

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Využití nukleární magnetické rezonance k detekci
falšování medu**

Bakalářská práce

Autor práce: Andrea Nosková

Obor studia: Výživa a potraviny

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

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Využití nukleární magnetické rezonance k detekci falšování medu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15. 7. 2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za věnovaný čas, cenné rady a odborné vedení při zpracování této bakalářské práce.

Využití nukleární magnetické rezonance k detekci falšování medu

Souhrn

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je fyzikálně chemickou metodou zaměřující se na identifikaci a kvantifikaci chemických sloučenin a stanovení jejich struktur.

S neustále zvyšujícími se požadavky na kvalitu a bezpečnost potravin se metody detekce výrazně vyvíjejí, a právě analýza NMR se díky svému širokému využití jeví jako vhodná metoda při odhalování podvodů a falšování potravin.

V rámci bakalářské práce byla řešena problematika falšování a ověřování autenticity potravin. Hlavním cílem byl popis metody NMR a její porovnání s hmotnostní spektrometrií, tedy další nejvyužívanější metodou při detekci potravin. Nejobsáhlejší část práce tvoří využití NMR analýzy v rámci detekce falšování medu, popis chemického složení medu a parametry pro hodnocení kvality, způsoby falšování a podrobně popsání studie vysvětlující problematiku falšování medu.

Na základě vědeckých studií byl vypracován podrobný přehled zaměřující se na identifikaci sloučenin medu i nových biomarkerů, které jsou klíčem pro snazší rozlišitelnost botanických druhů a geografického původu medu.

Klíčová slova: Med, květový med, akátový med, řepkový med, ^1H NMR, falšování, metabolomika

Application of nuclear magnetic resonance in detection of honey adulteration

Summary

Nuclear magnetic resonance (NMR) is a method used for quantification of chemical compounds and its structure determination. High requirements on food safety and food quality have a huge impact on the development of modern analytical methods. Thanks to widespread use of NMR spectroscopy it appears to be a very suitable method for the detection of food adulteration and contamination.

The main purpose of this Bachelor's thesis is the application of NMR in detection of honey adulteration compared to other analytical methods for example mass spectroscopy (MS) which is also widely used method for detection of food fraud.

An important part of this thesis work is a summary of professional studies dealing with honey adulteration, identification and quantification of its chemical compounds and discovering new biomarkers which are the main key for easier differentiation of botanical and geographical origin of honey.

Keywords: Honey, flower honey, acacia honey, canola honey, ^1H NMR, adulteration, metabolomics

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Autenticita a falšování potravin	3
3.1.1	EMA incidenty	3
3.1.2	Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF)	4
3.2	Med	6
3.2.1	Složení medu	6
3.2.2	Druhy medu	7
3.2.3	Využití medu	8
3.2.4	Parametry určující kvalitu medu	9
3.2.5	Způsoby falšování	11
3.2.5.1	Přídavek cukrů, sladidel, enzymů, léčiv	11
3.2.5.2	Tuzemský med a jeho náhrada za zahraniční	12
3.2.6	České značky kvality	12
3.3	Metody detekce	12
3.3.1	Rozdělení metod	12
3.4	Nukleární magnetická rezonance (NMR)	14
3.5	Princip NMR	15
3.5.1	Chemický posun	16
3.5.2	Interakce a štěpení signálu ve spektru	17
3.5.3	Pulzní NMR	18
3.5.4	^1H NMR	18
3.6	Odběry a příprava vzorků NMR	18
3.7	Využití NMR	19
3.7.1	Porovnání analytických metod (NMR/MS)	19
3.8	Využití NMR k detekci falšování medu	21
3.8.1	Přehledová tabulka odborných studií	24
4	Metodika	35
5	Závěr	36
6	Literatura	37

1 Úvod

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je jednou z vysoce perspektivních analytických metod, které jsou využívány v mnoha vědních oborech mezi něž patří medicína, farmacie, potravinářství a další. V oblasti potravinářství má široké uplatnění především díky své komplexnosti, robustnosti a přesnosti. V rámci velkého zástupu jiných druhů metod, které se v potravinářství využívají, se NMR postupně řadí do popředí díky své účinnosti a výhodám, které ovlivňují průběh, rychlost a přesnost výsledků studií potravin.

Princip metody spočívá ve schopnosti určit chemické struktury sloučenin, díky čemuž je tato analýza čím dál více využívána při autentizaci a detekci falšování potravin. Velikou výhodou je nejen relativně jednoduchá a rychlá příprava vzorků, ale především přesnost a vysoká reprodukovatelnost. Nukleární magnetická rezonance je analýzou nedestruktivní, čímž se výrazně odlišuje od ostatních metod.

Falšování potravin a pančování nápojů je celosvětovým problémem a potýkáme se s ním téměř u všech potravinových druhů jako například maso a masné výrobky, mléko a mléčné výrobky, med, olej, víno, pivo, koření, a mnoho dalších.

Nejčastěji falšovanou potravinou je med. Kontrola kvality a botanického a geografického původu je u medu velice důležitá. Z důvodu různorodosti chemického složení a odlišných organoleptických vlastností se dají medy relativně dobře rozlišovat, avšak čím dál více se na trhu objevují medy smíšených botanických druhů, ale i směsi květových a medovicových druhů, které možnost rozlišení výrazně ztěžují.

Využití NMR k detekci falšování medu se jeví jako vhodná metoda pro stanovení metabolického profilu, určení lokality a botanického původu na základě poměru a zastoupení chemických sloučenin a v neposlední řadě jejich správnou identifikaci a kvantifikaci.

2 Cíl práce

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je rozvíjející se perspektivní metodou k detekci falšování potravin, geografického nebo botanického původu. Jednou z nejčastěji falšovaných potravin je med. NMR spektra jsou výsledkem odezvy 50-100 látek, mají vysokou reprodukovatelnost a přesnost a v rámci poměrů a zastoupení sloučenin jsme schopni rozlišit druhy medů a jejich geografický původ.

Cílem práce je zpracování obsáhlé literární rešerše na téma falšování medu a zhodnocení potenciálu NMR k odhalení těchto praktik. Bude sestaven přehled hlavních vědeckých postupů, parametrů a možností metody.

3 Literární rešerše

3.1 Autenticita a falšování potravin

Falšování potravin je problémem již od počátku civilizace. Testy autenticity potravin a detekce potravinářských výrobků jsou nezbytné pro posouzení hodnoty, kvality a zajištění ochrany spotřebitele před podvodnými činnostmi. Kvůli obavám o bezpečnost potravin došlo v posledních letech k rozvoji fyzikálních, biochemických, imunologických a molekulárních metod. (Bansal et al. 2017)

Obecně může být falšování potravin definováno jako snižování kvality úmyslným nebo neúmyslným nahrazováním složek. Nebezpečí padělání a falšování tkví v možné toxicitě a negativním vlivu na zdraví člověka. Nemusí se však jednat pouze o zdravotní nebezpečí ve formě otrav, ale i o ochuzení potravin nebo výrobku o potřebné živiny, které byly kvůli padělání nahrazeny. (Mishra 2019) Při záměrném falšování se využívají látky, které mají podobné vlastnosti jako daná potravina, proto je mnohdy těžké padělání analyzovat a rozpoznat. K neúmyslnému falšování dochází na základě nedbalosti a nevědomosti člověka při výrobě a zpracování potravin. Jedná se například o kontaminaci bakteriemi a plísněmi, kažení potravin, přítomnost hlodavců a další. (Bansal et al. 2017)

Organizace pro výživu a zemědělství (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations) se společně se Světovou zdravotnickou organizací podílely na založení potravinářského zákoníku, Codex Alimentarius (CA), jenž se zabývá podporou správných postupů při celosvětovém obchodu s potravinami a zajišťuje koncovým spotřebitelům požadovanou bezpečnost výrobků vytvářením potravinových norem, pokynů a kodexů. (Mishra 2019; FAO & WHO 2020)

Podle studií Kubally 2018 se díky společné kooperaci Europolu a Interpolu vytvořila tzv. Operace OPSON VI, zaměřující se na falšování potravin, v průběhu které bylo zjištěno 9800 tun, více než 26,4 milionů litrů a 13 milionů kusů padělaných potravin a nápojů v hodnotě přibližně 230 milionů eur. (Kuballa et al. 2018)

Průkopníkem analytických metod využívajících se při falšování potravin se stal německý chemik Friedrich Christian Accum, který ve svém díle z roku 1820 poprvé pojednává o detekci falšování vína, při kterém byly použity jedovaté látky (olovo), došlo ke změně chemického složení, záměny odrůd vín či procentuálního podílu obsaženého alkoholu. (Ellis et al. 2012)

Ač se v posledních desetiletích povedlo výrazně eliminovat výskyt nebezpečných potravin, jsou z historie známy případy hromadných úmrtí a otrav lidí na základě nedodržení předepsaných postupů výroby a zpracování falšovaných potravin. (SZPI 2015)

3.1.1 EMA incidenty

Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) definoval ekonomicky motivované falšování, economically motivated adulteration (EMA), jako podvodné, úmyslné nahrazení či přidání látky do produktu za účelem zvýšení hodnoty nebo snížení nákladů na výrobu, tj. za účelem finanční výhody a ekonomického zisku. (Spink & Moyer 2011; Johnson 2014; Manning & Soon 2016)

Ve studii Everstina 2013 bylo v průběhu let 1980 až 2013 zjištěno něco přes 137 jedinečných EMA incidentů v 11 různých kategoriích potravin: ryby a mořské plody (24 incidentů), mléčné výrobky (15 incidentů), ovocné šťávy (12 incidentů), oleje a tuky (12 incidentů), výrobky z obilí (11 incidentů), med a jiná přírodní sladidla (10 incidentů), koření a výtažky (8 incidentů), víno a jiné alkoholické nápoje (7 incidentů), kojenecká výživa (5 incidentů), rostlinné proteiny (5 incidentů) a další potravinářské výrobky (28 incidentů). (Everstine et al. 2013)

3.1.2 Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF)

Systém s názvem Rapid Alert System for Food and Feed, česky Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva, je informační systém oznamující přímá či nepřímá rizika pro lidské zdraví týkající se potravin nebo krmiv. Zajišťuje velice rychlé a efektivní šíření a sdílení informací o možném riziku nebezpečných potravin či krmiv mezi členy systému, tedy státy EU, Evropskou komisí, Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (anglicky European Food Safety Authority; EFSA) a mezi zeměmi Evropského sdružení volného obchodu (anglicky European Free Trade Association; EFTA ~ ESVO). (Bouzembrak & Marvin 2016; Ministerstvo zemědělství 2019)

Pokud má někdo z členů RASFF podezření na riziko ohrožení života při požití potravin nebo krmiv, má povinnost okamžitě informovat Evropskou komisi prostřednictvím tohoto systému. Daná ohlášení jsou dále šířena mezi ostatní členy prostřednictvím několika typů oznámení, které jsou znázorněny v tabulce č. 1. Ostatní členové systému pak postupují podle daného typu oznámení a zpětně informují Evropskou komisi o přijatých opatřeních. (Ministerstvo zemědělství 2014; European Commission 2020)

Tabulka č. 1 – RASFF typy oznámení

Typy oznámení	Popis oznámení
Varování	Vážná rizika potravin či krmiv nabízena spotřebitelům ke koupi. - Požadován rychlý postup
Informace	Rizikové potraviny již nejsou na trhu nebo riziko není považováno za závažné. - Nevyžadován rychlý postup
Odmítnutí na hranicích	Zásilky potravin a krmiv, jež byly testovány a následně odmítnuty na hranicích EU. - Zjištěno zdravotní riziko
Novinky	Veškeré informace, které nejsou sdělovány prostřednictvím varování či informace. - Považovány za významné pro kontrolní orgán

V rámci databáze RASFF jsou zahrnuty podvody jak úmyslné, tedy případy falšování či činy neúmyslné např. špatná nebo chybějící dokumentace. Mezi lety 2000 a 2013 bylo v systému RASFF zaznamenáno 749 oznámení týkající se podvodů a falšování potravin. Tato ohlášení byla rozdělena do 6 skupin, které jsou znázorněny v tabulce č. 2. Taktéž je zde k porovnání přiřazeno rozdělení podvodných způsobů falšování dle Spinka a Moyera. (Spink & Moyer 2011; Bouzembrak & Marvin 2016; Manning & Soon 2016)

Tabulka č. 2 – Rozdělení typů podvodů dle 2 autorů (převzato a upraveno podle Spink & Moyer 2011; Bouzembrak & Marvin 2016)

Typ podvodu podle Bouzemark & Marvin 2016	Typ podvodu podle Spink & Moyer 2011	Definice podvodů podle Spink & Moyer 2011
Nesprávné, podvodné či chybějící zdravotní osvědčení	Falšování	Komponent finálního produktu je zfalšovaný
Nelegální dovoz	Simulace	Nelegitimní produkt je navržený tak, aby vypadal, ale ne přesně kopíroval produkt legitimní
Manipulace	Manipulace	Legitimní produkt a jeho obal jsou podvodně využívány
Nesprávné, prošlé, podvodné či chybějící vstupní doklady a prohlášení	Přetížení, nadbytek	Legitimní produkt se vyrábí nad rámec dohodnutého množství
Datum trvanlivosti	Krádež	Legitimní produkt je odcizen Prodej či distribuce
Nesprávné označení	Odklon	legitimního produktu mimo zamýšlené trhy
-	Padělání	Celý výrobek včetně balení je replikován a falšován

V České republice je Národní kontaktní místo orgán státního dozoru Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI). Zde se shromažďují veškeré informace z vyšších dozorových orgánů dohlížejících na bezpečnost potravin a krmiv v ČR. SZPI je povinna oznamovat přehled ohlášení, jenž v rámci výše zmíněného systému přijala či odeslala. Tento přehled se musí průběhem roku obnovovat a doplňovat o nově příchozí oznámení. (Ministerstvo zemědělství 2014, SZPI 2020)

