

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie



Analýza medu pomocí plynové chromatografie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vypracovala:

Bc. Veronika Frenzlová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

Doc. RNDr. Petr Barták, CSc.

Konzultant:

Mgr. Pavla Kučerová, Ph.D.

Olomouc

duben 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat všem soukromým včelařům, kteří mi věnovali vzorky výsledků svojí celoroční péle. Dále děkuji svému vedoucímu doc. RNDr. Petru Bartákovi, CSc. za odborné rady a vedení při práci na této studii.

ANOTACE

Cílem této práce je zavedení metod analýzy některých významných složek medu, za účelem kontroly kvality potraviny. Sledované složky, jako vybrané parametry kvality, byly analyzovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Analyzovány byly furfuraly, jako ukazatele nevhodného zacházení s medem, dále pak sacharidy, jako ukazatele pravosti medu a voskové estery a uhlovodíky jako markery přímého kontaktu medu s včelím voskem.

Kontrolované vzorky medů pocházeli z rozdílných zdrojů. Vzorky pocházející od soukromých včelařů byly posuzovány v závislosti na poloze zdroje a období, ve kterém byly vzorky odebrány. Mezi analyzovanými vzorky byly zařazeny tři medy zakoupené v obchodní síti a dva vzorky medu exotického původu z Tasmánie.

Klíčová slova: plynová chromatografie, med, furfuraly, sacharidy, včelí vosk, hmotnostní spektrometrie

THE ANNOTATION

This work focuses on introduce methods of analysis of some important components of honey, for the purpose to control quality of the food. Target compounds, as chosen parameters of quality, were analyzed by means of gas chromatograph with mass spectrometry. Furfurals were analyzed, as markers of inconvenient handling with honey, then saccharides as markers of originality of honey and wax esters and hydrocarbons as markers of direct contact of honey with bee wax.

Analyzed samples of honey have been taken from different sources. Samples, which have been taken from private beekeepers, were explored in relation to the source location and season when the samples were taken. Three samples from local store and two exotic samples from Tasmania were included in the sample set.

Key words: gas chromatography, honey, furfurals, saccharides, bee wax, mass spectrometry

Obsah

1	ÚVOD A CÍLE	1
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1	Včela medonosná.....	2
2.1.1	Stavba těla včely medonosné – dělnice	3
2.2	Úl	4
2.3	Složení medu	5
2.4	Analýza dle legislativy.....	6
2.4.1	Součet obsahů glukózy a fruktózy.....	8
2.4.2	Obsah sacharózy.....	9
2.4.3	Obsah vody.....	10
2.4.4	Kyselost	10
2.4.5	Hydroxymethylfurfural.....	10
2.4.6	Obsah ve vodě nerozpustných látek (v popelu)	11
2.4.7	Elektrická vodivost	11
2.4.8	Aktivita Diastázy (dle stupňů Schadeho).....	11
2.5	Analýza pomocí plynové chromatografie.....	11
2.5.1	Plynový chromatograf	11
2.5.2	Hmotnostní detektor.....	14
2.5.3	Analýza furfuralů	15
2.5.4	Analýza sacharidů.....	19
2.5.5	Analýza vosků	21
3	PRAKTICKÁ ČÁST.....	24
3.1	Experiment	24
3.1.1	Přístrojová technika.....	24
3.1.2	Vzorky.....	24
3.1.3	Chemikálie	25
3.1.4	Furfuraly	26
3.1.5	Sacharidy	27
3.1.6	Vosky (včelí vosk)	28
3.2	Výsledky a diskuze.....	29

3.2.1	Furfuraly	29
3.2.2	Sacharidy	36
3.2.3	Vosky	40
3.2.4	Celkové hodnocení vzorků	45
4	ZÁVĚR	51
5	POUŽITÁ LITERATURA	54

1 ÚVOD A CÍLE

Med je přírodní sladká potravina produkovaná včelami medonosnými. Tento včely vytvářejí buďto sběrem nektaru rostlin a výměšků živých částí rostlin (med květový) nebo výměšků hmyzu – mšice, červci, mery - sajícího na rostlinách (med medovicový). Včely pak tyto výměšky a nektar přetvářejí mísením se svými vlastními specifickými látkami a nechávají dehydratovat. Uskladňují je a nechávají „uležet“ a „zrát“ v medových plástech.

Při uvádění medu na trh se z něj nesmí odstraňovat žádná z jeho složek ani přidávat žádné potravinové složky, včetně potravinářských přídatných látek.

Z důvodu poklesu stavu včelstev a nízké výkupní ceny je v České republice kvalitního včelího medu málo a často dochází k jeho „šizení“. Do medu jsou přidávány sacharidové složky různého původu narušující jeho autenticitu a vnášející cizorodé enzymy. Někdy jsou tyto enzymy záměrně přidávány.

Významným parametrem kvality, ale i ověřením druhu medu je stanovení zastoupení sacharidů. Květový med se liší od medovicového jak obsahem hlavních cukrů – glukózy a fruktózy, tak i zastoupením minoritních di- a tri-sacharidů.

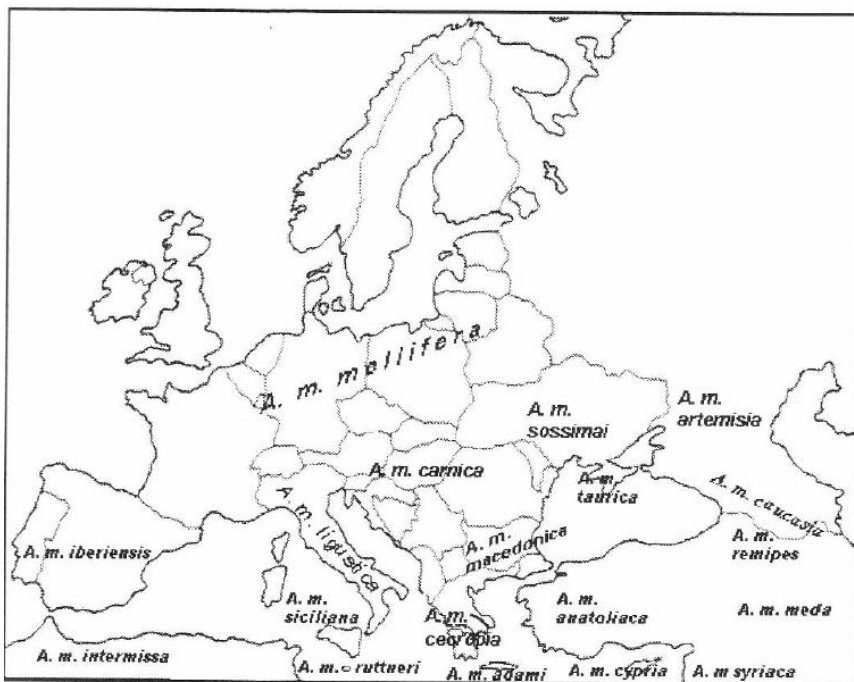
Významným markrem kvality medu je pak obsah 5-hydroxymethylfurfuralu (dále jen „HMF“), který vzniká nešetrným zacházením s medem, zejména zahříváním nad 50°C nebo stárnutím špatně uskladněného medu (zejména v prostředí s teplotou nad 30 °C). Zvýšený obsah HMF není pro člověka zdravotním rizikem, spíše se považuje za látku antinutriční povahy. Toxický je ale pro včely a je třeba se vyhnout zkrmování tohoto medu včelám. Pro lidskou potřebu je ukazatelem již zmíněného nešetrného zacházení, při kterém dochází k znehodnocení dalších nutričně významných látek, zejména enzymů.

Při získávání medu se do něj mohou dostat i jiné složky včelího plástu – strdí. Významným ukazatelem kvality stočení medu je analýza vosků v medu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Včela medonosná

Včela medonosná (*Apis mellifera* L.) je mnohým mezidruhovým křížením a jejím využitím člověkem nejčastěji zastoupena po celém světě (viz obr.1). U nás je to pak obzvláště včela medonosná kraňská (*Apis mellifera carnica* P.), včela medonosná vlašská (*Apis mellifera ligustica* S.) a včela medonosná tmavá (*Apis mellifera mellifera* L.) [1]

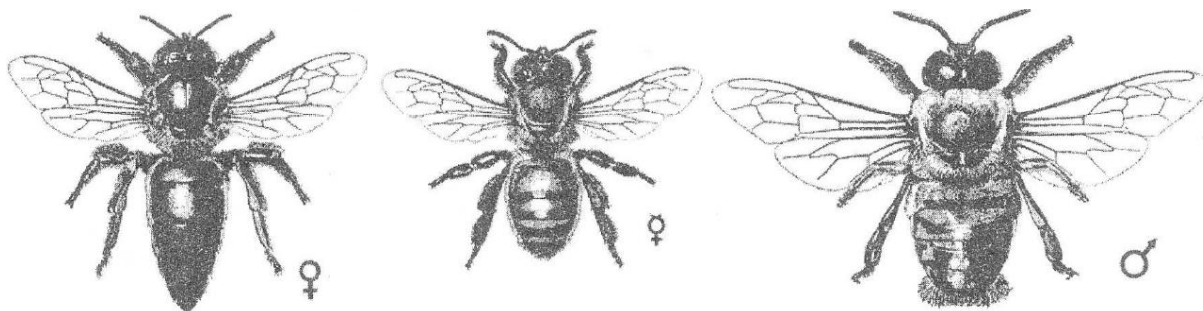


Obrázek 1 Zastoupení plnem *Apis mellifera* L. v Evropě [1].

Včela medonosná je vývojově nejdokonalejší zástupce svého druhu. Vedle medu využíváme neméně i další její produkty, a to vosk, mateří kašičku, propolis, jed a pyl. Nepřímo pak včela zajišťuje díky své opylovací schopnosti asi 1/3 lidské výživy. [1]

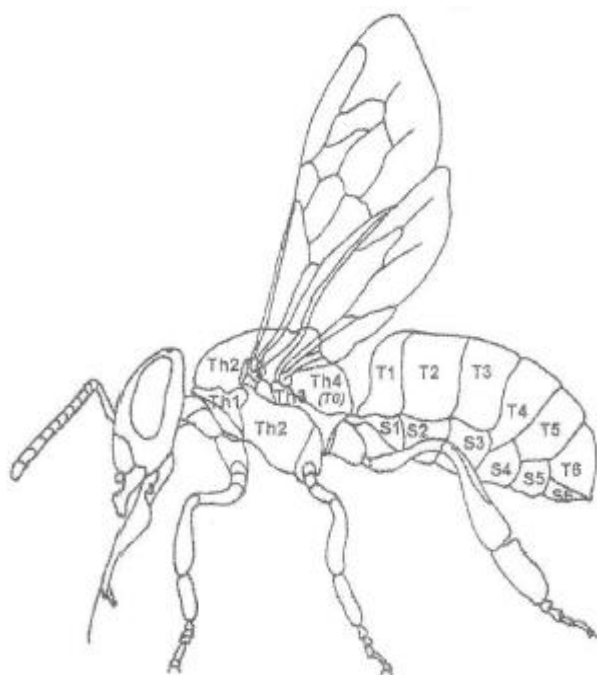
Společenství včely medonosné – včelstvo - je tvořeno několika různými členy o rozdílném počtu jedinců (viz obr. 2). Pouze jedním jedincem je zastoupena *Matka*. Matka je jediný samičí plodný jedinec v úlu. Schopnost reprodukce je však jedinou její funkční vlastností. O její život a dění kolem ní se neustále starají jiné včely z řad dělnic. Dělnic je naopak ve včelstvu několik tisícovek a jednotlivé dělnice jsou nahraditelné jinými. *Dělnice* jsou neplodné samičky. Naopak jedinými plodnými samčími jedinci jsou *Trubci*. Trubci jsou největšími členy včelstva, ale jejich úlohy ve společenství jsou omezené. Vyskytují se pouze

v období snůšky a mimo oplození matky se malým podílem účastní koloběhu potravy a zahříváním plodu. Pokud trubec splní funkci oplodnění matky, hyne. Jedinci, kteří se nestihli s matkou spářit, jsou po ukončení snůšky vyhnáni dělnicemi z úlu. *Plod* je v úlu přítomen v různém množství a různém stádiu podle ročního období. V období přezimování včely medonosné se včelí plod nevyskytuje. [2]



Obrázek 2 Pohlavní a kastový dimorfismus včely medonosné [2]

2.1.1 Stavba těla včely medonosné – dělnice



Obrázek 3 Článekování imaga dělnic [2]

Stejně jako u většiny členovců (*Athropoda*), k nimž se včela medonosná řadí, je tělo včely rozděleno na hlavu, hrud' a zadeček (viz obr. 3).

Při vývoji dělnice v buňce plástu však bylo její tělo rozděleno do více článků, z nichž některé během vývoje zakrní. Ve výsledné podobě včely je pak hlava složena z 6 těchto článků, hrud' z 3 a zadeček z 12. Na každém z článků vyrůstal pár končetin, které se ale plně vyvinuly jen na člancích hrudi. Na hlavě se uzpůsobily pro příjem potravy jako kusadla a sosák a pro orientaci v prostoru jako tykadla. Na

zadečku většinou vymizely, pouze na dvou člancích se uzpůsobily pro funkci rozmnožování, jako vnější pohlavní orgány.

Vnější kostru, všechny články a jejich spoje, tvoří kutikula. Základem kutikuly je sklerotizovaný chitin, zpevněný a zpružněný přítomností glycidů a vosků. [2]

Kromě tykadel a ústního ústrojí jsou na hlavě umístěny jednoduchá očka a složené oči. Jednoduchá očka jsou komorového typu, jako u savců, bez možností akomodace s nepohyblivou čočkou. Jejich hlavní funkcí je vnímání intenzity světla a posouzení vhodnosti opuštění včelstva na delší dobu (stmívání, změna počasí). Oproti tomu jsou složené oči tvořené 4000 až 4500 oček tvaru jehlanu. Z těchto jednotlivých oček se v nervovém systému skládá úplný obraz, díky kterému včela vnímá okolí. [3]

Na hrudní části má včela kromě tří párů nohou umístěny i dva páry blanitých křídel. Křídla vznikly v larválním stádiu z pokožky a jsou za letu koordinována a ovládána hrudními létacími svaly. [3]

V zadečku včely je kromě pohlavních žláz umístěna většina životních orgánů. Mimo jiné se zde nachází medový váček, kde se mísí strava včely s výměšky žláz a dává tak vzniknout prvnímu medu nebo mateří kašičce. Mateří kašička vzniká smísením medu, pylu a výměšků hltanových žláz u mladých včel. Dalšími orgány, ve kterých vznikají pro člověka významné suroviny, jsou voskové žlázy a jedová žláza se žihadlem. [3]

2.2 Úl

Včela medonosná není samotářský a soběstačný druh, je zcela závislá na existenci včelstva jako celku. Život včelstva je pak bezpodmínečně spojen s včelím dílem. Pláсты si včela staví, jak „na divoko“, tak při životě kontrolovaným člověkem – v úlech. Včelí dílo včelstvu zajišťuje prostředky nejen k reprodukci, ale i životu samotnému. Správně zhotovený úl zabezpečuje teplo a zásoby pro přezimování, dostatek vzduchu a ochranu před škůdci a nepřízní počasí.

Dělnice během života vykonávají různé činnosti na pozicích, které jsou podmíněny jejich vývojem. V první části života pracují uvnitř úlu. V prvních dnech života udržují buňky, pak přecházejí ke krmení a ošetřování plodu. Ke konci období práce v úlu, které trvá asi 20 dní, pracují dělnice jako stavitelky a přejímatelky potravy. Po 20. dnu dělnice vylétají z úlu a jejich práce se zaměřuje na pátrání po zdroji potravy a jejím sběru. Ještě než se včela začne vydávat na delší lety mimo úl, pohybuje se v jeho okolí a stráží ho. [2]

2.3 Složení medu

Podle české vyhlášky č. 76/2003 Sb. v platném znění oddílu 2 se medem rozumí přírodní potravina sacharidového charakteru s většinovým složením glukózy, fruktózy, organických kyselin a enzymů, která vzniká sběrem včelami a dehydratuje a zraje v plástech smíšená se specifickými látkami. Přítomny jsou přirozeně i částice zachycené při sběru nektaru nebo medovice. [4]

Jak tedy legislativa předjímá, majoritní složkou medu jsou sacharidy. Nejvíce zastoupenými cukry jsou fruktóza a glukóza (tzv. invertní cukr), dále pak maltóza a sacharóza. Vyšší cukry jsou v přírodním medu přítomny také, a to v celkovém obsahu od 2 do 10% (m/m), přičemž větší množství je obsaženo v medovicových medech. Jednotlivé druhy medu obsahují asi 10 – 20 % (m/m) vody. V množství pod 1 % (m/m) jsou v medu zastoupeny enzymy a minerální látky. [3,5,6]

Tabulka 1 Složení medu (%) [6]

Složka	průměrná hodnota	variační rozpětí
Voda	17,2	13,3 – 22,9
Fruktóza	38,2	27,3 – 44,3
Glukóza	31,3	22,0 – 40,8
Sacharóza	2,4	1,7 – 3,0
Maltóza	7,3	2,7 – 16,0
Vyšší cukry	1,5	0,1 – 8,5
Ostatní	3,1	0,0 – 13,2
Dusík	0,06	0,05 – 0,08
Minerály (popel)	0,22	0,20 – 0,24
Volné kyseliny ^a	22,0	6,8 – 47,2
Laktony ^a	7,1	0,0 – 18,8
Všechny kyseliny ^a	7,1	18,7 – 59,5
Hodnota pH	3,9	3,4 – 6,1
Hodnota diastázy	20,8	2,1 – 61,2

^a mequivalent/kg

Podle množství vody v medu je jeho hustota (20°C) v rozsahu od 1,4404 g/cm³ (14% vody) do 1,3550 g/cm³ (20% vody). [6]

Složení oligosacharidů často závisí na zdroji nektaru/medovice, ze kterých byl med vytvořen, přičemž zeměpisný a sezónní vliv jsou zde zanedbatelné. Naopak množství sacharózy se mění znatelně podle doby zrání. [6]

Podle původu medu ho můžeme dělit na:

- květový (získaný sběrem nektaru)
- medovicový (získaný sběrem medovice – výměšky hmyzu (*Hemiptera*) sajícího z živých částí rostlin nebo sekrety živých částí rostlin)
- pekařský (průmyslový) – jedná se o med výhradně pro průmyslové použití nebo jako složka do jiných potravin. Může mít cizí chuť i pach, může vykazovat počínající kvašení nebo mohl být zahřát. [4,7]

Podle způsobu získání a úpravy:

- vytočený
- plástečkový
- lisovaný
- vykapaný
- med s plástečky
- filtrovaný
- pastový (po získání byl upraven do pastové struktury a je tvořen jemnými krystalky) [4,7]

2.4 Analýza dle legislativy

Podle jakostních požadavků nesmí být z medu žádná jeho složka odstraněna (s výjimkou odstranění látek při filtraci medu), ale ani k němu nesmí být žádné látky přidány (s výjimkou jiného druhu medu), a to včetně látek přídatných.

