as the food of a natural sweet carbohydrate character produced by *Apis mellifera* bees. According to the origin honey is divided into floral, which comes mainly from the nectar of plants, and honeydew coming from excretions of insects sucking from plants on living parts of plants or from the secretions of living parts of plants. Honey is also one of the most adulterated food.

The aim of this work was to create a database of NMR spectra of Czech honeys and to find markers for classification of honeydew and floral honey.

A total of 12 floral samples and 8 honeydew samples of honey from the Czech Republic obtained in 2017 were evaluated. All ^1H NMR measurements were performed on a Bruker AVANCE III HD 500 MHz spectrometer using a 1d noesy pulse sequence. Data were processed in Topspin v. 3.5 pl7, Mestrenova v. 12.0.03, Chenomx v 8.3 and statistical processing was performed in MetaboAnalyst 4.0 and Microsoft Excel 2016 using Principal Component Analysis (PCA), Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA), Orthogonal partial least squares-discriminant analysis and permutation tests.

Using permutation tests, the model for distinction floral and honeydew honeys was found to be valid. Markers responsible for class separation were found. Floral honeys differed in higher glucose and fructose signal intensity. For honeydew honeys melezitose, trehalose, erlose, sucrose, maltose, maltotriose, shikimic acid, proline, and succinic acid were significant. NMR allowed a good distinction between floral and honeydew honeys and can be used for routine honey analysis.

Keywords: NMR, honey, metabolomics, honey adulteration

Obsah

1	Úvod	7
2	Cíl práce	8
3	Literární rešerše	9
3.1	Legislativní požadavky ČR a EU na med	9
3.1.1	Označování medu a požadavky na jeho jakost	10
3.1.2	Parametry pro kvalitu a rozlišení medu	12
3.1.2.1	Elektrická vodivost	13
3.1.2.2	Specifická rotace	13
3.1.2.3	Barva	14
3.2	Druhy medů	14
3.3	Složení medu	17
3.3.1	Cukry	17
3.3.2	Voda	19
3.3.3	Organické kyseliny	19
3.3.4	Vitaminy a minerální látky	20
3.3.5	Fenolové sloučeniny a těkavé sloučeniny	20
3.3.6	Proteiny a enzymy	21
3.4	Falšování medu	23
3.4.1	Kauzy v ČR	24
3.4.2	Trh s medem	26
3.5	Využití NMR při analýze medu	27
4	Metodika	34
4.1	Materiál	34
4.1.1	Spotřební materiál	34
4.1.2	Chemikálie	34
4.2	Metody	34
4.2.1	Software	34
4.2.2	Přístroje	35
4.2.3	Příprava vzorku	35
4.2.4	Parametry měření ^1H NMR spekter	35
4.2.5	Statistické zpracování	36
5	Výsledky	37
5.1	PCA analýza	37
5.2	PLS-DA a OPLS-DA	37
6	Diskuze	43

7 Závěr.....	46
8 Literatura.....	47
9 Seznam použitých zkratk a symbolů	53
10 Seznam obrázků a tabulek	54
11 Seznam příloh	55
12 Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Tato diplomová práce navazuje na moji bakalářskou práci Využití nukleární magnetické rezonance v pokročilé analýze zemědělských produktů, kde byl shrnut princip metody a výsledky vědeckých studií, které se zabývaly využitím této metody při analýze různých zemědělských komodit.

Nukleární magnetická rezonance (NMR) se mimo jiné používá při určování původu medů. Jedná se o účinnou metodu primárně využívanou pro stanovení struktury látek, která může pomoci lépe porozumět komplexním strukturám ve složitém systému, jakým jsou potraviny. Ve srovnání s jinými metodami existuje několik výhod NMR, včetně její neinvazivní povahy, relativní snadnosti přípravy vzorku, rychlosti získání dat a schopnosti prezentovat informace o široké řadě metabolitů v jednom experimentu (Siddiqui et al. 2017).

Med je po staletí používán jako sladidlo a zdroj energie. Je oceňován nejen pro svou chuť, ale také pro svou výživnou hodnotu a přínos pro lidské zdraví. Jeho antibakteriální a protizánětlivé vlastnosti jsou využívány např. při hojení ran a popálenin nebo při léčbě žaludečních vředů a gastritidy (Gheldof & Engeseth 2002). Na druhou stranu pro některé osoby může být med silným alergenem. Kontrola kvality a botanického původu medu je velmi důležitá, jelikož falšování medu se v posledních letech zvýšilo a med patří k nejfalšovanějším potravinám vůbec.

Medovicové a květové medy jsou spotřebiteli přijímány různě. V mnoha evropských zemích roste trh s medovicovým medem. Proto je potřeba rozlišovat mezi oběma druhy medu, aby se zabránilo falšování a podvodům. Různorodost složení a organoleptických vlastností a častý výskyt medů vzniklých jako směs květového a medovicového medu ztěžují jejich rozlišení (Soria et al. 2005). V posledních letech se proto začalo využívat moderních analytických metod, jakým je ^1H NMR profilování, které se jeví jako vhodná metoda pro rozlišení jednotlivých druhů medu a nalezení jejich případných typických markerů.

2 Cíl práce

Metoda nukleární magnetické rezonance (NMR) je pokročilou technikou umožňující kvantitativní i necílovou chemickou analýzu směsí s celou řadou výhod oproti klasickým metodám jako hmotnostní spektrometrie. Nachází uplatnění v analýze původu a detekci falšování řady potravin, přitom med je nejčastěji falšovanou potravinou. S pomocí NMR byly dříve nalezeny charakteristické markery pro různé druhy medů, jejich botanický původ nebo určení lokality.

Cílem práce je vytvoření databáze NMR spekter českých medů a nalezení markerů na klasifikaci medovicového a květového medu.

Hypotéza: Květové a medovicové medy se liší významnými "features" ve spektru a ty budou charakterizovány.

3 Literární rešerše

3.1 Legislativní požadavky ČR a EU na med

Jakost medu je v české legislativě stanovena vyhláškou č. 76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony, ve znění vyhlášky č. 43/2005 Sb. V roce 2015 byla vydána vyhláška č. 148/2015 Sb., kterou se v některých bodech mění vyhláška č. 76/2003 Sb. V legislativě EU, z jejichž závazných předpisů vychází legislativa ČR, jsou požadavky na med zakotveny ve směrnici Evropského parlamentu a Rady 2014/63/EU ze dne 15. května 2014, kterou se mění směrnice Rady 2001/110/ES o medu. Tyto požadavky jsou v souladu s normou Codexu Alimentarius, která se týká medu Codex Stan 12-1981.

Med je zde definován jako potravina přírodního sacharidového charakteru, složená převážně z glukózy, fruktózy, organických kyselin, enzymů a pevných částic zachycených při sběru sladkých šťáv květů rostlin (nektar), výměšků hmyzu na povrchu rostlin (medovice), nebo na živých částech rostlin včelami (*Apis mellifera*), které sbírají, přetvářejí, kombinují se svými specifickými látkami, uskladňují a nechávají dehydrovat a zrát v plástech.

Med dělíme podle původu na květový a medovicový. Květový (nektarový) med pochází zejména z nektaru květů. Medovicový med pochází zejména z výměšků hmyzu (*Hemiptera*) sajícího z rostlin na živých částech rostlin nebo ze sekretů živých částí rostlin. Květové a medovicové medy se od sebe liší kromě jiného např. konzistencí, vzhledem, chutí a barvou, viz tabulka 1.

Tabulka 1: Smyslové požadavky. Upraveno podle vyhlášky č. 76/2003 Sb.

Med	Konzistence a vzhled	Chuť	Barva
květový	mírně až silně viskózní, tekutý, částečně až plně krystalický	výrazně sladká až škrablavá	vodově čistá až s nazelenalým nádechem, slabě žlutá až zlatavě žlutá
medovicový	mírně až silně viskózní, tekutý, částečně až plně krystalický	sladká, popřípadě kořeněná až mírně škrablavá	tmavohnědá s nádechem do červenohněda

Z tabulky 1 vyplývá, že sensorické vlastnosti obou druhů medu mohou být velmi různorodé.

Podle způsobu získávání nebo obchodní úpravy dělíme med na vytočený, plástečkový, lisovaný, vykapaný, med s plástečky, filtrovaný med, pastový a pekařský med (vyhláška č. 76/2003 Sb.).

3.1.1 Označování medu a požadavky na jeho jakost

Označování potravin se řídí směrnicí Rady 2001/110/ES, vyhláškou č. 76/2003 Sb., obecnými požadavky na značení balených potravin, tj. nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011, vyhláškou č. 417/2016 Sb., o některých způsobech označování potravin a také jejím nadřazeným právním předpisem, což je zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů.

Na medu musí být uvedeny tyto údaje: název potraviny, jméno nebo obchodní název a adresa výrobce (zpracovatelského podniku, balírny či distribučního podniku), množství v gramech nebo kilogramech a datum minimální trvanlivosti.

Kromě výše zmíněných povinných údajů uvedených v zákoně a v prováděcím právním předpisu se med dále označuje podle jeho původu a země původu, kde byl získán. Pokud se jedná o směs medů z více zemí, lze je označit těmito třemi způsoby:

- a) směs medů ze zemí EU,
- b) směs medů ze zemí mimo EU,
- c) směs medů ze zemí EU a ze zemí mimo EU (vyhláška č. 76/2003 Sb.).

Označení medu, s výjimkou filtrovaného medu a pekařského medu může být doplněno následujícími údaji:

- a) regionálním, územním nebo místním označením původu, pokud výrobek pochází zcela z uvedeného zdroje původu,
- b) ve vztahu k původu medu názvem „jednodruhový“ nebo „smíšený“,
- c) druhem rostlin, z nichž pochází, pokud výrobek pochází zcela nebo převážně z uvedeného druhu a má odpovídající organoleptické, fyzikálně-chemické a mikroskopické charakteristiky,
- d) specifickými kritérii jeho jakosti (vyhláška č. 76/2003 Sb.).

Dalším kritériem na jakost medu je, že do něj nesmí být přidány, s výjimkou jiného druhu medu, žádné jiné látky včetně přídatných látek. Dále z medu nesmí být odstraněn pyl ani jiná

specifická součást medu, s výjimkou toho, kdy při filtraci nelze ztrátě některých látek zabránit.

Med s výjimkou pekařského (průmyslového) medu nesmí:

- a) mít jakékoliv cizí příchutě a pachy,
- b) začít kvasit nebo pěnit,
- c) být zahřát do takové míry, že jeho přirozené enzymy jsou zničeny nebo významně inaktivovány,
- d) být u něj uměle změněna kyselost (vyhláška č. 76/2003 Sb.).

Přidal (2013) ve své práci poukazuje na sporné části zmíněné legislativy. Jako zásadní nedostatek považuje ignorování existence květovo-medovicových medů, tzv. smíšených medů a také legislativně neregulované používání označení lesní med. Podle Přidala (2013) legislativa také nedefinuje druhovost medů a k hodnocení nevyužívá parametr optické rotace. Rozlišení květových a medovicových medů se provádí především na základě elektrické vodivosti. Hranice mezi nimi však není ostrá a nejsou legislativně určeny limity pro elektrickou vodivost smíšených medů, která se může pohybovat v rozmezí 50-110 mS/m, tudíž tyto medy spadají do obou skupin současně. Přidal (2013) navrhuje dva způsoby, jak by hodnocení medu mohlo být vylepšeno. Jedním způsobem by mohlo být definování další kategorie květovo-medovicových medů. V současné legislativě je označení medu „smíšený“ pouze dobrovolné, nikoliv povinné. Druhým způsobem by bylo, označování typu medu vypustit a použít pouze označení druhové, přičemž nedruhové medy by zůstaly bez povinného označení a zároveň by nebylo použito označení lesní med (Přidal 2013).

V České republice existuje také svazová norma, která vznikla ve spolupráci Českého svazu včelařů s Výzkumným ústavem včelařským, s. r. o. v Dole. Jedná se o normu jakosti č. ČSV 1/1999 – ČESKÝ MED, která je v některých fyzikálně-chemických požadavcích přísnější než zmíněná legislativa. Konkrétně se oproti tabulce 2 níže jedná o tyto parametry:

- obsah vody: nejvýše 18 % u všech druhů medu ve spotřebitelském balení,
- HMF (hydroxymethylfurfural): nejvýše 20 mg/kg u všech druhů medu,
- obsah sacharózy: nejvýše 5 % u všech druhů medu.

Dále norma zahrnuje doplňující kritéria:

- med má geografický původ na území ČR a je bez jakékoliv příměsi jiného medu,
- medovicový med lze označit jako ČESKÝ MED, pokud vykazuje kladnou polarizaci před i po inverzi.

Při dodržení podmínek svazové normy lze využít i pro označení MORAVSKÝ MED a SLEZSKÝ MED. Všechna tři označení, která svazová norma umožňuje nelze použít pro med filtrovaný ani pro med pekařský (Norma jakosti č. ČSV 1/1999).

3.1.2 Parametry pro kvalitu a rozlišení medu

Pro hodnocení kvality medů slouží mnoho chemických a fyzikálně-chemických parametrů, které jsou také zakotveny ve vyhlášce č. 76/2003 Sb., stejně jako ve směrnici 2001/110/ES a jejich novelizacích, viz tabulka 2.

Hlavním parametrem pro rozlišení květového a medovicového medu dle legislativy je elektrická vodivost. Dalšími parametry, které se u medu stanovují, jsou např. obsah vody, kyselost, obsah hydroxymethylfurfuralu (HMF), obsah sacharózy, aktivita diastázy, aj. uvedené v tabulce 2. K rozlišení květových a medovicových medů mohou kromě elektrické vodivosti pomoci tyto další parametry: specifická rotace nebo barva (Pita-Calvo & Vázquez 2017).

Tabulka 2: Fyzikální a chemické požadavky. Upraveno podle vyhlášky č. 76/2003 Sb.

Požadavek	Druh medu		
	květový	medovicový	pekařský (průmyslový)
součet obsahů fruktózy a glukózy (% hmot. nejméně)	60,0	45,0	-
obsah sacharózy (% hmot. nejvýše)	5,0 ¹⁾	5,0	-
obsah vody (% hmot. nejvýše) ³⁾	20,0	20,0	23,0
kyselost (mekv/kg nejvýše)	50,0	50,0	80
hydroxymethylfurfural (mg/kg nejvýše) ⁴⁾	40,0	40,0	-
obsah ve vodě nerozpustných látek (% hmot. nejvýše) ²⁾	0,10	0,10	-
elektrická vodivost ($\text{ms} \times \text{m}^{-1}$) ⁵⁾	nejvýše 80,0	nejméně 80,0	-
aktivita diastázy (stupňů podle Schadeho nejméně) ⁶⁾	8,0	8,0	-

1) U medu květového jednodruhového akátového z trnovníku akátu (*Robinia pseudoacacia*), z tollice vojštěšky (*Medicago sativa*), z banksie (*Banksia menziesii*), z kopyšníku (*Hedysarum*), z blahovičnicku (*Eucalyptus camadulensis*), z *Eucryphia lucida*, z *Eucryphia miliganii*, z citrusů (*Citrus spp.*), může být obsah sacharózy nejvýše 10,0 %; u levandulového medu (*Lavandula*

spp.) a u medu z brutnáku lékařského (*Borago officinalis*) může být obsah sacharózy nejvýše 15,0 %.

- 2) U medu lisovaného se připouští nejvýše 0,50 % hmotnostních ve vodě nerozpustných látek.
- 3) U vřesového (*Calluna*) medu může být obsah vody nejvýše 23 %; u pekařského medu z vřesu (*Calluna vulgaris*) může být obsah vody nejvýše 25 %.
- 4) U medů deklarovaného původu z regionů s tropickým klimatem a směsi obsahující výlučně tyto medy může být obsah hydroxymethylfurfuralu nejvýše 80 mg/kg.
- 5) Výjimky: planika (*Arbutus unedo*), vřesovec (*Erica*), blahovičník (*Eucalyptus camadulensis*), lípa (*Tilia spp.*), vřes obecný (*Calluna vulgaris*), balmín neboli manuka (*Leptospermum*), kajeput (*Melaleuca spp.*).
- 6) U medu s přirozeně nízkým obsahem enzymů (citrusové medy) a obsahem HMF nižším než 15 mg/kg může být aktivita diastázy nejméně 3.