3.2 Med

Med je vyráběn a tvořen zahušťováním sladkých šťáv. Tvůrcem je včela medonosná (*Apis mellifera*). Proces výroby začíná včelím sběrem nektaru, z čehož vzniká med květový, nebo sběrem výměšků hmyzu živícího se sáním mízy rostlin, díky čemuž získáváme med medovicový. (Castro-Vázquez et al. 2007)

Přesnou definici medu můžeme hledat ve vyhlášce 76/2003 Sb., která přesně stanovuje požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. „*Pro účely této vyhlášky se rozumí: medem – potravina přírodního sacharidového charakteru, složená převážně z glukózy, fruktózy, organických kyselin, enzymů a pevných částic zachycených při sběru sladkých šťáv květů rostlin (nektar), výměšků hmyzu na povrchu rostlin (medovice), nebo na živých částech rostlin včelami (Apis mellifera), které sbírají, přetvářejí, kombinují se svými specifickými látkami, uskladňují a nechávají dehydratovat a zrát v plástech.*“ (Ministerstvo zemědělství 2004)

Med je jednou z nejproblematictějších a nejčastěji falšovaných potravin. (Suková 2012)

3.2.1 Složení medu

Díky svému chemickému složení má med řadu pozitivních nutričních i zdravotních účinků. Je přesyceným roztokem sacharidů, obsahuje menší množství bílkovin, aminokyselin, enzymů, minerálních látek včetně stopových prvků, které mají antioxidační vlastnosti, vitaminů, aromatických látek a dalších. (Alvarez-Suarez et al. 2010) V tabulce č. 5 je zaznamenáno průměrné složení jednotlivých látek medu květového a medovicového a zároveň jejich minimální a maximální doporučená či příkázaná množství ve 100 g produktu. Složení medu obecně je velice variabilní a převážně záleží na květovém zdroji. Jinou roli hrají vnější faktory (sezónní a environmentální) a celkový proces zpracování. Fakt, že složení medu je do značné míry ovlivněno botanickým původem, nebyl nikdy dostatečně zvažován ať už v rámci výživových či fyziologických studiích. (Bogdanov et al. 2008; Alvarez-Suarez et al. 2010)

Tabulka č. 5 – Průměrné složení látek v medu (data v g/100 g)

Složky	Květový		Medovicový	
	Průměrně	Min-max	Průměrně	Min-max
Voda	17,2	15,0-20,0	16,3	15,0-20,0
Fruktosa	38,2	30,0-45,0	31,8	28,0-40,0
Glukosa	31,3	24,0-40,0	26,1	19,0-32,0
Sacharosa	0,7	0,1-4,8	0,5	0,1-4,7
Disacharidy (ostatní)	5,0	2,0-8,0	4,0	1,0-6,0
Melezitosa	<0,1	-	4,0	0,3-22,0
Ostatní cukry	0,5	0,5-1,0	3,0	0,1-6,0

Složky	Kvěťový		Medovicový	
	Průměrně	Min-max	Průměrně	Min-max
Celkový obsah cukrů	79,7	-	80,5	-
Minerální látky	0,2	0,1-0,5	0,9	0,6-2,0
Aminokyseliny, proteiny	0,3	0,2-0,4	0,6	0,4-0,7
Hodnota pH	3,9	3,5-4,5	5,2	4,5-6,5

3.2.2 Druhy medu

Dle vyhlášky č. 76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony, můžeme z paragrafu 7 a 8 říci, co si pod jednotlivými druhy medu můžeme představit. Členění těchto produktů je objasněné níže v tabulce č.6.

Tabulka č. 6 – Členění dle pojmů

Pojem	Vysvětlení
Med kvěťový (nektarový)	Z nektaru květů
Med medovicový	Z výměšků hmyzu, který saje na živých částech rostlin či ze sekretů částí rostlin
Med pastový	Po získání upraven do konzistence pasty
Med vytočený	Získaný odstředováním odvíčkových plástů
Med plástečkový	Včelami uložený a zavíčkovaný med do plástů postavených ze včelího vosku, prodáváný v uzavřených celých plástech či dílech plástů
Med vykapaný	Získaný vykapáním odvíčkových plástů
Med s plástečky	Obsahující jeden či více kusů plástečkového medu
Med lisovaný	Získaný lisováním plástů za použití ohřevu do 45 °C nebo bez použití tepla
Med filtrovaný	Po získání odstraněny cizí organické či anorganické látky, odstranění pylu
Med pekařský (průmyslový)	Pro průmyslové použití nebo složka do jiných potravin, cizí příchut', pachut', počáteční kvašení nebo byl zahřát

3.2.3 Využití medu

Již historicky získával člověk med za pomoci aktivity včel, které tento produkt vytvářely. Stejně jako v oblasti potravinářství se med využíval při léčení různých druhů nemocí nebo při hojení ran. I dnes se váže tato potravina k medicíně. Studie doložily hned několik případů týkajících se pozitivního vlivu medu na účinnost hojení ran, odstranění infekce, schopnost ničit mikroorganismy a sterilovat infikované rány, představeného jako velice významné, širokospektrální, antibakteriální činidlo. Taktéž existují studie zaměřující se na význam medu při terapii kožních ran, kožních či žaludečních vředů, popálenin a dalších závažných onemocnění. (Hanousek 1991; Dunford et al. 2000; Alvarez-Suarez et al. 2010; Al-Waili et al. 2011)

Díky antioxidační aktivitě složek medu (flavonoidů, fenolových kyselin, organických kyselin, produktů Maillardových reakcí, a dalších) dochází k inhibici oxidace látek a oxidačního stresu. Existují studie zaměřující se na antimutagenní aktivitu medu různého botanického původu (akácie, řepka, pohanka, sója), kde výsledky vykazovaly výraznou a významnou inhibici mutagenity heterocyklického aminu Trp-P-1. Antimetastatický účinek medu byl rozebírán ve studiích karcinomu mléčné žlázy u myši a karcinomu tlustého střeva u potkanů, kde bylo zjištěno, že při perorální aplikaci medu se aktivuje a stimuluje imunitní systém, tudíž příjem medu může mít pozitivní vliv v rámci prevence rakoviny a jejich metastáz. Dále u myši proběhly studie účinku medu na rakovinu močového měchýře. Podle výsledků *in vitro* bylo potvrzeno, že med je účinnou látkou pro inhibici růstu nádoru tohoto typu rakoviny. (Swellam et al. 2003; Bogdanov et al. 2008)

Med má taktéž výrazně pozitivní vliv na gastrointestinální trakt (GIT) a jeho funkci. Dříve byl med doporučován jako lék proti průjmům a pro prevenci a léčbu GIT poruch (vředy, gastritida, gastroenteritida). Podle jistých studií byla po požití medu snížena kyselost žaludečních šťáv o 56 %. Oligosacharidy obsažené v medu mají probiotické účinky podobné vlivu fruktooligosacharidů, jež stimulují funkci a zvyšují počet bifidobakterií a laktobacilů. Čistý med prokázal baktericidní aktivitu proti organismům způsobující výše zmíněné žaludeční onemocnění, např. *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*. Dalším škodlivým organismem způsobující infekce GIT je *Helicobacter pylori*. Právě med je zdrojem látek, které by mohly být užitečné při léčbě infekcí *H. pylori*. (Bogdanov et al. 2008; Manyi-Loh et al. 2011)

Med stimuluje sekreci inzulínu, snižuje tak hladinu glukosy v krvi, zvyšuje koncentraci hemoglobinu a zlepšuje profil lipidů. Při začlenění medu do racionální stravy nebo redukčních diet bylo potvrzeno snížení kardiovaskulárních onemocnění u lidí trpících nadváhou nebo obezitou, aniž by došlo ke zvýšení jejich tělesné hmotnosti po dlouhodobém užívání medu. (Musharraf et al. 2016)

Podle studie Simove 2012 je prokázáno, že v medovicových medech je výrazně vyšší množství oligosacharidů, které představují potencionální probiotickou aktivitu a zvýšení počtu bifidobakterií a laktobacilů v lidských střevech. Taktéž bylo prokázáno, že celková antibakteriální a antioxidační aktivita je u medovicových medů vyšší než u medů květových. (Simova et al. 2012)

3.2.4 Parametry určující kvalitu medu

Při laboratorních rozborech jsou zkoumány jednotlivé složky, které ovlivňují danou kvalitu medu. Dle vyhlášky č. 76/2003 Sb., která stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem a čokoládové bonbony rozlišujeme hned několik parametrů kvality, které máme rozepsané v níže uvedené tabulce č. 7.

Tabulka č. 7 – Druhy parametrů určující kvalitu medu

Parametr	Průměrná hodnota udávající kvalitu – květový	Průměrná hodnota udávající kvalitu – medovicový
Hydroxymethylfurfural (HMF)	40 mg/kg nejvýše	40 mg/kg nejvýše
Aktivita diastasy	8 stupňů podle Schadeho (výjimkou jsou citrusové medy a medy s hodnotou HMF pod 15 mg/kg, kde aktivita diastasy musí činit nejméně 3)	8 stupňů podle Schadeho (výjimkou jsou citrusové medy a medy s hodnotou HMF pod 15 mg/kg, kde aktivita diastasy musí činit nejméně 3)
Kyselost	50 mval/kg nejvýše	50 mval/kg nejvýše
Obsah vody	20 % hmotnostních nejvýše	20 % hmotnostních nejvýše
Elektrická vodivost	80 mS/m nejvýše	80 mS/m nejméně
Obsah sacharosy	5 % hmotnostních nejvýše	5 % hmotnostních nejvýše
Obsah fruktosy a glukosy	60 % hmotnostních nejméně	45 % hmotnostních nejméně

Hydroxymethylfurfural (HMF) je složitá látka vznikající zahříváním glukosy či fruktosy při pH nižším než 5. Čím vyšší teplotu při zahřívání používáme, tím vyšší je obsah HMF. V malém množství lze HMF považovat za přirozeně se vyskytující v medu, tedy tepelně nezpracovaném medu. Důležité je vědět, že vysoká hodnota této látky není nijak zdraví závadná, avšak indikuje horší kvalitu medu, protože zvýšením teploty přicházíme o mnoho cenných termolabilních látek. Udává se v jednotkách mg/kg. Jeho hodnota se kontroluje především proto, že když je příliš vysoká a překročí se určený limit, existuje podezření o výrobě falšovaného, umělého medu. Pokud med nese název „ČESKÝ MED“, hodnota HMF nesmí přesáhnout 20 mg/kg. (Ministerstvo zemědělství 2004; Dimins et al. 2006)

Invertasa neboli α -glukosidasa je velice důležitý enzym, který je uplatňován při štěpení sacharosy na glukosu a fruktosu a při převádění nektaru či medovice na med. Původ tohoto enzymu sahá ke včelám a sekretu jejich hltanových žláz. Evropská norma pro med aktivitu tohoto enzymu neuznává jako vhodnou pro kontrolu kvality, avšak podle jiných norem důležitá je. Aktivita invertasy velice snadno klesá se zvýšenou teplotou při zahřívání medu, ale taktéž klesá při dlouhodobém skladování, proto se při hodnocení kvality musí dbát i na ostatní

parametry výše zmíněné. Udává se v invertasových jednotkách (IU) nebo v invertasovém čísle (IN). (Dimins et al. 2006; Kružík et al. 2018)

Diastasa neboli α -amylasa je dalším enzymem, jehož aktivita je při laboratorním stanovení a hodnocení kvality medu výrazně využívána. Jedná se o látku, která je schopna štěpit škrob na jednoduché cukry. Je uváděna v normách a na rozdíl od invertasy se velice dobře stanovuje. Významem a hlavním principem využití je fakt, že podle aktivity diastasy jsme schopni odhadnout aktivitu i ostatních cenných látek a taktéž při vysoké aktivitě diastasy existuje předpoklad pro vyšší obsah a aktivitu ostatních důležitých obsažených enzymů. Přirozená úroveň diastasy je variabilní v závislosti na květovém zdroji. (Boffo et al. 2012) Problémem v případě manipulace s medem může být riziko poklesu enzymu při rozpouštění, ztekucování krystalického medu v mikrovlnné troubě. Vyjádření aktivity diastasy je za pomoci tzv. diastasového čísla (diastase number, DN) v Schadeho jednotkách. Přírodní med by měl mít minimálně 8 stupňů Schadeho jednotek podle kritérií EU. (Dimins et al. 2006; Kružík et al. 2018) V tabulce č. 8 můžeme vidět druhy amylas, které se v medu vyskytují přirozeně a naopak enzymy, které nejsou z včelího zdroje, tedy nejsou z jejich slinných žláz, ale jsou rostlinného nebo mikrobiálního původu. (Kružík et al. 2018)

Tabulka č. 8 – Rozlišené amylasy přirozeně/nepřirozeně se vyskytující

Název enzymu	Výskyt	Důvod	Původ
α -amylasa	Jediná přirozeně vyskytující se v medu, jiným názvem diastasa	Zdrojem může být nektar, medovice či slinné žlázy včel	Sekret slinných žláz, jiné druhy bakterií
β -amylasa	Nenajdeme přirozeně se vyskytující	Zdrojem není nektar, medovice ani slinné žlázy včel	Zpravidla rostlinný původ, taktéž bakteriální (<i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i>), kvasinky, plísně
γ -amylasa	Nenajdeme přirozeně se vyskytující	Zdrojem není nektar, medovice ani slinné žlázy včel	Zpravidla mikrobiální původ (<i>Aspergillus</i> , <i>Rhizopus</i>)

Kyselost je jistý parametr, jehož hodnoty se udávají v mval na kg. Spolu s pH indikuje vyzrállost medu a charakterizuje stabilitu a změnu kvality medu během dlouhodobého skladování. Zvýšenou kyselost vykazují medy, u kterých začal kvasný proces důsledkem vyššího obsahu vody ve vytočeném medu.