Med, s výjimkou pekařského medu, nesmí:

- mít žádné cizí pachy a příchutě
- začít pěnít nebo kvasit

-být zahrát do takové míry, že jsou jeho přirozené enzymy zničeny nebo se stanou neaktivní

Smyslové, fyzikální a chemické požadavky na jakost jsou uvedeny v příloze č. 3 vyhlášky č. 76/2003 Sb. viz tabulky 1 a 2. (v této práci tab. 2 a 3) [4,7]

Tabulka 2 Smyslové požadavky [4]

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

Tabulka 3 Fyzikální a chemické požadavky [4]

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 (mS. m ⁻¹) ⁵⁾	nejvýše 80,0	nejméně 80,0	-
aktivita diastázy (stupňů podle Schadeho nejméně) ⁶⁾	8,0	8,0	-

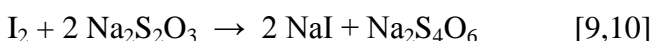
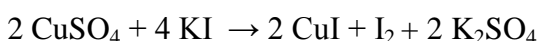
- 1) U medu květového jednodruhového akátového z trmovníku akátu (*Robinia pseudoacacia*), z tolice vojtešky (*Medicago sativa*), z banksie (*Banksia menziesii*), z kopyšníku (*Hedysarum*), z blahovičnicku (*Eucalyptus camadulensis*), z *Eucryphia lucida*, z *Eucryphia milligani*, z citrusů (*Citrus 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 přípouští nejvýše 0,50 % hmotnostních ve vodě nerozpustných látek.
- 3) U vřesového (*Calluna*) medu a medu průmyslového může být obsah vody nejvýše 23 %; u medu z vřesu (*Calluna*) určeného pro průmyslové účely může být obsah vody nejvýše 25 %.
- 4) U medů deklarovaného původu z regionů s tropickým klimatem a směsi těchto medů může být obsah hydroxymethylfurfuralu nejvýše 80 mg/kg.
- 5) Výjimky: planika (*Arbutus unedo*), vřesovec (*Erica*), blahovičnick (*Eucalyptus camadulensis*), lípa (*Tilia spp.*), vřes obecný (*Calluna vulgaris*), *Leptospermum*, *Melaleuca spp.*
- 6) U medu s přirozeně nízkým obsahem enzymů (citrusové medy) a obsahem HMF nižším než 15mg/kg může být aktivita diastázy nejméně 3.

2.4.1 Součet obsahů glukózy a fruktózy

Isolace sacharidů z matrice se provádí extrakcí vodou nebo 80% etanolem za tepla (80°C). Pro vyčiření získaného roztoku se nejčastěji používají olovnaté soli (octan olovnatý, dusičnan olovnatý). Známé jsou i metody, kde se jako čiridlo používá Carrezovo činidlo. [8]

Jednou z používaných metod stanovení redukujících cukrů je stanovení podle Ofnera. Metoda je založena na vyredukování oxidu měďného z Ofnerova činidla (roztok síranu měďnatého (5 g), bezvodého uhličitanu sodného (10 g), vínanu sodnodraselného (300 g) a dekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného (50 g) doplněný na 1000 ml). Vyprodukovaný oxid měďný se rozpustí v kyselině chlorovodíkové a měďné ionty se zoxidují na měďnaté jodem. Přebytek jodu se pak stanoví titrací thiosíranem sodným. Tato metoda je vhodná pro stanovení malého množství invertního cukru (glukózy a fruktózy) vedle velkého množství sacharózy (těžká šťáva, surový cukr). [8-10]

Další možností stanovení redukujících cukrů v potravinách rostlinného původu je stanovení podle Luffa – Schoorla. Principem metody je redukce měďnaté soli na oxid měďný přítomnými redukujícími cukry za varu. Přebytek nezreagované měďnaté soli se opět stanovuje jodometricky. [9,10]



Redukce měďnaté soli na oxid měďný využívá i metoda stanovení podle Rotche. V tomto případě je vzniklý oxid měďný rozpuštěn v kyselém roztoku síranu

železitoamonného, kde redukuje ekvivalentní množství železité soli na železnatou. Vzniklé železnaté ionty se pak stanovují manganometricky. [9,10]

Stanovení redukujících cukrů podle Potterata a Eschmanna využívá redukce měďnaté soli taktéž. Vzniklý oxid měďný se v tomto případě rozpouští v kyselině dusičné a stanovuje se chelatometricky. [8-10]

Rozhodčí metoda je stanovení redukujících cukrů vyjádřených jako invertní cukr - metoda dle Lanea a Eynona. Podstatou zkoušky je titrace Fehlingova roztoku (směs roztoku síranu měďnatého a roztoku tetrahydrátu vlnanu sodnodraselného s hydroxidem sodným) zkoušeným vzorkem za varu s indikací na methylenovou modř. [9-11]

V případě stanovení fruktózy, glukózy a sacharózy vedle sebe se nejdříve v slabě alkalickém prostředí zoxiduje glukóza jodem na kyselinu glukonovou. Poté se stanoví fruktóza metodou dle Luffa-Schoorla. Sacharóza se pak vypočte odečtením obsahu glukózy a fruktózy ze stanovení obsahu všech redukujících cukrů po inverzi. Touto Kruisheerovou metodou, lze tyto tři sacharidy stanovit vedle sebe, pouze pokud v matrici není přítomen další sacharid. [9]

Pro stanovení více sacharidů vedle sebe nachází dnes největší uplatnění chromatografické techniky. Dříve nejvíce užívanou techniku chromatografie na tenké vrstvě dnes vytlačila kapalinová chromatografie. Nejvhodnější se pro praxi jeví iontová chromatografie sacharidů s kyselinou boritou, kdy vznikají komplexy s potřebným nábojem. Stejně techniky se pak používá i při separaci sacharidů pomocí elektromigračních technik. Analyzované sacharidy jsou pak detekovány spektrofotometricky, refraktometricky nebo elektrochemicky. Pro plynovou chromatografii se sacharidy převádí na více těkavé trimehtylsilylery (více viz 2.5.3). [8-10]

2.4.2 Obsah sacharózy

Nejčastější způsoby stanovení obsahu sacharózy se provádí pomocí polarizace. Při stanovení sacharózy ve vzorku bez jiných sacharidů či dalších látek, které mají schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla, se po vyčerpání odečítá úhel stočení polarizovaného světla přímo.

V případě, že vzorek obsahuje jiné opticky aktivní složky, se po tomto měření provede kyselá inverze sacharózy, nejčastěji kyselinou chlorovodíkovou. Poté se opět odečte úhel stočení

polarizovaného světla a z rozdílu se dopočte množství obsažené sacharózy (stanovení podle Clergeta). [6,8,9]

Pro případ vzorku, ve kterém se vedle sebe nacházejí redukující cukry a sacharóza (cukrářské výrobky) se provádí stanovení přímou polarizací podle Thalera (rozhodčí metoda). Principem stanovení je inaktivace redukujících sacharidů hydroxidem barnatým. [6,9]

2.4.3 Obsah vody

Voda může být v matrici vázána v několika formách (buněčná/mimobuněčná, volná/adsorbovaná/hydratační). U většiny potravin se voda stanovuje gravimetricky, a to vysušením vzorku při 105 °C.

Další možností stanovení vody (vlhkosti) v potravinách je destilace, termická analýza, refraktometrie, konduktometrie a denzitometrie. Pro velmi malá množství vody pak titrace podle Karl-Fischer, spektroskopie v blízké infračervené oblasti (NIR) a nukleární magnetická rezonance (NMR). [8,10]

Stanovení vody v medu se provádí refraktometricky, metodou dle Chatwaye a Wedmora. [4,8,12,13]

2.4.4 Kyselost

Pro stanovení celkové kyselosti se tuhé vzorky potravin homogenizují známým množstvím vody a digerují (vyluhují) 30 minut při 80 °C. Takto získané kapalně extrakty pevných vzorků i kapalně vzorky se pak přefiltrují a filtrát se titruje standardním roztokem KOH na fenolftalein. U barevných vzorků je vhodnější titraci provádět s potenciometrickou nebo konduktometrickou indikací. [8,12]

Stanovení kyselosti se v medu provádí acidobazickou titrací s indikací na fenolftalein. [4]

2.4.5 Hydroxymethylfurfural

Karboonylové sloučeniny jsou téměř vždy přítomny jako součást silic. Pro jejich stanovení se nejčastěji využívá jejich charakteristické reakce s 2,4-dinitrofenylhydrazinem. Žluté zbarvení, způsobené vznikem komplexů, se pak fotometruje při 350 - 370 nm. [8]

Stanovení 5-hydroxymethylfurfuralu se v medu provádí fotometricky, metodou dle Winklera. Roztok vzorku se nejdříve čirí Carrezovým činidlem. Principem stanovení je vznik vínového zbarvení roztoku v přítomnosti přidané kyseliny barbiturové a *p*-toluidinu. Toto zbarvení je fotometrováno při 550 nm. [4]

2.4.6 Obsah ve vodě nerozpustných látek (v popelu)

Obsah ve vodě nerozpustných látek v medu se stanovuje jako nerozpustný podíl popela. Principem stanovení je stanovení popela po mineralizaci, který se poté extrahuje horkou vodou (obvykle 10 ml). Nerozpuštěný podíl se pak filtruje, s filtrem vysuší a opět spálí. Tato metoda je častým měřítkem určení podílu ovocné složky v cukrovinkách. [8,10,13]

2.4.7 Elektrická vodivost

Stanovení elektrické vodivosti je důležité pro kontrolu kvality potravin. Elektrická vodivost se v medu stanovuje konduktometricky. Konduktometrické stanovení je založeno na úměrnosti mezi vodivostí vzorku a jeho vlhkostí. Vodivost vzorku roste s obsahem vody. [4,8]

2.4.8 Aktivita Diastázy (dle stupňů Schadeho)

Diastatická aktivita se stanovuje fotometricky dle Schadeho (metoda upravena Dnisbergem). Metoda je založena na principu úměrného rozpouštění škrobu diastázou. [4]

Spektrofotometrické stanovení produktů (glukózy) po enzymatické hydrolyze spočívá ve specifické reakci s kyselinou 3,5-dinitrosalicylovou. [8,13]

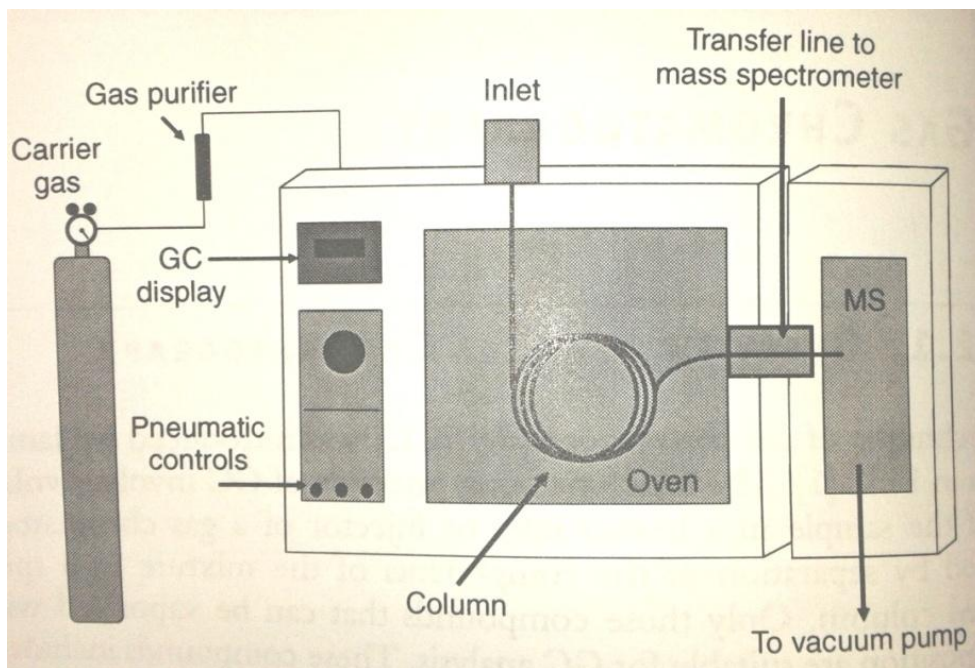
2.5 Analýza pomocí plynové chromatografie

2.5.1 Plynový chromatograf

Techniku plynové chromatografie (GC) zavedli do praxe v roce 1952 pánové James a Martin. Základní princip je založen na těkavosti složek vzorku ve vyhřátém vstupu nebo injektoru plynového chromatografu a následujícím oddělení směsi složek ve speciálně připravené koloně (schéma plynového chromatografu viz obr. 4). Takto separovány mohou být pouze látky, které se při vypařování nerozkládají. Látky s nižší těkavostí (kyseliny, aminokyseliny, aminy, amidy, sacharidy, steroidy, apod.) se pro případ analýzy plynovou chromatografií derivatizují. Pro přenos analyzovaných složek od injektoru k detektoru se používá nosný plyn (mobilní fáze). Nejčastěji používanými nosnými plyny jsou helium a vodík. [14,15]

V převážném zastoupení se dnes v plynové chromatografii používají kapilární kolony se stacionární fází zakotvenou na vnitřní stěně. [14,15]

Separace složek je ovlivněna jejich distribucí mezi stacionární a mobilní fází. Látka, která setrvává ve stacionární fázi pouze malý časový úsek, opustí separační systém velice rychle. Jakmile analyzovaná sloučenina opustí chromatografickou kolonu, je „hnána“ nosným plynem do detektoru. Ve spojení s plynovou chromatografií se kromě hmotnostního spektrometru užívá i detektor tepelné vodivosti, plamenově-ionizační detektor, plamenově-fotometrický detektor a detektor elektronového záchytu. [14-16]

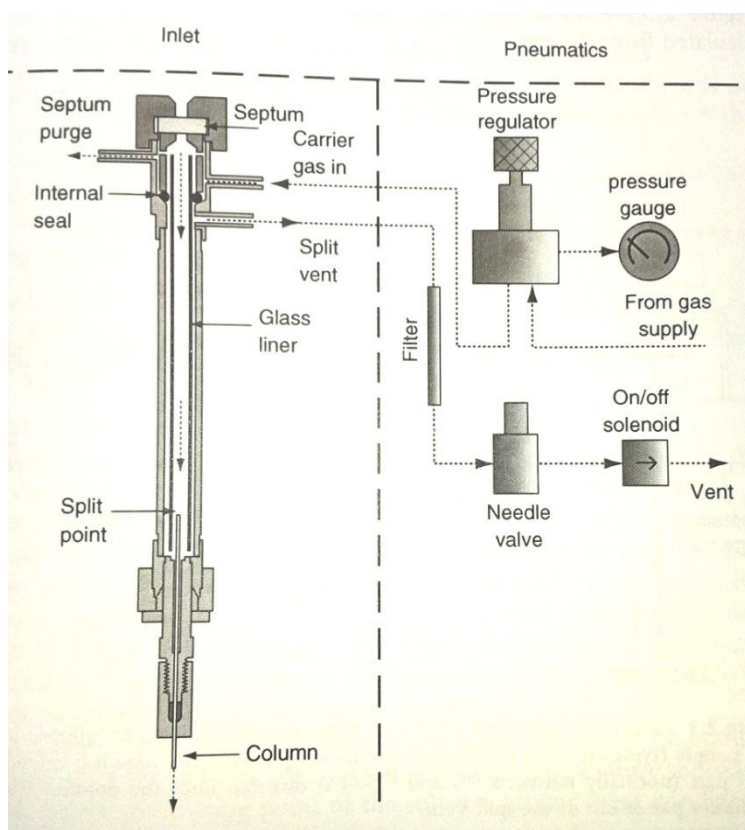


Obrázek 4 Schéma plynového chromatografu s hmotnostním spektrometrem [14]

Mód split/splitless

Nejstarší a nejdéle užívané zavádění vzorku do kapilární kolony je pomocí vyhřívaného split/splitless injektoru (viz obr. 5). Oba módy vstřikování jsou horké, izotermální techniky injekce. Tzn., že injektor je po celou dobu separace nastaven a vyhřát na teplotu dostatečně vysokou k odpaření solventu a analytů ve vzorku.

Nástřík s děličem toku (split) se užívá pro čisté vzorky nebo v případě, že je hledaná látka rozpuštěna ve velké koncentraci. V tomto případě je vzorek odpařen do proudu nosného plynu a jen malá část z tohoto proudu je dopravena na začátek kapilární kolony. Přebytek vzorku je odfoukán nosným plynem do odpadu. Nejčastější rozsah rozdělovacích poměrů je od 10:1 do 400:1.



Obrázek 5 Příčný řez typickým split/splitless injektorem [14]

Mód bez děliče toku (splitless) je užíván pro vzorky se stopovým množstvím hledané látky. V tomto případě je spliter (rozdělovač) po dobu dávkování vzorku do chromatografické kolony uzavřen. Po určitém čase je ventil spliteru otevřen za účelem očištění injektoru od rozpouštědla. V tomto čase jsou již všechny hledané složky vzorku v chromatografické koloně. Jako prevence ztráty hledaných sloučenin by teplota varu zvoleného rozpouštědla měla být alespoň o 20 °C nižší než nejméně těkavé složky vzorku. V případě

dávkování splitless injekcí by měla být teplota injektoru dostatečně vysoká pro odpaření všech složek vzorku a počáteční teplota chromatografické kolony by měla být o 10 – 15 °C nižší než teplota varu rozpouštědla. Za těchto podmínek rozpouštědlo a analyty kondenzují v úzkých páscech na začátku separační kolony. Se zvyšováním teploty kolony pak analyzované látky migrují a jsou eluovány z kolony jako „ostré“ píky. [14,16-18]

Dávkování vzorku

V případě kapalných vzorků nebo jejich extraktů dávkujeme vzorek přímo „na“ kolonu nebo do injektoru. Odběr plynných vzorků je značně náročnější na ztráty a kontaminaci při odběru i přenosu. Pro jejich analýzu se užívají speciální stříkačky a vzorkovací ventily. Dávkované množství plynu je od 100 µl do 2 ml, nejčastěji však 1 ml.

Odběr těkavých složek z pevných nebo kapalných vzorků se provádí z uzavřeného prostoru nad vzorkem (headspace), kde jsou těkavé složky v největší koncentraci. Odběr se provádí za pomoci vzorkovací stříkačky nebo se kapalným vzorkem probublává nosný plyn, který tak s sebou „strhává“ hledané analyty. Další možností je dávkování pomocí extrakce na

pevnou fází v mikroměřítku (solid phase micro extraction = SPME). Metoda SPME lze užít i pro extrakci hledaných látek z kapalných vzorků i z headspace. Jedná se o metodu využívající sorpce látek na úzké, krátké (typicky 1cm), tavené křemenné vlákno pokryté polymerním absorbentem. Naadsorbované látky jsou pak tepelně desorbovány v nástřiku chromatografu. [14-16,18]

2.5.2 Hmotnostní detektor

V systému plynového chromatografu s hmotnostním detektorem ionizujeme plynnou fází vycházející z kolony. Pro spojení s plynovým chromatografem se nejvíce užívá ionizace elektronem, chemická ionizace a ionizace polem. Jakmile vzniknou z analytů nabitě částice, vstupují do analyzátoru. Pro hmotnostní analýzu ve spojení s plynovou chromatografií se nejčastěji užívá kvadrupólový analyzátor, iontová past, analyzátor doby letu nebo sektorový analyzátor s dvojitou fokusací. Hmotnostní analyzátory separují a detekují látky na základě parametru m/z . [14,18,19]

Nejčastější hmotnostní analyzátor ve spojení s plynovou chromatografií je kvadrupólový analyzátor a ionizací elektronem, neméně často s chemickou ionizací. Tato instrumentační technika dosahuje velice vysoké citlivosti a jsou k ní zaznamenány velice rozsáhlé knihovny spekter. [18]

Kvadrupólový analyzátor se sestává z iontového zdroje a čtyř kovových tyčí, které jsou bezpodmínečně přesně umístěny paralelně. Nabitě částice jsou pak v prostoru ovlivňovány energetickými poli, která vytvářejí proti sobě opačně nabitě tyče. Princip kvadrupólového analyzátoru byl popsán Paulem a Steinwegenem již v roce 1953. [19]

Získávání dat

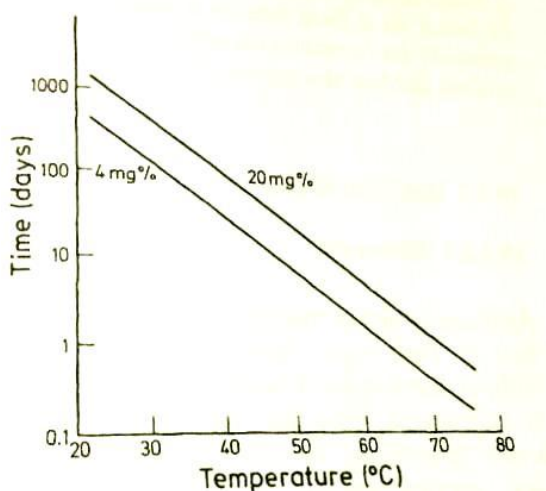
Pokud není v software nastaveno jinak, jsou data v hmotnostním spektrometru sbírána jako celkový iontový proud (TIC). TIC je souhrnný záznam signálů spekter jednotlivých látek opouštějících analyzátor v daném čase. Pro zjednodušení a zpřesnění (nižší limit detekce a kvantifikace) získávaných dat, lze v software nastavit zaznamenávání signálu jen pro hledané látky. Technika tzv. SIM (selected ion monitoring) zaznamenává signál pouze pro zadanou hodnotu m/z hledaného analytu. Další možností zpřesnění analýzy je technika SRM (selected reaction monitoring), kdy je selektován konkrétní reakční iont s hmotou m/z , ten je pak

podroben fragmentační reakci a produkty reakce jsou dále analyzovány v následujícím hmotnostním analyzátoru. Technika je tedy použitelná pouze v tandemově zapojeném hmotnostním analyzátoru (MS/MS). [14,19]

Cílem této práce je nalézt využití plynového chromatografu v analýze medu. Ze složek medu byly vybrány sacharidy a furfuraly, které jsou sledovanými jakostními parametry. Stopovou složku medu, kterou legislativa nestanovuje, je včelí vosk. Cílem práce je vyvinout pro tyto složky metodiku zpracování vzorku a upravit separaci pomocí plynové chromatografie, jako analytické koncovky.