3.1.2.1 Elektrická vodivost

Elektrická vodivost je běžně využívána jako kritérium pro rozlišení medovicových a květových medů. Její stanovení je velmi jednoduché a rychlé a provádí se pomocí konduktometru. Medovicový med musí mít elektrickou vodivost dle legislativních požadavků nejméně 80 ms/m a květový nejvýše 80 ms/m (vyhláška č. 76/2003 Sb.).

Elektrická vodivost úzce souvisí s obsahem minerálních látek, kyselin a proteinů v medu. Čím vyšší je obsah těchto látek, tím vyšší je výsledná vodivost (da Silva et al. 2016). Tento parametr je také vhodný při odhalování falšování medu (Sereia et al. 2017).

Obecně lze tedy říci, že medovicové medy mají vyšší elektrickou vodivost než medy květové. Nicméně existují některé výjimky, které jsou zahrnuty v legislativě, viz tabulka 2 výše.

3.1.2.2 Specifická rotace

Med je schopný stáčet rovinu polarizovaného světla. Specifická rotace závisí převážně na druhu medu a relativních podílech cukrů v medu. Květové medy jsou levotočivé a medovicové nebo falšované medy jsou obvykle pravotočivé. U květových medů je to způsobené převažující fruktózou, která má zápornou specifickou rotaci $[\alpha]_{D}^{20} = -92,4^{\circ}$. Glukóza, která převažuje u medovicových medů vykazuje kladnou specifickou rotaci $[\alpha]_{D}^{20} = +52,7^{\circ}$. Medovicové medy mají tedy obvykle nižší obsah fruktózy a obsahují melecitózu $[\alpha]_{D}^{20} = +88,2^{\circ}$ nebo erlózu $[\alpha]_{D}^{25} = +121,8^{\circ}$, které společně s glukózou vykazují celkově čistě kladnou rotaci. Specifická rotace se měří polarimetricky (García-Alvarez et al. 2002).

3.1.2.3 Barva

Barevná škála medů může být velmi široká – od vodově čisté, přes žluté a hnědé odstíny, až k černé. Barva medů je dána především jeho botanickým původem. Záleží také na obsahu minerálních látek, teplotě a době skladování. K nejsvětlejším medům řadíme např. akátový med, naopak mezi nejtmaší medy jsou obecně řazeny medy medovicové. V různých zemích je preferován med různé barvy. V České republice se za posledních 20 let minulého století zvýšil zájem o med tmavší (Titěra 2013).

Vzhledem k tomu, že na barvu medu má vliv mnoho faktorů (např. botanický původ, zpracování a další výše jmenované), rozlišování medu podle tohoto parametru není dostatečně přesné (Veselý a kol. 2003).

Barva medu může být hodnocena pomocí Pfundovy stupnice měřením hladiny absorpce světla v milimetrech pomocí spektrofotometru ve viditelné části spektra při různých vlnových délkách (tj. 560 nm), viz tabulka 3.

Tabulka 3: Pfundova stupnice pro stanovení barvy medu. Upraveno podle (Olawode et al. 2018).

Barva	Pfundova stupnice (mm)	Barevný rozsah
vodově jasná	1–8	0,030 nebo méně
velmi světlá	> 8–17	> 0,030–0,060
bílá	> 17–34	> 0,060–0,120
velmi světle jantarová	> 34–50	> 0,120–0,188
světle jantarová	> 50–85	> 0,188–0,440
jantarová	> 85–114	> 0,440–0,945
tmavě jantarová	> 114	> 0,945

Další parametry a jejich význam bude shrnut v jednotlivých částech kapitoly složení medu.

3.2 Druhy medů

Med lze dělit podle různých hledisek, jak již bylo zmíněno výše. Druhy medů jsou dány rozmanitostí rostlinného původu. Získání čistě jednodruhových medů je prakticky nemožné, jelikož snůška v daném období může být z různých rostlinných druhů. Téměř jednodruhové

medy získávají včelaři v České republice z vydatných snůšek, které poskytuje např. řepka, akát, maliník a jetel (Veselý a kol. 2003).

Jednodruhové medy jsou tedy vzácnější, protože včelař musí vystihnout správný moment, kdy je med zralý a co nejrychleji jej vytočit. Na obecném uznávání a definici jednodruhových medů dlouhodobě pracuje mezinárodní komise pro med IHC – International Honey Commission, viz tabulka 4. Rostlinný původ medu se určuje na základě analýzy pylových zrn, která však vyžaduje mnoho znalostí a zkušeností (Titěra 2013).

Tabulka 4: Jednodruhové medy a jejich typické vlastnosti. Upraveno podle (Titěra 2013).

Zdroj	Charakteristika	Hojnost/vzácnost
Ovocné stromy	Světlý, lahodný.	Většinou se vytáčí s ostatními zdroji jako smíšený jarní med.
Řepka <i>Brassica</i>	Světlý, rychle krystalizující, po ztuhnutí téměř bílý. Vhodný pro pastování.	Dnes jeden z hojně produkovaných medů.
Akát <i>Robinia</i>	V čistém stavu vodojasný s nazelenalým nádechem. Dlouho tekutý. Vhodný pro slazení nápojů.	Na trhu poměrně častý, ale často se vyskytují i medy pouze označené jako akátové, ve skutečnosti jsou smíšené.
Jetel (zejm. bílý) <i>Trifolium</i>	Rychle tuhnoucí med s výraznější nakyslou chutí než u řepkového medu.	V čisté podobě se získává ze včelstev přisunutých k semenným porostům.
Pohanka <i>Phagopyrum</i> <i>aesculenthum</i>	Aroma pohankového medu připomíná nezkušeným konzumentům naftu nebo myšinu. Nepříjemný pocit však rychle mizí.	Dříve se dovážel z Polska a Ruska. Nyní stále běžnější i u nás díky větším plochám pohanky.
Maliník <i>Rubus</i>	Lesní med, ale nektarový. Světlá barva, aromatický a chutný. Rychle tuhne, dá se pastovat.	V některých místech jedna z hlavních snůšek.

Vřes <i>Calluna vulgaris</i>	Tixotropní med, mícháním řídne. Pylová zrna jsou nezaměnitelná, tvoří čtveřice.	Pozdní snůška z velmi vysokých poloh. Vzácně i u nás. Získává se obtížně pomocí speciálních lisů.
Lípa <i>Tilia</i>	Výrazně, příjemně aromatický. Lípa poskytuje nektar i medovici.	Běžný v některých oblastech a letech.
Smrk <i>Picea</i>	Tmavý medovicový med.	U nás nejběžnější, ale jen v některých letech.
Dub <i>Quercus</i>	Nejtmavší medovicový med s načervenalým nádechem.	Vzácnější, jen v některých letech, většinou ve směsi.
Jedle <i>Abies</i>	Medovicový med s nazelenalým nádechem.	Vzácnější, v některých letech v lokalitách i čistý.

Medy z větší dálky

kaštan <i>Metcalfa pruinosa</i>	Med z jedlého kaštanu, nikoli z našeho jírovce. Med je tmavý, dlouho tekutý a chuťově velmi výrazný.	V českých zemích se nevtáčí, dostane se na trzích u jižních sousedů (Maďarsko, Chorvatsko).
levandule <i>Lavandula</i>	Výrazně aromatický, pro někoho až nepříjemně.	Suvenýrový med z Francie a dalších jižních zemí.
blahovičník <i>Eucalyptus</i>	Zvláštní, ale příjemně nahořklá příchut'.	Ze Španělska, Středomoří a zámoří.

Vůně a chuť jsou dvě velmi žádané vlastnosti v medu. Chuť medovicových medů je silnější než u květových. Na druhé straně medovicový med není tak sladký jako med květový (Castro-Vázquez et al. 2006).

Medovicový med by nemohl vzniknout bez producentů medovice, jejichž tělo je uzpůsobeno k parazitickému životu. Mezi nejvýznamnější producenty medovice patří mšice a červci, menší podíl mají mery. Obsáhlé poznatky o medovicových medech a producentech medovice velmi dobře shrnuje Haragsima (2005).

Velmi ceněným medem je med manukový. Manuka (*Leptosperum scoparium*) je strom, který roste pouze na Novém Zélandu a v některých dalších částech Austrálie. Jedná se o tmavě

zbarvený květový med, který díky svému vysokému obsahu polyfenolů vykazuje léčivé účinky (Spiteri et al. 2015). Manukový med obsahuje dihydroxyaceton (DHA), který se v průběhu zrání a skladování medu přeměňuje na methylglyoxal (MGO) – právě tato látka je zodpovědná za antimikrobiální aktivitu medu a obě látky slouží také jako typické markery manukového medu (Adams et al. 2009). Jedná se o velmi vzácný med, čímž se automaticky zvyšuje jeho cena a s ní také riziko falšování. Bylo zjištěno, že manukového medu se celosvětově prodá až trojnásobně více než kolik je ho vůbec vyprodukováno (Spiteri et al. 2017).

3.3 Složení medu

Med se skládá převážně z cukrů a dalších složek, jako jsou voda, enzymy, aminokyseliny, organické kyseliny, vitamíny, minerální a aromatické látky. Med je také bohatým zdrojem flavonoidů a fenolových kyselin, které vykazují mnoho biologických účinků a působí jako přirozené antioxidanty. Složení, barva, vůně a chuť medu závisí na mnoha faktorech: především na rostlinách, které včely opylují, na zeměpisné oblasti a klimatu. Manipulace s medem – zpracování, balení a jeho skladování mají na složení medu významný vliv (da Silva et al. 2016).

Díky rozvoji analytických metod mohou být stále častěji identifikovány další specifické látky medu.

3.3.1 Cukry

Cukry jsou hlavní složkou medu, z nichž monosacharidy představují asi 75 %, disacharidy 10–15 % a menší množství je zastoupeno také dalšími oligosacharidy. Cukry přítomné v medu jsou odpovědné za jeho energetickou hodnotu, viskozitu, hygroskopicitu a granulaci. Koncentrace fruktózy a glukózy, a jejich poměr jsou užitečným ukazatelem pro klasifikaci jednodruhových medů. Fruktóza bývá u téměř všech druhů medů zastoupena ve větším množství než glukóza, není to však absolutním pravidlem, jelikož rozmanitost medů je velmi široká. Vyšší obsah glukózy má např. med z brukve řepky (*Brassica napus*) a pampelišky lékařské (*Taraxacum officinale*), poměr fruktózy a glukózy je tedy u těchto medů většinou menší než 1. Medy s vyšším obsahem glukózy mají větší tendenci ke krystalizaci. Rozmezí obsahu fruktózy v medu je obvykle 32–44 %, glukózy 23–38 % (da Silva et al. 2016; Machado De-Melo et al. 2018).

Obsah sacharózy, jejíž maximální množství je v legislativě stanoveno na 5 %, se ve většině medů pohybuje kolem 1 %. Vyšší množství může poukazovat na příkrmování včel

cukrem, které je kromě mimoprodukčního období zakázané, nebo také na botanický původ, či nezralost medu. Vyšší obsah sacharózy se může přirozeně vyskytovat v medu z brutnáku lékařského (*Borago officinalis*) nebo také levandule (*Lavandula spp.*) (Machado De-Melo et al. 2018).

Typickým trisacharidem některých medovicových medů je melecitóza, která způsobuje ztuhnutí medu ještě v plástech. Takový med je nazýván jako „cementový med“ (Titěra 2013). Melecitóza je syntetizována pomocí enzymů ze střev a slinných žláz hmyzu sajícího na rostlinách. Další cukry, jako např. erlóza vznikají díky enzymatickým reakcím při sekreci hltanových žláz včel. (Machado De-Melo et al. 2018).

Ostatní cukry, které lze v medu nalézt, jsou vypsány v přehledu níže (Schievano et al. 2017).

Monosacharidy:

- fruktóza
- glukóza
- manóza
- rhamnóza

Disacharidy:

- sacharóza
- trehalóza
- turanóza
- maltóza
- maltulóza
- palatinóza
- melibióza
- isomaltóza
- gentiobióza
- nigeróza
- kojibióza

Trisacharidy:

- rafinóza
- isomaltóza
- erlóza
- melecitóza
- maltobióza
- maltotrióza
- panóza
- 1-kestóza

Mezi cukry dochází k enzymatickým přeměnám. Například sacharóza a maltotrióza jsou enzymaticky hydrolyzovány na monosacharidy (da Silva et al. 2016).

Koncentrace sacharidů byly použity k odlišení květového a medovicového medu. V porovnání s květovými medy mají medovicové medy nižší obsah monosacharidů, vyšší

obsah trisacharidů (převážně melecitózy, erlózy, rafinózy a maltotriózy), stejně tak mají i vyšší obsah dalších oligosacharidů. Odlišení jednotlivých medovicových medů je však složitější (Bogdanov et al. 2004).

Jak již bylo zmíněno, zralost medu a průběh skladování ovlivňují složení medu. Během skladování se vlivem enzymatické aktivity snižuje obsah monosacharidů a zvyšuje se obsah oligosacharidů. Jako produkt degradace redukujících cukrů vzniká 5-HMF (5-hydroxymethylfurfural). Reakce probíhá v kyselém prostředí za zvýšených teplot, při čemž dochází k dehydrataci hexóz. V menší míře vzniká HMF také jako meziprodukt Maillardovy reakce. HMF tudíž indikuje nevhodné skladovací podmínky a přílišné tepelné namáhání. Hodnota se u déle skladovaného medu zvyšuje. Limit pro obsah HMF je nejvýše 40 mg/kg, u medů z tropických oblastí je potom povolená hodnota vyšší (Soares et al. 2017; Machado De-Melo et al. 2018).

3.3.2 Voda

Obsah vody by u medu květového a medovicového neměl překročit 20 %, většinou se pohybuje v rozmezí 14–19 %. Čím vyšší je obsah vody tím méně kvalitní med je, a může tak snáze podléhat mikrobiální kontaminaci a kvašení. Vyšší obsah vody indikuje nedostatečně vyzrálý med, který není bez nežádoucích změn dlouhodobě skladovatelný. Obecně je však med považován za mikrobiálně velmi stabilní potravinu (Titěra 2013).

3.3.3 Organické kyseliny

Důležitou součástí medu, která ovlivňuje jeho chuť, stabilitu i další vlastnosti jsou organické kyseliny. Působí jako přirozené antioxidanty, jejich nejvyšší obsah však nesmí překročit 50 mekv/kg. Některé organické kyseliny pravděpodobně pochází přímo z nektaru nebo medovice (kyselina citronová, jablečná a šřavelová), ale většina z nich jsou produkty, vzniklé působením enzymů vylučovaných včelami, při zrání a skladování medu (kyselina mravenčí, aj.). U nezralého medu může docházet ke kvašení a zvyšování obsahu kyselin. Jako indikátor fermentace slouží kyselina octová. Nejvýznamnější kyselinou v medu je kyselina glukonová, která představuje 70–90 % celkového obsahu kyselin. Vzniká z glukózy působením enzymu glukooxidáza. Dále se v medu vyskytuje: kyselina jantarová, máselná, protokatechová, benzoová, gentisová, vanilová, kumarová, ferulová, syringová, anisinová, salicylová, skořicová a také hydroxyderiváty a metylestery některých těchto kyselin (Titěra 2013; Machado De-Melo et al. 2018).

Co se týká pH květového medu, obecně se pohybuje v rozmezí 3,3–4,6. Výjimkou je kaštanový med, kde se hodnoty pohybují od 5 do 6. Hodnota pH medovicových medů 4,5–6,5 je vyšší kvůli jejich vyššímu obsahu minerálních látek, které působí tlumivě (Machado De-Melo et al. 2018).

Organické kyseliny jsou také využívány pro rozlišení medů podle jejich geografického a botanického původu.

3.3.4 Vitaminy a minerální látky

V medu jsou nejvíce zastoupené vitaminy skupiny B, konkrétně: thiamin – (B₁), riboflavin (B₂) a kyselina pantothenová. Ve většině medů se nachází také vitamin C, jehož obsah je velmi nestabilní. Množství vitaminů je tak malé, že med není považován za významný zdroj vitaminů (León-Ruiz et al. 2013).