Obsah vody neboli vlhkost stejně jako kyselost významně závisí na vyzrállosti medu. Je jedním z hlavních charakteristik, které jsou u kvalitního medu vyžadovány. Čím vyšší obsah vody je, tím vyšší je riziko náchylnosti ke kvašení a znamená to, že byl nevyzrálý med vytočen dřív, než ho včely stihly zakonzervovat. Existují případy falšování, kdy byla voda do medu uměle přidána. (Dimins et al. 2006; Suková 2012)

Elektrická vodivost souvisí s obsahem minerálních solí, organických kyselin, proteinů a zůstává téměř konstantní během zpracování a skladování medu. Hodnoty vyšší než 800 μ S jsou až na pár výjimek (lípa) pro květinové medy neobvyklé. Zpravidla se využívá pro lepší rozlišení medů květových a medovicových. Ve 20 % roztoku medu zjistíme, že medy květové mají elektrickou vodivost nízkou, na rozdíl od medovicových, kde je vodivost výrazně vyšší. V České republice je problémem prodávání medu smíšeného, tedy z nektaru i medovice dohromady, kde v takovém případě nelze medy dostatečně rozlišit. (Popescu et al. 2016)

Konzistence a krystalizace nejsou vždy důležité. Je k tomu nutná laboratorní analýza, která určí příčinu dané změny sensorických a organoleptických vlastností a určí tak pravost a autentičnost daného produktu. (SZPI 2015)

Barva medu nespadá pod klasické parametry hodnotící kvalitu medu, avšak i podle ní se dá přibližně odhadnout botanický původ medu. Medy akátu a citrusových rostlin jsou slámové barvy, medy vřesu mají barvu červenohnědou. Z tolice vojtešky získáváme medy barvy bílé. S barvou je spojená i chuť medu, která u světlých bývá mírnější než u tmavých, kde je chuť výrazně silnější. Metody rozlišování barvy jsou založené na optickém srovnání, při čemž se používá jednoduché barevné třídění podle Pfunda nebo Lovibonda. (Boffo et al. 2012)

3.2.5 Způsoby falšování

Med jakožto velice cenný přírodní produkt se řadí mezi nejčastěji falšované potraviny vůbec. Mezi obvyklé způsoby falšování patří přidavek cukerných sirupů různých druhů (glukosový, škrobový, rýžový a další), záměna botanického původu či lokality a v neposlední řadě filtrace pylových zrn.

3.2.5.1 Přídavek cukrů, sladidel, enzymů, léčiv

Obvyklým paděláním bývá přidavek cukru, glukosového nebo škrobového sirupu či jiných druhů sladidel. V prvopočátcích odhalování bylo použití cukrů z rostlin (C4 rostlin – kukuřice, cukrová třtina), které nebyly opylovány včelami. Tím bylo jasné, že se do medu mohly dostat pouze lidskou rukou. Jednalo se převážně o obiloviny, konkrétně o kukuřici, cukrovou třtinu a řepu. (Cotte et al. 2007; Suková 2012; SZPI 2015)

Jedním z nejčastějších způsobů falšování medů je přidavek škrobového sirupu, který se projeví v rámci následných laboratorních analýz na základě stanovení zbytkové aktivity cizích enzymů, konkrétně výskytu již výše zmíněných β - nebo γ -amylas. Problém tkví v tom, že se v takovém případě jedná o med, u kterého došlo k nešetrnému záhřevu nebo byl příliš dlouho skladován, díky čemuž docházelo k denaturaci látek bílkovinné povahy, enzymů a jejich následnému rozkladu. Proto byl produkt maskován přídatkem jiných druhů amylas, které včelám nejsou vlastní. (Dimins et al. 2006; Kružík et al. 2018)

Státní veterinární správa vydala v lednu tohoto roku tiskovou zprávu, kde nařídila stahování medů pod názvem „Landis, med květový a medovicový“ od slovenského distributora, na základě analýzy, která proběhla v Ústavu pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv (ÚSKVBL). Zjistilo se, že med obsahoval nepovolené léčivo dapson, které je u potravinových zvířat v EU zakázáno. Tato látka je používána pouze v humánní medicíně, u lidí zejména při léčbě lepry a jiných onemocněních. (SVS 2020)

3.2.5.2 Tuzemský med a jeho náhrada za zahraniční

Slovem „med“ lze označit pouze a jen pravý včelí med, u kterého je nutné uvést jméno a adresu českého včelaře, dále množství, datum minimální trvanlivosti, původ (květový či medovicový), způsob získání a úpravy, avšak především země původu. Ta je důležitá převážně v případě, že je výrobek ze směsi medů z více zemí. (Suková 2012)

Novějším způsobem padělání těchto produktů je označování zahraničního medu za český. K ověření autentičnosti a zajištění jeho tuzemského původu se využívá metoda pylové analýzy, při které zjistíme spektra jednotlivých druhů pylů a jejich zastoupení. Problémem této metody je náročnost z hlediska kvalifikace a know-how personálu. (SZPI 2015)

3.2.6 České značky kvality

V rámci hodnocení kvality medu a lepší orientace při výběru výrobku se díváme na české značky kvality, které jsou udělovány za jistých podmínek. Bohužel je zde jisté riziko, i přestože med nese označení o dané kvalitě, může v určitém období kvalitativně klesnout a než se stihne obnovit a zkontrolovat momentální kvalitu, do oběhu se vpustí nekvalitní výrobek. Označení využívaná nejčastěji jsou KLASA a Regionální potravina.

Jedním z kvalitativních označení medu vyrobeného na území České republiky je výrobek nesoucí název „ČESKÝ MED“, což je jistá norma jakosti pro spotřebitelské balení. U medů filtrovaných a pekařských (průmyslových) se toto označení nesmí používat. Český med má zpřísnující fyzikální i chemické požadavky, které musí být dodržovány, a taktéž jako doplňujícím kritériem je geografický původ na území České republiky. Tato norma jakosti byla vydána Českým svazem včelařů. Ve stejném duchu se nese označení „MORA VSKÝ MED“ a „SLEZSKÝ MED“, které svou ochrannou známkou zajišťují vyšší kvalitu produktu. (Český svaz včelařů 1999)

3.3 Metody detekce

Zvolení vhodné metody k detekci cizorodých látek je důležité z hlediska správnosti a účinnosti analýzy. Na základě typu látky rozdělujeme metody dle Bansala et al. 2017 do 3 hlavních skupin. Prvními jsou fyzikální metody, druhými molekulární metody založené na DNA (PCR) a třetím typem jsou chemické a biochemické metody, mezi které řadíme chromatografické, elektroforetické nebo spektroskopické metody (TLC, GC, LC, HPLC, NMR, MS, PAGE) a immuno analýzy (ELISA).

3.3.1 Rozdělení metod

Mezi fyzikální technologie řadíme makroskopické a mikroskopické **vizuální strukturální analýzy** a taktéž **analýzy fyzikálních parametrů** jako například konzistence, rozpustnost, objem či hustota. Tyto metody se využívají především v kombinaci s chemickým profilováním k identifikaci a autentizaci bylin a jiných léčivých rostlin. Analýza vizuální struktury v rámci mikroskopických a makroskopických vlastností se hojně využívá v případě mikrobiální detekce u hub. (Sheorey & Tiwari 2011) V případě mikroskopických laboratorních vyšetření se snadno detekuje přítomnost škrobu v práškových kořenicích přípravcích.

Co se týče medu, za pomoci optické mikroskopie lze rozeznat falšování ve formě přídavku třtinového cukru a výrobků z něj, ale jiné druhy falšování medu za pomoci těchto metod nelze analyzovat. (Bansal et al. 2017)

Molekulární metody jsou založené na bázi DNA, RNA, bílkovin, a lipidů a nejčastěji se využívají k doplnění chemických a biochemických metod. Jednou z těchto metod je polymerázová řetězová reakce (**PCR**), která je značně používána při detekci alergenních potravin například při ověření autenticity mléka a určení jeho původu, dále sóji a dalších druhů potravin. (Bobková et al. 2009) Jiné molekulární metody fungují na bázi sekvenování (čtení) DNA a hybridizace, kdy již při nepatrné změně v řetězci nukleotidů se dá detekovat cizorodá látka. Nevýhodou oproti PCR metodě je časová i pracovní náročnost. (Bansal et al. 2017)

Do chemických a biochemických technologií řadíme metody na bázi chromatografie, elektroforézy, dále metody spektroskopické a v neposlední řadě immuno analýzy.

Mezi chromatografické řadíme tenkovrstvou chromatografii (**TLC**), která patří mezi jednodušší a funguje na bázi rozdělení látek pohyblivou a pevnou fází tenké vrstvy, dále plynovou chromatografií (**GC**), kapalinovou chromatografií (**LC**) a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (**HPLC**). Právě tyto druhy technik vedly ke značnému vývoji v analýze směsných složek, využívají se k izolaci složek směsi pro další analýzu, separaci a možnosti snazšího stanovení látek a jejich biologických vlastností. (Martin & Martin 2013; Bansal et al. 2017)

Při detekci falšování, odlišení různých odrůd a identifikaci a oddělení těkavých organických sloučenin vín bývá využita GC spolu s hmotnostní spektroskopií (MS) a infračervenou spektroskopií využívající Fourierovu transformaci (FTIR). Jedná se o spolehlivou, nedestruktivní techniku s potřebou malého množství vzorku. (Bansal et al. 2017)

V oblasti detekce a falšování medu se chromatografické metody hojně využívají v kombinaci se spektrometrickými metodami (NMR) a vycházejí s výbornými výsledky. Na základě metody HPTLC (vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie) byla kvantitativně stanovena glukóza, fruktóza a sacharóza z různých typů komerčně dostupných rumunských medů. (Puscas et al. 2013) Studie z roku 2002 ukazuje postup a vývoj těchto analýz a detekci falšovaných medů v průběhu 25 let, kde byly zkoumány různé sloučeniny objevující se v medu (cukry, organické kyseliny, flavonoidy, HMF a podobně), čímž jasně poukazují na vysokou složitost některých potravinových matric, jako například med a jiné nijak neupravované přírodní produkty. (Cordella et al. 2002)

V rámci elektroforetických analýz mluvíme v základě o analýze **PAGE** (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu) používající se kupříkladu při detekci falšování mléka a mléčných produktů. (Chen et al. 2004; Bobková et al. 2009) Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (**SDS-PAGE**) je metodou separace proteinů na základě jejich elektroforetické pohyblivosti závislé na délce peptidového řetězce. Obsah bílkovin a kvalita medů se liší podle botanického původu a podle podmínek produkce a způsobu manipulace. V rámci studie Nisbeta 2009 a využití metody SDS-PAGE byly vzájemně porovnány proteinové profily čistých a falšovaných medů a bylo potvrzeno, že se proteinový profil může využít k detekci a rozlišení falšovaných a nefalšovaných medů. (Nisbet et al. 2009)

Mezi spektroskopické, pro nás nejdůležitější, metody řadíme infračervenou spektroskopií (**IR**), která je jednou z technik poskytující informace o funkčních skupinách vyskytujících se v molekule (COR, COOR, CN, NO₂ a další). Bohužel ze spekter získaných pomocí této metody

nezjistíme umístění či propojení výše uvedených funkčních skupin. (Balci 2005) Velké využití nacházíme v oblasti identifikace mikroorganismů, kde díky infračervenému záření lze snadněji a lépe identifikovat a zkoumat jednotlivé druhy mikroorganismů. Využívá se konkrétně **FTIR** spektroskopie, tedy infračervená spektroskopie využívající Fourierovu transformaci. Je to technika zajišťující rychlou diferenciaci a klasifikaci druhů až poddruhů jednotlivých organismů. (Naumann et al. 1991; Thi et al. 2000; Ngo-Thi et al. 2003) Tato metoda je považována za poměrně jednoduchou a spolehlivou. Dá se stanovit jak chemické složení, tak i fyzikální vlastnosti medu. Při analýze popsané ve studii Lichtenberg-Kraaga 2002 bylo využito množství 1600 vzorků medu různého botanického původu a zkoumalo se množství monosacharidů, oligosacharidů, proliny, pH, vlhkost, elektrická vodivost, obsah HMF (hydroxymethylfurfuralu) a další. Pomocí FTIR analýzy se dokázal odlišit falšovaný vzorek, ale nešlo spolehlivě identifikovat cizorodou látku. (Lichtenberg-Kraag et al. 2002)

Blízká infračervená spektroskopie (**NIR**) je metodou vhodnou k rychlé detekci cizorodých látek v surovém materiálu, ale ne k jejich identifikaci. Používá se například jako nástroj při odhalování podvodů a falšování sójových produktů, které jsou součástí krmiva pro zvířata. **Ramanova spektroskopie** není probádaná natolik, abychom byli schopni říci, že patří mezi účinné analýzy vhodné pro detekci a falšování potravin. V jedné z mála studií byla zkoumána kvalita masa pomocí přenosné Ramanovy sondy. Bylo však potvrzeno, že existují lepší a účinnější analytické metody. (Ellis et al. 2012; Bansal et al. 2017)

Hmotnostní spektrometrie (**MS**, mass spectrometry) spočívá v poskytování informací o molekulové hmotnosti nebo hmotnosti sloučenin. Jedná se o analytickou metodu využívající princip převedení molekul na ionty a jejich rozlišení v rámci poměru hmotnosti a náboje (m/z), zaznamenává se intenzita a detekují se tak nabitě částice, ionty. Problémem této analýzy bývá náročná příprava vzorku a často je vyžadována spolupráce s jinými metodami, aby se zvýšil počet detekovaných metabolitů. Více se o rozdílech hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetické rezonance budeme bavit v kapitole níže.