2.5.3 Analýza furfuralů

Při zpracování a skladování potravin, může docházet k chemickým modifikacím a degradacím sacharidů, které jsou v nich obsaženy. Při dlouhodobém skladování a hlavně pak

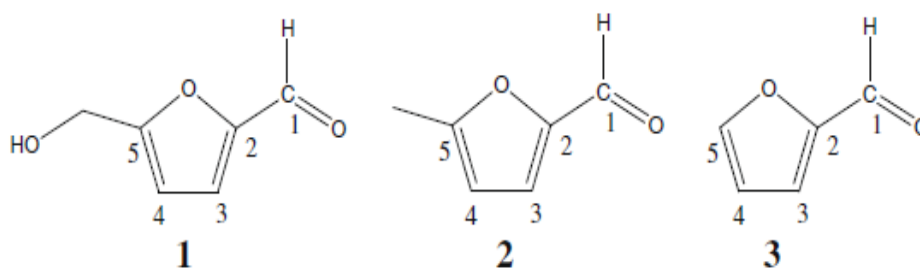


Obrázek 6 Vznik 5-hydroxymethylfurfuralu v závislosti na době a teplotě skladování [10]

při vystavení teplotám nad 45 °C dochází k degradaci sacharidů na furfuraly (viz obr 6). Studii byla prokázána dehydratace hexóz v jejich cyklické formě až na 5-hydroxymethylfurfural (viz obr 8).

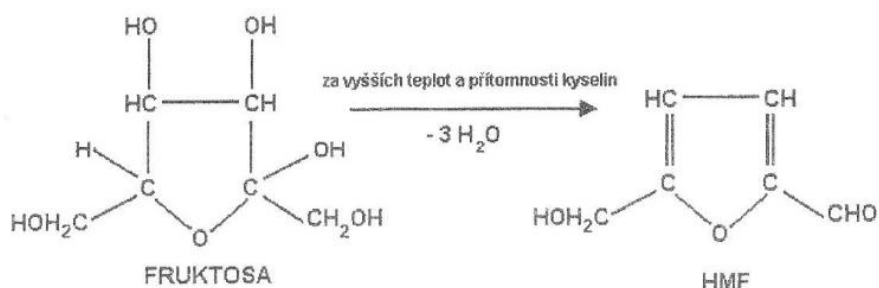
5-Hydroxymethylfurfural (HMF),

5-methylfurfural (MF) a 2-furfural (FF) jsou uznány za parametry týkající se čerstvosti a kvality některých potravin (viz obr. 7). Byly použity k vyhodnocení kvality způsobu zpracování a kvality organoleptických vlastností konečného výrobku. [20-23]



Obrázek 7 1) 5-hydroxymethylfurfural, 2) 5-methylfurfural 3) 2-furfural [28]

Tyto látky jsou přirozeně zastoupené produkty Maillardovy reakce a společně s antokyany poskytují komplexní kondenzační produkty, které způsobují typické hnědé zbarvení medu. [24]



Obrázek 8 Schéma vzniku 5-hydroxymethylfurfuralu z hexozy[2,23]

Dle směrnice Evropské unie 110/2001 a vyhlášky České republiky č. 76/2003 Sb. bylo stanoveno maximální povolené množství 5-HMF v medu na 40mg/kg. [4,7,20] Pro jiné furfuraly nebyly stanoveny maximální povolené limity. Toxikologický význam HMF nebyl dosud prokázán, ale In vitro studie prokázaly jeho cytotoxicitu, mutagenitu, karcinogenitu a genotoxicitu. [25]

Obvykle se analýza furfuralů provádí pomocí RP-HPLC s UV detekcí. Popsána byla metoda pro kvantifikaci HMF v medu, kdy se 5 g medu rozpustilo a naředilo na 50 ml destilovanou vodou, přefiltrovalo přes mikrofiltr (0,45 μm) a okamžitě nastříklo (20 μl) do chromatografického systému. Kolona s reverzní fází (18, 5 μm , 125 x 4 mm) byla opatřena předklonkou se stejnou stacionární fází. Separace látek probíhala v isokratické eluci s mobilní fází: 90 % voda, 1% kyselina octová a 10% methanol, s průtokem 0,7 ml / min. Detekce HMF byla prováděna pomocí detektoru s diodovým polem v rozsahu vlnových délek 220-660 nm. [26,27]

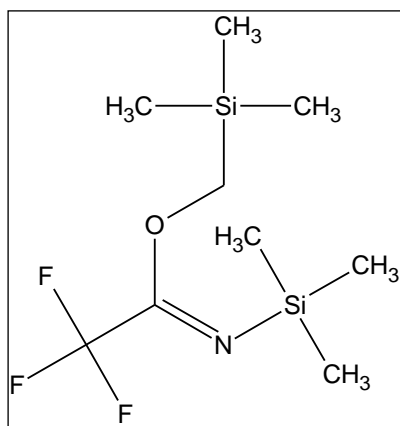
Popsány jsou také metody extrakce kapalina/kapalina [28-30] nebo mikroextrakce z head-space [20,21] s následnou analýzou GC-MS (případně HPLC/MS).

Jednou z popsaných možností extrakce kapalina/kapalina je extrakce dichlormethanem, která byla prováděna za přídavku bezvodého síranu sodného do vodné fáze, za účelem zvýšení iontové síly a tím lepší extrahovatelnosti. Takto získaný extrakt byl separován na kapilární koloně Stabilwax (polyethylenglykol) 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm

v teplotním programu 40 – 120 °C/ 1°C.min⁻¹, 120 – 180 °C/ 1,7°C.min⁻¹, 180 – 220 °C/ 25°C.min⁻¹. Detekce byla provedena na hmotnostním detektoru Varian Saturn III. [31]

Separace plynovou chromatografií byla prováděna s použitím extrakce SPME na vlákno 2 cm – 50/30 µm DVB/CAR/PDMS. Jako vysolovací činidlo byl do kapalných vzorků přidán roztok NaCl (konečná koncentrace 40% (V/V)). Adsorpce byla prováděna po dobu 40 minut a desorpce 10 minut. Separace látek probíhala v systému DB-WAX (polyethylenglykol) kapilární koloně (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Injektor i detektor byly vyhřáty na 280 °C a teplotní program začínal při 110 °C a končil při 160 °C s rychlostí ohřevu 3 °C/min. Helium, jako nosný plyn, proudilo rychlostí 1 ml/min. Detekce zde byla prováděna hmotnostní spektrometrií s ionizací elektronem (70 eV) v režimu sledování vybraných iontů. [21,32]

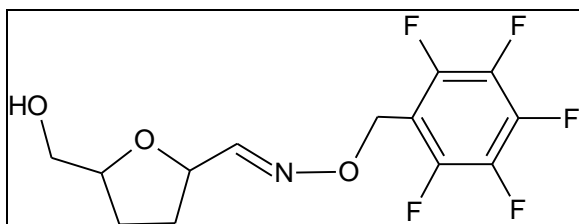
Odběr vzorků pro dávkování do plynového chromatografu byl popsán taky jako přímé vzorkování z headspace. Separace v tomto případě probíhá na DB-5 koloně (polydimethylsiloxan s 5% obsahem fenylu) při teplotě 90 °C. Nosným plynem byl vysoce čistý dusík s rychlostí proudění 3,8 ml/min. Detekce byla prováděna pomocí plamenově ionizačního detektoru. [32]



Pro zjednodušení a zkvalitnění separace byla navržena metoda derivatizace HMF. Tato metoda byla navržena pro ovocné šťávy. HMF byl zde za mírných podmínek derivatizován pomocí bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu (BSTFA) na trimethylsilylether. Po separaci v plynovém chromatografu byly tyto deriváty ionizovány elektronem a analyzovány hmotnostním analyzátozem. Data byla sbírána v módu SIM. [33]

Obrázek 9 bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid [16]

Jinou možností derivatizace HMF byla popsána přímá reakce ve vodném prostředí za laboratorních podmínek s *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) hydroxylamin hydrochloridem (PFBHA) za vzniku odpovídajícího oximu. Takto vzniklý oxim (viz obr. 10) byl extrahován ethylesterem kyseliny octové a za pomoci činidel (MSTFA/pyridin/TMCS, 10:5:0.1) převeden na trimethylsilylether. Takto připravený derivát byl opět analyzován pomocí GC/MS. [34]



Obrázek10 Derivát 5-HMF po reakci s PFBHA před trimethylsilylací

2.5.3.1 Extrakce metodou QuEChERS

V moderní praxi v chemii potravin patří mezi nejvíce užívané metody pro získávání analytů z matrice společně s extrakcí na pevnou fázi i takzvaná QuEChERS. [35]

Metoda QuEChERS (rychlá, jednoduchá, levná, efektivní, robustní, bezpečná) byla vyvinuta v roce 2003 pro stanovení reziduí pesticidů v ovoci a zelenině. Tento postup obsahuje počáteční jednofázovou extrakci vodné fáze acetonitrilem, následovanou rozdělením fází po přidavku bezvodého $MgSO_4$ a $NaCl$. Tímto se v jednom kroku provádí čištění a odstranění zbytkové vody. Takto připravený extrakt vzorku je vhodný pro analýzu pomocí GC/MS. [36]

Pro analýzu reziduí pesticidů v medu byla tato metoda QuEChERS modifikována v roce 2006, 2007 a 2010. V nejnovější úpravě je vzorek medu rozpuštěn v deionizované vodě s přidavkem NH_4OH . Po extrakci acetonitrilem je přidán bezvodý síran hořečnatý a po oddělení fází a centrifugaci je odebrán alikvotní podíl organické fáze k analýze. [37]

2.5.4 Analýza sacharidů

Jelikož je med užíván, jako nejstarší přírodní sladidlo a také dle legislativy jsou sacharidy zastoupeny v medu majoritně, je jejich analýza přirozenou součástí kontroly kvality. Monosacharidy, fruktóza a glukóza, vznikají enzymatickou hydrolýzou sacharózy a vyšších cukrů. [38]

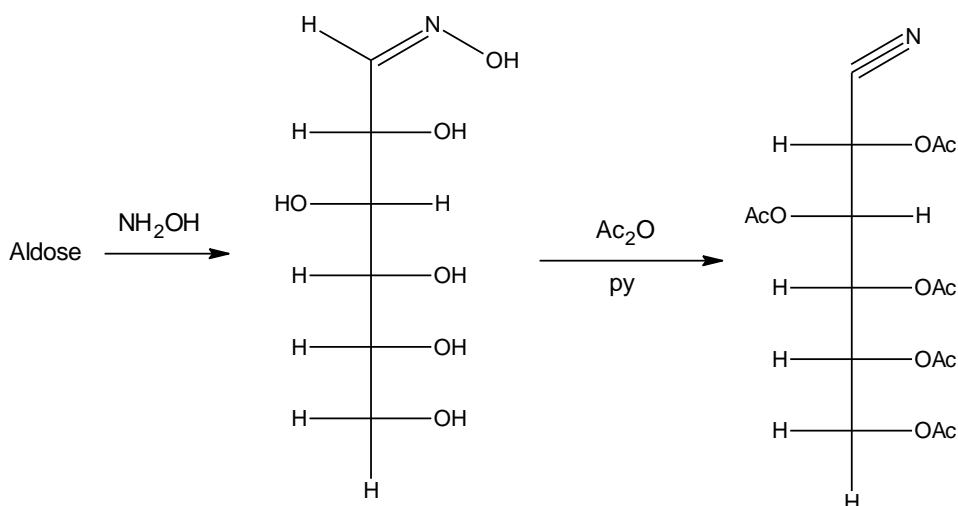
Pro analýzu sacharidů ve sladkostech se prokázala plynová chromatografie, jako vhodná metoda. Tento postup byl specificky aplikován pro analýzu medu. [18]

Základní analytické metody a jiné chromatografické techniky stanovení sacharidů byly popsány v kapitole 2.4.

Nejčastěji prováděná analýza sacharidů plynovou chromatografií s hmotnostní nebo plamenově ionizační detekcí je pomocí jejich TMS-oximů. Pomocí této metody byly v různých matricích separovány nejenom mono- a disacharidy, ale i vyšší oligosacharidy. [38-41]

Převedení sacharidů na estery (acetáty) nebo silanizované deriváty je možné v bezvodém prostředí, nejčastěji v pyridinu. Pro získání derivátů v necyklické formě sacharidů se využívá reakce s NH_2OH , kdy je zablokována volná funkční skupina aldehydu. Takto připravené deriváty sacharidů jsou analyticky vhodné pro separaci a identifikaci pomocí plynové chromatografie. [6]

Po převedení sacharidů na oximy pomocí hydroxyaminchloridu v prostředí pyridinu se pro trimethylsilylaci používá činidlo hexamethyldisilazan (HMDS) za přítomnosti kyseliny trifluoroctové (TFA) v poměru 10:1. [38-45]



Obrázek 11 Derivatizace aldosity po zablokování aldehydové skupiny [6]

Analýzy „acetátových“ derivátů sacharidů nenašly v praxi přílišné uplatnění. Přesto jsou tyto metody popsány. Derivatizace sacharidů na příslušné estery probíhá podle reakce, viz obrázek 11. [46]

Separace silanizovaných sacharidů je nejčastěji prováděna pomocí kapilární kolony typu DB-1 (polydimethylsiloxan) – 30m x 0,25mm x 0,25 μm, při teplotním programu 60-250 °C/ 8°C.min⁻¹. Pro analýzu oligosacharidů o hledané velikosti se pak teplotní programy specificky upravují, přičemž teplota injektoru byla nejčastěji nastavena na 300°C. [14,38,41-44]

Popsána byla i metoda separace v kapilární koloně typu BPX5 (95% fenyl-arylen-polydimethylsiloxan) - 30m x 0,25mm x 0,25 μm. Nástřík byl na 2 minuty vyhřát na 150 °C a poté byla teplota zvýšena na 330°C. Teplota termostatu 150 °C, která byla udržována 2 minuty od počátku analýzy, pak byla zvyšována rychlostí 1°C.min⁻¹ až na teplotu 330 °C. Tato teplota byla udržována 5 minut. [45]

Pro analýzu mono-, di- a trisacharidů se kromě kapilární kolony s polydimethylsiloxanovou stacionární fází používají kapilární kolony Rtx-65 TG (25m x 0,25mm x 0,25 μm), kde je stacionární fáze obohacena o 35% fenylu. Separace byla v tomto případě zahájena při teplotě 170 °C, která byla udržována 10 minut. Po této době byla teplota zvyšována v programu 170 - 215°C/ 15°C.min⁻¹, 215 - 240 °C/ 1°C.min⁻¹, 240 - 320 °C/ 5°C.min⁻¹. Před ukončením analýzy byla teplota 320°C udržována 20 minut. [38,41,42]

Jednou z dalších možností separace takto derivatizovaných sacharidů byla analýza pomocí kapilární kolony typu HT5 (polycarboran-siloxan) -25m x 0,25mm x 0,25 μm. Analýza začínala při teplotě 200°C, která byla udržována po dobu 15 minut. Poté byla teplota zvyšována v programu 200 – 270 °C/ 15°C.min⁻¹, 270 – 290 °C/ 1°C.min⁻¹, 290 – 350 °C/ 15°C.min⁻¹. Konečná teplota byla udržována 30 minut. Tato metoda separace byla modifikována pro analýzu tri- a tetrasacharidů. [39]

2.5.5 Analýza vosků

Přírodní vosky jsou významné deriváty „dlouhých“ jednosytných alkoholů. V menším množství jsou ve vosku zastoupeny i volné kyseliny, ale největší podíl ve složení zabírají jejich estery s výše zmíněnými alkoholy s dlouhým řetězcem. Primární alkoholy s velikostí 12-28 uhlíků, nejčastěji esterifikují s kyselinou palmitovou, v případě včelího vosku i s kyselinou cerotovou. Nejvíce zastoupenými estery je pak ceryl-ceroát. [5,6]

Včelí vosk se skládá z uhlovodíků (14%), monoesterů (35%), diesterů (14%), triesterů (3%), hydroxymonoesterů (4%), hydroxypolyesterů (8%), monoesterů kyselin (1%), polyesterů kyselin (2%), volných kyselin (12%), volných alkoholů (1%), a neidentifikovaných sloučenin (6%). Celkový přehled složení je uveden v tabulce 4. [2,47]

Analýza volných mastných kyselin a jejich esterů byla mnohokrát popsána pro spojení plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. [6,18,48]

Tabulka 4 Chemické složení včelího vosku [2]

frakce	% podíl frakce	Počet složek ve frakci		poznámka
		hlavní	vedlejší	
uhlovodíky	14	10 (5)	66	<ul style="list-style-type: none"> • nasycené uhlovodíky C₁₃₋₃₉ (cca 66%); • cis-alkeny C₃₁₋₃₃ • rozvětvené uhlovodíky nemetabolizovatelné běžnými mikroorganismy
monoestery	35	10 (7)	10	<ul style="list-style-type: none"> • hlavně kys. palmitová s C₂₄₋₃₂ alkoholy
diestery	14	6 (5)	24	<ul style="list-style-type: none"> • obsahují 15-hydroxypalmitovou kys. vázanou α, ω - 1-dioly s palmitovou nebo nenasycenou kyselinou
triestery	3	5	20	<ul style="list-style-type: none"> • obsahují 2 hydroxykyseliny nebo hydroxykyselinu s diolem uprostřed
hydroxymonoestery	4	6 (1)	20	<ul style="list-style-type: none"> • estery diolu s kyselinou nebo hydroxykyseliny s jednosytným alkoholem (C₄₀₋₅₀) • hydroxypolyestery mají větší molekulovou hmotnost a délku řetězce
hydroxypolyestery	8	5	20	
estery kyselin	1	7	20	<ul style="list-style-type: none"> • hl. estery kys. 15-hydroxypalmitové s C₃₂₋₄₄
polyestery kyselin	2	5	20	<ul style="list-style-type: none"> • dtto, ale řetězec je delší
volné kyseliny	12	8 (3)	10	<ul style="list-style-type: none"> • hlavně C₂₄, méně C₂₆ a C₂₈
volné alkoholy	1	5	?	
neidentifikované	6	7	?	
celkem	100	74	> 210	

Vzhledem k nízké těkavosti a charakteru sloučenin, které tvoří včelí vosk, je jejich analýza často založena na hydrolýze esterů a následné derivatizaci kyselých a alkoholových skupin. Jedním z hlavních problémů tohoto postupu je krok zmýdelnění, vůči němuž je včelí vosk velmi rezistentní. Zmýdelnění se často provádí zahříváním vzorku s KOH v methanolu nebo ve směsi ethanol:voda (1:1). Méně častou možností je přidání roztoku KOH v methanolu ke vzorku rozpuštěném ve směsi chloroformu a methanolu. Tyto metody zmýdelnění probíhají ve velmi malém výtěžku, proto našla pro tento krok uplatnění mikrovlnná technika. Takto získaný hydrolyzát je extrahován směsí *n*-hexanu a *n*-oktanu (2:1) Poté je extrakt okyselen kyselinou chlorovodíkovou a dvakrát reextrahován diethyletherem. Získaný etherový extrakt se odpaří v proudu N₂ a znovu rozpustí ve směsi *n*-oktanu a acetonu (1:2). Tento roztok se pak nechá reagovat s derivatizačním činidlem BSTFA při 60 °C po dobu 30 minut. Analýza roztoku byla prováděna pomocí kapilární kolony typu HP5-MS

