

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie



Andrea Čudová

STANOVENÍ VÁPNIKU A HOŘČÍKU VE VZORCÍCH MEDU
ATOMOVOU ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIÍ

Determination of calcium and magnesium in honey samples by
atomic absorption spectrometry

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jakub Hraníček, Ph. D.

Praha 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

Podpis:

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala RNDr. Jakubu Hraníčkoví, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce a cenné rady, které mi během jejího vypracování poskytoval. Dále bych také ráda poděkovala RNDr. Václavu Červenému, Ph.D. a RNDr. Elišce Novákové, Ph.D. za jejich odborné rady v praktické části bakalářské práce. Poděkování patří také včelařům, kteří mi med poskytli a předali mi cenné informace a panu Bc. Janu Hlávkoví za jeho inspirativní a podnětné návrhy. Závěrem bych také chtěla poděkovat své rodině a nejbližším přátelům, kteří mě podporovali v průběhu celého mého studia.

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce je stanovení vápníku a hořčíku ve vybraných vzorcích medu. Stanovení je prováděno pomocí metody atomové absorpční spektrometrie s plamenovou technikou atomizace (F-AAS). Pro stanovení je použit plamen acetylen-vzduch.

První část bakalářské práce je věnována nalezení optimálních podmínek metody pro další měření jednotlivých vzorků medu. Mezi tyto parametry patří především výška paprsku nad hranou hořáku a průtoková rychlost acetylenu. Za těchto zjištěných podmínek jsou dále stanoveny základní charakteristiky stanovení vápníku a hořčíku (opakovatelnost, citlivost, limit detekce a stanovitelnosti).

Druhá část bakalářské práce je věnována stanovení vápníku a hořčíku v jednotlivých předložených vzorcích medu. Celkem je pro analýzu připraveno 15 vzorků medů jak od lokálních včelařů, tak z obchodních řetězců. Naměřené hodnoty jsou zaznamenány do tabulek a statisticky vyhodnoceny.

Stanovené koncentrace vápníku se pohybují v rozmezí 7,11 – 66,8 $\mu\text{g/g}$, pro hořčík pak 8,79 – 92,2 $\mu\text{g/g}$. Na závěr jsou získané hodnoty pro medy z České republiky porovnány s daty uvedenými v zahraničních studiích.

Klíčová slova:

Atomová absorpční spektrometrie, plamenová atomizace, hořčík, vápník, med

Abstract

This bachelor thesis is focus on the determination of calcium and magnesium in selected honey samples. Determination is performed by atomic absorption spectrometry with a flame atomization technique (F-AAS) by using an acetylene-air flame.

The first part of the bachelor thesis is devoted to finding the optimal conditions of the method for further measurement of individual honey samples. These parameters are beam height above the burner edge and acetylene flow rate. Then, under these optimal conditions, the basic characteristics of calcium and magnesium determination (repeatability, sensitivity, limit of detection and limit of quatification) were found.

In the second part of this bachelor thesis, the calcium and magnesium determination are performed in the honey samples. A total of 15 honey samples are analysed. The honey samples are prepared by local beekeepers from Czech Republic and retail chains (Tesco). The measured values are recorded in tables and statistically evaluated.

The determined calcium concentrations range is 7.11 – 66.8 $\mu\text{g/g}$, for magnesium to 8.79 – 92.2 $\mu\text{g/g}$. Finally, the values obtained for honeys from the Czech Republic are compared with data reported in foreign studies.

Key words:

Atomic absorption spectrometry, flame atomization, magnesium, calcium, honey

Obsah

Úvod	9
1 Cíl práce.....	11
2 Teoretická část.....	12
2.1 Atomová absorpční spektrometrie (AAS)	12
2.1.1 Atomová spektra	12
2.1.2 Základní vztahy	12
2.1.3 Princip AAS	13
2.1.4 Instrumentace AAS	13
2.2 Vápník.....	16
2.2.1 Vliv vápníku na organismus.....	16
2.3 Hořčík	17
2.3.1 Vliv hořčíku na organismus	18
2.4 Med	19
2.4.1 Definice medu	19
2.4.2 Typy medů.....	20
2.4.3 Složení medu	20
2.4.4 Minerální látky v medu	21
2.4.5 Faktory ovlivňující složení medu	22
2.4.6 Konduktivita medu.....	24
2.4.7 Med jako bioindikátor životního prostředí.....	24
2.4.8 Stanovení vápníku a hořčíku ve vzorcích medu.....	25
3 Experimentální část	28
3.1 Použité chemikálie	28
3.2 Použité přístroje	28
3.3 Použité programy	28
3.4 Vzorky medů.....	28
3.5. Pracovní postup.....	29
3.5.1 Optimalizace pracovních podmínek.....	30
3.5.2 Kalibrace a zjištění základních charakteristik.....	30
3.5.3 Příprava kalibračních roztoků obsahujících ionizační pufr.....	31
3.5.4 Příprava vzorků medů	31
3.6 Metoda přidavku standardu.....	31
3.7 Statistické zpracování	32

4 Výsledky a diskuze	34
4.1 Optimalizace parametrů	34
4.1.1 Shrnutí optimálních parametrů	39
4.2 Kalibrace	39
4.3 Charakteristiky pro stanovení vápníku a hořčíku	41
4.4 Stanovení vápníku a hořčíku ve vzorcích medu	41
4.4.1 Vyhodnocení vzorků z oblasti ČR a prodejných řetězců (vzorky A1 – A10)	42
4.4.2 Vyhodnocení medů z oblasti Železných hor (A11 – A15).....	43
4.4.3 Metoda přidavku standardu	43
4.4.4 Srovnání všech analyzovaných vzorků (A1 – A15) se zahraničními studii... ..	44
Závěr	46
Soupis bibliografických citací	48

Seznam zkratek a symbolů

<i>A</i>	Absorbance
AAS	Atomová absorpční spektrometrie
ATP	Adenosintrifosfát
<i>c</i>	Koncentrace [mg/l]
$CI_{\mu}, L_{1,2}$	Konfidenční interval střední hodnoty, Interval spolehlivosti [mg/l]
ČR	Česká republika
EDL	Bezelektrodová výbojky
EU	Evropská unie
F-AAS	Absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací
<i>h</i>	Výška paprsku nad hranou hořáku [mm]
HCL	Výbojka s dutou katodou
<i>k</i>	Směrnice kalibrační rovnice
<i>LOD</i>	Mez detekce [mg/l]
<i>LOQ</i>	Mez stanovitelnosti [mg/l]
<i>n</i>	Počet měření
p. a.	Pro analýzu
Q_v	Průtoková rychlost acetylenu [l/min]
r. j.	Relativní jednotky
<i>RSD</i>	Relativní směrodatná odchylka
σ	Směrodatná odchylka
SADA1	Kalibrační roztoky bez ionizačního pufru
SADA2	Kalibrační roztoky s ionizačním pufrem KCl
STD1	Kalibrační roztok č. 1 z dané kalibrační sady
STD3	Kalibrační roztok č. 3 z dané kalibrační sady
\bar{x}	Aritmetický průměr
<i>z</i>	Tabelovaná hodnota závisující na konfidenčním intervalu

Úvod

Tato bakalářská práce se zaměřuje na stanovení vápníku a hořčíku ve vybraných vzorcích medu. Med je velmi zdravá přírodní potravinu, která oba tyto prvky obsahuje. Jejich procentuální zastoupení se odvíjí podle toho, o jaký typ medu se jedná a z jaké oblasti pochází. To může být ovlivněno mnoha faktory – půda, geologické a geochemické vlivy, typ rostlin v místě opylování, výživa včel a jejich zdravotní stav. ^[1]

Objev medu se datuje přibližně do období 2100-2000 let př.n.l. (sumerské město Nippur). Přibližně ve stejné době med objevili také ve starověké Číně a následně i starověkém Egyptě. Med byl nedílnou součástí tradiční čínské medicíny. Znalosti o něm se postupně šířily do středomoří, Evropy a v 17. století i do Ameriky. ^{[2][3]}

Med byl dlouhou dobu využíván jako jediná forma sladidla. Postupně byl nahrazován cukrem. Tato sladící inovace se zrodila okolo roku 350 n.l. ve starověké Číně. Produkce cukru do dalších zemí však trvala několik století, a i přes to, že ponětí o něm se postupně rozšiřovalo dál, byl cukr stále považován za jakýsi druh luxusního koření, které se objevovalo v jídelníčku pouze urozených a šlechty. ^{[2][3][4]}

To se plně změnilo v průběhu 19. století, kdy byl med cukrem téměř vytlačen. I tak má med své místo v tradiční medicíně, kde je používán pro své antibakteriální účinky (krytí ran, popálenin, vředů). Dodnes je často používán při zmírnění obtíží během laryngitidy (antiseptické účinky). ^{[2][3][5]}

Nejvíce zastoupenými prvky v medu jsou sodík a draslík. Hned na další příčce se však umísťuje právě stanovovaný vápník a hořčík. Jejich poměr se u každého medu liší. Oba tyto prvky jsou pro lidské tělo prospěšné. Jejich přebytek, nebo naopak nedostatečný příjem, však může tělu uškodit. ^{[6][7][8]}

Pro stanovení byla použita metoda F-AAS (atomová absorpční spektrometrie s plamenovou technikou atomizace). Jedná se o rychlou metodu, která umožňuje stanovit prvky o velmi nízké koncentraci. Značnou výhodou této metody je metoda plamenové atomizace. Jednotlivé složky vzorku jsou atomizovány pomocí plamene o vysoké teplotě. Následně je vybrán vhodný (specifický) zdroj primárního záření – výbojka s dutou katodou. Každý posuzovaný prvek má svou charakteristickou výbojku. Díky tomu detektor během měření zaznamenává přítomnost pouze daného stanovovaného prvku. ^{[9][10]}

Vzorky, které byly použity pro analýzu, pochází především od malých lokálních včelařů (pouze dva vzorky byly zakoupeny v obchodním řetězci). Podle studií, které byly nalezeny během literární rešerše, je možné očekávat, že květové medy budou bohatší na vápník. Naopak medovicové medy budou obsahovat vyšší podíl hořčíku. ^{[11][12][13][14][15]}

1 Cíl práce

Hlavní náplní a cílem práce bylo stanovení vápníku a hořčíku v jednotlivých vzorcích medů za pomoci atomové absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací (F-AAS). Mezi další dílčí cíle patřily následující body:

- Optimalizace pracovních podmínek měření – pro vápník i hořčík (výška paprsku nad hranou hořáku, průtoková rychlost acetylenu)
- Stanovení základních charakteristik měření – pro vápník i hořčík (opakovatelnost, citlivost, mez detekce (*LOD*), mez stanovitelnosti (*LOQ*))
- Provedení stanovení vápníku a hořčíku v jednotlivých vzorcích medu a následné vyhodnocení výsledků
- Porovnání získaných výsledných koncentrací mezi jednotlivými druhy medu
- Porovnání získaných výsledných koncentrací s výsledky zahraničních studií

2 Teoretická část

2.1 Atomová absorpční spektrometrie (AAS)

Atomová absorpční spektrometrie je jedna z velmi často používaných metod pro prvkovou analýzu. Pomocí AAS je možno stanovit až 68 různých prvků – jak kovů, tak ale i polokovů (arsen, selen, antimon atd.).^[16] Metody, které jsou založeny na principu AAS, jsou jedny z nejmladších fyzikálně-chemických metod. První analytický atomový absorpční spektrometr byl sestaven roku 1953 Alanem Walshem.^[10] Pro stanovení je využita platnost Lambert-Beerova zákona a spektrální oblast v rozsahu 190 až 900 nm.^[16] V dnešní době je AAS v praxi využívána v několika provedeních dle použitého způsobu atomizace – plamenová atomová absorpční spektrometrie (Flame-atomic absorption spectrometry F-AAS) a elektrotermická atomizace v AAS (Electrothermal atomisation-atomic absorption spectrometry ETA-AAS).^[10] Metody AAS jsou využívány pro stanovované koncentrace v řádu 10^{-3} až 10^{-6} g/l (v ideálních případech pro ještě nižší koncentrace). Metoda AAS je velmi rychlá a velmi selektivní.^[9]

2.1.1 Atomová spektra

Spektrometrické stanovení je možné provádět pouze pro vzorky v plynné fázi. Každý vzorek je proto nejprve atomizován (rozložen a stanovované prvky jsou převedeny do zmiňované plynné fáze). V tento moment vzniklé atomy nevykazují žádné rotační či vibrační přechody, jediným možným přechodem jsou přechody mezi elektronovými stavy. Ty se projeví ve spektru a výsledná spektra se tedy jeví jako čárová.^[9]

Měřený analyt (v plynné fázi) je excitován pomocí fotonů ze zdroje primárního záření. Míra absorpce závisí na volbě vlnové délky. Ta musí odpovídat energetickému rozdílu mezi výchozí (základní) a excitovanou hladinou, do které valenční elektron přechází. Počet získaných čar ve spektru koreluje s počtem valenčních elektronů. Pro každý prvek existuje charakteristická vlnová délka.^{[9][10]}

2.1.2 Základní vztahy

Atomy prvku jsou ozařovány svazkem monochromatického záření (fotony o dané energii). Jak bylo zmíněno již výše – k absorpci dochází v momentu, kdy energie přijatého fotonu při absorpci současně odpovídá energetickému rozdílu hladin. Energii fotonu je možno vyjádřit dle vztahu:

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (1),$$

kde E_1 představuje hodnotu energie excitovaného stavu [J], E_0 značí energii základního stavu [J], h představuje Planckovu konstantu ($h = 6,6260 \cdot 10^{-34}$ J·s), ν je frekvence záření [Hz], c symbolizuje rychlost světla ($c_{\text{vakuum}} = 2,997 \cdot 10^8$ m/s) a λ značí vlnovou délku záření [nm]. [10]

Pomocí naměřených hodnot absorbance a znalosti Lambert-Beerova zákona je možné vypočítat koncentraci daného roztoku. Lambert-Beerův zákon je vyjádřen pomocí vztahu

$$A = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (2),$$

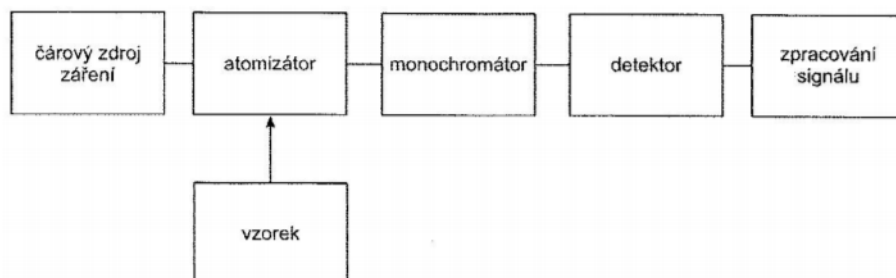
kde A představuje hodnotu absorbance [/], ε_{λ} značí molární absorpční koeficient [l/cm·mol], c symbolizuje hodnotu koncentrace absorbance [mol/l], a d představuje tloušťku absorpční vrstvy absorbance [cm]. Absorbance je veličina, která je lineárně závislá na koncentraci absorbující látky. [17]

2.1.3 Princip AAS

Atomová absorpční spektrometrie je metoda kvantitativní prvkové analýzy, během které je využito měření absorbance elektromagnetického záření volnými atomy prvků. Pro AAS je typické využití čárových zdrojů záření (emitují energii v úzkém spektrálním intervalu). Předložený vzorek je zmlžen a přiveden do plamene atomizátoru, kde dojde k rozdělení vzorku na jednotlivé atomy v plynné fázi. [18] Ty absorbují vlnové záření specifických vlnových délek. [5] Monochromátor slouží k izolaci záření o požadované vlnové délce. [19] Ta je změřena detektorem. Následně dojde k převedení na hodnotu absorbance. [10]

2.1.4 Instrumentace AAS

Atomový absorpční spektrometr je složen ze zdroje záření, atomizátoru, monochromátoru a detektoru záření. Ten následuje vyhodnocovací zařízení (počítač), které zpracuje výsledný signál. [16] Instrumentace AAS byla popsána blokovým schématem (viz Obr. 2.1).



