VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STANOVENÍ HYDROXYMETHYLFURFURALU V MEDU

DETERMINATION OF HYDROXYMETHYLFURFURAL IN HONEY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE — Barbora Dohnalová
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE — doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.
SUPERVISOR

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce:	FCH-BAK1684/2020	Akademický rok:	2020/21
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií		
Studentka:	**Barbora Dohnalová**		
Studijní program:	Chemie a technologie potravin		
Studijní obor:	Potravinářská chemie		
Vedoucí práce:	**doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.**		

Název bakalářské práce:

Stanovení hydroxymethylfurfuralu v medu

Zadání bakalářské práce:

1. Zpracování literární rešerše k tématu BP
2. Ověření přípravy vzorku k analýze
3. Validace metody HPLC pro analýzu hydroxymethylfurfuralu v medu

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Barbora Dohnalová student(ka)	doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D. vedoucí práce	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc. vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Med je cenná potravina přírodního charakteru, která může být předmětem falšování za účelem vyššího zisku. Jednou metodou při odhalování tohoto falšování může být stanovení hydroxymethylfurfuralu, jehož vznik je podpořen zahříváním. Teoretická část práce se zabývá druhy medu, jejich vznikem a možnostmi jejich falšování. Dále je popsán HMF, jeho výskyt, využití a metody pro jeho stanovení. Praktická část je věnována popisu experimentu jako je příprava vzorků, jejich měření a vyhodnocení. Při stanovení HMF v medu byla využita metoda HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie), kterou lze stanovit i velmi nízké koncentrace. Vzorků pro experiment bylo pět, z toho čtyři přímo od včelaře a jeden z obchodního řetězce. Všechny vzorky mezi sebou byly porovnány z hlediska obsahu HMF. Největší koncentrace HMF byla stanovena ve vzorku komerčně dostupného medu. V medech od včelaře se obsah HMF se stářím medu zvyšoval. Obsah HMF ve všech medech odpovídal Vyhlášce č. 76/2003 Sb.

KLÍČOVÁ SLOVA

Med, hydroxymethylfurfural, HPLC

ABSTRACT

Honey is a valuable food of a natural nature that can be subject to adulteration for higher profits. One method of detecting this adulteration may be to determine hydroxymethylfurfural, the formation of which is promoted by heating. The theoretical part of the thesis deals with the types of honey, their origin, and the possibilities of their falsification. HMF, its occurrence and use and methods for its determination are also described. The practical part is devoted to the description of the experiment such as sample preparation, measurement and evaluation. The HPLC (high performance liquid chromatography) method was used to determine HMF in honey, which can be used to determine even very low concentrations. There were five samples for the experiment, four of them directly from the beekeeper and one from the retail chain. All samples were compared for HMF content. The highest concentration of HMF was determined in a sample of commercially available honey. In domestic honeys, the HMF content increased with the age of the honey. The content of HMF in all honeys complied with Decree No. 76/2003 Coll.

KEY WORDS

Honey, hydroxymethylfurfural, HPLC

BIBLIOGRAFICKÁ CITACE PRÁCE

DOHNALOVÁ, Barbora. *Stanovení hydroxymethylfurfuralu v medu.* Brno, 2021. Dostupné také z: https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131705. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Pavel Diviš.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Stanovení hydroxymethylfurfuralu v medu vypracovala samostatně s použitím odborné literatury a pramenů, uvedených v seznamu, který tvoří přílohu této práce.

Datum	Jméno a příjmení

PODĚKOVÁNÍ

Tímto děkuji doc. Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D. a Ing. Lence Punčochářové za jejich čas a cenné rady, které mi poskytli.

OBSAH

1 Úvod ... 8
2 Teoretická část ... 9
2.1 Med ... 9
2.1.1 Vznik medu ... 9
2.1.2 Druhy medu ... 10
2.1.3 Složení a vlastnosti medu ... 11
2.1.4 Krystalizace medu ... 13
2.1.5 Vady a falšování medu ... 14
2.2 Hydroxymethylfurfural ... 15
2.2.1 Vlastnosti ... 15
2.2.2 Syntéza hydroxymethylfurfuralu ... 15
2.2.3 Využití hydroxymethylfurfuralu ... 16
2.2.4 Hydroxymethylfurfural v medu ... 17
2.3 Analytické metody pro stanovení HMF v medu ... 18
2.3.1 Chromatografie ... 18
2.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ... 18
2.4 Základní validační parametry metody ... 21
3 Experimentální část ... 22
3.1 Seznam chemikálií ... 22
3.2 Seznam použitých laboratorních pomůcek a přístrojů ... 22
3.3 Charakterizace analyzovaných vzorků medu a jejich úprava ... 22
3.4 Příprava kalibračních roztoků ... 23
3.5 Příprava roztoků pro stanovení limitů detekce a kvantifikace ... 23
3.6 Příprava roztoků pro stanovení přesnosti metody (recovery) ... 23
3.7 Metoda pro stanovení HMF v medu pomocí HPLC-DAD ... 23
4 Výsledky a diskuse ... 24
4.1 Optimalizace a validace metody ... 24
4.2 Úprava vzorků medu čiřením pomocí Carrerových roztoků ... 25
4.3 Stanovení HMF ve vzorcích medu ... 26
5 Závěr ... 28
6 Seznam použité literatury ... 29
7 Seznam použitých zkratek ... 32
8 Seznam obrázků ... 33
9 Seznam tabulek ... 34

1 ÚVOD

Med je sladká viskózní látka, která je lehce stravitelná a energeticky bohatá. Med je složený převážně ze sacharidů glukózy a fruktózy. Mimo to také obsahuje velké množství jiných nutričně hodnotných látek jako jsou organické kyseliny, enzymy a další. Med se v potravě konzumuje ve své nativní formě. Je oblíbený pro své rekonvalescentní účinky, je všeobecně využíván pro podporu organismu, v potravinářství je využíván jako přírodní sladidlo [1].

Mimo nutričně hodnotné látky obsahuje med také 5-hydroxymethylfurfural (HMF), který v něm vzniká Maillardovou reakcí mezi cukry. Tato reakce probíhá i za běžných podmínek, avšak pomalu. Proto se předpokládá, že čím je med starší, tím více HMF bude obsahovat. Reakci mezi cukry lze urychlit zahříváním, které způsobí vyšší koncentrace HMF v medu. Vzhledem k tomu, že zahřívání medu za účelem zlepšení jeho vlastností je podle platné legislativy zakázáno, sledují koncentraci HMF v medu příslušné kontrolní orgány (například Státní zemědělská a potravinářská inspekce).

Nejčastěji využívanou metodou pro stanovení HMF v medu je vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Pro zlepšení citlivosti metody se často vzorek medu ještě upravuje, nejčastěji se odstraňují bílkoviny a barevné látky pomocí čiření.

Cílem této bakalářské práce bylo vytvořit metodu vhodnou pro stanovení HMF v medu a ověřit účinnost úpravy vzorku medu pomocí čiření před analýzou na vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Vytvořená metoda byla následně použita pro analýzu vzorků medu zakoupených přímo od včelaře a v obchodní síti ČR.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Med

Podle mezinárodního standardu pro medové výrobky, jako je Codex Alimentarius (CA, 2010) a Evropské společenství (EU) (Rada EU, 2002), je med definován jako „přírodní sladká látka, kterou produkují včely medonosné z nektaru rostlin, ze sekrece živých částí rostlin nebo ze sekretů vylučovaných hmyzem sajícího rostliny z živých částí rostlin, které včely shromažďují, transformují kombinací s vlastními specifickými látkami, ukládají, dehydratují, skladují a nechávají ve včelích plástech zrát“ [2].

Med je sladká, viskózní lepkavá látka s vysokou energetickou hodnotou. Má význam v lidské potravě, kde nachází uplatnění jako doplněk stravy s antioxidačními účinky a vysokým obsahem cukru. Pozitivně působí na střevní peristaltiku, může být součástí stravy u lidí po těžkých operacích a je vhodným doplňkem energie pro sportovce[1].

Med patří mezi základní včelí produkty spolu s voskem, pylem, propolisem, mateří kašičkou a včelím jedem. Také bývá zařazován do kategorie tzv. superpotravin. Bývají tak označovány přírodní látky s vysokým nutričním obsahem příznivě ovlivňující lidské zdraví. Med je zároveň jednou z potravin obsahující všechny látky potřebné k udržení života včetně vitaminů, minerálů, vody a enzymů[3].

2.1.1 Vznik medu

Med vzniká ve včelstvu přeměnou nektaru nebo medovice. Samotný vznik medu je složitý proces. Včely ho vytvářejí jako vlastní zásobu na přezimování.

Nektar donese do úlu v medovém váčku včela létavka, která ho uloží do plástu nebo předá přímo úlovým včelám. Tyto včely opakovaně nasávají nektar a vrací ho do plástu, tím se odpařuje voda a jsou dodávány potřebné enzymy. Když má nektar kolem 30 % vody, je uložen do buňky plástu. V plástu se voda z tekutiny dále odpařuje díky udržování vhodných podmínek ve včelstvu. Včely dovedou odpařit vodu až na pouhých 17 %. Při tomto obsahu vody včely med zavíčkují voskovými víčky, kde zrání medu ještě nějakou dobu pokračuje [4].

Výše zmíněná medovice je míza rostlinného pletiva, kterou vyměšují mšice a červi. Tyto organismy nabodávají rostlinné pletivo, aby z něj získaly bílkoviny. Přebytečný nasládlý roztok poté rozstřikují do okolí, včely ho sbírají a přetvářejí na med stejným způsobem jako nektar [4].

