

Vybrané charakteristiky syrového mléka

Bc. Adéla Balajková

Diplomová práce
2009

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství
akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla BALAJKOVÁ**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Vybrané charakteristiky syrového mléka**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

- Teoreticky zpracovat kapitolu týkající se mléka, požadavky na syrové mléko a jeho chemické složení.
- Popsat princip metod HPLC a NIR.

II. Praktická část

- Změřit v syrovém mléce obsah: tuku, tukuprosté sušiny, vody, sušiny, bílkovin, laktosy pomocí zařízení Julie MilkoScope SN:2606.
- Využití metody NIR spektroskopie ke stanovení základních složek mléka.
- Zavést metodiku pro stanovení vitamínů B5 a B6 pomocí HPLC.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

[1] Zpracoval kolektiv autorů, Instrumentální analýza, SNTL/ALFA, 1986.

[2] Hrabě, J., Březina, P., Valášek, P., Technologie výroby potravin živočišného původu, UTB Zlín, 2006.

[3] http://www.vscht.cz/anl/lach1/6_LC.pdf.

[4] Buňka, F., Technologie výroby potravin živočišného původu II., 2007.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce:

18. února 2009

Termín odevzdání diplomové práce:

31. května 2009

Ve Zlíně dne 31. května 2009



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Mléko je tekutý sekret mléčné žlázy savců. Obsahuje dusíkaté látky, bílkoviny, laktózu, vitamíny, minerální látky a také tuk. Jeho primární funkcí je výživa novorozenců, a proto patří právem do významného zdroje lidské výživy. Vitamín B₅ (kyselina pantothenová) se účastní metabolismu všech živin v těle. Jeho aktivní formou je koenzym A, který se účastní především metabolismu sacharidů a lipidů. Koenzym A zlepšuje kvalitu vlasů, nehtů a kůže. Vitamín B₆ se vyskytuje ve třech formách pyridinových derivátů: pyridoxol, pyridoxal a pyridoxamin. Všechny tyto deriváty spolu se svými fosfáty se chovají jako vitamíny, účastní se metabolismu aminokyselin a sacharidů.

Klíčová slova: mléko, vitamín B₅, vitamín B₆, koenzym A

ABSTRACT

Milk is a secretion of lacteal gland of mammal. Milk containing of nitric substance, proteins, lactose, vitamins, mineral substance and fat too. His primary function is nutrition of newborn, that is why pertain in important source of human nutrition. Vitamin B₅ (kyselina pantothenová) take part in metabolism an all nutrients in body. His an active form is a coenzyme A, that pertain of metabolism of sugars and lipids. Coenzyme A improve quality of hair, fingernails and derma. Vitamin B₆ offer in free form of pyridine derivate: pyridoxol, pyridoxal and pyridoxamine. All of this derivate together with their phosphates go on vitamins, they pertain metabolism of amino acid and sugars.

Keywords: milk, vitamin B₅, vitamin B₆, coenzyme A

Ráda bych poděkovala Ing. Daniele Kramářové, Ph.D. a také Ing. Janě Růžičkové, Ph.D. za odborné vedení, spolupráci, trpělivost a velmi cenné rady, které mi pomohly při tvorbě mé diplomové práce.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské/diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem citoval(a). V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uveden(a) jako spoluautor(ka).

Ve Zlíně

.....

Podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 MLÉKO.....	12
1.1 DRUHY MLÉK.....	12
1.1.1 Albuminová a kaseinová mléka	12
1.1.2 Zralá a nezralá mléka	12
1.1.2.1 Zralé mléko	13
1.1.2.2 Nezralé mléko.....	13
1.1.2.3 Starodojné mléko.....	15
1.1.3 Srovnání kozího mléka s mlékem kravským.....	16
1.2 PRODUKCE KRAVSKÉHO MLÉKA	17
1.2.1 Laktace.....	18
1.2.2 Vyměšování a vylučování mléka.....	18
1.2.3 Vlastní dojení.....	19
1.3 CHEMICKÉ SLOŽENÍ MLÉKA	21
1.3.1 Dusíkaté látky.....	21
1.3.2 Mléčný tuk	22
1.3.3 Sacharidy.....	24
1.3.4 Minerální látky.....	25
1.3.5 Vitamíny.....	26
1.3.6 Enzymy	28
1.3.7 Plyny	29
1.3.8 Antimikrobiální látky.....	29
1.4 VLASTNOSTI MLÉKA	30
1.4.1 Senzorické vlastnosti mléka	30
1.4.2 Základní fyzikální a chemické vlastnosti	31
1.5 POŽADAVKY NA SYROVÉ MLÉKO	33
1.5.1 Vyhláška 61/2009 Sb. O veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty.....	33
1.5.2 Požadavky na produkci syrového kravského mléka, kritéria kvality a faktory ovlivňující výsledky jejího hodnocení.....	34
1.5.3 Laboratoře.....	41
2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE.....	43
2.1 PRINCIP	43
2.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	45
2.2.1 Čerpadla.....	45
2.2.2 Kolony.....	47
2.2.3 Detektory	47
3 SPEKTROMETRIE V BLÍZKÉ INFRAČERVENÉ OBLASTI.....	50

3.1	TECHNIKY MĚŘENÍ NIR SPEKTER.....	51
3.2	PŘÍSTROJE PRO MĚŘENÍ NIR SPEKTER.....	52
3.2.1	Fourierova (FTIR) spektroskopie.....	53
3.2.2	Výhody a nevýhody FT NIR spektroskopie.....	56
3.3	KVANTITATIVNÍ ANALÝZA.....	57
4	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH DAT	59
II	PRAKTICKÁ ČÁST.....	61
5	METODIKA.....	62
5.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	62
5.2	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A POMŮCKY	62
5.3	VZORKY MLÉKA.....	63
5.4	METODY	63
5.4.1	Stanovení obsahu vitamínu B ₅ a B ₆ v mléce metodou HPLC – UV/VIS.....	63
5.4.1.1	Zkouška extrakce vitamínu B ₅ a B ₆ z kravského a kozího mléka.....	64
5.4.1.2	Pilotní chromatografické stanovení vitamínů B ₅ a B ₆ metodou HPLC	65
5.4.1.3	Měření kalibrační křivky pro stanovení vitamínů B ₅ a B ₆ metodou HPLC – UV/VIS.....	65
5.4.1.4	Vlastní stanovení obsahu vitamínu B ₅ a B ₆ ve vzorcích čerstvého mléka	66
5.4.2	Stanovení základních složek mléka spektroskopii.....	66
5.4.2.1	Příprava vzorku mléka ke stanovení základních složek spektroskopii.	66
5.4.2.2	Vlastní stanovení základních složek čerstvého kravského mléka spektroskopii, použití přístroje Julie MilkoScope C5 Automatic	67
5.4.2.3	Vlastní stanovení základních složek čerstvého kravského mléka metodou NIR, použití přístroje FT NIR Antaris (ThermoNicolet).....	67
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	69
6.1	VÝSLEDKY A PŘESNOST STANOVENÍ VITAMÍNU B ₅ A B ₆ METODOU HPLC – UV/VIS.....	69
6.1.1	Výsledky stanovení vhodné extrakce vitamínu B ₅ a B ₆ v mléce.....	69
6.1.2	Výsledky stanovení chromatografických podmínek pro detekci vitamínů B ₅ a B ₆ metodou HPLC – UV/VIS	71
6.1.3	Výsledky a přesnost stanovení kalibrační křivky vitamínů B ₅ a B ₆ metodou HPLC – UV/VIS.....	73
6.1.4	Výsledky a přesnost vlastního stanovení vitamínu B ₅ a B ₆ v mléce metodou HPLC – UV/VIS.....	76
6.1.4.1	Výsledky a přesnost vlastního stanovení vitamínu B ₅ a B ₆ v čerstvém kravském mléce metodou HPLC – UV/VIS	76
6.1.4.2	Výsledky a přesnost vlastního stanovení vitamínu B ₅ a B ₆ v čerstvém kozím mléce metodou HPLC – UV/VIS.....	77
6.1.5	Výsledky vlastního stanovení základních složek mléka spektroskopii.....	79
6.1.5.1	Vlastní stanovení základních složek čerstvého kravského mléka spektroskopii, použití přístroje Julie MilkoScope C5 Automatic	79
6.1.5.2	Vlastní stanovení základních složek čerstvého kravského mléka metodou NIR, použití přístroje FT NIR Antaris (ThermoNicolet).....	80

6.1.5.3 Srovnání a vyhodnocení naměřených výsledků pomocí Julie MilkoScope C5 Automatic a FT NIR Antaris (ThermoNicolet)	82
ZÁVĚR	85
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	86
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	88
SEZNAM OBRÁZKŮ	89
SEZNAM TABULEK	91
SEZNAM PŘÍLOH	93

ÚVOD

Mléko je tekutý sekret mléčné žlázy savců. Nejvíce je využíváno mléko kravské. Mezi mléka jiného původu lze zařadit např. mléko buvolí, ovčí, kozí, velbloudí a dokonce i tulení. Mléko se skládá z 88 % vody a 12 % sušiny. Obsahuje dusíkaté látky, bílkoviny, laktózu, vitamíny, minerální látky a také tuk. Jeho primární funkcí je výživa novorozenců, a proto patří právem do významného zdroje lidské výživy. V této práci se budu věnovat vitamínům B₅ a B₆. Vitamín B₅ (kyselina pantothenová) se účastní metabolismu všech živin v těle. Jeho aktivní formou je koenzym A, který se účastní především metabolismu sacharidů a lipidů. Koenzym A zlepšuje kvalitu vlasů, nehtů a kůže.

Vitamín B₆ se vyskytuje ve třech formách pyridinových derivátů: pyridoxol, pyridoxal a pyridoxamin. Všechny tyto deriváty spolu se svými fosfáty se chovají jako vitamíny, účastní se metabolismu aminokyselin a sacharidů.

Cílem této práce je zpracovat kapitulu týkající se mléka, dále stanovit základní složky mléka spektroskopii a stanovení obsahu vitamínu B₅ a B₆ metodou HPLC – UV/VIS v mléce kravském a kozím.

Spektroskopii bude stanovován obsah sušiny, tuku, laktózy, minerálních látek, bílkovin. K měření bude použito dvojí zařízení: Julie MilkoScope C5 Automatic (Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně) a FT NIR Antaris ThermoNicolet (Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Fakulta agronomická). Dále budou také popsány požadavky na syrové kravské mléko, požadavky na jeho produkci, kritéria kvality a faktory ovlivňující výsledky jeho hodnocení.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MLÉKO

Mlékem se nazývá tekutý sekret mléčné žlázy savců [1]. Mléko je základním zdrojem výživy hlavně pro mláďata, která získávají potřebné protilátky a vitamíny pro upevnění své imunity. Zvířata konzumují mléko až do doby, dokud nejsou schopna trávit pevnou stravu (píce, maso). U lidí to funguje stejně s tím, že dospělí jedinci konzumují mléko jiných zvířat (kravské, kozí, ovčí, lamí...). Člověk je jediným živočichem, který si schopnost trávit mléčné bílkoviny uchovává i ve stáří. Ne všichni lidé ale disponují touto schopností, u podstatné části z nás postupem času zaniká nebo je omezena [2].

S mlékem se setkáváme v různých podobách. Může to být čerstvé mléko, zakysané mléko, sušené mléko, apod. Rostlinnými náhražkami kravského mléka jsou sojové mléko, rýžové mléko, mandlové mléko... [2].

1.1 Druhy mlék

1.1.1 Albuminová a kaseinová mléka

Všechna druhová mléka je možno zařadit podle jejich chemického složení do různých skupin. Zásadní charakter je určován vzájemným zastoupením hlavních druhů bílkovin [3].

Rozeznáváme:

- Ø mléka kaseinová, která produkují přežvýkavci a v nichž obsah kaseinu překračuje 75 % celkového obsahu bílkovin,
- Ø mléka albuminová, produkovaná masožravci, všežravci a býložravci s jednoduchým žaludkem [3].

I když jsou albuminová mléka rozšířenější, mají kaseinová mléka mnohem větší význam z hlediska zpracování v mlékárenském průmyslu [3].

1.1.2 Zralá a nezralá mléka

Kromě druhových rozdílů je možno zaznamenat typické odlišnosti ve složení a vlastnostech mléka jednotlivých druhů i v průběhu laktace. Podle těchto ontogenetických rozdílů rozlišujeme následující mléka: zralé, nezralé, starodojné [3].

1.1.2.1 Zralé mléko

Podle vzájemného poměru kaseinové a albuminové části bílkovin rozlišujeme u zralých mlék: mléka albuminová (ženské, psí, kočičí a kobyli) a mléka kaseinová (kravské, kozí, ovčí, velbloudí). V našich podmínkách se průmyslově zpracovává především mléko kravské, v menší míře mléko ovčí a kozí [2].

Složení mléka se vyvíjí charakteristicky od porodu až po zaprahnutí. Změny složení zralého mléka, vylučovaného od 6. až 10. dne po porodu však jsou podstatně menší. Zralé mléko se liší zásadně od mleziva tím, že má vhodné senzorycké vlastnosti, je vhodné k dalšímu průmyslovému zpracování, má prakticky ustálené složení a je tedy vhodné pro lidskou výživu [3]. Složení a vlastnosti mléka ovlivňují různí činitelé, zároveň však existuje zákonitě a zcela určité zastoupení jednotlivých složek. Změny obsahu základních složek mléka v průběhu laktace jsou v negativní korelaci k produkci mléka [3].

1.1.2.2 Nezralé mléko

Jako nezralé mléko se označuje mlezivo či kolostrum (vylučované po porodu), mléko starodojné (vylučované před zaprahnutím) a mléka aberantní, tj. sekrety podobné mléku [3].

Nezralé mléko (mlezivo) je vylučováno mléčnou žlázou na konci gravidity před porodem (běžné mlezivo) a hned po porodu (mlezivo pravé). Mlezivo není využíváno k průmyslovému zpracování. Přejchod mleziva v mléko zralé trvá průměrně 7 - 10 dní po porodu [5].

Liší se od zralého mléka v mnoha směrech. Je to hustá lepkavá tekutina nažloutlé až nažnědlé barvy, příznačného pachu a mírně slané chuti. Má vysoký obsah sušiny, z níž největší podíl tvoří bílkoviny, z nich především imunoglobuliny. Vykazuje zvýšené obsahy popelovin a některých minerálních látek, zvýšenou titrační kyselost aj. Změny složení mleziva jsou patrné z následujících tabulek, ve kterých jsou uvedeny výsledky analýz mleziva velkého počtu otelených krav ve velkokapacitních kravínech v ČR. Složení mleziva od jednotlivých krav je velmi kolísavé a zastoupení jednotlivých složek se po porodu velmi rychle mění [3].

Tab.1: Změny základního složení mleziva [3]

Složka	Jednotka	1.den		3.den		5.den	
		Léto	Zima	Léto	Zima	Léto	Zima
Sušina	%	24,25	25,20	13,56	12,16	13,17	13,55
Tuk	%	4,69	5,42	4,46	4,04	5,26	4,21
Laktóza	%	1,91	1,67	4,30	4,38	4,53	4,71
Celkové bílkoviny	%	17,12	16,97	4,36	4,16	3,57	3,76
Syrovátkové bílkoviny	g·l ⁻¹	126,1	145,5	19,5	20,3	12,5	17,2
γ-globulin	g·l ⁻¹	112,2	120,5	10,8	9,1	3,6	5,1

Tab.2: Změny obsahu minerálních látek mleziva [3]

Složka	Jednotka	1.den		3.den		5.den	
		Léto	Zima	Léto	Zima	Léto	Zima
Popeloviny	%	1,08	1,10	0,84	0,88	0,80	0,79
Vápník	mmol·dm ⁻³	49,97	50,80	39,49	35,47	35,66	37,56
Fosfor	mmol·dm ⁻³	33,57	37,32	32,04	34,39	29,92	32,76
Hořčík	mmol·dm ⁻³	10,44	9,30	4,46	4,40	4,02	4,06
Sodík	mmol·dm ⁻³	41,78	45,06	33,51	36,89	28,59	37,66
Draslík	mmol·dm ⁻³	23,50	27,18	24,58	33,25	23,80	27,05

Tab.3: Změny vlastností a obsahu vitamínů v mlezivu [3]

Složka	Jednotka	1.den		3.den		5.den	
		Léto	Zima	Léto	Zima	Léto	Zima
Titrační kyselost	°SH	18,44	18,18	12,58	10,74	10,30	9,88
pH		6,31	6,24	6,31	6,35	6,43	6,39
Pufrační kapacita	mmol·dm ⁻³	0,038	0,026	0,031	0,021	0,026	0,021
Sýřitelnost		177,5	225,5	89,5	110,0	181,5	135,3
Vitamín A	mmol·dm ⁻³	21,29	17,83	7,97	4,47	6,56	2,78
Vitamín E	mmol·dm ⁻³	21,54	24,93	8,78	12,27	8,28	9,48

Mlezivo vykazuje zvýšenou enzymatickou aktivitu, zejména *katalázy*, *amylázy* a *lipázy*. Také hladina vitamínů rozpustných v tucích je značně vyšší, obsah ve vodě rozpustného vitamínu B₁ bývá dvojnásobný a B₂ až čtyřnásobně vyšší [3].

Většina složek dosáhne složení zralého mléka v průběhu 5 dnů po porodu, mléko, produkované 6. až 10. den po porodu má sice vzhled a obsahy základních složek odpovídající zralému mléku, avšak z technologického hlediska není ještě stabilní.

Podle ČSN 57 0529 se vylučuje z dodávky do mlékárny mléko do 5 dnů po otelení a mléko vylučované dojnici před zaprahnutím [3].

1.1.2.3 Starodojné mléko

Laktační doba je různě dlouhá nejen u různých savců, ale i u jednotlivých plemen. Podstatně se uplatňuje nové zabřeznutí, s nímž je spojeno hormonální potlačování další tvorby mléka [3].

V posledních týdnech před zaprahnutím se složení a vlastnosti zralého mléka podstatně mění. Vysokobřezí dojnice se označují jako „starodojné“ a jejich mléko se označuje jako „starodojné mléko“. Složení produkovaného mléka se přibližuje složení mleziva, tj. snižuje se obsah kaseinu a zvyšuje obsah sérových bílkovin, klesá obsah laktózy a zvyšuje se obsah chloridů, snižuje se velikost tukových kuliček, zvyšuje počet somatických buněk v mléce,

zvyšuje se aktivita enzymů a mění se i vlastnosti produkovaného mléka. I toto mléko musí být vyloučeno z dodávky do mlékárny [3].

1.1.3 Srovnání kozího mléka s mlékem kravským

Rozdíly ve výživových a technologických vlastnostech mlék různých živočišných druhů jsou způsobeny především rozdílným složením [4].

Složení mlék značně kolísá v průběhu roku a v závislosti na plemeni, podmínkách prostředí, způsobu chovu a krmivu, takže je možné porovnávat jen průměrné hodnoty [4].

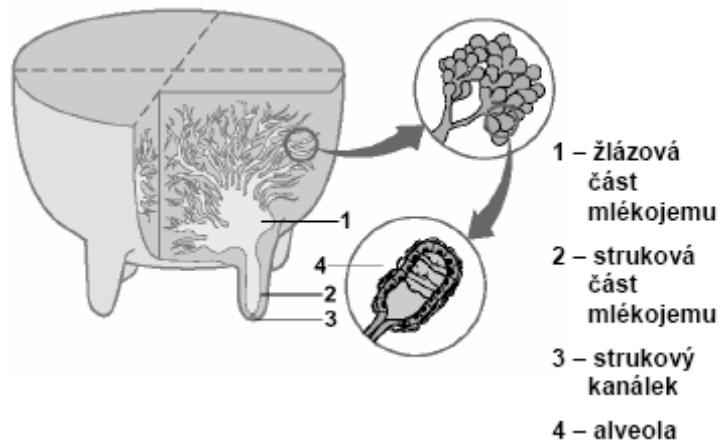
Složení kozího mléka je podobné kravskému, ale je v něm obsaženo nepatrně více tuků, sirných aminokyselin, vápníku, fosforu, draslíku, hořčíku, manganu, vitamínu A a B₂ a niacinu, mastných kyselin s krátkým řetězcem, ale méně celkových bílkovin, vitamínu E, B₆, B₁₂, kyseliny listové, karotenu (způsobuje bílou barvu sýrů), zinku a selenu. Průkazné rozdíly mezi kozím a kravským mlékem jsou ve složení a struktuře tuku – v kozím mléce jsou tukové kuličky menší a lépe rozptýlené (je to způsobeno nepřítomností aglutinínu), což způsobuje lepší stravitelnost [4].

Specifická chuť kozího mléka souvisí s vyšším obsahem mastných kyselin s krátkým řetězcem, především kyseliny kaprinové. V porovnání s kravským obsahuje kozí mléko větší množství nenasycených mastných kyselin linolové a linolenové, které mají vliv na zvýšení odolnosti organismu proti infekčním chorobám a normalizují přeměnu cholesterolu, tzn. působí proti ateroskleróze [4].

V kozím mléce je více esterů glycerolu, které jsou důležité pro výživu novorozenců a naopak méně kyseliny orotové, což může hrát roli v prevenci ztučnění jater. Z hlediska výroby sýrů se nepříznivě projevuje v kozím mléce chybějící α -s₁-kasein, který má význam pro vytváření kaseinové sýřeniny. [4]

1.2 Produkce kravského mléka

Mléko je tvořeno v mléčné žláze uložené ve vemeni. To může dosáhnout až 25 kg. Je rozděleno na pravou a levou polovinu a každá polovina je rozdělena na přední a zadní čtvrt. Zadní čtvrt je o 20 – 50 % větší než přední. Každá čtvrt je samotnou mléčnou žlázou sestávající ze žláznatého tělesa, struku a mlékojemu [5].