Obr. 2.1 - Schéma atomového absorpčního spektrometru [16]

Zdroj záření

Výbojka s dutou katodou HCL

Zdroj záření vyzařuje energii v úzkých spektrálních intervalech. Nejčastěji používaným zdrojem záření je výbojka s dutou katodou (HCL – hollow cathode lamp).^[10] Každý stanovovaný prvek má svou specifickou výbojku s dutou katodou. Jedná se o skleněnou trubičku, která obsahuje křemenné okénko naplněné neonem či argonem o nízkém tlaku. Uvnitř katody se nachází dvě elektrody – katoda a anoda.^[16]

Katoda výbojky je vyrobena ze stanovovaného prvku nebo z prvku s chudým emisním spektrem (nejčastěji hliník), jehož povrch je pokryt vrstvičkou právě stanovovaného prvku. Anoda je vyrobena z prvku, který je schopen odolat vysokým teplotám (vyznačuje se vysokou teplotou tání – W, Ti, Ta, Zr).^[10] Nevýhodou HCL výbojek je, že slouží nejčastěji ke stanovení pouze jednoho prvku. Existují však i víceprvkové výbojky (ke stanovení maximálně 6 prvků). I tak je laboratoř nucena pro každý stanovovaný prvek pořídit příslušnou HCL výbojku.^{[16][20]}

Bezelektrodová výbojka EDL

Dalším zdrojem záření může být bezelektrodová výbojka (EDL – electrodeless discharge lamp). Ta je tvořena skleněnou baňkou s plnicím plynem (argon nebo neon), analyzovaným kovem a jodidem tohoto kovu (či jeho jinou těkavou sloučeninou).^[10] Její výhodou oproti HCL výbojce je o řád vyšší intenzita emitovaného záření. Nevýhodou je bohužel vyšší cena a její menší životnost.^[16]

Kromě těchto dvou výbojek je také možné použít i kontinuální zdroj (vysokotlaká xenonová výbojka). Ta je schopna analyzovat všechny prvky. Pro její použití je však nutné, aby daný spektrometr obsahoval monochromátor s vysokým rozlišením.^[16]

Atomizátor

V atomizátoru dochází k atomizaci vzorku (převedení vzorku do plynného atomového stavu) a následné absorpci primárního záření. Existuje několik druhů atomizátorů.^[16] Kapalný vzorek je do plamene zaváděn pomocí pneumatického zmlžovače. Jeho nevýhodou je relativně vysoká spotřeba vzorku (5 ml/min). Tu je možné snížit využitím techniky průtokové injekční analýzy. Účinnost zmlžování je možno zvýšit využitím tzv. nebulizéru (tenká kapilára, kterou proudí nosný proud se vzorkem).^[10]

Plamenová atomizace (FA – flame atomization)

Předložený vzorek je převeden do kapalné formy. Vzniklý roztok je nasáván do pneumatického zmlžovače, ve kterém dochází ke vzniku aerosolu daného roztoku. Následně se aerosol mísí s palivem a je přiveden do štěrbinového hořáku. Délka jeho štěrbinou se volí individuálně tak, aby rychlost proudění směsi byla vždy vyšší než rychlost hoření. ^[16] Nejčastěji používaným palivem jsou směsi acetylen-vzduch a acetylen-oxid dusný. ^[10]

Elektrotermická atomizace (ETA – electrothermal atomization)

Během elektrotermické atomizace dochází k atomizaci jednorázové dávky vzorku. Vzorek je atomizován v kyvetě. ^[16] Ta je umístěna v optické ose spektrometru a je vyrobena z elektricky vodivého materiálu, který je velmi chemicky i mechanicky odolný při vysokých teplotách (grafit, wolfram, molybden). ^[10] Trubičkou prochází elektrický proud. Dochází tak tedy k jejímu zahřívání v prostředí argonu a následně k atomizaci vzorku. ^{[10][16]} Vzorek je předložen ve vialkách a následně dávkován pomocí automatického pneumatického dávkovače. Výhodou této metody atomizace je velmi malá spotřeba vzorku (v řádech jednotek až desítek μl) a možnost analyzovat také suspenze a pevné vzorky. ^[16]

Technika generování a atomizace těkavých sloučenin

Jedná se o třetí možnou variantu atomizace vzorku. Analyt je pomocí chemické reakce nejprve převeden na těkavou sloučeninu (nejčastěji hydrid). Ta je následně atomizována ve speciálním křemenném atomizátoru. Tato metoda je vhodná pouze pro prvky, které jsou schopny tvořit hydridy (As, Se, Te, Sn, Pb, ...). Výhodou této metody je možnost oddělení analytu od matrice (ta částečně omezuje možné interference matrice vzorku). Citlivost této metody je srovnatelná s elektrotermickou atomizací ETA. Speciální technikou této metody je tzv. technika studených par HG-AAS (generace plynné elementární rtuti). ^[10]

Podle typu zvolené atomizace vzorku rozlišujeme atomovou absorpční spektrometrii na F- AAS, ET-AAS a HG-AAS.

Monochromátor

Jedná se o disperzní systém, díky kterému je možné izolovat úzký pás daných vlnových délek z polychromatického zdroje. Monochromátor je tvořen disperzním prvkem (hranol či mřížka), sérií zrcadel (čoček) a vstupní a výstupní štěrbinou. Ty mají většinou stejnou šířku. ^[49] Nejčastěji se jako monochromátor záření používají holografické (interferometricky zhotovené) mřížky. Ty izolují vlnové délky v rozsahu 190-900 nm. ^[10]

Detektor

Jako detektor je nejčastěji využíván fotonásobič. Ten detekuje fotony, které na něj dopadají a zesiluje jejich signál. [35] Ten je následně zpracován analogovým zařízením či je převeden na digitální formu určenou k dalšímu matematickému zpracování. [10]

Fotonásobič je tvořen ze skleněné evakuované baňky, která obsahuje anodu, katodu a systém dynod (jednotlivé elektrody). Jeho výhodou je velká citlivost a nízká časová konstanta ($10^{-8} - 10^{-9}$) – tudíž je možno provádět rychlá měření. [10]

2.2 Vápník

Vápník (lat. *calcium*) je šedobílý kov alkalických zemin. Jeho protonové číslo je 20. V periodické tabulce je tedy proto umístěn ve 2. skupině a 4. periodě (II. A skupina). Konfigurace jeho valenčních elektronů je $4s^2$. Vápník má 8 izotopů ($^{40}\text{Ca} - ^{48}\text{Ca}$). Poprvé byl připraven elektrolyticky v roce 1808 sirem Humphrym Davym. V přírodě ho nenalezneme v elementární podobě. Vyskytuje se pouze ve sloučeninách, a to v Ca^{2+} mocenství. [21]

Vápník je pátý nejrozšířenější prvek v zemské kůře (3,25 %) a jeden z celkově nejrozšířenějších prvků na zemi. Je tudíž značnou součástí minerálů. Nalezneme ho ve formách kalcitu (vápenec) CaCO_3 , sádrovce $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, kazivce (fluorit) CaF_2 či jako apatit $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{Cl}, \text{F}, \text{OH})$. V kombinaci s hořčíkem tvoří minerál zvaný dolomit $\text{CaCO}_3 \cdot \text{MgCO}_3$. [22] Mineralogové prozatím popsali více jak 1400 minerálů, ve kterých byl vápník obsažen. Kromě minerálů ho nalezneme také ve vodě (tvoří až 0,16 hm.% mořské vody). Spolu s hořčíkem zpříčiňuje její tvrdost. Další využití má vápník také ve formě peroxidu vápníku CaO_2 (hnojivo) či jako manganistan vápenatý $\text{Ca}(\text{MnO}_4)_2$ (bělicí zubní pasty). [21]

Hlavním zdrojem vápníku je především chlorid vápenatý CaCl_2 (je získáván pomocí elektrolýzy právě zmíněného CaCl_2). [22]

2.2.1 Vliv vápníku na organismus

Vápník je jedním z důležitých prvků, bez kterého by lidské tělo nemohlo fungovat. Má vliv na správné fungování oběhového systému, práci svalů (aktivuje troponin – umožňuje svalovým vláknům provést svalový stah), uvolňování hormonů, regulaci propustnosti buněčných membrán či se také podílí na sekreční činnosti exokrinních žláz. [6][7][24][25][26] Dále se také podílí na srážlivosti krve. [8] Jeho přítomnost je nutná k přenosu nervových vzruchů. [8]

Doporučená denní dávka vápníku závisí na věku a zdravotním stavu jedince. Denní doporučená dávka pro dospělé osobu se pohybuje přibližně okolo 1000 mg vápníku, pro těhotné ženy či ženy starší 50 let je pak doporučená denní dávka vyšší (až 1200 mg).^{[6][7]}

Celkem až 99 % vápníku je uloženo v zubech a kostech. Zbývající jedno procento se nachází v krevním oběhu a ostatních buňkách.^{[24][25][26]} V případě nedostatku vápníku je tento deficit projeven řadou onemocnění lidského těla – osteoporózou (řidnutí kostí), osteopenií (předcházející lehčí forma osteoporózy), osteomalcií (měknutí kostí) či vypadávání zubů a tvorba zubních kazů. Nedostatek vápníku u malých dětí může způsobit až zastavení vývoje a růstu. Aby se těmto onemocněním zabránilo, je nutné konzumovat potraviny bohaté na vápník (tělo není schopno si ho samo vyrobit) – mléčné výrobky, listová zelenina, bílé fazole, lososovité ryby, chléb či cereálie.^{[6][7]} Získaný vápník je vstřebáván v tenkém střevě. Jeho absorpce je značně ovlivněna vitamínem D₃.^{[24][25][26]}

Pokud má tělo nedostatek vitamínu D₃, tak i jeho účinné zpracování vápníku bude nedostatečné. Tato situace je nebezpečná především pro osoby s laktózovou intolerancí a vegany.^{[6][7]} V tomto případě hrozí riziko hypokalcemie (nedostatek vápníku). S hypokalcemií bývá obvykle spojován také nedostatek hořčíku a vitamínu D₃. Výsledkem dlouhodobého deficitu je výskyt vývojových poruch (u dětí křivice) a osteoporózy (u starších lidí).

Opakem této situace je hyperkalcemie (nadbytek vápníku). Ta může způsobit plynatost, zácpu, nadýmání, nauzeu či artrózu. Ve spojitosti s hyperkalcemií je také často uváděno zvýšené riziko ledvinových kamenů a psychických poruch.^[24]

Byly také provedeny studie, které pozorovaly, jaký má vápník vliv na prevenci rakoviny. Bylo prokázáno, že u osob s optimalizovanou hladinou vápníku a vitamínu D došlo ke snížení rizika rakoviny oproti druhé pozorované skupině, které bylo podáváno pouze placebo.^[26]

2.3 Hořčík

Hořčík (lat. magnesium) je taktéž jako vápník prvek z II. A skupiny – jedná se tedy o kov alkalických zemin. Jedná se o měkký, stříbrný kov s protonovým číslem 12. Konfigurace jeho valenčních elektronů je tedy 3s². V dnešní době je známo 5 izotopů, z toho poslední dva jsou uměle připraveny (²⁴Mg – ²⁸Mg).^[27] Historický objev hořčíku je totožný s objevem vápníku. I hořčík (a současně také stroncium a baryum) byl poprvé úspěšně izolován jako čistý kov roku 1808 H. Davym (elektrolýza).^[22] Hořčík je velmi reaktivní – proto se v přírodě vyskytuje pouze ve formě sloučenin (mocenství Mg²⁺).^[27]

Množství hořčíku je téměř nevyčerpatelné. Tvoří značnou část zemské kůry (2,35 hm.%)^[27] a vyskytuje se ve velkém množství minerálů – magnezit $MgCO_3$, spinel $MgAl_2O_4$, epsomit $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, olivín $(MgFe)_2SiO_4$, dolomit (sloučenina obsahující vápník i hořčík), mastek, azbest aj. Stejně tak jako vápník je i hořčík obsažen ve vodě ($MgCl_2$).^[22]

Hořčík je technicky velmi podstatný materiál. Využívá se na výrobu slitin (konstrukční materiály – automobily, letectví, raketový průmysl) či jako reakční činidlo.^[22] Mezi nejdůležitější slitiny patří dural, elektron a magnalium.^[27]

Hořčík je možno připravit více způsoby. Nejpoužívanějším způsobem je elektrolýza (např.: směsi chloridu hořečnatého $MgCl_2$ a chloridu draselného KCl). Postup se pro elektrolytickou výrobu liší dle použité výchozí suroviny (minerálu). Druhou možností, jak prvek připravit je termická výroba hořčíku (méně časté).^[27]

2.3.1 Vliv hořčíku na organismus

Hořčík je nezbytný biogenní prvek jak pro člověka, tak pro živočichy a rostliny. Vyskytuje se v chlorofylu (zelené barvivo rostlin, Mg ve formě porfyrinového komplexu). Při nedostatku hořčíku lidské tělo pociťuje únavu, slabost, nauzeu, svalové vyčerpání. V krajních případech může dojít až ke ztrátě vědomí.^{[22][28]}

Zastoupení hořčíku v lidském těle je přibližně 0,043 % (tedy 22-30 g u dospělého jedince). Najdeme ho jak v kostech (50–60 % z celkového množství hořčíku), tak v měkkých tkáních (40–50 %).^{[29][30]}

Hořčík uložený na povrchu kostí má zásobní funkci (v případě, že by v krevním séru či měkkých tkání došlo k hořčíkovému deficitu, je zde uložený hořčík zmobilizován a transportován tak, aby došlo k vyrovnání hladin do optimálních hodnot).^{[29][30]} Hořčík je také nezbytnou součástí biochemických procesů. Hořečnaté ionty mají katalytický účinek pro více jak 300 enzymů.^[28] Dále je důležitý také pro proteosyntézu, tvorbu ATP, regulaci krevního tlaku, trávení, tvorbu kostí, pro přenos nervových vzruchů do mozku či pro správnou funkci Krebsova cyklu a dýchacího řetězce.