Hmotnostní spektrometrie slouží ke stanovení struktury a chemického složení vzorku. Často se využívá ve spojení s různými separačními metodami (GC-MS, LC-MS) při určování struktury organických látek je doplňována nukleární magnetickou rezonancí (NMR) a IR spektroskopií. (Balci 2005) Své aplikování si MS našla nejen v rámci analýzy falšování medů, vín a dalších potravin, ale taktéž v rámci studia kontaminace patogenními bakteriemi (*Salmonella*), které způsobovaly otravu jídlem. (Ellis et al. 2012)

3.4 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

Nukleární magnetická rezonance, z anglického názvu Nuclear Magnetic Resonance, je metoda používající se k detekci původu potravin a objevení nových biomarkerů. Pokroky v technologii digitálních spektrometrů během posledních dvou desetiletí zajistily NMR spektroskopii možnost rutinní analýzy a lepší kvantifikace a identifikace sloučenin. Pokroky byly zaznamenány například ve zpracování signálu, při kterém jsou odstraněny protony vody, které by mohly přehlušit nebo deformovat spektra méně zastoupených molekul, dále ve zvýšené automatizaci při přípravě vzorků a při zpracování výsledného spektra, kde je využíváno technik vícerozměrné analýzy dat. Na základě těchto pokroků vznikají větší spektrální databáze umožňující tvorbu vysoce prediktivních AI modelů. (Kuballa et al. 2018)

V případě medů se jedná především o rozpoznání snahy o falšování botanického a zeměpisného původu na základě jeho organoleptických a aromatických vlastností. Nařízení EU o medu tímto stanovuje povinnost uvádět na etiketě jak botanický, tak zeměpisný původ produktu. Jsou stanoveny jisté parametry prodávávaného medu, podle kterých je jednoznačně určen původ v rámci celkové kvality medu. (Schievano et al. 2012)

3.5 Princip NMR

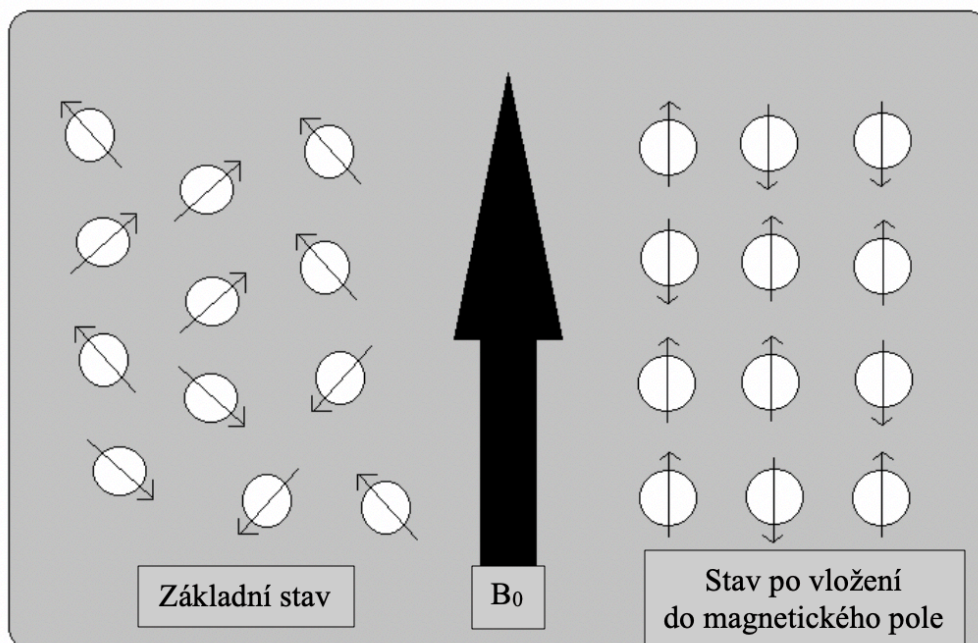
NMR spektroskopie využívá magnetických vlastností jader. Postupem času se využití této metody měnilo z role studia magnetických vlastností jader na popis detailní struktury anorganických a organických látek a biomolekul v různých typech skupenství. (Popa & Novotná 2012)

Jedná se tedy o výkonnou analytickou spektroskopickou techniku, která je schopna poskytnout kvantitativní informace o chemickém složení kapalných, ale i pevných rozpustných směsí organických sloučenin. Provedením komplexnějších experimentů 1D a 2D NMR analýzy je možné detekovat a identifikovat i sloučeniny doposud neznámé. (Ralli et al. 2018)

Principem jsou základní stavební částice atomů, tedy protony, neutrony a elektrony rotující kolem své vlastní osy, tzn. mají svůj moment hybnosti, který je označován jako **spin** (značka: **I**).

Pokud je v jádrech izotopů sudý počet protonů a neutronů, jsou spárovány spiny částic, což znamená, že spinové kvantové číslo je 0 ($I = 0$). Bavíme se například o izotopech ^{12}C a ^{16}O , tedy jádrech, které nemají magnetický moment μ , čímž nám neposkytují signály NMR. Jádra obsahující lichý počet protonů a neutronů či obou typů částic nemají spárovány spiny a jejich spinové kvantové číslo je vyšší než 0. Se vznikem magnetického pole souvisí pohyb elektricky nabitých částic po uzavřené dráze, díky čemuž mají jádra se spinovým kvantovým číslem vyšším než 0 svůj vlastní magnetický moment. Jedná se například o částice ^1H , ^{13}C , ^{17}O . (Buděšínský & Pelnář 2000)

Základní stav je tehdy, kdy spiny nejsou uspořádány a nenajdeme mezi nimi žádný energetický rozdíl. NMR experiment začíná ve chvíli, kdy je jádro vloženo do magnetického pole B_0 , kde dojde k uspořádání magnetických momentů ve směru a proti směru magnetického pole, což můžeme vidět na obrázku č. 1. (Günther 2013)



Obrázek č. 1: Uspořádání a orientace spinů

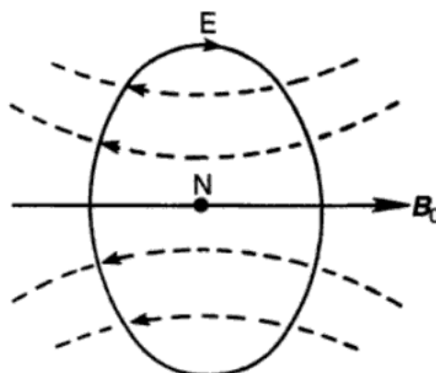
Magnetický moment (μ) opisuje kružnici a spiny jader vytváří tzv. precesní pohyb, tedy otáčivý pohyb, ke kterému dochází na základě vychýlení z rovnovážné polohy.

Pokud se částice ze záření o jisté frekvenci absorbují jádrem, vzniká rezonanční vlna, čili jev nazývaný se rezonance. Rezonanční frekvence závisí na struktuře okolního jádra. Výsledkem je spektrum, tedy frekvence versus absorbovaná energie. Principem rezonance je, že jádra na nižší energetické hladině jsou schopna absorbovat radiofrekvenční záření a přecházet tak do excitovaného stavu. (Popa & Novotná 2012)

3.5.1 Chemický posun

Chemický posun je jev, který nám pomáhá odlišit jednotlivé látky a jejich struktury na základě odlišného okolí a jejich reakce s ním spojené. Jinak řečeno rezonanční frekvence jednotlivých jader je ovlivněna elektrony v chemických vazbách molekuly. Kdyby neexistoval chemický posun, jádra by rezonovala při stejné frekvenci a my bychom nebyli schopni jednotlivé látky v rámci NMR analýzy rozlišit.

Principem tzv. magnetického stínění jádra (anglicky shielding) je změna B_0 vlivem okolních elektronů. Po vystavení zkoumané molekuly nebo směsi magnetickému poli B_0 vzniká cirkulující pohyb elektronů v elektronovém obalu, které obklopuje jádro. Díky tomuto pohybu vzniká slabší lokální pole B_{local} , které míří proti vnějšímu magnetickému poli B_0 , což můžeme vidět na obrázku č. 2. (Akitt & Mann 2000)



Obrázek č. 2: Pohyb elektronového oblaku E okolo jádra N
(Akitt & Mann 2000)

Díky odlišnosti magnetických polí jednotlivých látek dochází k rozdílným chemickým posunům a rozdílnému stínění a na základě toho jsme schopni rozlišit i odlišné frekvence, ve kterých látky rezonují. (Wishart et al. 1995; Günther 2013) Frekvence ve spektru roste zprava doleva, kdežto stínění zleva doprava. (Popa & Novotná 2012)

Většinou se jednotky ve spektrech nepoužívají vlivem malých změn v rámci stínění, počítalo by se s malými čísly, proto se využívají tzv. referenční látky (standardy), nejčastěji TMS (tetramethylsilan) nebo TSP (3-trimethylsilylpropionan sodný), díky kterým se dá posun vyjádřit v ppm (bezrozměrně), protože jejich hodnota (dohodnutá frekvence) je 0. Tyto standardy dávají silný a ostrý signál, který je vždy zaznamenáván spolu se spektrem zkoumaného vzorku. Jsou to látky v podstatě inertní a po záznamu spektra se dají snadno ze vzorku odstranit. (Günther 1995; Hoffman 2006; Popa & Novotná 2012)

Bez chemického posunu bychom nezískali důležitá data pro stanovení struktur neznámých látek, ale i známých (organických) látek a NMR spektroskopie by pozbyla svého využití. (Wishart et al. 1995; Günther 2013)

Absolutní hodnoty frekvencí rezonancí jsou v MHz, ale výše zmíněný posun (rozdíl rezonančních frekvencí) způsobený stíněním je řádově v Hz, proto se zde používá jednotka ppm (parts per million, česky miliontiny vnějšího pole). (Popa & Novotná 2012)

3.5.2 Interakce a štěpení signálu ve spektru

Rezonance jádra se změní ve chvíli, kdy je v jeho okolí další magneticky aktivní jádro. (Popa & Novotná 2012) **Spin-spin coupling**, neboli česky spin-spinové interakce, jsou reakce nepřímé mezi jednotlivými atomy. V rámci odlišnosti jejich elektronového okolí se logicky předpokládá, že se budou navzájem ovlivňovat a společně interagovat.

Na základě těchto interakcí a působení magnetických polí mezi jednotlivými sousedními jádry dochází ke štěpení signálu, který v NMR spektru vzniká. (Günther 1995)

3.5.3 Pulzní NMR

NMR spektrum tvoří obecně frekvenční charakteristiku systému, kterou můžeme získat tzv. kontinuální vlnou, tedy okamžitým měřením odezvy bod po bodu, a nebo využitím pulzů (tzv. FT NMR spektrometry), kde po vybuzení pulzem změříme odezvy Fourierovou transformací. Moderní spektrometry pracují převážně na bázi pulzů a s kontinuální vlnou nepracují téměř vůbec. Výhodou FT NMR spektrometrů je ta, že doba měření bývá několik sekund na rozdíl od kontinuální vlny, kde trvá několik minut. Za tu dobu jsme za pomoci pulzů schopni měření několikrát opakovat, výsledky sečíst a docílit tak mnohonásobně vyšší citlivosti na tomtéž vzorku. (Günther 1995; Popa & Novotná 2012)

3.5.4 ^1H NMR

Dle mnoha studií můžeme potvrdit, že ^1H NMR je jednou z nejvhodnějších metod pro detekci falšování nebo odlišení botanického původu medů a pro identifikaci biomarkerů. Je to především dáno rychlostí výše zmíněné metody, dále díky relativně malému množství vzorku, které je při analýze potřeba (v určitých případech stačí méně než 1 μg vzorku), a díky schopnosti metody poskytnout bohatou strukturální informaci ohledně různých chemických látek současně. (Schievano et al. 2012)

Vodík ^1H je nejběžnější formou a má výjimečné postavení v NMR spektroskopii organických sloučenin především díky výhodným vlastnostem, tedy vysokému přirozenému zastoupení činícím přes 99 %, spinovým kvantovým číslem vyšším než 0, vysokou citlivostí a rozsáhlým výskytem.