Obr.1: Anatomie vemene [5]

Žláznaté lalůčky v žláznatých tělesech jsou odděleny pružnou vazivovou tkání, to umožňuje rozšiřování a splasknutí vemena při tvorbě a vyprazdňování mléka. Lalůčky jsou složeny z menších primárních lalůček, středem probíhá úzký kanálek – nitrolalůčkový vývod. Do nitrolalůčkového vývodu vyúsťuje pomocí tubulů 100 až 200 alveol, kde se tvoří sekret – mléko, které je nitrolalůčkovým vývodem odváděno do vývodových cest [5].

Alveoly (v plné laktaci asi 2 miliardy) jsou váčky kulovitého nebo vejčitého tvaru, spolu s tubuly jsou vystlány jednovrstevným sekrečním epitelem. Z vnější strany je síť smršťitelných buněk hvězdicového tvaru – košičkové (myoepiteliální) buňky - smrštěním stlačují mléčné alveoly a tubuly – napomáhají vyměšování mléka a vypuzují již vyloučené mléko. Z alveol se mléko odvádí nitrolalůčkovými vývody. Sléváním nitrolalůčkových vývodů vznikají mezilalůčkové vývody, dojde k přechodu do silnějších mlékovodů ústících do mlékojemu (u tenkých vývodů jsou košičkové buňky, u silnějších vývodů jsou hladkosvalové buňky – svěrače) [5].

Mlékojem ve čtvrti - „mléčná cisterna“ má objem 2,5 l. Zde se mléko shromažďuje před dojením.

Mlékojem má dvě části:

- Ø část žlázová (horní – vyústí sem mlékovody),
- Ø část struková (dolní).

Otevírá se 8 – 12 mm dlouhým strukovým kanálkem (po obvodu kruhový hladkosvalový svěrač). Struk je dlouhý 5 – 10 cm a široký 2,5 – 3,0 cm. U předních čtvrtí je delší než u zadních čtvrtí [5].

1.2.1 Laktace

Jedná se o proces sekrece, shromažďování a spouštění mléka. Tvorbu mléka vyvolává hormon prolaktin se začátkem těsně před nebo po porodu. Podpůrný efekt mají také hormony tyroxin, somatotropin a některé další. Sekrece laktogenních hormonů je podporována drážděním struku při sání a dojení. Syntéza mléka probíhá v sekrečních buňkách alveol a tubulů [5].

1.2.2 Vyměšování a vylučování mléka

Objem mléčné buňky se vytvořeným mlékem zvětšuje a mléko je vypuzeno do alveoly. Proces se opakuje v intervalu 4 - 6 hodin, sekrece je nepřetržitá. Rychlejší je tvorba ve vyprázdněné žláze než těsně před dojením. Z naplněných alveol a tubulů se mléko hromadí ve vývodech a následně stéká do mlékovodů a naposled do mlékojemu [5].

Rozeznáváme několik druhů mlék:

- Ø mléko v mlékovodech a mlékojemu – mléko cisternové – pasivní dojení,
- Ø mléko alveolární (v alveolách a horních cestách) – aktivní dojení za pomoci stahů košičkových buněk,
- Ø reziduální mléko [5].

Z mlékojemu je mléko uvolňováno při sání mláděte a při dojení. Při ručním dojení tlak mléka překonává stah kruhového svěrače strukového kanálku, při strojovém dojení se kombinuje tlak a sání (podtlak). Spouštění (ejekce) mléka je vyvolána nepodmíněnou reflexní reakcí nervové soustavy na podráždění vemene. Vzniklé vzruchy jsou přenášeny do zadního laloku *hypofýzy*, kde se vyplaví oxytocin, ten je krví dopraven do vemene. Stah košičkových buněk kolem alveol způsobuje vytlačování mléka. Po odeznění účinku oxytocinu nelze již alveolární mléko vydojit [5].

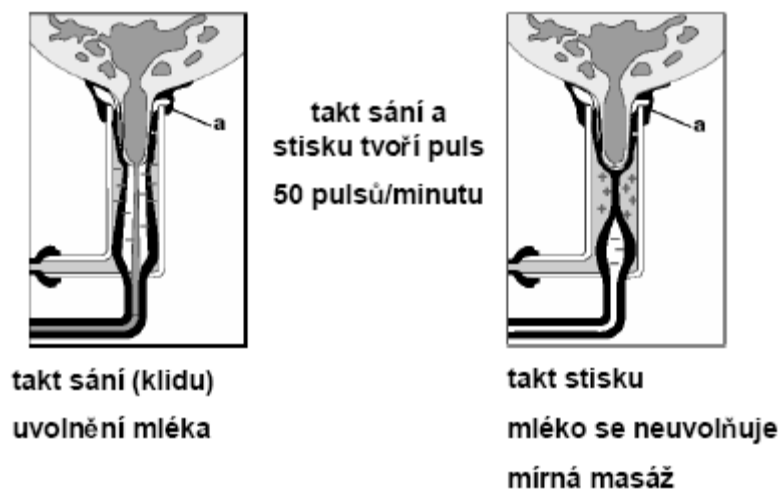
Stres vyvolává produkci adrenalinu, dochází ke stahům vlásečnic a zabránění přístupu oxytocinu ke košičkovým buňkám [5].

1.2.3 Vlastní dojení

Dojení je třeba věnovat dostatečnou péči, musí být rychlé a bezbolestné. Obvykle se dojí dvakrát za den, ideálně s intervalem 12 hodin. Nutná je příprava vemene (tzv. toaleta vemene), vyvolání spouštěcího efektu, oddojení 2 – 3 stříků z každého struku a posouzení a odstranění vysokého počtu mikroorganismů (tzv. bakteriální zátka). Oddojené mléko se musí odstranit. Po oddojení se struky čistí (20 – 30 °C) a osuší. Při „nenalití“ struků mlékem se provede krátká masáž vemene [5].

Ruční dojení (tzv. vytlačování bez tahání struků) je 80 – 90 stisků za minutu. Nejprve se dojí větší zadní čtvrti a pak obě přední, dnes prakticky jen u nemocných a poraněných vemene.

Strojní dojení má vyšší potenciál v oblasti hygieny získávání mléka. Dojící souprava obsahuje: vývěvu k vytvoření podtlaku, podtlakové potrubí, mléčné potrubí (hadice) a dojící stroj – 4 kusy násadců na struky. Strojní dojení probíhá v dojírnách [5].



Obr.2: Strojní dojení [5]

Po ukončení dojení se šetrně sejmou násadce ze struků. Dezinfekce struku probíhá ihned po sejmutí násadců, struky se ponoří do desinfekčního roztoku (šetrné ke kůži), nutné je také čištění a dezinfekce dojícího zařízení [5].

Tab.4: Průměrný obsah jednotlivých živin v 1l kravského mléka [6]

Druh živin 1)	(g·l ⁻¹)	Obsah živin v 1l mléka
Bílkoviny		31,0 – 35,0
Esenciální aminokyseliny		1,3
Mléčný tuk		30,0 – 46,0
Mléčný cukr		45,0 – 50,0
Minerální látky		7,0
Vitamíny		11,4 – 42,4

Tab.5: Složení mléka různého původu [6]

Druh mléka	Voda (%)	Bílkoviny (%)	Tuk (%)	Laktóza (%)	Popel (%)
Kravske	87,4	3,3	3,9	4,6	0,72
Lidské	86,5	2,0	4,1	7,2	0,21
Kozí	86,9	3,3	4,5	4,6	0,79
Kobylí	89,8	2,0	1,5	6,1	0,41
Tulení	34,0	12,0	54,0	neobsahuje	0,53

1.3 Chemické složení mléka

Kravske mléko obsahuje průměrně 88 % vody a 12 % sušiny, 3,2 – 3,6 % dusíkatých látek (hrubé bílkoviny), 3,5 - 4,5 % tuku, 4 – 5 % sacharidů, do 1 % minerálních látek, dále vitamíny, enzymy, hormony, plyny. Aktivní kyselost mléka (pH) je 6,5 – 6,7; průměrně kolem pH 6,6 [5].

Mléko je polydisperzní systém:

- ∅ tuk – disperze (hrubá disperze, emulze typu olej ve vodě),
- ∅ bílkoviny – koloidní roztok (koloidní disperze),
- ∅ sacharidy, minerální látky – pravý roztok (molekulární disperze) [5].

1.3.1 Dusíkaté látky

Dusíkaté látky jsou nejkompexnější složkou mléka, určují základní fyzikálně-chemické vlastnosti mléka, spoluurčují nutriční hodnotu mléka. Čistá bílkovina je tvořena z 80 % kaseinem. Jedná se o komplex fosfoproteinů, který je obsažen v mléce z 2,4 – 2,6 % a lze jej vysrážet při pH 4,6 a teplotě 20 °C. Druhá skupina tvořící čistou bílkovinu jsou syrovátko-

vé bílkoviny, které zaujímají zbývajících 20 %. Jedná se o globulární bílkoviny, které jsou v mléce zastoupeny z 0,5 – 0,7 % a rozpouští se při pH 4,6 [5].

Tab.6: Základní rozdělení čisté bílkoviny [5]

Kasein		Syrovátkové bílkoviny
α_{S1} -kasein	dohromady cca 42 % ČB (4-5 : 1)	α -laktalbumin
α_{S2} -kasein		β -laktoglobulin
β -kasein	cca 25 % ČB	sérum albuminy
κ -kasein	cca 9 % ČB	imunoglobuliny
ostatní frakce se považují za deriváty		proteoso-peptony (štěpy kaseinů)

ČB..... čistá bílkovina

Ostatní dusíkaté látky zahrnují např. močovinu, amoniak, kreatin, kyselinu močovou, lipoproteiny, enzymy... [5].

1.3.2 Mléčný tuk

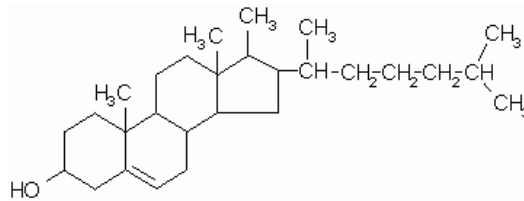
98 % představují triacylglyceroly (estery glycerolu a mastných kyselin), zbývajících 2 % tvoří mono- a diacylglyceroly, volné mastné kyseliny, fosfolipidy, steroly, estery sterolů, uhlovdíky a vitamíny rozpustné v tucích [5].

Až ze 75 % jsou zde zastoupeny nasycené mastné kyseliny, zejména myristová, palmitová, stearová. Vysoký podíl také zaujímají nízkomolekulární mastné kyseliny jako např. máselná, kapronová, kaprylová. Tvoří typické aroma mléka [5].

Tab.7: Lipidy v mléce [6]

Lipidická složka	Obsah [%]
Triacylglyceroly	98 – 99
Diacylglyceroly	0,2 – 0,5
Monoacylglyceroly	0,02
Vosky	Stopy
Volné mastné kyseliny	Stopy
Fosfolipidy:	0,2 – 1,0
Fosfatidylcholin	35 – 40
Fosfatidyletanolamin	29 – 38
Sfingomyeliny	19 – 24
Steroly:	0,25 – 0,40
Cholesterol	0,2 – 0,4
Lanosterol	Stopy
7-dehydrocholesterol	Stopy
Vitamín A	7 -8,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Karotenoidy	8 – 10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Vitamín E	2 – 50 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Vitamín D	0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Vitamín K	Stopy

Obsahuje také nepatrné množství *trans*-mastných kyselin, které vznikají působením mikroorganismů v zažívacím traktu dojníc. Jejich množství je však z hlediska doporučeného limitu spotřeby *trans*-mastných kyselin zanedbatelné. [4]



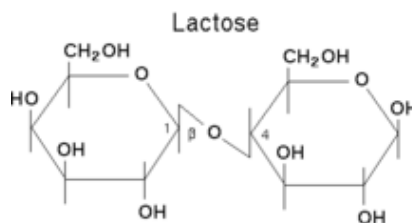
Cholesterol [7]

1.3.3 Sacharidy

Ze sacharidů se v mléce vyskytuje laktóza a v nepatrném množství její štěpné produkty glukóza a galaktóza, dále pak kvasný produkt laktózy – kyselina mléčná [4].

Laktóza je z chemického hlediska disacharid, O- β -D-galaktopyranosyl-(1-4)-D-glukopyranóza, tvoří se v mléčné žláze, je rozpustná ve vodě. Dodává nasládlou chuť a udržuje osmotický tlak v mléce. Vyskytuje se ve dvou anomerech: α -laktóza a β -laktóza [5].

Laktóza se vyznačuje nízkou sladivostí a dobrou stravitelností (až 99 %). Má příznivý vliv na trávení, protože vazbou vody vyvolává bobtnání střevního obsahu a podporuje peristaltiku. Enzymem β -galaktosidázou se štěpí v tenkém střevě na glukózu a galaktózu [4]. Hlavní význam z hlediska fyziologie výživy je v tom, že kyselina mléčná, která vzniká v intestinálním ústrojí mikrobiální činností, zvyšuje resorpci vápníku [7]. U osob s nedostatečnou tvorbou enzymu *laktázy* může laktóza působit zažívací potíže. Jedná se o intoleranci laktózy, tedy neschopnost ji štěpit. Řešením je vyhnout se konzumnímu mléku tekutému a zaměřit se ve spotřebě na sýry a fermentované mléčné výrobky, které obsahují menší množství laktózy [4].



Laktóza [8]

1.3.4 Minerální látky

Hodnota minerálních látek v mléce vynikne při srovnání s látkami jiných potravin, u nichž je zpravidla nižší obsah, nebo jsou v nevhodném vzájemném poměru [8].

Minerální látky se v mléce vyskytují v několika formách:

- ∅ v roztoku,
- ∅ koloidní forma,
- ∅ vázány na složky mléka [5].

Jednotlivé formy jsou ve vzájemných rovnováhách:

- ∅ ovlivnění osmotického tlaku (zejména K a Na, spolu s laktózou)
- ∅ ovlivnění velikosti, stavu a vlastností kaseinových micel (Ca, Mg, P, spolu s citráty).

Obsah a formu minerálních látek ovlivňuje řada faktorů, jako např. pH, uvolnění některých solí do roztoků, vliv záhřevu mléka, stádium laktace, zdravotní stav aj [5]. Mléko je zejména nositelem vápníku, fosforu a draslíku. Poměr mezi vápníkem a fosforem je v mléce 1 : 1,3 [9]. Vápník a fosfor je zastoupen ze 30 % v roztocích, 40 – 50 % je v koloidním kalcium-fosfátu a z 20 % jsou vázány na kaseinový komplex [5].

Ze stopových prvků je v mléce železo, které se váže na kaseinové micely (až 70 %), zinek se váže na kasein (až 80 %) a imunoglobuliny, měď a jód, dále hořčík, volné ionty selenu aj. [5].

Minerální látky (v 1l mléka)			6,0 – 8,0 g		
ML	Množství (g)	ML	Množství (mg)	ML	Množství (µg)
Vápník	1,20 – 1,40	Křemík	0,87 – 2,27	Hliník	50 – 1000
Hořčík	0,10 – 0,13			Bór	100 – 400
Sodík	0,50			Železo	300
Draslík	1,45 – 1,50			Bróm	180 – 250
Fosfáty	2,10			Jód	10 – 80
Chloridy	1,00				
Sírany	0,10				

ML.....minerální látky

1.3.5 Vitamíny

Mléko obsahuje vitamíny rozpustné jak ve vodě, tak v tucích. Obsahuje relativně vysoký obsah vitamínu A i jeho prekurzoru karotenu. Jeho koncentrace však přímo úměrně záleží na krmení zeleným krmivem. Mléko je velmi důležitým zdrojem ve vodě rozpustného vitamínu B₂ (riboflavinu) a vitamínu B₁₂ (kyanokobalaminu) a poměrně dobrým zdrojem vitamínu B₁ (thiaminu), B₆ (pyridoxinu) a biotinu [10].

Čerstvě nadojené mléko obsahuje také vitamín C, ale vlivem světla je oxidací o tento vitamín ochuzováno. Mléko přispívá k výživě člověka pouze zanedbatelným množstvím vitamínu D a K a malým množstvím vitamínu E [3].

Obsah vitamínů v mléce ovlivňuje především roční doba a výživa dojnice.

Tab.9: Obsah vitamínů v mléce [5]

Vitamín	Obsah v mléce (mg·kg ⁻¹)
Thiamin	0,3 – 0,7
Riboflavin	0,2 – 3,0
Pyridoxin	0,2 – 2,0
Kobalamin	0,003 – 0,038
Niacin	0,8 – 5,0
Folacin	0,03 – 0,28
Pantotenová kyselina	0,4 – 4,0
Biotin	0,01 – 0,09
Vitamín C	5 - 20

Vitamín A a jeho provitamín β -karoten se podílí na žlutém vybarvení mléčného tuku. Dobrým zdrojem vitamínů A jsou mléčné výrobky s vyšším obsahem tuku a máslo. Při pasteuraci, v UHT mléce a při sušení se ztrácí do 6 % vitamínu A, dále při skladování v přítomnosti kyslíku a na světle (při skladování v nevhodných obalech) 20 – 30 % vitamínu A. V sušeném mléce je vitamín A velmi stabilní [9].

Vitamin D se v mléce vyskytuje jako D₂ – ergokalciferol a D₃ – cholekalciferol. Vitaminy D vznikají UV zářením z prekurzorů, které se nazývají provitaminy D. Hladina tohoto vitamínu je ovlivněna zejména ročním obdobím (resp. výživou, v zimním období bývá obsah tohoto vitamínu až 4x nižší než v letním období). Vitamin D má význam pro metabolismus vápníku a to zejména pro jeho resorpci ve střevě a zpětnou resorpci v ledvinách [9].

Mléčný tuk obsahuje vitamínu E mnohem méně než rostlinné oleje. Vitamin E je jedním z nejúčinnějších antioxidantů, brání stárnutí, nádorovému bujení a podporuje zárodečnou tkáň. V nepřítomnosti kyslíku a oxidovaných lipidů je vitamin E poměrně stabilní při běžném průmyslovém zpracování [9].

Vitamin K se v játrech účastní syntézy většiny koagulačních faktorů. Tvoří se také v tlustém střevě účinkem bakterií, proto např. při podávání antibiotik, kdy se zničí střevní bakterie,

vzniká krvácivost. Během zpracování a skladování je relativně stabilní, ke značným ztrátám dochází, je-li mléko vystaveno dennímu světlu [9].

1.3.6 Enzymy

V mléce je značné množství enzymů. Vznikají syntézou v mléčné žláze, přechází z krve dojnice nebo se jedná o mikrobiální enzymy z kontaminující mikroflóry [5]. Detekce jejich obsahu (aktivity) se využívá zejména k:

- ∅ rozlišení mlék různých savců,
- ∅ odlišení zralých mlék od nezralých (mlezivo),
- ∅ diagnostika zdravotního stavu dojnice,
- ∅ zjišťování hygieny získávání mléka,
- ∅ zjišťování správnosti ošetření mléka (př. většina enzymů se ničí záhřevem, enzymy se však liší v teplotě inaktivace a v potřebné době jejího působení – lze rozlišit různé stupně záhřevu),
- ∅ hodnocení nebezpečí rozkladu složek mléka působením enzymů [5].

Významní zástupci:

Laktoperoxidáza rozkládá peroxid vodíku na vodu a atomární kyslík. Aktivita *laktoperoxidázy* se mění se stádiem laktace (v průběhu klesá). Podle aktivity se posuzuje správnost provedení vysoké pasterace mléka nebo smetany. Je značně tepelně stabilní [5].

Xantinoxidáza zprostředkovává oxidaci *xantinu* na *hypoxantin* a dále na kyselinu močovou. Aktivita se mění se stádiem laktace (v průběhu roste). Využívá se k odlišení zdravého mléka od mléka mastitidních dojnic [5].

Kataláza rozkládá peroxid vodíku na vodu a kyslík. Mléko ji obsahuje vždy. Je možné ji využít k detekci onemocnění mléčné žlázy. Aktivita *katalázy* se zvyšuje u mléka s vyšším počtem leukocytů [5].

Lipázy způsobují hydrolyzu acylglycerolů na glycerol a mastné kyseliny. Obvyklá je asociace *lipázy* s kaseinem a tukovými kuličkami. Aktivita se mění se stádiem laktace (v prvních

dnech klesá a po cca 10 dnech opět roste) a roční dobou. *Lipáza* je aktivována stopovými prvky (Cu, Fe) [5].

Fosfatázy způsobují hydrolýzu estericky vázané kyseliny fosforečné z různých substrátů. Je přirozenou součástí mléka. *Fosfatázy* rozdělujeme na alkalickou a kyselou *fosfatázu*.

Alkalická *fosfatáza* má původ v epitelu mléčné žlázy, v krvi, buněčných útvarech a je lokalizována v membránách tukových kuliček. Má výrazně vyšší aktivitu než kyselá *fosfatáza*. Ztráta aktivity nastává při teplotách nad 70 °C po dobu 15 s [5].

Kyselá *fosfatáza* má původ z leukocytů a je lokalizována v mléčném séru. K její deaktivaci dochází při 80 °C po dobu 15 s. Aktivita značně roste při zánětech mléčné žlázy [5].

Plasmin (alkalická mléčná *proteáza*) štěpí α a β -frakce kaseinu. Disociace nastává při poklesu pH. Při výrobě sýrů ze syrového mléka se podílí na proteolýze bílkovin [5].

1.3.7 Plyny

Čerstvě nadojené mléko obsahuje cca 6 – 9 % plynů (značná část 5 – 7 obj.%) CO₂, pravděpodobně přechází z krve a část plynů se dostává ze vzduchu. Při stání se ustavují rovnováhy, nastane pokles CO₂, zvýšení N₂ a O₂. Přítomností kyslíku je možná oxidace vitamínu C, případně i tuků. Je také možný rozvoj aerobních mikroorganismů [5].