Doporučená denní dávka hořčíku se liší dle pohlaví a stáří jedince. U dospělých jedinců se mluví o přibližně 400–420 mg hořčíku denně (muži) a o 310–320 mg denně (ženy).^{[32][33]} V případě těhotných žen je doporučeno denní dávku hořčíku zvýšit o 15-20 %, u kojících žen pak o 20-25 %. Doporučená denní dávka pro děti se pohybuje okolo 250 mg.^{[8][34][35]}

Zvýšené dávky hořčíku se také doporučují jako prevence proti migrénám. V tomto případě by však doporučené dávky měly být konzultovány s lékařem. ^{[32][33]}

Hořčík je obsažen obdobně jako vápník v listové zelenině, luštěninách, celozrnných výrobcích, minerálních vodách, a navíc také v ořechách. Jeho vyšší podíl může být také obsažen v některých lécích – např. u laxativ (projímadla), léků proti překyselení žaludku a léků na pálení žáhy. ^{[28][32][33]}

Je nutné udržovat hladinu hořčíku v povoleném rozsahu. Při jeho nadbytku dochází k tzv. hypermagnezémii. Její výskyt je velmi vzácný – ledviny umí totiž přebytečný hořčík velmi efektivně a rychle zpracovat. Nejčastěji se proto vyskytuje u osob s onemocněním ledvin (tyto osoby by proto neměly užívat doplňky stravy s obsahem hořčíku). Předávkování hořčíkem se vyznačuje dušností, nauzeou, zvracením, průjmy, svalovou slabostí, nízkým krevním tlakem až v krajních případech srdeční zástavou. Jako antidotum je v tomto případě intravenózně podáván glukonát vápenatý. V případě nefunkčnosti ledvin je vhodným řešením dialýza. ^{[32][33]}

Opakem této problematiky je hypomagnezémie (hořčíkový deficit). K němu dochází při nadměrném užívání alkoholu, opakovaném zvracení (bulimie, těhotenství) a kojení. Důsledkem nedostatku hořčíku jsou deprese, samovolné záškuby svalů (fascikulace), křeče (spasmy), arytmie, vysoký krevní tlak, migrény, zhoršená koncentrace, nervozita, úzkosti, chronická únava a slabost. ^[28] Hořčíkový deficit také nabourává metabolismus sodíku, draslíku, vápníku a fosfátů. ^{[8][34][35]}

2.4 Med

2.4.1 Definice medu

Laicky by bylo možné med definovat jako sladkou a lepkavou tekutinu, která je produkována včelami. Podle směrnice Evropského parlamentu a Rady je med definován jako „*sladká látka produkována včelami medonosnými z nektaru rostlin nebo výměšků hmyzu sajícího na rostlinách, které včely sbírají, přetvářejí mísením se svými vlastními specifickými látkami a ukládají, nechávají dehydratovat, uležet a zrát v medových plástech*“. ^[36]

Med můžeme rozlišovat dle několika hledisek – dle původu (květový či medovicový), či dle způsobu získávání či obchodní úpravy (plástečkový med, vykapaný med, vytočený med apod...). ^[36] Vzhledem k zaměření bakalářské práce se budeme zabývat pouze rozlišením medu na základě jeho původu. Med je pro včely především zásobárnou energie. Aby byly včely schopné přečkat zimu, stačí jim přibližně 1 kg medu na měsíc. ^{[2][37]}

2.4.2 Typy medů

Existuje několik typů medů. Základním rozlišením se med dělí na květový a medovicový. Pokud květový med pochází pouze z jednoho druhu rostlin je označován dle typu dané rostliny – bezový, lipový nebo například jetelový med. [3]

Med květový

Květový med zpracovávají včely z nektaru z květů rostlin. [37] Nektarem je chápán roztok cukrů, který je tvořen seskupením speciálních buněk (nektaria). Med bývá zlatavější světlejší barvy než medovicový med. Také je sladší, obsahuje více cukrů a také rychleji a jemněji krystalizuje. [3]

Med medovicový

Medovicový med je tvořen z medovice, kterou vylučují například mšice či puklice. Jedná se o sladkou a lepkavou substanci na listí a jehličí stromů. [4] Medovicový med obsahuje oproti tomu květovému méně cukru. Naopak je však bohatší na rostlinná barviva, minerální látky a vyznačuje se menší kyselostí. [4][38] Jeho tmavost je způsobena látkami a barvivy, které jsou obsaženy v míze lesních dřevin. [37] Jeho krystalizace je mnohem pomalejší než u květového medu – vytváří se velké hrubé krystaly, které se postupně usazují u dna nádoby. Také má ostřejší chuť a výrazné aroma. [38]

Smíšený med

Jedná se o kombinaci obou předchozích medů. Vyznačuje se zlatavou barvou. Pojem „smíšený“ však nepředstavuje med nižší kvality, ba naopak. Jedná se o takový med z období, kdy se překrývá například květová snůška např. černého bezu se snosem medovice z lesa. [39]

2.4.3 Složení medu

Med je tvořen především cukry – glukózou (27 – 44 %) a fruktózou (22 – 41 %), dále pak vodou (přibližně 18 %), dalšími cukry – maltóza, sacharóza (1 – 14 %, podle typu medu), minerálními látkami, proteiny, vitamíny a aminokyselinami. [10] Může nastat situace, kdy je podíl vody v medu vyšší (více jak 18 %) – tento med se poté nazývá nevyzrálý. Díky vyššímu obsahu vody je poté mnohem náchylnější ke kvašení. [38][39][40] Složení medovicového a květového medu se liší (viz Tab. 2.1).

V medu se vyskytují i některé kyseliny (jejich přítomnost ovlivňuje pH medu). Enzymatickou oxidací glukózy vzniká kyselina glukonová. Dalšími přítomnými kyselinami jsou kyselina citrónová, jablečná a jantarová. Chuť medu pak ovlivňuje přítomnost

aminokyselin. Jejich přítomnost a obsah umožňují určit geografický původ medu. Nejvíce zastoupenou aminokyselinou v medu je prolin. ^{[38][39][40]}

2.4.4 Minerální látky v medu

Obsah minerálních látek činí maximálně 1 %. Obecně je známo, že medovicové medy obsahují vyšší podíl minerálních látek než medy květové. V případě medovicových medů hovoříme o obsahu minerálních látek v rozmezí 0,6 – 2 %. U květových medů se potom jedná o 0,2 – 0,5 %. ^{[3][38][39][40]}

Nejvíce zastoupeným prvkem v medu je draslík. Dalšími prvky, které se v medu hojně vyskytují, jsou sodík, vápník, hořčík, ale také i síra a fosfor. Příkladem medů, které jsou velmi bohaté na vápník a hořčík, je avokádový med či med pocházející z kaštanu či vřesu (tmavé medy – tmavá barva potvrzuje zvýšený výskyt hořčíku). Naopak menším obsahem těchto prvků se vyznačuje například med z eukalyptu či tymiánu (světlé medy). ^[1]

Obsah minerálních látek v medu ovlivňuje jak barvu, tak ale i kyselost medu (jeho pH). Medovicový med se vyznačuje pH okolo 6,1 a tmavým zbarvením. To je způsobeno vyšším obsahem manganu, železa a mědi. Květové medy obsahují těchto prvků méně, proto i jejich barva je světlejší. Jejich pH se pohybuje okolo 3,4. Informace o složení těchto dvou typů medu byly pro větší přehlednost a pro lepší porovnání zaznamenány do tabulky (viz Tab. 2.1). ^{[38][39][40]}

Tab. 2.1 – Obsah prvků v květovém a medovicovém medu ^{[38][39][40]}

Minerální látky [mg/kg]	Květový med	Medovicový med
Draslík	205	1676
Sodík	18	76
Vápník	49	51
Hořčík	19	35
Železo	2,4	9,4
Mangan	0,3	4,1
pH	3,4	6,1

Složení medu je také ovlivněno jeho původem. Hlavním zdrojem kovů v medu je půda v okolí lokace, kde byl med sbírán. Minerální látky pochází z nektaru, pylu a medovice. Rostliny je čerpají z půdy pomocí svých kořenových systémů. Včely minerální látky ani kovy

do medu nikterak nepřidávají, pouze med obohacují o výměšky ze svých žláz, které slouží ke správnému zpracování medu. ^{[1][15]}

2.4.5 Faktory ovlivňující složení medu

Složení každého medu je ojedinělé a jedinečné. Díky tomu je možné zjistit geografický původ medu a v jakém období byl med přibližně sbírán. Jeho složení je ovlivněno několika různými faktory:

- Geochemické a geologické vlivy (vulkanická a hydrotermální činnost)
- Regionální podmínky a klimatické změny
- Půda v oblasti krmné plochy včel
- Typ medových rostlin (jejich květinový původ)
- Výživa včel
- Zdravotní stav včel
- Způsob zpracování medu ^[1]

Půda v oblasti krmné plochy včel

Jak již bylo zmíněno, lokalita, ze které med pochází, je značně podstatná pro jeho složení. V případě přímořských oblastí nebo ostrovů se v důsledku mořského aerosolu daný med vyznačuje vyšším procentem obsahu sodíku a draslíku (koncentrace alkalických kovů mohou být tedy až 10x vyšší oproti koncentracím ve vzorcích z jiných oblastí). Medové složení úzce koreluje s jeho vizuálním zbarvením. ^[41]

Některé medy mohou obsahovat zvýšené koncentrace mnohých kovů (Al, Ba, Ca, Mg, Mn, Ni, Cu, ...). Nejčastější příčinou těchto navýšených koncentrací je výskyt oceláren, dolů a průmyslových zón či pak znečištění prostředí chemickými odpady a výfukovými plyny v oblastech, které včely opylovávají. Analýza těchto složek medu však může být dobrým způsobem, jak odhalit zfalšovaný med (zředěný vodou či sirupy) nebo jak odhalit lživou informaci o jeho původu. ^[41]

Typ medových rostlin

Medy, které jsou vyrobeny z nektaru a medovic velmi aromatických rostlin, rovněž obsahují zvýšené koncentrace těžkých kovů. Důvodem je, že tyto aromatické rostliny kumulují těžké kovy a znečišťující látky mnohem jednodušeji než bylinné rostliny. ^[41]

Výživa včel

Výživa včel je jedním z dalších faktorů, který může ovlivnit složení medu. Včelám bývají často podávány výživové krmné sirupy. Ty však vykazují zvýšené koncentrace K, Na, Cd, Co, Fe a Mg. Včely je zpracovávají stejně jako med, který je pro ně jinak běžným zdrojem energie a potravy. Tudíž i tyto krmné sirupy zpracovávají za využití svých enzymů. Je to obdobný příklad, jako když my lidé jíme a potravu automaticky obohacujeme o své sliny. ^{[41][42]} Při výběru těchto krmných sirupů je vhodné zkontrolovat i jejich složení. Některé sirupy mohou kromě jednoduchých cukrů obsahovat také dextry – ty jsou však pro včely nestavitelné. Rizikem těchto tekutých krmných sirupů je jejich krystalizace po zahuštění včelami a uložení v plástech v období zimy. Pokud došlo k zatuhnutí jejich zimních zásob, může dojít k zeslabení až úhynu včelstva. Kromě krmných sirupů mohou mít vliv na složení medu také pylové náhražky (další doplněk stravy) či léčiva (antibiotika). ^{[42][43][44]}

Zdravotní stav včel

Včely mohou trpět různými onemocněními virového, bakteriálního či houbového původu. Jedním z nejčastějších onemocnění je virová paralýza včel. Paralyzované včely jsou napadány zdravými včelami, ty se nakazí a nemoc se šíří dál. Nakažené včely většinou nemohou létat a je možné u nich pozorovat charakteristický třes a záškuby těla. ^{[1][45][46][47]}

Dalším onemocněním, se kterým se včely setkávají, je varróza. Jedná se o nemoc způsobenou roztočem kleštíkem včelím. V dnešní době je možné využít chemickou léčbu akaricidy či fyzikální a mechanické metody léčby. ^[48]