2.1.2 Druhy medu

Med můžeme dělit podle několika kritérií. Jednak podle typu sbírané tekutiny včelami, podle rostlinného původu, technologického zpracování apod. Prvním zmíněným faktorem je, zda včely sbíraly nektar nebo medovici. Poté se med dělí na květový nebo medovicový. Tyto medy jsou od sebe těžko rozlišitelné, protože není snadné určit, ze které rostliny včely med sbírají. Proto se u těchto medů často orientujeme podle jejich barvy. Světlejší medy jsou květové, čím je med tmavší, tím více medovice obsahuje [4].

Obr. 1: Vlevo med květový, vpravo med medovicový [5]

Dále se med může dělit podle toho, ve kterém období byl vytočený, a tudíž jaká rostlina právě kvetla. Podle tohoto dělení můžeme mít medů celou řadu například řepkový, akátový, javorový, meruňkový a další. Včely postupně v úlu vytvářejí zásoby medu z pylu různých rostlin, které neukládají odděleně. Proto jsou nejčastější medy vícedruhové, kde tento med vzniká z mnoha druhů rostlin. Jednodruhové medy jsou spíše vzácné [4].

Další dělení medů je podle způsobu získávání medu včelařem a to na vytáčený a lisovaný med. V dnešní době se lisování medu spíše nepraktikuje, protože kvalita takového medu se může značně lišit podle aktuálního složení látek v lisu [4].

Med se liší i podle jeho získávání či finálního charakteru. Prvním je med plástečkový, který je unikátní v tom, že se nevytáčí. Med se prodává přímo ve voskovém plástu. Existuje také med s plástečky. Jedná se o klasický tekutý med, který obsahuje kus medového plástu. Dále je med pastovaný, který je speciálně upravený na netuhnoucí jemně krystalickou strukturu. Při získávání medu z ekologicky fungujícího hospodářství může být med označován jako bio. Takové označení včelař získává při dodržování zásad pro ekologické hospodářství popsané zákonem č. 242/2000 Sb. o ekologickém zemědělství. Trendem poslední doby je med panenský. Jedná se o med, který je vytočený z panenských plástů, což jsou plásty, ve kterých nebyla ještě odchována ani jedna generace plodu [1; 4].

Obr. 2: Plástečkový med [6]

Obr. 3: Pastovaný med [7]

Podle vyhlášky č. 76/2003 Sb. by na etiketě medu mělo být označení jeho původu, způsob získávání a úpravy. V přídě, že se jedná o med vytočený, údaje o způsobu získávání a úpravy nejsou nutné uvádět. Pokud se jedná o med filtrovaný nebo pekařský, musí být označen jako „filtrovaný“ nebo „pekařský“.

Na etiketách medu bývají často i matoucí údaje, jako je například med získávaný za studena. V dnešní době se žádný med nezískává roztavením plástů, protože by nevyhovoval normě o vyšším obsahu hydroxymethylfurfuralu, tudíž je každý med získávaný za studena. Dalším nepřesným údajem může být med s přívlastkem pasterizovaný. Pasterizace je ohřátí na vyšší teplotu, která má usmrtit nežádoucí mikroorganismy. Med je pro mikroorganismy prostředí nevhodné, proto není potřeba pasterizaci provádět [4].

2.1.3 Složení a vlastnosti medu

Většinu látek obsažených v medu tvoří sacharidy. Obecně se jedná o polyhydroxysloučeniny, které obsahují v molekule karbonylovou skupinu (ketonovou nebo aldehydovou). Jsou přítomny ve všech organismech, kde plní mnoho významných funkcí [8]. Sacharidy v medu jsou převážně jednoduché cukry. Nejvíce zastoupené jednoduché cukry jsou glukóza a fruktóza, které tvoří více než 80 % hmotnosti medu. Tyto cukry se v každém medu vyskytují v určitých charakteristických poměrech, které jsou pro každý med odlišné, a mají vliv na rychlost krystalizace medu. Pokud med obsahuje více fruktózy, jeho krystalizace je pomalejší. Naopak pokud obsahuje větší množství glukózy, tak tuhne rychleji. Sacharidy tvořené dvěma, třemi i více základními jednotkami jsou v medu obsaženy pouze v malém množství. Například obsah disacharidu sacharózy je ve většině medů kolem 1 %, přičemž „Svazová norma ČESKÝ MED“ připouští až 5 %. „Svazová norma ČESKÝ MED“ je norma jakosti vydaná Českým svazem včelařů v souladu s Vyhláškou č. 76/2003 Sb. Oligosacharidy a dextriny jsou v medu obsaženy minoritně. Jejich přítomnost dokazuje přirozený původ medu. Jakékoliv vyšší sacharidy se vyskytují v komerčních produktech napodobujících med. Tyto produkty vznikají mísením medu s levnými sirupy [4].

Další složku v medu tvoří voda. Její zastoupení v medu je mezi 14 až 19 %. Takto malé množství vody je nepříznivým prostředím pro mikroorganismy, proto je med poměrně stabilní a nekazící se potravina. Medy s vyšším obsahem vody jsou náchylné ke kvašení. Obsah vody je také jedním z kritérií kvality medu a stanovuje se refraktometricky. Evropská legislativa stanovuje maximální obsah vody na 19 % [1].

Med obsahuje velké množství organických sloučenin, z nichž nejvýznamnější jsou aromatické látky. Ty poskytují medu jeho charakteristickou chuť a vůni [4; 9]. Některé z těchto organických kyselin můžeme řadit mezi antioxidanty. Přirozený obsah kyselin v medu je 0,3 g na kilogram medu. Pokud je med nezralý a kvasí, tak se zvyšuje obsah kyselin.

Proto je legislativně určené nejvyšší možné množství kyselin 0,5 g na kilogram medu [4]. Nejdůležitější kyselinou v medu je kyselina glukonová, která vzniká z glukózy enzymatickou oxidací. V medu je nejčastěji ve formě laktonu, který tvoří asi třetinu celkové kyselosti. Další kyseliny vyskytující se v medu jsou kyselina citrónová, jablečná a jantarová, v minoritním množství pak kyselina octová, mravenčí, máselná, mléčná a šťavelová [1].

Nedílnou složkou medu jsou také dusíkaté látky. Hmotnostní podíl těchto látek není velký, ale i přesto mají biologický význam, neboť je většina z nich biochemicky aktivních. Například enzymy, které slouží jako biokatalyzátory metabolických reakcí v organismu. Podle aktivity enzymů se posuzuje i kvalita medu. Významným enzymem je invertáza, která štěpí sacharózu na glukózu a fruktózu. Také je schopna vytvářet z jednoduchých cukrů složené cukry tzv. oligosacharidy, k čemuž využívá glukózu. Dalším významným enzymem je diastáza, která je schopna štěpit škrob. Oba výše zmíněné enzymy pochází hlavně z hltanových žláz včel. Důležitými dusíkatými látkami jsou také aminokyseliny, podle kterých je možné určit geografický původ medu. Nejvýznamnější aminokyselinou je prolin a další volné aminokyseliny se v medu vyskytují v závislosti na rostlinném původu. Na aminokyseliny jsou nejbohatší medy smíšené [1; 4].

Med také obsahuje minerální látky rostlinného původu, z nichž některé jsou biogenní prvky. Největší zastoupení má draslík, po něm následují sodík, vápník, síra, hořčík a fosfor. Nejmenší zastoupení mají železo, měď a zinek [4].

V medu jsou také vitaminy, největší podíl tvoří vitaminy skupiny B, zejména B3 (kyselina nikotinová, niacin) a B5 (kyselina pantothenová), v menším množství jsou poté zastoupeny vitaminy B1 (thiamin), B2 (riboflavin) a B6 (pyridoxin). Vitaminy jsou důležité pro metabolismus, neboť slouží jako biokatalyzátory. Jedná se o látky esenciální, to jsou takové, které nejsou v těle samy syntetizovány, ale je nezbytné je suplementovat v potravě [4].

Lipidy řadíme mezi přírodní látky, které jsou omezeně rozpustné ve vodě a dobře rozpustné v organických rozpouštědlech. Obecně jsou to estery mastných kyselin s příslušným alkoholem. Představují jednu z hlavních zásobáren chemické energie živočišných organismů a mnohých rostlinných semen [10]. Obsah látek tukové povahy je v medu zastoupen minimálně, pouze asi 150 mg na 1 kg medu. Nejvíce se zde nacházejí mastné kyseliny, triglyceridy a steroly. Tyto látky se do medu pravděpodobně dostávají z mateří kašičky a jiných žlázových produktů mladých včel, které med zpracovávají [4].

Med obsahuje stopová množství aromatických látek, kterých bylo v medu identifikováno více než 150 druhů. Vytvářejí typickou chuť a vůni. Tyto látky mají také důležitý význam ve výživě včel a člověka [4].

Antioxidanty jsou látky neutralizující účinek volných radikálů, které vznikají v těle jako vedlejší produkty buněčného metabolismu. Volné radikály se podílejí na vzniku zhoubných nádorů, mohou být příčinou řady onemocnění a také přispívají k těžšímu průběhu chorob jako jsou například cukrovka, revmatická artritida nebo Alzheimerova choroba. V boji proti volným radikálům imunitnímu systému pomáhají antioxidanty, které spolu pracují synergicky. V medu patří k nejvýznamnějším organické kyseliny a jejich estery a látky ze skupin flavonoidů a flavanonů. Množství antioxidantů v medu není tak velké jako třeba v zelenině, ale je srovnatelné například s červeným vínem. Spektrum antioxidantů je důležitější než jejich množství, protože jejich kombinací se účinek umocňuje. Pestřejší složení těchto látek mají medy smíšené, které pochází z více druhů rostlin [4].