1.3.8 Antimikrobiální látky

Laktoferin je glykoprotein, který váže železo a stává se tak nedostupným pro bakterie. Je syntetizován v mléčné žláze a jiných exokrinních žlázách (slinné žlázy, *pankreas*, slzné žlázy). Vysoký obsah laktoferinu je v kolostru/mateřském mléce, během laktace se snižuje, zvyšuje se při mastitidách [10].

Laktoperoxidázový systém je účinný zejména na G⁻ bakterie [10].

Mezi hlavní zástupce imunoglobulinů patří: IgA, IgG, IgM. Tvoří obranný systém mládřat proti gastrointestinálním infekcím [10].

Lysozym je *1,4-(β)-N-acetylmuramidáza*. Vyskytuje se především ve slinách, vaječném bílku, mléce, krvi. Vyšší obsah *lysozymu* je v kolostru a jeho obsah se zvyšuje při infekcích. Štěpí glykosidovou vazbu mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetylglukosaminem v bakteriálním peptidoglykanu, na což jsou citlivé zejména G^+ bakterie [10].

Fukosylované oligosacharidy a glykoproteiny podporují růst Bifidobakterií, slouží k prevenci adheze střevních patogenů na stěnu střeva a také k inaktivaci některých toxinů [10].

Jsou zde zastoupeny zejména MK (mastné kyseliny) o střední délce řetězce (C8, C10, C12). Tyto MK chrání mláďata proti střevním patogenům [10].

1.4 Vlastnosti mléka

1.4.1 Senzorické vlastnosti mléka

K základním sensorickým vlastnostem mléka patří chuť, vůně, barva a konzistence [3]. Sladkou chuť mléka způsobuje laktóza. Kromě laktózy se na výsledné chuti mléka částečně podílejí i mléčný tuk a fosfatidy. Negativně mohou ovlivnit chuť mléka některé látky z krmiva [3]. Čerstvě nadojené mléko nemá zvláštní výraznou vůni. Mléko velmi snadno přijímá cizí pachy z vnějšího prostředí, tyto se velmi snadno váží na tukové kuličky. Vůně mléka souvisí především se stupněm jeho znečištění, z tohoto důvodu je třeba prostředí, ve kterém je mléko získáváno a uchováváno věnovat mimořádnou pozornost [3].

Mléčný tuk ve formě tukových kuliček a částečně také kasein ve formě kaseinových micel podmiňují bílou až slabě krémovou neprůhlednou barvu mléka. Krémově žlutá barva je závislá na obsahu karotenoidů, rozpuštěných v mléčném tuku, částečně je také ovlivněna riboflavinem [3].

Konzistence mléka je způsobena především vysokým obsahem vody a homogenní strukturou mléka, ve kterém se nachází laktóza a část minerálních látek v roztoku, bílkoviny v koloidní fázi a pouze mléčný tuk v emulzní fázi [3].

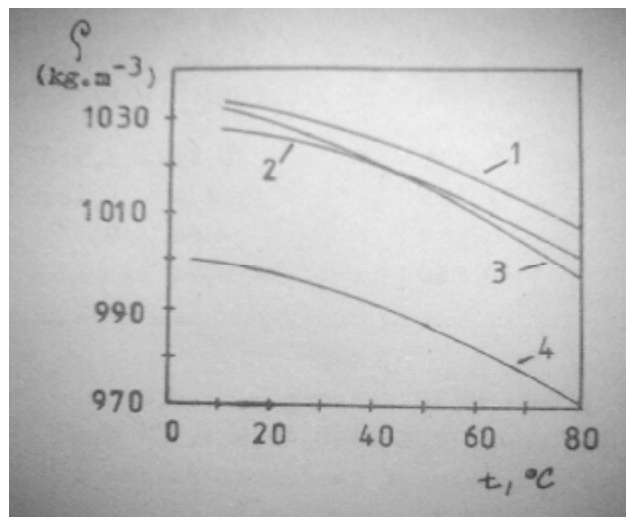
1.4.2 Základní fyzikální a chemické vlastnosti

Specifická hmotnost směšného syrového mléka se v podmínkách ČR pohybuje v rozpětí 1,028 až 1,032 g.cm⁻³. Výsledná hodnota je závislá na obsahu základních složek mléka a to bílkovin, laktózy, tuku a minerálních látek. Zvýšený obsah tuku v mléce hmotnost snižuje, bílkoviny, laktóza a minerální látky (tukuprostá sušina) hmotnost zvyšují. U odstředěného mléka nebo mléka s odebraným tukem se specifická hmotnost zvyšuje nad 1,032 g.cm⁻³. Specifická hmotnost snižovaná pod 1,028 g.cm⁻³ je předběžným ukazatelem přidané vody. Přidaná voda v množství 10 % snižuje specifickou hmotnost mléka o 0,003 g.cm⁻³ [3].

Změny specifické hmotnosti mléka může způsobit řada dalších faktorů, ovlivňujících složení mléka, jako je zhoršený zdravotní stav dojnic, zejména mastitidy, dietetické a metabolické poruchy, stádium laktace apod. [3].

Pro některé výpočty je udávána specifická hmotnost v tzv. laktodenzimetrických stupních (°L). Pro přepočítání specifické hmotnosti v g.cm⁻³ na °L platí vztah :

$$(\text{specifická hmotnost} - 1) \cdot 10^3 = \text{°L} \quad [3]$$



Obr.3: Závislost specifické hmotnosti mléka na teplotě [15]

1 – odstředěné mléko, 2 – pasterované egalizované mléko (2,5 hm. % tuku), 3 – syrové mléko (4,5 hm. % tuku), 4 – destilovaná voda

Bod mrznutí je důležitá fyzikální vlastnost mléka, používaná v současné době k rychlému posouzení technologické neporušenosti směsného syrového mléka. Tato vlastnost je relativně konstantní (- 0,54 až - 0,57 °C) a souvisí se stálostí osmotického tlaku. Deprese bodu mrznutí mléka (BMM) proti vodě je způsobena zhruba z 50 % obsahem laktózy a cca ze 30 % rozpuštěnými solemi (chloridy, fosfáty, citráty) [3].

Pro nakupované směsné mléko byla stanovena mezní hodnota $BMM \leq - 0,520$ °C v rámci EU, resp. $BMM \leq - 0,515$ °C v ČR. Původně se na základě BMM určovala velikost porušení mléka vodou (1 % přidané vody zhoršuje BMM cca o 0,005 °C) [3].

Příčinou kolísání BMM může být řada dalších vlivů, souvisejících se změnami složení a vlastností mléka. Vedle vlivu sezóny, stádia laktace, plemene, užitkovosti, subklinických mastitid apod. je nejzávažnější a nejčastější vliv výživy a dietetických, případně metabolických poruch. Na základě dlouhodobých a rozsáhlých sledování je uváděno, že pokles obsahu laktózy o 0,1 % představuje zhoršení BMM o 0,005 °C, pokles obsahu bílkovin o 0,1 % zhoršení BMM o 0,0025 °C a pokles obsahu močoviny o 10 mg·100 ml⁻¹ mléka pokles BMM o 0,002 °C [3].

U mléka a mléčných výrobků se kyselost vyjadřuje jednak titrační kyselostí a jednak aktivní kyselostí, tj. koncentrací vodíkových iontů [3]. Titrační kyselost udává spotřebu roztoku NaOH o koncentraci $c(\text{NaOH}) = 0,25$ mol.dm⁻³ potřebného k neutralizaci kyselých látek ve 100 ml (100 g) vzorku na indikátor fenolftalein. Historicky se tato kyselost uváděla v Soxhlet-Henkelových stupních (°SH), podle soustavy SI by se měla uvádět v jednotkách mmol.dm⁻³ [3].

Titrační kyselost čerstvého směsného mléka od zdravých a dobře krmených dojnic se pohybuje kolem 7. Podle ČSN 57 0529 se u nás považuje za normální mléko o titrační kyselosti v rozmezí 6,2 – 7,8 [3].

U jednotlivých dojnic se můžeme setkat se značnými výkyvy kyselosti čerstvě nadojeného mléka. Mléko s kyselostí pod 5 je vodnaté, modravé barvy a pochází obvykle od dojnic se zánětem vemene. Mléko o kyselosti nad 8 pochází obvykle od dojnic po otelení nebo se jedná o mléko, produkované v průběhu první laktace. Přesahuje-li kyselost mléka 9, jde obvykle o mlezivo nebo mléko od dojnic s akutním zánětem vemene [3].

Celkově můžeme říci, že kolísání nativní kyselosti je způsobeno těmito vlivy:

- Ø kyselost mléka kolísá individuálně a je specifická pro každý určitý organismus,
- Ø zastoupením jednotlivých složek ovlivňujících spotřebu při neutralizaci mléka,
- Ø mírné kolísání probíhá mezi jednotlivými nádoji a ze dne na den,
- Ø ke konci laktace nastává obvykle pokles kyselosti,
- Ø dojnice na první laktaci dávají obvykle mléko s vyšší kyselostí,
- Ø množství kyselin v krmné dávce neovlivňuje podstatně kyselost mléka,
- Ø onemocnění dojnice a zejména mléčné žlázy vyvolává většinou změny kyselosti mléka [3].

Kyselost mléka narůstající s časem nad hodnotu nativní kyselosti je způsobena rozkladem laktózy na kyselinu mléčnou činností mikroorganismů. Mléko o kyselosti nad 9 – 10 se sráží varem, při kyselosti 25 – 30 se sráží již při pokojové teplotě [3].

Aktivní kyselost čerstvě nadojeného mléka se pohybuje v intervalu hodnot pH 6,4 – 6,8. Stanovení pH u čerstvě nadojeného mléka nemusí však být vždy nejlepším měřítkem hodnocení. Mléko má jako každá fyziologická tekutina tlumivou – pufrční schopnost a přidáme-li k němu malé množství kyseliny nebo zásady, nezmění se hodnota aktuální kyselosti. Tato schopnost se vysvětluje přítomností bílkovin, fosfátů a citrátů. Nezachytíme proto první stádium rozkladu laktózy jako změnu pH, i když se již vytvořilo určité množství kyseliny mléčné. Proto u mléka je vhodnějším měřítkem kvality, resp. čerstvosti stanovení jeho titrační kyselosti [3].

1.5 Požadavky na syrové mléko

1.5.1 Vyhláška 61/2009 Sb. O veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty

Podle vyhlášky 61/2009 Sb. O veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty § 13 platí:

(1) Chovatel může v malých množstvích prodávat se souhlasem krajské veterinární správy syrové, mlékárensky neošetřené mléko a syrovou smetanu v místě výroby přímo konečnému spotřebiteli pro spotřebu v jeho domácnosti [11].

(2) Předmětem přímého prodeje syrového mléka může být pouze syrové mléko, které:

a) pochází od zdravého zvířete z hospodářství úředně prostého tuberkulózy a úředně prostého nebo prostého brucelózy, jež nevykazuje žádné příznaky nakažlivého onemocnění přenosného mlékem na člověka,

b) bylo získáno hygienickým způsobem v hospodářství, v němž jsou dodržovány hygienické požadavky stanovené zákonem a požadavky uvedené v odstavci 3 [11].

(3) Hygienické požadavky na výrobu syrového mléka, požadavky na prostory a vybavení, na hygienu během dojení, sběru a přepravy a na hygienu personálu stanovené předpisy Evropských společenství platí pro hospodářství, z něhož pochází syrové mléko, které je předmětem přímého prodeje, obdobně [11].

(4) Není-li syrové mléko určené k přímému prodeji prodáno do 2 hodin po nadojení, musí být zchlazeno na 8 °C a zchlazené prodáno do 24 hodin po nadojení [11].

(5) Za malé množství syrového, mlékárensky neošetřeného mléka a syrové smetany, určené k přímému prodeji jednomu konečnému spotřebiteli, se považuje takové množství tohoto syrového mléka nebo syrové smetany, které odpovídá obvyklé denní spotřebě tohoto mléka v domácnosti daného spotřebitele [11].

1.5.2 Požadavky na produkci syrového kravského mléka, kritéria kvality a faktory ovlivňující výsledky jejího hodnocení

Hygienické požadavky na produkci syrového kravského mléka a kritéria pro syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování stanovují: [12]

Nařízení Evropského parlamentu a Rady /ES/ - hygienický balíček:

- Ø č. 178/2002 ze dne 28.1.2007, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin,
- Ø č. 852/2004 ze dne 29.4.2004 O hygieně potravin,
- Ø č. 853/2004 ze dne 29.4.2004, kterým se stanoví Zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu,
- Ø č. 854/2004 ze dne 29.4.2004, kterým se stanoví Zvláštní pravidla pro organizaci úředních kontrol produktů živočišného původu určených k lidské spotřebě,
- Ø č. 882/2004 z 29.4.2004 O úředních kontrolách za účelem ověření dodržování právních předpisů týkajících se krmiv a potravin a pravidel o zdraví zvířat a dobrých životních podmínkách zvířat [12].

Nařízení Komise /ES/ č. 2074/2005 z 5.12.2005, kterým se stanoví prováděcí opatření pro některé výrobky podle nařízení Evropského parlamentu a Rady /ES/ č. 853, 854 a č. 882/2004, kterým se stanoví odchylka od nařízení EP a Rady č. 852, 853, 854 / 2004 [12].

Doplňující nařízení

Nařízení Komise /ES/ č. 1662, 1663, 1664 ze 6.11.2006, kterými se mění následující nařízení Evropského parlamentu a Rady /ES/:

- Ø č. 853/2004, kterým se stanoví Zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu /1662/,
- Ø č. 854/2004, kterým se stanoví Zvláštní pravidla pro organizaci úředních kontrol produktů živočišného původu určených k lidské výživě/1663/,
- Ø č. 2074/2005, pokud jde o prováděcí opatření pro některé produkty živočišného původu určené k lidské spotřebě a zrušující některá prováděcí opatření/1664/ [12].

Vyhláška č.287/99 Sb. Nahrazuje v podstatě ČSN 57 0529 Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování. V této normě však jsou uvedeny i další znaky jakosti a složení, z nichž některé jsou uplatňovány při uzavírání kupních smluv [3].

Smyslové znaky jakosti

Barva: bílá, případně s lehce nažloutlým odstínem,

Konzistence a vzhled: stejnorodá tekutina bez usazenin, vloček a hrubých nečistot,

Chuť a vůně: čistě mléčná bez jiných příchutí a pachů [3].

Fyzikální a chemické znaky jakosti – mléko musí odpovídat těmto požadavkům:

- Ø obsah tuku nejméně $33,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (T),
- Ø obsah bílkovin nejméně $28,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (B),
- Ø obsah tukuprosté sušiny nejméně 8,50 % (TPS),
- Ø bod mrznutí větší nebo rovno $-0,515 \text{ }^\circ\text{C}$ (BM),
- Ø kyselost mléka stanovená dle Soxhlet-Henkela 6,2 – 7,8 [3].

Doplňkové znaky jakosti

Mikrobiologické znaky jakosti pro speciální výroby:

- Ø počet psychrotrofních mikroorganismů do 50 000 v 1ml (PTM),
- Ø počet termorezistentních mikroorganismů do 2000 v 1ml (TRM),
- Ø počet koliformních bakterií nejvýše 1000 v 1ml (CA),
- Ø sporotvorné anaerobní bakterie v 0,1ml – test negativní (SPAN) [3].

Látkový obsah volných mastných kyselin u mléčného tuku má být $13,0 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ metodou stlukem – $32,0 \text{ mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ metodou extrakčně titrační [3]

Tab.10: Průměrné ukazatele jakosti syrového kravského mléka v období let 1997 – 2001 dle výsledků hodnocení v centrálních laboratořích [3]

	Jednotka	1997	1998	1999	2000	2001
CPM	v 1ml	79 120	66 030	65 000	52 680	46 770
PSM	v 1ml	236 760	238 380	248 000	248 200	259 210
BM	x (-0,001) °C	521	523	523	523	523
B	%	3,26	3,36	3,34	3,31	3,35
T	g·100ml ⁻¹	4,27	4,26	4,24	4,21	4,19
TPS	%	8,82	8,82	8,79	8,79	8,82
CA	v 1ml	132	149	191	276	215
TRM	v 1ml	1 275	1 200	1 192	1 016	831
PTM	v 1ml	21 220	16 450	10 900	6 847	6 200
SPAN	% pozit.vzorků	15,4	14,0	10,51	13,67	10,6

Další kritéria na syrové mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování:

Stanovují je:

- Ø ČSN 570529 Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování, Změna č.1, leden 1998,
- Ø ČSN 569601 Pravidla správné hygienické a výrobní praxe - Mléko a mléčné výrobky z roku 2006, zpracovaná ve smyslu Nařízení EP a Rady /ES/ č.852/2004 ke zpracování a rozšiřování pravidel pro správnou praxi potravinářským sektorem [12].

Doporučuje kontrolovat následující kritéria:

- Ø senzorické znaky,
- Ø fyzikálně chemické znaky (tuk, bílkovina-kasein, bod mrznutí mléka, kyselost mléka),
- Ø další znaky dle ČSN 570529 (doplňkové mikrobiologické znaky, podíl volných mastných kyselin atd.) [12].

Stanovené znaky se kontrolují na základě dohody mezi výrobcem mléka a jeho zpracovatelem. Jsou využívány pro zajištění kvalitního zpracování mléka a kvalitu výrobků a případného využívání při zpeněžování mléka. Je tedy třeba využívat příslušných ustanovení obchodního zákoníku. Je možno doporučit používání příslušných výkladů, které existují k citovaným doporučeným normám [12].

Stanovení tuku je předpokladem schválení odběratele ve smyslu §5, odst.3, písmeno b Nařízení vlády č.258/255 O stanovení bližších podmínek pro uplatňování dávky v odvětví mléka a mléčných výrobků v rámci společné organizace trhu s mlékem a mléčnými výrobky a to v laboratořích schválených podle zvláštního právního předpisu (Veterinární zákon) [12]. Při kontrole mléka pro potřeby mlékárenského zpracování, hygienické kvality, jeho zpeněžování a zejména při kontrole užitečnosti dojnic je možno kontrolovat i další parametry, zejména pro kontrolu zdravotního stavu dojnic, jejich metabolismu a správné výživy [12].

Jedná se zejména o:

- Ø stanovení močoviny pro kontrolu bílkovinného metabolismu a přísunu energie,
- Ø stanovení kyseliny citronové pro kontrolu glycidového metabolismu,
- Ø stanovení ketolátek [12].

Tab. 11: Hodnoty močoviny v syrovém kravském mléce [12]

Obsah močoviny v mg·l ⁻¹			
Obsah bílkovin v %	< 150	150 - 300	> 300
> 3,6	Nedostatek bílkovin a přebytek energie	Přebytek energie	Přebytek bílkovin a energie
3,2 – 3,6	Nedostatek bílkovin a slabý přebytek energie	Bílkoviny a energie v rovnováze	Nedostatek bílkovin a slabý nedostatek energie
< 3,2	Nedostatek energie a bílkovin	Nedostatek energie	Přebytek bílkovin a nedostatek energie

Ověřování požadovaných kritérií

Plnění stanovených kritérií se musí ověřovat na reprezentativním počtu vzorků syrového mléka odebraných při namátkových kontrolách v zemědělských podnicích vyrábějících mléko.

- Ø klouzavý geometrický průměr za dvouměsíční období, alespoň dva vzorky za měsíc (CPM),

- Ø klouzavý geometrický průměr za tříměsíční období, alespoň jeden vzorek za měsíc, pokud příslušný orgán neurčí jinou metodiku s cílem zohlednit sezónní variace v úrovni výroby (PSB) [12].

Tyto kontroly mohou být prováděny :

- Ø provozovatelem potravinářského podniku, který mléko vyrábí, nebo v jeho zastoupení,
- Ø provozovatelem potravinářského podniku, který mléko sváží, nebo zpracovává, nebo v jeho zastoupení,
- Ø skupinou provozovatelů potravinářských podniků, nebo v jejich zastoupení,
- Ø nebo v rámci vnitrostátních nebo regionálních kontrolních programů [12].

Pokud mléko nesplňuje požadovaná kritéria, musí provozovatel potravinářského podniku informovat příslušný orgán a přijmout opatření k nápravě. Podkladem pro rozhodnutí orgánů veterinární správy musí být výsledek vyšetření ze Státního veterinárního ústavu, Národní referenční laboratoř, referenčních laboratoř nebo laboratoř, které byly pro požadovaný druh vyšetření akreditovány, a kterým vydala Státní veterinární správa (SVS) povolení k provádění veterinární laboratorní diagnostické činnosti, anebo referenční laboratoř Evropského společenství.

Tyto laboratoře postupují podle metod a norem stanovených předpisy ES [12].

Kontrola syrového mléka po svozu

Příslušný orgán monitoruje prováděné kontroly požadovaných kritérií. Pokud provozovatel potravinářského podniku nenapraví situaci do 3 měsíců, kdy poprvé oznámil příslušnému orgánu, že nebyla dodržena kritéria pro obsah mikroorganismů nebo somatických buněk, musí být dodávky syrového mléka pozastaveny, nebo v souladu se zvláštním povolením nebo všeobecnými pokyny příslušného orgánu podrobeny požadavkům týkajícím se ošetření mléka a jeho použití, předepsaným z důvodu ochrany veřejného zdraví. Toto pozastavení

nebo tyto požadavky musí zůstat v platnosti, dokud provozovatel neprokáže, že syrové mléko opět splňuje kritéria [12].

Testovací metody pro syrové mléko

- Ø EN/ ISO 4833 pro obsah mikroorganismů při 30 °C,
- Ø ISO 13366-1 pro obsah somatických buněk /ČSN EN ISO/.