Minerální látky se v medu nachází ve stopových množstvích. V květových medech jsou v rozmezí 0,02–0,3 %, v medovicových mohou dosáhnout až 1 %. Jejich spektrum je velmi široké. Nejvýznamnější minerální látky nalezené v medu jsou draslík, sodík, vápník a hořčík. Stejně jako u vitaminů, množství minerálních látek v medu není nijak zvlášť dieteticky významné (Machado De-Melo et al. 2018).

Obsah minerálních látek je zodpovědný za barvu a chuť medu, kdy medy s vyšším obsahem jsou tmavší a mají výraznější chuť. Obvykle existuje pozitivní korelace mezi barvou, obsahem minerálů a elektrickou vodivostí medu (da Silva et al. 2016).

3.3.5 Fenolové sloučeniny a těkavé sloučeniny

Fenolové sloučeniny jsou po chemické stránce velmi heterogenní skupinou látek. Tyto látky se do medu dostávají jako sekundární metabolity rostlin, které si je syntetizují jako ochranu před stresem a oxidačním poškozením. Fenolové sloučeniny medu lze rozdělit na dvě hlavní skupiny: fenolové kyseliny a jejich příbuzné deriváty a flavonoidy (da Silva et al. 2016).

Díky těmto látkám, které jsou zastoupeny v minoritním množství, je možné určit jednotlivé druhy medu a klasifikovat jejich pravost. Již dříve byly pomocí GC-MS ve vřesových medech v porovnání s ostatními medy identifikovány ve větším množství tyto látky: kyselina benzoová a kyselina fenyloctová. Tyto výsledky byly potvrzeny a jako další marker pro vřesový med byla identifikována kyselina mandlová a β-fenylmléčná, pro řepkový med kyselina hydroskořicová (fenylpropanová). Jako marker medovicového medu byla určena kyselina protocatechová a pro pohankový med kyselina 4-hydroxybenzoová. Kyselina p-

kumarová a kyselina ferulová jsou typické pro kaštanový med. Výsledky z UPLC-Q/TOF-MS potvrdily, že medovicové medy jsou nejbohatší co do obsahu fenolových sloučenin. Obsahují vysoké množství výše zmíněné kyseliny protokatechové, ale také kyseliny abscisové, 4-hydroxybenzoové, β -fenylmléčné a chrysinu (Trautvetter et al. 2009).

Vůně a chuť medu je dána komplexní směsí těkavých sloučenin, které se mohou lišit v závislosti na původu nektaru, podmínkách zpracování a skladování. Těkavé sloučeniny jsou přenášeny z rostlin, ale mohou být produkovány nebo měněny také samotnými včelami. V medech bylo ve velmi malých koncentracích zjištěno více než 600 sloučenin s nízkou molekulovou hmotností, jako jsou: monoterpeny, terpeny, terpenoidy, alkoholy, ketony, aldehydy, aj. Aromatický profil medu, stejně jako identifikace těkavých látek se ukázala být efektivní při posouzení botanického a geografického původu medu, i při detekci případného falšování medu (Machado De-Melo et al. 2018).

3.3.6 Proteiny a enzymy

Obsah bílkovin v medu závisí na druhu včel, kterými je med produkován. Med včel rodu *Apis mellifera* obsahuje 0,1–3,3 % bílkovin. Proteiny v medu jsou jak rostlinného, tak živočišného původu. Hlavním zdrojem bílkovin medu však zůstává pyl. Z aminokyselin v medu převládá nejvíce prolin, který vzniká při sekreci slin včel během přeměny nektaru na med. Prolin tvoří 50–85 % všech aminokyselin medu a je využíván při hodnocení vyžralosti medu, či odhalování přídatku exogenních cukrů po vytočení medu. Minimální hodnota prolinu je 180 mg/kg. Dalšími nejběžnějšími aminokyselinami medu jsou: kyselina glutamová, alanin, fenylalanin, tyrosin, leucin a izoleucin (Hermosín et al. 2003; Iglesias et al. 2006).

Volné aminokyseliny jsou dobrým ukazatelem při rozlišování medovicového a květového medu. HPLC analýza 46 vzorků medu ze Španělska poukázala na rozdíly ve složení aminokyselin mezi oběma medy. Rozdíly byly nalezeny u všech zkoumaných aminokyselin, kromě histidinu, β -alaninu a lysinu. U jedenácti z jednadvaceti testovaných aminokyselin dosahovala hladina významnosti $<0,001$ a u čtyř (tryptofan, fenylalanin, leucin, prolin) $<0,05$. Všechny tyto významně odlišné aminokyseliny se nacházejí ve vyšší koncentraci v medovicových medech než v květových, s výjimkou tyrosinu a fenylalaninu. Podle obsahu kyseliny glutamové a tryptofanu, přítomných ve větším množství u medovicových medů, byly kromě jednoho vzorku všechny medy zařazené do správné kategorie dokonce ze stejné geografické oblasti (Iglesias et al. 2004).

S nutriční hodnotou a čerstvostí medu úzce souvisí enzymy. I když jsou přítomny ve velmi malém množství, mají významný vliv na kvalitu medu. Enzymy významně ovlivňují obsah bílkovin, profil volných aminokyselin a kyselost medu. Do medu jsou vylučovány slinnými žlázami včel, konkrétně se jedná o oxidázy, katalázy a amylázy. Tyto enzymy dokáží rozložit složité sacharidy na jednoduché cukry, jako je fruktóza a glukóza. Jednoduché cukry mohou být při vhodných podmínkách (obsahu vody a optimální teplotě) dále fermentací katalyzovány na alkohol a kyselinu octovou. Kromě ovlivnění hodnoty pH může činnost enzymů po fermentaci změnit chuť a vůni medu (Chua & Adnan 2014).

Za přeměnu nektaru a medovice na med je zodpovědný enzym invertáza. Je tvořen hltanovými žlázami včel a dokáže rozštěpit sacharózu za vzniku glukózy a fruktózy. Při tomto štěpení je určité množství vody zabudováno do nově vzniklých molekul a dochází tak k zahušťování vznikajícího medu (Veselý a kol. 2013). Tento enzym je velmi citlivý na teplotu. Jeho aktivita při vysokých teplotách nebo dlouhodobém skladování klesá, tudíž je důležitým ukazatelem kvality medu (Titěra 2013). Na druhou stranu dokáže invertáza z jednoduchých cukrů vytvořit cukry složité – oligosacharidy. Nejčastěji k tomu využívá nejméně rozpustnou glukózu. Se snižujícím se obsahem glukózy je snížena schopnost krystalizace medu (Veselý a kol. 2013).

Dalším významným enzymem, který je legislativně normován minimální hodnotou 8 stupňů Schadeho je diastáza. Diastáza zahrnuje α - a β -amylázu, při čemž α -amyláza hydrolyzuje řetězec škrobu uprostřed za vzniku dextrinů a β -amyláza štěpí řetězec škrobu od konce za vzniku maltózy. Aktivita diastázy odpovídá aktivitě enzymu přítomného v 1 g medu, který hydrolyzuje 0,01 g škrobu za jednu hodinu při teplotě 40 °C. Aktivita tohoto enzymu klesá např. při ztekucování medu. Díky své termolabilitě slouží aktivita diastázy jako indikátor doby skladování a zvýšené teploty. Aktivita klesá, pokud je produkt vystaven zahřívání nad 60 °C (Sak-Bosnar & Sakač 2012; Titěra 2013). Funkce diastázy v medu není úplně jasná vzhledem k tomu, že nektar neobsahuje škrob. Pravděpodobně se ale účastní na trávení pylu včelami (Machado De-Melo et al. 2018).

Glukooxidáza, tvořena slinnými žlázami včel, přeměňuje glukózu na glukonolakton, který je hydrolyzován na kyselinu glukonovou. Ta zvyšuje kyselost medu a uvolňuje malé množství peroxidu vodíku, sloučeniny, která je zodpovědná za mikrobiální odolnost (da Silva et al. 2016).

V menším množství je v medu přítomná také kataláza a kyselá fosfatáza. Kataláza pochází z pylu, přeměňuje peroxid vodíku produkovaný glukooxidázou na vodu a kyslík. Čím vyšší množství katalázy je přítomné v medu, tím nižší je hladina peroxidu vodíku (Weston

2000). Kyselá fosfatáza může být indikátorem fermentace medu. Její aktivita závisí na pH medu. Čím vyšší je pH, tím nižší je pokles aktivity kyselé fosfatázy (Alonso-Torre et al. 2006).

3.4 Falšování medu

Med jako cenný přírodní produkt patří bohužel také k často falšovaným komoditám. Mezi způsoby falšování medu lze zařadit přidavek cukerných sirupů různého původu nebo nesprávně uvedený údaj o botanickém, či geografickém původu medu. Dalším způsobem je nepovolená filtrace medu za účelem odstranění pylových zrn, které jsou jeho přirozenou součástí, nebo také odstranění vody z nedostatečně vyzrálého medu.

Častým prohřeškem bývá také zahřívání medu pomocí vysoké teploty (>50 °C) s cílem zbavit se krystalů v medu a získat med tekutý. Ten bývá mnohdy lépe prodejný a u laické veřejnosti oblíbenější, přestože je krystalizace medu naprosto přirozený proces. Přílišné tepelné namáhání má za následek zničení některých prospěšných látek v medu a vznik nežádoucí látky HMF (Soares et al. 2017).

Mezi nejčastěji používané analytické metody k odhalení falšování medu přidavkem cukerného sirupu patří: chromatografie, hmotnostní spektrometrie, optická spektroskopie a nukleární magnetická rezonance. Geografický a botanický původ lze detekovat např. pomocí pylové analýzy nebo analýzy minerálních látek (Ulberth 2016).

Velmi časté je falšování medu kukuřičným sirupem (CS) a vysokofruktózovým kukuřičným sirupem (HFCS), které se svým složením velmi podobají složení medu. HFCS obsahuje přibližně 55 % fruktózy, 41 % glukózy a 4 % dalších (oligo)sacharidů. Právě obsah oligosacharidů CS a HFCS, které se přirozeně v medu nevyskytují, slouží k odhalení falšování medu, a to díky analytické metodě HPAEC-PAD, což je vysoce účinná aniontová výměnná chromatografie s pulzní ampérometrickou detekcí. Při analýze byl med záměrně falšován sirupy s různým stupněm izomerace (5%, 10%, 20% CS) a (20%, 40%, 80% HFCS). Ve vzorcích CS a HFCS byly přítomny vysokomolekulární oligosacharidy se stupněm polymerace 3–16. Směs 5% CS s medem byla jasně detekovatelná, ale citlivost metody detekce HFCS byla nižší (Morales et al. 2008).

Stanovení poměru stabilních izotopů uhlíku (SCIRA) pomocí hmotnostní spektrometrie izotopových poměrů (IRMS) je široce používaným nástrojem pro rozlišení materiálů pocházejících z rostlin. C3 rostliny, které využívají k fixaci atmosférického CO₂ Calvin-Bensonův cyklus mají nižší poměr izotopů ¹³C / ¹²C, než rostliny C4, které využívají Hatch-Slackův cyklus. Kvetoucí rostliny a květy stromů, které včely obvykle navštěvují, patří do

skupiny rostlin C3, zatímco cukrová třtina a kukuřice jsou rostliny C4. Právě tohoto rozdílu se využívá při detekci zakázaného přídavku sirupů z cukrové třtiny a kukuřice do medu (Elflein et Raezke, 2008). V České republice se však při falšování medu využívá cukru získaného z C3 rostlin, kam patří cukrová řepa (Zábrodská & Vorlová 2014). K C3 rostlinám patří např. také pšenice a rýže (Spiteri et al. 2015).

Další analytickou metodou, kterou lze pro stanovení autenticity medu použít, je NMR. Jako příklad slouží výzkum vědeckého týmu Zhenga et al., který provedl analýzu 70 čínských vzorků medu (osmi různých botanických druhů, ze tří geografických oblastí a pěti produkčních období). Detekováno bylo celkem 33 složek, při čemž bylo zjištěno, že ^1H NMR spektra kombinovaná s multivariační statistickou analýzou mohou poskytovat přesné kvalitativní i kvantitativní informace o 20 složkách medu, včetně sacharidů, některých karboxylových kyselin a aminokyselin. NMR umožňuje rozlišení medu dle geografického i botanického původu (Zheng et al. 2016).

K bližšímu určení jednodruhových medů může posloužit také senzorická analýza provedená panelem zkušených hodnotitelů. Zakládá se na hodnocení barvy, chuti a aroma medu, při čemž je dána přesná terminologie a škála, podle které se med hodnotí. Celá tato metoda se zakládá také na několika ISO normách. V kombinaci s běžnými fyzikálně-chemickými testy, kdy stanovujeme vodivost, pH, volné kyseliny, aj., je určení geografického původu jednodruhových medů komplexnější (Ulberth 2016).

Analýza pylových zrn, která je zmíněna výše, je považována za "zlatý standard" pro stanovení botanického i geografického původu medu. K tomu, aby byla užitečná musí být známá charakteristická flóra oblasti, z níž med pochází. K rozpoznání a klasifikaci pylových zrn je zapotřebí zkušený odborník a také je nezbytná rozsáhlá databáze „knihovna“ pylových zrn přítomných v medu. Hlavním kritickým bodem analýzy pylových zrn je správnost identifikace pylu a následná interpretace výsledků (Von Der Ohe et al. 2004).

Co se týká nejnovějších metod, v současnosti se využívá také DNA analýzy pylových zrn, která dokáže spolehlivě potvrdit botanický původ medu (Manivanan et al. 2018). Bohužel však tuto analýzu nelze použít u přefiltrovaných medů, kde dochází ke ztrátám pylových zrn.

3.4.1 Kauzy v ČR

V roce 2014 byla Státní zemědělskou potravinářskou inspekcí (SZPI) provedena mimořádná kontrola v maloobchodní síti, která se zaměřovala na hodnocení jakostních parametrů medů. Z celkem 30 analyzovaných vzorků bylo 18 nevyhovujících. V 9 vzorcích

bylo nalezeno nepovolené barvivo E150d – karamel, které se využívá při dobarvování světlých a ředěných medů; v 1 vzorku byl nepovolený přídavek oligosacharidů, které se využívají při ředění medu; u 11 vzorků byla nízká aktivita diastázy a u 10 vzorků byla vyšší hodnota HMF. Některé medy tedy nevyhovovaly ve více parametrech najednou (Kopřiva 2014).

Klamání spotřebitele nesprávným uvedením geografického původu medu vedlo v roce 2015 k odebrání značky Český výrobek – garantováno Potravinářskou komorou ČR společnosti Včelpo, s. r. o. Podmínkou užívání této značky v případě medu je, že musí být získaný/sklizený výhradně v České republice. Pylová analýza medů opakovaně prokázala přítomnost pylu např. z východní Evropy nebo z Číny (PK ČR 2015). Ve stejném roce zjistila Státní veterinární správa (SVS) a SZPI u medů od tohoto výrobce další pochybení. Jednalo se pravděpodobně o největší kauzu u nás. Celkem u 29 šarží medu byla potvrzena přítomnost reziduí antibiotik. Konkrétně byla nalezena rezidua chloramfenikolu, streptomycinu, sulfonamidů a nitrofuránů, které jsou pro léčení včel v EU zakázané. Byla analyzována jak surovina od tuzemských výrobců, tak ze zahraničí. Velmi podobné spektrum antibiotik bylo nalezené ve vzorcích medu pocházejících z Ukrajiny. Z tržní sítě bylo staženo zhruba 150 tun, ve skladech bylo zajištěno dalších 115 tun vyrobeného medu a 163 tun pro výrobu medu. Prodejcům byla udělena pokuta v celkové výši 5 920 000 Kč (Pejchal 2016; Kopřiva 2016).

V průběhu druhé poloviny roku 2016 se SVS zaměřila na med významných tuzemských včelařů. Všech 72 vzorků, které byly podrobeny smyslovému posouzení, ve sledovaných parametrech vyhovělo. Vzorky byly testovány také na rezidua látek využívaných např. při léčbě varoázy, či celou řadu zakázaných antibiotik. Všechny testy vyšly negativně. Kontrola prokázala, že med od českých včelařů může být považován za bezpečný a kvalitní (Pejchal 2017).