Mezi bakteriální onemocnění patří hniloba včelího plodu či mor včelího plodu. Obě tyto onemocnění jsou celosvětově rozšířená. V ČR je však díky radikálnímu postupu včelařů jejich výskyt menší než ve světě. Mor včelího plodu je nejzávažnější možná bakteriální choroba. Její výskyt je pro včelstvo likvidační a včelař má ohlašovací povinnost. Onemocnění se šíří velmi rychle. Nakažené včelstvo, ale stejně tak všechny pomůcky a nářadí, se kterými přišlo včelstvo do styku, je proto nutno spálit. ^{[1][45][46][47]}

Onemocnění, se kterými se včelstvo může potkat, je tedy spousta. Proti většině z nich existuje i mnoho léčiv a antibiotik. Například na Ukrajině, v Bělorusku či USA jsou běžně používány antibiotika proti moru včelího plodu. Nemoc však plně nevyhladí, pouze utlumí klinické příznaky tohoto onemocnění. Ty však po odeznění dávky antibiotik znovu propukají. U těchto antibiotik se však bohužel jedná o látky, které pak mohou zůstat v medu (mohly

by ovlivnit složení a vlastnosti medu) – z tohoto důvodu je použití jakýchkoliv antibiotik v Evropské unii zakázáno. ^[44]

Způsob zpracování medu

Složení medu může být ovlivněno také při jeho zpracování. Během něj může dojít k uvolnění některých kovů z nástrojů, které včelaři ke zpracování používají. Jedné se o uvolnění např.: Al, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Ni a Zn z materiálů jako jsou nerezová ocel, pozinkovaná ocel či hliník. Nástroje vyrobené z těchto materiálů jsou nejčastěji používány na sklizeň, výrobu a následnou úpravu medu (extrakce, zrání) či na jeho uchovávání a přepravu. Med se vyznačuje svým kyselým pH, čímž je posílen korozivní účinek těchto materiálů a následný proces uvolňování zmíněných prvků do vzorku medu. ^[1]

2.4.6 Konduktivita medu

V praxi může nastat situace, kdy je nutné zjistit, s jakým typem medu jsme přišli do styku. Prvková analýza je však v této situaci velmi drahá a zbytečná. Pro rozlišení typu medu (květový nebo medovicový) nám bohatě postačí změření elektrické vodivosti (konduktivity medu). Ta se měří ve 20% roztoku medu, do kterého jsou předloženy dva plíšky. Následně je měřena vodivost roztoku. Ta je způsobena přítomností minerálních látek. Včely však často tyto dva typy medu míchají. I přesto je nutné na etiketu uvést typ medu, který převažuje. Mezi těmito dvěma typy medů je tedy stanovena hranice 80 mS/m. Pokud je změřená konduktivita menší než 80 mS/m, tak se jedná o květový med. V opačném případě (vodivost je větší než 80 mS/m) se jedná o vzorek medovicového medu. ^[3]

2.4.7 Med jako bioindikátor životního prostředí

Dle Směrnice rady 2001/110/ES ze dne 20.12.2001 o medu je jasně řečeno, že med je přírodní produkt včel a nesmí do něho být přidány žádné další látky (s výjimkou jiného druhu medu). ^[36] Med obsahuje nízké koncentrace minerálních látek a kovů, které pochází ze sebraného nektaru a medovice. Pokud dojde ke kontaminaci prostředí, bude tato kontaminace znatelná také na složení a kvalitě medu. Díky složení medu je možné určit kontaminaci ovzduší, vody, rostlin a půdy nad plochou, kterou včely opylovávají. Vzhledem k tomu, kolik vnějších faktorů může med ovlivnit, není vhodné ho považovat za citlivý biomarker. Výjimkou by byla pouze situace v případě velmi silné kontaminace životního prostředí. ^[1]

2.4.8 Stanovení vápníku a hořčíku ve vzorcích medu

V dnešní době existuje již mnoho publikací a článků, které se zabývají složením medu. Cílem mé bakalářské práce bylo zjistit, jak velmi se mění složení medu (především stanovený obsah vápníku a hořčíku) dle typu medu a lokace sběru. Pro porovnání svých dat jsem si vybrala jednu ze studií, která se zabývala složením medu v různých zemích. Získané informace o naměřených koncentracích vápníku a hořčíku byly zaznamenány do tabulky (viz Tab. 2.2). Ze studie byly vybrány pouze ty země, u kterých byly uvedeny stanovené hodnoty pro oba prvky. V tabulce jsou uvedené rozmezí stanovených koncentrací – ty se mohou měnit na základě různých faktorů (viz 2.4.5 Faktory ovlivňující složení medu).

Tab. 2.2 – Koncentrace vápníku a hořčíku stanovené v medech z různých zemí ^[45]

Stát	c(Ca) [μg/g]	c(Mg) [μg/g]
Česká republika	11,2 – 142	18,4 – 89,0
Francie	3,00 – 108	1,40 – 110
Irsko	74,9 – 175	18,9 – 53,3
Itálie	9,10 – 409	3,90 – 159
Makedonie	4,10 – 170	4,40 – 182
Polsko	3,30 – 159	1,10 – 19,8
Španělsko	13,8 – 341	3,60 – 230
Turecko	3,30 – 900	2,00 – 111

V další nalezené studii byl stanovován obsah celkem 12 prvků ve 30 vzorcích medu (všechny původem z Polska). Stanovení bylo provedeno pomocí metody F-AAS. Průměrná koncentrace stanovovaného vápníku činila 3,3 – 159,2 mg/kg, u hořčíku se pak jednalo o 0,07 – 19,83 mg/kg. Studia prokázala, že medovicové medy obsahují mnohem vyšší koncentrace sodíku a hořčíku než medy řepkové (ty zase naopak obsahují vyšší koncentrace vápníku). Naměřené hodnoty vápníku a hořčíku byly ale téměř až 10x nižší než hodnoty uvedené v porovnávací studii Golob et al. A Devillers et al. Vzorky medu byly během měření a vyhodnocení jasně rozděleny na dvě skupiny dle složení. Bylo prokázáno, že složení řepkového a medovicového medu se mění s ohledem na původ medu. ^[15]

Další porovnávanou studií byla studie zabývající se složením medů ze Španělska. V ní bylo vybráno 8 různých vzorků medů (kaštanový, tymiánový, avokádový, rozmarýnový med a další), u kterých bylo porovnáváno celkem 7 prvků – K, Na, Ca, Mg, Zn, Fe a Cu. Prvky

byly stanovovány pomocí metody F-AAS. Měření pro každý vzorek bylo provedeno třikrát. Nejvíce zastoupeným prvkem ve všech předložených vzorcích byl draslík. Na další příčce se pak umístily sodík, hořčík a vápník. Stanovené rozpětí koncentrací vápníku a hořčíku v různých vzorcích medu byly pro lepší přehled zaznamenány do tabulky (viz Tab. 2.3). Přítomnost dalších stanovovaných prvků není vždy automatická. Železo bylo stanoveno pouze ve vzorku kaštanového a tymiánového medu. Například měď však nebyla ve vzorcích vůbec detekována. Opět bylo potvrzeno, že tmavší medy (tymiánový, avokádový, kaštanový a vícekvětný med) obsahují vyšší podíl minerálních látek než medy světlé (rozmarýnový med a med z pomerančového květu). Stanovené koncentrace draslíku se mezi těmito dvěma typy medů velmi liší. ^[13]

Tab. 2.3 – Stanovené koncentrace vápníku a hořčíku ve vzorcích španělských medů ^[13]

Typ medu	c(Ca) [mg/kg]	c(Mg) [mg/kg]
Kaštanový	111,42 ± 1,12	1078,95 ± 10,55
Rozmarýnový ^a	38,66 ± 0,24	70,48 ± 0,82
Rozmarýnový ^b	15,14 ± 0,07	42,11 ± 0,19
Tymiánový	181,69 ± 0,40	341,74 ± 2,30
Avokádový	55,97 ± 0,010	623,58 ± 3,73
Med z pomerančového květu	43,10 ± 0,65	54,15 ± 0,96
Vícekvětný	115,77 ± 0,31	267,13 ± 0,90

^a – vzorky značky Consejo Regulador „Miel de Granada“

^b – vzorky poskytnuty místními včelaři ^[11]

Další studií byla studie porovnávající 116 vzorků jednokvětých a vícekvětných medů. Celkem 81 vzorků bylo původem z Kanárských ostrovů (62 z nich pocházelo z Tenerife). Původ vzorků se lišil – byly buď zakoupeny od značky Casa de la Miel (Tenerife) či získané od lokálních včelařů. Obsah vápníku a hořčíku ve vzorcích byl stanovován pomocí metody F-AAS. Vzorky uvedené ve studii, byly připravovány obdobným způsobem, jako mé vzorky během experimentální části této bakalářské práce. Hodnoty koncentrací vápníku a hořčíku získané z této studie byly pro lepší přehlednost zaznamenány do tabulky (viz Tab. 2.4). ^[14]

Tab. 2.4 - Stanovené koncentrace vápníku a hořčíku ve vzorcích medu pocházejících z Kanárských ostrovů ^[14]

Původ medu	c(Ca) [mg/kg]	c(Mg) [mg/kg]
Tenerife	74,4	49,6
Palma	82,0	35,2
Hierro	57,3	30,6
Gomera	76,0	38,6
Mimo Kanárské ostrovy	74,5	28,4
Průměrná hodnota všech vzorků	74,8	41,0

Fabíola Carina Biluca a její kolegové prováděli studii zabývající se přítomností různých fenolových sloučenin ve vzorcích medů původem z Brazílie. Kromě těchto organických sloučenin stanovovali také obsah minerálních prvků. Pro stanovení bylo použito 13 vzorků z celkem 3 lokací. Koncentrace vápníku byly stanoveny v rozmezí 88,6 – 138 $\mu\text{g/g}$. Rozmezí pro stanovené koncentrace hořčíku bylo rozsáhlejší a to 25,9 – 231 $\mu\text{g/g}$. ^[11] Naměřené hodnoty v podstatě potvrdily předchozí studii Fabíoly Bilucy. ^[12]

Moringa olejodárná a med jsou obě velmi nutričně bohaté přírodní složky. V roce 2021 Hadju, Dassir, Putranto a Sadapotto provedli studii, která se zabývá chemickým složením listů Moringy a medu získaného v okolí jeho růstu. Moringa je „záračným stromem“ – lidé z něho dokáží spotřebovat úplně vše (i kořeny). Současně je to také skvělá zásobárna vody v období sucha v nehostinných podmínkách. Moringa obsahuje látky, které jsou používány ve farmakologii. Chemické složení listů Moringy se liší obdobně jako složení medu (záleží na teplotě okolí a geografických podmínkách). ^[32]

Pro studii byly vybrány tři různé lokace výskytu Moringy olejodárné (oblast jižní Sulawesie – nejvýchodnější z ostrovů Velkých Sund, provincie v Indonésii) a medy z těchto příslušných oblastí.

Stanovení obsahu jednotlivých prvků bylo provedeno pomocí metody AAS. Stanovené koncentrace vápníku se pohybovaly v rozmezí 616–1040 ppm, u hořčíku pak v rozmezí 216 – 378 ppm (dle lokace sběru medu). ^[32]

Všechny číselné hodnoty, které byly uvedeny v tabulkách v kapitole 2.4.8 (Stanovení vápníku a hořčíku ve vzorcích medu) byly převzaty z uvedených studií a nebyly dále nikterak zaokrouhlovány či upravovány.

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

- Standardní roztok vápenatých iontů o koncentraci 1,0 g/l (Merck, Německo)
- Standardní roztok hořečnatých iontů o koncentraci 1,0 g/l (Analytika spol. s.r.o., Česká republika)
- Chlorid draselný p.a. (Lach-Ner s.r.o., Česká republika)
- Kyselina dusičná 65% p.a. (Lach-Ner s.r.o., Česká republika)
- Acetylen, čistý (Linde Gas, a.s., Česká republika)
- Oxid dusný, medicínální (Linde Gas, a.s., Česká republika)

3.2 Použité přístroje

- Analytické váhy (Sartorius, Německo)
- Automatické pipety o objemech 1000 µl až 5 ml (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Přístroj na výrobu deionizované vody Milli-Q plus (Millipore, USA)
- Spektrometr GBC 933 AA (GBC Scientific Equipment, Australia)
- Výbojky s dutou katodou pro stanovení Ca a Mg (Varian, Australia)

3.3 Použité programy

- GBC Avanta ver. 1.33

Tab. 3.1 – Neměnné parametry při měření metodou F-AAS

Parametr	Vápník	Hořčík
Vlnová délka [nm]	422,7	285,2
Šířka spektrální štěrbin [nm]	0,5	0,5

V tabulce (viz Tab. 3.1) nalezneme parametry, které byly konstantní po celou dobu experimentálního měření dat pro bakalářskou práci na spektrometru GBC 933 AA.

3.4 Vzorky medů

Pro stanovení vápníku a hořčíku ve vzorcích medů bylo použito 15 různých vzorků. Informace o jednotlivých medech byly zaznamenány do tabulky (viz Tab. 3.2). Pro experimentální měření byly použity vzorky jak od lokálních českých včelařů

(Královéhradecký kraj, Pardubický kraj, kraj Vysočina), tak vzorky z obchodních řetězců. Vzorky značené A11-A15 pocházely ze stejného místa, a to z oblasti Železných hor (Pardubický kraj).