3.6 Odběry a příprava vzorků NMR

Odběry a příprava vzorků pro NMR spektroskopii jsou relativně snadné, pokud se dodržují jistá pravidla. Je třeba rozlišovat, v jakém skupenství se vzorek nachází a jakého původu (rostlinného/živočišného) je. Stále klesající cena deuterovaných rozpouštědel, které jsou při přípravě potřeba, činí NMR metodu výrazně dostupnější. (Grünther 1995)

Způsob a náročnost přípravy vzorku před analýzou je ovlivněn potravinami v odlišném skupenství. Potraviny v kapalném skupenství, tedy s vysokou koncentrací vody, nebo vody a ethanolu představují nejjednodušší manipulaci, jedná se například o víno, lihoviny či džusy. Tyto vzorky lze přímo analyzovat nebo při nutné zvýšené citlivosti se část vody nebo ethanolu snadno odpaří nebo vymrazí. Potraviny v pevném skupenství, které jsou rozpustné ve vodě nebo v jiných rozpouštědlech lze taktéž přímo analyzovat při obezřetnosti na homogenitu vzorku. (Ralli et al. 2018)

Při odběru vzorků medu je třeba dbát na správné uchování vzorku, aby nedošlo k nechtěnému znehodnocení kvality a složení. Skladuje se na temných, chladných a suchých místech. Do mrazicích zařízení se med ukládá do doby data analýzy z důvodu eliminování možné degradace a těsně před analýzou jsou vzorky ponechány v temnu při pokojové teplotě, aby konzistence medu byla vhodná pro následnou manipulaci. (Bienefeld 2005)

Medy musí být homogenní. Pokud se jedná o medy krystalické, musí se předem rozpustit. (Consonni et al. 2019)

Vzorek je nutné před analýzou zředit a smíchat s deuterovaným rozpouštědlem. Obzvláště pokud se využívá ^1H NMR, je důležité mít vzorek rozpuštěn v určitém procentu (nejčastěji 10-100 %) neboť spektrometr potřebuje signál deuteria ^2H , aby byl schopen korigovat lokální aberace magnetického pole. Tyto změny v homogenitě pole by mohly vést k nesymetrickému tvaru peaků spektra nebo sníženému odstupům signálu od šumu. (Jacobsen 2007) Pro běžné lipofilní organické molekuly je ideálním rozpouštědlem CDCl_3 , pro hydrofilní molekuly (soli) je vhodné D_2O . Pokud se jedná o organické kyseliny, které mají polární i nepolární skupiny, využívají se dražší látky jako například velice účinné rozpouštědlo $\text{d}_6\text{-DMSO}$, ale po jeho použití může být obtížné vzorek rekonstituovat. Jinými použitelnými rozpouštědly jsou plně deuterovaný aceton, methanol, acetonitril, benzen, THF a další. (Jacobsen 2007)

3.7 Využití NMR

NMR spektroskopie má v potravinářské analýze dlouhou tradici a v posledních letech velmi výrazně přispěla k vývoji vícerozměrných statistických analytických metod srovnávajících fingerprinty vzorků. (Ralli et al. 2018) Studie tvrdí, že metoda SNIF-NMR (specific natural isotopic fractionation-NMR) se prokázala jako účinná analýza pro ověření autenticity francouzských a jiných evropských medů a podala na rozdíl od metody SCIRA-MS (stable carbon isotopic ratio analysis-MS) více lepších a kvalitních výsledků. K validaci metody byly využity jak vzorky autentické, tak úmyslně falšované pomocí glukosových a fruktosových sirupů z C3 (řepka, slunečnice, akát, javor, jedle a další) a C4 (kukuřice, cukrová třtina) rostlin. Metoda SCIRA-MS podala výsledky s vysokými odchylkami a negativními výsledky, proto byli pracovníci nuceni udělat analýzu znovu za pomoci SNIF-NMR. Počet případů falšování přídatkem sirupů C3 rostlin se stále zvyšuje, protože ani jedna z analytických metod není schopna podvodu odhalit. (Cotte et al. 2007)

3.7.1 Porovnání analytických metod (NMR/MS)

Vzhledem k tomu, že stále roste poptávka spotřebitelů po pravdivosti původu, se výrobci snaží dbát na autenticitu výrobků a zajistit danou odrůdu a jejich původ. Většina analytických metod, které byly využívány v historii a dají se používat i dnes, jsou časově náročné. Proto kontrolní orgány hledají rychlé a pokud možno snadno použitelné analytické techniky, které tyto identifikace zajišťují. (Roussel et al. 2003)

Účinnost a využití analytických technologií se odvíjí od druhu, původu a povahy vzorku a taktéž záleží na zaměření dané studie. Výběr metody by měl probíhat na základě těchto faktorů, i když se stává, že se určí dle nákladů, dostupnosti přístrojů a technologie a odborné znalosti zmíněných technik. Hmotnostní spektrometrie kapalinové (LC-MS) i plynové (GC-MS) jsou přirozeně citlivější než analýza NMR. (Emwas et al. 2019) NMR data jsou vysoce reprodukovatelná a kvantitativní v širokém rozsahu a jsou bezkonkurenční metodou pro analýzu a stanovení neznámých sloučenin. Obě metody NMR a MS jsou k sobě komplementární a synergicky fungující. (Markley et al. 2017)

Vzhledem k jednotlivým zaměřením daných analytických platform je nejlepší a nejúčinnější variantou společné využití metabolomických studií pro úplné identifikování

a kvantifikaci všech metabolitů typických pro biologický vzorek. (Emwas et al. 2019) K analýzám nelze používat pouze jeden faktor falšování, jako je například HMF, vlhkost, barva, pH a podobně. Koncentrace HMF (hydroxymethylfurfural) se mění na základě intenzity tepelného ošetření, ale často má vliv i přítomnost organických kyselin, hodnota pH, vlhkost, aktivita vody, profil cukru a další. (ElMasry et al. 2019)

Veškeré pozitivní i negativní vlastnosti NMR a MS analýz můžeme vidět v tabulce č. 3 níže, kde je jasně popsáno, díky čemu je jaká metoda lepší a účinnější.

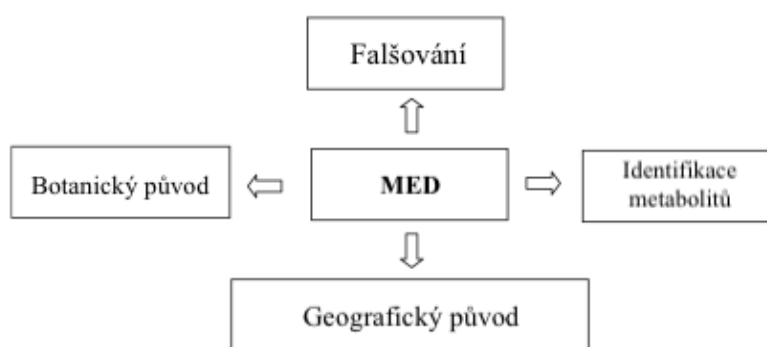
Tabulka č. 3 – Porovnání analýz NMR a MS

Vlastnost	NMR	MS
Reprodukovatelnost	Vysoká	Malá (v porovnání s NMR)
Citlivost	Vnitřně nízká, dá se zlepšit vyšším počtem skenů, vyšší intenzitou magnetického pole	Vysoká (snadná detekce velice nízkých koncentrací)
Selektivita	Zpravidla neselektivní analýza	Selektivní analýza, v kombinace s chromatografií = cílená analýza
Měření vzorku	Rychlé měření pomocí ^1H NMR, všechny metabolity V JEDNOM MĚŘENÍ	Nutná spolupráce s jinými metodami k maximalizaci počtu detekovaných metabolitů (ionizační metody)
Počet detekovatelných metabolitů	V jednom měření lze detekovat a identifikovat méně než 200 metabolitů	Pomocí různých technik MS lze detekovat tisíce různých metabolitů a identifikovat několik stovek
Příprava vzorků	Minimální příprava, lze automatizovat (zpravidla přenos vzorku do zkumavky a přidání deuterovaného rozpuštědla)	Náročnější příprava, vyžadovaná deprivatizace pro GC-MS
Zotavení vzorku	Nedestruktivní metoda, na jednom vzorku lze provést několik analýz, možné izolování vzorku, jeho dlouhodobé uložení	Destruktivní metoda, vzorek nelze získat zpět
Kvantitativní analýza	Kvantitativní (intenzita signálu přímo úměrná koncentraci metabolit)	Intenzita často nekoreluje s koncentracemi metabolitů

Vlastnost	NMR	MS
Cílená analýza	Ne tak časté využití, ale lze použít v cílené i necílené analýze	GC-MS i LC-MS jsou vhodné pro cílené analýzy
In vivo studie	Využívána, nejčastěji s využitím jader ^1H a ^{31}P	Nevyužívá se

3.8 Využití NMR k detekci falšování medu

Využití nukleární magnetické rezonance při detekci falšování medů se v posledních letech výrazně zvýšilo. Tento druh analýzy je vhodnou metodou pro rozlišení botanických druhů medu podle jejich chemického složení a taktéž pro nalezení nových biomarkerů, které jsou specifickou látkou pro jednotlivé druhy. Na obrázku č. 4 můžeme vidět různá využití NMR při ověření autenticity a falšování medu.



Obrázek č. 4: Rozdělení využití NMR analýzy

Tradiční falšování medu kukuřičným sirupem, invertním cukrovým sirupem nebo kukuřičným sirupem s vysokým obsahem fruktosy způsobuje změny především v uhlíkovém složení. Ve studii Musharrafa 2016 bylo zjišťováno falšování za pomoci sirupu z hnědé rýže, který je medu podobný jak vzhledem, tak chutí. K této analýze byla využita kvantitativní ^1H NMR metoda ($q^1\text{H}$ NMR) pro její jednoduchost, rychlost a snadnou přípravu vzorku. Včetně obvyklé přítomnosti glukosy a fruktosy byla zjištěna i přítomnost maltosy, která je významným markerem v rámci charakteristiky sirupu z hnědé rýže. Tato studie poprvé potvrdila falšování sirupem hnědé rýže za pomoci $q^1\text{H}$ NMR analýzy. (Musharraf et al. 2016)

Díky NMR je při kvantifikaci fruktosy a glukosy možná detekce jednotlivých izoform cukrů, které jsou jinak nedetekovatelné. (del Campo et al. 2016) Profil cukrů v medu se dá použít jako otisk prstu k potvrzení jeho pravosti a odhalení možného falšování produktu formou přidání sladidla. V Schievanově studii z roku 2020 bylo analyzováno 46 vzorků medů, kde byl za pomoci CSSF-TOCSY NMR, tedy robustní a citlivé pulzní techniky poskytující přesné kvantitativní stanovení cukrů ve složitých maticích, určen profil 20 sacharidů. Při porovnání s čínskými vzorky medu, u kterých byl deklarovaný stejný botanický původ, se odhalily

v profilech sacharidů významné rozdíly. Podrobná analýza potvrdila, že k falšování pravděpodobně došlo na základě přikrmování kolonií včel cukrovými sirupy v období opylování. Čínské medy vykazovaly vyšší hladiny monosacharidů. Například výrazný rozdíl byl u manosy, kde evropské medy obsahovaly méně než 0,018 g/100 g oproti čínským, u kterých se hodnota pohybovala v rozmezí 0,06 – 0,17 g/100 g. Manosa je součástí rýžových sirupů a sirupů s vysokým obsahem fruktosy, ale taktéž je součástí kaštanových medů či lipových, nikoliv však akátových. U medů z akácií nebyla manosa doposud detekována, proto se touto studií potvrzuje hypotéza falšování cukerným sirupem. Čínské medy mimojiné vykazovaly i nižší obsah disacharidů ve srovnání s medy evropskými. Tato studie taktéž potvrzuje, že koncentrace minoritních sacharidů představuje jiný fingerprint medu. Koncentrace glukosy a fruktosy nebyla výrazně ovlivněna cukernými sirupy. (Schievano et al. 2020)

Popescu ve své práci z roku 2015 dokázal za pomoci fyzikálně chemických metod ^1H a ^{13}C NMR a HPLC odlišit jednotlivé botanické druhy rumunských medů (akát, slunečnice, řepka, lípa a medy vícedruhové) na základě parametrů hodnotící kvalitu medů, tedy jejich odlišné pH, elektrickou vodivost, poměr fruktosa/glukosa, celkový obsah pevných látek, profily ^1H a ^{13}C NMR a obsah HMF. Hodnoty pH medy dobře odlišovaly, u vícedruhových bylo pH 3,2, u líp 4,7, u slunečnice 3,5 a bylo zde potvrzeno, že slunečnicové medy jsou zásaditější než medy lipové. Elektrická vodivost je vhodný parametr pro odlišování medů podle botanického původu. Pro akát byla hodnota 150 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pro lípu 550 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Poměr fruktosa/glukosa byl taktéž dobrým parametrem pro rozlišení jednotlivých druhů medu. Pokud vyšla hodnota ≤ 1 , začíná krystalizace rychleji, což bylo pozorováno u slunečnicového a řepkového medu, kde poměr vyšel v rozmezí 0,70 do 0,95. Akátový med měl nejvyšší poměr fruktosa/glukosa mezi 0,98 a 1,49, díky čemuž nekrystalizuje. (Popescu et al. 2016)

Pro určování a rozeznání botanického původu medu byl prokázán velký potenciál NMR analýzy ve spojení s technikami chemometrie. Ve studii Zuccata 2017 byla provedena podrobná analýza složek medů včel druhů *Melipona*, *Geotrigona-Trigona* a *Scaptotrigona* a taktéž *Apis mellifera*. Látka diacylglycerylether, která již byla identifikovaná jako endogenní sloučenina medu *Apis mellifera*, se v této studii potvrdila jako užitečný marker při odhalování podvodů míchání různých druhů medu a jejich následného vydávání za medy čisté. Taktéž se zde přišlo na odlišné složení vosků, které se v medu objevují ve stopovém množství. Podle druhu včely a prostředí, ve kterém žijí, se liší i složení produkovaného vosku. (Zuccato et al. 2017)

Ve studii Boffa 2012 byla taktéž využita NMR analýza společně s chemometrickými metodami, díky čemuž se dokázaly rozlišit medy eukalyptu, citrusové medy a vícedruhové (smíšené). U vícedruhových medů byl zjištěn vyšší obsah fenylalaninu a tyrosinu, u citrusových medů vyšší množství sacharosy a u eukalyptových vyšší obsah kyseliny mléčné. U potvrzených falšovaných medů byly pozorovány signály HMF a kyseliny citronové, která byla pravděpodobně přidána záměrně, jako antioxidant, protože v ^1H NMR spektrech citrusových medů nebyla pozorována. ^1H NMR analýza se prokázala jako velmi účinná společně s chemometrickými metodami pro lepší klasifikaci vzorku a byly rozlišené falšované medy s identifikací konkrétní cizorodé látky a taktéž byl odlišen botanický původ medů. (Boffa et al. 2012)

Rozlišit botanické druhy medů se povedlo i ve studii Ohmenhaeuser 2013, kde se záměrně zaměřovali nejenom na kvantifikaci sacharidů, které se prokázaly jako klíčový marker

pro diferenciaci, a aminokyselin, ale i alifatických a aromatických kyselin. Jednalo se především o kyselinu mravenčí, citronovou, jablečnou, vinnou, fumarovou, pyrohroznovou a jantarovou. Koncentrace kyseliny jantarové byly nepatrně vyšší u medů medovicových (0,17 a 0,28 g/100 g), u medů kaštanových byly vyšší koncentrace kyseliny mravenčí (0,71 g/100 g). (Ohmenhaeuser et al. 2013)