Tyto analytické metody jsou stanoveny jako referenční pro příslušné orgány, popřípadě provozovatele potravinářských podniků ke kontrole dodržování limitů stanovených kritérií. Použití alternativních metod je přijatelné za předpokladu jejich validace za stanovených podmínek [12].

1.5.3 Laboratoře

- Ø Referenční laboratoř Společenství pro mléko a mléčné výrobky AfssaLerga, F 94700 Maisons –Alfort [12].
- Ø Referenční laboratoř Společenství pro antibakteriální látky AFSSA Sile de Fougerés, BP 9023, Francie [12].

Národní referenční laboratoře:

- Ø pro mléko a mléčné výrobky SVÚ Praha,
- Ø pro antibakteriální/inhibiční/ látky a rezidua veterinárních léčiv SVÚ Jihlava,
- Ø NRL VÚCHS Rapotín [12].

MILCOM a. s., Výzkumný ústav mlékárenský a jeho laboratoř zapojená do systému mezi-laboratorních testů v oblasti stanovení chemicko-fyzikálních znaků a mikrobiologické jakosti mléka a kalibrace přístrojové techniky na základě dohody o spolupráci v oblasti jakostního hodnocení syrového kravského mléka mezi SVS ČR A SCL pro hodnocení jakosti mléka z 30.11.2000 [12].

Zkušební laboratoře :

- Ø Centrální laboratoř - MADETA Agro a.s, České Budějovice,
- Ø Centrální laboratoř - Bohušovická mlékárna a.s,

Ø Laboratoř pro rozbory mléka, Tuřany ČMSCH,

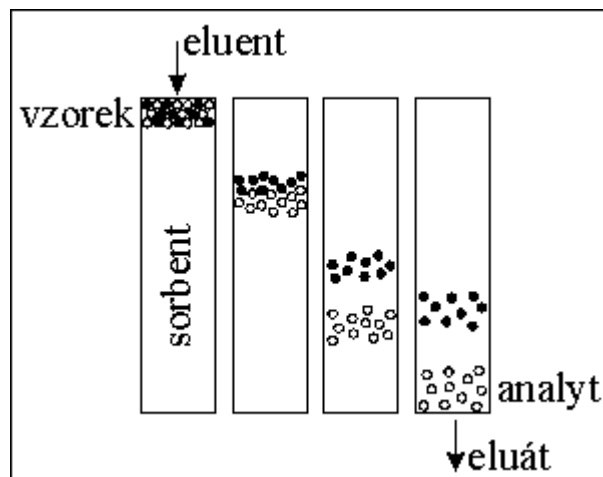
Ø Laboratoř pro mléko, Buštěhrad ČMSCH,

a další laboratoře pro úřední kontrolu akreditované a schválené SVS ČR [12].

2 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

2.1 Princip

Kapalinová chromatografie je jednou z chromatografických separačních (dělících) metod. V případě kolonové chromatografie je k dělení látek používána chromatografická kolona. Je to zpravidla skleněná, ocelová nebo plastová trubice naplněná drobnými částicemi vhodného materiálu - **sorbentu**. Určitá oblast sorbentu je přístupná pro molekuly vzorku a tvoří **tzv. stacionární fázi**. Mezi částicemi sorbentu protéká kolonou kapalina (mobilní fáze, eluent). Při běžné eluční metodě je roztok vzorku nastříknut v úzké zóně na začátek kolony. V kontaktu se sorbentem každá složka vzorku přechází zčásti do stacionární fáze ve snaze dosáhnout termodynamické rovnováhy [13].



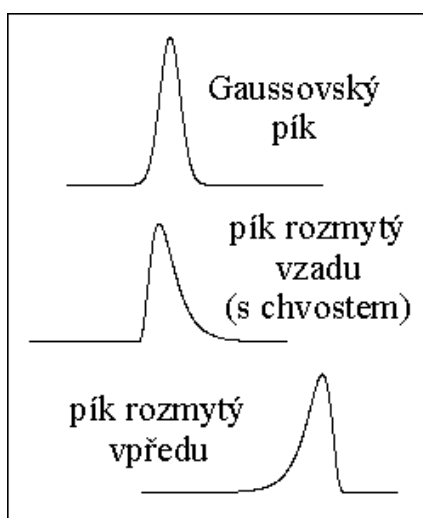
Obr.4: Separace vzorku [14]

Velikost retence (zadržení) složky na stacionární fázi je charakterizována **retenčním faktorem k**:

$$k = \frac{n_s}{n_m}$$

kde n_s a n_m jsou rovnovážná látková množství složky ve fázi stacionární a mobilní [13].

Složky, jejichž retenční faktory se dostatečně liší, opouštějí kolonu v oddělených zónách. Mobilní fáze vystupující z kolony je vedena do detektoru, který na základě změny některé fyzikální nebo fyzikálně-chemické veličiny indikuje přítomnost separovaných složek. Grafický záznam závislosti signálu detektoru na čase se nazývá **chromatogram**. Počátek chromatogramu je kladen do okamžiku nástřiku vzorku na kolonu. Každé rozdělené složce odpovídá na chromatogramu jeden pík, který má v ideálním případě tvar Gaussovy křivky [13].



Obr.5: Tvary píků [13]

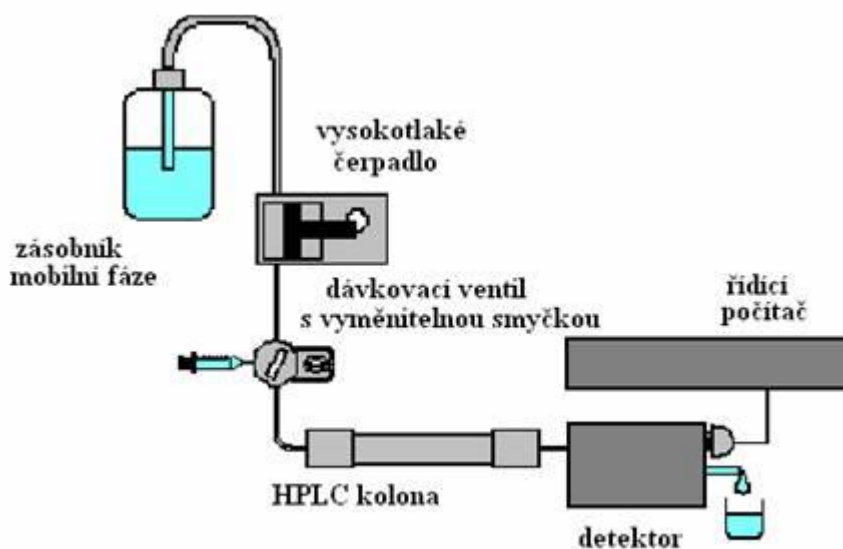
Poloha jejího vrcholu se nazývá **retenční čas t_R** . Retenční čas je v podstatě doba, během níž látka projde celou kolonou [14]. HPLC metoda poskytne základní separaci všech složek s dobrou rozlišovací schopností během 40 minut [24].

2.2 Přístrojové vybavení

Chromatografický systém může být buď otevřený – klasická kapalinová chromatografie, nebo uzavřený – moderní vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) [14].

Otevřený chromatografický systém se skládá z kolony naplněné sorbentem, která je nahoře opatřena zásobníkem eluentu a dole je jímadlo eluátu, někdy též jímač frakcí. Vzorek se vnáší přímo na náplň kolony [14].

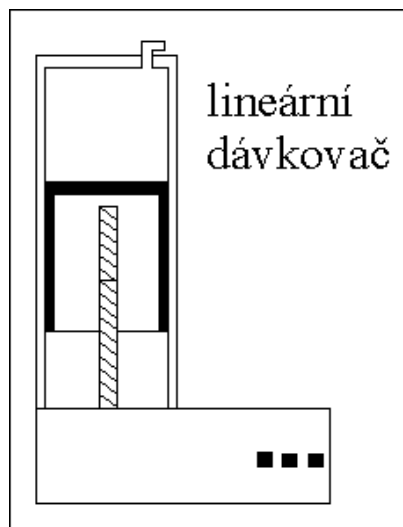
V uzavřeném chromatografickém systému obstarává pohyb eluentu čerpadlo zařazené před kolonu. Na vstupu do kolony je ještě zařízení pro dávkování vzorku. Na výstupu z kolony je umístěn detektor, za kterým může být zařazen jímač frakcí. Základní technické vybavení obsahuje čerpadlo, dávkovač vzorku, kolonu a detektor [14].



Obr. 6: Schéma kapalinového chromatografu [17]

2.2.1 Čerpadla

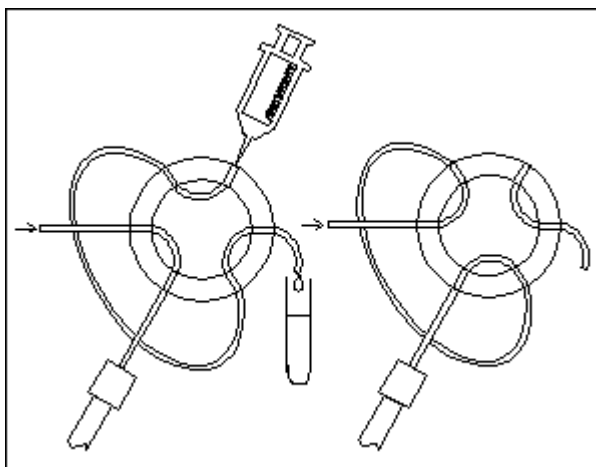
Čerpadla musí zajišťovat konstantní průtok mobilní fáze s přesností lepší než 2 %, plynule regulovatelný v rozsahu asi $0,1$ až $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ [14].



Obr.7: Lineární dávkovač [16]

Zařízení pro gradientovou eluci umožňuje plynule během analýzy měnit složení mobilní fáze při konstantním průtoku. Moderní gradientová zařízení se mohou skládat ze dvou lineárních dávkovačů, které jsou elektronicky řízeny tak, aby se v průběhu experimentu jednotlivá čerpadla podílela na celkovém průtoku požadovaným podílem [14].

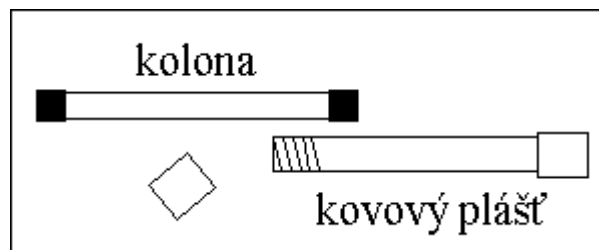
Vzorek se dávkuje do kolony buď přímým nástřikem injekční stříkačkou, nebo předřazenou dávkovací smyčkou. Pro přímý nástřik je kolona opatřena nástřikovací hlavou, ve které je septum. Vzorek se vnáší propíchnutím septa injekční stříkačkou. Druhý způsob dávkování používá šesticestný kohout s dávkovací smyčkou. Při dávkování se nejprve naplní smyčka vzorkem a potom se kohout přepne do druhé polohy, kdy eluentu protéká smyčkou a unáší vzorek do kolony [14].



Obr.8: Dávkovací smyčka [16]

2.2.2 Kolony

Při konstrukci kolon se většinou dává přednost rovným trubicím, jejichž délka se pohybuje mezi 5 až 25 cm. Nejběžnějším materiálem pro tlakové kolony je nerezová ocel, méně často měď nebo tvrzené sklo. [14]



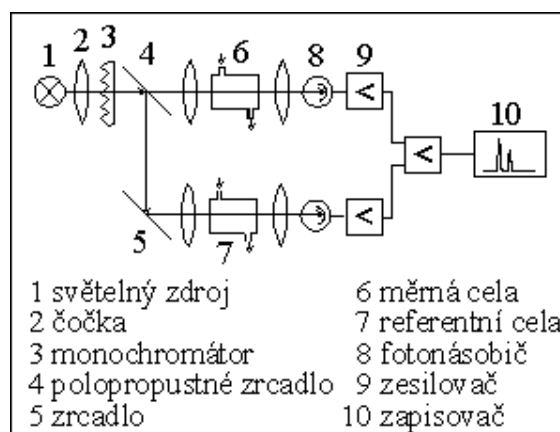
Obr.9: Chromatografická kolona [16]

2.2.3 Detektory

V kapalinové chromatografii se používají převážně tyto detektory:

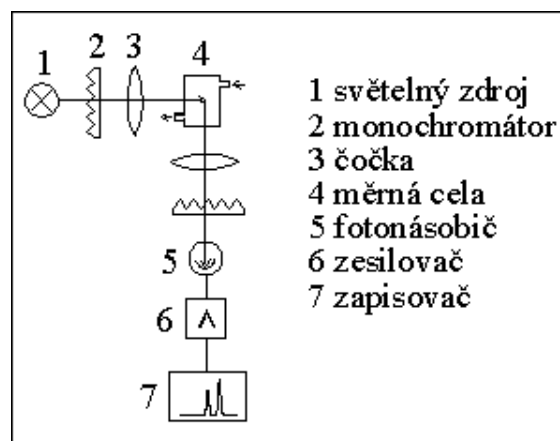
- Ø optické (fotometrický, fluorimetrický, refraktometrický),
- Ø elektrochemické (voltametrický, ampérometrický, kulometrický, ...), [14]
- Ø hmotnostní.

Fotometrický detektor - novější přístroje jsou vybaveny deuteriovou výbojkou, mřížkovým monochromátorem a fotoelektrickým násobičem a mohou pracovat při libovolně volitelné vlnové délce v rozsahu 190 až 600 nm [14].



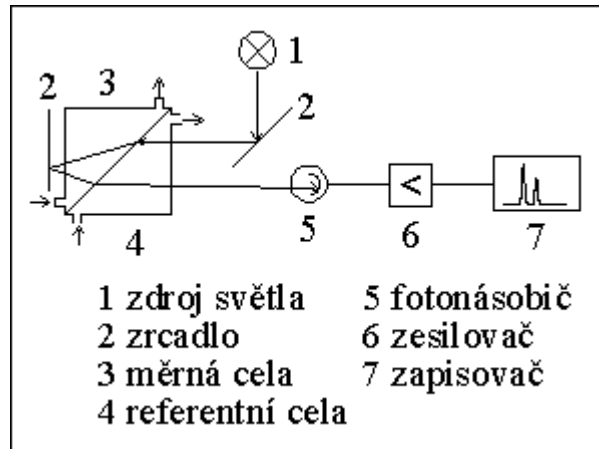
Obr.10: Fotometrický detektor [16]

Fluorimetrické detektory jsou konstrukčně velmi podobné detektorům fotometrickým. Polychromatické zařízení ze zdroje prochází excitačním monochromátorem, který z něho izoluje excitační záření o zvolené vlnové délce. Záření potom dopadá na celu, kterou protéká eluent z kolony a část záření je přitom absorbována. Emitované fluorescenční záření a rozptýlené excitační záření vstupují do emisního monochromátoru, který odfiltruje rozptýlené záření a propustí určitou část fluorescenčního záření podle zvolené vlnové délky emise. Fluorescenční záření dopadá na fotoelektrický násobič, kde se přemění na elektrický signál, který je po zesílení registrován [14].



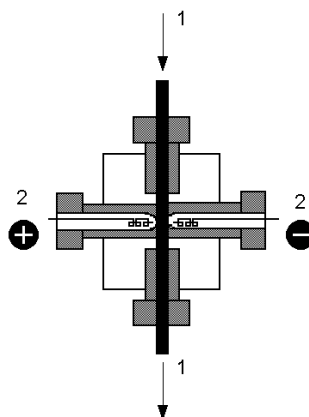
Obr.11: Fluorimetrický detektor [16]

Refraktometr kontinuálně zaznamenává rozdíl v indexu lomu mezi čistou mobilní fází, která je v referenční cele a mezi eluátem z kolony, který protéká měrnou celou. Detektor využívá toho, že při změně složení mobilní fáze v měrné cele, dojde ke změně vychýlení světelného paprsku, který celou prochází. Paprsek dopadá na fotoelektrický násobič a podle jeho vychylky se mění elektrický signál. Jsou méně citlivé než fotometrické detektory [14].



Obr.12: Refraktometrický detektor [16]

Vodivostní detektory patří mezi univerzální detektory a měří elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami, na něž je vkládáno střídavé napětí, aby se zabránilo polarizaci těchto elektrod. U vodivostního detektoru jsou kladené vysoké nároky na mobilní fázi, která by měla být pokud možno nevodivá, musí ovšem separované látky dostatečně rozpouštět a mít dostatečně velkou permitivitu. Těmto podmínkám vyhovuje redestilovaná voda, popřípadě i s příměsí polárních organických rozpouštědel. Její nepatrná vodivost pak umožňuje detekci i stopových složek iontů vycházející z kolony. V případě použití pufrů jako mobilní fáze se ale drasticky změní vodivost mobilní fáze a nepatrné zvýšení vodivosti v důsledku přítomnosti malého množství iontu vycházejícího z kolony detektor neumožňuje zaznamenat. [18]



Obr. 13: Schéma vodivostního detektoru [18]

3 SPEKTROMETRIE V BLÍZKÉ INFRAČERVENÉ OBLASTI

Spektrometrie v blízké infračervené oblasti („Near-Infrared Spectrometry“ – NIR spectroscopy) je metodou molekulové spektroskopie, která využívá spektrální oblast blízkého infračerveného záření, tj. oblast vlnových délek 800 – 2500 nm, resp. vlnočtů 12500 – 4000 cm^{-1} . NIR oblast tak z jedné strany navazuje na viditelnou, z druhé pak na střední infračervenou. Hranice nejsou zcela ostré a fluktuují v závislosti na tom, zda se tyto hranice vyvozuji z možností spektrometrů pokrýt danou oblast, nebo z typu energetických přechodů, které se v dané oblasti pozorují.

Absorpce záření v NIR oblasti je obvykle způsobena energetickými přechody mezi vibračními hladinami molekul¹, a to přechody kombinačními² a svrchními tóny (overtony)³, nikoli přechody fundamentálními, které hrají dominantní roli ve střední infračervené oblasti (MIR) [21].

Přiřazení absorpčních pásů jednotlivým kombinačním přechodům a svrchním tonům je poměrně obtížné, a proto se běžně neprovádí rozbor spekter směřující k identifikaci funkčních skupin v molekulách, jak je obvyklé při interpretaci spekter v MIR oblasti. Lze vymezit oblasti, kde jsou dominantní pásy kombinačních přechodů (cca 4000 – 5300 cm^{-1}), první overtóny (cca 4600 – 7300 cm^{-1}), druhé overtóny (cca 6000 – 10000 cm^{-1}) a třetí overtóny (cca 8800 – 14500 cm^{-1}).

Z hlediska kvalitativní informace je možné srovnávat měřená spektra čistých látek s knihovny spekter, a tak provádět identifikaci látek. K dispozici jsou například knihovny spekter polymerů či farmaceuticky důležitých chemikálií [21].

1 U některých látek či materiálů se v NIR oblasti uplatňují přechody mezi různými elektronovými stavy. Jedná se například o některé koordinační sloučeniny přechodných kovů či lantanoidů.

2 Kombinační přechody znamenají současnou excitaci několika vibračních módů (energie příslušného přechodu pak odpovídá součtu energií fundamentálních přechodů příslušných vibračních módů).

3 Svrchní tón (oveton) odpovídá excitaci daného vibračního modu do vyšší excitované hladiny. První oveton tak zhruba odpovídá dvojnásobku energie fundamentálního přechodu, druhý oveton trojnásobku, třetí čtyřnásobku. Pro přesnější popis je třeba uvažovat anharmonicitu vibračních módů.

Významnou měrou se NIR spektra využívají pro kvantitativní analýzu, a to i složitých vzorků v řadě odvětví jako je například petrochemie, farmaceutický, papírenský či potravinářský průmysl. V mnoha případech je možné stanovit více složek vedle sebe, aniž je nutné dělit složité směsi, a to přímo ve výrobním procesu. NIR spektrometrie se proto zařazuje mezi tzv. procesní analytické metody, kdy se klade důraz na rychlost samotné analýzy včetně možnosti kontinuální on-line analýzy ve výrobním procesu (na výrobní lince) nikoli na její přesnost. Takto lze například zároveň stanovit obsah tuků, bílkovin, laktózy a močoviny v mléce a mléčných výrobcích (v různých stádiích jejich zpracování), či obsah etanolu a sacharidů v alkoholických nápojích (například během probíhajících kvasných procesů) [21].

Samostatné měření je poměrně rychlé, často nedestruktivní a nevyžaduje obvykle žádnou speciální úpravu vzorku. Minimalizuje se tak spotřeba chemikálií, jednorázově použitelných analytických setů, a tím i generování životní prostředí zatěžujících odpadů. Lze měřit vzorky ve skleněných i některých dalších transparentních obalech. Voda v některých částech NIR oblasti významně absorbuje, přesto však lze analyzovat i relativně zředěné vodné roztoky. Mnohem pracnější a časově výrazně náročnější než samotné měření spekter je následné zpracování a vyhodnocování naměřených dat [21].

3.1 Techniky měření NIR spekter

NIR spektra lze měřit jako zeslabení zářivého toku po průchodu záření vzorkem (transmisní měření) nebo po odrazu záření (reflexní techniky). V rámci reflexních technik se nejčastěji uplatňuje princip difúzní reflexe⁵, kdy se dopadající záření odráží od povrchu jednotlivých malých částic práškového vzorku. Tento přístup se často používá při analýzách ve farmaceutickém průmyslu či při analýze průmyslově vyráběných práškových krmiv pro zemědělskou výrobu [21].

⁵ Difúzně-reflexní princip měření FTIR spekter je mnohdy označován zkratkou DRIFT.