Tab. 3.2 – Přehled informací o jednotlivých analyzovaných medech

Vzorek	Zdroj	Původ (kraj)	Lokalita	Druh medu
A1	Obchodní řetězec	-	Směs medů z a mimo EU	Květový
A2	Obchodní řetězec	-	Směs medů z a mimo EU	Květový
A3	Místní včelař	Královéhradecký	Jaroměř	Květový
A4	Místní včelař	Pardubický	Poběžovice u Holic	Medovicový
A5	Místní včelař	Královéhradecký	Třebechovice pod Orebem	Květový
A6	Místní včelař	Královéhradecký	Třebechovice pod Orebem	Květový
A7	Místní včelař	Plzeňský	Trnčí	Medovicový
A8	Obchodní řetězec	Vysočina	Nová ves u Chotěboře	Květový
A9	Místní včelař	Královéhradecký	Třebechovice pod Orebem	Květový
A10	Místní včelař	Královéhradecký	Třebechovice pod Orebem	Medovicový
A11	Místní včelař	Pardubický	Železné hory	Květový
A12	Místní včelař	Pardubický	Železné hory	Květový
A13	Místní včelař	Pardubický	Železné hory	Květový
A14	Místní včelař	Pardubický	Železné hory	Květový
A15	Místní včelař	Pardubický	Železné hory	Květový

3.5. Pracovní postup

Jednotlivé prvky byly stanoveny metodou atomové absorpční spektrometrie (AAS) s plamenovou technikou atomizace. Všechny vzorky medů byly připraveny ve stabilizačním roztoku, kterým byl 0,24% roztok kyseliny dusičné. Ten byl připraven z koncentrované 65% kyseliny dusičné a deionizované vody. Následně byl ke každému vzorku medu přidán také ionizační pufr KCl o koncentraci 20 000 ppm. Před samotným experimentálním měřením vzorků medů bylo nutné nejprve provést optimalizaci metody pro získání co nejpřesnějších výsledků a zajištění co nejmenší chyby. Proměření každého vzorku bylo provedeno třikrát.

3.5.1 Optimalizace pracovních podmínek

Byly připraveny dvě sady standardních roztoků pro každý stanovovaný prvek – sada bez ionizačního pufru (SADA 1) a sada s ionizačním pufrem KCl (SADA 2). Standardní roztok vápníku o koncentraci 1,0 mg/l byl připraven z 0,1 ml zásobního roztoku o koncentraci 1,0 g/l do 100ml odměrné baňky. Standardní roztok hořčíku o koncentraci 0,2 mg/l byl připraven z 0,02 ml zásobního roztoku hořčíku o koncentraci 1,0 g/l do 100ml odměrné baňky. Následně byla provedena optimalizace pracovních podmínek. Optimalizace výšky paprsku nad hranou hořáku byla měřena v rozmezí dílku č. 2,0 – 8,0. Rozmezí jednotlivých dílků bylo 2,5 mm. Pokud byl hořák umístěn do polohy dílku č. 8, tak paprsek přesně procházel úrovní hořáku (vzdálenost tedy byla rovna nule). Pokud byl hořák polohován do úrovně dílku č. 7,0, tak vzdálenost paprsku nad hořákem činila 2,5 mm. U dílku č. 6,0 byl paprsek od hořáku vzdálen 5,0 mm atd. Průtoková rychlost acetyleny byla měřena v rozmezí dílku č. 2,0 – 4,0 (směs acetylen-vzduch) a v rozmezí dílku č. 5,3 – 7,0 (směs acetylen-oxid dusný). Pro experimentální měření jednotlivých vzorků mědi byly vybrány ty výsledky měření optimalizace, při kterých byla získána nejvyšší hodnota absorbance (nejvyšší signál).

3.5.2 Kalibrace a zjištění základních charakteristik

Pro zjištění základních charakteristik byly připraveny dvě kalibrační sady vzorků – sada s pufrem KCl a bez něho. K získání kalibrační závislosti pro stanovení vápníku byly připraveny sady roztoků o koncentraci 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 mg/l. Kalibrační roztoky byly připraveny ředěním standardního roztoku vápníku o koncentraci 1,0 g/l. Odpipetované množství tohoto roztoku bylo převedeno do skleněné odměrné baňky a následně doplněno po rysku stabilizačním roztokem (0,24% kyselina dusičná). Stejným způsobem byly také připraveny sady kalibračních roztoků pro stanovení hořčíku. Koncentrace těchto roztoků byly 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/l. Kalibrační roztoky byly připraveny ředěním standardního roztoku hořčíku o koncentraci 1,0 g/l. Odpipetované množství tohoto roztoku bylo taktéž převedeno do skleněné uzavíratelné odměrné baňky a doplněno po rysku stabilizačním roztokem. Tímto způsobem byly připraveny kalibrační roztoky z první sady roztoků (SADA1).

Následně byly kalibrační roztoky pro oba prvky proměřeny a ze získaných hodnot byly sestaveny kalibrační grafy pro vápník a hořčík.

3.5.3 Příprava kalibračních roztoků obsahujících ionizační pufr

Sady kalibračních roztoků obsahující ionizační pufr KCl (SADA2) byly připraveny obdobně jako v předchozím bodě. Ke každému roztoku bylo před jeho doplněním po rysku stabilizačním roztokem přidáno 10,0 ml ionizačního pufru o koncentraci 20 000 ppm.

Pro stanovení základních charakteristik metody byly desetkrát proměřeny roztoky vápníku o koncentraci 1,0 a 3,0 mg/l. Stejným způsobem byly také desetkrát proměřeny roztoky hořčíku o koncentraci 0,2 a 0,6 mg/l. Získané hodnoty byly vyhodnoceny a zaznamenány do tabulky viz sekce 4. Výsledky a diskuze.

3.5.4 Příprava vzorků medů

Pro měření bylo použito 15 vzorků medů. Každý vzorek byl připraven odvážením 5,80 – 6,40 g medu. Ke vzorku bylo přidáno přibližně 30 ml stabilizačního roztoku (0,24% roztok kyseliny dusičné) a 10,0 ml KCl o koncentraci 20 000 ppm. Med byl za tepla rozpuštěn v kádince až do úplného zhomogenizování směsi. Takto připravený vzorek byl kvantitativně převeden do 50 ml uzavíratelné plastové centrifugační zkumavky a doplněn po rysku stabilizačním roztokem.

Poté bylo do 15 ml uzavíratelných plastových centrifugačních zkumavek předloženo 1,5 ml KCl o koncentraci 20 000 ppm. Následně byla zkumavka doplněna po rysku příslušným roztokem vzorku medu rozpuštěném ve stabilizačním roztoku. Takto připravené roztoky vzorků byly použity pro stanovení vápníku a hořčíku ve vzorcích medu.

Celkem 9 z 15 takto připravených vzorků však vykazovalo vysoké hodnoty absorpance při stanovení vápníku (naměřené hodnoty byly mimo kalibrační křivku). Stejný problém se také vyskytl při stanovení hořčíku – zde se však vysoké hodnoty absorpance vyskytly u všech vzorků. Všechny vzorky byly tedy ještě 20krát zředěny.

3.6 Metoda přidavku standardu

Pro ověření získaných výsledků bylo také provedeno stanovení pomocí metody přidavku standardu. Stanovení bylo provedeno pro oba prvky (vápník, hořčík) pomocí F-AAS pro všech 15 zředěných vzorků. Stejně tak jako u předchozího stanovení, bylo měření prováděno za optimálních podmínek (ty jsou shodné jako u předchozí kalibrační metody). Pro měření byly vytvořeny tři sady vzorků – sada č. 1 bez přidavku standardu (tedy stejné vzorky, které byly již použity pro předchozí stanovení), sada č. 2 s přidavkem standardu a sada č. 3 s ještě vyšším přidavkem standardu. Ke vzorkům ze sady č. 2 bylo přidáno takové množství roztoku standardu

vápníku, aby celková koncentrace vápníku byla 1 mg/l a takové množství roztoku standardu hořčíku, aby celková koncentrace hořčíku byla 0,2 mg/l. U sady č. 3 bylo postupováno obdobně, pouze požadované výsledné koncentrace byly pro vápník 2,0 mg/l a pro hořčík 0,4 mg/l.

Následně byly proměřeny všechny vzorky z těchto tří sad. Každé měření bylo provedeno třikrát. Touto metodou tak byla potvrzena správnost výsledků získaných provedením klasické kalibrační metody.

3.7 Statistické zpracování

Veškerá měření byla vždy provedena třikrát. Získané výsledky byly zpracovány, statisticky vyhodnoceny a zaneseny do tabulek a grafů (viz sekce 4. Výsledky a diskuze). Při měření byly získány vždy tři hodnoty absorbance (analytický signál). V dalším vyhodnocování byl využit aritmetický průměr z těchto tří hodnot.^[49]

Aritmetický průměr \bar{x}

Jedná se o odhad střední hodnoty všech získaných výsledků měření. Jeho hodnotu získáme pomocí následujícího vzorce

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (3.7.1),$$

kde x_i je výsledek daného i -tého měření a n značí počet měření.

Opakovatelnost (O), variační koeficient (var), relativní směrodatná odchylka (RSD)

Opakovatelnost odpovídá hodnotě relativní směrodatné odchylky. Ta je vyjádřena v procentech a je získána stonásobkem poměru směrodatné odchylky σ a aritmetického průměru \bar{x} .

$$O = var = RSD = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100 (\%) \quad (3.7.2)$$

Mez detekce (LOD)

Mez detekce je možné vyložit jako nejmenší koncentraci analytu, při které je však již vyvolána rozpoznatelná odezva měřicího systému. Pro její stanovení je třeba 10krát proměřit tentýž vzorek. Ze získaných hodnot je následně získána hodnota směrodatné odchylky. Mez detekce (LOD) lze poté vypočítat ze vztahu

$$LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{k} \quad (3.7.3),$$

kde σ představuje směrodatnou odchylku (vypočteno z 10 měření) a k značí směrnici kalibrační rovnice procházející počátkem v bodu $[0,0]$ získanou ze sestrojeného kalibračního grafu.

Mez stanovitelnosti (*LOQ*)

Mez stanovitelnosti představuje nejmenší koncentraci analytu, kterou je možné vyhodnotit s přijatelnou správností a přesností. I pro její stanovení je nutno provést 10 měření stejného vzorku. Z naměřených hodnot je stejně jako u *LOD* získána hodnota směrodatné odchylky σ . *LOQ* je následně možné vypočítat pomocí vztahu

$$LOD = \frac{10 \cdot \sigma}{k} \quad (3.7.4).$$

Konfidenční interval střední hodnoty (*CI_μ*)

Konfidenční interval střední hodnoty vymezuje rozsah hodnot kolem získaného výsledku měření, ve kterém leží odhad střední hodnoty s danou pravděpodobností.^[49] Ta je udána koeficientem spolehlivosti (volíme 95% pravděpodobnost). Získaný interval je tím menší, čím přesnější jsou získané výsledky. Vypočítáme ho pomocí vztahu

$$CI_{\mu} = L_{1,2} = \bar{x} \pm \frac{z \cdot \sigma}{\sqrt{n}} \quad (3.7.5),$$

kde \bar{x} značí aritmetický průměr, n značí počet měření, σ představuje směrodatnou odchylku a z je tabelovaný koeficient ($z=1,96$). Data byla vyhodnocena na 95% konfidenční úrovni.

4 Výsledky a diskuze

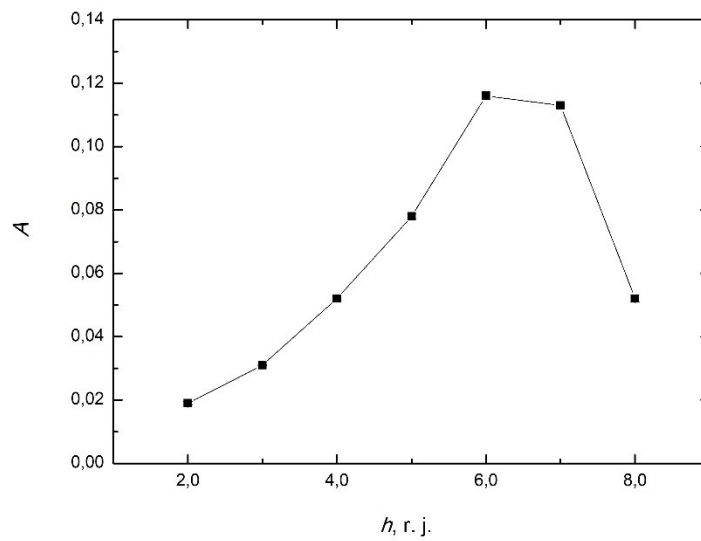
V této kapitole nalezneme veškeré vyhodnocené výsledky získané během měření. Pro stanovení byla použita metoda F-AAS. Měření každého vzorku bylo provedeno třikrát. Z naměřených hodnot byly sestrojeny příslušné grafy, ve kterých jsou znázorněny chybové úsečky pro dané měření (konfidenční intervaly středních hodnot/intervaly spolehlivosti).

4.1 Optimalizace parametrů

Aby bylo možné provést co nejpřesnější stanovení prvků ve vzorcích medů, bylo nutné nejprve nalézt optimální podmínky. Díky nim byla citlivost pro samotná stanovení co nejvyšší (tedy měření bylo co nejpřesnější). Pro stanovení optimálních parametrů byl použit roztok č. 3 (STD3) ze sady č. 1 (tedy ze sady, která neobsahovala ionizační pufr KCl). Jeho příprava byla popsána viz výše. Koncentrace vápníku v tomto roztoku byla 3 mg/l. Koncentrace hořčíku v tomto roztoku byla 0,6 mg/l.

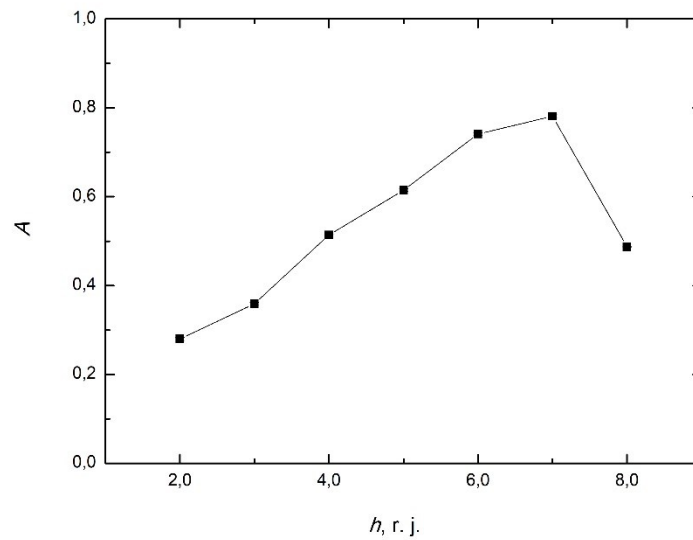
Optimalizace výšky paprsku nad hranou hořáku – acetylen-vzduch

Optimalizace výšky paprsku nad hranou hořáku pro vápník byla prováděna v rozmezí dílků č. 2,0 – 8,0 (uváděno v relativních jednotkách odečtených z měřicího přístroje). Vzdálenost mezi jednotlivými dílky byla vždy 2,5 mm. S postupným zvětšováním vzdálenosti mezi paprskem a hořákem docházelo také k postupnému zvyšování naměřené absorbance. Nejvyšší hodnota absorbance pro vápník byla naměřena v momentu, kdy se hořák nacházel na pozici dílku č. 6,0. Jak je patrné z grafu (viz Obr. 4.1) po překročení dílku č. 6,0 začaly hodnoty naměřené absorbance opět klesat.