(polydimethylsiloxan s 5% fenylu) - 30m x 0,25mm x 0,25 μm s injektorem vyhřátým na 280°C. Teplotní program byl nastaven následovně: 80°C-2 min., 80-200°C/10°C.min⁻¹, 200-330°C/30°C.min⁻¹, 330°C-60 min. Nosným plynem bylo při toku 1,2 ml/min helium. Data byla při této analýze sbírána v módu SIM. [47,49-51]

Stejně upravený vzorek lze analyzovat také pomocí kapilární kolony typu CP-Sil 5 CB (polydimethylsiloxan). Shodně bylo použito jako nosný plyn i helium, ale s teplotním programem 50°C-1 min., 50-350°C/10°C.min⁻¹, 350°C-10 min. [52]

Jinou možností derivatizace pro tuto analýzu je methylace pomocí činidla hydroxidu tetramethylamonného. Separace a analýza methyl-derivátů byla prováděna stejným způsobem. [51,53]

Pokud se získaný odparek rozpustí v *n*-hexanu, je možné jej analyzovat pomocí DB-1 kapilární kolony s detekcí plamenově ionizačním detektorem i bez derivatizace. Teplotní program byl téměř shodný, jako v případě užití kolony typu HP5-MS (tato analýza popsána i s tímto typem kapilární kolony). Nosným plynem byl v tomto případě vodík s rychlostí toku 1,8 ml/min. [50,54,55]

Pro analýzu vosků a olejů bez derivatizace byla výše popsaná chromatografická instrumentace použita v online kombinaci s předchozí separací pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Separované látky byly detekovány plamenově ionizačním detektorem. [56]

Jednou z popsaných technik analýzy včelího vosku je pyrolýza spojená s GC/MS. Bohužel tato metoda vede k rozkladu a degradaci analyzovaných sloučenin. Vyřešení tohoto problému vyřešila trimethylsilylace pomocí HMDS. Analýza takto získaných produktů byla opět prováděna pomocí kapilární kolony typu HP5-MS s injektorem vyhřátým na 300°C. Počáteční teplota držená po dobu 8 minut programu byla 31 °C, dále stoupala až na 240 °C/10 °C.min⁻¹. Na teplotě 240 °C zůstala kolona vyhřátá 3 minuty, pak se zvyšovala o 20°C.min⁻¹ na 300 °C. Konečná teplota zůstala do konce programu, a to 30 minut. Jako nosný plyn bylo použito helium. [47]

Nejčastější doporučená separace *n*-alkanů (C₅-C₁₀₀) je s 30 m SIM DIST-CB Chomapack kolonou při teplotním programu 100-325 °C/ 10°C.min⁻¹ a injektoru vyhřátém na 325 °C. [14]

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Experiment

3.1.1 Přístrojová technika

Všechny analýzy byly provedeny na plynovém chromatografu GC Systém Agilent Technologies 7890 A (USA) s kolonou od firmy SUPELCO SLBTM-5ms, typ 5 (polydimethylsiloxan s 5% fenylu), s rozměry 30m x 0,25mm x 0,25μm. K detekci byl použit hmotnostní spektrometr Agilent Technologies 5975C inert XL EI/CI (USA). Hmotnostní detektor pracoval v EI módu při 70 eV. Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokem 0,9 ml/min.

Pro přípravu vzorků k jednotlivým analýzám byly dále použity:

Centrifuga 5702 od firmy Eppendorf (Německo)

Analytické váhy XSE 205 DualRange od firmy Mettler Toledo (Švýcarsko)

Blokový termostat SBM 130 od firmy Stuart (Velká Británie)

Ultrazvuková lázeň S30/S30H od firmy Elma (Německo)

3.1.2 Vzorky

K analýzám bylo zajištěno celkem 19 vzorků medu. Tři vzorky od včelaře z Nové Vsi, šest vzorků od včelaře spravujícího včelstva v Pňovicích, Střemeníčku a Karlově a pět vzorků od včelaře spravujícího včelstva v Řimicích, Mohelnici a Dětrichově. Tři vzorky medu byly zakoupeny v prodejnách supermarketů. Dva vzorky medu byly dovezeny z Tasmánie. Žádný z medů nebyl šlehán ani pastován.

1. Medovicový med včelaře z Nové Vsi u Litovle stáčený 15. 6. 2014.
2. Květový med z Nové Vsi stáčený 4. 5. 2014.
3. Květový med z Nové Vsi stáčený 25. 5. 2014.
4. Květový „jarní“ med včelaře z Pňovic vytáčený 10.6.2014.
5. Květový „lipový“ med z Pňovic vytáčený 10. 7.2014.
6. Smíšený „pampeliškový“ med včelaře ze Střemeníčka stáčený 20. 6. 2014.
7. Smíšený „jitrocelový“ med ze Střemeníčka vytáčený 20. 8. 2014.
8. Smíšený med od včelaře z Karlova vytáčený 22.7.2014.
9. Medovicový lesní med z Karlova stáčený 30.8.2014.

10. Květový med včelaře z Řimic vytáčený 9.5.2014.
11. Květový med od včelaře z Mohelnice stáčený 25.7.2014.
12. Smíšený med z Mohelnice vytáčený 20.7.2014.
13. Strdí od včelaře z Mohelnice odebrané 9.8.2014.
14. Květový med včelaře z Dětrichova vytáčený 22.7.2014.
15. Směs medů zemí ES a medů zemí mimo ES od výrobce Medokorec s.r.o.
16. Směs květového a medovicového medu–Český 100% med od výrobce JANKAR PROFI, s.r.o.
17. Směs květových medů mimo zemí ES od výrobce JSG med, a.s.
18. Med MANUKA Active 5 +.
19. Tasmánský med Leatherwood.



Obrázek 12 Vzorky medů od včelaře, opatřujícího včelstva v Pňovicích, Střemeníčku a Karlově seřazeny podle data vytáčení (od voskově bíložlutého květového , přes pampeliškový, lipový a jitrocelový po lesní med)

3.1.3 Chemikálie

Chemikálie použité pro analýzu furfuralů:

deionizovaná voda (jednotka Millipore, USA)

acetonitril (PENTA, Česká republika)

5-hydroxymethylfurfural, p. a.(Sigma-Aldrich, Německo)

5-methylfurfural, p. a.(Sigma-Aldrich, Německo)

2-furfural, p. a.(Sigma-Aldrich, Německo)

pyridin (PENTA, Česká republika)

BSTFA (*N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid), p. a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Hexan (PENTA, Česká republika)

Chemikálie použité pro analýzu sacharidů:

deionizovaná voda (jednotka Millipore, USA)

etanol (PENTA, Česká republika)

salicin(2-(hydroxymethyl)fenyl- β -D-glukopyranosid), p. a. (Sigma-Aldrich, Německo)

hydroxylaminhydrochlorid, p. a. (Sigma-Aldrich, Německo)

pyridin (PENTA, Česká republika)

hexamethyldisilazan, p. a. (Sigma-Aldrich, Německo)

kyselina trifluoroctová, p. a. (Sigma-Aldrich, Německo)

fruktóza, p. a. (Sigma-Aldrich, Německo)

galaktóza, p. a. (Sigma-Aldrich, Německo)

manóza, p. a. (Sigma-Aldrich, Německo)

glukóza, p. a. (Sigma-Aldrich, Německo)

laktóza, p. a. (Sigma-Aldrich, Německo)

sacharóza, p. a. (Sigma-Aldrich, Německo)

maltotrióza, p. a. (Sigma-Aldrich, Německo)

Chemikálie použité pro analýzu včelího vosku:

metanol, (PENTA, Česká republika)

heptan, (PENTA, Česká republika)

dokosan, p. a. (Sigma-Aldrich, Německo)

stearylstearáť, p. a. (Sigma-Aldrich, Německo)

3.1.4 Furfuraly

Pro analýzu furfuralů byl vždy navážen 1g vzorku medu, který se za pomoci ultrazvukové lázně rozpustil ve 2 ml deionizované vody. Ke třem roztokům vzorku č. 1 bylo přidáno 50, 100, 200 μ l směsného standardu furfuralů. Koncentrace 5-hydroxymethylfurfuralu, 5-methylfurfuralu a 2-furfuralu byla 50 μ g/ml. Furfuraly byly z vodné soluce extrahovány 2 ml acetonitrilu, přičemž rozdělení fází napomohly sacharidy obsažené v medové matrici, které nasýtily vodnou fázi. Pro lepší oddělení extrakčních fází byly roztoky centrifugovány 2 minuty při 1500 rpm. Z acetonitrilové fáze byl do vialky odebrán 1 ml, ze kterého se dávkoval 1 μ l. Furfuraly byly separovány v teplotním programu, který začínal na 50°C. Tato teplota byla udržována po dobu 2 minut a poté byla zvyšována

rychlostí 10°C/min až na teplotu 300 °C. Teplota 300°C byla udržována 5 minut. Celková doba separace trvala 31,5 minut. Separace probíhala v módu splitless, splitter se otevíral 12 s po zahájení programu. Hmotnostní detektor pracoval v režimu Solvent delay. Data se sbírala v režimu SIM (Selected ion monitoring) od 3. minuty analýzy. Pro 2-furfural se do 6. minuty sbíral signál 95 m/z a 96 m/z, pro 5-methylfurfural se od 6. do 10. minuty sbíral signál 109 m/z a 110 m/z a pro 5-hydroxymethylfurfural se od 10. minuty do konce analýzy sbíral signál 126 m/z a 97 m/z.

Pro porovnání sledovaného množství 5-hydroxymethylfurfuralu byla provedena metoda jeho stanovení po derivatizaci. Opět byl navážen 1 g vzorku, rozpuštěn ve 2 ml deionizované vody a hledané analyty byly extrahovány 2 ml acetonitrilu. Organická fáze (1 ml) potom byla odpařena pod atmosférou N₂ při 40 °C. K odparku bylo přidáno 50 µl pyridinu a 50 µl silanizačního činidla BSTFA (*N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid). Takto připravený roztok se nechal 60 minut inkubovat při teplotě 40 °C a poté se doplnil hexanem na objem 1 ml. Před analýzou se vzorek centrifugoval 2 minuty při 2300 rpm a supernatant se odebral do čisté vialky.

3.1.5 Sacharidy

Z jednotlivých vzorků bylo vždy naváženo 100 mg medu, který se rozpustil ve 2 ml deionizované vody. K tomuto vodnému roztoku se pro deproteinizaci přidaly 4 ml roztoku salicinu (5mg/ml) v etanolu (denaturovaného 5% metanolu). Z této soulnice bylo 100 µl ve vialce odpařeno pod N₂ atmosférou při 50 °C. Odparek byl rozpuštěn v 500µl roztoku hydroxylaminhydrochloridu v pyridinu (25 mg/ml). Vialka byla uzavřena a inkubována 30 minut při teplotě 75 °C. Po ochlazení bylo přidáno 500 µl hexamethyldisilazanu a 50 µl kyseliny trifluoroctové. Poté byl vzorek inkubován 30 minut při laboratorní teplotě, 2 minuty centrifugován při 1500 rpm a supernatant byl odebrán k analýze. Stejným způsobem byly zpracovány standardy sacharidů (fruktóza, manóza, galaktóza, glukóza, laktóza, sacharóza, maltotrióza). K separaci byl vždy dávkován 1 µl v módu splitless. Počáteční teplota 150 °C byla udržována 2 minuty. Dále teplota stoupala o 10 °C/minutu až na 320 °C. Tato teplota byla udržována 15 minut. Celková doba analýzy byla 34 minut.

3.1.6 Vosky (včelí vosk)

Pro analýzu včelího vosku v medu byly vždy za pomoci ultrazvukové lázně ohřáté na 45 °C rozpuštěny 2 g medu v 2 ml metanolu. Takto připravené roztoku byly extrahovány 1 ml heptanu. K roztoku vzorku č. 1 byl přidán směsný standard roztoku dokosanu (0,05 μmol/ml) a stearylstearátu (0,1 μmol/ml) v heptanu. Pro lepší rozdělení extrakčních fází byly roztoky 5 minut centrifugovány 4400 rpm. K analýze bylo do vialky odebráno 600 μl heptanové fáze.

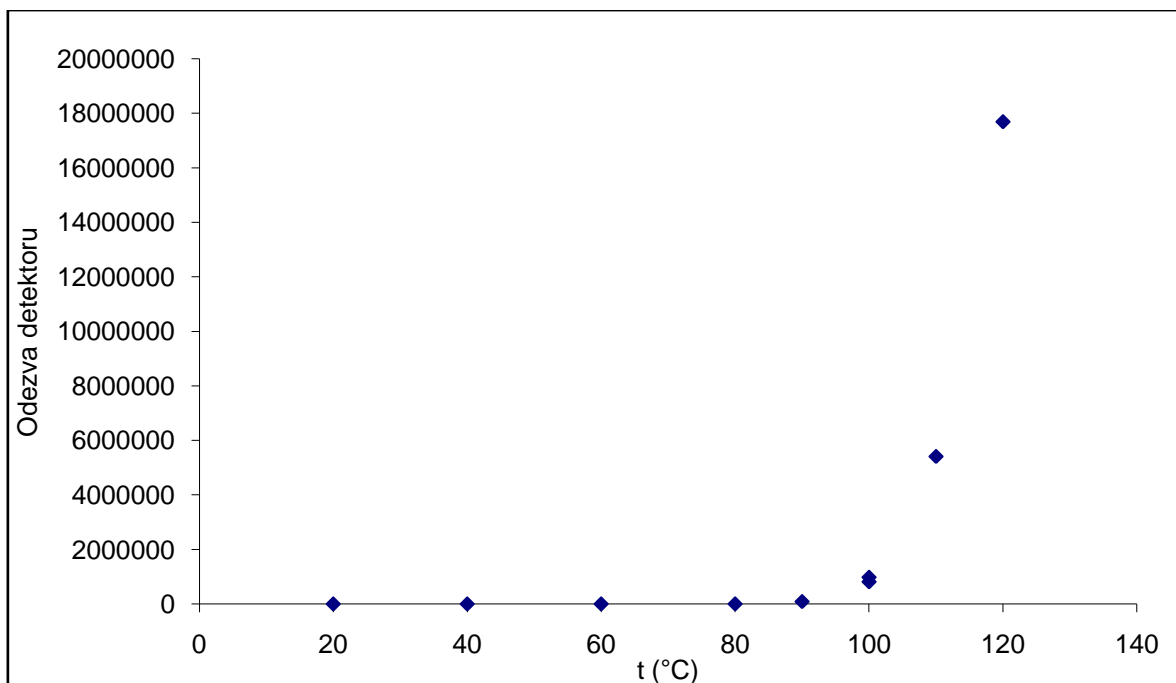
Do chromatografického systému byl nastříknut 1 μl. Teplotní program začínal na 50 °C. Tato teplota byla udržována po dobu 2 minut a poté byla navyšována o 5 °C za minutu až na konečnou teplotu 360 °C, která byla udržována 25 minut. Analýza jednoho vzorku pak trvala 89 minut. Separace probíhala v módu splitless. Data se sbírala v režimu SIM (Selected ion monitoring), a to zvláště pro *n*-alkany signál 57 m/z do času analýzy 55,5 minuty a dále potom signály odpovídající molekulárním iontům jednotlivých esterů mastných kyselin (např. sumární vzorec stearylstearátu je C₃₆H₇₂O₂- to by mělo v EI odpovídat molekulárnímu iontu 537 m/z).

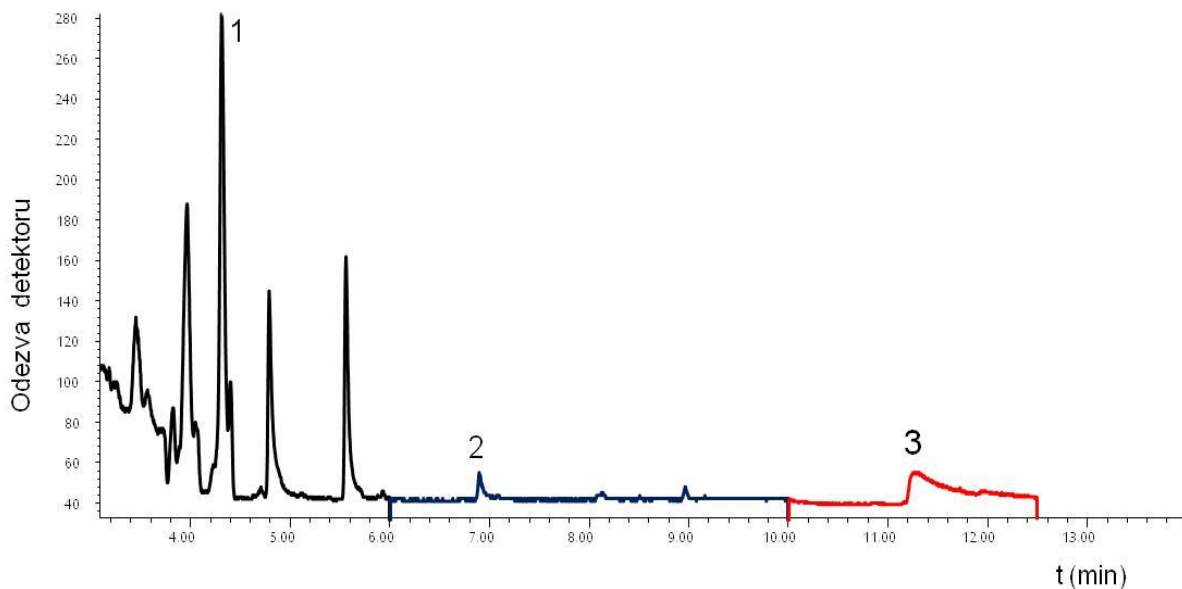
3.2 Výsledky a diskuze

3.2.1 Furfuraly

Teplota varu furfuralů (FF – 160°C, MF – 187°C a HMF – 291 °C) a jejich termostabilita je velice vhodná pro využití separace GC. Při vyvíjení metody separace a stanovení všech furfuralů v řadě byl vyzkoušen záměr o jejich extrakci přímo z head-space pomocí techniky mikroextrakce tuhou fází (SPME) na vlákno DVB/CAR/PDMS, kdy by nedocházelo k možným ztrátám analytu při manipulaci se vzorkem. Výsledky tohoto měření prokázaly nízkou účinnost a opakovatelnost, a to i při délce sorpce 1 hod. Pokus o zvýšení sorpce na vlákno zvýšením teploty poskytl větší odezvy píku HMF (viz graf 5). Prudký nárůst odezvy byl pozorován při teplotách 100 °C a vyšších, kdy je již možné očekávat značný rozklad sacharidových prekurzorů za vzniku degradačních produktů včetně HMF. Z tohoto lze usuzovat, že pokus vedl spíše k nežádoucímu zvýšení produkce furfuralů z matrice obsahující velké množství mono- a oligosacharidů, než k potřebnému zvýšení účinnosti extrakce.