Na druhou stranu na podzim 2017 byla v Jihomoravském kraji odhalena výrobní falšovaný med, který byl pod fiktivním jménem výrobce distribuován do tržní sítě. Med nevyhovoval fyzikálně-chemickým požadavkům, jelikož do něj byl přidán cukerný roztok (Vorlíček 2017).

Další mimořádné kontroly provedené v roce 2017 odhalily porušení právních předpisů u 12 šarží medu z celkem 25 zkoumaných, tj. 48 % falšovaných vzorků. Kromě prohřešků odhalených v roce 2014 bylo touto kontrolou navíc zjištěno klamavé označování botanického i geografického původu nebo přítomnost cizích cukrů (Kopřiva 2017).

Neméně časté je také uvádění medu na trh neexistujícím výrobcem, falšování daňových dokladů nebo certifikátů z Výzkumného ústavu včelařského v Dole. Navíc vzorky medu nevyhovovaly ani legislativním požadavkům, jako je aktivita diastázy, přítomnost HMF

a vykazovaly nezvyklou chuť i vůni, aj. (Pospíchal 2018). SVS v roce 2018 odhalila 3 šarže medu společnosti Honeypack, s. r. o., které nesplňovaly smyslové požadavky, deklarovaný botanický původ, požadavky na označení aj. Subjektům zapojeným do distribuce byla udělena pokuta ve výši přes 200 000 Kč (SVS 2018).

V roce 2018 odhalila SZPI a SVS v objektu bývalého ZD na Olomoucku 31,5 tun nelegálního medu, který byl označen etiketou výrobce Včelpo, s. r. o. Namátkově bylo zjištěno, že se jedná o šarže, u kterých byla v letech 2015/16 potvrzena přítomnost reziduí antibiotik (Kopřiva 2018).

3.4.2 Trh s medem

Spotřeba medu se v současné době zvyšuje. Med je používán stále častěji jako alternativa pro cukr a umělá sladidla. Na jednu stranu se chov včel různými způsoby modernizuje, např. je možné včelstva vzdáleně monitorovat – hlídat teplotu v úlu, zjišťovat hmotnost apod. Na druhou stranu ale včelaři musí čelit mnoha hrozbám, v souvislosti s používáním pesticidů, výskytem parazitů např. roztoče (*Varroa destructor*), prvoka (*Nosema apis*) a v podobě mnoha dalších onemocnění. V dnešní době dochází také k významnému snižování biodiverzity, zhoršují se podmínky přírodních včelích stanovišť a klimatická změna způsobuje extrémní výkyvy počasí. To vše ústí ve vyšší mortalitu včelstev, snížení produkce medu, zvyšující se náklady a snižující se konkurenční schopnost. Častěji proto dochází k ekonomicky motivovanému falšování medu (Spengler et al. 2019).

V EU je zhruba 600 000 včelařů a 17 milionů úlů, což odpovídá roční produkci okolo 250 000 tun medu. EU se společně s Čínou na prvním místě a Tureckem na třetím místě řadí mezi tři největší výrobce medu na světě. V rámci EU jsou největšími producenty Španělsko, Maďarsko, Německo, Rumunsko, Polsko, Řecko, aj. Podle dat z roku 2016 je EU zároveň největším dovozcem medu na světě, jelikož poptávka v EU převyšuje nabídku. Dováží se zhruba 200 000 tun, a to především z Číny, Ukrajiny, Argentiny a Mexika. Co se týká vývozu, vyváží EU okolo 20 000 tun především do Švýcarska, Saúdské Arábie, Japonska, USA a Kanady (Zpravodajství EP 2018).

V České republice bylo podle údajů Českého statistického úřadu v roce 2017 vyrobeno 9 365 tun medu, při čemž počet včelstev nepatrně klesl na 638 000. Více včelstev se chová na Moravě, nejvíce ve Zlínském kraji a nejméně se jich nachází v Karlovarském a Ústeckém kraji. V roce 2016 činila spotřeba medu na osobu za rok v ČR 0,9 kg, což je dvakrát více než tomu bylo v roce 2006. Nejvíce medu se do ČR dováží z Ukrajiny, Slovenska a Uruguaye. Vývoz

medu se pohyboval okolo 1500 tun a nejvíce se vyvezlo do Německa, na Slovensko a do Francie (Báčová 2018). V roce 2018 produkce medu klesla na 8 992 tun, což je nejméně od roku 2014 a počet včelstev se snížil na 632 000 (ČTK 2019). Spotřeba medu vzrostla v roce 2017 na 1 kg na osobu a rok (ČSÚ 2018).

3.5 Využití NMR při analýze medu

Jak již bylo nastíněno v kapitole falšování medu, NMR je velmi významnou metodou, které se využívá při ověřování autenticity medu. Jedná se o jednu z nejučinnějších analytických metod, která umožňuje cílenou i necílenou analýzu v rámci jednoho měření.

Využití NMR při analýze medu nabízí určité výhody, včetně možnosti získání více různých informací v jediném měření, které je často rychlejší než většina ostatních analytických metod. NMR umožňuje reprodukovatelnost a srovnatelnost dat s vysokou statistickou spolehlivostí, při čemž není nutná předběžná úprava vzorku a je možná zpětná identifikace a kvantifikace vzorků (Schievano et al. 2012).

Beretta et. al (2008) zkoumali pomocí ^1H NMR spektroskopie 44 komerčních italských medů z 20 různých botanických zdrojů. U medovicových, kaštanových a lipových medů bylo možné identifikovat dobře rozlišené oblasti spekter, a tudíž i markery pro určení botanického původu. Medovicové medy měly téměř identické profily, s dominující alifatickou částí spektra v rozmezí 0,85–1,60 ppm, navíc se sadou signálů v oblastech: 2,15 ppm, 4,60–5,20 ppm a jedním dubletem z tripletů 6,75 ppm. Kaštanový med byl charakterizován přítomností kyseliny kynurenové a některými jejími strukturně podobnými metabolity. U lipového medu byly nalezeny významné signály pro cyklohexa-1,3-dien karboxylovou kyselinu a její ester, které u ostatních vzorků kromě méně běžného medu z muškátové růže nebyly patrné. Jednalo se o předběžné výsledky, které naznačily možné použití NMR spekter pro identifikaci botanického původu medu (Beretta et al. 2008).

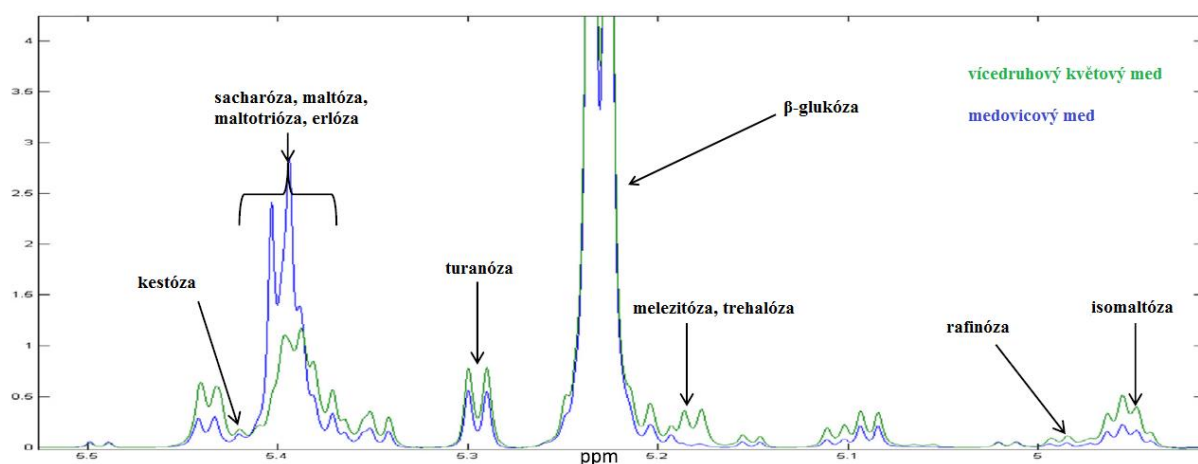
NMR spektra chloroformové frakce 118 vzorků medu čtyř botanických druhů v kombinaci s chemometrickou analýzou umožnila analyzovat netěkavé organické sloučeniny. Využitím extrakce chloroformem dochází k eliminaci majoritních sloučenin, jako jsou cukry. PCA a PLS-DA byly provedeny u vybraných signálů spektra za účelem rozlišení botanického původu a identifikace charakteristických metabolitů pro každý analyzovaný druh medu. PLS-DA dosáhla korelačního koeficientu $R^2 = 0,67$ a validačního korelačního koeficientu $Q^2 = 0,77$. Diskriminační analýza umožnila správně klasifikovat všechny vzorky (Schievano et al. 2010).

V další studii Schievano et. al (2012) byla také analyzována NMR spektra chloroformové frakce, konkrétně u 353 vybraných vzorků medu. Metabolomický přístup založený na ^1H NMR spojený s multivariační analýzou dat s cílem rozlišit různé druhy medů a identifikovat sloučeniny z chloroformové frakce byl použit při analýze sedmi různých botanických druhů medu. Pro každý jednodruhový med byly identifikovány specifické markery. Dva markery pro akátový med: chrysin a pinocembrin, jeden pro kaštanový: γ -LACT-3-PKA, dva pro pomerančový: 8-hydroxylinalool a kofein, jeden pro blahovičnickový: dehydrovomifoliol, jeden pro medovicový: diacylglycerylether a dva pro lipový: kyselina 4-(1-hydroxy-1-methylethyl)cyklohexa-1,3-dien-karboxylová a 4-(1-methylethenyl)cyklohexa-1,3-dien-karboxylová kyselina (Schievano et al. 2012).

V Itálii došlo za poslední roky kvůli onemocnění včelstev k dramatickému snížení produkce medu, což vede ke zvyšujícímu se importu medu z východní Evropy. Studie autorů Schievano et. al (2019) se jako první zabývala ^1H NMR spektroskopií chloroformové frakce akátových medů, které jsou pro Itálii typické. Schievano et. al (2019) zmiňuje rozdíly v národní a evropské legislativě. Legislativa EU umožňuje označení medů např. jako směs medů ze zemí EU, viz kapitola 3.1.1. Označování medu a jeho jakostní požadavky, přičemž konkrétní deklarace podílů složek medu různého původu ve směsi není vyžadována. Podle Schievano et. al (2019) je tento nedostatek pravděpodobně způsoben absencí analytické metody, která by dokázala rozlišit geografický původ směsi medu. Chloroformová frakce medu obsahuje zakoncentrované méně polární sloučeniny, zejména fenolové deriváty. Analýza chloroformové frakce je založena spíše než na rozdílné koncentraci sloučenin na přítomnosti specifických markerů. Schievano et. al (2019) analýzou databáze 2000 vzorků 45 různých botanických původů zjistili, že nejdůležitější signály charakterizující italské akátové medy spadají do oblasti 6,88–7,04 ppm, zatímco jedna z nejdůležitějších oblastí pro medy z východní Evropy je 5,12–5,16 ppm, typická pro med řepkový. V akátovém medu ze střední Evropy je přítomen významný sekundární podíl řepkového nektaru. Pylová analýza také potvrdila, že v akátovém medu z východní Evropy jsou vždy přítomna pylová zrna řepky, zatímco v italských vzorcích jsou v menším množství přítomna vzácně (Schievano et al. 2019).

V dřívější studii Lolli et al. (2008) analyzovaly 71 vzorků italského medu. Kaštanové, citrusové, blahovičnickové a vícedruhové květové byly analyzovány ^1H NMR spektroskopií a heteronukleární mnohonásobnou vazebnou korelací (HMBC). PCA a obecná diskriminační analýza (GDA) nebyly s použitím ^1H NMR schopny zařadit vzorky podle svého botanického původu. Jednotlivé klastry byly pozorovány u výsledků 2D analýzy $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMBC (Lolli et al. 2008).

Pomocí ^1H NMR profilování ve spojení s vhodnými kvantifikačními postupy a statistickými modely byla definována analytická kritéria pro ověření pravosti jednodruhového i vícedruhového květového medu. Celkem 816 referenčních vzorků, více než 60 botanických druhů medu různých barev a konzistence z více než 35 různých zemí, bylo shromažďováno přes deset let. Spolehlivost údajů o geografickém a botanickém původu byla ověřena provedením mikroskopické analýzy pylu (Spiteri et al. 2015). Chemické posuny mezi 0,5 a 3 ppm lze použít k pozorování signálů spojených s fermentačními nebo degradačními markery (zejména kyselinou jantarovou, octovou, mléčnou a ethanolem). V této části spektra lze současně pozorovat také dvě typické složky medu, kyselinu citronovou a prolin, které se v malém rozsahu liší u vícedruhového květového medu. V oblasti chemického posunu mezi 4,9 a 5,5 ppm, reprezentované zejména anomerními protony z cukrů, lze pozorovat signály spojené s typickými minoritními cukry. Kromě signálu turanózy může být většina pozorovaných píků způsobena vícenásobnými příspěvky (Spiteri et al. 2015). Obrázek 1 znázorňuje ty nejdůležitější.



Obrázek 1: Oblast chemického posunu 4,9–5,5 ppm typická pro cukry. Upraveno podle (Spiteri et al. 2015).

Spiteri et al. (2015) detekovali také 10% přídavek cukru a v rámci stejného experimentu byla provedena kvantifikace glukózy, fruktózy, sacharózy a 5-HMF. U vzorků manukového medu byly kvantifikovány jeho typické markery: MGO a DHA. Jako produkt fermentace byl kvantifikován také ethanol (Spiteri et al. 2015). Typické chemické posuny sloučenin, meze stanovitelnosti a nejistoty měření tohoto experimentu jsou zobrazeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Chemické posuny, mez stanovitelnosti a nejistota měření vybraných sloučenin. Upraveno podle (Spiteri et al. 2015).

Sloučenina	Chemický posun pro kvantifikaci (ppm)	Chemický posun pro kontrolu (ppm)	Mez stanovitelnosti (g/100 g)	Nejistota měření (g/100 g)
glukóza	5,23 α -glukóza 3,24 β -glukóza	4,65; 3,51	5,000	1,0000 + 5 %
fruktóza	4,10	4,04; 3,58	5,000	1,0000 + 5 %
sacharóza	4,22	5,41; 4,20	1,000	0,5000 + 5 %
5-HMF	9,45	7,54; 6,69	0,001	0,0003 + 10 %
dihydroxyaceton (DHA)	4,41	-	0,001	0,0003 + 15 %
methylglyoxal (MGO)	2,31	1,38	0,001	0,0010 + 7 %
ethanol	1,17	-	0,001	0,0003 + 10 %

¹H NMR metabolomický přístup byl aplikován při charakterizaci finských medů různého botanického původu. Mezi zkoumanými medy byly např. pohankové, jetelové, pampeliškové, vřesové, medovicové, lipové, aj. PCA a OPLS-DA analýza umožnila úplné rozlišení pohankového, pampeliškového, vřesového a medovicového medu. U pohankového medu bylo zjištěno vyšší množství těchto aminokyselin: izoleucin, leucin, threonin, tyrosin, valin a navíc 4-hydroxybenzoové kyseliny. Izoleucin, leucin a valin se nachází v oblasti 1,1–0,9 ppm. Jako potenciální indikátor pohankového medu mohou sloužit také nepřirazené signály těchto binů: 5,04; 6,67; 6,70 a 6,80 ppm. Kromě melecitózy a trehalózy byly pro medovicový med nalezeny další charakteristické sloučeniny z alifatické a aromatické části spektra: kyselina fumarová, mléčná, jablečná a jantarová. Další marker byl pozorovatelný v oblasti 5,58 a 6,43 ppm. V lipovém medu byla kromě typického markeru 1-O- β -gentiobiosyl (6-O-(β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranosyl) esteru 4-(1-hydroxy-1-methylethyl)cyklohexa-1,3-dien-1-karboxylové kyseliny nejvíce přítomná gentiobióza. Bylo potvrzeno, že složení cukrů hraje důležitou roli při rozlišování medu. PCA primárního souboru dat ukázala, že melecitóza (bin 3,85; 3,63; 4,29; 5,18), typická pro medovicový med, byla společně s trehalózou (bin 3,63; 3,85; 5,18) jako hlavní složka zodpovědná za odlišení od medů květových. Druhou složkou

zodpovědnou za odlišení květových medů byla fruktóza (biny 3,79; 3,57; 3,55) a glukóza (3,73; 3,45) (Kortesniemi et al. 2016).