Obr. 4.1 – Závislost absorbance na výšce paprsku nad hořákem pro směs acetylen-vzduch (roztok Ca)

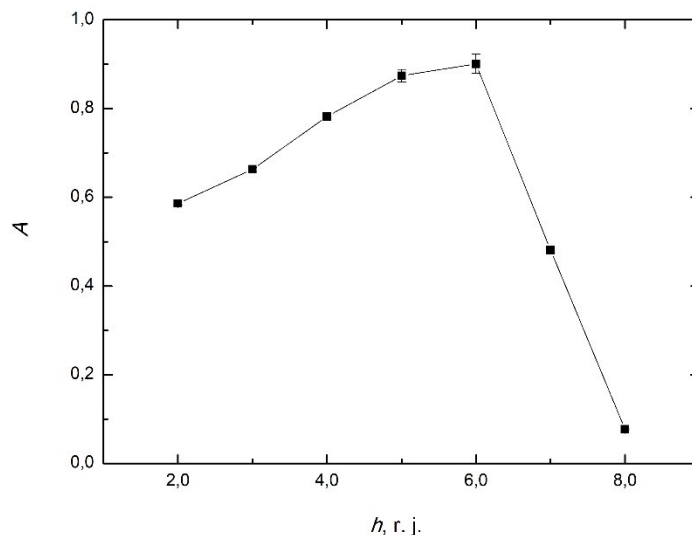
Nejvyšší hodnota absorbance pro hořčák byla naměřena v pozici hořáku u dílku č. 7,0 (viz Obr. 4.2). Stejně jako u vápníku po překročení této hodnoty začala následně absorbance klesat.



Obr. 4.2 - Závislost absorbance na výšce paprsku nad hořákem pro směs acetylen-vzduch (roztok Mg)

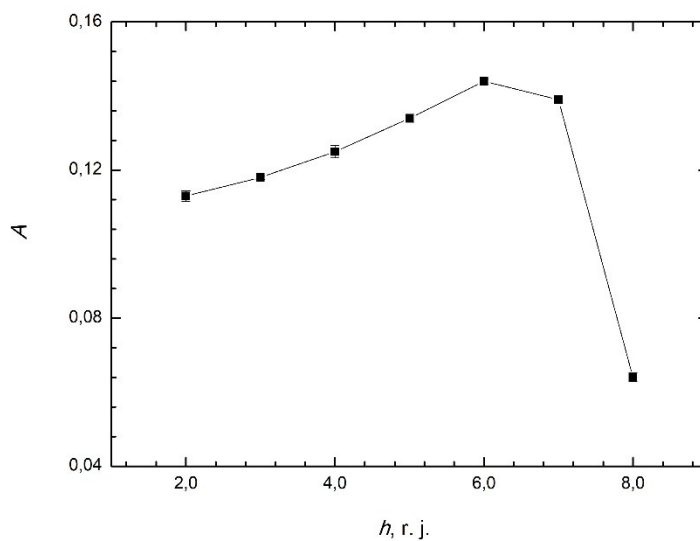
Optimalizace výšky paprsku nad hranou hořáku – acetylen – oxid dusný

Stejné měření bylo provedeno také pro směs acetylen-oxid dusný. I zde byla nejvyšší hodnota absorpance pro vápník naměřena v pozici dílku č. 6,0 (viz Obr. 4.3).



Obr. 4.3 – Závislost absorpance na výšce paprsku nad hořákem pro směs acetylen- N_2O (roztok Ca)

Stanovení pro hořčík bylo provedeno obdobně jako u vápníku. Nejvyšší absorpance byla při využití paliva acetylen-oxid dusný naměřena u dílku č. 6,0 (tedy o dílek dříve než u směsi paliva acetylen-vzduch – viz Obr. 4.4).



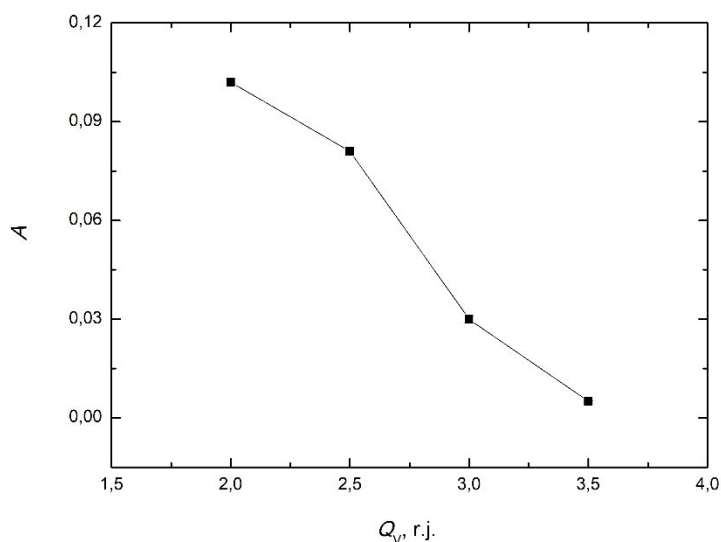
Obr. 4.4 – Závislost absorpance na výšce paprsku nad hořákem pro směs acetylen- N_2O (roztok Mg)

Během měření dalších optimalizačních parametrů bylo zjištěno, že plamen acetylen-oxid dusný má dle předpokladů vyšší energii a lépe atomizuje analyzovanou směs než plamen acetylen-vzduch. Proto za hodnoty optimálních parametrů byly využity hodnoty naměřené za použití paliva acetylen-oxid dusný. Tyto naměřené hodnoty pro vápník a hořčík byly použity jako optimální hodnoty pro další stanovování vzorků.

Optimalizace průtokové rychlosti acetylenu – acetylen-vzduch

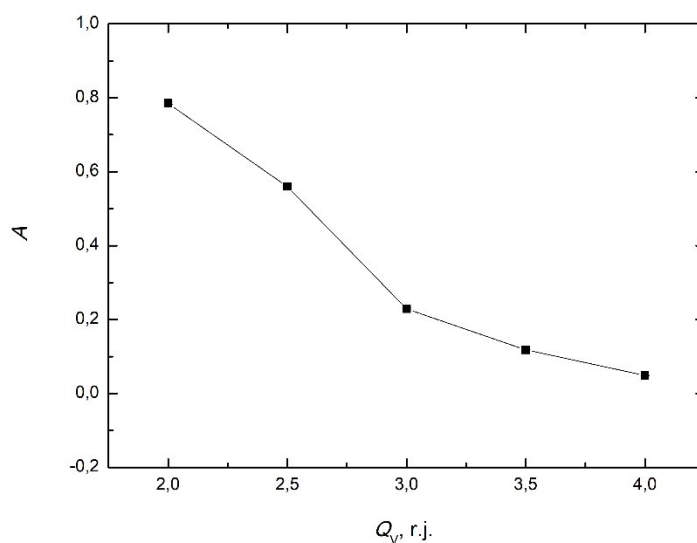
V dalším kroku bylo provedeno stanovení optimální průtokové rychlosti acetylenu pro vápník a hořčík. Optimalizace byla taktéž provedena jak za využití paliva acetylen-vzduch, tak za využití paliva acetylen-oxid dusný.

Během měření byl hledán takový poměr mezi palivem a oxidantem, při kterém bude naměřena nejvyšší hodnota absorpance. Průtok vzduchu (oxidantu) byl po celou dobu měření konstantní. Jeho hodnota byla 7,5 (uvedeno v relativních jednotkách (r. j.) odečtených z přístroje). Měněna byla pouze hodnota průtoku acetylenu (palivo). Ta byla měřena v rozpětí 2,0 – 4,0 r. j. s krokem 0,5 r. j. Optimální hodnota průtokové rychlosti acetylenu ve směsi acetylen-vzduch pro vápník byla 2,0 r. j. (viz Obr. 4.5). Po jejím naměření došlo k prudkému poklesu dalších hodnot absorpance.



Obr. 4.5 – Závislost absorpance na průtokové rychlosti směsi acetylen-vzduch (roztok Ca)

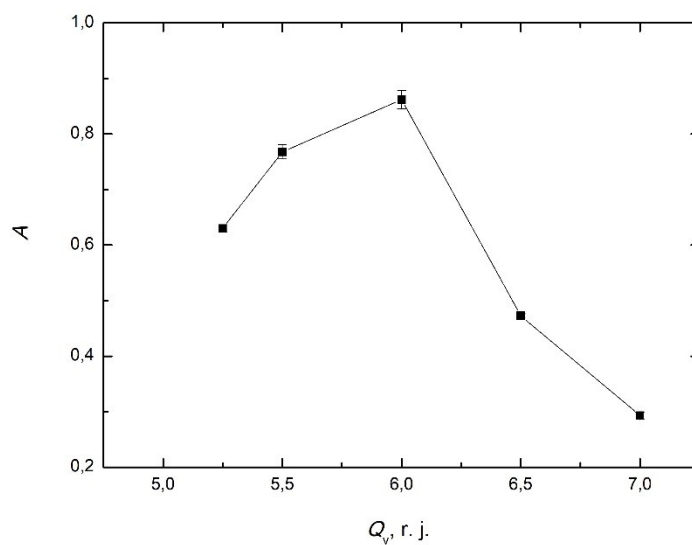
Optimální hodnota pro hořčík byla stanovena taktéž jako 2,0 r. j. (viz Obr. 4.6). I po získání této hodnoty absorpance další hodnoty vykazovaly pouze klesající trend.



Obr. 4.6 – Závislost absorbance na průtokové rychlosti směsi acetylen-vzduch (roztok Mg)

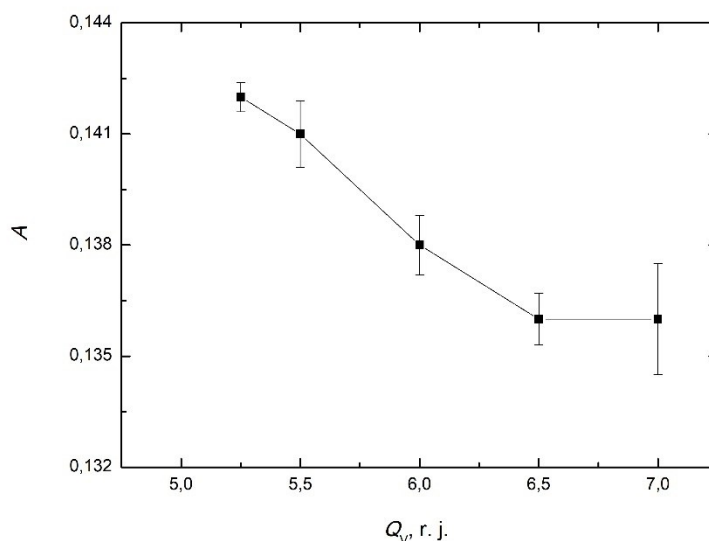
Optimalizace průtokové rychlosti acetylenu – acetylen-oxid dusný

Následně bylo provedeno stejné měření pro oba prvky za využití paliva acetylen-oxid dusný. Průtok oxidu dusného (oxidantu) zůstal opět konstantní po celou dobu měření. Průtok paliva (acetylen) byl stanovován v rozmezí mezi 5,3 – 7,0 r. j. Naměřená optimální hodnota průtokové rychlosti acetylenu pro vápník byla 6,0 r. j. (viz Obr. 4.7).



Obr. 4.7 – Závislost absorbance na průtokové rychlosti směsi acetylen- N_2O (roztok Ca)

Měření pro hořčík bylo provedeno opět obdobně jako pro vápník. Optimální hodnota průtokové rychlosti acetylenu pro hořčík byla 5,3 r. j. (viz Obr. 4.8).



Obr. 4.8 – Závislost absorpance na průtokové rychlosti směsi acetylen- N_2O (roztok Mg)

4.1.1 Shrnutí optimálních parametrů

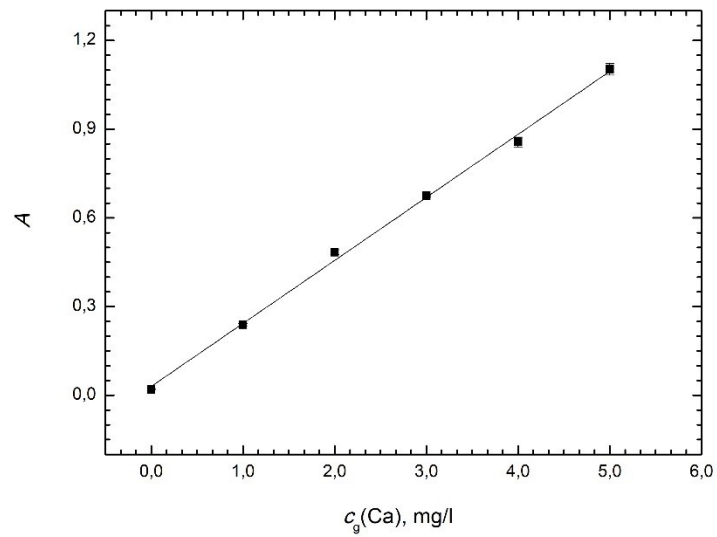
Jak bylo již zmíněno výše, plamen acetylen-oxid dusný byl prokázán a vyhodnocen efektivnějším atomizačním prostředím, a tudíž byl pro další stanovení vápníku a hořčíku ve vzorcích medu výhodnější. Vyhodnocené optimální parametry byly shrnuty pro lepší přehlednost do tabulky (viz Tab. 4.1). Tyto parametry byly nadále využívány při každém dalším měření vzorků medů.