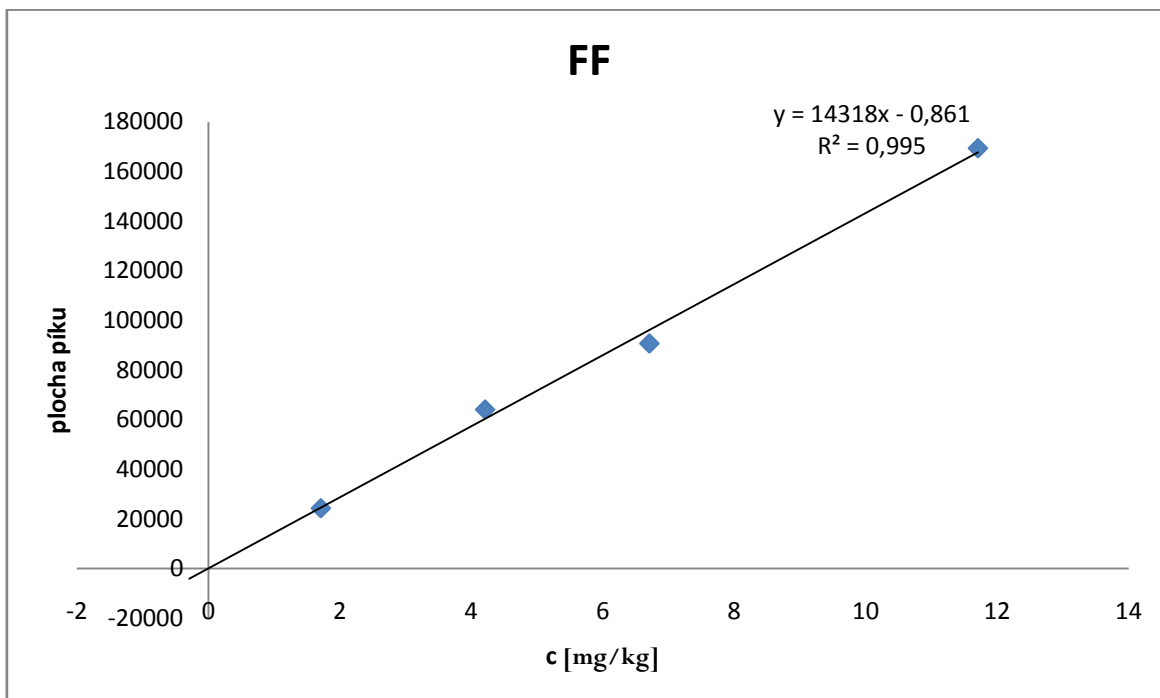
Graf 1 Teplotní závislost plochy píku 5-hydroxymethylfurfuralu



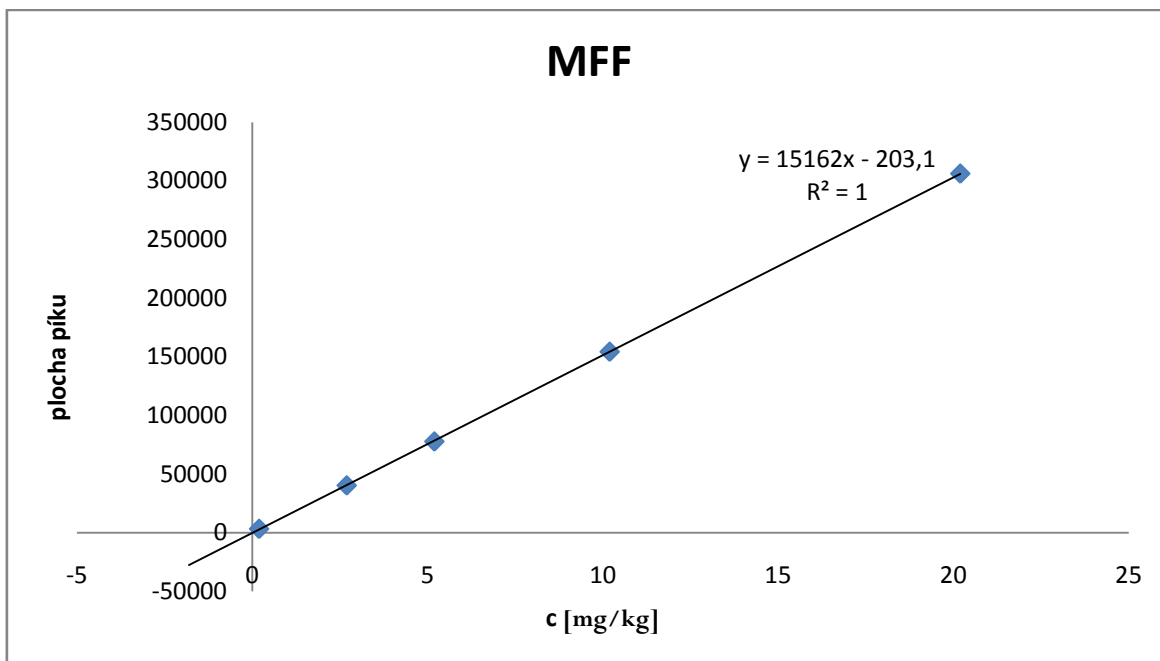


Obrázek 13 Chromatogram separace furfuralů bez derivatizace- GC separace (SUPELCO SLB™-5ms, typ 5; 0,9ml/min) (1: 2-FF, 2: 5-MF, 3: 5-HMF). Detekce: hmotnostní spektrometr

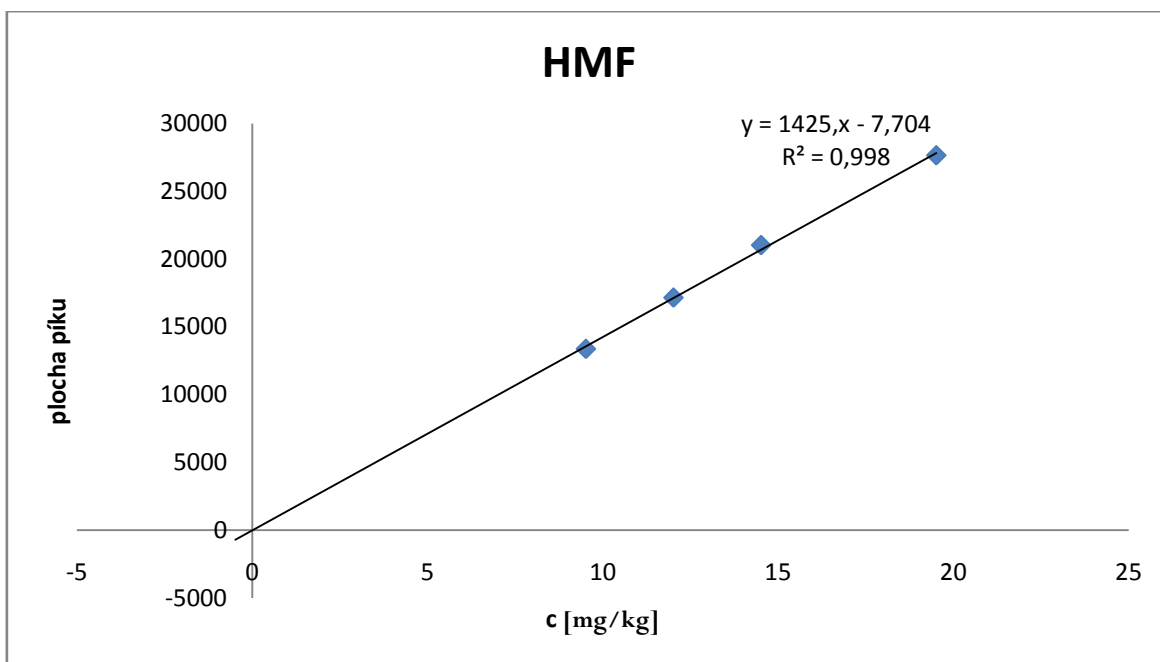
Graf 2 Kalibrační závislost 2-furfuralu (standardní přídavky - vzorek č.1)



Graf 3 Kalibrační závislost 5-methylfurfuralu (standardní přídavky - vzorek č.1)



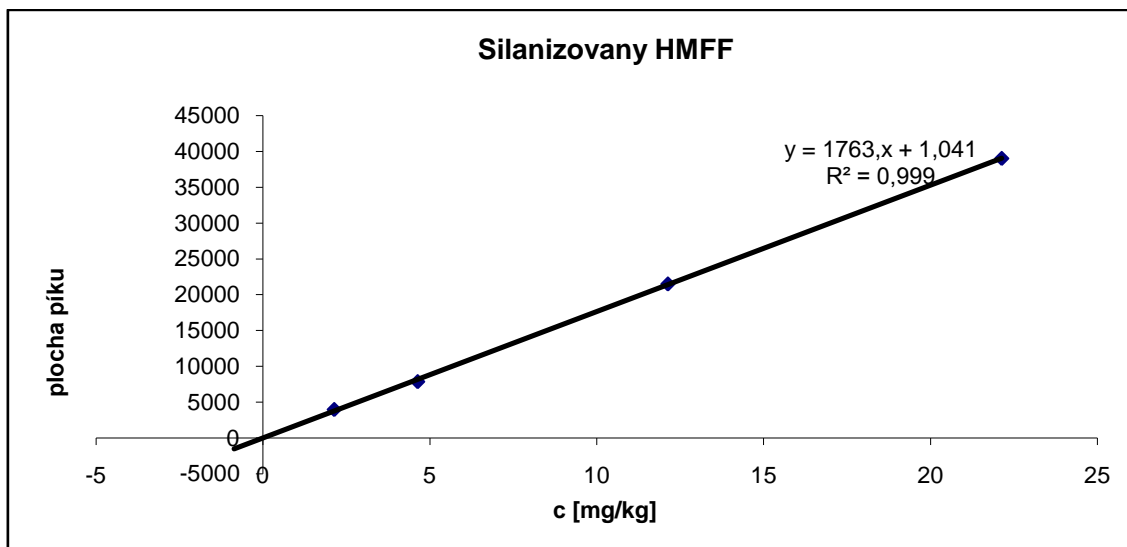
Graf 4 Kalibrační závislost 5-hydroxymethylfurfuralu (standardní přídavky - vzorek č.1)



Tabulka 5: Výsledky analýzy všech furfuralů bez derivatizace

vzorek	FF (mg/kg)	MF (mg/kg)	HMF(mg/kg)
t_R	4.78 min	6.88 min	11.26 min
<i>Sbíraná data v SIM</i>	95 m/z	109 m/z	126 m/z
1) Nová Ves (15.6)	1,71	0,20	9,52
2) Nová Ves (4.5)	1,86	0,40	8,12
3) Nová Ves (25.5)	1,45	0,27	11,34
4) Pňovice (10.6)	2,19	0,30	18,09
5) Pňovice (10.7)	2,22	0,29	12,88
6) Střemeníčko (20.6)	2,30	0,29	11,16
7) Střemeníčko (20.8)	1,82	0,27	8,24
8) Karlov (22.7.)	2,17	0,27	9,25
9) Karlov (30.8.)	7,62	0,26	10,89
10) Řimice (9.5.)	1,31	0,25	7,75
11) Mohelnice (25.7.)	1,11	0,22	5,11
12) Mohelnice (20.7.)	1,65	0,25	8,94
13) Mohelnice (9.8.)	2,28	0,33	15,76
14) Dětřichov (22.7.)	1,47	0,27	11,35
15) Medokorec	2,45	0,37	21,97
16) Český 100% med	4,56	0,29	10,11
17) JSG Med	1,88	0,29	30,89
18) Med manuka	0,70	0,12	21,48
19) Tasmánský med	1,64	0,09	9,99
LOD	0,02	0,01	0,1
LOQ	0,06	0,03	0,3

Graf 5 Kalibrační závislost derivatizovaného 5-hydroxymethylfurfuralu (standardní přídávky - vzorek č.1)



Tabulka 6: Výsledky analýzy silanizovaného 5-HMFF a jeho korekce na vnitřní standard(D-Chrysen) v porovnání s výsledky analýzy 5-HMFF bez derivatizace

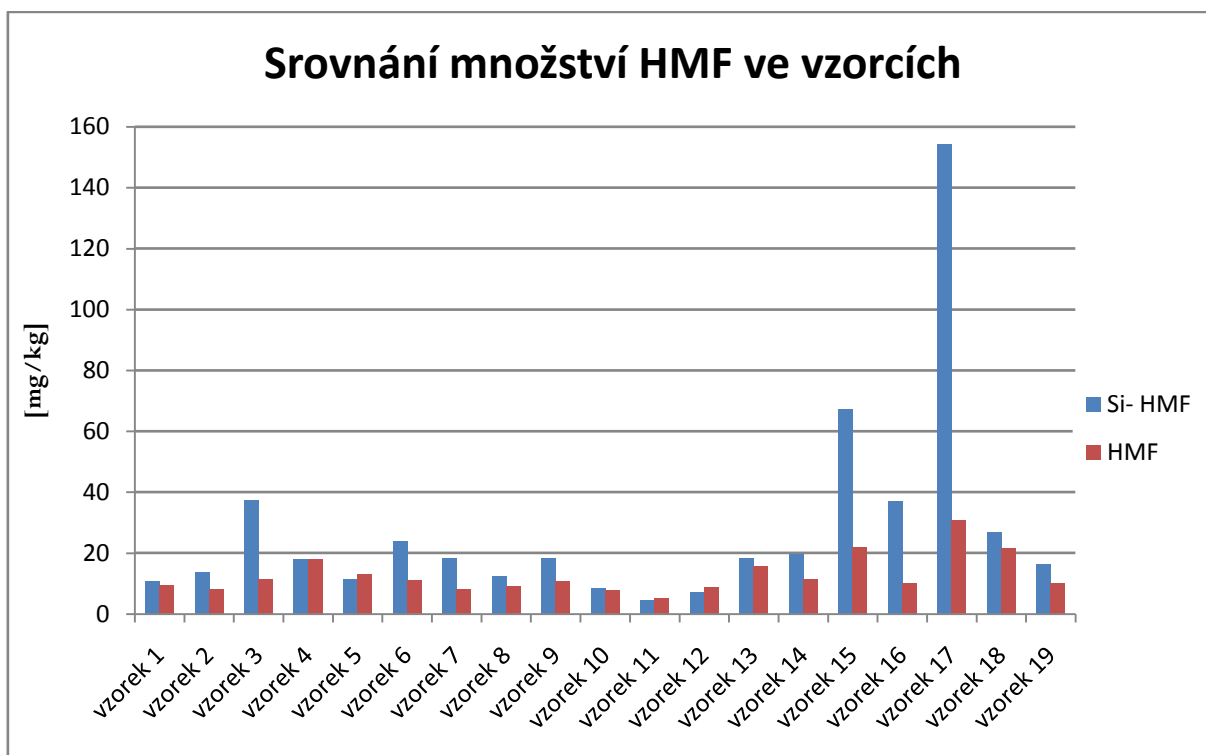
vzorek	HMF (mg/kg)	HMF-kor.(mg/kg)	HMF-nederiv. (mg/kg)
t_R	12.25 min	-	11.26 min
Sbíraná data v SIM	183 m/z	-	126 m/z
1) Nová Ves (15.6)	2,13	10,77	9,52
2) Nová Ves (4.5)	4,93	13,76	8,12
3) Nová Ves (25.5)	9,59	37,31	11,34
4) Pňovice (10.6)	59,35	17,97	18,09
5) Pňovice (10.7)	38,84	11,45	12,88
6) Střemeníčko (20.6)	29,81	23,92	11,16
7) Střemeníčko (20.8)	17,51	18,32	8,24
8) Karlov (22.7.)	14,61	12,49	9,25
9) Karlov (30.8.)	24,64	18,39	10,89
10) Řimice (9.5.)	14,71	8,59	7,75
11) Mohelnice (25.7.)	7,04	4,52	5,11
12) Mohelnice (20.7.)	11,07	7,10	8,94
13) Mohelnice (9.8.)	32,41	18,29	15,76
14) Dětrichov (22.7.)	41,86	19,63	11,35
15) Medokorec	138,99	67,36	21,97
16) Český 100% med	72,08	37,05	10,11
17) JSG Med	276,76	154,27	30,89
18) Med manuka	39,85	26,72	21,48
19) Tasmánský med	23,71	16,49	9,99
LOD	0,1	-	0,2
LOQ	0,3	-	0,6

Praktickou a nejlépe proveditelnou se ukázala extrakce látek v systému kapalina-kapalina. Vzorek byl vždy rozpuštěn ve vodě a extrahován organickým rozpouštědlem. Vyzkoušen byl CH_2Cl_2 , ethylester kyseliny octové, diethylether, pentan a acetonitril technikou QuEChERS. Poslední zmíněné rozpouštědlo se ukázalo pro extrakci jako neúčinnější. Vysoký obsah sacharidů v matrici, zde posloužil jako vysolovací činidlo, potřebné pro rozdělení fází. Nebylo proto nutné při extrakci přidávat MgSO_4 a NaCl .

Jako další možnost zkvalitnění separace byla vyzkoušena derivatizace furfuralů pomocí *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) hydroxylamin hydrochloridu (PFBHA). Při této derivatizaci vznikaly *cis/trans* izomery, což komplikovalo kvantifikaci. Bohužel tato derivatizace neprobíhala u všech furfuralů v dostatečném výtěžku. Převedení furfuralů na deriváty cysteaminu také neprobíhala kvantitativně a pro další použití bylo bezvýznamné. Poslední možností derivatizace, která byla prováděna, byla silylace pomocí BSTFA (40°C). Tato derivatizace probíhá na hydroxy- skupině, proto bylo možné takto analyzovat pouze HMF. Výsledky tohoto měření jsou ve výsledcích uvedeny pro porovnání (viz graf 5 a tabulka 6).

Jako další možnost zlepšení účinnosti separace byl vyzkoušen přídavek jiného organického rozpouštědla do vzorku. V tomto případě 2% nebo 10% toluenu ($t_v=110,6^\circ\text{C}$), který je těkavější sloučeninou než analyzované látky. Úvahou tohoto použití bylo pokrytí stacionární fáze kolony jemným filmem rozpouštědla, na kterém by se lépe zafokusovaly separované furfuraly. Přídavek toluenu v tomto případě neposloužil žádaným účinkem, dokonce došlo ke zhoršení kvality separace. K nejlepší separaci furfuralu dochází při analýze bez derivatizace a bez přídavných činidel (viz obr 13). Pro kvalitativní i kvantitativní vyhodnocení výsledků se lépe hodily hmoty 95 m/z pro FF, 109 m/z pro MF a 126 m/z HMF. Retenční časy furfuralů jsou popsány v tabulce. Analytická metoda prokázala svoji použitelnost k analýze furfuralů ve včelím medu. Výsledné hodnoty byly vyhodnoceny metodou standardního přídavku (viz grafy 2, 3 a 4). Na vhodnost GC-MS analýzy poukazují jakostní parametry, jako jsou meze detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ) a citlivost. Tyto hodnoty byly vyhodnoceny analýzou ředěného standardního roztoku o známé koncentraci.

Graf 6 Srovnání množství HMF ve vzorcích



Srovnání výsledků analýzy bez a s derivatizací poukazuje na malé i větší rozdíly ve stanovení (viz graf 6 a tabulka 6). Větší množství HMF při analýze s derivatizací může být způsobené nešetrným zacházením a zvýšenou teplotou při odpařování vzorku a následné derivatizaci. Druhou možností, která způsobuje zjištěné rozdíly, je méně kvalitní odezva separovaného HMF bez derivatizace.

Analýza všech furfuralů bez derivatizace vyčíslila rovnovážný obsah všech degradačních produktů v řadě (viz tabulka 5). Zatímco HMF je v medu obsaženo cca 10 mg/kg (výjimečně až 30 mg/kg), MF (další produkt rozpadové řady) je obsažen jen asi 0,2 mg/kg. Oproti tomu je nejmenší FF obsažen cca 2 mg/kg. Můžeme proto uvažovat, že s rostoucím stářím medu přibývá HMF (viz kap. 2.5.2) a nějaká část dále degraduje. Rychlost vzniku FF z MF je ale větší než rychlost vzniku MF z HMF.

3.2.2 Sacharidy

Sacharidy nejsou svými teplotami tání (např.: glukóza- 146°C, fruktóza- 104°C, galaktóza- 167°C, sacharóza- 186°C, laktóza -203°C) a následujícím tepelným rozkladem přímo předurčeny k separaci a analýze pomocí GC/MS. Pro tento druh analýzy se tedy sacharidy musely derivatizovat. Med se jako matrice složená převážně ze sacharidů velice dobře rozpouštěl ve vodě. Přídavek ethanolu, který měl denaturovat přítomné proteiny, posloužil spíše pro ředění vzorku. Salicin rozpuštěný v etanolu byl použit jako vnitřní standard, ke kterému se vztahovaly získané hodnoty. Metoda převedení sacharidů na silylované deriváty byla použita a byla potvrzena její spolehlivost.