Také Ohmenhaeuser et al. (2013) potvrdili pomocí PCA analýzy rozlišení medovicového a květového medu díky glukóze a fruktóze. V experimentu bylo využito kombinace ^1H , ^{13}C NMR spektroskopie a chemometrické analýzy dat. Dále zjistili, že signály minoritních sloučenin, jako např. chinolinové alkaloidy a kyselina kynurenová u kaštanového medu nebo nenasycené karboxylové kyseliny lipového medu, mají také svůj význam při rozlišování botanického původu. Analýza poukázala také na složitost kvantifikace jednotlivých sloučenin kvůli velkému počtu překrývajících se signálů, a to především u cukrů. Pro kvantifikaci je nutné použití pokročilých metod, jakou je např. multivariační regrese. Nicméně bylo nalezeno 13 sloučenin, pro které lze identifikovat alespoň jeden jednoznačný signál, který nebyl překrytý nebo neinterferoval s matricí Ohmenhaeuser et al. (2013). Některé vybrané sloučeniny jsou shrnuty v tabulce 6.

Tabulka 6: Významné sloučeniny ^1H NMR spektra a oblasti jednoznačných signálů. Upraveno podle (Ohmenhaeuser et al. 2013).

Sloučenina	Oblast NMR spektra (ppm)
HMF	9,43–9,47 (singlet)
kyselina mravenčí	8,44–8,47 (singlet)
kyselina fumarová	6,53–6,55 (singlet)
kyselina pyrohroznová	6,42–6,45 (singlet)
glukóza	4,63–4,65 (singlet)
arabinóza	4,52–4,54 (singlet)
fruktóza	4,14–4,08 (doublet)
kyselina jablečná	2,73–2,70 (dva singlety)
kyselina citronová	2,69–2,68 (singlet)
kyselina jantarová	2,50–2,52 (singlet)

Boffo et al. (2012) identifikovali u 46 vzorků brazilského květového medu pomocí ^1H NMR sloučeniny zodpovědné za rozlišení botanického původu medů. Medy divoce kvetoucích rostlin byly charakterizovány vyšším obsahem fenylalaninu a tyrosinu. Citrusové medy měly vyšší obsah sacharózy než ostatních sloučenin a blahovičnickové medy měly vyšší obsah kyseliny mléčné (Boffo et al. 2012).

Fyzikálně-chemické vlastnosti i ^1H NMR profilování za účelem rozlišení geografického původu bylo provedeno u celkem 10 medů ze Slovenska, Jihoafrické republiky a Zambie. PCA a PLS-DA úspěšně zařadily vzorky medů do dvou rozdílných klastrů, ačkoliv u dvou vzorků ze Slovenska a 2 vzorků z JAR bylo nalezené podobné spektrum látek a oba měly nižší obsah sacharózy (Olawode et al. 2018).

Jako účinná metoda detekce falšování medu úmyslným přidáváním různých koncentrací komerčních cukerných sirupů se ukázala 1D a 2D NMR použitá spolu s multivariační statistickou analýzou. Zkoumáno bylo 63 autentických a 63 znehodnocených vzorků medu. K přípravě falšovaných medů bylo použito sedm různých cukerných sirupů běžně používaných pro výživu včel. Nejlepší diskriminační model byl získán pomocí 1D spekter, kdy křížová validace s vynecháním jednoho odlehlého měření vykazovala prediktivní kapacitu 95,2 %. 2D NMR spektra také poskytla přijatelné výsledky - křížová validace umožnila správně klasifikovat 90,5 % vzorků (Bertelli et al. 2010).

Problematika kvantifikace cukrů může být vyřešena použitím selektivních filtrů pro chemický posun (CSSF). Celá metoda se nazývá CSSF-TOCSY. Tento typ NMR umožňuje získat specifické signály bez pozadí pro každý cukr. Metoda byla testována na vzorcích medu rozpuštěných v D_2O , a to bez jakékoliv další předúpravy. Bylo identifikováno 22 cukrů, které se obvykle vyskytují v medu, viz kapitola 3.3.1. Cukry. Mez stanovitelnosti se pohybovala v rozmezí 0,03–0,4 g / 100 g medu a relativní směrodatná odchylka činila 0,99–4,03 %. Pro reprodukovatelnost výsledků je nutná přesná regulace přístrojové teploty a pH vzorku, které má významný vliv na chemický posun. Pokud je vše dodrženo, postup metody je možné automatizovat a využít při rutinní analýze (Schievano et al. 2017).

Během několika posledních let došlo ke značnému úbytku pozitivních nálezů falšovaných medů pomocí konvenčních analýz. To však neznamená, že by k falšování medu nedocházelo (Spengler et al. 2019). Proto byla vyvinuta speciálně upravená metoda NMR tzv. „FoodScreener“, kterou lze využít při analýze potravin, konkrétně vína, džusu a medu, a která naplňuje zvyšující se potřebu po necílových metodách schopných odhalit stále více sofistikovanější způsoby falšování potravin. Vývoj tohoto nástroje se datuje přibližně 10 let nazpět a jeho používání je umožněné i osobám nespécializovaným na NMR. Začátek profilování medu se datuje do roku 2014, kdy bylo provedeno první měření. ALNuMed (Analytická laboratoř pro výživu a zdravotnické výrobky) vyvinula v roce 2011 metodu založenou na NMR pro testování kvalitativních parametrů medu. Následně ALNuMed – v úzké spolupráci s FoodQS – vytvořili konsorcium s firmou Bruker BioSpin a QSI pro vývoj metody Honey-Profiling, která je nyní k dispozici pro testování medu (ALNuMed 2019).

Nutností je vytvoření databáze referenčních vzorků, která umožní správné vyhodnocení později zkoumaných vzorků. Metoda je akreditována ISO normou 17025. V současnosti je využívána databáze „Honey-profiling 2.0“, která zahrnuje přibližně 18 000 vzorků medu, 100 různých botanických druhů z více jak 50 geografických oblastí. Procentuální zastoupení vzorků v databázi je: 53 % Evropa, 27 % USA, 16 % Asie, 2,6 % Austrálie a Oceánie a 1,4 % Afrika. Před tím, než jsou vzorky přidány do databáze, jsou důkladně prověřeny a charakterizovány pomocí několika testů. Nefalšované vzorky jsou použity pro rozvoj a validaci modelu.

Statistický model byl vytvořen pro:

- ověření geografického původu, které zahrnuje tyto země: Argentina, Brazílie, Chile, Čína, Kuba, Francie, Německo, Guatemala, Maďarsko, Indie, Mexiko, Nový Zéland, Rumunsko, Španělsko, Thajsko, Turecko, Ukrajina a Vietnam.
- ověření botanického původu, zahrnující 12 jednodruhových medů: akátový, vřesový, kaštanový, blahovičnickový, levandulový, lipový, manukový, pomerančový, borovicový, řepkový, slunečnicový a med z drmku.

Pracovní postup přípravy vzorků i akvizice spekter plně podléhá SOP. Po navázení a rozpuštění medu je ke vzorku automaticky přidán pufr a upraveno pH. Najednou lze měřit 20 vzorků. Analýza dat probíhá pomocí vzdáleného serveru (Spengler et al. 2019).

K výhodám NMR přizpůsobené konkrétně pro analýzu medu patří např.:

- jednoduchá a rychlá příprava vzorku,
- rychlost měření – cca 20 minut,
- prověření nepovoleného přídavku cukerných sirupů – nezávisle na rostlinném původu C3 nebo C4 pomocí pokročilých statistických metod a markerů,
- prověření neznámého způsobu falšování srovnáním s tisíci autentickými medy,
- ověření botanického a geografického původu – i po odstranění pylu,
- kvantifikace nejdůležitějších parametrů jakosti medu i mnoha nových markerů (ALNuMed 2009; Spengler et al. 2019).

Při necílené analýze je výsledkem obsáhlá zpráva, která zahrnuje informace o čistotě, pravosti a kvalitě medu. Cílená analýza umožňuje kvantifikaci 36 sloučenin, viz příloha 2.

4 Metodika

4.1 Materiál

Celkem bylo analyzováno 20 vzorků medu získaného v roce 2017, které byly poskytnuty Výzkumným ústavem včelařským v Dole, kde byly dříve analyzovány. Výsledky analýz z Výzkumného ústavu jsou shrnuty v příloze č. 1. Z celkového počtu vzorků bylo 8 medů medovicových a 12 květových. Z květových medů byl zastoupen jeden pohankový, jeden malinový, jeden akátový, dva lipové (z toho jeden označený jako květový smíšený), dva řepkové a jeden byl deklarovaný jako řepkový a ovocné stromy. Dva květové medy byly označeny pouze jako květové a dva jako květové smíšené. Vzorky pocházely z různých míst České republiky. Všechny vzorky byly před analýzou uchovávané v temnu při pokojové teplotě 18–23 °C v plastových zkumavkách se šroubovacím uzávěrem.

4.1.1 Spotřební materiál

- Mikrozukavky značky VWR 1,5 ml (CZ)
- Pipetovací špičky značky Eppendorf (CZ)
- NMR kyvety Norell 5 mm, High-Throughput 7“ Standard series (USA)

4.1.2 Chemikálie

- Deionizovaná voda, vodní purifikační jednotka Direct-Q[®] 3 UV
- NMR pufr byl připraven použitím D₂O (čistota 99,9 %), 0,2 % NaN₃, 5 mM TSP (čistota 98 %), 1,5 M K₂HPO₄ (čistota 99 %), 1,5 M NaH₂PO₄ (čistota 99 %). Všechna použitá činidla byla od výrobce Sigma Aldrich. pH pufru bylo upraveno na hodnotu pH 4 pomalým přidavkem 1,5 M roztoku NaH₂PO₄ do 1,5 M roztoku K₂HPO₄ s pomocí pH metru.

4.2 Metody

4.2.1 Software

- Topspin 3.5 pl7, Bruker (DE)
- Chenomx NMR suite 8.3, Chenomx Inc. (CA)
- Mestrenova 12.0.03, Mestrelab Research (ESP)

- Metaboanalyst 4.0 (CA)
- Microsoft Excel 2016 (USA)

4.2.2 Přístroje

- ph metr inoLab[®] pH 7110, WTW, (DE)
- Termostat – BIOLOGICAL THERMOSTAT BT 120
- Pipety VWR 20–200 μ l a 100–1000 μ l (CZ)
- Váha RADWAG Wagi Elektroniczne, e = 1 mg, d = 0,01 mg, AS 82/220.R2 (PL)
- Vortex IKA[®] MS 3 Basic (DE)
- Ultrazvuková lázeň Witeg, Ultrasonic Cleaner Set, WUC-A03H (DE)
- NMR spektrometr Bruker AVANCE III HD 500 MHz (DE)

4.2.3 Příprava vzorku

Všechny vzorky medu byly na 1 hodinu umístěny do termostatu, kde byly při 45 °C rozehrívány, aby došlo k jejich homogenizaci a rozpuštění vzniklých krystalů. Poté byly ponechány při pokojové teplotě. Od každého vzorku bylo do mikrozkušavky ve dvou opakováních naváženo 240 mg medu s odchylkou \pm 10 mg a navážka byla zaznamenána. Ke každému vzorku medu bylo napipetováno 830 μ L deionizované vody. Vzniklý roztok deionizované vody a medu byl vortexován, až do doby viditelného rozpuštění medu. Pro ještě lepší homogenizaci byly vzorky na 5 min umístěny do ultrazvukové lázně. Z takto připraveného roztoku bylo odpipetováno 540 μ L do čisté mikrozkušavky a k tomu bylo přidáno 60 μ L NMR pufru. Všechny mikrozkušavky se vzorky byly po dobu 10 s znovu vortexovány. Celkový objem 600 μ L vzorku byl kvantitativně pomocí pipety převeden do NMR kyvet.

4.2.4 Parametry měření ¹H NMR spekter

Měření ¹H NMR spekter bylo provedeno na spektrometru Bruker AVANCE III HD 500 MHz, vybaveném 5 mm PA BBO 500S1 BBF-H-D-05 Z SP sondou s cívkami se Z gradientem, a pracujícím při 500,23 MHz. Všechna měření byla provedena při teplotě 298 K. ¹H NMR spektra byla změřena s pomocí pulzní sekvence 1d noesy se supresí vody. ¹H NMR spektra byla snímána s následujícími parametry: počet skenů 128, počet datových bodů 64k, šířka spektra 16,0182 ppm, relaxační prodleva 1 s, akviziční čas 4,0894 s, směšovací čas 100 ms. Ladění, zamykání, kalibrace 90° pulzu a shimming byly automaticky

optimalizovány pomocí standardních příkazů (atma, lock, pulsecal a topshim). Všechny vzorky byly vloženy do autosampleru a automaticky měřeny využitím nástroje Spooler v softwaru Topspin. Všechna spektra byla zpracována za použití softwaru Topspin. Korekce fáze a korekce základní linie tzv. baseline byly provedeny manuálně pro každé jednotlivé spektrum. Reference byla upravena na signál TSP 0,00 ppm.

4.2.5 Statistické zpracování

Data získaná z binningu spekter provedeném v programu Mestrenova v. 12.0.03 od 0,50–10,00 ppm se šířkou jednoho binu 0,01 ppm a po odstranění oblasti suprese vody 4,60–4,70 ppm, byla dále analyzována pomocí softwaru MetaboAnalyst 4.0.

V softwaru MetaboAnalyst 4.0 byla data normalizována podle sumy, logaritmičticky transformována a automaticky škálována. Z multivariačních statistických analýz byla nejprve použita analýza hlavních komponent PCA. Poté byla aplikována diskriminační analýza PLS-DA a OPLS-DA. Validace modelu byla provedena při 1000 permutacích. Pro zjištění významných binů (VIP), které odlišují jednotlivé třídy byly p(corr) hodnoty z OPLS-DA násobené směrodatnou odchylkou (SD) jednotlivých binů. Takto získaná data byla názorně zobrazena jako loadingplot. Loadingplot významných binů byl zobrazen také podle významnosti p-hodnot (p-value), obojí v programu Microsoft Excel 2016.

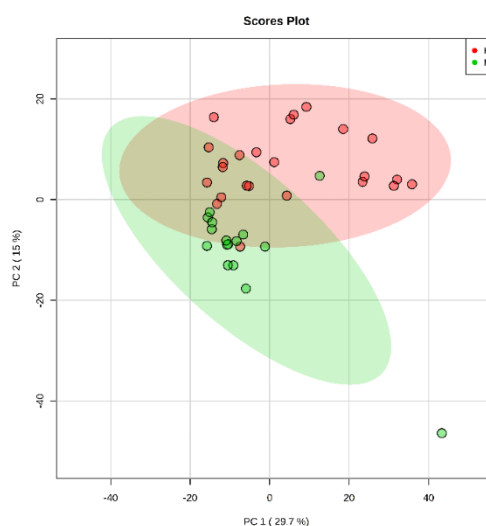
Přiřazení signálů ^1H NMR spekter bylo prováděno na základě významných binů z loadingplotu OPLS-DA blíže upřesněných pomocí softwaru Chenomx NMR suite v. 8.3. a také porovnáním s výsledky dostupné vědecké literatury (Consonni et al. 2013; Ohmenhaeuser et al. 2013; Spiteri et al. 2015; Kortesiemi et al. 2016; Zheng et al. 2016).

5 Výsledky

5.1 PCA analýza

Analýza hlavních komponent (PCA) je mnohorozměrnou nesupervizovanou statistickou metodou, která je vhodná pro rozlišování, třídění a identifikaci vzorků, pokud je více proměnných. Slouží k nalezení hlavních komponent, které jsou zodpovědné za rozptyl mezi proměnnými.

PCA analýza ukázala, že hlavní složka PC1 přispěla k celkové variabilitě tříd květového a medovicového medu 29,7 %. Složka PC2 přispěla k rozdělení 15 %, PC3 přispěla 12,8 %, PC4 5,8 % a PC5 5,5 %. Vzorky medovicových a květových medů je podle PCA analýzy na základě PC1 a PC2 možné rozdělit do dvou odlišných tříd, viz obrázek 2.



Obrázek 2: PCA rozptylový diagram komponentních skóre (scores plot) PC1 a PC2.