Tab. 4.1 – Shrnutí optimálních parametrů metody měření

Směs acetylen- N_2O	Vápník	Hořčík
Pozice hořáku [dílek č.]	6,0	6,0
Průtok. rychlost acetylenu [dílek č.]	6,0	5,3

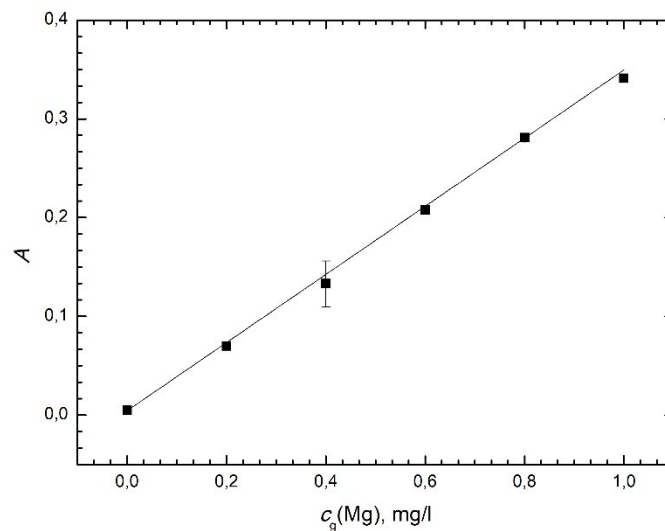
4.2 Kalibrace

Při měření kalibračních závislostí byly využity zjištěné optimální parametry (viz Tab. 4.1). Kalibrace byly změřeny za využití paliva acetylen-oxid dusný. Během kalibrace byly postupně proměřeny všechny připravené kalibrační roztoky. Koncentrace vápníku v těchto kalibračních roztocích byly 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 mg/l. Z naměřených dat byla sestrojena kalibrační křivka (viz Obr. 4.9).



Obr. 4.9 – Kalibrační závislost absorbance na koncentraci Ca ve směsi acetylen- N_2O

Koncentrace hořčíku v těchto zmíněných kalibračních roztocích byly 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/l. Vzniklá kalibrační křivka pro hořčík je uvedena v následujícím grafu (viz Obr. 4.10).



Obr. 4.10 – Kalibrační závislost absorbance na koncentraci Mg ve směsi acetylen- N_2O

Se získaným grafem bylo dále zaházeno obdobným způsobem jako s kalibrační závislostí pro vápník.

4.3 Charakteristiky pro stanovení vápníku a hořčíku

Pro stanovení základní charakteristiky metody byla využita data naměřená během kalibrace. Kromě nich byly použity také hodnoty z 10x proměřených kalibračních roztoků (STD1 a STD3). Koncentrace vápníku v kalibračním roztoku značeným STD1 byla 1,0 mg/l. Koncentrace hořčíku v tomto roztoku byla 0,2 mg/l. Zmíněný roztok byl 10x proměřen a ze získaných dat byla stanovena hodnota citlivosti metody, mez detekce (*LOD*) a mez stanovitelnosti (*LOQ*).

Následně byl 10x proměřen kalibrační roztok značený STD3. Koncentrace vápníku v tomto roztoku byla 3,0 mg/l. Koncentrace hořčíku zde činila 0,6 mg/l. Ze zjištěných hodnot absorbcí tohoto roztoku byla vyhodnocena hodnota opakovatelnosti. Zjištěné hodnoty byly pro lepší přehlednost zaznamenány do tabulky (viz Tab. 4.2).

Tab. 4.2 – Charakteristiky pro stanovení Ca a Mg

Charakteristika	Vápník	Hořčík
Opakovatelnost [%]	1,746	0,643
Citlivost [l/mg]	0,221	0,335
Mez detekce (<i>LOD</i>) [mg/l]	0,057	0,020
Mez stanovitelnosti (<i>LOQ</i>) [mg/l]	0,190	0,067

4.4 Stanovení vápníku a hořčíku ve vzorcích medu

V této části práce byly stanovovány hodnoty vápníku a hořčíku v 15 vzorcích medů. Před a po samotném stanovením bylo provedeno kontrolní proměření všech kalibračních roztoků s ionizačním pufrům (SADA 2). Zjištěné hodnoty byly porovnány s naměřenými hodnotami získanými během kalibrace. Následně byly proměřeny jednotlivé vzorky medů. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Naměřené hodnoty absorbcí medů a získané kalibrační rovnice byly využity na výpočet koncentrace prvků v původním vzorku medu. Do výpočtu bylo také zahrnuto 20x ředění vzorku. Výsledné hodnoty byly pro větší přehlednost zaznamenány do tabulky (viz Tab. 4.3). Vzorky A11 – A15 jsou vzorky z tentýž lokace (oblast Železných hor – Pardubický kraj).

Tab. 4.3 – Stanovené koncentrace Ca a Mg ve všech vzorcích medů

Vzorek	$c(\text{Ca})$ ve vzorku [$\mu\text{g/g}$ medu]	$c(\text{Mg})$ ve vzorku [$\mu\text{g/g}$ medu]
A1	$52,4 \pm 0,2$	$28,2 \pm 0,4$
A2	$62,7 \pm 0,06$	$21,2 \pm 0,6$
A3	$32,6 \pm 1,0$	$8,79 \pm 0,3$
A4	$13,6 \pm 0,4$	$57,7 \pm 0,06$
A5	$75,0 \pm 0,9$	$16,8 \pm 0,3$
A6	$66,8 \pm 0,2$	$15,9 \pm 0,2$
A7	$33,8 \pm 1,3$	$53,8 \pm 0,5$
A8	$47,8 \pm 1,3$	$17,1 \pm 0,3$
A9	$64,7 \pm 1,1$	$41,9 \pm 0,5$
A10	$7,11 \pm 0,2$	$60,7 \pm 0,4$
A11	$36,8 \pm 2,3$	$17,1 \pm 0,2$
A12	$9,40 \pm 0,70$	$92,2 \pm 1,4$
A13	$25,5 \pm 0,8$	$14,1 \pm 0,5$
A14	$36,0 \pm 0,6$	$12,8 \pm 0,3$
A15	$19,1 \pm 0,4$	$10,6 \pm 0,2$

Tučně znázorněné vzorky (**A4**) představují vzorky medovicových medů. Zbylé vzorky značí vzorky květových medů.

4.4.1 Vyhodnocení vzorků z oblasti ČR a prodejních řetězců (vzorky A1 – A10)

Vápník

Vzorky A3 – A7, A9 a A10 pocházely od lokálních včelařů z různých oblastí České republiky. Vzorky A1 – A3, A5, A6 a A8 – A9 představují květový med. Koncentrace vápníku u těchto vzorků květových medů byly stanoveny v rozmezí 32,6 – 75,0 $\mu\text{g/g}$ medu.

Vzorky A4, A7 a A10 představují medovicové medy (viz Tab. 4.3). Koncentrace vápníku u těchto medů byla stanovena v rozmezí 7,11 – 33,8 $\mu\text{g/g}$. Vzorky medovicových medů vykazovaly značně nižší stanovené množství vápníku než vzorky květového medu.

Nejvyšší naměřené koncentrace vápníku mezi všemi vzorky A1 – A10 činily 75,0; 66,8; 64,7 a 62,7 $\mu\text{g/g}$. Jednalo se konkrétně o vzorek květového medu A5, A6, A9 a A2 (v tomto pořadí). Vzorky květového medu A5, A6 a A9 pocházely z domácí výroby lokálních včelařů, vzorek medu A2 pocházel z obchodního řetězce.

Hořčík

Koncentrace hořčíku u květových medů byly stanoveny v rozmezí 8,79 – 28,2 $\mu\text{g/g}$ medu. Stanovené koncentrace u medovicových medů byly značně násobně vyšší. Naměřené hodnoty hořčíku činily 53,8 – 60,7 $\mu\text{g/g}$. Vzorky medovicového medu obsahují tedy mnohem vyšší podíl hořčíku než květové medy (u vápníku to bylo přesně naopak). Je však zajímavé, že med s nejvyšším obsahem hořčíku obsahoval současně nejnižší obsah vápníku.

Nejvyšší naměřené koncentrace hořčíku činily 60,7; 57,7; 53,8 a 41,9 $\mu\text{g/g}$. Jednalo se právě o vzorky zmiňovaného medovicového medu (A10, A4, A7 – v tomto pořadí). Všechny tyto tři vzorky pocházely z domácí výroby. Vysoké koncentrace hořčíku se také projevíly na zbarvení vzorku (velmi tmavé medy).

Nejnižší koncentrace hořčíku byla stanovena u vzorku květového medu z obchodního řetězce. Naměřená koncentrace činila pouze 8,79 $\mu\text{g/g}$ hořčíku. Tuto hodnotu prokázala také barevnost medu – vzorek měl velmi světlou až bílo-nažloutlou barvu.

4.4.2 Vyhodnocení medů z oblasti Železných hor (A11 – A15)

Všechny vzorky z oblasti Železných hor byly klasifikovány jako vzorky květového medu. Koncentrace ve vzorcích z Železných hor se pro vápník pohybovala v rozmezí 9,40 – 36,8 $\mu\text{g/g}$, pro hořčík pak v rozmezí 10,6 - 92,2 $\mu\text{g/g}$. Zde je velkou výjimkou vzorek A12, pro který byla stanovena hodnota pro hořčík 92,2 $\mu\text{g/g}$. Jedná se tedy o med s celkově nejvyšším obsahem hořčíku ze všech analyzovaných vzorků.

4.4.3 Metoda přidavku standardu

Pro utvrzení správnosti bylo měření provedeno také metodou přidavku standardu. Měření bylo provedeno za optimálních podmínek stejně jako u předchozí metody (viz 3.6 Metoda přidavku standardu). Získané hodnoty byly statisticky vyhodnoceny obdobně jako data u kalibrační metody a následně byly porovnány. Vyhodnocené výsledky metody přidavku standardu souzněly s výsledky klasické kalibrační metody, a tudíž tak byla potvrzena správnost měření.

4.4.4 Srovnání všech analyzovaných vzorků (A1 – A15) se zahraničními studii

Pro lepší porovnání provedené analýzy se zahraničními studii nebyly do vyhodnocení zahrnuty vzorky z obchodních řetězců – tedy vzorky A1, A2 a A8 (jedná se o květové medy).

Bylo stanoveno, že nejvyšší obsah vápníku obsahovaly vzorky květového medu (A5, A6 a A9) z různých oblastí ČR ($c(\text{Ca}) \sim 60 \mu\text{g/g}$ medu). U těchto vzorků byly souběžně naměřeny nižší koncentrace hořčíku než třeba u medovicových medů. Pro ně je naopak význačný vysoký obsah hořčíku. Nejvyšší hodnota ($92,2 \mu\text{g/g}$) byla stanovena u vzorku květového medu (A12). Druhým nejbohatším vzorkem na hořčík byl vzorek A10 ($c(\text{Mg}) = 60,7 \mu\text{g/g}$). Tento vzorek však souběžně vyznačoval také nejnižší stanovenou koncentraci vápníku ze všech analyzovaných vzorků.

Průměrná koncentrace vápníku v květových medech z České republiky, které byly použity pro analýzu, byla $44,1 \mu\text{g/g}$, u medovicových medů pak $18,2 \mu\text{g/g}$. Průměrná koncentrace hořčíku u těchto medů byla pro květové medy $24,7 \mu\text{g/g}$, u medovicových medů pak $57,4 \mu\text{g/g}$.

Pro lepší přehlednost byly rozsahy koncentrací pro jednotlivé typy medů zaznamenány do tabulky (viz Tab. 4.4).

Tab. 4.4 – Rozsah stanovených koncentrací jednotlivých prvků v analyzovaných medech s původem z České republiky (mimo vzorky z obchodních řetězců)

Druh medu	$c(\text{Ca}) [\mu\text{g/g}]$	$c(\text{Mg}) [\mu\text{g/g}]$
Květový	9,40 – 66,8	8,79 – 92,2
Medovicový	7,11 – 33,8	53,8 – 60,7

Vzorky použité pro provedení analýzy potvrdily výsledky studie pana doktora Pohla. ^[41] Naměřené koncentrace odpovídaly koncentracím uvedeným ve studii, pouze v předložených vzorcích květového medu bylo stanoveno o $3,2 \mu\text{g/g}$ více hořčíku než uvádí studie. Při porovnání se studií z Polska bylo zjištěno, že naměřené hodnoty koncentrace vápníku odpovídají hodnotám uvedeným ve studii. ^[15] Naopak však hodnoty hořčíku byly v předložených vzorcích až 4,5x vyšší, než by se podle polské studie očekávalo.

Porovnání hodnot koncentrací uvedených ve španělské studii s mými získanými daty bylo náročnější, jelikož rozsah koncentrací uvedený ve studii je značně široký díky využití velkého množství různých typů medu. Nejmenší koncentrace vápníku a hořčíku naměřena ve vzorcích

českých medů byla stanovena značně pod hranicí uvedené v této studii. Nejvyšší naměřené hodnoty koncentrací těchto prvků se však do tohoto rozsahu vešly bez problémů. ^[41]

Získané hodnoty vápníku byly však prokazatelně nižší a hodnoty hořčíku zase naopak vyšší než hodnoty uvedené ve studii medů z Kanárských ostrovů. ^[14] Obdobně to bylo i při porovnání výsledků s daty uvedenými ve studii Fabíoly Cariny Bilucy, pouze s tím rozdílem, že hodnoty pro hořčík byly stanoveny lehce pod dolní hranicí koncentrace (pro květový med). Naopak horní hranice rozmezí koncentrací uvedených ve studii byla o 46 µg/g vyšší než má maximálně naměřená hodnota. ^{[11][12]}

Závěr

Bylo provedeno stanovení koncentrace vápníku a hořčíku v 15 vzorcích různých typů a druhů medů s původem především od lokálních včelařů z České republiky. Stanovení bylo provedeno pomocí F-AAS (atomová absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací).

V první části experimentální práce byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení vápníku a hořčíku. Mezi hledanými parametry byla výška paprsku nad hranou hořáku a průtoková rychlost acetylenu. Po nalezení těchto optimálních podmínek byly opakovaně proměřeny připravené roztoky standardu o vhodné koncentraci. Díky získaným hodnotám tak byly určeny základní charakteristiky stanovení.