Barva medu je charakteristická pro každý med a odvíjí se od mnoha faktorů například geografický původ, způsob zpracování nebo i délka skladování. V medu můžeme nalézt barviva přidaná včelami během zpracování, rostlinná barviva nebo barviva vzniklá během skladování

a zpracování [1]. Během skladování probíhá Maillardova reakce, která zapříčiňuje tmavnutí medu [11]. Rostlinná barviva, která ovlivňují barvu medu, jsou flavonoidy, karotenoidy, xantofyly, chlorofyly a antokyany [1]. Med může mít mnoho různých barev, nejčastější jsou odstíny žluté a hnědé, najdeme však i červenohnědé medy (některé lesní medy), oranžové (medy ze slunečnice) nebo zelené (jedlová medovice). Nejsvětlejším medem je med akátový, který je téměř vodojasný, s nádechem do žlutozelena. Světlý je i med řepkový, který po několika dnech krystalizuje na bílou hmotu. Naopak tmavé medy jsou pohankové nebo med z jedlého kaštanu. Nejtmavší jsou medy medovicové, tedy lesní, zpravidla ze smrku, dubu nebo jedle[4].

Tab. 1: Složení medu v g na 100 g medu [4]

Složka	Květový med		Medovicový med	
	průměr	min – max	průměr	min – max
Voda	17,2	15–20	16,3	15–20
Fruktóza	38,2	30–45	31,8	28–40
Glukóza	31,3	24–40	26,1	19–32
Sacharóza	0,7	0,1–4,7	0,5	0,1–4,7
Minerální látky	0,2	0,2–0,5	0,9	0,6–2,0
Aminokyseliny, proteiny	0,3	0,2–0,4	0,6	0,4–0,7
Organické kyseliny	0,5	0,2–0,8	1,1	0,8–1,5

2.1.4 Krystalizace medu

Krystalizace je přirozený proces, který se v medu děje v důsledku vysokého obsahu sušiny, převážně cukrů, a nízkého obsahu vody. Krystalizační proces má dvě fáze, kde první je nukleace. V této fázi se v medu vytváří, nebo jsou do medu vpravena vytáčením, krystalizační jádra. Druhou fází je pak samotná krystalizace, kdy se na tyto jádra nabalují větší a větší krystaly až vznikají útvary viditelné okem [1].

Rychlost krystalizace je závislá na poměru dvou hlavních cukrů vyskytujících se v medu, glukózy a fruktózy. Rychleji krystalizují medy s vyšším obsahem glukózy, jelikož glukóza je méně rozpustná ve vodě, a pylových zrnech, která slouží jako krystalizační jádra. Medy obsahující více fruktózy krystalizují pomaleji, protože fruktóza zpomaluje samotnou krystalizaci glukózy [1; 4].

Každý med by nakonec měl zkrystalizovat. Pokud k tomu nedojde, můžeme se domnívat, že bylo s medem špatně zacházeno. Například mohl být med vystaven velmi vysokým teplotám nebo filtrován, kde byla odstraněna všechna krystalizační jádra. V nejhorším případě mohly být do medu přidány látky potlačující krystalizaci [12].

2.1.5 Vady a falšování medu

Za účelem vyššího zisku se objevují různé praktiky falšování medu. První z nich může být krmení včel cukerným roztokem, který včely zpracují a zahustí. Po vytočení se získává produkt podobný medu, ale med to není. Je to praktika nevýhodná, protože včely při zpracování část cukerného roztoku spotřebují. Na světě jsou i falšovatelé s potřebnou technikou a znalostmi pro to, aby vytvořili med, který se včelami vůbec nepřišel do styku. Při koupi takového výrobku sice není ohroženo zdraví spotřebovatele, ale místo medu s mnoha pozitivními účinky si zákazník koupí náhražku na bázi sacharózy nebo škrobu. S úplnou náhražkou medu se můžeme setkat například na trhu v podobě pampeliškového medu. Nejedná se o med, ale o hustý sirup svařený s květy pampelišek. Protože spotřebitelé dávají větší přednost medům tekutým, výrobci se snaží o to, aby med zůstal tekutý co nejdéle. Řešením jsou dlouhé zahřívání, filtrace s hustými síty – k odstranění krystalů a zárodků pro krystalizaci – nebo dokonce přidávání čisté fruktózy přímo do medu. Velká poptávka o tmavé medy vede falšovatele k pokusům o barvení medů karamelem nebo potravinářskými barvivy.

Nejběžnější vadou medu je vysoký obsah hydroxymethylfurfuralu. Ten sice není zdraví škodlivý, ale jeho vysoký obsah svědčí o nešetrném zahřívání nebo nevhodném skladování s velkými výkyvy teplot. Takový med má potom méně zdraví prospěšných látek. Další vadou medu je přítomnost spor bakterií. Ty se do medu dostávají, pokud je včelstvo nemocné včelím morem. Mor není sice přenosný na člověka, ale taková včelstva se léčí antibiotiky a v té chvíli je to med nevhodný ke konzumaci. V České republice je léčení včel antibiotiky zakázáno.

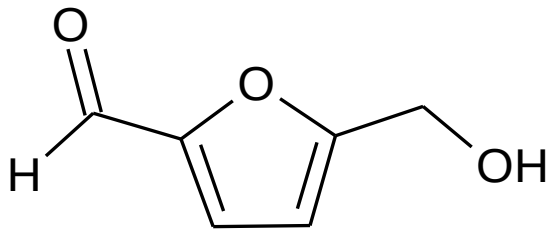
Za vadu vzhledu se považuje nehomogenní krystalizace, kdy tekutý med je nahoře a krystalický se nachází dole. Takové medy mohou být nezávadné, ale nelákají ke konzumaci [4].

2.2 Hydroxymethylfurfural

Hydroxymethylfurfural (HMF) je šestiuhlíkatá heterocyklická organická sloučenina obsahující jak aldehydové, tak alkoholové (hydroxymethyl) funkční skupiny. Řadíme ho do třídy furanů, který je substituovaný v polohách 2 a 5 formylem a hydroxymethylovými substituenty (Obr. 4). Je produktem a indikátorem Maillardovy reakce a může také vznikat při kyselé dehydrataci hexóz.

HMF je téměř všudypřítomný. Vyskytuje se v každodenních tepelně zpracovaných potravinách obsahujících cukr, od snídaňových cereálií, chleba, mléčných výrobků a ovocných šťáv po likéry v různých koncentracích. HMF je proto považován za jeden z hlavních indexů kvality různých komerčních syrovátkových proteinů, melasy a mnoha dalších produktů.

Ve většině starších studií bylo zjištěno, že HMF má negativní účinky na lidské zdraví, jako je mutagenita nebo karcinogenita vůči lidem a zvířatům. V novějších rozsáhlých studiích však bylo prokázáno, že HMF má širokou škálu pozitivních účinků, jako jsou antioxidační, antialergické, protizánětlivé apod [9; 13].



Obr. 4: Struktura hydroxymethylfurfuralu [13]

2.2.1 Vlastnosti

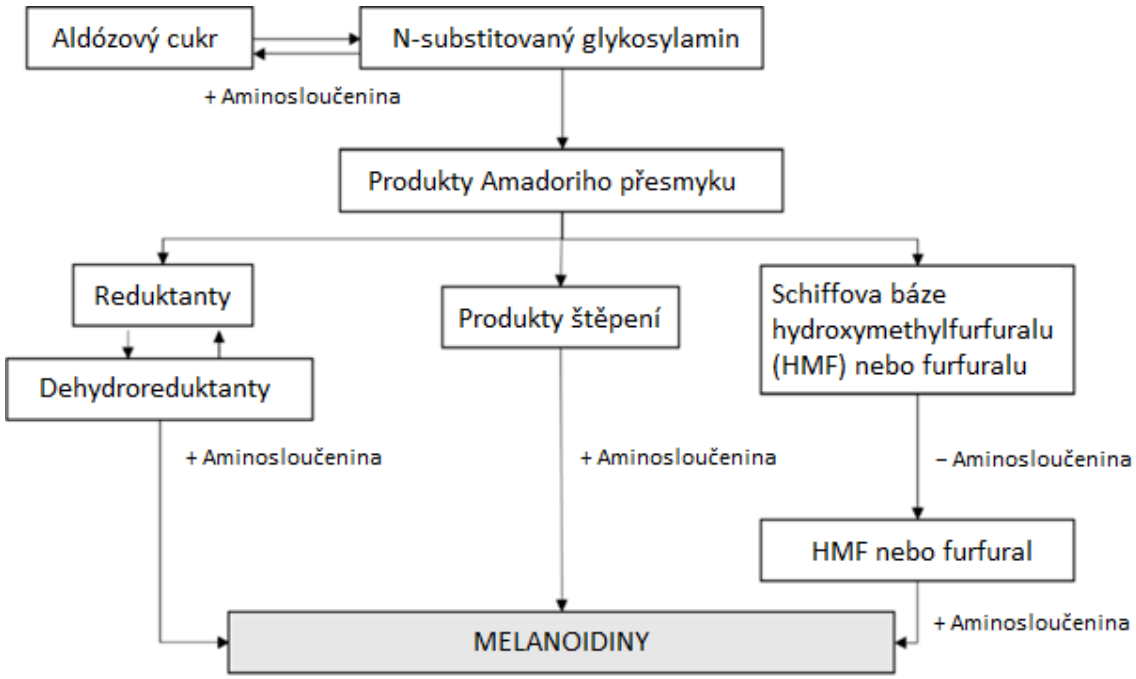
Hydroxymethylfurfural je pevná krystalická žlutá látka, jejíž krystaly mají tvar jehel. Má nízkou teplotu varu a je snadno rozpustný jak ve vodě tak v organických rozpouštědlech jako například v methanolu, ethanolu, acetonu, ethylacetátu a dimethylformamidu. Při jeho zahřívání se uvolňuje štiplavý kouř a dráždivé výpary. Jeho zápach připomíná květy heřmánku a chuť je zatuchlá máselná, karamelová. HMF je klasifikován jako látka ke zlepšení potravin a používá se v potravinářském průmyslu jako ochucovadlo pro potravinářské výrobky i jako potravinářská přídatná látka [13].