5.2 PLS-DA a OPLS-DA

Diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců PLS-DA potvrdila odlišnost květových a medovicových medů, viz obrázek 3. PLS-DA inklinuje k tzv. „overfit“ přefitování dat (vzhledem k malému počtu vzorků a mnohonásobně většímu množství proměnných – binů). Proto je nutné ověření modelu, aby se zjistilo, zda je separace statisticky významná nebo je způsobena náhodným šumem. K tomu bylo použito křížové validace „cross validation“, viz tabulka 7.

Tabulka 7: Detaily křížové validace PLS-DA.

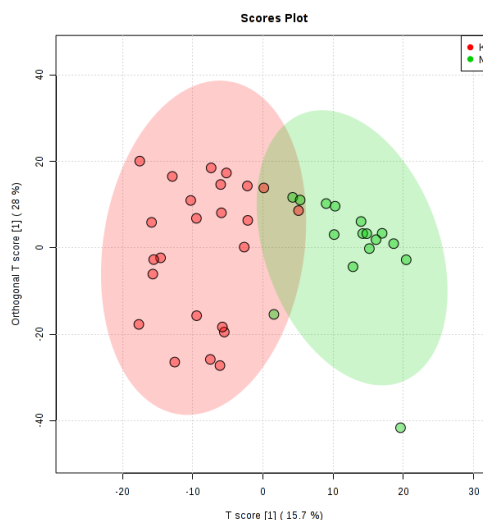
	1 comps	2 comps	3 comps	4 comps	5 comps
přesnost	0,86	0,90	0,92	0,90	0,98
R2	0,67679	0,77007	0,86956	0,91438	0,95232
Q2	0,52190	0,62506	0,64019	0,58020	0,57714

Křížová validace PLS-DA naznačila validitu modelu, pokud je R2 a Q2 >0,6. Tato podmínka je splněna při použití 3 komponent, kdy R2 = 0,86956; Q2 = 0,64019.



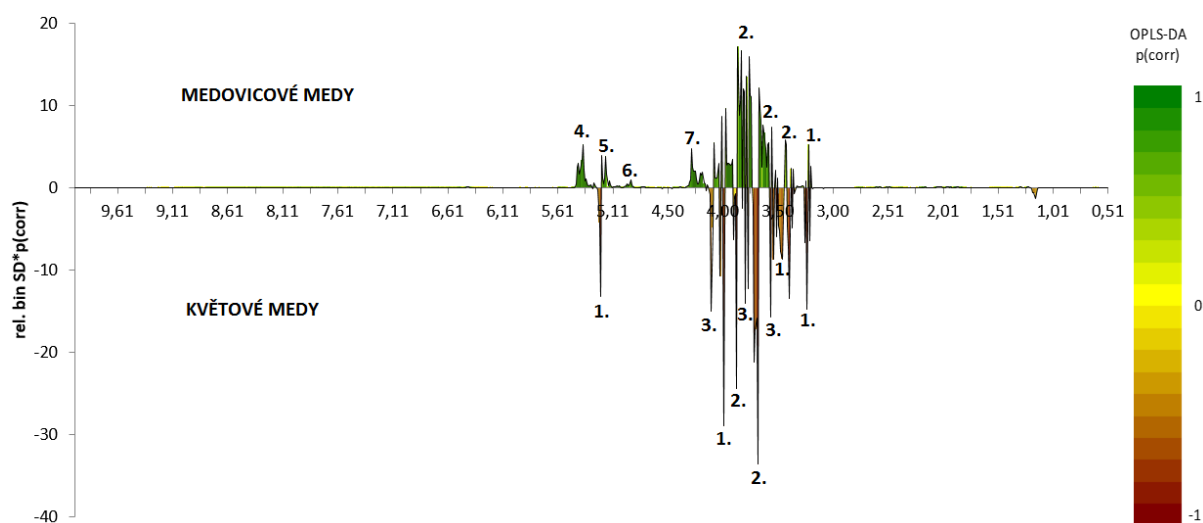
Obrázek 3: PLS-DA diagram komponentních skóre (scores plot) komponent 1 a 2.

Pro další ověření modelu byla použita ortogonální diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců OPLS-DA, která je zobrazena na obrázku 4. Validace tohoto modelu pomocí permutačních testů při 1000 permutacích shledala model jako validní, kdy $p < 0,001$; Q2 = 0,653 a R2Y = 0,77.



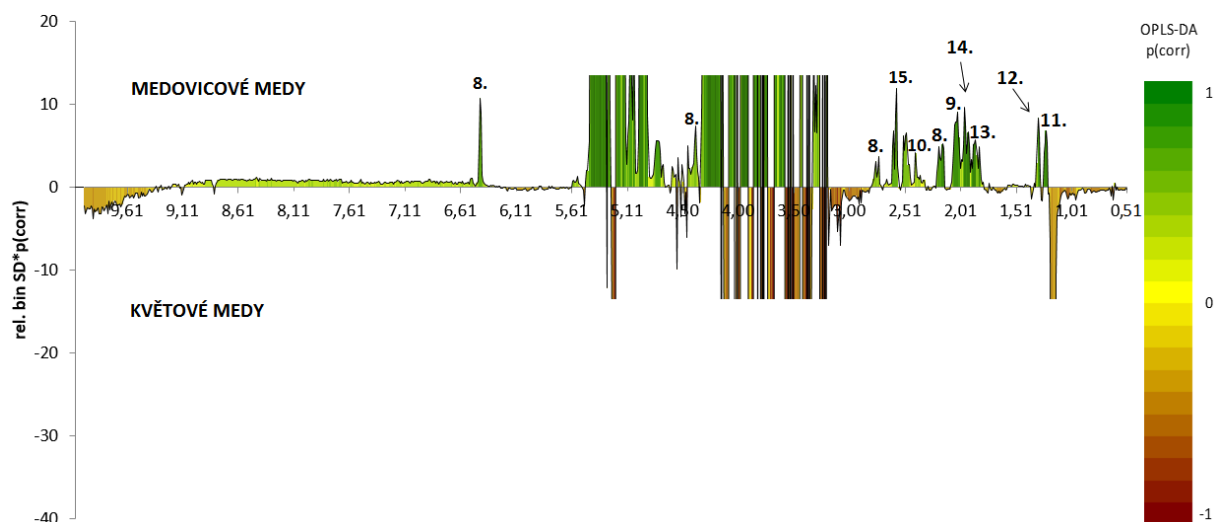
Obrázek 4: OPLS-DA diagram komponentních skóre (scores plot).

Grafické znázornění binů zodpovědných za separaci tříd květového a medovicového medu získané násobením $p(\text{corr})$ hodnot z OPLS-DA a směrodatnou odchylkou (SD) jednotlivých binů je zobrazeno na obrázku 5.



Obrázek 5: Loadingplot binů spekter medu, jednotlivé posuny jsou barevně zvýrazněné podle VIP score – jejich směr ukazuje na výraznější zastoupení v jedné nebo druhé kategorii.

Protože se biny, a tedy i signály zodpovědné za rozlišení obou kategorií nachází také v dalších částech spektra, které nejsou patrné z obrázku 5, přibližná oblast loadingplotu s dalšími biny je znázorněná na obrázku 6. Vysvětlivky k obrázkům jsou popsány v tabulce 8 níže.



Obrázek 6: Loadingplot binů spekter medu, jednotlivé posuny jsou barevně zvýrazněné podle VIP score – jejich směr ukazuje na výraznější zastoupení v jedné nebo druhé kategorii.

Tabulka 8: Vysvětlivky k obrázku 5 a 6, biny zodpovědné za separaci tříd.

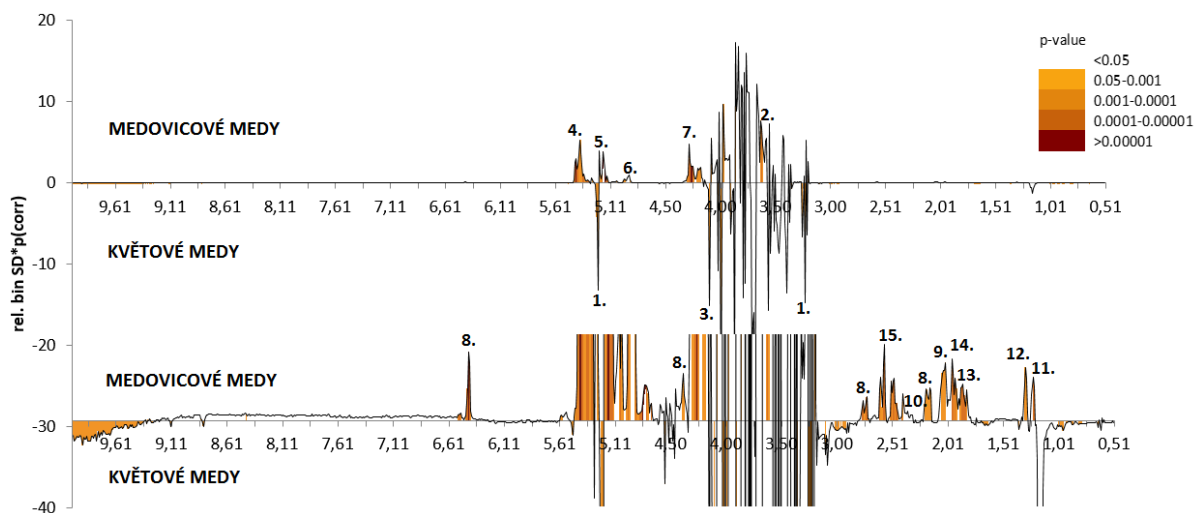
Číslo	Sloučenina	Chemický posun (ppm)
1.	glukóza	(β -) 3,20–3,25; 3,36–3,48; 3,86; (α -) 5,22
2.	glukóza + fruktóza	3,61–3,71; 3,86; 3,42–3,55 → společná oblast „3,65–3,90“
3.	fruktóza	4,10; 3,58; 3,77–3,79
4.	sacharóza, maltóza, maltotrióza, erlóza + (kestóza, kojibióza, panóza, rafínóza, nigeróza, melecitóza)	4,18–4,20; 5,30–5,47
5.	melecitóza, *trehalóza	5,12–5,18; 5,20; (*3,86; 3,63)
6.	neznámé (isomaltóza, isomaltotrióza, panóza, rafínóza)	4,97–4,99; 5,01; 5,03; 5,05–5,07
7.	neznámé (kestóza, maltulóza, turanóza, melezitóza, threonine)	4,24–4,28
8.	kyselina šikimová	2,16–2,21; 2,72–2,77; 4,37–4,39; 6,41–6,44
9.	prolin	2,03–2,06
10.	kyselina jantarová	2,41–2,42
11.	neznámé	1,23–1,24
12.	neznámé (kys. mléčná, threonine)	1,31
13.	neznámé	1,84–1,89
14.	neznámé	1,93–1,97
15.	neznámé	2,45–2,52; 2,57–2,61

Z výsledků loadingplotu je patrné, že pro medovicové medy je typická přítomnost melecitózy a trehalózy (5). Další sloučeninou pro rozlišení medovicového medu byla kyselina šikimová (8) a aminokyselina prolin (9). Dále se u nich vyskytovala sacharóza, maltóza, maltotrióza, erlóza (4), přičemž se v této oblasti mohly vyskytovat i další minoritní cukry uvedené v závorce. Obecně je oblast 3–6 ppm v ^1H NMR spektru, typická pro cukry, velmi bohatá na signály, které se vzájemně překrývají (důvodem je podobná struktura) a proto je jejich objasnění, především těch minoritních, komplikované.

U několika oblastí nebylo možné přesně určit o jaké sloučeniny se jedná, u medovicového medu však byly významné (6, 7, 11–15). S využitím literatury, kde byla analyzována ^1H NMR spektra, je u některých vysvětlivek v závorkách uvedeno, o jaké sloučeniny by se pravděpodobně mohlo jednat.

Pro medy květové je patrná vyšší intenzita signálů v oblastech chemického posunu, kde se nachází glukóza (1) a fruktóza (3) a obě tyto sloučeniny společně (2).

Loadingplot, barevně zvýrazněný podle významnosti p-hodnot (p-value) binů zodpovědných za rozlišení květových a medovicových medů, je zobrazen na obrázku 7. Vysvětlivky k obrázku 7 jsou uvedeny v tabulce 9 pod obrázkem.



Obrázek 7: Loadingplot binů spekter medu, jednotlivé posuny jsou barevně zvýrazněné podle p-hodnot (p-value) – jejich směr ukazuje na výraznější zastoupení v jedné nebo druhé

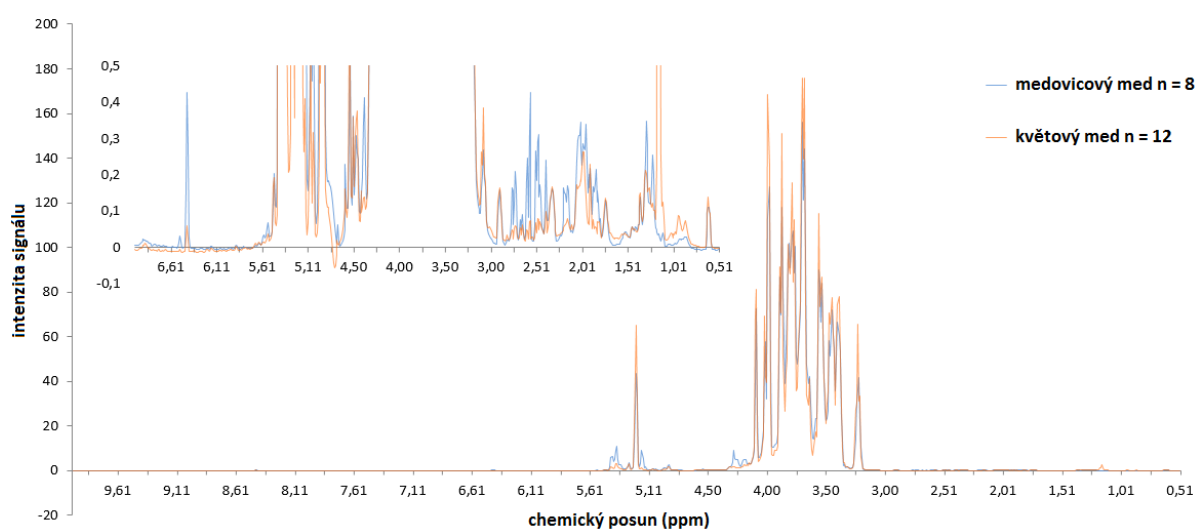
Tabulka 9: p-hodnoty jednotlivých sloučenin významných pro rozlišení kategorií medu.

p-hodnota	číslo
<0,05	6, 10
0,05–0,001	9
0,001–0,0001	2, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15
0,0001–0,00001	1, 3
>0,00001	-

Ze známých sloučenin, které byly nejvýznamnější pro rozlišení kategorií medu, je dle p-hodnot v rozmezí 0,0001–0,00001 glukóza a fruktóza (1, 3), které byly signifikantní u květového medu. Dalšími významnými sloučeninami, p-hodnota 0,001–0,0001, byly sacharóza, maltóza, maltotrióza a erulóza (4); melecitóza a trehalóza (5) a kyselina šikimová (8) – významné u medovicového medu. U prolinu (9) byla p-hodnota 0,05–0,001 a u kyseliny jantarové (10) <0,05.

Podle p-hodnot byly identifikovány také tyto sloučeniny: kyselina fumarová (6,50–6,52 ppm), kyselina mravenčí (8,43 ppm) a trigonelin (8,82 a 9,11 ppm). Žádná z těchto sloučenin nebyla zodpovědná za rozlišení kategorií.

Obrázek 8 zobrazuje průměrné spektrum květového a medovicového medu v oblasti 0,51–9,61 ppm s přiblíženou oblastí spektra 0,51–6,61 ppm. Průměrná spektra obou druhů medu se překrývají, ale některé rozdíly jsou i z průměrných spekter patrné. Nejvíce rozdílů je vidět v přiblížené alifatické oblasti spektra 1–3 ppm, kde je vyšší intenzita signálů u medovicových medů. Z objasněných sloučenin se jedná o kyselinu šikimovou, jantarovou a prolin. Intenzita signálů v oblasti 3–6 ppm, která je typická pro majoritní cukry medu glukózu a fruktózu, je vyšší u květového medu.