Stejným způsobem byly zpracovány standardy sacharidů (fruktóza, manóza, galaktóza, glukóza, laktóza, sacharóza, maltotrióza), které byly použity jako vnější standardy pro určení relativní odezvy detektoru na jednotlivé sacharidy. Díky retenčním časům byly identifikovány sacharidy v analyzovaném medu. Monosacharidy se separovaly v pořadí fruktóza, galaktóza, glukóza. Přítomnost manózy v medu nebyla potvrzena. Stopové množství galaktózy (složky mléčného cukru) ve vzorcích je možné přisuzovat přítomnosti každého jednoho epimeru v monosacharidu. Tato myšlenka byla potvrzena analýzou standardu glukózy, při které bylo nalezeno stanovitelné množství galaktózy.

Pro disacharid maltózu nebyl analyzován standard. Identifikace maltózy v chromatogramu proběhla na základě znalosti eluce monosacharidů (fruktóza-galaktóza-glukóza a sacharóza-laktóza-*maltóza*). K ověření správnosti identifikace píku maltózy přispěla rešerše studií analýzy sacharidů (viz kap. 2.5.3) a data získaná z hmotnostního spektrometru.

**Tabulka 7: Výsledky analýzy TMS-oximů sacharidů v % (m/m) vyhodnocené metodou vnitřního standardu;
(v pořadí: fruktóza, galaktóza, glukóza, sacharóza, laktóza, maltóza, erulóza, maltotrióza)**

LOD: 0,003% (m/m)

LOQ: 0,01% (m/m)

Detekční a kvantifikační limity jsou shodné pro všechny sacharidy.

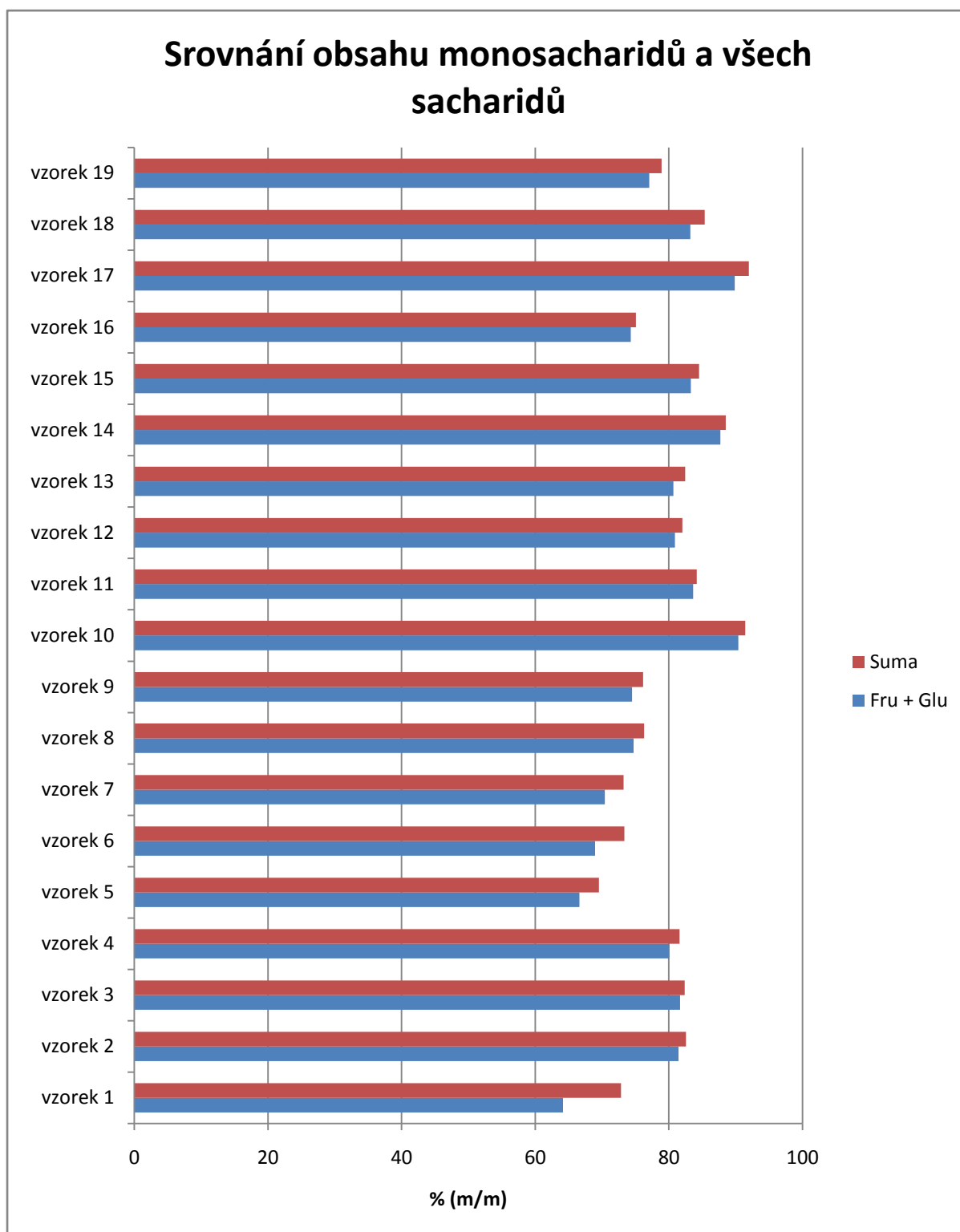
Vzorek/sacharid	Fru	Gal	Glu	Sach	Lak	Mal	Erl	Malt
1) Nová Ves (15.6)	31,00	0,05	33,16	0,47	0,01	1,55	6,43	0,14
2) Nová Ves (4.5)	33,73	0,07	47,73	0,01	0,02	0,69	0,07	0,22
3) Nová Ves (25.5)	32,76	0,05	48,91	0,01	0,01	0,62	0,01	<0,01
4) Pňovice (10.6)	35,15	0,05	44,90	0,13	0,02	1,31	0,02	<0,01
5) Pňovice (10.7)	33,02	0,07	33,60	1,27	0,02	1,43	0,12	<0,01
6) Střemeníčko (20.6)	33,65	0,07	35,29	1,72	0,02	1,88	0,69	<0,01
7) Střemeníčko (20.8)	34,36	0,06	36,05	0,20	0,02	1,42	1,13	<0,01
8) Karlov (22.7.)	37,28	0,06	37,44	0,17	0,01	1,20	0,13	<0,01
9) Karlov (30.8.)	36,74	0,07	37,74	0,11	0,02	1,16	0,30	<0,01
10) Řimice (9.5.)	44,64	0,08	45,76	0,08	0,02	0,80	0,03	<0,01
11) Mohelnice (25.7.)	37,50	0,08	46,13	0,01	0,02	0,43	<0,01	<0,01
12) Mohelnice (20.7.)	40,30	0,06	40,62	0,03	0,02	0,92	0,04	<0,01
13) Mohelnice (9.8.)	42,10	0,05	38,60	0,05	0,02	1,58	0,04	<0,01
14) Dětrichov (22.7.)	40,98	0,06	46,70	0,02	0,02	0,71	<0,01	<0,01
15) Medokorec	46,01	0,07	37,27	0,12	0,03	1,01	<0,01	<0,01
16) Český 100% med	34,76	0,06	39,52	0,03	0,01	0,62	0,05	<0,01
17) JSG Med	43,65	0,05	46,21	1,77	0,02	0,27	<0,01	<0,01
18) Med manuka	44,14	0,09	39,06	0,23	0,03	1,67	0,13	<0,01
19) Tasmánský med	41,61	0,07	35,47	0,10	0,02	1,54	0,08	<0,01

Tabulka 8: Srovnání kontrolovaných parametrů: souhrnný obsah fruktózy a glukózy, obsah všech sacharidů a obsah sacharózy (v % (m/m))

Vzorek/ukazatel	Fru+Glu	Suma	Sach
1) Nová Ves (15.6)	64,16	72,82	0,47
2) Nová Ves (4.5)	81,46	82,55	0,01
3) Nová Ves (25.5)	81,67	82,38	0,01
4) Pňovice (10.6)	80,06	81,60	0,13
5) Pňovice (10.7)	66,61	69,53	1,27
6) Střemeníčko (20.6)	68,94	73,33	1,72
7) Střemeníčko (20.8)	70,41	73,24	0,20
8) Karlov (22.7.)	74,72	76,29	0,17
9) Karlov (30.8.)	74,48	76,14	0,11
10) Řimice (9.5.)	90,40	91,42	0,08
11) Mohelnice (25.7.)	83,62	84,17	0,01
12) Mohelnice (20.7.)	80,92	82,01	0,03
13) Mohelnice (9.8.)	80,69	82,44	0,05
14) Dětřichov (22.7.)	87,69	88,51	0,02
15) Medokorec	83,28	84,52	0,12
16) Český 100% med	74,28	75,07	0,03
17) JSG Med	89,86	91,98	1,77
18) Med manuka	83,21	85,37	0,23
19) Tasmánský med	77,08	78,89	0,10
<i>Jakostní parametr</i>	<i>min. 60/45 % (m/m)</i>	-	<i>5,00 % (m/m)</i>

Cílem stanovení sacharidů v medu bylo sestavit metodu, díky které bude možné vedle sebe analyzovat mono-, di- a trisacharidy (viz tabulka 7). Největším problémem této analýzy je různé zastoupení jednotlivých sacharidů, a to od setin po desítky procent. Důležité bylo nalezení správné navážky vzorky tak, aby dominantní monosacharidy „nepřehltily“ detektor a naopak obsažené trisacharidy byly v koncentraci nad limitem stanovení. Ačkoli by pro lepší „zachycení“ a popsání všech trisacharidů v medu byla vhodná větší navážka, je metoda s 0,1 g analyzovaného medu postačující pro analýzu všech mono-, di- a trisacharidů vedle sebe.

Graf 7 Obsah sacharidů ve vzorcích



Analytická metoda prokázala svoji použitelnost pro analýzu fruktózy, glukózy a sacharózy, které jsou jakostním parametrem. Metoda je vhodná i pro posouzení původu a procesu vzniku medu, podle analýzy obsažených trisacharidů. Výsledné hodnoty byly vyhodnoceny metodou vnitřního a vnějšího standardu. Na vhodnost GC-MS analýzy poukazují jakostní parametry, jako jsou meze detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ) a citlivost. Tyto hodnoty byly vyhodnoceny analýzou ředěného standardního roztoku o známé koncentraci.

Získané hodnoty obsahů monosacharidů prokázaly vyšší množství glukózy u květových medů. Toto souvisí i s větším obsahem všech monosacharidů v květových medech. V jakostním parametru souhrnného obsahu fruktózy a glukózy a parametru sacharózy všechny analyzované vzorky vyhověly. Naproti tomu u medů medovicového a smíšeného původu je dokázán větší obsah vyšších sacharidů (viz tabulky 7, 8 a graf 7).

Mezi medy zakoupenými v obchodní síti a medy od lokálních včelařů nebyl v parametru obsahu sacharidů nalezen rozdíl ani trend.

3.2.3 Vosky

K analýze včelího vosku v medu vedla myšlenka, že pokud med zraje a byl uskladněn v plástu z včelího vosku, je velmi pravděpodobné, že při jeho získávání (vytáčení, lisování, ...) v něm zůstaly stopy vosku. Složení včelího vosku (estery mastných kyselin, *n*-alkany) je velmi zajímavé pro analýzu plynovou chromatografií. Pro lepší solvataci nepolárních složek vosku se vzorek medu rozpouštěl za tepla v metanolu, díky kterému se narušily micelární struktury, které tyto látky tvoří (viz obr. 15). Pro extrakci nepolárních složek, pak byl zvolen heptan.

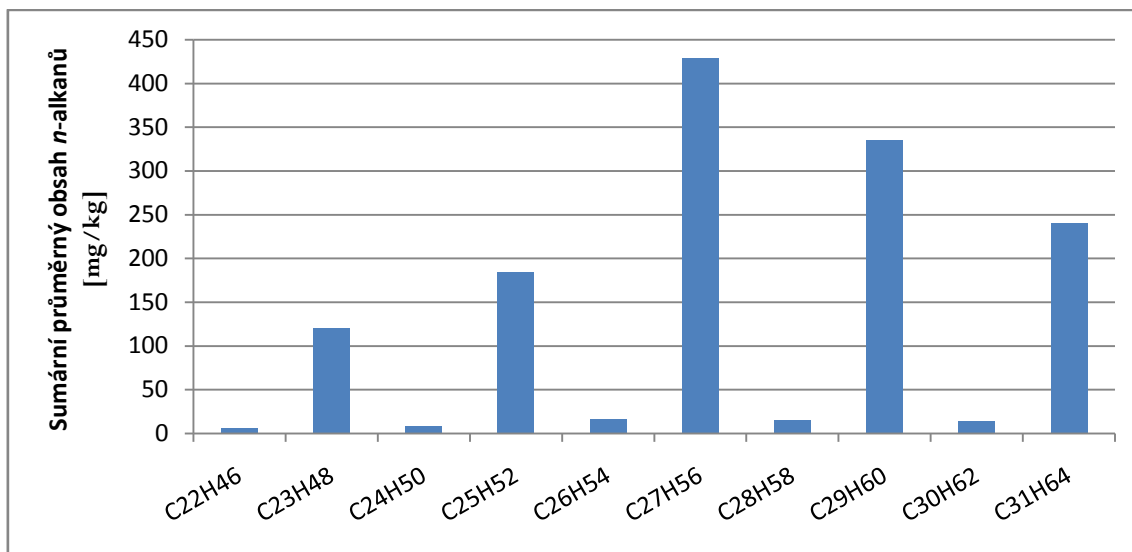
Tabulka 9 Výsledky analýzy včelího vosku v medu: *n*-alkany

LOD: 0,03 mg/kg

LOQ: 0,1 mg/kg

alkan	C ₂₂ H ₄₆	C ₂₃ H ₄₈	C ₂₄ H ₅₀	C ₂₅ H ₅₂	C ₂₆ H ₅₄	C ₂₇ H ₅₆	C ₂₈ H ₅₈	C ₂₉ H ₆₀	C ₃₀ H ₆₂	C ₃₁ H ₆₄
med	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
1.	8,36	82,21	5,63	105,07	6,19	122,08	6,21	92,05	5,29	54,73
2.	1,08	14,11	1,61	21,66	2,07	22,23	2,35	20,62	1,80	10,23
3.	15,84	297,00	19,27	518,95	46,87	1409,50	51,83	1267,46	46,34	906,01
4.	5,00	122,91	6,29	222,18	7,18	201,50	7,15	150,22	8,18	74,87
5.	12,05	285,31	16,00	437,49	32,71	1154,25	31,21	802,90	31,91	565,39
6.	3,39	77,27	3,94	141,42	6,45	228,51	6,91	143,96	7,38	85,57
7.	27,97	430,00	48,44	734,87	93,61	2702,71	81,29	2154,47	74,03	1710,55
8.	7,75	203,71	13,29	313,54	56,35	846,23	25,24	693,33	20,83	501,53
9.	4,93	131,81	6,02	144,40	7,53	206,08	7,15	126,68	8,18	84,98
10.	4,25	70,01	4,03	105,55	4,40	91,02	4,71	79,30	5,91	38,22
11.	6,09	112,81	9,23	141,60	16,35	237,14	20,72	194,20	14,80	128,47
12.	3,02	110,31	5,10	106,67	4,75	106,52	5,02	90,71	3,92	52,66
13.	4,27	128,36	7,37	130,70	13,73	245,63	15,02	203,50	12,99	128,72
14.	0,69	39,97	1,72	64,55	1,92	58,22	2,19	42,57	2,64	21,58
15.	1,20	39,45	2,05	54,07	2,48	47,81	2,74	30,10	3,33	19,64
16.	0,36	29,06	0,83	52,79	1,32	43,01	1,38	34,89	1,38	13,39
17.	1,26	12,70	1,29	17,29	1,22	15,05	1,23	7,26	1,39	5,23
18.	2,12	60,89	3,69	111,85	10,57	258,57	9,42	163,27	8,26	125,28
19.	0,82	43,59	2,12	80,09	4,80	160,74	4,08	82,70	3,08	51,24

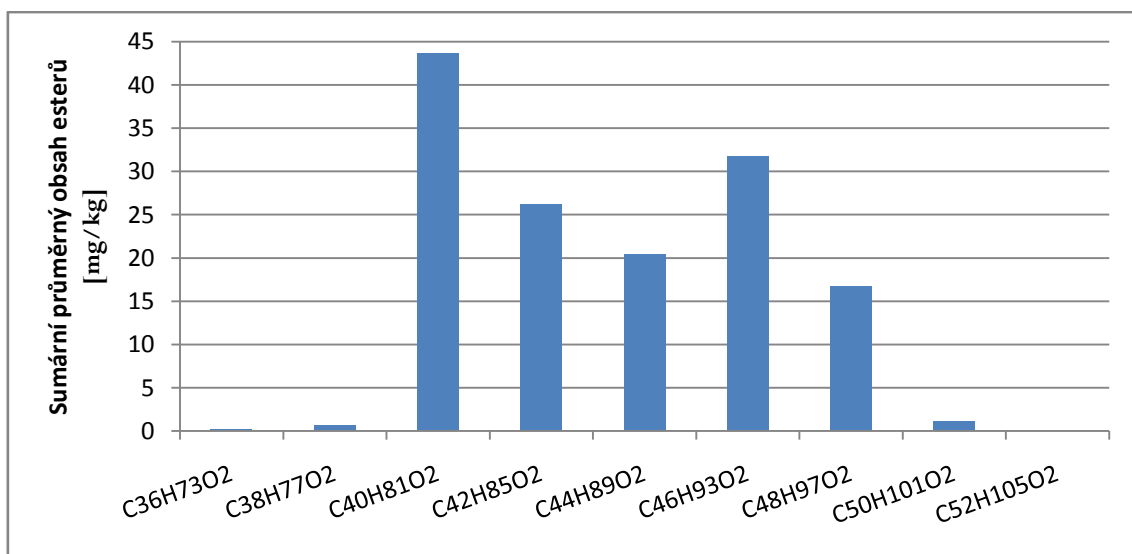
Graf 8 Průměrný obsah jednotlivých *n*-alkanů



Při analýze *n*-alkanů byl jednoznačně prokázán majoritní obsah uhlovodíků s lichým počtem uhlíků (viz tabulka 9 a graf 8). Nejvíce zastoupeny jsou uhlovodíky heptakosan a nonakosan. Předpokládán byl výskyt uhlovodíků $C_{13} - C_{39}$. Větší výskyt uhlovodíků s lichým počtem uhlíků můžeme přikládat jejich vzniku rozkladem esterů, při kterém se jeden uhlík „odštěpí“.

Nalezený obsah esterů mastných kyselin ve vzorcích medu byl menší než obsah *n*-alkanů (viz tabulky 9 a 10). Nejvíce zastoupeny jsou estery se 40- 48 uhlíky (viz graf 9 a obr. 14). Toto zjištění potvrzuje složení včelího vosku popsané literaturou (viz kap. 2.5.5), které zmiňovalo dominantní zastoupení esterů kyseliny palmitové ($C_{16}H_{32}O_2$) s alkoholy $C_{24} - C_{32}$.