2.2.2 Syntéza hydroxymethylfurfuralu

Hydroxymethylfurfural vzniká při Maillardově reakci, kterou můžeme rozdělit do pěti základních kroků. V prvním kroku vzniká N-substituovaný glykosylamin z ketózy nebo aldózy reakcí s primární aminoskupinou aminokyseliny, peptidu nebo proteinu. V druhém kroku dochází k přeskupení glykosylaminu podle Amadoriho přesmyku, což má za následek vznik ketózaminu nebo aldózaminu. Ve třetím kroku může reagovat buď aldózamin s aminokyselinou za vzniku diaminosacharidu, nebo může dojít k druhému přesmyku ketózaminu a k jeho reakci s aldózou za vzniku diketózaminu. Čtvrtý krok vede k dehydrataci aminosacharidu a vzniku amino- nebo non-aminosloučenin. Pátým a posledním krokem je kondenzační reakce sloučenin vzniklých ve čtvrtém kroku za vzniku aminosloučenin, které dále poskytují hnědé pigmenty [14]. Maillardova reakce také probíhá při pokojové teplotě, ale mnohem pomaleji a nejpomaleji probíhá při nízkých teplotách a nízkém pH.

Příklady Maillardovy reakce mohou být kůra pečeného masa nebo chleba. Reakce také kromě barvy vytváří nespočet komplexních chutí. Aminokyseliny methionin a cystein, obsahující síru, hrají primární roli při tvorbě aromatických složek získaných během Maillardovy reakce. Senzorický vjem pečeného nebo grilovaného masa také vytváří heterocyklické sloučeniny odvozené od aminokyselin, nukleotidů a cukrů z Maillardovy reakce, jako je oxopropanol a hydroxymethylfurfural [15].

HMF může být také tvořen degradací redukujících cukrů, jako například glukózy nebo fruktózy, při vysokých teplotách [16].



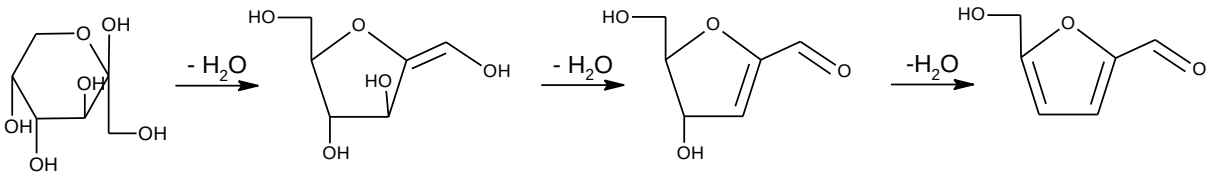
Obr. 5: Schéma Mailardovy reakce [17]

2.2.3 Využití hydroxymethylfurfuralu

HMF je cenná látka odvozená od biomasy, která se využívá při výrobě herbicidů, potravinářských přísad nebo zdravotnických potřeb. Velkou pozornost získal HMF zejména pro využití jako bioplastový materiál, a to pro jeho udržitelnost, protože významně přispívá k realizaci udržitelné společnosti. HMF pro tyto účely lze získat kyselou vodní konverzí hexózy [18].

2.2.4 Hydroxymethylfurfural v medu

Jak bylo zmíněno výše v kapitole Vady a falšování medu, tak se HMF v medu vyskytuje ve větší míře při přílišném zahřívání nebo při nevhodných skladovacích podmínkách. Špatným skladováním medu se myslí časté výkyvy teplot, které nejsou pro med vhodné. Vznik HMF při zahřívání medu je důsledek reakce sacharidů, jak je patrné z Obr. 6. HMF v medu také vzniká v průběhu správného skladování bez výkyvů teplot. Zahříváním se prodejci snaží docílit toho, aby med vydržel co nejdéle tekutý. To má ale za následek ztrátu prospěšných látek citlivých na teplo a vyšší množství HMF. Takovémuto falšování medu se snaží předcházet evropská norma, která stanovuje nejvyšší povolené množství HMF 40 mg na 1 kg medu. Podle normy Český med je nejvyšší povolené množství HMF 20 mg na 1 kg medu, dle Vyhlášky č. 76/2003 Sb. nesmí koncentrace HMF v medu překročit 40 mg/kg medu [4; 19].



Obr. 6: Schéma vzniku HMF z fruktózy [20]

2.3 Analytické metody pro stanovení HMF v medu

2.3.1 Chromatografie

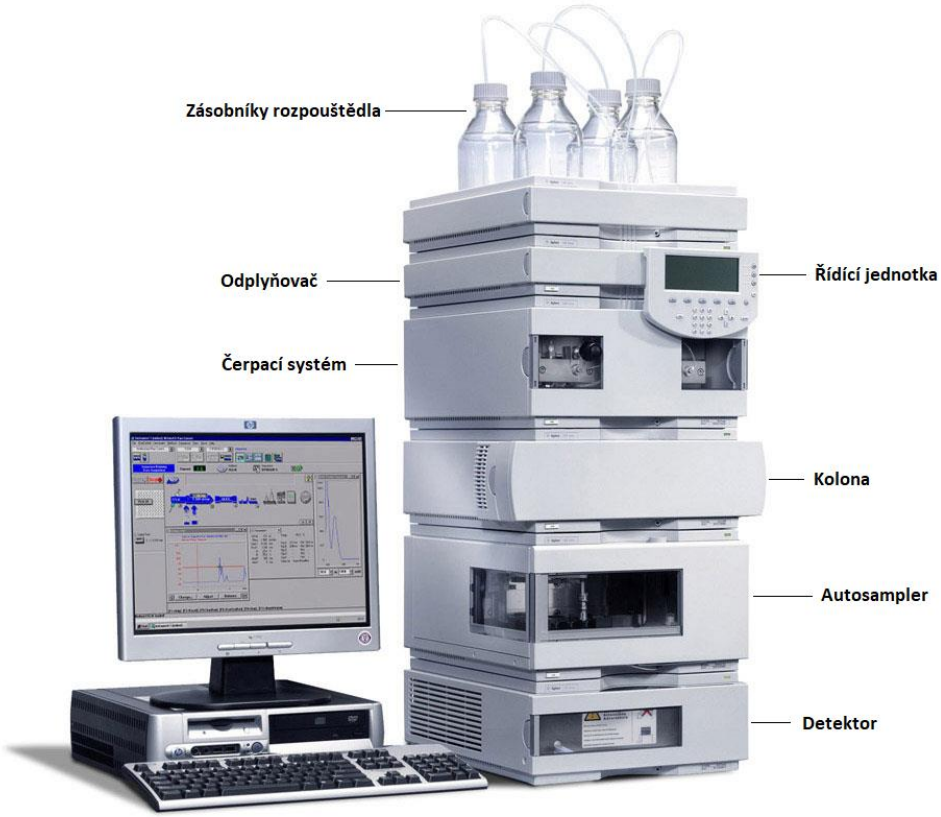
Všechny typy chromatografií jsou založené na rozdělení složek směsi mezi dvě fáze. Jedna z nich je fáze nepohyblivá – stacionární, druhá je fáze pohyblivá – mobilní. Principem chromatografického dělení je, že složky směsi jsou unášeny stacionární fází tokem mobilní fáze a jejich separace je založená na rozdílné afinitě k jednotlivým fázím. Chromatografii potom můžeme dělit podle typu mobilní fáze na kapalinovou a plynovou chromatografii. Dále ji můžeme dělit podle způsobu umístění stacionární fáze, a to na kolonovou chromatografii, kde je stacionární fáze umístěna v úzké trubici, a planární chromatografii, kde je stacionární fází porézní vrstva [21; 22].

2.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (zkráceně HPLC z anglického: High Performance Liquid Chromatography) je nejvšestrannějším a nejvíce používaným typem chromatografie. Využívá se k separaci a stanovení analytů z velké škály organických, anorganických i biologických materiálů. V této technice je mobilní fází kapalina, která je obvykle natlakována, aby protékala separační kolonou naplněnou stacionární fází. Zvýšený tlak mobilní fáze odlišuje HPLC od jiných technik kapalinové chromatografie (jako je nízkotlaká kapalinová chromatografie). V HPLC jsou rozlišovány dva systémy v závislosti na polaritě mobilní a stacionární fáze. Metody, které používají polární stacionární fázi a nepolární mobilní fázi, se nazývají kapalinová chromatografie s normální fází (NPLC). Příkladem NPLC je kapalinová chromatografie využívající stacionární fázi složenou z částic oxidu křemičitého a mobilní fázi toluenu. Druhým systémem je ten, kde se používá nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze, jde o tzv. kapalinovou chromatografii s reverzní fází (RPLC). Příkladem RPLC může být stacionární fáze tvořená oktadecylsilylem (C18) a mobilní fáze směsi voda-methanol. Rozmanitost stacionárních a mobilních fází umožňuje separaci široké škály sloučenin, počínaje malými molekulami a sahající až k polymerům, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny. V závislosti na detektoru vybraném pro měření analytů (a na vlastnostech analytu) může rozsah citlivosti pro HPLC analýzu klesnout až na pikogramy na ml analytu v roztoku. HPLC lze také aplikovat na koncentrované vzorky.