Transmisní měření se využívá především v případě kapalin, kašovitých vzorků a polymerních folií. Kapalné vzorky je možné měřit v kyvetách ze speciálního skla (INFRASIL, SUPRASIL), které vykazuje vysokou propustnost v celé NIR oblasti. Tloušťka optické vrstvy u těchto kyvet je obvykle od 1 mm do cca 10 mm a jejich volba se optimalizuje v závislosti na koncentraci analytu v roztoku a optických vlastnostech rozpouštědla.

Vedle uvedených postupů, kdy je vzorek umístěn v držáku přístroje, se často NIR spektra měří s využitím vláknové optiky s různými typy sond, které mohou být umístěny například přímo v chemickém či biotechnologickém výrobním reaktoru [21].

3.2 Přístroje pro měření NIR spekter

Pro měření v blízké infračervené oblasti je možné spektrometry rozdělit do tří základních skupin.

- Ø **Filtrové přístroje.** Vývojově nejstarší skupina přístrojů, které pracují pouze s určitými vlnovými délkami.
- Ø **Disperzní přístroje.** Pomocí různě širokých štěrbin převádějí záření zdroje na monochromatické záření.
- Ø **FT NIR spektrometry.** Zaznamenávají na detektoru tzv. interferogram, který je následně převeden Fourierovou transformací na infračervené spektrum [19].

V dnešní době jsou filtrové a disperzní přístroje téměř vytlačeny a používají se spektrometry založené na Fourierově transformaci. Tato práce byla měřena na spektrometru FTIR Antaris ThermoNicolet, spektrometru pracujícího na základě Fourierovy transformace [19].

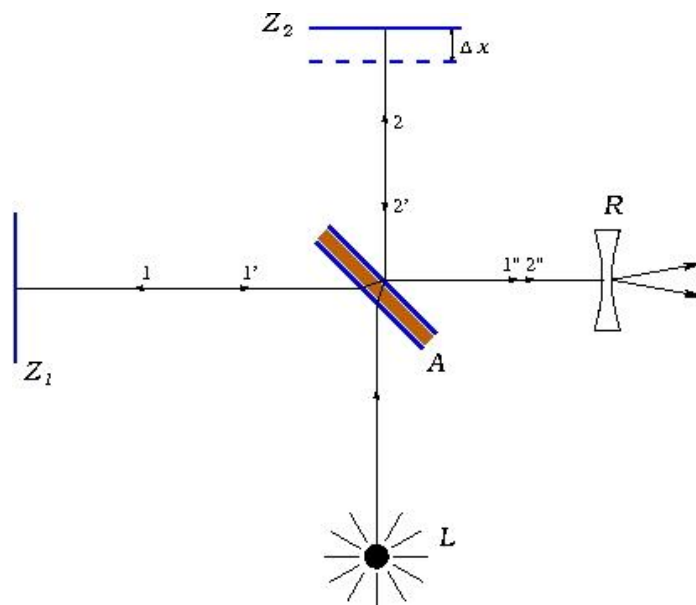
Proti disperzním spektrometrům má FT spektrometr některé výhody:

- Ø **Výhoda světelnosti (Jacquinotova).** FT spektrometrem prochází celý svazek o vysoké intenzitě. Naopak u disperzního přístroje s růstem rozlišovací schopnosti velmi rychle klesá procházející světelný tok.
- Ø **Multiplexová výhoda (Felgettova).** Celé spektrum je měřeno během jedné periody pohybu zrcadla, což vede ke značné úspoře času a zvýšení poměru signálu k šumu [19].

- Ø Výhoda jednoduché kalibrace (Connesové). Pro výpočet spektra stačí znát přesně rozdíl optických drah v obou ramenech.
- Ø Výhoda rozptýleného světla. V interferometru dochází k odlišnému skládání záření o různých frekvencích, které jsou způsobeny rotujícím polokruhovým zrcadlem.
- Ø Velká rozlišovací schopnost a konstantní rozlišení v celém rozsahu spektra. Rozlišení je pouze závislé na velikosti použitého dráhového rozdílu interferometru.
- Ø Rychlost záznamu a výpočtu.
- Ø Modularita. Možnost snadno změnit spektrální rozsah přístroje změnou zdroje záření, děliče svazků a detektoru [19].

3.2.1 Fourierova (FTIR) spektroskopie

Srdcem FT spektrometru je Michelsonův interferometr (obr.17), který je příkladem nedisperzního neboli multiplexního zařízení, jež na principu interference zesiluje, resp. zeslabuje záření z polychromatického zdroje [19].



Obr.14: Michelsonův interferometr [20]

Jedna část paprsku, jež dopadá na polopropustný dělič paprsků, se od něj odráží na pevné zrcadlo, zde se odráží zpět a vrací se nazpět k děliču paprsků. Druhá část paprsku prochází přes polopropustný dělič paprsků, odráží se od pohyblivého zrcadla zpět a od polopropustného děliče paprsků se odráží dolů. V tomto místě se setkává s první částí paprsku a interferuje s ní. Interferencí se zesilují paprsky, které se potkají ve fázi. Postupně se mění vzdálenost pohyblivého zrcadla, a tím i vlnové délky zesíleného záření [19].

Výsledkem měření není spektrum, ale interferogram, jež představuje závislost odezvy detektoru na čase. Infračervené spektrum získáme teprve převedením interferogramu pomocí matematického postupu zvaného Fourierova transformace [19].

FT NIR Antaris (ThermoNicolet)

Přístroj může měřit v režimu reflektance (odraz paprsku od povrchu vzorku) a transmitance (průchod světla vzorkem) ve spektrálním rozsahu $10\,000 - 4\,000\text{ cm}^{-1}$. [19]

Spektrometr je vybaven několika snímacími místy: integrační sféra, optická sonda a kyvetový prostor, na kterých se uplatňují různé typy kyvet a transportních cel. Pro snímání kontinuálního spektra vzorku na integrační sféře je určeno nastavné zařízení (spinner), jež během měření otáčí kyvetou se vzorkem. [19]

Snímání vzorku probíhá v následujícím sledu:

- programově se nastaví počet scanů a spektrální rozlišení
- na začátku je proměřeno pozadí oproti standardu (zlatý terčik), které je opakovaně snímáno v různých časových intervalech během vlastního měření vzorku
- probíhá vlastní proměřování vzorků, spektrum každého vzorku je snímáno opakovaně během jednoho měření (počet scanů) [19]

Ke komunikaci mezi spektrometrem a počítačem slouží programy Omnic a Result Integration. Tyto programy jsou určeny ke snímání spekter, jejich úpravě a zpracování. Rozdíl mezi nimi je v možnosti naprogramování tzv. workflow, tedy sled následných kroků během měření v závislosti na měřené komoditě, spektra jsou poté automaticky zprůměrována. Tato automatizace je možná pouze v režimu programu Result Integration. Tento program také

umožňuje aplikaci spinneru pro snímání vzorků. V programu Omnic je nastavení a úprava spekter dělána ručně. [19]



Obr.15: FT NIR Antaris [25]

Julie MilkoScope

Přístroj provádí měření základních obsahových složek – tuk, tukuprostá sušina, hustota, bílkoviny celkové, laktóza, přidaná voda a bod mrznutí. Jedná se o alternativní analýzu nahrazující zdlouhavé butyrometrické metody (používající nebezpečné chemikálie) s možností doplnění přesnými výsledky dalších obsahových složek (TPS, bílkovina, ...).

Využití nachází v příjmových, tzv. zemědělských laboratořích, při hodnocení obsahových složek u cisternových i bazénových vzorků a dále při analýze zásobních příjmových tanků. Rovněž mezioperační či výstupní laboratoře využijí tento analyzátor ke kontrole pasterizačních vzorků, homogenizovaných mléčných směsí či při kontrole finálních pasterizovaných či UHT mlék nízkotučných, polotučných i plnotučných.

MilkoScope Julie představuje analyzátor s velmi jednoduchou obsluhou, velmi dobrou přesností a opakovatelností výsledků. Výsledky měření jsou k dispozici max. do 90 sekund [26].



Obr.16: Julie MilkoScope C5 Automatic [27]

3.2.2 Výhody a nevýhody FT NIR spektroskopie

V posledních letech je NIR spektroskopie užívána v řadě odvětví a její široké uplatnění v základních analýzách se stává nenahraditelným. K rozšíření blízké infračervené spektroskopie přispělo několik významných skutečností:

- Ø rychlost,
- Ø snadná obsluha,
- Ø nedestruktivní metoda,
- Ø nevyžaduje speciální přípravu vzorku,
- Ø umožňuje měřit přes transparentní obaly (sklo, polyetylen),
- Ø jedno NIR spektrum vzorku lze použít ke kvalitativnímu i kvantitativnímu stanovení řady parametrů,
- Ø ideálně se hodí k analýze vzorků s vysokým obsahem vody (potravin a nápoje) [19].

NIR spektroskopie má ovšem také své nevýhody:

- Ø nehodí se ke stanovení obsahu minoritních látek ve směsích (stopová analýza),
- Ø naměřená spektra jsou těžko interpretovatelná a jejich vyhodnocení vyžaduje použití počítače vybaveného náležitým chemometrickým softwarem,
- Ø věrohodnost kvantitativních výsledků dosažených NIR spektroskopii závisí na přesnosti použité referenční metody, protože ta ovlivňuje kvalitu vytvořeného kalibračního modelu,
- Ø vyžaduje vyšší náklady na vytvoření kalibračního modelu, neboť pro získání kalibrační závislosti je potřeba použít velký počet vzorků [19].

3.3 Kvantitativní analýza

Jak již bylo uvedeno, NIR spektrometrie se výrazně uplatňuje v kvantitativní analýze. V rámci transmisních měření se obecně ve spektroskopii vychází z platnosti Lambertova-Beerova zákona, kdy pro každou jednotlivou složku i směsného vzorku platí následující vztah:

$$A_{l,i} = \epsilon_{\lambda,i} b c_i$$

kde $A_{\lambda,i}$ je příspěvek i -té složky k celkové absorptanci A_{λ} při dané vlnové délce λ , $\epsilon_{\lambda,i}$ je molární absorpční koeficient i -té složky při dané vlnové délce λ , b je optická tloušťka absorbujícího prostředí, c_i je koncentrace i -té složky ve směsi. [21]

Celková absorptance A_{λ} při dané vlnové délce λ je pak součtem příspěvků od všech m nezávislých složek zkoumaného systému:

$$A_l = \sum_{i=1}^m A_{l,i}$$

Vzhledem k tomu, že pásy v NIR oblasti jsou obvykle široké i pro čisté látky, a dále nelze vyloučit překryvy pásů různých složek a vzájemné vlivy měnících se koncentrací jednotlivých složek na tvar příslušných absorpčních pásů, není v této metodě jednoduchý princip Lambertova-Beerova zákona obvykle splněn [21].

Pro kalibraci je v NIR spektrometrii třeba vyvíjet kalibrační modely s využitím pokročilých chemometrických algoritmů, které však obvykle vyžadují rozsáhlou sadu standardů (běžně více jak 30 kalibračních vzorků). Taková sada musí být dostatečně reprezentativní, musí pokrýt celou očekávanou či odhadnutelnou variabilitu charakteristik vzorků, které pak mají být kvantitativně analyzovány, a to nejen z pohledu obsahu sledovaných analytů, ale i z pohledu dalších proměnlivostí (ať již fyzikálních či chemických) [21].

Při použití těchto regresních metod se v rámci kalibračního modelu používají nikoli hodnoty absorbance v maximech vybraných pásů, ale většinou se vyhodnocují širší spektrální úseky či dokonce celá NIR spektra. Podmínky měření všech spekter i způsoby jejich úprav a zpracování musí být zachovány od kalibračních, přes validační až po neznámé zkoumané vzorky [21].

Příprava takové sady kalibračních vzorků vyžaduje pečlivé plánování experimentu. Vývoj robustních kalibračních modelů a jejich řádná validace jsou klíčovými a poměrně náročnými kroky kvantitativní analýzy pomocí NIR spektrometrie. Je třeba počítat s nutností přípravy nejen již zmiňovaných velmi rozsáhlých souborů kalibračních vzorků, ale i sad vhodně zvolených validačních vzorků (který je mnohdy i dodatečně doplňován), testováním různých postupů předběžného zpracování spektrálních dat, hledáním vhodné regresní metody a optimalizací jejích parametrů a nezbytnými ověřovacími kroky, kdy je třeba testovat i odlehlé výsledky [21].

Použití validačních měření je nutné pro vyhodnocení výkonnostních charakteristik kalibračního modelu. Plnohodnotná validace spočívá v analýze nezávislého souboru vzorků o známém složení s využitím vyvinutého kalibračního modelu. K předběžnému ověření kalibračního modelu lze využít i různých postupů křížové validace („cross-validation“) včetně uplatnění principu postupného vylučování jednotlivých měření a jejich predikce na základě modelů konstruovaných pomocí ostatních měření („leave-one-out“) [21].

4 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH DAT

Výsledky statistické analýzy hodnotíme podle správnosti, tj. schopnosti metody kvantitativně určovat danou veličinu, dále podle přesnosti, tj. schopnosti metody poskytovat konzistentně stejné výsledky pro řadu opakovaných stanovení a podle reprodukovatelnosti, tj. schopnosti metody poskytovat konzistentně stejné výsledky pro nezávislá měření, prováděná se stejným vzorkem a stejným postupem různými pracovníky v různých laboratořích [22].

Analytická chyba představuje rozdíl mezi nalezeným obsahem analytu (x) a jeho skutečným obsahem (μ) ve vzorku. Malé, nepravidelné odchylky od skutečné hodnoty se určují statisticky ze souboru paralelních (opakovaných) analýz. Ovlivňují přesnost (reprodukovatelnost) či opakovatelnost stanovení [22].

Pro skutečný výpočet odhadu směrodatné odchylky na empiricky zjištěné řadě čísel (tento odhad se nazývá **výběrová směrodatná odchylka** a jedná se o odmocninu z výběrového rozptylu) lze použít následující postup:

Mějme soubor reálných čísel x_1, \dots, x_N . Aritmetický průměr souboru lze vypočítat jako:

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

Potom výběrová směrodatná odchylka těchto dat může být vypočítána jako

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}. \quad (2)$$

Pro praktické výpočty se častěji používá ekvivalentní vzorec,

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \left(\sum_{i=1}^N x_i^2 - N\bar{x}^2 \right)} \quad (3) [23]$$

Ve skutečnosti máme k dispozici jen omezený počet výsledků, který je podstatně menší než $n \rightarrow \infty$ a tudíž je směrodatná odchylka závislá na počtu paralelních výsledků. Byl definován Studentův koeficient t , který charakterizuje Studentovo rozložení náhodných odchylek pro daný stupeň volnosti (daný počet výsledků analýz a použitou hladinu významnosti $1-\alpha$).

Nejlépeším vyjádřením pro průměrný výsledek ze série paralelních stanovení je vztah:

$$m = \bar{x} \pm \frac{\sqrt{s}}{t} \cdot n \quad (3)$$

Tabulka 12: Kvantily t (n) Studentova rozdělení o n stupních volnosti:

t(n)	α		
n	0,05	0,01	0,001
1	12,71	63,66	636,58
2	4,30	9,93	31,60
3	3,18	5,84	12,92
4	2,78	4,60	8,60
5	2,57	4,03	6,87
6	2,45	3,71	5,96
7	2,37	3,50	5,41
8	2,31	3,36	5,04
9	2,26	3,25	4,78
10	2,23	3,14	4,59

[22]

PRAKTICKÁ ČÁST

5 METODIKA

5.1 Použité chemikálie

Kyselina chlorovodíková 37% (dodavatel Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)

Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4 (Ing. Petr Švec, PENTA)

Trichloroctová kyselina $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$, TCA (Ing. Petr Švec, PENTA)

Carrez I, 30 hmot.% ZnSO_4 (Chemapol Praha)

Carrez II, 15 hmot.% $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Chemapol Praha)

Metanol čistoty pro HPLC (Sigma Aldrich, Riedel-del Haën, SRN)

Clara-diastáza - α -amyláza, celulóza, invertáza, peptidáza, fosfatáza a sulfatáza

Destilovaná a redestilovaná voda

5.2 Použité přístroje a pomůcky

Temperovaná vodní lázeň a třepačka (Memmert, SRN)

Předvážky (Kern, SRN)

Lednice (Samsung- Calex, CZ)

pH metr

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

Analytické váhy

Speciální zřízení:

Aparatura pro HPLC – UV/VIS (Hewlett Packard 1100)

- Ø detektor DAD,
- Ø dávkovací ventil analytický smyčkový (20 μl),
- Ø kolona Supelcosil LC8 (150 x 4,6 mm; 5 μm),
- Ø PC s vyhodnocovacím programem Chemstation - Instrument 1, (Agilent, USA).

Dávkovací stříkačka (Hamilton, USA)

Mikrofiltry 0,45 μm , Nylon (Supelco, USA)

Mikrofiltry na mobilní fázi 0,2 μm (Supelco, USA)

FT NIR Antaris od firmy ThermoNicolet

- Ø detektor InGaAs,
- Ø dělič paprsků CaF_2 ,
- Ø zdroj záření halogenová žárovka.

Julie MilkoScope C5 Automatic

5.3 Vzorky mléka

Bylo vytipováno 8 krav holštýnského plemene u soukromého dodavatele, který si nepřeje být jmenován. Po odstranění bakteriální zátky byly ručně oddojeny jednotlivé vzorky mléka do neprůhledných lahvíček z polyetylénu. Vzorky byly zchlazeny na chladírenskou teplotu 8 °C a při této teplotě byly skladovány. Tyto vzorky byly odebírány vždy po jednom měsíci, a to celkem 3x. Do Brna byly vzorky převezeny v chlazeném boxu, aby nedošlo ke kolísání teploty mléka. Před vlastním měřením byly vzorky zahřáté na teplotu 40 °C a následně zchlazeny na teplotu 20 °C pro lepší homogenizaci tuku ve vzorcích. Následovala analýza vzorků.

5.4 Metody

5.4.1 Stanovení obsahu vitamínu B₅ a B₆ v mléce metodou HPLC – UV/VIS

Nejprve bylo nutno provést jednoduchou extrakci pro zjištění, jakých extrakčních činidel se posléze bude využívat k extrakci vitamínu B₅ a B₆ z kravského a kozího mléka. Extrakce probíhala za laboratorní teploty 25 °C a poté byly vzorky přesunuty do termostatu o teplotě 30 °C. Byly sestaveny dvě sady vzorků.

První sada sestávala z pěti vzorků. Do Erlenmayerovy baňky bylo napipetováno po 5 ml vzorku mléka, následně bylo ke každému vzorku přidáno po 25 ml HCl a to v koncentracích: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 mol·dm⁻³ (obr.18, 19).

Druhá sada vzorků sestávala taktéž z pěti vzorků. Opět bylo do Erlenmayerovy baňky napipetováno po 5 ml vzorku mléka, následně bylo přidáno po 25 ml HCl ke každému vzorku v koncentracích: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; a 0,5 mol·dm⁻³. Navíc se k jednotlivým vzorkům přidalo po 1 ml trichloroctové kyseliny v koncentracích: 80 %, 70 %, 60 % a 50 % (př. 5 ml mléka + 0,1 mol·dm⁻³ HCl + 80 % TCA; 5 ml mléka + 0,2 mol·dm⁻³ HCl + 70 % TCA, atd.)

Extrakce probíhala 24 hodin v termostatu o teplotě 30 °C. Výsledky jednoduché extrakce udává kapitola 6.1.1.

5.4.1.1 Zkouška extrakce vitamínu B₅ a B₆ z kravského a kozího mléka

Pro srovnání obsahů vitamínů byly použity vzorky čerstvého kravského a kozího mléka. Nejprve bylo nutno vzorky čerstvého kravského a kozího mléka zhomogenizovat a zahřát na 40 °C pomocí temperované vodní lázně a třepačky. Následně byly vzorky zchlazeny na 20 °C.

Z ochlazeného mléka bylo odebráno po 5 ml vzorku do čtyř Erlenmayerových baněk (2 x 5 ml mléka kravského a 2 x 5 ml mléka kozího). Ke všem vzorkům bylo přidáno po 30 ml 0,2 mol·dm⁻³ HCl a tyto vzorky se umístily do temperované vodní lázně o teplotě 95 °C po dobu 30 minut.

Po 30 minutách se 1 vzorek kravského mléka a 1 vzorek mléka kozího vyjmuly z lázně a umístily se do termostatu na 25 °C na dobu 18 hodin. Zbylé 2 vzorky se taktéž vyjmuly z lázně a po úpravě pH na hodnotu 6 se ke vzorkům přidalo po 2 ml 2 % enzymu *Clara-dia*stázy. Vzorky se opět vložily do termostatu na dobu 18 hodin.

Po 18 hodinách se všechny vzorky vyjmuly z termostatu, převedly do 50 ml odměrné baňky. Každá Erlenmayerova baňka se promyla 2 ml 80 % TCA (trichloroctová kyselina) a následně se obsah baňky vlil ke vzorku v odměrné baňce. Totéž se postupně opakovalo se 2 ml činidla Carrez I, 2 ml činidla Carrez II pro vyčiření vzorku. Poté se odměrná baňka doplnila po rysku mobilní fází.

Následovala 2-stupňová filtrace vzorku, nejdříve pomocí modrého filtračního papíru a následně pomocí vývěvy (mikrofiltr 0,2 μm). Pro dávkování vzorku do chromatografické kolony bylo nutno nejdříve vzorek přefiltrovat pomocí nylonového filtru o velikosti pórů 0,45 μm . Následně byly jednotlivé vzorky dávkovány pomocí dávkovací jehly do chromatografické kolony. Každý vzorek byl proměřen 5 x pro kontrolu naměřených dat.