Ve studii Simove 2012 byla využita ^1H a ^{13}C NMR analýza pro rychlou diferenciaci dubového medovicového medu (oak honeydew honey) od jiných druhů, ať už květových či medovicových. Kvantifikovaným markerem je zde kvercitol (5-deoxyinositol), který prokazatelně odlišuje dubové medy od ostatních. Za pomoci qNMR byly zjištěny hned 4 typy kvercitolu, kdy proto-kvercitol je nejvýznamnější. (Simova et al. 2012)

V procesu zrání medu, které probíhá uvnitř plástů, probíhají biochemické transformační procesy, které spočívají především ve změně obsahu vody (pod 20 %) a přeměně sacharosy na glukosu a fruktosu. Přeměna cukrů je zprostředkována jak rostlinnými, tak včelími enzymy. Ve studii Svečnjaka 2019 byl popsán vliv parafínu na změnu složení a kvality medu. Parafín je látkou cenově snadno dostupnou a používá se na výrobu mezistěn. Náhrada včelího vosku za parafín je celosvětově rozšiřující se problém. Analýza se praktikovala na dvou typech vzorků, které dozrávaly v úlech. Jeden, jenž byl uložen do plástů, kde základ tvořil pravý včelí vosk, a druhý, kde základ obsahoval z 90 % parafín a z 10 % včelí vosk. Díky souběžnému využití analýz ^1H NMR, FTIR-ATR a GC-MS byl rozpoznán rozdíl v obsahu vody, který byl vyšší u medů dozrávajících ve falšovaných základech parafínem. Způsobeno to bylo hydrofobní povahou parafínu, která blokuje přirozený přenos vlhkosti během zrání medu a negativně tak ovlivňuje odpařování vody, jenž je kvůli tomu pomalejší. U vzorků s parafínem byl zjištěn i vyšší obsah kyseliny octové a citrónové, což společně s vyšším obsahem vody negativně ovlivňuje chemické změny v medu, které směřují k fermentaci a následné biologické degradaci. (Svečnjak et al. 2019)

Med s názvem Manuka pocházející z Nového Zélandu je v posledních letech velice studovanou potravinou. Manuka med je komerčně známý novozélandský med z velké části z eukalyptů. (Spiteri et al. 2017) Vzhledem k jeho vysoce antibakteriálním účinkům se v průběhu let publikovaly studie o použití medu jako lokální antibiotikum nebo při léčbě žaludečních vředů způsobené bakterií *Helicobacter pylori*. (Oelschlaegel et al. 2012) Donarski se ve své studii z roku 2010 zaměřuje na sloučeninu methylglyoxal (MGO), která je možným faktorem zodpovědným za antibakteriální aktivitu Manuka medu. Využil metody LC-MS i LC-UV, ale především qNMR. Výhoda použité qNMR analýzy byla v přípravě vzorku zředěného medu bez chromatografické separace, derivatizace vzorku a kalibrace. Všechny metody vyšly s podobnými výsledky koncentrací (např. qNMR 444 mg/kg; LC-MS 468 ± 16 mg/kg, LC-UV 524 ± 16 mg/kg). Studie poprvé stanovila koncentraci methylglyoxalu v Manuka medu, aniž by bylo potřeba chromatografického oddělení látek nebo derivatizace vzorku. (Donarski et al. 2010)

Medům druhu Manuka se věnovali i ve studii Oelschlaegela 2012, kde byly poprvé zjištěny nové látky lumichrom, jenž je produktem rozkladu riboflavinu, kyselina kojová, která je produktem rozkladu sacharidů, kyselina 4-methoxyfenyloctová, kyselina 5-methyl-3-furankarboxylová a acetyl-2-hydroxy-4-(2-methoxyfenyl)-4-oxobutanát. (Oelschlaegel et al. 2012)

Výzkum Spiteriho 2017 byl zaměřený nejen na obsah sloučeniny MGO, ale i obsah dihydroxyacetonu (DHA) v Manuka medech, a byl zde nově kvantifikován marker nazývaný leptosperin. Při snaze rozlišit Manuka med od ostatních na základě jejich pylového profilu se vyskytly podobnosti v morfologii pylu, který byl téměř totožný s rostlinou rostoucí a kvetoucí ve stejných oblastech a ve stejný čas nazývaný se Kanuka. Tyto dva druhy však mají odlišné chemické složení nektaru, kde je potvrzeno, že Kanuka neobsahuje DHA, tudíž neobsahuje ani MGO. V rámci diferenciací Manuka medů od ostatních druhů je NMR analýza vysoce účinnou, rychlou a jednoduchou metodou, která zajišťuje přesnou kvantifikaci a identifikaci látek potřebných pro druhové rozlišení. (Spiteri et al. 2017)

3.8.1 Přehledová tabulka odborných studií

Na základě článků primární vědecké literatury byl sestaven přehled 20 studií zaměřujících se na autenticitu medu, rozlišování botanických druhů, možnost falšování a v neposlední řadě objevení nových biomarkerů pro lepší identifikaci jednotlivých druhů medu.

Tabulka č. 4 – Systematická tabulka studií rozlišující různé typy medů

Autor a rok studie	Počet vzorků	pH	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Beretta et al. 2008	44 komerčních italských medů ze 20 různých botanických zdrojů	2,5 pomocí 6N HCl	10 g medu zředěno 100 ml destilované vody, a látky jsou finálně získané za pomoci methanolu (20 ml), přidáno 600 μ L DMSO- d_6	Varian Mercury VX300 spektrometr nebo Bruker 500 vybavený 5 mm z-gradientovou inverzní širokopásmovou sondou, pulzní sekvence	kynurenová kyselina, cyklohexa-1,3-dienkarboxylová kyselina (CDCA) a CDCA-GBE	^1H NMR (300 MHz), HPLC-ESI-MS	PCA	Medovice - látky z rostlinné mízy, kaštanový med - kynurenová kyselina, lipový med - monoterpen - cyklohexa-1,3-dienkarboxylová kyselina (CDCA) a jeho ester CDCA-GBE
Donarski et al. 2008	182 vzorků medů z různých zemí (Rakousko 18, Francie 129, Německo 18, Irsko 2, Itálie 15)	N/A	50 g medu naředěno destilovanou vodou a zhomogenizováno. Přidáno 60 μ L roztoku azidu sodného a 60 μ L fosfátového pufrového roztoku (250 mM, pH 7,2 obsahující 10 mM TSP rozpuštěného v $2\text{H}_2\text{O}$)	Bruker Avance 500 MHz vybavený kryoprobuou TCI, centrální frekvence 500 MHz za použití rezonanční presaturace	glukosa, fruktosa	^1H NMR	techniky vícerozměrné analýzy, PLS, LDA, GP	První identifikace látky nazývané trigonellin - může poukazovat na zeměpisný původ (solná stanoviště) nebo růstové podmínky (suchá stanoviště, stres)

Autor a rok studie	Počet vzorků	pH	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Donarski et al. 2010	6 vzorků komerčních medů Manuka s faktory UMF (5-25) + 2 neaktivní medy	N/A	300 µL zfiltrovaného medového roztoku, 60 µL roztoku azidu sodného, fosfátový pufr (TSP, v 2H ₂ O) a ultračistá voda	Bruker Avance III 500 MHz vybavený 5 mm PABBI 1H/D-BB inverzní detekční sondou, při 300 K, potlačení vody, 65 K bodů, spektrální šířka 13,99 ppm, doba pořízení 4,67 s	methylglyoxal (MGO)	¹ H NMR	TopSpin 2.13	Přirozeně nízká koncentrace MGO u neaktivních medů, potvrzena přítomnost MGO v Manuka medu bez derivatizace a chromatografické separace
Boffo et al. 2012	46 vzorků medu	N/A	150 mg medu rozpuštěno ve 450 ml D ₂ O; 50 µL TMSP připravené v D ₂ O jako vnitřní referenční látka	Bruker DRX400 při 9,4 T vybavený 5 mm přímými a inverzními detekčními sondami, 400 MHz, potlačení vody, spektrální šířka 4664 Hz, 65 K datových bodů, relaxační zpoždění 1,5 s, doba pořízení 7s	sacharidy, aminokyseliny, organické kyseliny	¹ H NMR	PCA, HCA, KNN, SIMCA, PLS-DA, Software Topspin	Vícedruhové medy - vyšší koncentrace fenylalaninu, tyrosinu; citrusové medy - vyšší množství sacharosy; eukalyptové medy - vyšší množství kyseliny mléčné, falšované medy - presence HMF, kyseliny citronové a nepřítomnost signálů aminokyslin

Autor a rok studie	Počet vzorků	pH	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Schievano et al. 2012	353 chloroformových extraktů vybraných vzorků medu (75 akátů, 62 líp, 40 pomerančů, 32 eukalyptu, 60 kaštanů a 36 medovice)	po úpravě 2,5	6 g medu, ošetřeno 15 ml vody a 15 ml chloroformu. Po centrifugaci spodní chloroformová fáze odpařena pod mírným proudem dusíku. Pevný zbytek rozpuštěn v 600 µL CDCl ₃ . Chloroformové extrakty zpracovány roztokem acetonitril:voda (95:5).	600 MHz Bruker Avance, 64K bodů, spektrální šířka 14 ppm, relaxační doba 2 s při 298K s použitím modifikovaných pulzních sekvencí, ozvěn s dvojitým pulzním polem, celková doba pro každé spektrum 25 minut	γ-LACT-3PKA, dehydrovomifoliol, 8-hydroxylinalool, kofein, cyklohexa-1,3-dien-1-karboxylová kyselina, 4-(1-hydroxy-1-methyletenyl)cyklohexa-1,3-dienkarboxylová kyselina, diacylglycerylether, pinocembrin, chrysin	NMR, 2D NMR, MS	PCA, O2PLS-DA, SIMCA P+ 11.0	Kaštanový med - γ-LACT-3PKA; eukalyptus - norisoprenoid dehydrovomifoliol; pomeranč - 8-hydroxylinalool a kofein; lipový med - cyklohexa-1,3-dienových monoterpenů vzácný (pouze v lipovém medu, lipovém nektaru), glykosidický ester C1 v lipovém i kaštanovém nektaru; medovicový med - diacylglycerylether ve vyšší koncentraci; akátový med - pinocembrin a chrysin.
Oelschlaegel et al. 2012	40 vzorků medu (Manuka, medovice, kaštan, vřes, eukalyptus)	N/A	DMSO-d ₆ , methylglyoxal, TMS	Bruker Avance 600	organické kyseliny, MGO	¹ H NMR, ¹³ C NMR, UPLC-PDA-MS	Spearmanova korelace	Nové látky: kyselina kojová, kyselina 4-methoxyfenyloctová, kyselina 5-methyl-3-furankarboxylová, acetyl-2-hydroxy-4-(2-methoxyfenyl)-4-oxobutanát

Autor a rok studie	Počet vzorků	pH	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Simova et al. 2012	24 vzorků medu	N/A	100 mg medu rozpuštěno v 0,6 ml D ₂ O, vnitřní standard TSP	Bruker Avance AV600 II, spektrální šířka 10 ppm, na 32 K bodech, doba pořízení 2,73 s, relaxační zpoždění 10 s,	sacharidy, kvercitol	¹ H NMR, ¹³ C NMR, TOCSY	N/A	Kvercitol (5-deoxyinositol) ve 4 typech - potvrzená diferenciacie dubových medů
Ohmenhaeuser et al. 2013	328 vzorků různých druhů medu	pH upraveno na 4,5 pomocí H ₃ PO ₄ nebo KOH	200 mg bezvodého medu smíchání s 300 μL pufru (KH ₂ PO ₄ a azid sodný v 50 ml čistí vody), 700 μL destilované vody a 100 μL vnitřního standardu TSP, D ₂ O	Bruker Avance 400 Ultrashield vybavený 5 mm SEI sondou s cívkami s gradientem Z, Bruker Automatic Sample Changer (B-ACS 120); 300 K bez rotace vzorku, 65 K bodů, spektrální šířka 19,99 ppm, doba pořízení 4 s, potlačení vody pomocí NOESY-presaturace, pulzní sekvence	sacharidy, alifatické a aromatické uhlovodíky, aldehydy	¹ H a ¹³ C NMR	PCA, SIMCA, PLS-DA	Signály glukosy a fruktosy - klíčový faktor pro diferenciaci; kaštanový med - kynurenová kyselina, mravenčí kyselina, chinolinové alkaloidy; lipový med - nenasycené karboxylové kyseliny, medovicový med - kyselina jantarová

Autor a rok studie	Počet vzorků	pH	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Ribeiro et al. 2014	30 vzorků brazilských medů	mezi 3,10 - 4,70 (vyšší pH u delších dob relaxace)	Med smíchán se sirupem s vysokým obsahem fruktózy v poměru 0 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % a 100 % hmotnostních.	Bench-top NMR analyzátor s pracovní frekvencí 13 MHz; Relaxační čas T2 měřen CPMG pulzní sekvencí s 10 skeny, 256 bodů	vlhkost, pH, obsah popela, aktivita vody, barva	LF ¹ H NMR	ANOVA	Odlišení čistého květového medu od falšovaného kukuřičným sirupem s vysokým obsahem fruktózy
Popescu et al. 2015	38 vzorků rumunských medů (akát, slunečnice, řepka, lípa, vícedruhový) + 14 vzorků neznámého botanického původu	pH v rozmezí 3,5 - 4,5	70 m g medu v 700 μL D ₂ O	Bruker Avance III 400 MHz vybavený 5 mm sondou BBO, spektrální šířka 8224 Hz, 65 K bodů, relaxační zpoždění 1 s, doba pořízení 4 s	pH, el. vodivost, vlhkost, poměr fruktosa/glukosa, celkový obsah pevných látek, HMF	¹ H a ¹³ C NMR, HPLC	ANOVA, DA, AHC	Slunečnice a lípa - vysoké hodnoty el. vodivosti (400 a 550 μS/cm); akát - vysoký poměr fruktosa/glukosa; vzorky neznámého botanického původu - nižší kvalita, vysoký obsah HMF (15-130 mg/kg)