Vzorek je po nástřiku unášen mobilní fází, která ho dodává za vysokého tlaku na kolonu obsahující stacionární fázi ve formě velmi malých částic. Mobilní fáze obsahující složky směsi prochází kolonou, kde jsou složky směsi odděleny v závislosti na jejich chemické afinitě k mobilní a stacionární fázi. Složky směsi eluují z kolony v různých časech v závislosti na jejich rozdělení mezi mobilní a stacionární fázi. Po průchodu jsou detekovány detektory [21; 23; 24].

Základní konstrukce přístroje pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii zahrnuje následující části: systém přívodu rozpouštědla (zásobníky rozpouštědla a odplyňovač), vysokotlaký čerpací systém, injektor (často součástí autosampleru), termostatový držák kolony, chromatografická kolona (případně s ochrannou kolonou nebo předkolonou), jeden nebo více detektorů a jednotka pro řízení a zpracování dat (obvykle počítač s vyhrazenými programy). Celý systém je řízen v moderních přístrojích HPLC počítačovým systémem, který umožňuje sběr a zpracování dat. Volitelně mohou být zahrnuty další součásti přístroje, jako je chladicí systém pro autosampler/injektor, sběrač frakcí a přepínání kolony pro zpětný tok [23].



Obr. 7: Konstrukce přístroje HPLC [25]

Systém přívodu rozpouštědla by měl mít schopnost odstraňovat plyny rozpuštěné v rozpouštědlech (prvotní odplynění). Ze zásobních nádob je rozpouštědlo přenášeno přes nízkotlaké potrubí do čerpacího systému. Veškeré potrubí používané pro průchod mobilní fáze systémem musí splňovat požadavek inertnosti vůči použitým rozpouštědlům. Fluorokarbonové polymery, jako je teflon, jsou běžnými materiály používanými pro tento typ vedení, ale používá se také polypropylen. Systém pro dodávání rozpouštědla HPLC má jeden nebo více zásobníků pro rozpouštědla. Zásobníky musí být čisté a inertní vůči rozpouštědlům, která obsahují. Rozpouštědla ze zásobníků musí být prostá částic a být v dostatečné čistotě, případně jsou před použitím filtrována přes mikrofiltry. Druhé odplynění v systému HPLC se provádí v odplyňovači. V odplyňovacím zařízení rozpouštědlo prochází speciální polymerní trubicí, která je umístěna ve vakuové komoře. Materiál hadice (membrána) má selektivní propustnost pro plyny a vakuum vytvořené malou pumpou snižuje obsah plynů v rozpouštědle. Odplynění je nutné, protože kyslík může být uvolňován ve formě velmi malých bublin v systému HPLC, když dojde k poklesu tlaku nebo když je smícháno rozpouštědlo s vysokou rozpustností pro kyslík s jiným rozpouštědlem s nízkou rozpustností pro tento plyn. Pokud je směšovač mobilních fází zařazen před vysokotlakým čerpadlem, mohou plynové bubliny vést ke změnám tlaku kapaliny dodávané čerpadlem (kolísání tlaku). Rozpuštěné plyny v mobilní fázi mohou také ovlivnit vstřikovaný objem, obzvlášť u malých objemů nástřiku (např. 1–2 µl). Také čtení detektorů může být narušeno rozpuštěnými plyny. Hlavní čerpací systém se skládá z čerpadla schopného dodávat konstantní tok mobilní fáze přes injektor, chromatografickou kolonu a detektor. Čerpadla musí být schopna generovat vysoký tlak mobilní fáze, který je nezbytný k překonání odporu proti průtoku chromatografickou kolonou. Průtok čerpadly musí být konstantní, bez výkyvů. Bezpulzní tok je nezbytný převážně u detektorů, u kterých může signál kolísat při změně průtoku. Úlohou injektoru je nadávkovat

do mobilní fáze (přesným a reprodukovatelným způsobem) přesný objem analyzovaného roztoku. Konvenční systémy HPLC mají injektory schopné dávkovat objemy mezi 1 µl až 100 µl roztoku vzorku, typické objemy pro injekce jsou mezi 1 µl a 25 µl. Větší vstřikovaný objem umožňuje zvýšení citlivosti metody, ale v některých případech to ovlivňuje tvar chromatografického píku. Chromatografická kolona je určena k provádění separace jednotlivých složek ve vzorku. Tělo kolony se obvykle skládá z trubice, vyrobené z kovu (nerezová ocel) nebo plastu (např. PEEK), která je naplněna stacionární fází. Stacionární fáze obvykle sestává z malých pevných částic potažených aktivním materiálem. Tímto aktivním materiálem může být vázaná fáze, jako jsou dlouhé uhlovodíkové řetězce nebo jiné organické skupiny. Kromě malých částic lze jako podporu pro stacionární fázi použít také monolitické materiály. Stacionární fáze vyrobená z malých částic nebo z porézního monolitického materiálu má specifické fyzikální a chemické vlastnosti, které umožňují separaci. Po oddělení jednotlivých složek v chromatografické koloně prochází mobilní fáze detektorem (nebo několika detektory). Měření jsou založena na skutečnosti, že molekuly vzorku mají fyzikálně-chemické vlastnosti odlišné od vlastností mobilní fáze. Odezva detektoru se jeví jako elektrický signál zaznamenaný ve formě chromatogramu [26].

HPLC je nejběžnější analytická technika, nabízí vynikající flexibilitu pro analýzu různých vzorků a pro mnoho různých účelů. Hlavním využitím HPLC je kvantifikace, kterou lze použít na širokou škálu typů molekul, včetně malých molekul s různou polaritou, stejně jako větších molekul, jako jsou proteiny, nukleové kyseliny, polymerní sacharidy, syntetické polymery atd. Lze také použít pro hodnocení molekulové hmotnosti. Další aplikace HPLC souvisí s odhadem specifických molekulárních vlastností, jako je hydrofobicita a disociační konstanty [26].

2.4 Základní validační parametry metody

K prokázání spolehlivosti analytické metody slouží proces validace, jejímž cílem je demonstrovat a dokumentovat kvalitu analytické metody ustanovením definovaných kritérií a měřením hodnot těchto kritérií. Slouží k ověření platnosti dané analytické metody a k prokázání, že daná analytická metoda bude poskytovat konzistentní výsledky. Předmětem validace může být vlastnost např. koncentrace hlavního analytu, koncentrace nečistoty nebo fyzikálně chemický parametr. Také se používá při validaci nové metody, při převodu validované metody nebo při kontrole způsobilosti systému. Využívaná validační kritéria jsou přesnost, opakovatelnost, citlivost, správnost, linearita a další. Linearita označuje lineární závislost mezi signálem a koncentrací nebo množstvím a je charakterizována koeficientem stanovení R^2. Kvantifikace by měla být prováděna v rozsahu kalibrace, ale v případě lineární závislosti lze data mírně mimo rozsah kalibrace stále považovat za spolehlivá. Přesnost lze považovat za experimentální hodnotu, která se blíží předpětí. Předpětí je rozdíl mezi akceptovanou (nebo skutečnou) hodnotou analyzovaného množství nebo koncentrace a průměrným výsledkem analýzy. Malé nebo nulové zkreslení označuje dobrou přesnost [26]. Přesnost se dá zjistit trojím způsobem. Buď srovnáním s referenčním standardem, měřením výtěžnosti nebo standardním přidáním analytu [27]. Výtěžnost udává míru schopnosti metody detekovat veškerý analyt přítomný ve vzorku. Můžeme ji nazvat mírou účinnosti metody. Vyjadřuje se jako podíl koncentrace se známým přidaným množstvím analytu a bez něj. Mez detekce je stanovena analýzou vzorků se známou koncentrací analytu a stanovením minimální úrovně, při které lze analyt za daných experimentálních podmínek spolehlivě detekovat, ale nemusí být kvantifikován jako přesná hodnota. Detekční limit se obecně vyjadřuje jako koncentrace analytu ve vzorku. Vzorec pro výpočet limitu detekce:

$$\mathrm{LOD} = 3{,}3 \cdot \frac{\delta}{a}$$

kde δ je směrodatná odchylka a *a* je hodnota konstanty z rovnice kalibrační křivky. Mezní hodnota kvantifikace charakterizuje citlivost metody. Je to nejnižší koncentrace látky, kterou lze stanovit s přijatelnou přesností a správností. Vzorec pro výpočet limitu kvantifikace [28; 29]:

$$\mathrm{LOQ} = 10 \cdot \frac{\delta}{a}$$

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam chemikálií

Tab. 2: Seznam použitých chemikálií

Název	Čistota	Výrobce	CAS číslo
hydroxymethylfurfural	≥98,0%	Sigma Aldrich	67-47-0
Acetonitril	≥99,9%	Sigma Aldrich	75-05-8

3.2 Seznam použitých laboratorních pomůcek a přístrojů

Tab. 3: Seznam použitých přístrojů

Název	Výrobce
Agilent 1260 Infinity	Agilent Technologies

Tab. 4: Seznam požitých pomůcek

Název	Specifikace
odměrná baňka	10 ml
odměrná baňka	50 ml
odměrná baňka	250 ml
kádinka	100 ml
skleněná vialka	2 ml
analytické váhy	
mikrofiltry	velikost pórů 0,45 µm
automatické pipety	
špičky pro pipety	
stříkačky	

3.3 Charakterizace analyzovaných vzorků medu a jejich úprava

Pro samotný experiment byly vybrány čtyři vzorky medu z domácího včelařství a jeden komerčně dostupný med značky Clever. Medy z domácího včelařství byly ze třech různých let (2019, 2020 a 2021), kdy z roku 2020 jsou vzorky dva, jeden pastovaný a druhý nepastovaný.