5.4.1.2 Pilotní chromatografické stanovení vitamínů B₅ a B₆ metodou HPLC

Pro stanovení metodiky měření obsahu vitamínu B₅ a B₆ v mléce byly použity standardy kyseliny pantotenové a pyridoxinu od Supelco, USA. Chromatografická separace probíhala na koloně SUPELCOSIL LC8 (150 x 4,6 mm; 5 μm). Eluce byla prováděna izokraticky s mobilní fází (KH₂PO₄ : MetOH v poměru 90 : 10), pH 7, při teplotě 25 °C, průtoku 1 ml·min⁻¹ a tlaku 90 bar. Vzorky vitamínu B₅ byly proměřovány při následujících vlnových délkách: 220 nm, 234 nm, 254 nm a 261 nm. Vzorky vitamínu B₆ byly proměřovány při následujících 204, 220, 254 a 324 nm. Úkolem bylo stanovit vhodnou vlnovou délku, při které je nejvhodnější chromatografická detekce vitamínu B₅ a B₆ v mléce, dále zjistit retenční čas příslušných vitamínů.

5.4.1.3 Měření kalibrační křivky pro stanovení vitamínů B₅ a B₆ metodou HPLC – UV/VIS

Byly ověřeny vhodné vlnové délky 204 nm a 220 nm. Pro sestavení kalibrační křivky bylo nejprve nutno připravit standardní roztoky vitamínů B₅ a B₆ o různých koncentracích. Nejprve byl připraven zásobní roztok o koncentraci 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ tak, že bylo naváženo 0,0020 g do 100 ml odměrné baňky a následně doplněno po rysku mobilní fází (KH₂PO₄ : MetOH v poměru 90 : 10). Z tohoto zásobního roztoku byly připraveny následující koncentrace standardních roztoků pro měření kalibrační křivky: 1, 2, 3, 4, 5 a 6 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Chromatografická separace probíhala na koloně SUPELCOSIL LC8 (150 x 4,6 mm; 5 μm). Eluce byla prováděna izokraticky s mobilní fází (KH₂PO₄ : MetOH v poměru 90 : 10), pH 7, při teplotě 25 °C, průtoku 1 ml·min⁻¹ a tlaku 91 bar. Vzorky byly proměřovány při vlnových délkách 204 a 220 nm. Každý vzorek byl proměřen čtyřikrát při daném potenciálu. Pro přesnější stanovení obsahu vitamínu B₅ a B₆ byla použita vlnová délka 220 nm. Z naměřených dat

byla odečtena hodnota plochy píku [$\text{mAV}\cdot\text{s}^{-1}$]. Kalibrační křivky byly sestrojeny jako závislost plochy píku na koncentraci vitamínů B_5 a B_6 . Výsledky jednotlivých vitamínů budou uvedeny v $\text{mg}\cdot 100\text{ ml}^{-1}$ syrového mléka.

5.4.1.4 Vlastní stanovení obsahu vitamínu B_5 a B_6 ve vzorcích čerstvého mléka

Byly připraveny vzorky mléka (5 vzorků čerstvého kravského mléka a 5 vzorků čerstvého kozího mléka) extrakcí podle postupu v kapitole 5.4.1. Alikvotní podíl vzorku byl vždy před nástřikem do chromatografické kolony přefiltrován přes nylonový filtr o velikosti pórů $0,45\ \mu\text{m}$. Chromatografická separace probíhala na koloně SUPELCOSIL LC8 ($150 \times 4,6\ \text{mm}$; $5\ \mu\text{m}$). Eluce byla prováděna izokraticky s mobilní fází (KH_2PO_4 : MetOH v poměru 90 : 10), pH 7, při teplotě $25\ ^\circ\text{C}$, průtoku $1\ \text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a tlaku 90 bar. Detekce vitamínu B_5 a B_6 byla prováděna při vlnové délce 220 a 204 nm. Pro přesnější stanovení obsahu vitamínu B_5 a B_6 byla nakonec použita vlnová délka 220 nm. Z naměřených dat byly odečteny hodnoty plochy píku [$\text{mAV}\cdot\text{s}^{-1}$], dosazeny do rovnic kalibračních křivek a vypočteny obsahy jednotlivých vitamínů v $\text{mg}\cdot 100\text{ ml}^{-1}$ syrového mléka.

5.4.2 Stanovení základních složek mléka spektroskopii

Úkolem bylo stanovit základní složky čerstvého kravského mléka: tuk, sušinu, hustotu, bílkoviny, laktózu. Měření probíhalo na zařízeních: Julie MilkoScope C5 Automatic (UTB Zlín) a FT NIR Antaris od firmy ThermoNicolet (Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Ústav technologie potravin). Hlavním cílem bylo vyhodnotit naměřené hodnoty z obou zařízení a vzájemně je mezi sebou porovnat.

5.4.2.1 Příprava vzorku mléka ke stanovení základních složek spektroskopii

Vzorky mléka byly získány od soukromého dodavatele. Bylo získáno osm různých vzorků od osmi různých krav stejného plemene – holštýnské plemeno (vzorky označeny A – I). Po odstranění bakteriální zátky byly ručně oddojeny jednotlivé vzorky mléka do neprůhledných lahvíček z polyetylénu. Vzorek byl zchlazen na chladírenskou teplotu $8\ ^\circ\text{C}$ a při této teplotě byl skladován. Do Brna byl vzorek převezen v chlazeném boxu, aby nedo-

šlo ke kolísání teploty mléka. Před vlastním měřením byly vzorky zahřáté na teplotu 40 °C a následně zchlazeny na teplotu 20 °C pro lepší homogenizaci tuku ve vzorcích. Vytemperované vzorky byly připraveny na měření.

5.4.2.2 Vlastní stanovení základních složek čerstvého kravského mléka spektroskopii, použití přístroje Julie MilkoScope C5 Automatic

Úkolem bylo stanovit základní složky čerstvého kravského mléka: tuk, tukuprostou sušinu, sušinu, bílkoviny, laktózu, hustotu a minerální látky. Celkem bylo proměřeno osm vzorků, které byly připraveny podle postupu v kapitole 5.4.1. Každý vzorek byl proměřen třikrát. Před vlastním měřením vzorku bylo nutno přístroj promýt destilovanou vodou. Měření probíhalo za laboratorní teploty 25 °C.

5.4.2.3 Vlastní stanovení základních složek čerstvého kravského mléka metodou NIR, použití přístroje FT NIR Antaris (ThermoNicolet)

NIR slouží ke stanovování kvantitativních a kvalitativních ukazatelů potravin. U mléka hlavně pro určení majoritních složek (bílkoviny, tuk, laktóza a sušina) a minoritních složek (bod mrznutí, hustota, močovina a pH). Celkem bylo proměřováno osm vzorků, které byly připraveny podle postupu v kapitole 5.4.1. Měření probíhalo na přístroji FT NIR Antaris od firmy ThermoNicolet, který pracuje na principu Fourierovy transformace (kapitola 3.2.1.).

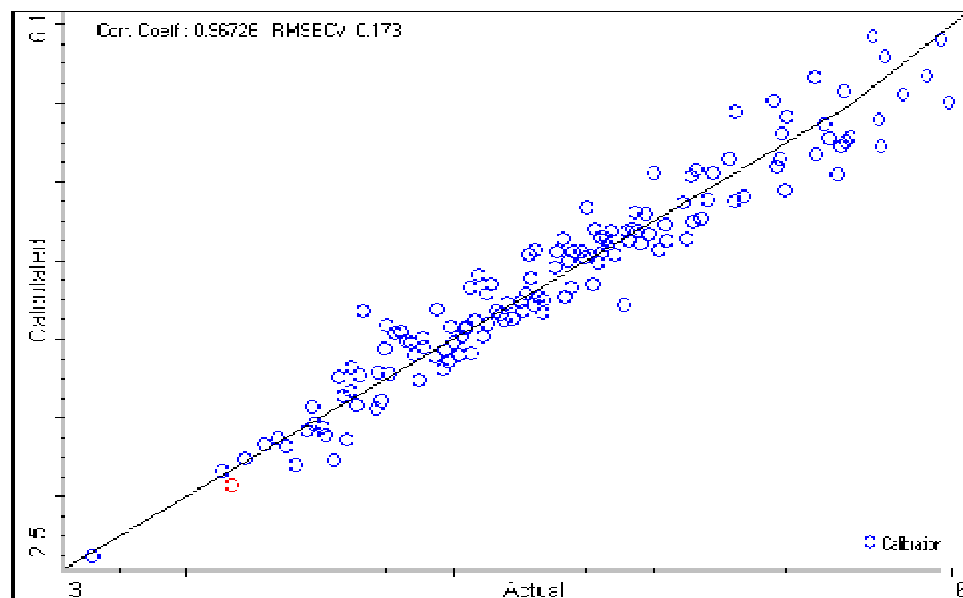
Vzorky syrového kravského mléka byly snímány spektrometrem v režimu reflektance na integrační sféře pomocí transflektanční kyvety. Kyveta vymezuje množství vzorku, který byl umístěn v Petriho misce, kovovým zrcátkem o $h = 0,2$ mm. Měření probíhalo v programu Result Integration. Vzorky byly snímány 100 scany a rozlišením 8 s dobou měření cca 50 sekund.

Vzorky mléka byly odebírány od vytipovaných krav 1x za měsíc v období prosince až února. Tyto byly vždy proměřeny na přístroji FT NIR Antaris v Brně. Naměřené hodnoty byly zprůměrovány a jsou uvedeny ve výsledkové části.

Tab. 13: Základní charakteristika přístroje

Zdroj záření	Halogenová žárovka
Rozsah vlnočtů (vlnových délek)	10 000 – 4 000 cm^{-1} (1 000 – 2 500 nm)
Detektory	InGaAs
Dělič paprsků	CaF_2
Ovládací software	Omnic, Result Integration

Na kalibrace mléčných složek byla aplikována metoda částečných nejmenších čtverců (PLS). PLS metodou byly vytvořeny kalibrační modely pro tuk, bílkoviny, laktózu a obsah somatických buněk pro NIR spektrometr. [19] Tyto kalibrace byly provedeny pracovníky Mendlovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně a byly použity i při našich analýzách.



Obr. 17: Grafické znázornění závislosti kalibračního modelu pro obsah tuku

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Výsledky a přesnost stanovení vitamínu B₅ a B₆ metodou HPLC – UV/VIS

6.1.1 Výsledky stanovení vhodné extrakce vitamínu B₅ a B₆ v mléce

Extrakce byly provedeny podle postupu v kapitole 5.4.1. Z uvedených výsledků v tabulkách vyplývá, že extrakce proběhla u všech vzorků mimo první vzorky. Při pozorování bylo zjištěno, že u těchto vzorků byla účinnost extrakce velmi malá. Optimálně probíhala extrakce u vzorku s 0,2 mol·dm⁻³ HCl, a to jak v první sadě, tak i ve druhé sadě vzorků. Se zvyšující se koncentrací HCl se postupně vzorky začaly kalit a došlo k následnému zhnědnutí (spálení) vzorku. Z toho plyne, že HCl o takové koncentraci je pro daný vzorek příliš silná. Výsledky extrakce jsou zaznamenány na obrázcích 18 a 19.

Vzorky byly vyhodnoceny symboly: + (kladný postup) a – (záporný postup).

Tab. 14: Výsledky jednoduché extrakce první sady vzorků

Vzorek	Vyhodnocení
5 ml mléka + 25 ml 0,1 mol·dm ⁻³ HCl	-
5 ml mléka + 25 ml 0,2 mol·dm ⁻³ HCl	+
5 ml mléka + 25 ml 0,3 mol·dm ⁻³ HCl	+
5 ml mléka + 25 ml 0,4 mol·dm ⁻³ HCl	+
5 ml mléka + 25 ml 0,5 mol·dm ⁻³ HCl	+

Tab. 15: Výsledky jednoduché extrakce druhé sady vzorků

Vzorek	Vyhodnocení
5 ml mléka + 25 ml $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl + 80 % TCA	-
5 ml mléka + 25 ml $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl + 70 % TCA	+
5 ml mléka + 25 ml $0,3 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl + 60 % TCA	+
5 ml mléka + 25 ml $0,4 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl + 50 % TCA	+
5 ml mléka + 25 ml $0,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HCl + 50 % TCA	+

Obr. 18: Stanovení vhodné extrakce vitamínu B₅ a B₆ v mléce postupem kyselý hydrolyzy

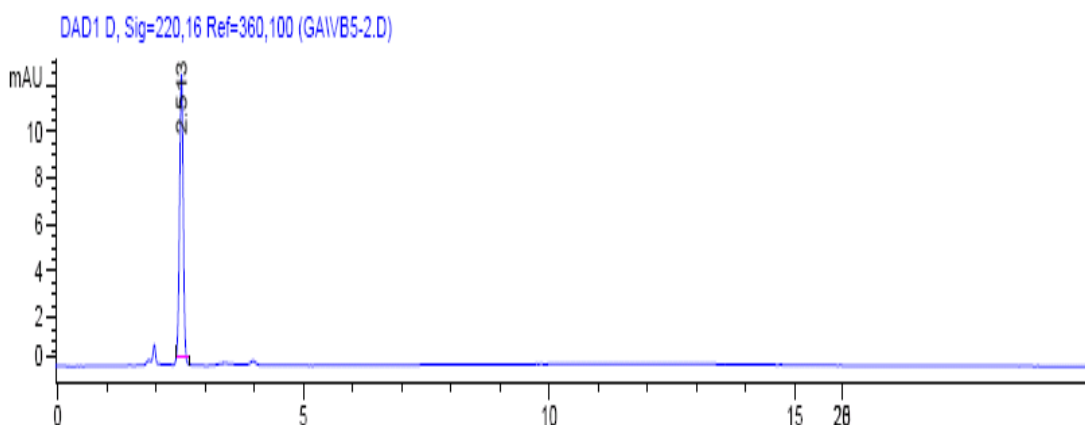


Obr. 19: Stanovení vhodné extrakce vitamínu B₅ a B₆ v mléce postupem kyselá hydrolyzy (navíc přidána po 1 ml 80 % TCA)

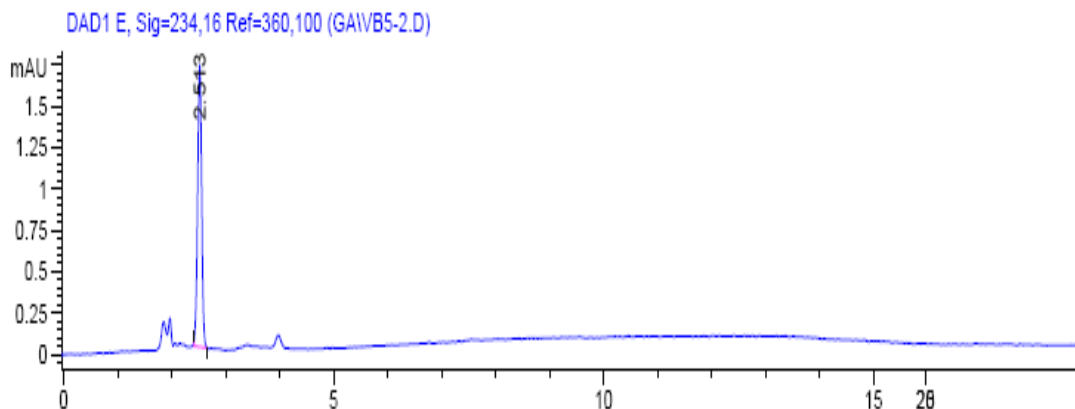
6.1.2 Výsledky stanovení chromatografických podmínek pro detekci vitamínů B₅ a B₆ metodou HPLC – UV/VIS

Standards vitamínů B₅ a B₆ byly proměřeny podle postupu popsaného v kapitole 5.4.1.3. Úkolem bylo stanovit vhodnou vlnovou délku, která je nejvhodnější pro stanovení vitamínů B₅ a B₆. Také bylo nutno zjistit retenční čas příslušných vitamínů.

Standard vitamínu B₅ měl dobrou odezvu při vlnové délce 220 nm a 234 nm a retenční čas pro vitamín B₅ byl 2,513 min.

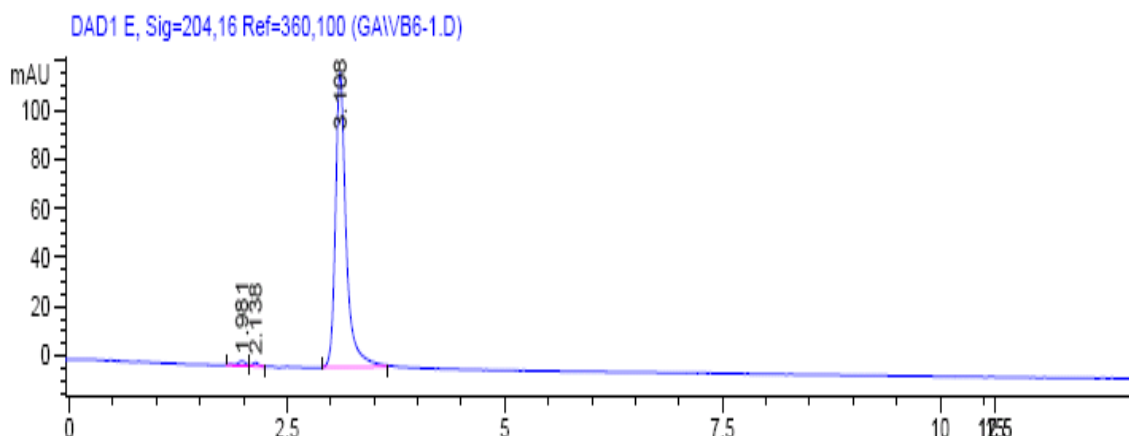


Obr. 20: Stanovení vhodné vlnové délky a retenčního času pro standard vitamínu B₅ (měření 220 nm)

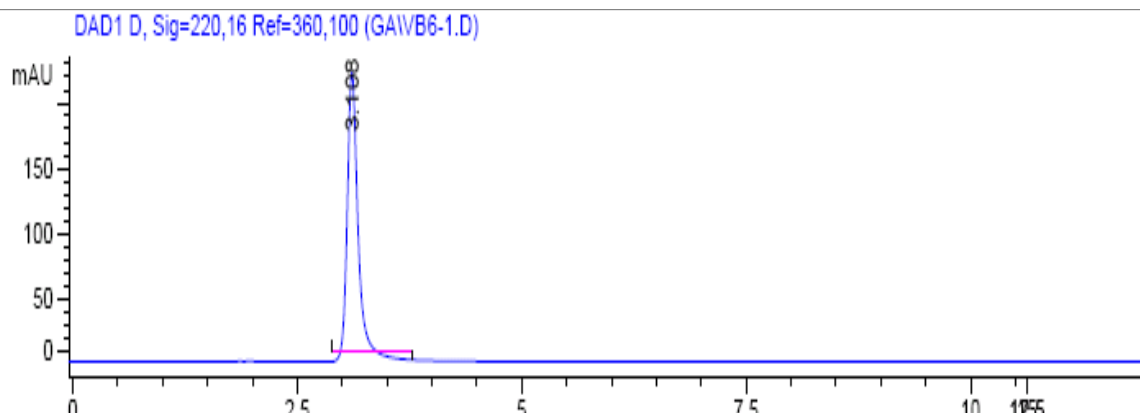


Obr. 21: Stanovení vhodné vlnové délky a retenčního času pro standard vitamínu B₅ (měření 234 nm)

Standard vitamínu B₆ měl velmi dobrou odezvu při vlnové délce 204 nm a retenční čas pro vitamín B₆ byl v 3,108 min.



Obr. 22: Stanovení vhodné vlnové délky a retenčního času pro standard vitamínu B₆ (měření 204 nm)



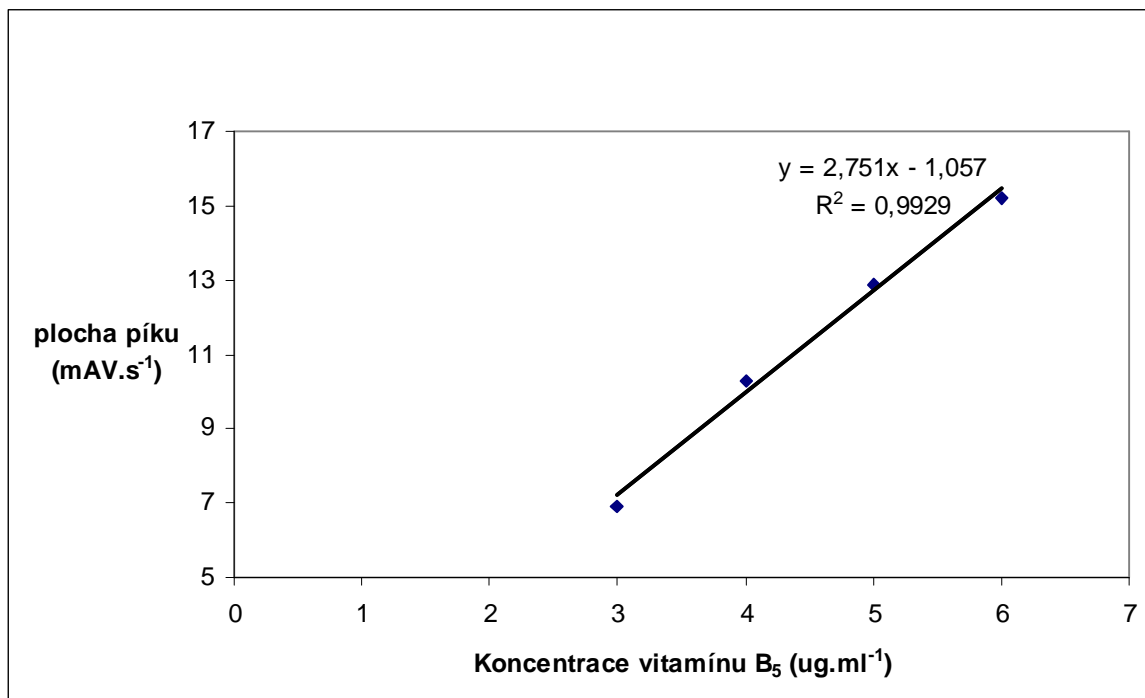
Obr. 23: Stanovení vhodné vlnové délky a retenčního času pro standard vitamínu B₆ (měření 220 nm)

6.1.3 Výsledky a přesnost stanovení kalibrační křivky vitamínů B₅ a B₆ metodou HPLC – UV/VIS

Kalibrační křivka pro stanovení vitamínu B₅ byla provedena podle postupu v kapitole 5.4.1.3. Z naměřených chromatografických dat byly vypočteny průměrné hodnoty ploch píků, které jsou uvedeny v tabulce 16. Chromatogramy jsou uvedeny v příloze I.