Obrázek 8: Průměrné spektrum květového a medovicového medu v překryvu.

6 Diskuze

Podle očekávání nejintenzivnější a nejdominantnější signály v ^1H NMR spektrech medu náležely cukrům (chemický posun 3,0–5,5 respektive 6 ppm), typicky α - a β -glukóza a fruktóza. V této oblasti byly detekovány také další sacharidy včetně disacharidů maltózy a sacharózy nebo trisacharidů erlózy a maltotriózy. Z důvodu překryvu signálů však není jasné, jak významný příspěvek měl každý sacharid jednotlivě. Podle (Gerhardt et al. 2016) byly signály maltózy a sacharózy prakticky identické ve všech analyzovaných vzorcích medu s velmi malými odchylkami intenzity. V této oblasti se mohou vyskytovat i signály dalších minoritních cukrů, jako např. kestóza, kojibióza, panóza, rafinóza, nigeróza nebo melecitóza.

Trisacharid melecitóza byl již dříve identifikován jako marker medovicových medů (Doner 1977). Melecitóza byla určena jako významná ($p = 0,001 - 0,0001$) a její signály se nachází stejně jako u ostatních cukrů i v dalších oblastech ^1H NMR spektra. Se stejnou významností jako melecitóza pro medovicový med byla nalezena i trehalóza (Kortesniemi et al. 2016).

Přítomnost dalšího trisacharidu erlózy byla také potvrzena jako významná pro rozlišení medovicového medu. Tento výsledek je v souladu s další vědeckou studií, ve které bylo zjištěno, že medovicové medy jsou typické vyšším obsahem trisacharidů melecitózy, erlózy, rafinózy a maltotriózy (Bogdanov et al. 2004). Ačkoliv rafinózu nebylo možné jasně odlišit od ostatních signálů, oblast spektra, ve které je přítomný její signál, byla označena jako významná pro odlišení medovicového medu.

U medovicových medů byly identifikovány i další oblasti cukrů, u kterých však nebylo možné vlivem překryvu signálu odlišit, jaké příspěvky jednotlivé cukry vykazovaly. Široké spektrum cukrů a zejména oligosacharidů v medovicovém medu je známé již z dřívější studie (Doner 1977).

Alifatická část spektra 0–3 ppm byla dle studie Beretta et al. (2008) shledána jako významná oblast medovicových medů. Významné signály medovicového medu v této oblasti měla kyselina šikimová, která rezonuje i v dalších částech spektra, a kyselina jantarová. Podle Schwarzinger et al. (2016) byla v medovicových medech jako klíčová sloučenina nalezena právě kyselina šikimová společně s kyselinou jantarovou. Kyselina jantarová může sloužit zároveň jako indikátor fermentace (Missler et al. 2018). Relevantní informace pro rozlišení původu medu jsou tedy skryté nejen v oblasti majoritních sloučenin, jako jsou cukry, ale také v oblastech minoritních složek.

Medovicový med, na jehož vzniku se významnou částí podílí hmyz, má právě díky tomu významné spektrum aminokyselin, jako je např. prolin, který je zodpovědný za vyzrálost medu (Iglesias et al. 2004). Jako marker medovicového medu byl prolin označen ve studii (Chua & Adnan 2014). Ostatní aminokyseliny nebylo možné blíže specifikovat, přesto byla oblast jejich typických signálů ve spektru označena za významnou právě pro medovicové medy.

Další rozdíly mezi květovými a medovicovými medy, které mohou být díky rozmanitosti medů celého světa odlišné, byly shrnuty v přehledovém článku (Pita-Calvo & Vázquez 2017).

Pro dobré rozlišení medů je potřebné vytvoření rozsáhlé databáze NMR spekter, jak uvádí např. Spengler et al. (2019). Tyto databáze jsou velmi užitečným pomocníkem při analýze nových vzorků a pro využití NMR profilování v rutinní analýze jsou naprosto nezbytné. Schievano et al. (2019) využili databáze 2000 vzorků 45 různých botanických druhů, což jim umožnilo nalézt charakteristickou oblast spektra pro řepkový med, který je i v České republice velmi často produkován. V této práci byly zastoupeny tři řepkové medy a další druhy květových medů, jako např. lipový, akátový, pohankový nebo malinový. Pro další analýzy bude vhodné zaměřit se právě na rozdíly mezi jednotlivými květovými medy, jejichž spektrum je velmi široké. Nutno dodat, že i v rámci porovnání celé této různorodé skupiny květových medů, i přes malý počet analyzovaných vzorků, bylo možné nalézt rozdíly od medovicových medů.

U květových medů převažuje glukóza a fruktóza, což je v souladu s legislativními požadavky vyhlášky č. 76/2003, která uvádí, že součet obsahů fruktózy a glukózy u květového medu musí být nejméně 60,0 % hmot. a u medovicového 45,0 % hmot. Jiný typický marker skupiny květových medů nebyl nalezen. Zajímavé však bylo spektrum pohankového medu, který byl zastoupen jedním vzorkem. U tohoto medu byla patrná významná oblast, kde se nachází aminokyseliny valin, leucin a izoleucin, což je v souladu s výsledky analýz finských medů (Kortesniemi et al. 2016). Porovnávání jednotlivých květových medů sice nebylo cílem práce, ale lze usoudit, že zvolená metoda by mohla být vhodná právě i pro nalezení markerů jednotlivých květových medů, z nichž některé byly zmíněné v literární rešerši.

Problematika falšování medu je velmi složitá a vzhledem k obchodování s medem po celém světě nelze zamezit mísení medů z různých států a vzniku směsí medů, které jsou definovány ve směrnici EP a Rady 2014/63/EU, stejně jako byly implementovány do vyhlášky č. 76/2003 Sb. a jejích pozdějších změn. Tato možnost směsí medů alespoň v České republice nejčastěji přispívá ke kauzám, které byly shrnuty v kapitole 3.4.1. Kauzy v ČR. Podle nejaktuálnějších údajů SZPI a SVS se med řadí na první místo problematických potravin.

Právě nukleární magnetická rezonance je však velmi dobrou analytickou metodou, která je vhodná pro rutinní analýzu medů a je schopná rozlišit různé druhy medů a způsoby jejich falšování, ať už je to přídavek cukerných sirupů, nebo nesprávná deklarace botanického a geografického původu.

7 Závěr

V této práci bylo ^1H NMR profilováním s pomocí multivariačních statistických metod umožněno rozlišit mezi medovicovými a květovými medy. Bylo nalezeno několik typických markerů pro rozlišení květových a medovicových medů.

Květové medy vykazovaly vyšší intenzitu signálů těchto sloučenin:

- glukóza a fruktóza (p-hodnota 0,0001–0,00001).

Jako markery medovicových medů byly určeny tyto sloučeniny:

- melecitóza, trehalóza, erlóza, sacharóza, maltóza, maltotrióza a kyselina šikimová (p-hodnota 0,001–0,0001),
- prolin (p-hodnota 0,05–0,001),
- kyselina jantarová (p-hodnota <0,05).

Vlivem překryvu některých signálů, především cukrů, nebylo možné všechny významné signály přiřadit konkrétním sloučeninám. I přes to ^1H NMR umožnila od sebe květové a medovicové medy dobře rozlišit. Validace modelu byla potvrzena pomocí permutačních testů, kdy $p < 0,001$; $Q^2 = 0,653$ a $R^2Y = 0,77$.

Tato metoda by do budoucna mohla pomoci také u nás pro rutinní analýzu a případné udělení známky květový nebo medovicový med, či odhalení různých způsobů falšování medu. Použití metody je potřeba ještě optimalizovat, potvrdit na větší sadě vzorků a vytvořit nový predikční model.

K optimalizaci metody by mohla významně přispět také spolupráce s ostatními laboratořemi, ve kterých se využívá metody Honey-Profiling. Tyto laboratoře již pracují s širokou databází referenčních vzorků, která se neustále rozšiřuje. Případnou možnost spolupráce a zapojení do společného výzkumu je zapotřebí ještě ověřit.

8 Literatura

- Adams CJ, Manley-Harris M, Molan PC. 2009. The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate Research* **344**:1050–1053.
- Alonso-Torre SR, Cavia MM, Fernández-Muiño MA, Moreno G, Huidobro JF, Sancho MT. 2006. Evolution of acid phosphatase activity of honeys from different climates. *Food Chemistry* **97**:750–755.
- ALNuMed Analytical laboratory for nutrition and medical products. 2019. Honey-Profiling is a novel fast screening method for simultaneously testing authenticity and quality of honey. Bayeruth, Germany. Available from <http://www.honey-profiling.com/index.php?id=110> (accessed March 2019).
- Báčová P. 2018. V českých jídelničních přibývá medu. ČSÚ. Available from <https://www.czso.cz/csu/czso/v-ceskych-jidelniccich-pribyva-medu> (accessed March 2019).
- Beretta G, Caneva E, Regazzoni L, Bakhtyari NG, Maffei Facino R. 2008. A solid-phase extraction procedure coupled to ¹H NMR, with chemometric analysis, to seek reliable markers of the botanical origin of honey. *Analytica Chimica Acta* **620**:176–182.
- Bertelli D, Lolli M, Papotti G, Bortolotti L, Serra G, Plessi M. 2010. Detection of honey adulteration by sugar syrups using one-dimensional and two-dimensional high-resolution nuclear magnetic resonance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**:8495–8501.
- Boffo EF, Tavares LA, Tobias ACT, Ferreira MMC, Ferreira AG. 2012. Identification of components of Brazilian honey by ¹H NMR and classification of its botanical origin by chemometric methods. *LWT - Food Science and Technology* **49**:55–63.
- Bogdanov S, Ruoff K, Persano Oddo L. 2004. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie* **35**:4–17.
- Castro-Vázquez L, Díaz-Maroto MC, Pérez-Coello MS. 2006. Volatile composition and contribution to the aroma of spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:4809–4813.
- Chua LS, Adnan NA. 2014. Biochemical and nutritional components of selected honey samples. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria* **13**:169–179.
- Consonni R, Cagliani LR, Cogliati C. 2013. Geographical discrimination of honeys by saccharides analysis. *Food Control* **32**:543–548.
- ČSÚ. 2018. Spotřeba potravin a nealkoholických nápojů (na obyvatele za rok). ČSÚ. Available from <https://www.czso.cz/documents/10180/61565936/2701391801.pdf/e7d7123e-b288-4336-92b2-f8be22ebdae8?version=1.1> (accessed March 2019).

- ČTK. 2019. Medu je nejméně za poslední čtyři roky. Na produkci včel se podepsalo sucho. Hospodářské noviny. Available from https://domaci.ihned.cz/c1-66505230-v-cesku-je-nejmene-medu-za-posledni-ctyri-roky-na-produkci-vcel-se-podepsalo-sucho?utm_source=mediafed&utm_medium=rss&utm_campaign=mediafed (accessed March 2019).
- da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. 2016. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry* **196**:309–323.
- Doner LW. 1977. The sugars of honey—A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **28**:443–456.
- Evropský parlament a Rada Evropské unie. 2011. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 ze dne 25. října 2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 a (ES) č. 1925/2006 a o zrušení směrnice Komise 87/250/EHS, směrnice Rady 90/496/EHS, směrnice Komise 1999/10/ES, směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/13/ES, směrnice Komise 2002/67/ES a 2008/5/ES a nařízení Komise (ES) č. 608/2004. Pages 18–63 in *Úřední věstník Evropské unie*, 2011, L 304. Štrasburk.
- Evropský parlament a Rada Evropské unie. 2014. Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2014/63/EU ze dne 15. května 2014, kterou se mění směrnice Rady 2001/110/ES o medu. Pages 1–5 in *Úřední věstník Evropské unie*, 2014, L 164. Brusel.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1981. CODEX STANDARD FOR HONEY. Pages 1–8 in *CODEX STAN 12-1981*¹, 1981. Řím.
- García-Alvarez M, Ceresuela S, Huidobro JF, Hermida M, Rodríguez-Otero JL. 2002. Determination of polarimetric parameters of honey by near-infrared transreflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**:419–425.
- Gheldof N, Engeseth NJ. 2002. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**:3050–3055. Available from <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0114637>.
- Haragsim O. 2005. *Medovice a včely*, 2. dopl. vyd. Brázda, Praha.
- Hermosín I, Chicón RM, Cabezudo MD. 2003. Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chemistry* **83**:263–268.
- Iglesias MT, De Lorenzo C, Polo MDC, Martín-Álvarez PJ, Pueyo E. 2004. Usefulness of amino acid composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**:84–89.
- Iglesias MT, Martín-Álvarez PJ, Polo MC, De Lorenzo C, González M, Pueyo E. 2006. Changes in the free amino acid contents of honeys during storage at ambient temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:9099–9104.

- Kopřiva P. 2014. Aktuální výsledky kontrol medů v obchodní síti. SZPI. Available from <https://www.bezpecnostpotravin.cz/aktualni-vysledky-kontrol-medu-v-obchodni-siti.aspx> (accessed March 2019).
- Kopřiva P. 2017. Kvalita prodávávaného medu je stále nevyhovující – polovina je falšovaná. SZPI. Available from <https://www.bezpecnostpotravin.cz/kvalita-prodavaneho-medu-je-stale-nevyhovujici-polovina-je-falsovana.aspx> (accessed March 2019).
- Kopřiva P. 2018. Potravinářská inspekce při mimořádné kontrole zjistila 31,5 tuny nelegálního medu. SZPI. Available from <https://www.bezpecnostpotravin.cz/potravinarska-inspekce-pri-mimoradne-kontrole-zjistila-31-5-tuny-nelegalniho-medu.aspx> (accessed March 2019).
- Kortesniemi M, Slupsky CM, Ollikka T, Kauko L, Spevacek AR, Sjövall O, Yang B, Kallio H. 2016. NMR profiling clarifies the characterization of Finnish honeys of different botanical origins. *Food Research International* **86**:83–92.
- León-Ruiz V, Vera S, González-Porto A V., San Andrés MP. 2013. Analysis of Water-Soluble Vitamins in Honey by Isocratic RP-HPLC. *Food Analytical Methods* **6**:488–496.
- Lolli M, Bertelli D, Plessi M, Sabatini AG, Restani C. 2008. Classification of Italian honeys by 2D HR-NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**:1298–1304.
- Machado De-Melo AA, Almeida-Muradian LB de, Sancho MT, Pascual-Maté A. 2018. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research* **57**:5–37.
- Manivanan P, Madapuji Rajagopalan S, Subbarayalu Professor M, Mohankumar Subbarayalu Professor C, Subbarayalu M. 2018. Studies on authentication of true source of honey using pollen DNA barcoding. ~ 255 ~ *Journal of Entomology and Zoology Studies* **6**:255–261.
- Ministerstvo zemědělství. 2005. Vyhláška č. 43/2005 Sb. ze dne 11. ledna 2005, kterou se mění vyhláška č. 76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. Pages 298-299 in *Sbírka zákonů České republiky, 2005, částka 10. Česká republika*
- Ministerstvo zemědělství. 2015. Vyhláška č. 148/2015 Sb. ze dne 11. ledna 2015, kterou se mění vyhláška č. 76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony, ve znění vyhlášky č. 43/2005 Sb. Pages 1917-1918 in *Sbírka zákonů České republiky, 2015, částka 61. Česká republika*.
- Ministerstvo zemědělství. 2003. Vyhláška č. 76/2003 Sb. ze dne 6. března 2003, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. Pages 2470-2487 in *Sbírka zákonů České republiky, 2003, částka 32. Česká republika*.
- Ministerstvo zemědělství. 2016. Vyhláška č. 417/2016 Sb. ze dne 13. prosince 2016 o některých způsobech označování potravin. Pages 6442-6448 in *Sbírka zákonů České republiky, 2016, částka 170. Česká republika*.