Bylo naváženo 5 g vzorku medu s přesností na čtyři desetinná místa. Poté byl vzorek kvantitativně převeden do 50ml odměrné baňky a doplněn po rysku deionizovanou vodou. Následně byl vzorek přefiltrován přes mikrofiltr s velikostí pórů 0,45 µm do vialky na 2 ml. V rámci úpravy vzorků bylo na jednom vzorku testováno čiření Carrezovými roztoky. Carrez I je 15% roztok hexakyanoželeznatanu draselného K4(Fe[CN]6) a Carrez II je 30% roztok síranu zinečnatého ZnSO4. Při čiření se obě činidla přidávají v poměru 1:1. Při přípravě vzorku pro čiření Carrezovými roztoky bylo do odměrné baňky se vzorkem napipetováno po 1 ml roztoků Carrez I a Carrez II. Dále se postupovalo jako u předchozích vzorků.

3.4 Příprava kalibračních roztoků

Při přípravě kalibračních roztoků bylo naváženo 16 mg HMF a rozpuštěno ve 250 ml 5% roztoku ACN. Tím byla získána koncentrace 64 mg/l, ze které bylo odpipetováno 5 ml do odměrné baňky na 10 ml a doplněno vodou. Tím byla získána koncentrace 32 mg/l. Poslední koncentrace 1 mg/l bylo dosaženo zředěním předchozí koncentrace tak, že se odpipetovalo 0,4 ml do odměrné baňky na 10 ml a baňka byla doplněna vodou po rysku.

3.5 Příprava roztoků pro stanovení limitů detekce a kvantifikace

Pro stanovení limitů detekce a kvantifikace byl připraven standard HMF o koncentraci 2 mg/l v 5% roztoku ACN.

3.6 Příprava roztoků pro stanovení přesnosti metody (recovery)

Pro stanovení přesnosti metody byl připraven standard HMF o koncentraci 25 mg/l v 5% roztoku ACN.

3.7 Metoda pro stanovení HMF v medu pomocí HPLC-DAD

Vzorky byly měřeny na přístroji Agilent 1260 Infinity a vyhodnocovány v programu Agilent Chemstation. Další specifikace metody jsou uvedeny v tabulce Tab. 5 a složení gradientu v závislosti na čase v tabulce Tab. 6.

Tab. 5: Specifikace metody pro přístroj Agilent 1260 Infinity

kolona	Kinetex EVO C18 (150x4,6 mm; 2,6 µm)
MF	H_2O:ACN = 95:5
nástřik	5 µl
průtok	0,6 ml/min
teplota	30 °C
detektor	DAD
detekce	280 nm

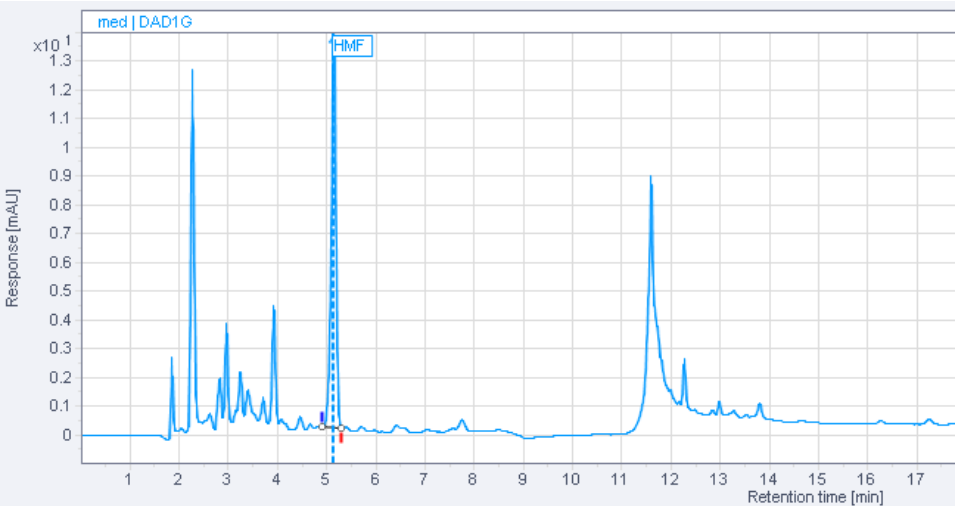
Tab. 6: Složení gradientu v závislosti na čase

t (min)	H_2O (%)	ACN (%)
0	95	5
7	95	5
8	60	40
20	60	40
21	95	5
30	95	5

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

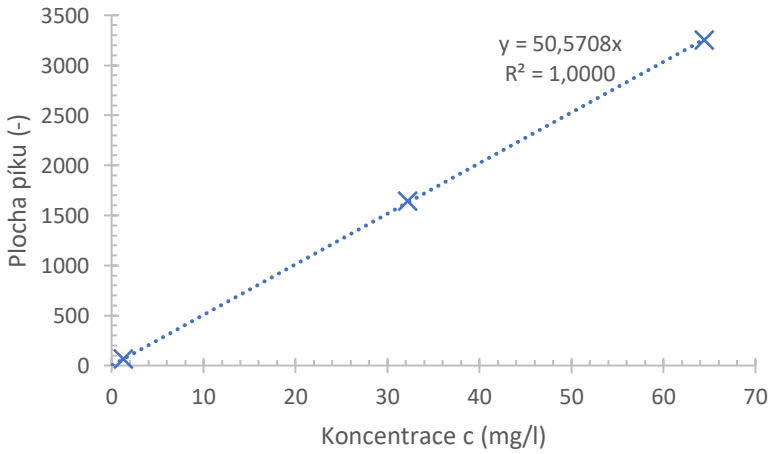
4.1 Optimalizace a validace metody

Hydroxymethylfurfural byl stanovován na kapalinovém chromatografu s DAD detektorem (detektor diodového pole měřící absorbanci). Pro identifikaci analytu ve vzorku byl použit standard HMF. Retenční čas HMF byl 5,1 minut. Měření probíhalo při vlnové délce 280 nm. V rámci optimalizace metody byla nastavena gradientová eluce. Na obr. 8 je ukázkový chromatogram vzorku medu.



Obr. 8: Chromatogram vzorku medu obsahující HMF (stanovení při 280 nm)

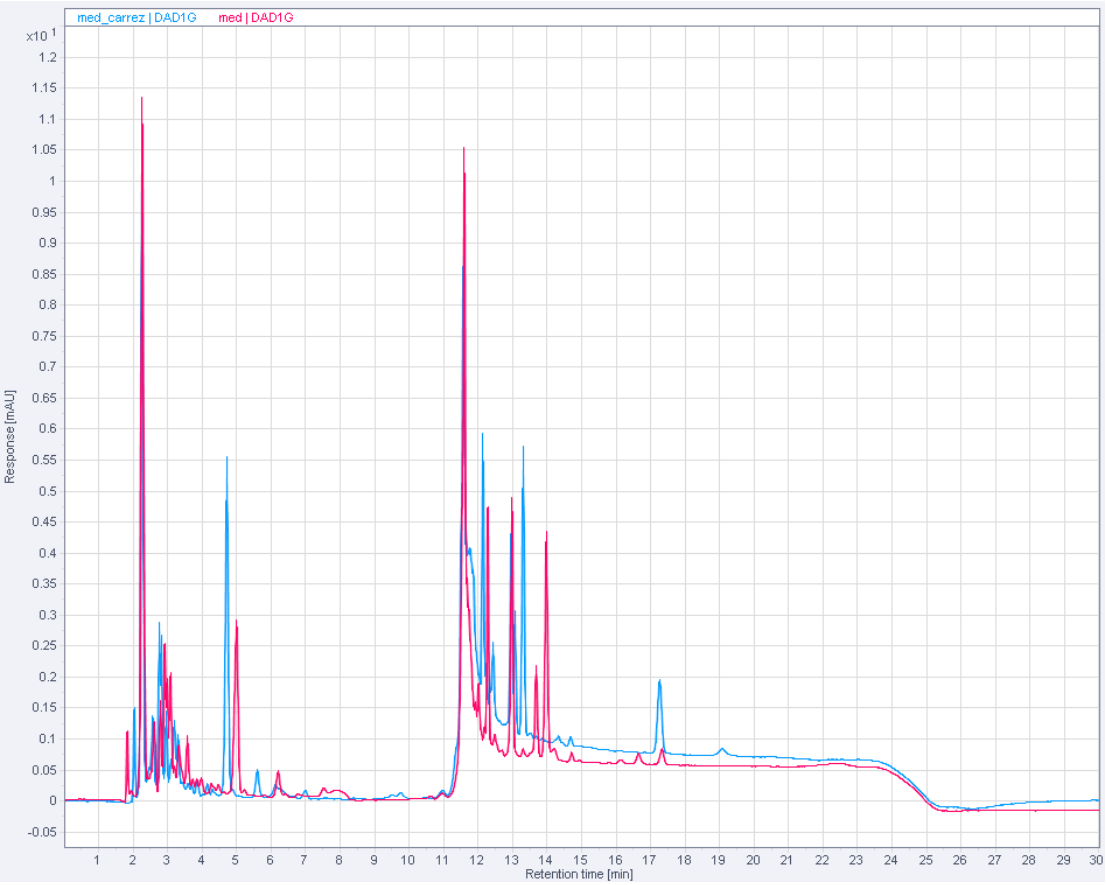
V rámci validace metody byla posuzována linearita sestavením kalibrační křivky ze závislosti plochy píku na koncentraci. Kalibrační křivka je zobrazená na Obr. 9. Kalibrační křivka sestává ze tří koncentrací 1 mg/l, 32 mg/l a 64 mg/l. naměřené body v kalibrační závislosti byly proloženy lineární regresí. Při takto zvolených koncentracích je závislost lineární a koeficient determinace R2 = 1. Dále pomocí validace byly stanoveny hodnoty pro limit detekce a limit kvantifikace. Limit detekce byl stanoven na hodnotu 0,021 mg/l. Limit kvantifikace byl stanoven na hodnotu 0,063 mg/l. Stanovené limity detekce byly dostačující pro analýzu reálných vzorků. Poslední prováděnou validací bylo určení přesnosti metody. Ta byla určena pomocí testu výtěžnosti na 99,1 %.