Graf 9 Průměrný obsah jednotlivých esterů

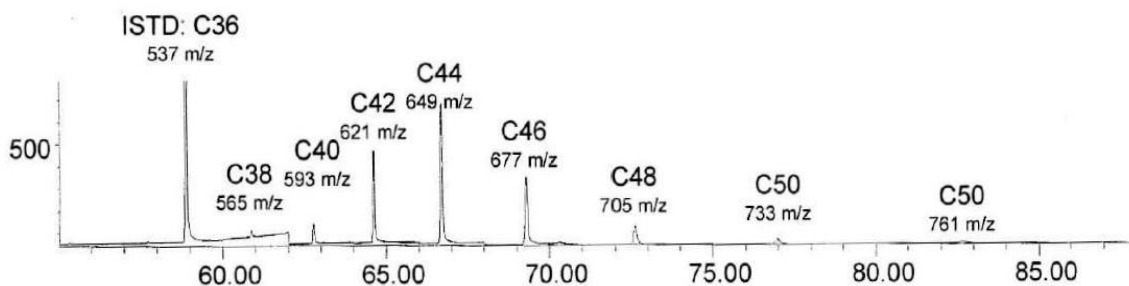


Tabulka 10 Výsledky analýzy včelího vosku v medu: voskové estery mastných kyselin

LOD: 0,003 mg/kg

LOQ: 0,01 mg/kg

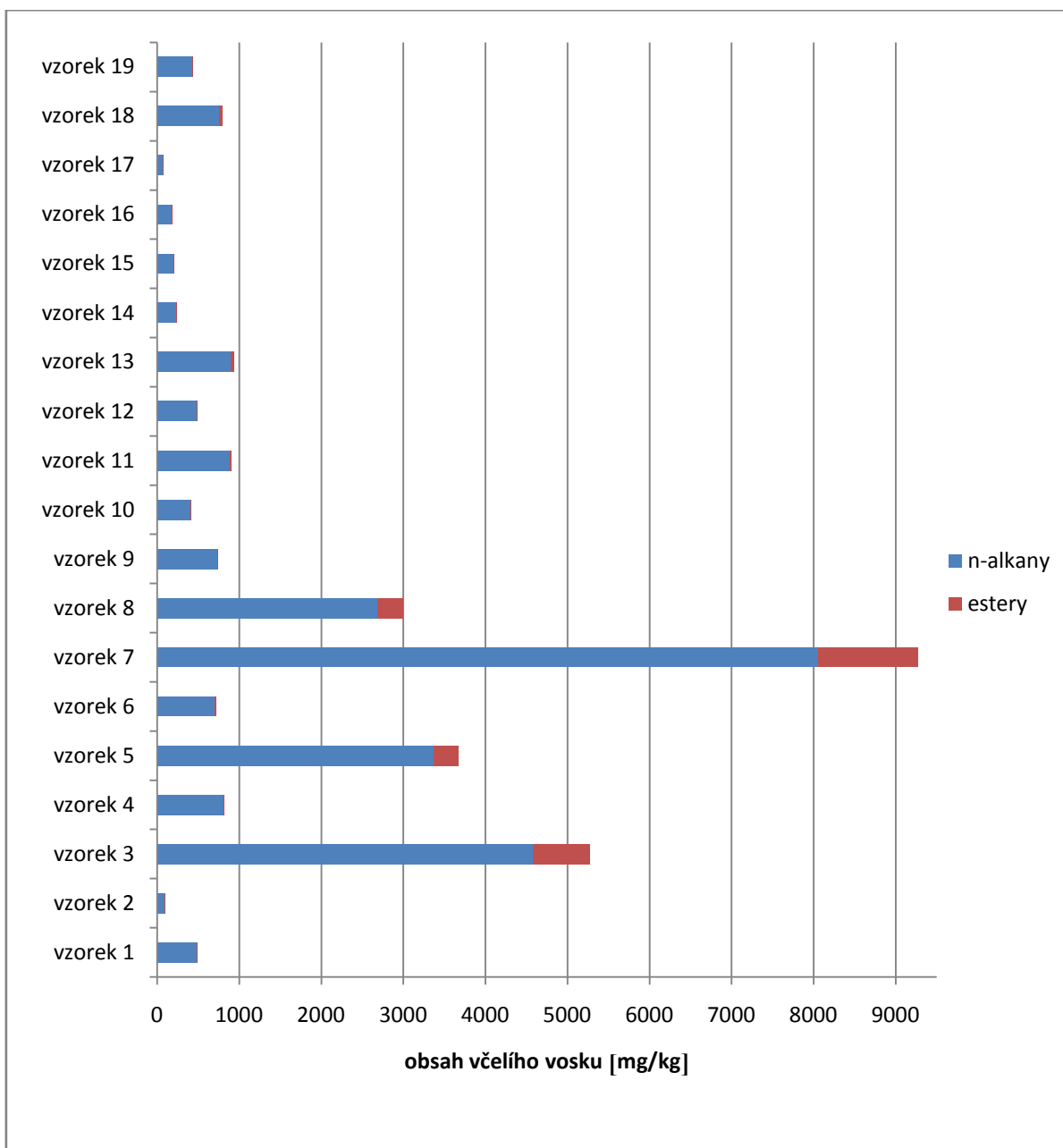
ester	C ₃₆ H ₇₃ O ₂	C ₃₈ H ₇₇ O ₂	C ₄₀ H ₈₁ O ₂	C ₄₂ H ₈₅ O ₂	C ₄₄ H ₈₉ O ₂	C ₄₆ H ₉₃ O ₂	C ₄₈ H ₉₇ O ₂	C ₅₀ H ₁₀₁ O ₂	C ₅₂ H ₁₀₅ O ₂
m/z	537	565	593	621	649	677	705	733	761
med	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
1.	0,25	0,22	1,68	0,68	0,68	0,86	0,48	0,10	0,04
2.	0,02	0,02	0,48	0,28	0,20	0,29	0,13	0,01	<0,01
3.	0,53	2,53	194,48	120,24	98,95	171,58	98,28	6,69	0,20
4.	0,16	0,19	3,94	2,17	1,36	1,89	0,79	0,05	<0,01
5.	0,46	1,37	98,84	55,29	40,25	66,34	37,16	2,17	0,13
6.	0,10	0,12	6,75	3,63	2,61	3,94	1,46	0,10	0,01
7.	1,26	6,56	411,38	246,93	177,85	244,78	117,25	9,12	0,32
8.	0,11	0,65	81,04	54,97	49,01	79,02	42,67	2,23	0,06
9.	0,04	0,05	2,90	1,63	1,47	2,36	1,12	0,06	<0,01
10.	0,01	0,01	0,15	0,08	0,06	0,09	0,04	<0,01	<0,01
11.	0,02	0,04	5,08	2,87	2,42	4,80	2,25	0,12	<0,01
12.	0,02	0,02	0,64	0,38	0,31	0,61	0,36	0,03	<0,01
13.	0,03	0,08	9,95	6,06	4,87	11,04	6,85	0,35	0,01
14.	0,01	0,01	0,10	0,07	0,05	0,09	0,05	<0,01	<0,01
15.	0,01	0,01	0,07	0,05	0,04	0,06	0,03	<0,01	<0,01
16.	0,01	0,01	0,07	0,04	0,03	0,05	0,02	<0,01	<0,01
17.	<0,01	<0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	<0,01	<0,01	<0,01
18.	0,02	0,05	9,19	0,55	5,23	11,94	6,93	0,34	0,01
19.	0,01	0,01	2,24	1,27	1,04	2,03	0,87	0,03	<0,01



Obrázek 14 Chromatogram separace esterů mastných kyselin

Metoda prokázala přítomnost včelího vosku ve vzorcích medu, přičemž u medu z komerčních zdrojů byl obsah nalezeného vosku menší (viz graf 10). Výsledné hodnoty byly vyhodnoceny metodou vnějšího standardu. Jako standardní látky byly použity dokosan pro uhlovodíky a stearylstearat pro estery mastných kyselin. Jakostní parametry, jako jsou meze detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ) poukazují na vhodnost GC-MS analýzy. Tyto hodnoty byly vyhodnoceny analýzou ředěného standardního roztoku o známé koncentraci.

Graf 10 Obsah složek včelího vosku ve vzorcích



Obsahy sledovaných složek, které jsou dominantní součástí včelího vosku, jednoznačně prokázaly větší obsah včelího vosku v medech z lokálních zdrojů než v medech zakoupených v obchodní síti. Různý obsah může být zapříčiněn jiným pečlivějším způsobem zpracování medu nebo pančováním medu invertním cukrem.

Obrázek 15 Vzorky medu rozpuštěné v methanolu pro analýzu včelího vosku (vpravo dole-vzorek č.1-řazeno doleva)



3.2.4 Celkové hodnocení vzorků

1. Medovicový med včelaře z Nové Vsi u Litovle stáčený 15. 6. 2014. Tento med je karamelově zbarvený, je hustý, s jemnou texturou. Netvoří však shluky krystalků, ale je ztuhlý rovnoměrně. Na povrchu je med lesklý, čirý. Aroma je silné a ostré po lesním medu. Hodnota HMF - 9,52 mg/kg, poukazuje na velmi dobrý způsob získání a uskladnění medu. Souhrnný obsah glukózy a fruktózy (64,16% (m/m)) je pro medovicový med více než postačující. Obsah sacharózy je nižší než nejvyšší povolené množství. Tento vzorek potvrzuje větší přítomnost vyšších sacharidů v medovicových medech. V kilogramu tohoto medu je obsaženo 487,8 mg *n*-alkanů a 5 mg esterů mastných kyselin (voskových esterů vyšších mastných kyselin s vyššími jednosytnými alkoholy). Můžeme tedy říct, že vzorek obsahuje téměř 0,5 g složek tvořících včelí vosk v 1 kg.
2. Květový med z Nové Vsi stáčený 4. 5. 2014. Jedná se o hustý rovnoměrně ztuhlý med s bíložlutým zbarvením (voskovým). Při práci se dobře roztíral a jeho povrch byl matný. Jeho vůně byla velmi jemná, květová. Obsah 8,12 mg HMF v 1 kg vzorku je zcela v souladu s předepsanou normou. Součet obsahu fruktózy a glukózy 81,46 % (m/m) je

typický pro květový med a i velmi nízkým obsahem sacharózy splňuje vzorek požadavek normy. Jeden kilogram tohoto medu obsahuje 97,8 mg *n*-alkanů a 1,43 mg esterů mastných kyselin. Obsah majoritních složek tvořících včelí vosk je téměř 0,1 g v 1 kg medu.

3. Květový med z Nové Vsi stáčený 25. 5. 2014. Med s bíložlutou barvou je rovnoměrně celý ztuhlý, na dně nádoby jsou viditelné drobné krystalky. Při práci se med hůře roztíral. Na matném povrchu vzorku jsou viditelné drobné kousky plástů, které se do vzorku dostaly po dekantaci při vytáčení. Vzorek tohoto medu má silně kořeněné aroma medu, připomínající „Vánoční cukrovinky“ (typické medové perníčky-kardamom, skořice, apod.). Vzorek s obsahem 11,34 mg HMF/kg vyhověl jakostnímu požadavku. Souhrnný obsah fruktózy a glukózy 81,67 % (m/m) a velmi nízký obsah sacharózy poukazují stejně jako u předchozího vzorku na kvalitní med vyhovující legislativním požadavkům. Oproti vzorku č.2 (po sobě následující vzorky jednoho včelstva) je obsah trisacharidů v tomto vzorku na nebo pod hranici detekce. V kilogramu tohoto medu je obsaženo 4579,1 mg *n*-alkanů a 693,5 mg esterů mastných kyselin. Můžeme tedy říct, že vzorek obsahuje asi 5,27 g složek tvořících včelí vosk v 1 kg.
4. Květový „jarní“ med včelaře v Pňovic vytáčený 10. 6. 2014. Med je žlutobílé barvy, rovnoměrně ztuhlý, bez krystalků, roztíratelný, na povrchu matný. Vůně je velmi jemná, po medu. Hodnotou HMF – 18,09 mg/kg, vzorek vyhověl jakostnímu parametru státní normy. Souhrnný obsah glukózy a fruktózy (80,06% (m/m)) je pro květový med přepokládaným výsledkem. Obsah sacharózy je nižší než nejvyšší povolené množství. V kilogramu tohoto medu je obsaženo 805,5 mg *n*-alkanů a 10,55 mg esterů mastných kyselin. Vzorek tedy obsahuje asi 0,82 g složek tvořících včelí vosk v 1 kg.
5. Květový „lipový“ med z Pňovic vytáčený 10. 7. 2014. Med má pískově žlutou barvu, na povrchu je lesklý. Jedná se o částečně tekutý med se shluky (hrudky). V medu jsou viditelné drobné kousky plástů. Tento vzorek nemá výrazné aroma, voní velice jemně po květech a medu. Obsah HMF je v tomto medu 12,88 mg/kg, čímž vzorek splnil požadavek. Součet obsahů fruktózy a glukózy 66,61% (m/m) je sice nižší než u medů podobného charakteru, ale vyhovující požadavku. I obsah sacharózy (1,27% (m/m)) je vyšší na rozdíl od ostatních vzorků, ale normě vyhovující. Obsah uhlovodíků 3369,2 mg/kg a esterů mastných kyselin 302 mg/kg, prokazuje minimální obsah 3,67 g složek včelího vosku v 1 kg medu.

6. Smíšený „pampeliškový“ med včelaře ze Střemenička stáčený 20. 6. 2014. Med má zlatavě hnědou barvu, je rovnoměrně hustý s jemnou pastovou strukturou s drobnými krystalky. Při zpracování je velmi dobře roztíratelný, velmi silně voní po medu.
I tento vzorek medu svým obsahem HFM - 11,16 mg/kg, vyhověl státní normě, když rozdíl mezi těmito stanoveními je veliký. Souhrnný obsah fruktózy a glukózy 68,94 % (m/m) je spíše typický pro medovicové medy, ale vyhověl i požadavku pro medy květové. Vyšší obsah sacharózy – 1,72% (m/m), může poukazovat na přidavek řepného cukru nebo příliš krátké zrání medu v plástu. Toto množství je ale zcela v souladu s legislativním požadavkem a běžným složením medu. Med obsahuje celkem asi 0,72 g/kg látek tvořících včelí vosk, z toho 704,8 mg *n*-alkanů a 18,7 mg esterů mastných kyselin.
7. Smíšený „jitrocelový“ med ze Střemenička vytáčený 20. 8. 2014. Med má hnědou barvu, je tuhý s jemnou pastovou strukturou bez krystalků. Při zpracování je velmi dobře roztíratelný. Na povrchu je lesklý s kousky plástů. Aroma je velmi jemné medově-bylinné. Obsah HMF - 8,24 mg/kg – vykazuje i v tomto vzorku velký rozdíl mezi stanoveními, ale splňuje jakostní normu. Med obsahuje množství fruktózy a glukózy typické pro smíšené medy – 70,41 % (m/m) a malé množství sacharózy – 0,2 % (m/m), čímž vyhověl požadavkům. Vysokým obsahem *n*-alkanů 8057,9 mg/kg a esterů kyselin 1215,4 mg/kg, které tvoří asi 9,27 g majoritních složek včelího vosku v 1 kg vzorku, byla potvrzena jeho přítomnost předpokládaná vizuálním hodnocením.
8. Smíšený med od včelaře z Karlova vytáčený 22. 7. 2014. Med má karamelově hnědou barvu, je tekutý se shluky. Na povrchu je lesklý s kousky plástů. Aroma medu je velmi silné. Podle informací včelaře je vůně charakteristická po malinách, ostružinách a javoru, které právě v období před vytáčením kvetly. Tento vzorek medu se prokázal velmi malým množstvím HMF – 9,25 mg/kg, a vyhověl jakostnímu požadavku. Vzorek vyhověl i požadavku na minimální sumární množství fruktózy a glukózy – 74,72 % (m/m) - a požadavku na maximální povolené množství sacharózy – 0,17 % (m/m). Obsah *n*-alkanů – 2681,8 mg/kg a esterů – 309,76 mg/kg je i v tomto vzorku velký. Celkový obsah látek tvořících včelí vosk je pak téměř 3 g/kg.
9. Medovicový lesní med z Karlova stáčený 30. 8. 2014 Vzorek má tmavě hnědou barvu. Jemná textura je rovnoměrně stejná, pastová. Med má velmi silnou ostrou vůni, která z části připomíná zemědělský velkochov. Tento vzorek medu vyhověl v požadavku na

maximální obsah HMF – 10,89 mg/kg. Souhrnný obsah fruktózy a glukózy 74,48 % (m/m) je pro medovicové medy zcela vyhovující. Obsah sacharózy – 0,11% (m/m) poukazuje na velmi kvalitní a vyzrálý med, splňující požadavek na maximální povolené množství sacharózy. U tohoto lesního medu je stanoveno vyšší množství trisacharidů. Med obsahuje celkem asi 0,74 g/kg látek tvořících včelí vosk, z toho 727,76 mg *n*-alkanů a 9,63 mg esterů mastných kyselin.

10. Květový med včelaře z Řimic vytáčený 9. 5. 2014 Med má bíložlutou (voskovou) barvu a je ztuhlý. Na povrchu má tenkou vrstvu velmi tekutého pískově žlutého medu. Vůně vzorku je velmi silná medová, mírně alkoholová (připomíná vůni medoviny). V analytickém požadavku na obsah HMF med zcela vyhověl – 7,75 mg/kg. Tento med se vyznačuje velmi vysokým obsahem monosacharidů – 90,40 % (m/m), čímž se vysvětluje jeho ztuhlost. Konzistence medu je ovlivněna převážně obsahem vody (běžně 20 %), která v tomto medu tvoří maximálně 9,6 % (m/m). Obsah *n*-alkanů – 407,4 mg/kg a esterů – 0,44 mg/kg je i v tomto vzorku mnohem menší než ostatních medech. Celkový obsah látek tvořících včelí vosk je pak cca 0,41 g/kg.
11. Květový med od včelaře z Mohelnice stáčený 25. 7. 2014. Med je zbarven bíložlutě (voskově), je rovnoměrně ztuhlý, ale roztíratelný. Jemná textura je rovnoměrně stejná napěněná s bublinkami, na povrchu matná. Aroma vzorku je silné, po fermentovaných potravinách až jogurtové. Tento vzorek se vykazuje nejmenším obsahem HMF – 5,11 mg/kg. Obsah fruktózy je ve vzorku vyšší, stejně jako v ostatních květových medech. Celkové množství monosacharidů je pak 83,64 % (m/m). Množství sacharózy je rovno limitu stanovení. Med ve všech kontrolovaných parametrech vyhověl. Vzorek obsahuje 881,4 mg/kg *n*-alkanů a 17,6 mg/kg esterů kyselin. Celkem med obsahuje 0,9 g včelího vosku v 1kg.
12. Smíšený med z Mohelnice vytáčený 20. 7. 2014 má zlatohnědou barvu. Vzorek je tekutý s drobnými krystalky. Na povrchu je med lesklý. Aroma medu je silné, výrazné po včelím vosku. Obsaženým HMF – 8,94 mg/kg, vzorek medu splnil jakostní požadavek. Med obsahuje i dostatečné souhrnné množství fruktózy a glukózy – 80,92% (m/m). Množství sacharózy ve vzorku – 0,03% (m/m), je tak pod maximálním povoleným limitem. Obsah uhlovodíků 488,7 mg/kg a esterů mastných kyselin 2,4 mg/kg, prokazuje minimální obsah 0,49 g složek včelího vosku v 1 kg medu.

13. Strdí od včelaře z Mohelnice odebrané 9. 8. 2014. Med v buňkách plástu je smíšený a má pískově žlutou barvu. V plástech je zatuhlý a v jeho textuře jsou viditelné drobné krystalky. Vůně medu v plástech je silná. Velmi výrazná je přítomnost vosku a mateří kašičky. Celé strdí má „v pozadí“ jemnou vůni jarních bylin (prvosenska jarní). I tento vzorek medu svým obsahem HMF – 15,76 mg/kg, vyhověl státní normě. Souhrnný obsah fruktózy a glukózy 80,69 % (m/m) vyhověl požadavku pro medy. Obsah sacharózy – 0,05% (m/m) je zcela v souladu s legislativním požadavkem. Med obsahuje celkem asi 0,93 g/kg látek tvořících včelí vosk, z toho 890,3 mg *n*-alkanů a 39,2 mg esterů mastných kyselin.
14. Květový med včelaře z Dětrichova vytáčený 22. 7. 2014. Med má bíložlutou barvu, je rovnoměrně ztuhlý, pastový, dobře roztíratelný. Na povrchu je med lesklý, ale přesto nečirý. Aroma medu je jemné, květové. Vzorek s obsahem 11,35 mg HMF/kg vyhověl jakostnímu požadavku. Souhrnný obsah fruktózy a glukózy 87,69 % (m/m) a velmi nízký obsah sacharózy (0,02% (m/m)) poukazují stejně jako u předchozího vzorku na kvalitní med vyhovující legislativním požadavkům. V kilogramu tohoto medu je obsaženo 236 mg *n*-alkanů a 0,38 mg esterů mastných kyselin. Můžeme tedy říct, že vzorek obsahuje asi 0,24 g složek tvořících včelí vosk v 1 kg.
15. Směs medů zemí ES a medů zemí mimo ES od výrobce Medokorec s.r.o. (Čestín 20, 285 10), zakoupený v obchodní síti Albert. Med má zlatavě hnědou barvu a je lesklý. Vzorek je velmi tekutý bez krystalků. Vůně medu není výrazná, spíše je cítit plastový obal. Tento komerčně dostupný obsahuje 21,97 mg/kg HMF. Podle metody bez derivatizace by med požadavku vyhověl, ale podle stanovení s derivatizací je nedostačující (viz tab. 6). Souhrnným obsahem fruktózy a glukózy – 83,28 % (m/m) a nízkým obsahem sacharózy – 0,12 % (m/m) vzorek jakostnímu požadavku vyhověl. Obsah *n*-alkanů – 202,9 mg/kg a esterů – 0,27 mg/kg je i v tomto vzorku mnohem menší než v ostatních medech. Celkový obsah látek tvořících včelí vosk je pak cca 0,2 g/kg.
16. Směs českého květového a medovicového medu – Český 100% med od výrobce JANKAR PROFI, s.r.o. (Čeladná 262, 739 12), zakoupený v obchodní síti Tesco. Med je karamelově hnědý, pastový s jemnou strukturou, na povrchu lesklý. Vůně vzorku je silná po medu a včelím vosku. Tento vzorek obsahuje 10,11 mg/kg HMF. Obsah fruktózy je ve vzorku vyšší, jako v ostatních květových medech. Celkové množství monosacharidů je 74,28 % (m/m). Obsah sacharózy je 0,03% (m/m). Med ve všech kontrolovaných

parametrech vyhověl. Vzorek obsahuje 178,4 mg/kg *n*-alkanů a 0,23 mg/kg esterů kyselin. Celkem med obsahuje 0,18 g včelího vosku v 1kg.