- Missler J, Beckh G, Bocher T, Spraul M, Heintz L, Schütz B. 2018. QSI, Bruker. Honey-Profiling mittels NMR. Available from https://www.tentamus.com/qsi-de/wp-content/uploads/sites/11/2018/01/10_PR_Bruker_Missler.pdf (accessed June 2018).
- Morales V, Corzo N, Sanz ML. 2008. HPAEC-PAD oligosaccharide analysis to detect adulterations of honey with sugar syrups. *Food Chemistry* **107**:922–928.
- Norma jakosti č. ČSV 1/1999. 1999. Svazová norma ČESKÝ MED. Český svaz včelařů pro Český med. Česká republika.
- Ohmenhaeuser M, Monakhova YB, Kuballa T, Lachenmeier DW. 2013. Qualitative and Quantitative Control of Honeys Using NMR Spectroscopy and Chemometrics. *ISRN Analytical Chemistry* **2013**:1–9.
- Olawode EO, Tandlich R, Cambray G. 2018. ¹H-NMR profiling and chemometric analysis of selected honeys from South Africa, Zambia, and Slovakia. *Molecules* **23**:578.
- Parlament České republiky. 1997. Zákon č. 110/1997 Sb. ze dne 24. dubna 1997 o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. Pages 2178–2188 in *Sbírka zákonů České republiky, 1997, částka 38*. Česká republika.
- Pejchal P. 2016. Státní veterinární správa udělila Včelpu pokutu 1,2 milionu Kč. SVS. Available from <https://www.bezpecnostpotravin.cz/statni-veterinari-sprava-udelila-vcelpu-pokutu-1-2-milionu-kc.aspx> (accessed March 2019).
- Pejchal P. 2017. Med od českých včelařů je bezpečný a kvalitní, ukázala mimořádná kontrolní akce SVS. SVS. Available from <https://www.bezpecnostpotravin.cz/med-od-ceskyh-vcelaru-je-bezpecny-a-kvalitni-ukazala-mimoradna-kontrolni-akce-svs.aspx> (accessed March 2019).
- Pita-Calvo C, Vázquez M. 2017. Differences between honeydew and blossom honeys: A review. *Trends in Food Science and Technology* **59**:79–87.
- PK ČR. 2015. Odebrání značky Český výrobek – garantováno PK ČR výrobcí medů. PK ČR. Available from <https://www.bezpecnostpotravin.cz/odebrani-znacky-cesky-vyrobek-garantovano-pk-cr-vyrobci-medu.aspx> (accessed March 2019).
- Pospíchal R. 2018. Laboratorní analýzy SZPI potvrdily významné falšování a jakostní prohřešky u medů. SZPI. Available from <https://www.bezpecnostpotravin.cz/laboratorni-analyzy-szpi-potvrdily-vyznamne-falsovani-a-jakostni-prohresky-u-medu.aspx> (accessed March 2019).
- Přidal A. 2013. Hodnocení medu podle platné evropské legislativy. *Veterinářství* **63**:453–455. Brno.
- Sak-Bosnar M, Sakač N. 2012. Direct potentiometric determination of diastase activity in honey. *Food Chemistry* **135**:827–831.
- Schwarzinger S, Brauer F, Rösch P, Dübecke A, Lüllmann C, Beckh G, Schütz B, Kämpf B. 2016. Authentic food. Why a single analysis parameter is not enough. q&more. Available from <http://q-more.chemeurope.com/q-more-articles/234/authentic-food.html> (accessed March 2019).

- Schievano E, Peggion E, Mammi S. 2010. ^1H nuclear magnetic resonance spectra of chloroform extracts of honey for chemometric determination of its botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**:57–65.
- Schievano E, Stocchero M, Morelato E, Facchin C, Mammi S. 2012. An NMR-based metabolomic approach to identify the botanical origin of honey. *Metabolomics* **8**:679–690.
- Schievano E, Stocchero M, Zuccato V, Conti I, Piana L. 2019. NMR assessment of European acacia honey origin and composition of EU-blend based on geographical floral markers. *Food Chemistry* **288**:96–101.
- Schievano E, Tonoli M, Rastrelli F. 2017. NMR Quantification of Carbohydrates in Complex Mixtures. A Challenge on Honey. *Analytical Chemistry* **89**:13405–13414.
- Sereia MJ, Março PH, Perdoncini MRG, Parpinelli RS, de Lima EG, Anjo FA. 2017. Techniques for the evaluation of physicochemical quality and bioactive compounds in Honey. Pages 194–214 *Honey Analysis*.
- Siddiqui AJ, Musharraf SG, Choudhary MI, Rahman A ur. 2017. Application of analytical methods in authentication and adulteration of honey. *Food Chemistry* **217**:687–698.
- Soares S, Amaral JS, Oliveira MBPP, Mafra I. 2017. A comprehensive review on the main honey authentication issues: production and origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **16**:1072–1100.
- Soria A, González M, ... C de L. 2005. Estimation of the honeydew ratio in honey samples from their physicochemical data and from their volatile composition obtained by SPME and GC-MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**:817–824.
- Spengler T, Beckh G, van der Meulen J. 2019. QSI, Bruker BioSpin. Application of NMR as a solution for detecting honey fraud. Available from <https://www.bruker.com/events/webinars/application-of-nmr-as-a-solution-for-detecting-honey-fraud.html> (accessed March 2019).
- Spiteri M, Jamin E, Thomas F, Rebours A, Lees M, Rogers KM, Rutledge DN. 2015. Fast and global authenticity screening of honey using ^1H -NMR profiling. *Food Chemistry* **189**:60–66.
- Spiteri M, Rogers KM, Jamin E, Thomas F, Guyader S, Lees M, Rutledge DN. 2017. Combination of ^1H NMR and chemometrics to discriminate manuka honey from other floral honey types from Oceania. *Food Chemistry* **217**:766–772.
- SVS. 2018. Za prodej nevyhovujícího a klamavě označeného medu uložila SVS pokuty přesahující 200.000 Kč. SVS. Available from <https://www.bezpecnostpotravin.cz/za-prodej-nevyhovujiciho-a-klamave-oznaceneho-medu-ulozila-svs-pokuty-presahujici-200-000-kc.aspx> (accessed March 2019).
- Titěra D. 2013. Včelí produkty mýtů zbavené: med, vosk, pyl, mateří kašička, propolis, včelí jed, Vyd. 2. Brázda, Praha.
- Trautvetter S, Koelling-Speer I, Speer K. 2009. Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC-MS. *Apidologie* **40**:140–150.

- Ulberth F. 2016. Advances in Testing for Adulteration in Honey. Pages 729–753 *Advances in Food Authenticity Testing*. Woodhead Publishing.
- Veselý V, et al. 2003. *Včelařství*, 2. dopl. vyd. Brázda, Praha.
- Von Der Ohe W, Persano Oddo L, Piana ML, Morlot M, Martin P. 2004. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie* **35**:18–25.
- Vorlíček P. 2017. SVS odhalila výrobu falšovaného medu. SVS. Available from <https://www.bezpecnostpotravin.cz/svs-odhalila-vyrobnu-falsovaneho-medu.aspx> (accessed March 2019).
- Weston RJ. 2000. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: A review. *Food Chemistry* **71**:235–239.
- Zábrodská B, Vorlová L. 2014. Adulteration of honey and available methods for detection – a review. *Acta Veterinaria Brno* **83**:85–102.
- Zpravodajství EP. 2018. Evropský trh s medem (infografika). Evropský parlament. Available from <http://www.europarl.europa.eu/news/cs/headlines/economy/20180222STO98435/evropsky-trh-s-medem-infografika> (accessed March 2019).
- Zheng X, Zhao Y, Wu H, Dong J, Feng J. 2016. Origin Identification and Quantitative Analysis of Honeys by Nuclear Magnetic Resonance and Chemometric Techniques. *Food Analytical Methods* **9**:1470–1479.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ALNuMed	Analytická laboratoř pro výživu a zdravotnické výrobky
CA	Kanada
CS	kukuřičný sirup
CSSF-TOCSY	chemical shift selective filter-total correlation spectroscopy
ČR	Česká republika
D ₂ O	deuterovaná voda
DE	Německo
DHA	dihydroxyaceton
ESP	Španělsko
EU	Evropská unie
GC-MS	gas chromatography-mass spectrometry
GDA	obecná diskriminační analýza
HFCS	vysokofruktózový kukuřičný sirup
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMF	hydroxymethylfurfural
HPAEC-PAD	high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection
HPLC	high performance liquid chromatography
IHC	International Honey Commission
IRMS	isotope ratio mass spectrometry
K ₂ HPO ₄	hydrogenfosforečnan draselný
MGO	methylglyoxal
NaH ₂ PO ₄	dihydrogenfosforečnan sodný
NaN ₃	azid sodný
NMR	nukleární magnetická rezonance
OPLS-DA	ortogonální diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců
PCA	analýza hlavních komponent
PLS-DA	diskriminační analýza částečných nejmenších čtverců
SCIRA	stable carbon isotope ratio analysis
SD	směrodatná odchylka
SOP	standardní pracovní postup
SVS	Státní veterinární správa
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
TSP	sodná sůl deuterované trimethylsilyl proionové kyseliny
UPLC-Q/TOF-MS	ultra performance liquid chromatography-quadrupole/time of flight-mass spectrometry
USA	Spojené státy americké
VIP	významný bin

10 Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1: Oblast chemického posunu 4,9–5,5 ppm typická pro cukry. Upraveno podle (Spiteri et al. 2015).	29
Obrázek 2: PCA rozptylový diagram komponentních skóre (scores plot) PC1 a PC2.	37
Obrázek 3: PLS-DA diagram komponentních skóre (scores plot) komponent 1 a 2.	38
Obrázek 4: OPLS-DA diagram komponentních skóre (scores plot).	38
Obrázek 5: Loadingplot binů spekter medu, jednotlivé posuny jsou barevně zvýrazněné podle VIP score – jejich směr ukazuje na výraznější zastoupení v jedné nebo druhé kategorii.	39
Obrázek 6: Loadingplot binů spekter medu, jednotlivé posuny jsou barevně zvýrazněné podle VIP score – jejich směr ukazuje na výraznější zastoupení v jedné nebo druhé kategorii.	39
Obrázek 7: Loadingplot binů spekter medu, jednotlivé posuny jsou barevně zvýrazněné podle p-hodnot (p-value) – jejich směr ukazuje na výraznější zastoupení v jedné nebo druhé kategorii.	41
Obrázek 8: Průměrné spektrum květového a medovicového medu v překryvu.	42
Tabulka 1: Smyslové požadavky. Upraveno podle vyhlášky č. 76/2003 Sb.	9
Tabulka 2: Fyzikální a chemické požadavky. Upraveno podle vyhlášky č. 76/2003 Sb.	12
Tabulka 3: Pfundova stupnice pro stanovení barvy medu. Upraveno podle (Olawode et al. 2018).	14
Tabulka 4: Jednodruhové medy a jejich typické vlastnosti. Upraveno podle (Titěra 2013)...	15
Tabulka 5: Chemické posuny, mez stanovitelnosti a nejistota měření vybraných sloučenin. Upraveno podle (Spiteri et al. 2015).	30
Tabulka 6: Významné sloučeniny ¹ H NMR spektra a oblasti jednoznačných signálů. Upraveno podle (Ohmenhaeuser et al. 2013).	31
Tabulka 7: Detaily křížové validace PLS-DA.	38
Tabulka 8: Vysvětlivky k obrázku 5 a 6, biny zodpovědné za separaci tříd.	40
Tabulka 9: p-hodnoty jednotlivých sloučenin významných pro rozlišení kategorií medu.	41

11 Seznam příloh

Příloha 1: Vzorokly z Výzkumného ústavu včelařského v Dole.....	I
Příloha 2: Sloučeniny detekovatelné pomocí NMR profilování. Upraveno podle (Missler et al. 2018).	II

12 Samostatné přílohy

Příloha 1: Vzorky z Výzkumného ústavu včelařského v Dole.

číslo vzorku	voda [%]	S [%]	HMF [mg/kg]	vodivost [mS/m]	F [%]	G [%]	F+G [%]	F/G	melecit. [%]	druh medu	údaje na etiketě
1.	16,2	2,7	<1,8	94,2	29,3	24,9	54,2	1,17	3,2	medovicový	med medovicový z CHKO Český les
2.	16,2	1,7	<1,8	91,2	30,7	26,0	56,8	1,18	1,8	medovicový	med medovicový
3.	15,3	0,1	<1,8	114,9	28,1	23,3	51,4	1,20	11,1	medovicový	Brtníkův med medovicový z Českého ráje
4.	16,1	0,5	<1,8	106,9	30,4	26,0	56,4	1,17	7,8	medovicový	med medovicový z oblasti Vizovických vrchů
5.	14,2	6,5	<1,8	107,4	26,9	24,3	51,1	1,11	1,9	medovicový	med medovicový lesní
6.	14,3	0,7	2,1	116,9	24,5	19,9	44,5	1,23	9,9	medovicový	Tichovský medovicový med
7.	16,2	0,3	6,8	35,2	37,6	32,9	70,6	1,14	nedet.	pohanka	med květový
8.	14,6	1,6	<1,8	84,5	34,6	29,8	64,4	1,16	1,3	medovicový	med medovicový
9.	15,9	0,7	<1,8	45,9	35,4	34,4	69,8	1,00	0,7	květový	med květový smíšený
10.	15,9	nedet.	3,3	61,6	34,2	32,3	66,6	1,06	1,0	lípa	med květový lipový z farní zahrady v Dražicích
11.	14,4	0,5	<1,8	49,4	33,7	29,6	63,3	1,14	1,6	květový	med květový smíšený z Podještědí
12.	17,2	0,4	<1,8	12,3	39,1	41,0	80,1	0,96	nedet.	květový řepka	med květový
13.	18,1	nedet.	4,5	27,5	38,9	34,2	73,1	1,14	0,6	květový malinový	Libavský med květový malinový
14.	16,3	0,2	<1,8	18,9	37,1	37,2	74,4	1,00	0,4	květový	med květový
15.	16,5	nedet.	<1,8	16,5	36,7	38,3	75,0	0,96	0,3	květový	med květový
16.	17,4	0,7	<1,8	11,8	35,8	38,4	74,2	0,93	nedet.	řepka	med květový pastový Kamenný most
17.	16,9	0,3	15,5	15,9	40,1	33,3	73,4	1,21	0,3	akát	med květový akátový
18.	17,3	0,2	<1,8	42,5	37,1	38,1	75,2	1,0	1,6	řepka a ovocné stromy	med květový
19.	17,4	nedet.	<1,8	71,8	34,5	30,0	64,5	1,15	6,4	medovicový	med medovicový
20.	19,6	0,8	3,3	48,3	37,6	34,2	71,9	1,10	1,0	lípa	med květový smíšený

Příloha 2: Sloučeniny detekovatelné pomocí NMR profilování. Upraveno podle (Missler et al. 2018).

Sloučenina	LOQ – mez stanovitelnosti	Jednotky
CUKRY		
glukóza + fruktóza	20,0	g/100 g
fruktóza/glukóza	-	-
fruktóza	10,0	g/100 g
glukóza	10,0	g/100 g
sacharóza	0,5	g/100 g
turanóza	0,2	g/100 g
maltóza	0,5	g/100 g
melecitóza	1,0	g/100 g
maltotrióza	1,0	g/100 g
gentiobióza	0,3	g/100 g
rafinóza	0,1	g/100 g
manóza	0,05	g/100 g
PRODUKTY FERMENTACE		
2,3-butandiol	20,0	mg/kg
5-HMF	5,0	mg/kg
kyselina octová	10,0	mg/kg
acetoin	20,0	mg/kg
ethanol	5,0	mg/kg
kyselina mléčná	10,0	mg/kg
kyselina mravenčí	5,0	mg/kg
kyselina fumarová	5,0	mg/kg
kyselina pyrohroznová	10,0	mg/kg
kyselina jantarová	5,0	mg/kg
AMINOKYSELINY		
alanin	5,0	mg/kg
kyselina asparagová	150,0	mg/kg
glutamin	200,0	mg/kg
leucin	40,0	mg/kg

prolin	200,0	mg/kg
valin	10,0	mg/kg
tyrosin	50,0	mg/kg
fenylalanin	100,0	mg/kg

MARKERY

kyselina 3-fenylmléčná	300,0	mg/kg
dihydroxyaceton (DHA)	20,0	mg/kg
kyselina kynurenová	60,0	mg/kg
methylglyoxal (MGO)	30,0	mg/kg
kyselina šikimová	80,0	mg/kg

KYSELINY

kyselina citronová	50,0	mg/kg
kyselina jablečná	100,0	mg/kg
kyselina chinová	300,0	mg/kg