Obr. 9: Graf kalibrační křivky závislosti plochy píku na koncentraci

4.2 Úprava vzorků medu čiřením pomocí Carrerových roztoků

Pro odstranění balastních látek u sacharidických roztoků se může využít metoda čiření pomocí Carrezových roztoků. Obecně je principem čiření tvorba nerozpustných solí odstraňovaných látek a tvorba sraženiny adsorbující na svůj povrch nežádoucí částice a sloučeniny [30]. Cílem čiření bylo odstranění balastních látek, které by mohly při stanovování zkreslovat výsledky. Porovnávané chromatogramy s čiřením vzorku a bez čiření jsou na Obr. 10, kde modrá křivka je čiřený vzorek a červená vzorek bez čiření. Už z přiloženého chromatogramu je patrné, že čiřením se nepodařilo odstranit látky poskytující analytický signál v blízkosti retenčního času hydroxymethylfurfuralu. Ačkoliv je čiření rozpuštěného medu před analýzou na HPLC běžně doporučováno, vzhledem k tomu, že se nepodařilo prokázat efekt čiření a vzhledem k tomu, že čiření představuje krok navíc v analýze medu, nebylo čiření při analýze reálných vzorků medu v této bakalářské práci dále používáno.



Obr. 10: Porovnání vzorků s čiřením a bez čiření

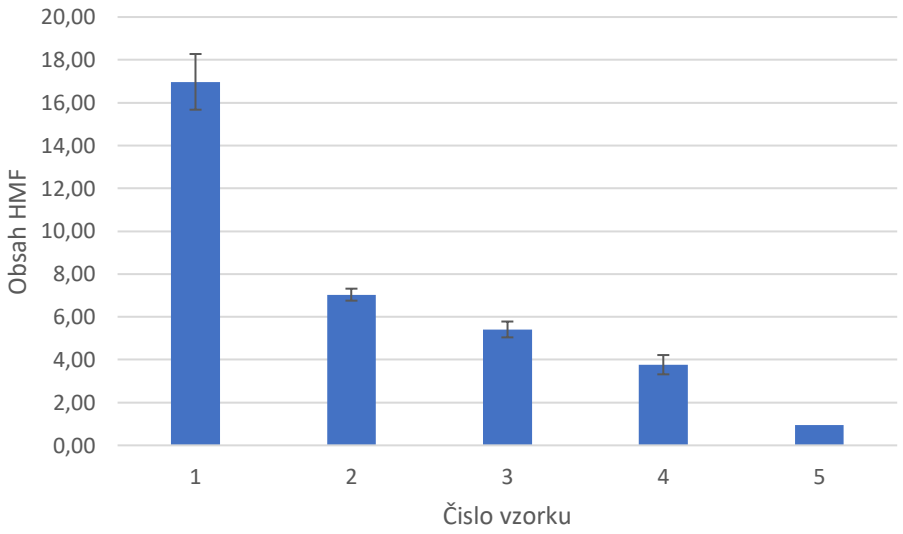
4.3 Stanovení HMF ve vzorcích medu

Vzorky pro experiment byly zvoleny podle předpokladu, že čím je med starší, tím více HMF obsahuje. Dalším předpokladem je, že med pastovaný obsahuje více HMF než nepastovaný, jelikož je mechanicky zpracováván. Nejvíce HMF je očekáváno ve vzorku komerčně dostupného medu, protože se prodejci snaží udržovat medy co nejdéle tekuté za pomoci zahřívání.

Tab. 7: Hodnoty HMF pro vzorky medů

Číslo vzorku	Rok stáčení	mg HMF/kg medu
1	*	16,97 ± 1,30
2	2019	7,04 ± 0,28
3	2020p	5,41 ± 0,37
4	2020	3,77 ± 0,45
5	2021	0,94

*komerčně dostupný med značky Clever, p – med pastovaný



Obr. 11: Porovnání obsahu HMF ve stanovovaných medech

Nejvyšší koncentraci HMF obsahoval vzorek č. 1 – komerčně dostupný med značky Clever. Průměrná hodnota 16,97 mg/ kg medu splňuje legislativní požadavky na nejvyšší možné množství HMF v medu. Na etiketě výrobku však nebylo uvedeno, ze kterého roku med pochází. Ve studii Shapla et al. [9] byly uvedeny hodnoty pro medy z České republiky, které byly skladovány čtyři roky za stálé teploty. Tyto medy měly obsah HMF v rozmezí 10,30–44,20 mg na kg medu.

V porovnání medů z domácího chovu byla nejvyšší koncentrace HMF stanovena ve vzorku č. 2 medu z roku 2019. Průměrná koncentrace 7,04 mg HMF/kg medu splňuje legislativní požadavky na nejvyšší možné množství HMF v medu. Se zvyšujícím se stářím medu roste obsah HMF v medu, protože v něm vzniká reakcí sacharidů v průběhu jeho skladování [4]. Výsledky vzorků č. 3 a 4 z roku 2020 potvrzují předpoklad, že med pastovaný obsahuje více HMF než

nepastovaný, jelikož je mechanicky zpracováván a při procesu pastování je dlouhou dobu míchán, a tím se i mírně zahřívá. Vzorek č. 3 (pastovaný med) obsahoval v průměru 5,4 mg HMF/ kg medu oproti vzorku č. 4 (nepastovaný med), který obsahoval v průměru pouze 3,7 mg HMF/kg medu. Nejméně HMF (0,9 mg na kg medu) bylo stanoveno ve vzorku č. 5 medu z roku 2021, který byl nejvíce čerstvý. Ve studii Shapla et al. [9] byly stanoveny koncentrace HMF pro medy v rámci EU. Obsah HMF v medu z Itálie, který byl měřen čerstvý, byl v rozmezí 1,23–5,95 mg na kg medu. Oproti medu měřenému v rámci práce jsou hodnoty vyšší. Zvýšené hodnoty mohou být způsobeny klimatickými podmínkami v Itálii nebo typem medu, který v článku není specifikovaný. U medů ze Španělska skladovaných méně než tři roky byl nejvyšší obsah HMF 21,39 mg na kg medu a u některých vzorků byla koncentrace pod mezí detekce. Tyto hodnoty jsou v rozmezí hodnot stanovených v práci. Horní hranice obsahu HMF v medu ze Španělska je vyšší a může být závislá na klimatických podmínkách. M. Zappalà et al. [19] stanovovali HMF v jednodruhových medech. Stanovené hodnoty nejsou porovnatelné s hodnotami stanovenými v práci, jelikož všechny vybrané medy jsou vícedruhové.

Studie B. Alghamdi et al. [31] byla věnována stanovení HMF v medech pocházejících se Saúdské Arábie. Maximální povolený limit HMF je v Saúdské Arábii 60 mg / kg. Hodnoty HMF se pohybovaly v rozmezí 0,5 – 29 mg na kg medu. Vzorků ke stanovení bylo 14 a z toho ve čtyřech nebyl HMF detekován vůbec. Spodní hranice obsahu je srovnatelná se vzorkem č. 5, kde se jedná o medy čerstvé. Vrchní hranice je vyšší než u vzorku č. 1, což mohlo být způsobeno delším skladováním. Hladina HMF ve zbývajících 10 vzorcích byla pod přípustnými limity. Přítomnost velmi malého množství HMF ve vzorcích medu naznačuje, že medy byly čerstvé, neohřívané a zbavené falšování jinými sirup [31].

5 ZÁVĚR

V této bakalářské práci bylo zkoumáno využití metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení 5-hydroxymethylfurfuralu v medu. V procesu validace byla vyhodnocena linearita metody a byly stanoveny hodnoty pro limity detekce a kvantifikace. Linearita kalibračních křivek v pracovním rozsahu byla velmi dobrá. Limit detekce byl stanoven na 0,021 mg/l a limit kvantifikace na 0,063 mg/l. Správnost metody byla ověřena testem výtěžnosti, přičemž výtěžnost byla 99 %. V rámci přípravy metody byl sledován vliv čiření vzorku na analýzu pomocí HPLC. Provedenými experimenty nebyl prokázán zlepšující vliv čiření na analýzu.