Následně v druhé části experimentální práce byly stanoveny koncentrace vápníku a hořčíku v jednotlivých vzorcích medů. Ty byly porovnány s daty získanými v literární rešerši. Bylo potvrzeno, že měření, při kterém byl vzorek obohacen o přídavek ionizačního pufru, bylo přesnější. Vápník a hořčík jsou třetí a čtvrtý nejčastěji zastoupené prvky v medu (nejvíce zastoupené jsou sodík a draslík). Bylo potvrzeno, že v každém vzorku medu převažoval buď vápník nebo hořčík – žádný ze vzorků neobsahoval stejné koncentrace zmíněných prvků, vždy byl jeden z nich v násobném přebytku.

Medovicové medy obsahovaly větší podíl hořčíku než květové medy. Současně však také obsahovaly méně vápníku. Květové medy byly zase naopak mnohem bohatší na vápník. Výjimkou byl vzorek A12. Ačkoliv se u tohoto vzorku jedná o květový med, tak má téměř 10x vyšší obsah hořčíku než vápníku (a současně obsahuje nejvyšší podíl hořčíku ze všech analyzovaných medů).

Po vyhodnocení byly medy porovnány s daty získanými ze zahraničních studií. Získané hodnoty pro oba prvky byly shodné se studií pana doktora Pohla. ^[15] Koncentrace vápníku byla ve většině případů nižší nebo srovnatelná s uvedenými zahraničními studii (srovnatelné hodnoty vápníku – studie z Polska ^[41], nižší hodnoty vápníku – studie ze Španělska ^[11], Kanárských ostrovů ^[14] a Brazílie ^{[11][12]}).

Koncentrace hořčíku byla ve většině případů mnohem vyšší než uvedené hodnoty ve studiích (studie z Polska ^[15], Kanárských ostrovů ^[14] a Brazílie ^{[11][12]}). Jedinou výjimkou bylo porovnání získaných výsledných hodnot s daty španělských autorů. Naměřené hodnoty koncentrací hořčíku byly ve většině případů mnohem nižší než ty, které byly uvedeny ve studii. Nejbliže jim byly vzorky medovicového medu a vzorek květového medu A12. ^[13]

Med obsahuje mnoho minerálních látek – sodík, draslík, vápník, hořčík, železo, měď a další. Ty mají pro lidi léčivé účinky. Vybraný vápník a hořčík byly stanovovány ve všech předložených vzorcích k analýze. Následně byla úspěšně potvrzena přítomnost obou těchto prvků. Žádný ze vzorků současně neobsahoval tak vysoké koncentrace prvků, které by byly pro člověka nebezpečné a ohrožovaly by jeho zdravotní stav (hyperkalcemie, hypokalcemie, hypermagnezémie, hypomagnezémie). Závěrem práce je možno tvrdit, že medovicové medy obsahují vyšší obsah hořčíku než medy květového původu. Jeho vyšší obsah má podíl i na jeho dalších vlastnostech – barva, aroma, chuť. Dalším možným krokem v této studii by mohlo být stanovování látek, které mohou mít na člověka negativní vliv – rtuť, olovo či kadmium. Zajímavý by také mohl být výzkum zaměřený na stanovování přítomnosti „včelích antibiotik“ v medech mimo země EU.

Soupis bibliografických citací

- [1] POLČÁK, L.: *Faktory ovlivňující produkci medu*. Zlín, 2013. Dostupné také z URL: https://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/24103/pol%c4%8d%c3%a1k_2013_bp.pdf?sequence=1&isAllowed=y.%20Bakal%C3%A1%C5%99sk%C3%A1%20pr%C3%A1ce.%20Univerzita%20Tom%C3%A1%C5%A1e%20Bati%20ve%20Zl%C3%A4n%C4%9B [cit. 2022-04-27]
- [2] JONES, R.: *Honey and healing through the ages*. Journal of ApiProduct and ApiMedical Science. International Bee Research Association, 2009, 1(1). ISSN 1759-7986. Dostupné z URL: <https://10.3896/IBRA.4.01.1.02> [cit. 2022-04-27]
- [3] TITĚRA, D.: *Včelí produkty mýtů zbavené*. Praha: Brázda, 2006. ISBN: 978-80-209-0424-9.
- [4] ALTMAN, N.: *Med jako lék*. Olomouc: Fontána, 2014. ISBN 978-80-7336-754-1.
- [5] MOORE, O. A.: *Systematic review of the use of honey as a wound dressing*. British Medical Journal [online]. PubMed Central, 2001, 1(2). ISSN 1472-6882. Dostupné z URL: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-1-2> [cit. 2022-04-30]
- [6] Mayo Clinic: *Calcium*. Mayo Foundation for Medical Education and Research: Healthy Lifestyle Nutrition and healthy eating [online]. Rochester, 2022. Dostupné z URL: <https://www.mayoclinic.org/healthy-lifestyle/nutrition-and-healthy-eating/in-depth/calcium-supplements/art-20047097?pg=2> [cit. 2022-04-29].
- [7] National Institutes Of Health: *Calcium*. Bethesda: National Institutes Of Health, Office of dietary supplements, 2016. Dostupné z URL: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Calcium-Consumer/#h8> [cit. 2022-04-29].
- [8] VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin 2*. 2. vydání. Tábor: Osis, 2002. ISBN 80-86659-01-12.
- [9] BÍLÝ, J.; BERKA A.: *Analytická chemie pro posluchače učitelských kombinací s chemií*. Praha: Univerzita Karlova, 1993. ISBN 80-7066-824-5.
- [10] NĚMCOVÁ, I.: *Spektrometrické analytické metody II*. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-586-8.
- [11] BILUCA, F. C. a kol.: *Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (Meliponinae)*. Journal of Food Composition and Analysis [online]. Elsevier, 2017, 63. ISSN 0889-1575. Dostupné z URL: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.039> [cit. 2022-04-30]
- [12] BILUCA, F. C.: *Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (Meliponinae)*. Journal of Food Composition and Analysis [online]. Elsevier, 2016, 50. ISSN 0889-1575. Dostupné z URL: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.05.007> [cit. 2022-04-30]

- [13] GALLEGO-PICÓ A., DE ALDA-GARCILOPE C. a kol.: *Characterization of Spanish honeys with protected designation of origin "Miel de Granada" according to their mineral content*. Food Chemistry [online]. Elsevier, 2012, 135(3). ISSN 0308-8146. Dostupné z URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.057> [cit. 2022-04-30]
- [14] HERNÁNDEZ, O. M. a kol.: *Characterization of honey from the Canary Islands: determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry*. Food Chemistry [online]. Elsevier, 2005, 93(3). ISSN 0308-8146. Dostupné z URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.036> [cit. 2022-04-30]
- [15] MADEJCZYK, M.; BARALKIEWICZ D.: *Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES*. Analytica Chimica Acta [online]. 2008, 617(1-2). ISSN 1873-4324. Dostupné z URL: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.01.038> [cit. 2022-04-30]
- [16] ZÁRUBA, K. a kol.: *Analytická chemie 2. díl*. Praha: VŠCHT Praha, 2016. ISBN 978-80-7080-951-8.
- [17] VOLKA K.; TKADLECOVÁ M.; ZÁRUBA K.: *Příklady z analytické chemie pro bakaláře*. Praha: VŠCHT v Praze, 2006. ISBN 80-7080-610-9.
- [18] SKOOG, D. A.; WEST D. M.; HOLLER F. J.; CROUCH S. R.: *Analytická chemie*. Praha: VŠCHT v Praze, 2019. ISBN 9788075920430.
- [19] OPEKAR, F.: *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 2. vydání. Praha: Karolinum, 2010.
- [20] JANDERA, P.; ČERNOHORSKÝ T.: *Atomová spektrometrie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1997. ISBN 80-7194-114-X.
- [21] SÝKORA, V.: *Chemickoanalytické tabulky*. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1976.
- [22] KAMENÍČEK, J.; ŠINDELÁŘ Z.; PASTOREK R.; KAŠPÁREK F.: *Anorganická chemie*. 4. vydání. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, 2009. ISBN 978-80-244-2387-6.
- [23] HOUSECROFT, C. E.; SHARPE A. G.: *Anorganická chemie*. Praha: VŠCHT Praha, 2014. ISBN 978-80-7080-872-6.
- [24] BOLLAND, M. J.; GREY, A.; AVENELL, A.; GAMBLE, G. D.; REID, I. R.: *Calcium supplements with or without vitamin D and risk of cardiovascular events: reanalysis of the Women's Health Initiative limited access dataset and meta-analysis*. British Medical Journal (Clinical Research Ed.), 2011. ISSN: 0959-8138.

lapp

- [25] BUCHTOVÁ, S.: *Obezita, vitamin D a vápník* [online]. Brno: Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, 2012. Dostupné z URL: http://is.muni.cz/th/326432/lf_b/ [cit. 2022-04-29].
- [26] LAPPE, J. M. a kol.: *Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial*. The American Journal of Clinical Nutrition. American Society for Nutrition, 2007. ISSN 1938-3207.
- [27] VOJTĚCH, D. a kol.: *Hořčík: kov pro medicínu i pro skladování vodíku*. Chemické listy, 2011(105). ISSN 1803-2389.
- [28] SCHNEIDERKA, P. a kol.: *Kapitoly z klinické biochemie*. 2. vydání. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0678-X.
- [29] ALLEN, L.; CABALLERO, B.; PRENTICE, A.: *Encyklopedia of human nutrition*. 2. vydání. Elsevier, 2005. ISBN 0-12-150110-8.
- [30] BOOMSNA, D. *The magic magnesium*. International Journal of Pharmaceutical Compounding, 2008. ISSN 10924221.
- [31] HARTWIG A. *Role of magnesium in genomic stability*. *Mutat.* 2001, 475(1-2). Dostupné z URL: <https://doi.org/10.1080/07315724.2009.10719764> [cit. 2022-04-23]
- [32] HADJU, V.; DASSIR M.; PUTRANTO A.; SADAPOTTO A.: *Chemical composition of Moringa oleifera and Honey from three different Areas in South Sulawesi, Indonesia*. *Gaceta Sanitaria* [online]. Sociedad Española de Salud Publica y Administración Sanitaria (Spanish Society of Public Health and Health Administration), 2021, 35(2). ISSN 0213-9111. Dostupné z URL: <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2021.10.060> [cit. 2022-04-30]
- [33] RUDE R. K.; SINGER F. R.; GRUBER H. E.: *Skeletal and hormonal effects of magnesisum deficiency*. *Journal American College of Nutrition*. 2009, 28(2). ISSN 1541-1087.
- [34] MAUGHAN, R. J.; BURKE. L. M.: *Výživa ve sportu – příručka pro sportovní medicínu*. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-318-4.
- [35] ORNSTOVÁ, M.: *Makroelementy ve výživě*. Brno: Masarykova Univerzita, Fakulta sportovních studií, 2008. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Jana Juříková, Ph.D.
- [36] Směrnice rady 2001/110/ES ze dne 20. prosince 2001 o medu. *Příloha 1*. Dostupné z URL: <https://cit.vfu.cz/legpoeu/leg/2001-110.pdf> [cit. 2022-04-23]
- [37] *Český med*. Základní organizace českého svazu včelařů [online]. České Budějovice: ZO ČSV, 2014. Dostupné z URL: <https://www.vcelar.info/zajimavosti/cesky-med/> [cit. 2022-04-26]

- [38] VESELÝ, V.: *Včelařství*. 2. vydání. Praha: Brázda, 2003. ISBN 80-209-0320-8.
- [39] KLINKOVSKÝ, L.: *Co je to smíšený, nebo vícedruhový med?* [online]. Ostrava, 2017. Dostupné z URL: <http://medostrava.cz/2017/10/09/co-je-to-smiseny-nebo-vicedruhovy-med/> [cit. 2022-04-29]
- [40] SEMERÁDOVÁ, N.: *Med, jeho složení a uplatnění ve výživě*. Brno, 2013. Dostupné také z: https://is.muni.cz/th/ovymc/finalni_verze_bp.pdf. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita v Brně. Vedoucí práce Jana Juříková.
- [41] POHL, P.: *Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries*. TrAC Trends in Analytical Chemistry [online]. 2009, 28(1). Dostupné z URL: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.015> [cit. 2022-04-30]
- [42] SVOBODA, J.: *Vhodnost umělé inverse zimních zásob*. Včelař, 1950, 3(2). Dostupné z URL: <http://www.vcelky.cz/clanky/2017-krmeni-invertem.htm> [cit. 2022-04-30]
- [43] TITĚRA, D. a kol.: *Správná praxe a kvalita krmení včel pro úspěšné přezimování – metodika*. Výzkumný ústav včelařský, s. r. o, 2018. ISBN 978-80-87196-44-1. Dostupné z URL: <https://www.beedol.cz/wp-content/uploads/2019/05/Spravna-praxe-krmeni.pdf> [cit. 2022-04-30]
- [44] TITĚRA, D.; KAMLER M.; ERBAN T.; HUBERT J.: *Mor včelího plodu: Diagnostika, prevence a thumení*. Výzkumný ústav včelařský, 2018. ISBN 978-80-87196-36-6.
- [45] *Včelařství*: časopis Českého svazu včelařů. Praha: MORAVIAPRESS a.s., 2013, 66 (4). ISSN 0042-2924.
- [46] *Včelařství*: časopis Českého svazu včelařů. Praha: MORAVIAPRESS a.s., 2012, 65 (11). ISSN 0042-2924.
- [47] *Včelařství*: časopis Českého svazu včelařů. Praha: MORAVIAPRESS a.s., 2012, 65 (10). ISSN 0042-2924.
- [48] KAMLER, F.; VESELÝ, V.; TITĚRA, D.: *Celý rok proti varroáze*. 6. vydání. Výzkumný ústav včelařský, 2014. ISBN: 978-80-87196-15-1.
- [49] *Návody k praktickým úlohám pro studenty NANALD*. Přírodovědecká fakulta Univerzita Karlova [online]. Praha: Univerzita Karlova, 2018. Dostupné z URL: <http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/navody.pdf> [cit. 2022-03-10].