Autor a rok studie	Počet vzorků	pH	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Spiteri et al. 2015	816 vzorků medu	pH upraveno na 4,5 pomocí 85 % H ₃ PO ₄ ; 5 M NaOH; blokovací roztok 50 mg TSP v 50 ml D ₂ O	200 mg medu bez vlhkosti smícháno s 300 μL NMR pufru (KH ₂ PO ₄ , azid sodný, voda), 700 μL destilované vody a 100 μL NMR blokovacího roztoku.	Bruker Avance 400 Ultrashield vybavený 5 mm BBI sondou s cívkami s gradientem Z; autosampler SampleXPress; 64 skenů, 65 K bodů, spektrální šířka 20 ppm, doba pořízení 4,096 s; potlačení vody pomocí pulzní sekvence NOESY - presaturace, ICON - NMR	glukosa, fruktosa, sacharosa a 5-HMF	¹ H NMR	Software Topspin 3.1, ICA, JADE, PLS-DA	Kaštanový med - kynurenová kyselina; levandulový med - vyšší hladiny tyrosinu, fenylalaninu
Spiteri et al. 2016	56 vzorků medu (akát, pomeranč, levandule, eukalyptus)	pH upraveno na 4,5 (85 % H ₃ PO ₄)	Vzorky zředěny pomocí pufru (KH ₂ PO ₄ a azid sodný ve vodě, destilovaná voda a standard TSP v D ₂ O.	Bruker Avance 400 Ultrashield vybavený 5 mm BBI sondou s cívkami s gradientem Z; autosampler SampleXPress;	obsah vody, organické kyseliny	¹ H NMR, LC-HRMS, dva typy MS (Orbitrap-MS, TOF-MS)	PCA, PLS-DA, Matlab verze R2009a	Rozlišení botanických druhů medů, eukalyptus - deoxyinositol; spojení HRMS a NMR - model bez potřeby pylové analýzy

Autor a rok studie	Počet vzorků	pH	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Musharraf et al. 2016	27 vzorků medu	N/A	100 mg medu rozpuštěno ve 400 μ L D ₂ O a 100 μ L 0,1 % DSS, DSS jako vnitřní standard, D ₂ O.	Bruker 500 MHz vybavený kryogenně chlazenou 5 mm širokopásmovou oddělovací inverzní (PABBI) 1H sondou, 300 K, CPMG pulzní sekvence, 64 K bodů, spektrální šířka 10 ppm, relaxační zpoždění 4 s	monosacharidy, disacharidy (maltosa)	¹ H NMR, CCF	PCA, Software TopSpin 2.1	Odlišení za pomoci maltosy; většina vzorků podobná spektra v oblastech 0-5,3 ppm, odlišné v aromatické části (6,4-9,4 ppm), 2 vzorky potvrzené falšování z 22,3 % a 37,3 %
Del Campo et al. 2016	9 vzorků španělských medů (eukalyptus, vřes, levandule, pomeranč, tymián, rozmarýn)	pH upraveno na 1,0 pomocí 1,2M HCl	20 g medu smícháno s 15 ml vody, přidána HCl, obsah cukru snížen na 40,0 % hmotnostních, roztok přefiltrován přes 0,45 μ m nylonovou membránu; 10 % D ₂ O, TSP a kyselina 1,3,5 - benzentrikarboxylová (BTC).	Bruker Avance 500 MHz; 128 skenů, 64 K datových bodů, spektrální šířka 16 ppm, doba získání 4 s, potlačení vody pomocí 1D NOESY pulzní sekvence, presaturace	aminokyseliny, sacharidy, organické kyseliny, HMF	¹ H NMR	Software Topspin 3.1	Levandulový med - vysoká koncentrace prolinu; kvantifikace α - a β - glukopyranosy

Autor a rok studie	Počet vzorků	pH	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Spiteri et al. 2017	264 vzorků medu	pH upraveno na 4,5 pomocí 85 % H ₃ PO ₄ ; 5 M NaOH; blokovací roztok 50 mg TSP v 50 ml D ₂ O	200 mg medu bez vlhkosti smícháno s 300 µL NMR pufru (KH ₂ PO ₄ , azid sodný, voda), 700 µL destilované vody a 100 µL NMR blokovacího roztoku.	Bruker Avance 400 Ultrashield vybavený 5 mm BBI sondou s cívkami s gradientem Z; autosampler SampleXPress; 64 skenů, 65 K bodů, spektrální šířka 20 ppm, doba pořízení 4,096 s; potlačení vody pomocí pulzní sekvence NOESY - presaturace, ICON - NMR	DHA, MGO, leptosperin	¹ H NMR, chemometrie	Software Topspin 3.1, ICA, JADE, PLS-DA	Vysoké množství methylglyoxalu MGO a dihydroxyaceton DHA = manuka odlišná a lehce identifikovatelná od ostatních medů + nový marker leptosperin
Zuccato et al. 2017	78 vzorků ekvádorských medů	N/A	200 mg medu rozpuštěno v D ₂ O, roztok přenesen do 5 mm zkumavky NMR; chloroformové extrakty - 6 g rozpuštěno v 15 ml D ₂ O, přidáno 15 ml CDCl ₃ , směs míchána, odstředěna.	Bruker Avance DMX600, 599,90 MHz vybavený 5 mm TXI triple-gradient sondou	aminokyseliny, sacharidy	¹ H NMR	SIMCA-P+ 13, PCA, PLS-DA a OPLS-DA	Diacylglycerylether - marker medů <i>Apis mellifera</i>

Autor a rok studie	Počet vzorků	pH	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Karabagias et al. 2018	70 vzorků medu (borovice, jedle)	pH neměněno	Rozpuštěno 50 mg medu ve 400 µl D ₂ O obsahující standard.	Bruker Avance 300 Ultrashield vybavený 5 mm SEI sondou s cívkami a gradientem Z. Spektra získána při 300 K bez rotace vzorku. 64 skenů, potlačení vody dosaženo pulzní sekvencí NOESY-presaturace	sacharidy, volné aminokyseliny, organické kyseliny	¹ H NMR, HPLC	Software MultiSpec NMR, MANOVA - SPSSv.20,0 Software	Medovicové medy - nižší hodnoty monosacharidů a vyšší hodnoty rafinosa, maltotriosy, melezitosa. Borovice - vyšší obsah fruktosy (1,89 %), glukosy, turanosy; Jedle - vyšší obsah maltosy, rafinosy; Obsah sacharosy nižší než 5 g/100 g
Consonni et al. 2019	56 vzorků medu (19 akátů, 18 kaštanů, 19 vícedruhových) - 28 organických, 28 konvenčních	pH neměněno	Každý vzorek připraven dvakrát; 100 mg medu rozpuštěno v 600 µl deuterované vody.	Bruker Avance II 500, 11.7 T vybavené 5 mm reverzní z-gradientovou sondou, TOPSPIN 1.2, 128 skenů, přes 32 K dat, spektrální šířka 7500 Hz	glukosa, fruktosa, kynurát, organické kyseliny, HMF	¹ H NMR	SIMCA-P 13.03, PCA, PLS-DA, OSC	Vícedruhové medy - vyšší koncentrace fenylalaninu, tyrosinu; kaštanové medy - kynurát, formiát; akátový med - vyšší obsah uracilu; společné znaky všech - sukcinát, acetát

Autor a rok studie	Počet vzorků	pH	Příprava vzorku a kalibrace	NMR spektrometr	Kvantifikace	Analýza	Statistické metody, software	Výsledky
Schievano et al. 2019	62 vzorků akátového medu (Itálie, Maďarsko, Rumunsko, Srbsko, Čína)	pH upraveno na 4,4	240 g medu rozpuštěno v roztoku fosfátového pufru (KH ₂ PO ₄ v D ₂ O).	Bruker Avance III 500,13 MHz vybavený 5 mm z-gradientovou širokopásmovou inverzní sondou (BBI), 298,1 K, čas získání 1,3 s; 2 s relaxační zpoždění, 128 skenů, 6000 Hz spektrální šířka na 64 K bodech	sacharidy	CSSF-TOCSY NMR	ACD/Lab v.12.5, SIMCA P+ 13.0 package, PCA	Určen profil 20 sacharidů; nově detekovány sacharidy manosa, isomaltotriosa
Svečnjak et al. 2020	30 vzorků medu (15 PF-H (parafín), 15 BWF-H (vosk))	pH v rozmezí 3,7 - 4,7	600 mikroL vzorku do zkumavky se 100 µL roztoku D ₂ O. Využitá referenční látka TSP.	Bruker Avance III HD 400 MHz vybavený 5 mm BBI sondou se z-gradientem, 64 skenů, 64 K datových bodů, 300 K, spektrální šířka 20 ppm, doba zachycení 4 s, zpoždění 2 s (7 minut na vzorek), 1D pulzní sekvence, presaturace	sacharidy, organické kyseliny, aminokyseliny, HMF	¹ H NMR, FTIR-ATR, HS-SPME/GC-MS	Software TOPSPIN 3.5, PLS, Párový t-test, ANOVA	Obsah vody vyšší u medu dozrávající ve falšovaném vosku (FV) (13 z 15); poměr glukóza/voda výrazně nižší u FV, vyšší obsah kyseliny octové a citrónové u FV - vliv na chuť

4 Metodika

Na základě článků primární vědecké literatury byla vytvořena práce zabývající se využitím analytické metody NMR k detekci falšování a ověření autenticity medu a taktéž byl sestaven přehled studií zaměřující se na chemickou strukturu a identifikaci biomarkerů v medu. Hypotéza byla, že NMR je vhodnou metodou pro rutinní detekci falšování medů, tedy přidávání přísad (cukerných sirupů) nebo chybné uvádění botanického či geografického původu.

5 Závěr

V bakalářské práci byly shrnuty metody detekce, které jsou aplikovány na správnou identifikaci a kvantifikaci chemických sloučenin, jež jsou součástí medu.

Díky vědeckým studiím bylo potvrzeno, že metoda ^1H NMR je velmi vhodnou metodou pro určování a odlišování druhů medu a také velice jednoduchou a perspektivní metodou k ověření autentizace medu a k odhalení možných pokusů o falšování. Bylo zjištěno, že Manuka med obsahuje látky, které ho odlišují od ostatních botanických druhů a jejich lokality. Jedná se o látky methylglyoxal (MGO), dihydroxyaceton (DHA) a v neposlední řadě nově objevený biomarker leptosperin. Díky odlišnosti chemického složení medů, byly rozlišeny různé botanické druhy konkrétně kaštanový med (vyšší obsah kynurenové kyseliny), levandulový med (vyšší obsah tyrosinu, fenylalaninu a prolinu), borovicový med (vyšší obsah fruktosy 1,89 %, glukosy a turanosy) a medy z jedle (vyšší obsah maltosy a rafinosy). Falšování medu kukuřičným (fruktosovým) sirupem bylo díky ^1H NMR úspěšně odhaleno.

I přesto, že je stále využívanější metodou hmotnostní spektrometrie (MS), se NMR dostává výrazně do popředí a postupně se potvrzuje její jednoduchost, nenáročnost na přípravu, účinnost, přesnost a reprodukovatelnost.

6 Literatura

- Akitt JW, Mann BE. 2000. *NMR and Chemistry: An introduction to modern NMR spectroscopy*. Crc Press.
- Al-Waili N, Salom K, Al-Ghamdi AA. 2011. Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its use in clinical practice. *The scientific world journal* **11**:766–787. Hindawi.
- Alvarez-Suarez JM, Tulipani S, Romandini S, Bertoli E, Battino M. 2010. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* **3**:15–23. Springer.
- Balci M. 2005. *Basic ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopy*. Elsevier.
- Bansal S, Singh A, Mangal M, Mangal AK, Kumar S. 2017. Food adulteration: Sources, health risks, and detection methods. *Critical reviews in food science and nutrition* **57**:1174–1189. Taylor & Francis.
- Beretta G, Caneva E, Regazzoni L, Bakhtyari NG, Facino RM. 2008. A solid-phase extraction procedure coupled to ¹H NMR, with chemometric analysis, to seek reliable markers of the botanical origin of honey. *Analytica Chimica Acta* **620**:176–182. Elsevier.
- Bienefeld K. 2005. *Imkern Schritt für Schritt*. Franckh-Kosmos Verlags-GmbH & Co. KG, Stuttgart
- Bobková A, Židek R, Flimelová E, Bobko M, Fiková M. 2009. Application of PCR method for milk adulteration and milk products identification. *Potravinárstvo (Slovak Republic)*.
- Boffo EF, Tavares LA, Tobias ACT, Ferreira MMC, Ferreira AG. 2012. Identification of components of Brazilian honey by ¹H NMR and classification of its botanical origin by chemometric methods. *LWT* **49**:55–63. Elsevier.
- Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. 2008. Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American College of Nutrition* **27**:677–689. Taylor & Francis.
- Bouzembrak Y, Marvin HJP. 2016. Prediction of food fraud type using data from Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) and Bayesian network modelling. *Food Control* **61**:180–187. Elsevier.
- Buděšínský M, Pelnař J. 2000. *Fyzikálně-chemické metody (Nukleární magnetická rezonance)*. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha.
- Castro-Vázquez L, Díaz-Maroto MC, Pérez-Coello MS. 2007. Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. *Food Chemistry* **103**:601–606. Elsevier.
- Chen R, Chang L, Chung Y, Lee M, Ling Y. 2004. Quantification of cow milk adulteration in goat milk using high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **18**:1167–1171. Wiley Online Library.
- Consonni R, Bernareggi F, Cagliani LR. 2019. NMR-based metabolomic approach to differentiate organic and conventional Italian honey. *Food Control* **98**:133–140. Elsevier.