Analýza vybraných vzorků medu pomocí validované metody ukázala, že medy splňují maximální přípustné množství HMF v medu dané Vyhláškou č. 76/2003 Sb. Nejvíce HMF bylo stanoveno ve vzorku komerčně dostupného medu značky Clever. Při srovnávání vzorků medů pocházející přímo od včelaře měl nejvíce HMF vzorek z roku 2019, což odpovídá předpokladu, že HMF přibývá se stářím medu. V porovnání vzorků z roku 2020 měl více HMF vzorek pastovaného medu, protože při pastování se med míchá a tudíž i trochu zahřívá. Nejméně HMF měl med z roku 2021, který byl analyzován týden po vytočení.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] VESELÝ, Vladimír. Včelařství. 2. Praha: Nakladatelství Brázda, 2003. ISBN 80- 209-0320-8.

[2] WANG, Jun a Li QING X. Advances in Food and Nutrition Research: Chapter 3 - Chemical Composition, Characterization, and Differentiation of Honey Botanical and Geographical Origins. *Academic Press* [online]. **2011**(62), 89-137 [cit. 2021-06-26]. ISSN 1043-4526. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-385989-1.00003-X

[3] *Včelařství*. Praha: Český svaz včelařů, o. s., 2019, .

[4] TITĚRA, Dalibor. *Včelí produkty mýtů zbavené: med, vosk, pyl, mateří kašička, propolis, včelí jed*. 1. vyd. Praha: Brázda, 2006, 175 s. : il. ISBN 80-209-0347-X.

[5] Květový a medovicový med. In: Včelky.cz [online]. Liberec, 2005 [cit. 2021-07-10]. Dostupné z: http://www.vcelky.cz/med.htm

[6] Plástečkový med. In: Včelařství *Řezanina [online]. Moravský* Krumlov, 2009 [cit. 2021-07-10]. Dostupné z: https://vcelarstvirezanina.cz/vceli-produkty/

[7] Pastovaný med. In: Domácí *med [online]. Praha*, 2018 [cit. 2021-07-10]. Dostupné z: https://www.domacimed.cz/jak-pastovat-med

[8] KODÍČEK, M. Sacharidy. Biochemické pojmy : výkladový slovník [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2021-06-26]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.*vscht.cz/*knihy/uid_es-002/ebook.html?p=sacharidy

[9] *SHAPLA*, Ummay, Md. SOLAYMAN, Nadia ALAM, Md. KHALIL a Siew GAN. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. Chemistry Central Journal [online]. Cham: Springer International Publishing, 2018, **12**(1), 1-18 [cit. 2021-06-26]. Dostupné z: doi:10.1186/s13065-018-0408-3

[10] KODÍČEK, *M*. Lipidy. Biochemické pojmy : výkladový slovník [online]. Praha: VŠCHT Praha [cit. 2021-06-26]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=lipidy

[11] GONZALES, Adriana Pereyra, Leila BURIN a María Del Pilar BUERA. Color changes during storage of honeys in relation to their composition *and initial color. Food research international [online]. Elsevier* Ltd, 1999, 32(3), 185-191 [cit. 2021-07-05]. ISSN 0963-9969. Dostupné z: doi:10.1016/S0963-9969(99)00075-7

[12] Včelařství. Praha: Český svaz včelařů, o. s., 2020, , 72 s.

[13] 5-Hydroxymethylfurfural. PubChem [*online]. US: National Center* for Biotechnology Information, 2004 [cit. 2021-06-26]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/237332

[14] POKORNÝ, J. Antioxidants in Food: Practical Applications. 1. United Kingdom: *Elsevier, 2001. ISBN 9781855736160.*

[15] Flavor Addition in Dairy Products: Health Benefits and Risks. KUMAR, Naresh, Midathala RAGHAVENDRA, Jayanti TOKAS a Hari R. SINGAL. Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease. 1. United Kingdom: Academic Press, 2017, s. 123-135. ISBN 9780128097625.

[16] RAMÍREZ-JIMÉNEZ, A, E GUERRA-HERNÁNDEZ a B GARCÍA-VILLANOVA. Browning indicators in bread. Journal of agricultural and food chemistry [online]. 2000, **48**(9), 4176 [cit. 2021-06-27]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf9907687

[17] MARTINEZ-GOMEZ, Alvaro a Isabel CABALLERO. Phenols and Melanoidins as Natural Antioxidants in Beer. Structure, Reactivity and Antioxidant Activity. Biomolecules (*Basel,* Switzerland) [online]. MDPI AG, **2020,** 10(3), 400 [cit. 2021-07-05]. Dostupné z: doi:10.3390/biom10030400

[18] MURANAKA, Yosuke, Kenta MATSUBARA, Taisuke MAKI, Shusaku ASANO, Hiroyuki NAKAGAWA, Kazuhiro MAE a Yosuke MURANAKA. 5-Hydroxymethylfurfural Synthesis from Monosaccharides by a Biphasic *Reaction-Extraction* System Using a Microreactor and Extractor. ACS omega [online]. 2020, 5(16), 9384-9390 [cit. 2021-06-27]. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.0c00399

[19] ZAPPALà, M, B FALLICO, E ARENA a A VERZERA. Methods for the *determination of* HMF in honey: a comparison. Food control [online]. Elsevier Ltd, 2005, 16(3), *273-277 [*cit. 2021-06-27]. ISSN 0956-7135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2004.03.006

[20] PATOČKA, Jiří. 5-Hydroxymethylfurfural v lidské stravě: je nebezpečný?. In: Toxicology [online]. Praha: SpeedWeb.cz, 2014 [cit. *2021-06-27]. Dostupné z: http://toxicology*.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=920

[21] SKOOG, Douglas A., Donald M *WEST, James HOLLER*, Stanley R. CROUCH, Karel NESMĚRÁK, Václav ČERVENÝ, Tomáš KŘÍŽEK a Eliška NOVÁKOVÁ. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0.

[22] ČERMÁKOVÁ, L, L FELT, I NĚMCOVÁ, V *PACÁKOVÁ a K ŠTULÍK.* Analytická chemie 2. 1. Praha: SNTL – nakladatelství technické literatury, 1980.

[23] Chapter 3 - Short Overviews of *the Main Analytical Techniques* Containing a Separation Step. MOLDOVEANU, Serban C. a Victor DAVID. *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis*. 1. United Kingdom: Elsevier, 2017, s. 55-85. ISBN 978012803684.

[24] GAFFNEY, Jeffrey a *Nancy MARLEY. General* Chemistry for Engineers. 1. United Kingdom: Elsevier, 2017. ISBN 9780128104446.

[25] Přístroj pro HPLC. *In: Biopedia.sk* [online]. Slovenská republika: www.genezis.eu [cit. 2021-07-10]. Dostupné z: https://biopedia.sk/molekularna-biologia/hplc

[26] MOLDOVEANU, Serban a *Victor DAVID. Selection* of the HPLC Method in Chemical Analysis. 1. United Kingdom: Elsevier, 2016. ISBN 9780128037119.

[27] RAVISANKAR, Panchumarthy, *D PRAVALLIKA, D.* Navya SIRI a Ch. Naga NAVYA. A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation. IOSR Journal Of Pharmacy. 2015, **5**(10), 7-19. ISSN 2250-3013.

[28] ECKSCHLAGER, Karel, *Zdeněk KODEJŠ a Ivan* HORSÁK. Vyhodnocování analytických výsledků a metod. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1980, 223 s.

[29] DOERFFEL, Klaus a *Karel ECKSCHLAGER. Optimální* postup chemické analýzy. 2. dopl.vyd. Praha: SNTL, 1988, 275 s.

[30] ČOPÍKOVÁ, Jana. *Chemie a analytika sacharidů*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1997, 104 s. ISBN 80-7080-306-1.

[31] ALGHAMDI, Budour A*, Elham Shasho ALSHUMRANI*, Muneerah Saad Bin SAEED et al. Analysis of sugar composition and pesticides using HPLC and GC–MS techniques in honey samples collected from Saudi Arabian markets. *Saudi journal of biological sciences* [online]. Elsevier B.V, 2020, **27**(12), 3720-3726 [cit. 2021-07-24]. ISSN 1319-562X. Dostupné z: doi:10.1016/j.sjbs.2020.08.018

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HMF	hydroxymethylfurfural
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ČR	Česká republika

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Vlevo med květový, vpravo med medovicový [5] 10
Obr. 2: Plástečkový med [6] 10
Obr. 3: Pastovaný med [7] 11
Obr. 4: Struktura hydroxymethylfurfuralu [13] 15
Obr. 5: Schéma Mailardovy reakce [17] 16
Obr. 6: Schéma vzniku HMF z fruktózy [20] 17
Obr. 7: Konstrukce přístroje HPLC [25] 19
Obr. 8: Chromatogram vzorku medu obsahující HMF (stanovení při 280 nm) 24
Obr. 9: Graf kalibrační křivky závislosti plochy píku na koncentraci 24
Obr. 10: Porovnání vzorků s čiřením a bez čiření 25
Obr. 11: Porovnání obsahu HMF ve stanovovaných medech 26

9 SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Složení medu v g na 100 g medu [4] 13
Tab. 2: Seznam použitých chemikálií 22
Tab. 3: Seznam použitých přístrojů 22
Tab. 4: Seznam požitých pomůcek 22
Tab. 5: Specifikace metody pro přístroj Agilent 1260 Infinity 23
Tab. 6: Složení gradientu v závislosti na čase 23
Tab. 7: Hodnoty HMF pro vzorky medů 26