17. Směs květových medů mimo zemí ES od výrobce JSG med, a.s. (Na Roudné 443/18, Plzeň, 323 00), zakoupený v Penny. Med má zlatavě žlutou barvu, je velmi tekutý, lesklý. Na dně vzorku jsou velké bílé krystalky cukru. Aroma medu je silné, cukerné. Tento vzorek se vykazuje nejvyšším obsahem HMF – 30,89 mg/kg. Příliš vysoká nevyhovující hodnota HMF, stanoveného jako silyl-derivátu, může být způsobena špatným zacházením při přípravě vzorku. Obsah fruktózy je ve vzorku vyšší, jako v ostatních květových medech. Celkové množství monosacharidů je pak 89,86 % (m/m). Množství sacharózy je 1,77% (m/m), může poukazovat na přídavek řepného cukru nebo příliš krátké zrání medu v plástu. Vzorek obsahuje 63,9 mg/kg *n*-alkanů a 0,04 mg/kg esterů kyselin. Celkem med obsahuje 0,06 g vosku v 1kg.
18. Med MANUKA Active 5 + je tmavě hnědý, lesklý, pastový, bez krystalků. Med je získaný od včelstva snášejícího nektar ze stromu Balmínu metlatého (*Leptospermum scoparium*, J.R.Forst & G.Forst). Aroma medu je těžké, podobné vůni datlí. Ačkoli je med tropického původu (pro tyto medy je povolen vyšší limit HMF), obsahuje vzorek 21,48 mg/kg HMF. V tomto parametru zcela splnil vzorek normu. Součet obsahu fruktózy a glukózy – 83,21 % (m/m), a obsah sacharózy – 0,23 % (m/m) prokazují kvalitu požadovanou vyhláškou. Med obsahuje celkem asi 0,79 g/kg látek tvořících včelí vosk, z toho 753,9 mg *n*-alkanů a 34,3 mg esterů mastných kyselin.
19. Tasmánský med získaný z včelstva snášejícího nektar ze stromu židelníku (*Eucryphia lucida*, L.). Vzorek má jasně žlutou barvu a je lesklý. Med je pastovitý bez krystalků. Aroma medu je štiplavé, po jehličnanech (připomíná tis). I tento med „neevropského“ původu obsahuje množství HMF – 9,99 mg/kg, které je velmi malé a vyhovující jakostnímu požadavku. Tento med obsahuje 77,08 % (m/m) monosacharidů a 0,1 % (m/m) sacharózy, čímž vyhověl požadavku. Tyto obsahy jsou typické spíše pro med medovicového původu (v rámci provedeného měření). V kilogramu tohoto medu je obsaženo 433,3 mg *n*-alkanů a 7,5 mg esterů mastných kyselin. Můžeme tedy říct, že vzorek obsahuje asi 0,44 g složek tvořících včelí vosk v 1 kg.

4 ZÁVĚR

V diplomové práci, která je zaměřena na analýzu složek medu pomocí plynové chromatografie, bylo analyzováno 19 vzorků medu. Tři vzorky medu byly zakoupeny v září 2014 v maloobchodních sítích a 16 vzorků medu, stáčených v měsících květnu až srpnu 2014, pochází od třech lokálních včelařů z oblasti Litovelska. Získané výsledky pro všechny tři analýzy složek včelího medu (furfuraly, sacharidy, uhlovodíky a estery mastných kyselin) prokázaly nejen vhodnost použití plynové chromatografie, ale i její univerzálnost pro analýzu zcela rozdílných látek ve stejné matrici. Všechny analyzované vzorky vyhověly svou kvalitou v jakostních parametrech, které jsou zahrnuty v legislativě.

Analýza furfuralů vyčíslila rovnovážný obsah všech sledovaných degradačních produktů v řadě. Zatímco HMF je v medu obsažen v desítkách mg/kg, MF v desetínách mg/kg. Oproti tomu FF obsahují vzorky asi dva mg/kg. Můžeme proto uvažovat, že s rostoucím stářím medu přibývá HMF a nějaká část dále degraduje. Rychlost vzniku FF z MF je ale větší než rychlost vzniku MF z HMF.

Z analýzy monosacharidů je patrný rozdíl mezi květovým a medovicovým medem. V analyzovaných květových medech se prokázal vyšší obsah glukózy. Oproti tomu v medech smíšených a lesních se projevuje trend zvyšujícího se množství disacharidů a trisacharidů.

Stanovení složek včelího vosku prokázalo větší množství *n*-alkanů než esterů mastných kyselin, ačkoli informace z literární rešerše uváděla obsah složek včelího vosku přesně naopak. Zjištěné zastoupení esterů potvrdilo předpokládané dominantní zastoupení esterů velikostí C₄₀ – C₄₈, tedy esterů kyseliny palmitové. Přírozeným rozpadem těchto esterů pak vznikají zastoupené uhlovodíky.

Větší množství včelího vosku bylo stanoveno ve vzorcích, ve kterých byly kousky voskových plástečků patrné pohledem. Obsah včelího vosku v medech neprokázal rozdíl mezi jednotlivými druhy (květový, smíšený, lesní med). Patrný rozdíl v obsahu včelího vosku je ale mezi medem komerčně dostupným a medem od soukromého včelaře.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HMF	hydroxymethylfurfural
MF	methylfurfural
FF	furfural
NIR	spektrometrie v blízké infračervené oblasti
NMR	nukleární magnetická rezonance
GC/MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním detektorem
SPME	mikroextrakce tuhou fází
TIC	celkový iontový proud
SIM	monitorování vybraného iontu
SRM	monitorování vybrané reakce
MS/MS	tandemové zapojení hmotnostních spektrometrů
RP – HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní stacionární fází
UV detekce	detekce záření v ultrafialové oblasti
DVB/CAR/PDMS	divinylbenzen/karboxen/polydimethylsiloxan
DB – WAX	kapilární kolona se stacionární fází z polyethylenglykolu
DB – 5	kapilární kolona se stacionární fází z polydimethylsiloxanu s 5% fenylu
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
PFBHA	<i>O</i> -(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) hydroxylamin hydrochlorid
MSTFA	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl) trifluoroacetamid
TMCS	trimethylchlorsilan
TMS-oximy	trimethylsilylované oximy
HMDS	hexamethyldisilazan
TFA	kyselina trifluoroctová
BPX5	kapilární kolona se stacionární fází z polydimethylsiloxanu s 5% fenylenu

Rtx-65 TG	kapilární kolona se stacionární fází z polydimethylsiloxanu s 35% fenylu
HT5	kapilární kolona se stacionární fází z polycarboran-siloxanu
HP5-MS	kapilární kolona se stacionární fází z polydimethylsiloxanu s 5% fenylu
CP-Sil 5 CB	kapilární kolona se stacionární fází z polydimethylsiloxanu
DB - 1	kapilární kolona se stacionární fází z polydimethylsiloxanu
SIM DIST-CB	kapilární kolona stacionární fází z dimethylpolysiloxanu
ES	Evropské státy/společenství
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace

5 POUŽITÁ LITERATURA

1. **Ing. Antonín Přidal, PhD., Ing. Květoslav Čermák, CSc.** *Včelařství*. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2005. 80-7157-850-9.
2. **Ing. Antonín Přidal, Ph.D.** *Včelí produkty*. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003. stránky 13-20. 80-7157-717-0.
3. **Ing. Vladimír Veselý, CSc. a kolektiv.** *Včelařství*. Praha : Nakladatelství Brázda, s.r.o., 2003. 80-209-0320-8.
4. Vyhláška 76/2003 Sb. *Vyhláška, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony*. místo neznámé : Ministerstvo zemědělství, 2003.
5. **J. Velíšek, J. Hajšlová.** *Chemie potravin*. Tábor : Ossis, 2009. 978-80-86659-15-2.
6. **H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle.** *Food Chemistry*. Berlin : Springer, 2009. 978-3-540-69934-7.
7. Směrnice 2001/110 ES. *J. Eur. Commun.* 2001.
8. **V. Kubáň, P.Kubáň.** *Analýza potravin*. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2007. 978-80-7375-036-7.
9. **Davídek, J.** *Laboratorní příručka analýzy potravin*. Praha : STNL, 1977.
10. **M.L.Nollet, Leo.** *Handbook of Food analysis*. New York : CRC Press, 2004. Sv. 1. 978-0-8247-5038-1.
11. Vyhláška 211/2004 Sb. o metodách zkoušení a způsobu odběru a přípravy kontrolních vzorků Příl.19. Praha : autor neznámý, 2004.
12. **Musa Ozcan, Derya Arslan, Durmus Ali Ceylan.** Effect of inverted saccharose on some properties of honey. *Food chemistry*. 2006, Sv. 99, stránky 24-29.
13. **Ahmet Guler, Ayse Bakan, Cevat Nisbet, Oguzhan Yavuz.** Determination of important biochemical properties of honey to discriminate pure and adulterated honey with sucrose (Saccharum officinarum L.) syrup. *Food chemistry*. 2007, Sv. 105, stránky 1119-1125.
14. **O. David Sparkman, Zelda E. Penton, Fulton G. Kitson.** *Gas Chromatography and Mass Spectrometry*. Oxford : Academic Press - Elsevier, 2011. 978-0-12-373628-4.
15. **H. M. McNair, J.M. Miller.** *Basic gas chromatography*. New Jersey : Wiley&sons, 2009. 978-0-470-43954-8.
16. **Poole, Colin F.** *Gas Chromatography*. Detroit : Elsevier, 2012. 978-0-12-385540-4.

17. **Snow, N.H.** *Modern Practice of Gas Chromatography*. Hoboken : Wiley& sons, 2004. 04712298830: 461-90.
18. **M.L.Nolet, Leo.** *Handbook of food analysis*. New York : Marcel Dekker, Inc., 2004. Sv. 3. 978-0-8247-5038-1.
19. **Edmond de Hoffmann, Vincent Stroobant.** *Mass Spectrometry - Principles and Applications*. Chichester : Wiley&sons, 2012. 978-0-470-03310-4.
20. **Elvira M.S.M. Gaspar*, João F. Lopes.** Simple gas chromatographic method for furfural analysis. 2009, Sv. 1216, stránky 2762-2767.
21. **Giordano, L., Calabrese, R., Davoli, E., & Rotilio, D.** Quantitative analysis of 2-furfural and 5-methylfurfural in different Italian vinegars by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography mass spectrometry using isotope dilution. *Journal of Chromatography A*,. 2003, Sv. 1017, stránky 141–149.
22. **Teixido, E., Santos, F. J., Puignou, L., & Galceran, M. T.** Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2006, Sv. 1135, stránky 85-90.
23. **Michael Jerry Antal Jr.1, William S.L. Mok, Geoffrey N. Richards,.** Mechanism of formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde from d-fructose and sucrose. *Carbohydrate Research*. 1990, Sv. 119, stránky 91-109.
24. **J. Velíšek, J. Hajšlová.** *Chemie potravin II*. Tábor : Osis, 2009. 978-80-86659-16-9.
25. **Chih-Yu Lo, Shiming Li, Yu Wang, Di Tan, Min-Hsiung Pan, Shengmin Sang, Chi-Tang Ho.** Reactive dicarbonyl compounds and 5-(hydroxymethyl)-2-furfural. *Food Chemistry*. 2008, Sv. 107, stránky 1099-1105.
26. **B. FALLICO, E. ARENA, AND M. ZAPPALA.** Degradation of 5-Hydroxymethylfurfural. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*. 2008, Sv. 73.
27. **Julia Degen, Michael Hellwig, and Thomas Henle.** 1,2-Dicarbonyl Compounds in Commonly Consumed Foods. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2012, Sv. 60, stránky 7071-7079.
28. **Elvira M.S.M. Gaspar *, Ana F.F. Lucena.** Improved HPLC methodology for food control – furfurals. *Food chemistry*. 2009, Sv. 114, stránky 1576-1582.
29. **Lee, H. S., Rouseff, R. L., & Nagy, S.** HPLC determination of furfural and 5-hydroxymethylfurfural in citrus juices. *Journal of Food Science*. 1986, Sv. 51, stránky 1075-1076.
30. **K. Gras, J. Luon, R. Gras, H.J. Cortes, R.A. Shellie.** Determination of furfurals in Manuka honey using piston-cylinderliquid–liquid extraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2014, Sv. 1362, stránky 43–48.

31. **JOSEÄ SOUSA CA^ MARA, JOSEÄ C. MARQUES, MARIÄA A. ALVES, ANTONIO C. SILVA FERREIR.** 3-Hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone Levels in Fortified Madeira Wines: Relationship to Sugar Content. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004, Sv. 52, stránky 6765-6769.
32. **Hailong Li, Xin-Sheng Chai, Huaiyu Zhan, Shiyu Fu.** Rapid determination of furfural in biomass hydrolysate by full evaporation headspace gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2010, Sv. 1217, stránky 7616–7619.
33. **Rupp, HS a Turnipseed, SB.** Confirmation of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in apple juice by gas chromatography/mass spectrometry. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*. 2000, Sv. 83, stránky 612-620.
34. **Bernhard M. Wagner, Fabrizio Donnarumma, Reinhold Wintersteiger, Werner Windischhofer and Hans J. Leis.** Simultaneous quantitative determination of α -ketoglutaric acid and 5-hydroxymethylfurfural in human plasma by gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, Sv. 396.
35. **Cifuentes, Alejandro.** *Foodomics - advanced Mass Spectrometry in Modern Food Science and Nutrition*. Madrid : Wiley& sons. 978-1-118-16945-2.
36. **Anastassiades M., Lehotay S.J., Štajnbaher D., Schenck F.J.** Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international*. 2003, Sv. 86, stránky 412-431.
37. **Déborá Tomasini, Maicon R.F. Sampaio, Sergiane S. Caldas, Jaqueline G. Buffon, Fábio A. Duarte, Ednei G. Primel.** Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2012, Sv. 99, stránky 380-386.
38. **A.I. Ruiz-Matute, M.L. Sanz, I. Martínez-Castro.** Use of gas chromatography–mass spectrometry for identification of a new disaccharide in honey. *Journal of Chromatography A*,. 2007, Sv. 1157, stránky 480–483.
39. **A.I. Ruiz-Matute, M. Brokl, A.C. Soria, M.L. Sanz, I. Martínez-Castro.** Gas chromatographic–mass spectrometric characterisation of tri- and tetrasaccharides in honey. *Food Chemistry*. 2010, Sv. 120, stránky 637–642.
40. **M.L. Sanz, J. Sanz, I. Martínez-Castro.** Gas chromatographic–mass spectrometric method for the qualitative and quantitative determination of disaccharides and trisaccharides in honey. *Journal of Chromatography A*. 2004, Sv. 1059, stránky 143–148.
41. **A. I. RUIZ-MATUTE, A. C. SORIA, I. MARTÍNEZ-CASTRO, AND M. L. SANZ.** A New Methodology Based on GC-MS To Detect Honey Adulteration with Commercial Syrups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, Sv. 55, stránky 7264-7269.

42. **E. de la Fuente, M.L. Sanz, I. Martínez-Castro, J. Sanz.** Development of a robust method for the quantitative determination of disaccharides in honey by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2006, Sv. 1135, stránky 212-218.
43. **Anass Terrab, José M. Vega-Pérez, María J. Díez and Francisco J. Heredia.** Characterisation of northwest Moroccan honeys by gas chromatographic–mass spectrometric analysis of their sugar components. *Journal of the science of food and agriculture*. 2001, Sv. 82, stránky 179-185.
44. **MICHAL BROKL, ANA C. SORIA, ANA I. RUIZ-MATUTE, MARIÁ LUZ SANZ AND LOURDES RAMOS.** Separation of Disaccharides by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry. Application to Honey Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, Sv. 58, stránky 11561–11567.
45. **Zs. Füzfai, I. Boldizsár, I. Molnár-Perl.** Characteristic fragmentation patterns of the trimethylsilyl and trimethylsilyl–oxime derivatives of various saccharides as obtained by gas chromatography coupled to ion-trap mass spectrometry. *Journal of chromatography A*. 2008, Sv. 1177, stránky 183–189.
46. **Brad Bendiak, Tammy T. Fang.** End-group determination of oligosaccharides: a gas chromatography–mass spectrometry:mass spectrometry method for distinguishing between all D-aldohexoses and D-ketohexoses. *Carbohydrate Research*. 2000, Sv. 327, stránky 463–481.
47. **Ilaria Bonaduce, Maria Perla Colombini.** Characterisation of beeswax in works of art by gas chromatography–mass spectrometry and pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry procedures. *Journal of Chromatography A*. 2004, Sv. 1028, stránky 297–306.
48. **Ramón Aparicioa, Ramón Aparicio-Ruíz.** Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*. 2000, Sv. 881, stránky 93-104.
49. **M. Regert, J. Langlois, S. Colinart.** Characterisation of wax works of art by gas chromatographic procedures. *Journal of Chromatography A*. 2005, Sv. 1091, stránky 124–136.
50. **Lorbeer, Birgit Reiter and Eberhard.** Analysis of the Wax Ester Fraction of Olive Oil and Sunflower Oil by Gas Chromatography and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Institute of Organic Chemistry*. 2001, Sv. 78, stránky 881-888.
51. **Eric Jover, Mohamed Adahchour, Josep M. Bayona, René J.J. Vreuls, Udo A.Th. Brinkman.** Characterization of lipids in complex samples using comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2005, Sv. 1086, stránky 2-11.
52. **Nicolas Garnier, Cé cile Cren-Olive, Christian Rolando, Martine Regert.** Characterization of Archaeological Beeswax by Electron Ionization and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2002, Sv. 74, stránky 4868-4877.

53. **Arndt Asperger, Werner Engewald, Gerd Fabian.** Advances in the analysis of natural waxes provided by thermally assisted hydrolysis and methylation (THM) in combination with GC/MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 1999, Sv. 52, stránky 51-63.
54. **T.C. Sindhu Kanya, L. Jaganmohan Rao, M.C. Shamanthaka Sastry.** Characterization of wax esters, free fatty alcohols and free fatty acids of crude wax from sunflower seed oil refineries. *Food Chemistry*. 2007, Sv. 101, stránky 1552–1557.
55. **Klára Urbanová, Vladimír Vrkoslav, Irena Valterová, Martina Háková, Josef Cvačka.** Structural characterization of wax esters by electron ionization mass spectrometry. *Journal of lipid research*. 2012, Sv. 53, stránky 202-212.
56. **Álvaro Aragóna, José M. Cortésb, Rosa M. Toledanoa, Jesús Villénb, Ana Vázquez.** Analysis of wax esters in edible oils by automated on-line coupling liquid chromatography–gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption (TOTAD) interface. *Journal of Chromatography A*. 2010, Sv. 1218, stránky 4960– 4965.