Tab. 16: Kalibrace vitamínu B₅ metodou HPLC – UV/VIS při vlnové délce 220 nm

Koncentrace standardu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Průměrná plocha píku [$\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$]
3	6,92
4	10,26
5	12,90
6	15,21



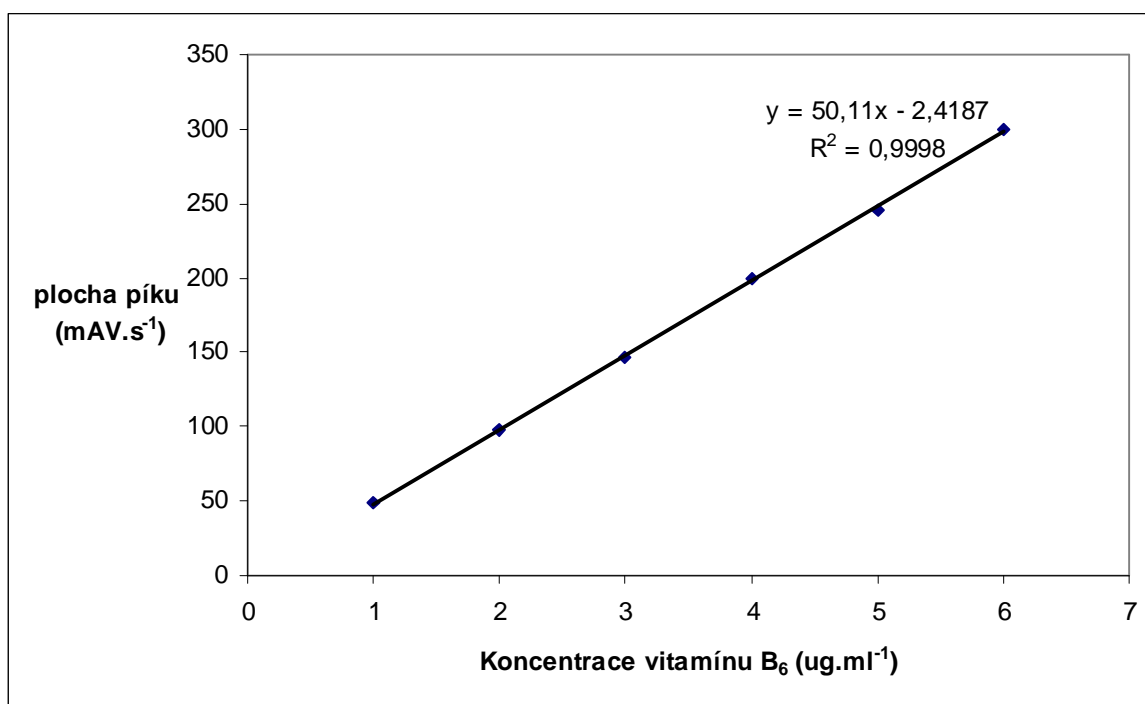
Graf č.1: Kalibrační křivka pro stanovení obsahu vitamínu B₅ v mléce metodou HPLC – UV/VIS při vlnové délce 220 nm

Z kalibrační přímky byla zjištěna rovnice regresní přímky: $y = 2,751x - 1,057$ a vypočten korelační koeficient, který je roven hodnotě 0,9929.

Kalibrační křivka pro stanovení vitamínu B₆ byla provedena podle postupu v kapitole 5.4.1.3. Z naměřených chromatografických dat byly vypočteny průměrné hodnoty ploch píků, které jsou uvedeny v tabulce 17. Chromatogramy jsou uvedeny v příloze II.

Tab. 17: Kalibrace vitamínu B₆ metodou HPLC – UV/VIS při vlnové délce 220 nm

Koncentrace standardu [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Průměrná plocha píku [$\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$]
1	48,56
2	97,22
3	146,79
4	199,59
5	246,31
6	299,33

Graf č.2: Kalibrační křivka pro stanovení obsahu vitamínu B₆ v mléce metodou HPLC – UV/VIS při vlnové délce 220 nm

Z kalibrační přímky byla zjištěna rovnice regresní přímky: $y = 50,11x - 2,4187$ a vypočten korelační koeficient, který je roven hodnotě 0,9998.

6.1.4 Výsledky a přesnost vlastního stanovení vitamínu B₅ a B₆ v mléce metodou HPLC – UV/VIS

Vzorky čerstvého kravského a kozího mléka pro vlastní stanovení obsahu vitamínu B₅ a B₆ byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 5.4.1. Vzorky byly proměřovány při vlnové délce 220 nm. Retenční čas standardu vitamínu B₅ byl 2,513 min. a standardu vitamínu B₆ byl 3,108 min. Retenční časy v obou případech nastaly o něco dříve než tomu bylo u standardů. Vzorky byly proměřovány v období prosince 2008 – února 2009. Kyselá hydrolyza se jevila jako nedostatečná. Z tohoto důvodu budou vyhodnocovány výsledky pouze enzymatické hydrolyzy.

6.1.4.1 Výsledky a přesnost vlastního stanovení vitamínu B₅ a B₆ v čerstvém kravském mléce metodou HPLC – UV/VIS

Čerstvé kravské mléko bylo hydrolyzováno enzymaticky za přídavku směsného enzymatického preparátu *Clara-diastázy*. Průběh měření je zobrazen v příloze III.

Ø Enzymatická hydrolyza

Tab. 18: Výsledky a přesnost stanovení vitamínu B₅ metodou HPLC – UV/VIS
(kravské mléko)

Plocha píku [mV.s ⁻¹]	Obsah vitamínu B ₅ [mg.100 ml ⁻¹]
1,849	0,711
2,113	0,807
2,139	0,816
2,045	0,782
1,978	0,757
	$\bar{x} = 0,775$

Směrodatná odchylka $s = 0,039$

Průměrný obsah vitamínu B₅ v kravském mléce: $\mu = 0,775 \text{ mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$

Tab. 19: Výsledky a přesnost stanovení vitamínu B₆ metodou HPLC – UV/VIS
(kravské mléko)

Plocha píku [mV.s ⁻¹]	Obsah vitamínu B ₆ [mg.100ml ⁻¹]
37,46	0,79
38,99	0,83
37,62	0,79
37,99	0,81
37,67	0,80
	$\bar{x} = 0,80$

Směrodatná odchylka $s = 0,017$

Průměrný obsah vitamínu B₆ v kravském mléce: $\mu = 0,800 \text{ mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$

Plochy píků byly dosazeny do rovnic kalibračních přímek a následně byly vypočteny koncentrace příslušných vitamínů. Tyto hodnoty byly zprůměrovány a porovnány s hodnotou v kapitole 1.3.5. Průměrný obsah vitamínu B₅ byl stanoven na $0,775 \text{ mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$ a průměrný obsah vitamínu B₆ byl stanoven na $0,800 \text{ mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$. Naměřené hodnoty se nachází v rozmezí hodnot, které uvádí kapitola 1.3.5.

6.1.4.2 Výsledky a přesnost vlastního stanovení vitamínu B₅ a B₆ v čerstvém kozím mléce metodou HPLC – UV/VIS

Čerstvé kravské mléko bylo hydrolyzováno enzymaticky za přídavku směšného enzymatického preparátu *Clara-diafézy*. Průběh měření je zobrazen v příloze IV.

Ø Enzymatická hydrolyza

Tab. 20: Výsledky a přesnost stanovení vitamínu B₅ metodou HPLC – UV/VIS
(kozí mléko)

Plocha píku [mV.s ⁻¹]	Obsah vitamínu B ₅ [mg.100ml ⁻¹]
3,679	1,376
3,589	1,343
3,581	1,340
3,602	1,348
3,615	1,352
	$\bar{x} = 1,352$

Směrodatná odchylka $s = 0,014$

Průměrný obsah vitamínu B₅ v kozím mléce: $\mu = 1,352 \text{ mg.100 ml}^{-1}$

Tab. 21: Výsledky a přesnost stanovení vitamínu B₆ metodou HPLC – UV/VIS
(kozí mléko)

Plocha píku [mV.s ⁻¹]	Obsah vitamínu B ₆ [mg.100ml ⁻¹]
37,62	0,79
37,73	0,80
37,21	0,79
36,99	0,79
37,65	0,79
	$\bar{x} = 0,79$

Směrodatná odchylka $s = 0,004$

Průměrný obsah vitamínu B₆ v kozím mléce: $\mu = 0,790 \text{ mg.100 ml}^{-1}$

Plochy píků byly dosazeny do rovnic kalibračních přímek a následně byly vypočteny koncentrace příslušných vitamínů. Tyto hodnoty byly zprůměrovány a porovnány s hodnotou v kapitole 1.3.5. Průměrný obsah vitamínu B₅ byl stanoven na 1,352 mg.100 ml⁻¹ a průměrný obsah vitamínu B₆ byl stanoven na 0,790 mg.100ml⁻¹.

6.1.5 Výsledky vlastního stanovení základních složek mléka spektroskopii

6.1.5.1 Vlastní stanovení základních složek čerstvého kravského mléka spektroskopii, použití přístroje Julie MilkoScope C5 Automatic

Úkolem bylo stanovit základní složky čerstvého kravského mléka. Celkem bylo proměřováno osm vzorků, které byly připraveny podle postupu v kapitole 5.4.1. Každý vzorek byl proměřen třikrát a hodnoty byly zprůměrovány (tabulka 22).

Tabulka 22: Julie MilkoScope C5 Automatic (průměrné hodnoty)

Vzorek	Tuk (%)	TPS (%)	Sušina (%)	BK (%)	Laktóza (%)	Hustota (°L)	ML (%)
Vzorek A	4,10	8,12	12,22	3,09	4,46	27,23	0,67
Vzorek B	2,35	8,12	10,47	3,09	4,46	28,67	0,66
Vzorek C	1,94	8,10	10,04	3,08	4,45	28,93	0,66
Vzorek D	3,17	7,03	10,20	2,69	3,85	23,88	0,58
Vzorek E	2,40	7,69	10,09	2,93	4,22	27,01	0,63
Vzorek F	2,54	8,42	10,96	3,20	4,62	29,63	0,69
Vzorek H	2,60	7,66	10,26	2,92	4,20	26,73	0,63
Vzorek I	2,05	7,76	9,81	2,96	4,26	27,55	0,63
Průměr	2,64	7,86	10,51	3,00	4,32	27,45	0,64
Směrodatná odchylka	0,697	0,597	0,772	0,157	0,238	1,771	0,034

TPS - tukuprostá sušina, BK – bílkoviny, ML - minerální látky

Získané hodnoty byly zprůměrovány a porovnány s hodnotami, které uvádí Buňka, F., Technologie výroby potravin živočišného původu II. Zdroj uvádí, že průměrný obsah tuku v kravském mléce je 3,5 – 4,5 %, lze říci, že získané hodnoty jsou mírně podprůměrné mimo vzorky A a D, tyto vzorky vyhovují hodnotám, které uvádí zdroj. Obsahu sušiny v mléce je také nižší, kromě vzorku A, ten zcela vyhovuje daným hodnotám. Obsah bílkovin byl stanoven v rozmezí 2,69 – 3,09 %, což je nepatrně nižší oproti hodnotám, které uvádí zdroj. Získané hodnoty laktózy vyhovují definovaným hodnotám mimo vzorek D, kde je tato hodnota nepatrně nižší. Odchyly mohou být způsobeny i ročním obdobím. Jelikož mají dojnice odlišný druh stravy v zimním a letním období, mohou se naměřené hodnoty lišit v jednotlivých ročních obdobích.

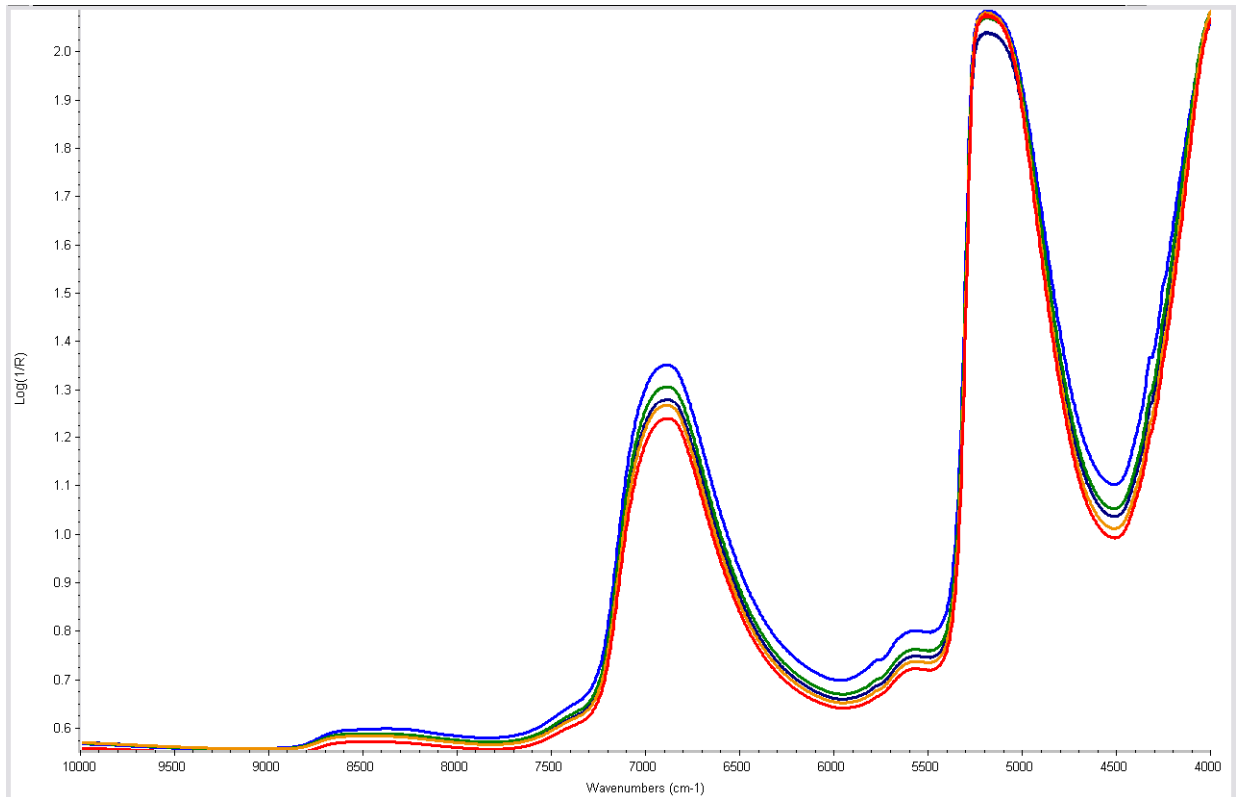
6.1.5.2 Vlastní stanovení základních složek čerstvého kravského mléka metodou NIR, použití přístroje FT NIR Antaris (ThermoNicolet)

Úkolem bylo stanovit základní složky čerstvého kravského mléka. Celkem bylo proměřováno osm vzorků, které byly připraveny podle postupu v kapitole 5.3. Měření probíhalo na přístroji FT NIR Antaris od firmy ThermoNicolet, který pracuje na principu Fourierovy transformace (kapitola 3.2.1.).

Tabulka 23: Naměřené hodnoty FT NIR Antaris od firmy ThermoNicolet
(průměrné hodnoty)

Vzorek	Tuk (%)	Sušina (%)	BK (%)	Laktóza (%)	Močovina (mg·100ml ⁻¹)	Hustota (°L)	pH	BMM (°C)
Vzorek A	5,09	14,05	3,03	4,74	49,1	27,69	6,65	-0,5279
Vzorek B	2,28	11,96	3,46	5,17	45,7	32,40	7,00	-0,5277
Vzorek C	1,83	11,40	3,51	5,00	45,6	31,79	7,09	-0,5182
Vzorek D	3,64	12,52	3,03	4,59	47,9	29,15	6,68	-0,5212
Vzorek E	2,31	11,56	3,39	4,96	46,4	30,53	6,95	-0,5231
Vzorek F	2,03	10,95	3,45	5,10	42,4	32,34	6,84	-0,5244
Vzorek H	2,88	11,49	2,94	4,93	48,1	30,48	6,74	-0,5202
Vzorek I	1,77	10,83	3,30	4,88	47,2	31,97	7,04	-0,5169
Průměr	2,73	11,85	3,26	4,92	46,55	30,79	6,87	-0,522
Směrodatná odchylka	1,135	1,039	0,281	0,187	5,479	1,684	0,178	0,000

BMM Bod mrznutí



Obr.24: Spektra měřených vzorků

Získané hodnoty byly zprůměrovány a porovnány s hodnotami uvedenými ve zdroji Buňka, F., Technologie výroby potravin živočišného původu II. Zdroj uvádí, že průměrný obsah tuku v kravském mléce je 3,5 – 4,5 %, lze říci, že získané hodnoty jsou mírně podprůměrné mimo vzorky A a D, tyto vzorky vyhovují hodnotám v literatuře. Obsah sušiny v mléce je taktéž nižší oproti hodnotám v dané literatuře, kromě vzorku A a D, ty zcela vyhovují hodnotám uvedeným ve zdroji. Obsah bílkovin byl stanoven v rozmezí 2,94 – 3,51 %, což odpovídá hodnotám, které uvádí zdroj. Hodnoty laktózy vyhovují definovaným hodnotám ve zdroji, u vzorku B a F byl obsah laktózy dokonce vyšší. Hodnota naměřeného pH je o něco vyšší ve srovnání s definovanou hodnotou.

6.1.5.3 Srovnání a vyhodnocení naměřených výsledků pomocí Julie MilkoScope C5 Automatic a FT NIR Antaris (ThermoNicolet)

Získané hodnoty z jednotlivých měření jsou shrnuty v tabulce 24.

Tab. 24: Srovnání naměřených hodnot NIR a Julie

Vzorek	Měření	Tuk (%)	Sušina (%)	BK (%)	Laktóza (%)	Hustota (°L)
Vzorek A	NIR	5,09	14,05	3,03	4,74	27,69
	Julie	4,10	12,22	3,09	4,46	27,23
Vzorek B	NIR	2,28	11,96	3,46	5,17	32,40
	Julie	2,35	10,47	3,09	4,46	28,67
Vzorek C	NIR	1,83	11,40	3,51	5,00	31,79
	Julie	1,94	10,04	3,08	4,45	28,93
Vzorek D	NIR	3,64	12,52	3,03	4,59	29,15
	Julie	3,17	10,20	2,69	3,85	23,88
Vzorek E	NIR	2,31	11,56	3,39	4,96	30,53
	Julie	2,40	10,09	2,93	4,22	27,01
Vzorek F	NIR	2,03	10,95	3,45	5,10	32,34
	Julie	2,54	10,96	3,20	4,62	29,63
Vzorek H	NIR	2,88	11,49	2,94	4,93	30,48
	Julie	2,60	10,26	2,92	4,20	26,73
Vzorek I	NIR	1,77	10,83	3,30	4,88	31,97
	Julie	2,05	9,81	2,96	4,26	27,55

Výsledky měření byly srovnány a uvedeny do tabulky 24. Lze jednoznačně říci, že mimo stanovení obsahu tuku, byl FT NIR Antaris dal komplexnější hodnoty obsahů jednotlivých složek než Julie MilkoScope C5 Automatic. U stanovení obsahu tuku byla naměřena vyšší hodnota pomocí přístroje Julie MilkoScope, což mohlo být způsobeno špatnou homogenizací tuku při přípravě vzorku.

Zařízení Julie MilkoScope C5 Automatic slouží pro laboratorní účely, kdežto NIR metoda je založena na mnohonásobné kalibraci.

ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývala stanovením obsahu vitamínu B₅ a B₆ metodou HPLC – UV/VIS u mléka kravského a kozího a stanovením základních složek kravského mléka (sušina, tuk, laktóza, bílkoviny) pomocí spektroskopie.

Po stanovení obsahu vitamínu B₅ a B₆ metodou HPLC – UV/VIS u kravského a kozího mléka lze říci, že bylo vhodnější sladké srážení, tudíž vyhodnocení naměřených dat bylo provedeno z odečtených hodnot jen enzymatické hydrolyzy. Obsah vitamínu B₅ v kravském mléce byl 0,775 mg·100 ml⁻¹, což odpovídá stanoveným hodnotám uvedeným v literatuře. Obsah vitamínu B₆ v kravském mléce byl 0,800 mg·100 ml⁻¹, což taktéž odpovídá stanoveným hodnotám uvedeným v literatuře.

Obsah vitamínů v kozím mléce jsem nemohla porovnat s žádnými hodnotami, jelikož se mi přesná vyhodnocení obsahů jednotlivých vitamínů nepodařilo získat. Obecně lze říci, že je v kozím mléce obsaženo nepatrně více tuků, sirných aminokyselin, vápníku, fosforu, draslíku, hořčíku, manganu, vitamínu A a B₂ a niacinu, mastných kyselin s krátkým řetězcem, ale méně celkových bílkovin, vitamínu E, B₆, B₁₂, kyseliny listové, karotenu, zinku a selenu. Obsah vitamínu B₅ v kozím mléce byl 1,352 mg·100 ml⁻¹, což je téměř dvojnásobné množství vitamínu B₅ než je tomu v mléce kravském. Obsah vitamínu B₆ v kozím mléce byl 0,790 mg·100 ml⁻¹, což v podstatě odpovídá obsahu vitamínu B₆ v mléce kravském.