- Cordella C, Moussa I, Martel A-C, Sbirrazzuoli N, Lizzani-Cuvelier L. 2002. Recent developments in food characterization and adulteration detection: Technique-oriented perspectives. *Journal of agricultural and food chemistry* **50**:1751–1764. ACS Publications.
- Cotte J-F, Casabianca H, Lh eritier J, Perrucchietti C, Sanglar C, Waton H, Grenier-Loustalot M-F. 2007. Study and validity of ¹³C stable carbon isotopic ratio analysis by mass spectrometry and ²H site-specific natural isotopic fractionation by nuclear magnetic resonance isotopic measurements to characterize and control the authenticity of honey. *Analytica Chimica Acta* **582**:125–136. Elsevier.
-  esk y svaz v elařu. 1999. Svazov a norma  esk y med k vyhl ařce  . 76/2003 Sb., odd il 2 Med, kterou se stanov i pořadavky pro p irodn i sladidla, med, cukrovinky, kakaov y p ařek a sm esi kakaa s cukrem a  okol adov e bonbony. Norma jakosti  .  SV 1/1999.
- del Campo G, Zuriarrain J, Zuriarrain A, Berregi I. 2016. Quantitative determination of carboxylic acids, amino acids, carbohydrates, ethanol and hydroxymethylfurfural in honey by ¹H NMR. *Food chemistry* **196**:1031–1039. Elsevier.
- Dimins F, Kuka P, Kuka M, Cakste I. 2006. The criteria of honey quality and its changes during storage and thermal treatment. *Proceedings of the Latvia University of Agriculture*.
- Donarski JA, Jones SA, Charlton AJ. 2008. Application of cryoprobe ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis for the verification of Corsican honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**:5451–5456. ACS Publications.
- Donarski JA, Roberts DPT, Charlton AJ. 2010. Quantitative NMR spectroscopy for the rapid measurement of methylglyoxal in manuka honey. *Analytical Methods* **2**:1479–1483. Royal Society of Chemistry.
- Dunford C, Cooper R, Molan P, White R. 2000. The use of honey in wound management. *Nursing Standard (through 2013)* **15**:63-68. BMJ Publishing Group LTD.
- Ellis DI, Brewster VL, Dunn WB, Allwood JW, Golovanov AP, Goodacre R. 2012. Fingerprinting food: current technologies for the detection of food adulteration and contamination. *Chemical Society Reviews* **41**:5706–5727. Royal Society of Chemistry.
- ElMasry G, Morsy N, Al-Rejaie S, Ayed C, Linforth R, Fisk I. 2019. Real-time quality authentication of honey using atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry (APCI-MS). *International Journal of Food Science & Technology* **54**:2983–2997. Wiley Online Library.
- Emwas A-H, Roy R, McKay RT, Tenori L, Saccenti E, Gowda GA, Raftery D, Alahmari F, Jaremko L, Jaremko M. 2019. NMR spectroscopy for metabolomics research. *Metabolites* **9**. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- European Commission. 2020. RASFF – Food and Feed Safety Alerts. EC. Available from https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en (accessed 2020)
- Everstine K, Spink J, Kennedy S. 2013. Economically motivated adulteration (EMA) of food: common characteristics of EMA incidents. *Journal of food protection* **76**:723–735. International Association for Food Protection.

- FAO & WHO. 2020. Codex Alimentarius – International Food Standards. FAO & WHO. Available from <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/en/> (accessed February 2020)
- Günther H. 1995. NMR spectroscopy – basic principles, concepts, and applications in chemistry. John Wiley & Sons Ltd, England.
- Günther H. 2013. NMR spectroscopy: basic principles, concepts and applications in chemistry. John Wiley & Sons.
- Hanousek L. 1991. Začínáme včelařit. Praha
- Hoffman RE. 2006. Standardization of chemical shifts of TMS and solvent signals in NMR solvents. *Magnetic Resonance in Chemistry* **44**:606–616. Wiley Online Library.
- Jacobsen NE. 2007. NMR spectroscopy explained: simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology. John Wiley & Sons.
- Johnson R. 2014. Food fraud and „Economically motivated adulteration" of food and food ingredients. Strany 1–56 *Food Fraud and Adulterated Ingredients: Background, Issues, and Federal Action*. Nova Science Publishers, Inc.
- Karabagias IK, Vlasiou M, Kontakos S, Drouza C, Kontominas MG, Keramidas AD. 2018. Geographical discrimination of pine and fir honeys using multivariate analyses of major and minor honey components identified by ¹H NMR and HPLC along with physicochemical data. *European Food Research and Technology* **244**:1249–1259. Springer.
- Kružik V, Grégrová A, Čížková H. 2018. Laboratorní přístroje a postupy: Ověření metod stanovení přirozených a cizích amylas v medu. *Chemické listy* **112**: 777-783.
- Kuballa T, Brunner TS, Thongpanchang T, Walch SG, Lachenmeier DW. 2018. Application of NMR for authentication of honey, beer and spices. *Current opinion in food science* **19**:57–62. Elsevier.
- Lichtenberg-Kraag B, Hedtke C, Bienefeld K. 2002. Infrared spectroscopy in routine quality analysis of honey. *Apidologie* **33**:327–337. EDP Sciences.
- Manning L, Soon JM. 2016. Food safety, food fraud, and food defense: a fast evolving literature. *Journal of food science* **81**:R823–R834. Wiley Online Library.
- Manyi-Loh CE, Clarke AM, Ndip RN. 2011. An overview of honey: Therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. *African Journal of Microbiology Research* **5**:844–852.
- Markley JL, Brüschweiler R, Edison AS, Eghbalnia HR, Powers R, Raftery D, Wishart DS. 2017. The future of NMR-based metabolomics. *Current opinion in biotechnology* **43**:34–40. Elsevier.
- Martin D, Martin B. 2013. Column chromatography. BoD–Books on Demand.
- Ministerstvo zemědělství. 2004. Vyhláška 76/2003 Sb., která stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem a čokoládové bonbony. Page 2471 in *Sbírka zákonů České republiky, 2003, částka 32*. Česká republika

- Ministerstvo zemědělství. 2014. Zpráva o činnosti Systému rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2013. Ministerstvo zemědělství, Odbor bezpečnosti potravin, Praha. Available from http://eagri.cz/public/web/file/327942/RASFF_2013_final_web.pdf (accessed July 2014)
- Ministerstvo zemědělství. 2019. Zpráva o činnosti Systému rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF) v České republice za rok 2018. Ministerstvo zemědělství, Odbor bezpečnosti potravin, Praha. Available from <https://www.svsr.cz/wp-content/files/zivocisne-produkty/RASFF-2018.pdf> (accessed April 2019)
- Mishra J. 2019. Recent trends in food adulteration, misbranding and related regulations. *Journal of the Gujarat Research Society* **21**:716–723.
- Musharraf SG, Fatima SA, Siddiqui AJ, Choudhary MI. 2016. ¹H-NMR fingerprinting of brown rice syrup as a common adulterant in honey. *Analytical Methods* **8**:6444–6451. Royal Society of Chemistry.
- Naumann D, Helm D, Labischinski H. 1991. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* **351**:81–82.
- Ngo-Thi NA, Kirschner C, Naumann D. 2003. Characterization and identification of microorganisms by FT-IR microspectrometry. *Journal of Molecular Structure* **661**:371–380. Elsevier.
- Nisbet C, Guler A, Ciftci G, Yarim GF. 2009. The investigation of protein profile of different botanic origin honey and density saccharose-adulterated honey by SDS-PAGE method. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* **15**:443–446.
- Oelschlaegel S, Gruner M, Wang P-N, Boettcher A, Koelling-Speer I, Speer K. 2012. Classification and characterization of manuka honeys based on phenolic compounds and methylglyoxal. *Journal of agricultural and food chemistry* **60**:7229–7237. ACS Publications.
- Ohmenhaeuser M, Monakhova YB, Kuballa T, Lachenmeier DW. 2013. Qualitative and quantitative control of honeys using NMR spectroscopy and chemometrics. *ISRN Analytical Chemistry* **2013**. Hindawi.
- Popa I, Novotná R. 2012. *Základy NMR spektroskopie*. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Olomouc.
- Popescu R, Geana EI, Dinca OR, Sandru C, Costinel D, Ionete RE. 2016. Characterization of the quality and floral origin of Romanian honey. *Analytical Letters* **49**:411–422. Taylor & Francis.
- Puscas A, Hosu A, Cimpoiu C. 2013. Application of a newly developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method to control honey adulteration. *Journal of Chromatography A* **1272**:132–135. Elsevier.
- Ralli E, Amargianitaki M, Manolopoulou E, Misiak M, Markakis G, Tachtalidou S, Kolesnikova A, Dais P, Spyros A. 2018. NMR Spectroscopy Protocols for Food Metabolomics Applications. Strany 203–211 *Metabolic Profiling*. Springer.

- Ribeiro R de OR, Mársico ET, da Silva Carneiro C, Monteiro MLG, Júnior CC, de Jesus EFO. 2014. Detection of honey adulteration of high fructose corn syrup by Low Field Nuclear Magnetic Resonance (LF 1H NMR). *Journal of Food Engineering* **135**:39–43. Elsevier.
- Roussel S, Bellon-Maurel V, Roger J-M, Grenier P. 2003. Authenticating white grape must variety with classification models based on aroma sensors, FT-IR and UV spectrometry. *Journal of Food Engineering* **60**:407–419. Elsevier.
- Schievano E, Sbrizza M, Zuccato V, Piana L, Tessari M. 2020. NMR carbohydrate profile in tracing acacia honey authenticity. *Food chemistry* **309**. Elsevier.
- Schievano E, Stocchero M, Morelato E, Facchin C, Mammi S. 2012. An NMR-based metabolomic approach to identify the botanical origin of honey. *Metabolomics* **8**:679–690. Springer.
- Sheorey RR, Tiwari A. 2011. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of herbal materials and medicines—A review. NISCAIR-CSIR, India.
- Simova S, Atanassov A, Shishiniova M, Bankova V. 2012. A rapid differentiation between oak honeydew honey and nectar and other honeydew honeys by NMR spectroscopy. *Food Chemistry* **134**:1706–1710. Elsevier.
- Spink J, Moyer DC. 2011. Defining the public health threat of food fraud. *Journal of food science* **76**:R157–R163. Wiley Online Library.
- Spiteri M, Dubin E, Cotton J, Poirel M, Corman B, Jamin E, Lees M, Rutledge D. 2016. Data fusion between high resolution 1 H-NMR and mass spectrometry: a synergetic approach to honey botanical origin characterization. *Analytical and bioanalytical chemistry* **408**:4389–4401. Springer.
- Spiteri M, Jamin E, Thomas F, Rebours A, Lees M, Rogers KM, Rutledge DN. 2015. Fast and global authenticity screening of honey using 1H-NMR profiling. *Food chemistry* **189**:60–66. Elsevier.
- Spiteri M, Rogers KM, Jamin E, Thomas F, Guyader S, Lees M, Rutledge DN. 2017. Combination of 1H NMR and chemometrics to discriminate manuka honey from other floral honey types from Oceania. *Food chemistry* **217**:766–772. Elsevier.
- Suková I. 2012. Med: druhy, vlastnosti, označování. Informační centrum bezpečnosti potravin. Available from <https://www.bezpecnostpotravin.cz/med-druhy-vlastnosti-oznacovani.aspx> (accessed May 2012)
- Svečnjak L, Jović O, Prđun S, Rogina J, Marijanović Z, Car J, Matošević M, Jerković I. 2019. Influence of beeswax adulteration with paraffin on the composition and quality of honey determined by physico-chemical analyses, 1H NMR, FTIR-ATR and HS-SPME/GC–MS. *Food chemistry* **291**:187–198. Elsevier.
- SVS. 2020. Stahování medu obsahující zakázané léčivo. Státní veterinární správa. Available from <https://www.bezpecnostpotravin.cz/stahovani-medu-obsahujiciho-zakazane-lecivo.aspx> (accessed January 2020)

- Swellam T, Miyanaga N, Onozawa M, Hattori K, Kawai K, Shimazui T, Akaza H. 2003. Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: in vivo and in vitro studies. *International journal of urology* **10**:213–219. Wiley Online Library.
- SZPI. 2015. Prezentace SZPI v Poslanecké sněmovně Parlamentu ČR: Falšování potravin – aktuální problém?. SZPI. Available from <https://www.szpi.gov.cz/clanek/prezentace-szpi-v-poslanecke-snemovne-parlamentu-cr-falsovani-potravin-aktualni-problem.aspx> (accessed April 2015)
- SZPI. 2020. Kontrolní činnost SZPI. SZPI. Available from <https://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1002118> (accessed January 2020)
- Thi NAN, Kirschner C, Naumann D. 2000. FT-IR microspectrometry: a new tool for characterizing micro-organisms. Strany 36–44 *Biomedical spectroscopy: vibrational spectroscopy and other novel techniques*. International Society for Optics and Photonics.
- Wishart DS, Bigam CG, Yao J, Abildgaard F, Dyson HJ, Oldfield E, Markley JL, Sykes BD. 1995. ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *Journal of biomolecular NMR* **6**:135–140. Springer.
- Zuccato V, Finotello C, Menegazzo I, Peccolo G, Schievano E. 2017. Entomological authentication of stingless bee honey by ¹H NMR-based metabolomics approach. *Food Control* **82**:145–153. Elsevier.