Dalším úkolem bylo stanovit základní složky čerstvého kravského mléka pomocí spektroskopie. Celkem bylo proměřováno osm vzorků od osmi dojnic v měsíčních intervalech. Měření probíhalo na přístrojích Julie MilkoScope C5 Automatic a FT NIR Antaris Thermo Nicolet.

Lze jednoznačně říci, že mimo stanovení obsahu tuku, byl FT NIR Antaris přesnější a naměřil komplexnější hodnoty obsahů jednotlivých složek než Julie MilkoScope C5 Automatic.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HRABĚ, J., BŘEZINA, P., VALÁŠEK, P. *Technologie výroby potravin živočišného původu*, UTB Zlín, 2006
- [2] Dostupné na: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Ml%C3%A9ko>
- [3] GAJDŮŠEK, S. *Laktologie*, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003
- [4] Dostupné na: <http://www.agronavigator.cz/az/>
- [5] BUŇKA, F. *Technologie výroby potravin živočišného původu II.*, 2007
- [6] Dostupné na: web.vscht.cz/poustkaj/2007%20APKP%20MLEKO.pdf
- [7] Dostupné na: <http://www.biology.estranky.cz/clanky/vzorce-sloucenin/pismeno-ch>
- [8] Dostupné na: <http://laktoza.navajo.cz/>
- [9] Dostupné na: http://is.muni.cz/th/176312/fsps_b/Bakalarska_prace-text.pdf
- [10] Dostupné na: [http://biomikro.vscht.cz/biol2/documents/Biologie potravin a surovin zivocisneh o_puvodu.pdf](http://biomikro.vscht.cz/biol2/documents/Biologie_potravin_a_surovin_zivocisneh_o_puvodu.pdf)
- [11] Zákon 289/2007 Sb. O veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty § 13
- [12] Dostupné na: http://www.cmsch.cz/docs/03_hodnoceni_mleka.pdf
- [13] Dostupné na: http://www.vscht.cz/anl/lach1/6_LC.pdf
- [14] Zpracoval kolektiv autorů, *Instrumentální analýza*, SNTL/ALFA, 1986
- [15] BŘEZINA, P., JELÍNEK, J. *Chemie a technologie mléka II.*, VŠCHT, Praha 1990
- [16] Dostupné na: <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [17] Dostupné na: http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa_soubory/image004.jpg
- [18] Dostupné na: http://www.hplc.cz/Teorie/COND_detector.html
- [19] RŮŽIČKOVÁ, J. *Aplikace NIR spektrometrie v kontrole kvality zemědělských materiálů a produktů* – Dizertační práce, Brno, 2007

- [20] Dostupné na: <http://praktika.fjfi.cvut.cz/IntOhybSv/node8.html>
- [21] Dostupné na: <http://www.vscht.cz/anl/lach2/NIR.pdf>
- [22] BAČÁKOVÁ, M. *Chemické charakteristiky brokolice*, Bakalářská práce, 2008
- [23] Dostupné na: http://cs.wikipedia.org/wiki/Sm%C4%9Brodavn%C3%A1_odchylka
- [24] MENDIOLA, J., A., MARIN, F., R., SEÑORÁNS, F., J., REGLERO, G., MARTÍN, P., J., CIFUENTES, A., IBÁÑEZ, E. Profiling of different bioactive compounds in functional drinks by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, Volume 1188, Issue 2, Pages 234-241, 25 April 2008
- [25] Dostupné na: http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.thermo.com/com/CMA/Images/Image_42863.jpg&imgrefurl=http://www.thermo.com/com/cda/landingpage/0,,1871,00.html&usg=__i1UTngzVOAOuH7qX-yZi4U30cMM=&h=298&w=468&sz=31&hl=cs&start=1&tbnid=d62AYv0I3ejWLM:&tbnh=82&tbnw=128&prev=/images%3Fq%3DNIR%2BAntaris%26gbv%3D2%26hl%3Dcs%26sa%3DG
- [26] Manuál k přístroji Julie MilkoScope C5 Automatic, O.K. Servis BioPro
- [27] Dostupné na: <http://www.industrial-supplies.cn/trade/julie-c5-milk-analyser-23886/>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ČB	Čistá bílkovina
ML	Minerální látky
UHT	Ultra-high temperature processing (UHT), česky „vysokoteplotní úprava“
BMM, BM	Bod mrznutí
NaOH	Hydroxid sodný
HCl	Kyselina chlorovodíková
°SH	Soxhlet – Henkel stupně
°L	Laktodenzimetrické stupně
ES	Evropské společenství
EP	Evropský parlament
T	Tuk
B, BK	Bílkovina
TPS, SNF	Tukuprostá sušina
PTM	Počet psychrotrofních mikroorganismů
TRM	Počet termorezistentních mikroorganismů
CA	Počet koliformních bakterií
SPAN	Sporotvorné anaerobní bakterie
HPLC, LC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie, kapalinová chromatografie
NIR	Spektrometrie blízké infračervené oblasti
MIR	Spektrometrie střední infračervené oblasti
FT, FTIR	Fourierova transformace, Fourierova spektroskopie
DAD	Diode Array Detector
TCA	Kyselina trichlooctová

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Anatomie vemene	16
Obrázek 2: Strojní dojení	19
Obrázek 3: Závislost specifické hmotnosti mléka na teplotě	30
Obrázek 4: Separace vzorku	41
Obrázek 5: Tvary píků	42
Obrázek 6: Schéma kapalinového chromatogramu	43
Obrázek 7: Lineární dávkovač	44
Obrázek 8: Dávkovací smyčka	44
Obrázek 9: Chromatografická kolona	45
Obrázek 10: Fotometrický detektor	45
Obrázek 11: Fluorimetrický detektor	46
Obrázek 12: Refraktometrický detektor	47
Obrázek 13: Schéma vodivostního detektoru	47
Obrázek 14: Michelsonův interferometr	51
Obrázek 15: FT NIR Antaris	53
Obrázek 16: Julie MilkoScope C5 Automatic	54
Obrázek 17: Grafické znázornění závislosti kalibračního modelu pro obsah tuku	66
Obrázek 18: Stanovení vhodné extrakce vitamínu B ₅ a B ₆ v mléce	68
Obrázek 19: Stanovení vhodné extrakce vitamínu B ₅ a B ₆ v mléce (navíc přidána po 1 ml 80 % TCA)	69
Obrázek 20: Stanovení vhodné vlnové délky a retenčního času pro standard vitamínu B ₅ (měření při potenciálu 220 mV)	69
Obrázek 21: Stanovení vhodné vlnové délky a retenčního času pro standard vitamínu B ₅ (měření při potenciálu 234 mV)	70

Obrázek 22: Stanovení vhodné vlnové délky a retenčního času pro standard vitamínu B ₆ (měření při potenciálu 204 mV)	70
Obrázek 23: Stanovení vhodného potenciálu a retenčního času pro standard vitamínu B ₆ (měření při potenciálu 220 mV)	71
Obrázek 24: Spektra měřených vzorků	80

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Změny základního složení mleziva	13
Tabulka 2: Změny obsahu minerálních látek mleziva	13
Tabulka 3: Změny vlastností a obsahu vitamínů v mlezivu	14
Tabulka 4: Průměrný obsah jednotlivých živin v 1 litru kravského mléka	19
Tabulka 5: Složení mléka různého původu	20
Tabulka 6: Základní rozdělení čisté bílkoviny	21
Tabulka 7: Lipidy v mléce	22
Tabulka 8: Obsah minerálních látek v mléce	25
Tabulka 9: Obsah vitamínů v mléce	26
Tabulka 10: Průměrné ukazatele jakosti syrového kravského mléka v období let 1997 – 2001 dle výsledků hodnocení v centrální laboratoři	36
Tabulka 11: Hodnoty močoviny v syrovém kravském mléce	38
Tabulka 12: Kvantily t(n) Studentova rozdělení o n stupních volnosti	58
Tabulka 13: Základní charakteristika přístroje	66
Tabulka 14: Výsledky jednoduché extrakce první sady vzorků	67
Tabulka 15: Výsledky jednoduché extrakce druhé sady vzorků	68
Tabulka 16: Kalibrace vitamínu B ₅ metodou HPLC – UV/VIS při vlnové délce 220 mV..	71
Tabulka 17: Kalibrace vitamínu B ₆ metodou HPLC – UV/VIS při vlnové délce 220 mV..	73
Tabulka 18: Výsledky a přesnost stanovení vitamínu B ₅ metodou HPLC – UV/VIS (kravské mléko)	74
Tabulka 19: Výsledky a přesnost stanovení vitamínu B ₆ metodou HPLC – UV/VIS (kravské mléko)	75
Tabulka 20: Výsledky a přesnost stanovení vitamínu B ₅ metodou HPLC – UV/VIS	

(kozí mléko)	76
Tabulka 21: Výsledky a přesnost stanovení vitamínu B ₆ metodou HPLC – UV/VIS	
(kozí mléko)	76
Tabulka 22: Julie MilkoScope C5 Automatic (průměrné hodnoty).....	77
Tabulka 23: Naměřené hodnoty FT NIR Antaris od firmy ThermoNicolet	
(průměrné hodnoty)	79
Tabulka 24: Srovnání naměřených hodnot NIR a Julie MilkoScope C5 Automatic	81

SEZNAM PŘÍLOH

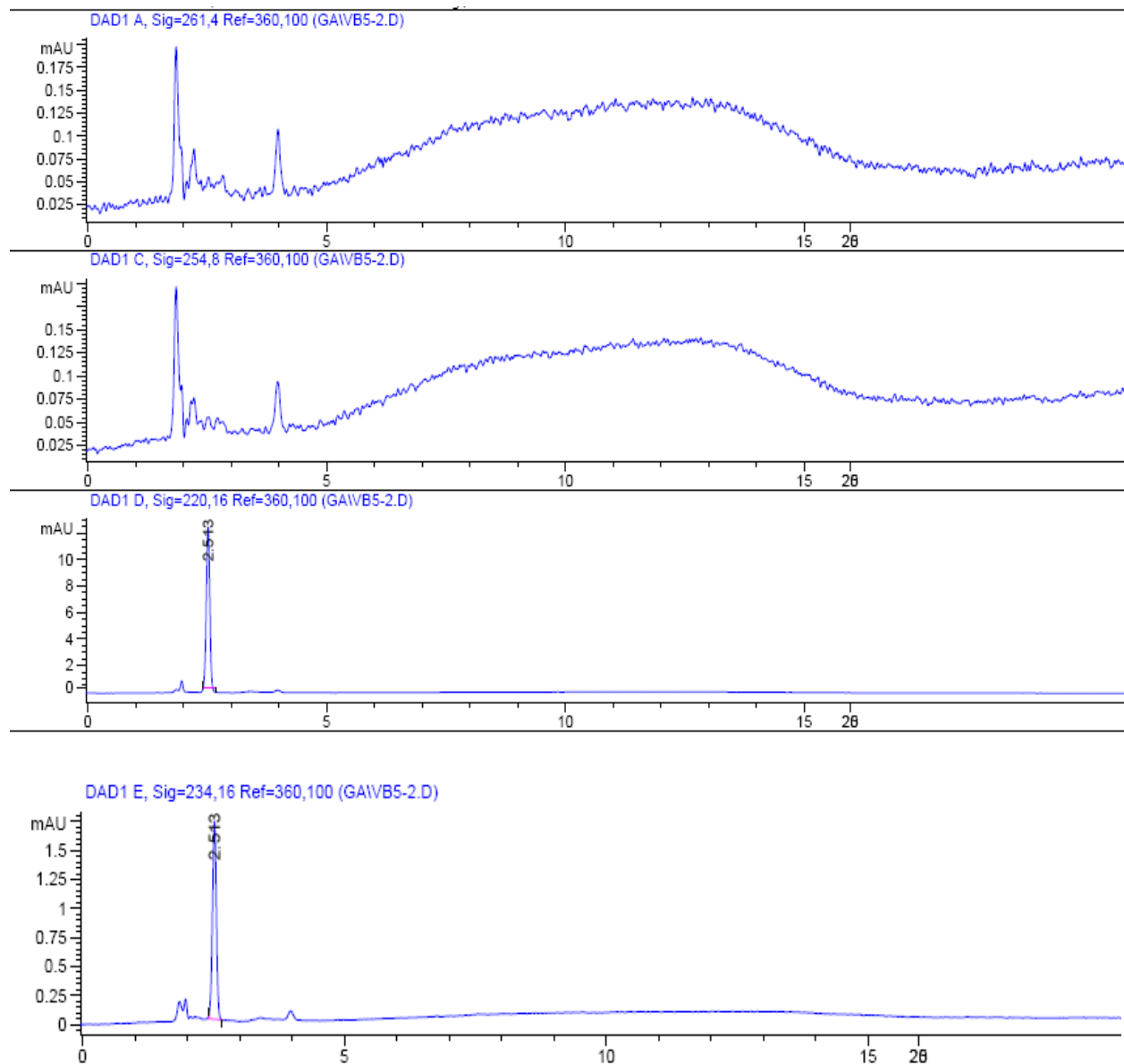
PŘÍLOHA I: Stanovení kalibrační křivky vitamínu B₅ metodou HPLC – UV/VIS

PŘÍLOHA II: Stanovení kalibrační křivky vitamínu B₆ metodou HPLC – UV/VIS

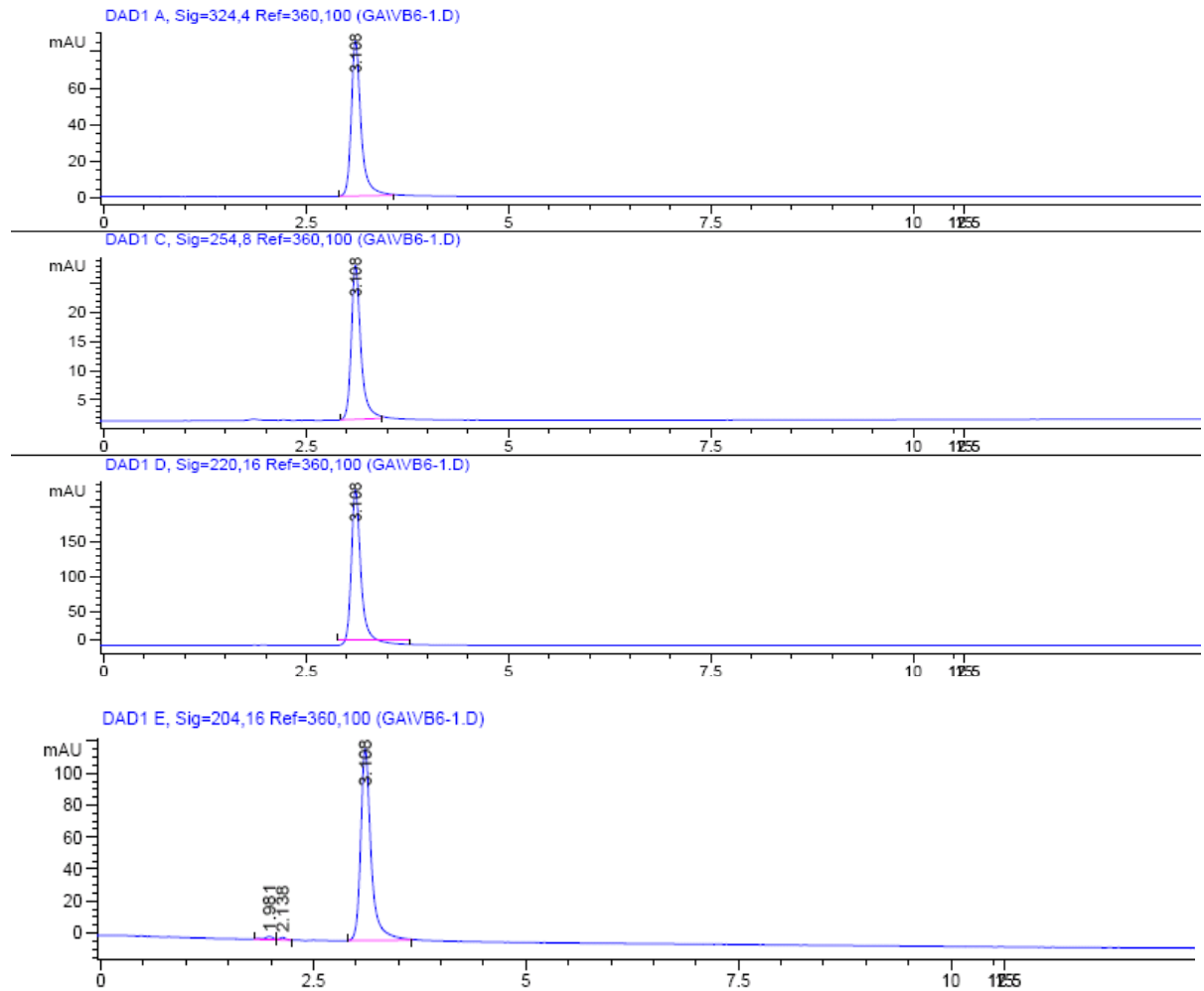
PŘÍLOHA III: Vlastní stanovení vitamínu B₅ a B₆ v kravském mléce metodou HPLC – UV/VIS

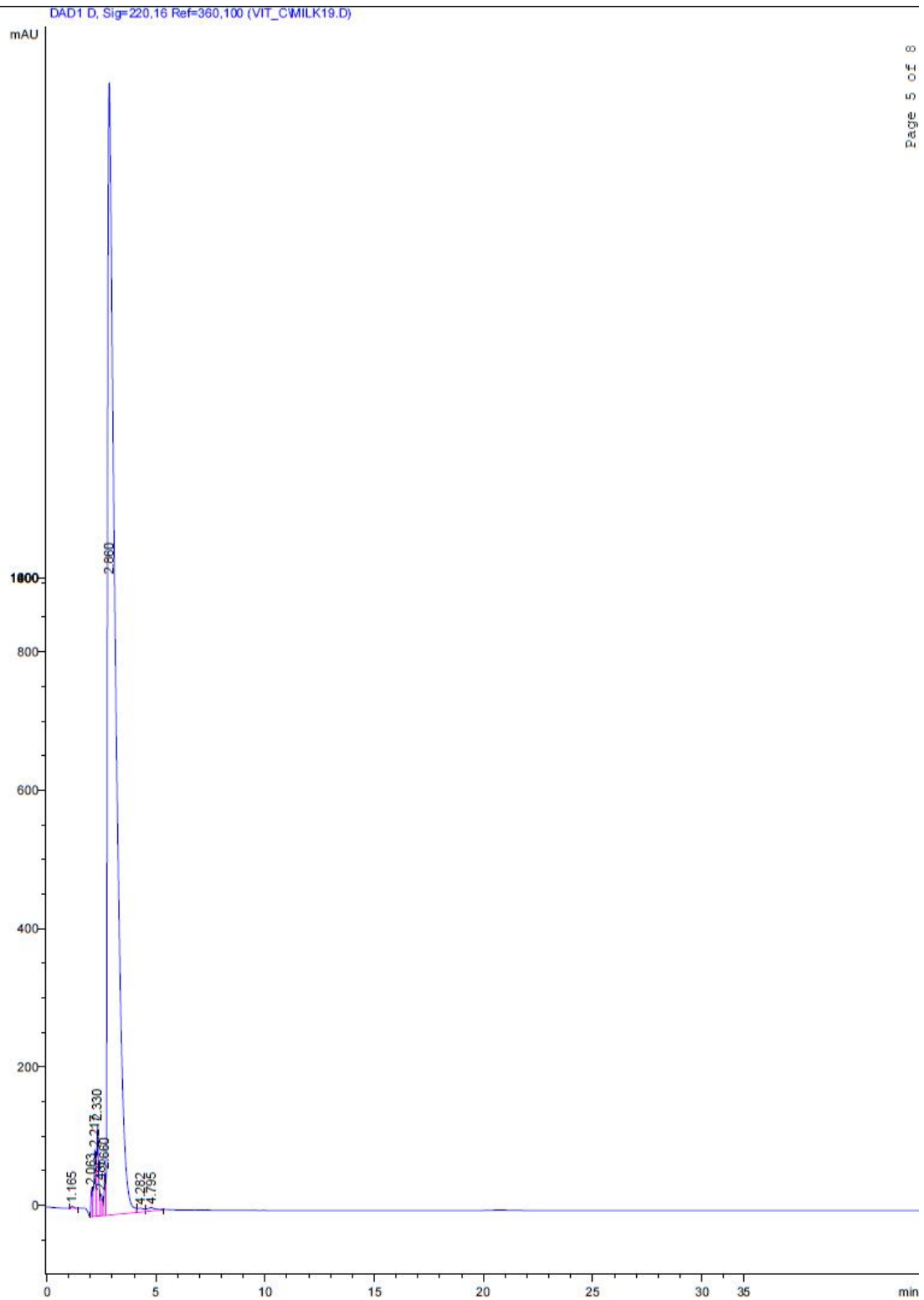
PŘÍLOHA IV: Vlastní stanovení vitamínu B₅ a B₆ v kozím mléce metodou HPLC – UV/VIS

Příloha P I: Stanovení kalibrační křivky vitamínu B₅ metodou HPLC – UV/VIS



Příloha P II: Stanovení kalibrační křivky vitamínu B₆ metodou HPLC – UV/VIS



**Příloha P III: Vlastní stanovení vitamínu B₅ a B₆ v kravském mléce meto-
dou HPLC – UV/VIS**

Příloha P IV: Vlastní stanovení vitamínu B₅ a B₆ v kozím mléce metodou HPLC – UV/VIS

