

# Stanovení vitamínu D a základní rozbor syrového mléka

Bc. Ludmila Linhartová

---

Diplomová práce  
2013-05-10



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2012/2013

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Ludmila Linhartová**  
Osobní číslo: **T11059**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**  
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Stanovení vitamínu D a základní rozbor syrového mléka.**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Charakteristika mléka jako nutriční potraviny s důrazem na jeho chemické složení.
2. Princip kapalinové chromatografie. Podrobněji zpracovat chemismus a teoreticky pojednat o vitamínu D.
3. Principy stanovení bílkovin, laktózy, tuku, celkové sušiny a tukuprosté sušiny v mléce.

### II. Praktická část

1. Odebrat vzorky syrového mléka z pěti sběrných svozů z oblasti Olomouckého kraje.
2. U odebraných vzorků stanovit obsah bílkovin, laktózy, tuku, celkové sušiny a tukuprosté sušiny pomocí přístroje MilkoScan.
3. Stanovení vitamínu D kapalinovou chromatografií s předchozím zmýdelněním vzorku.
4. Diskuse a formulace závěru.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. VELÍŠEK, Jan. Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. ISBN 978-80-86659-17-6
2. MURRAY, Robert K. Harperova biochemie. 23. vyd. Jinočany: H H, 2002, 872 s. ISBN 80-731-9013-3
3. ZADRAŽIL, Karel. Mlékařství: (přednášky). Vyd. 1. Praha: ISV, 2002, 127 s. Živočišná výroba (Česká zemědělská univerzita). ISBN 80-866-4215-1
4. DOUŠA, Michal. Základy separačních metod se zaměřením na HPLC. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Laboratorní odbor, 2002, 129 s. Učební texty pro pracovníky ÚKZÚZ. ISBN 80-865-48-09-0
5. Štulík, Karel. Analytické separační metody. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 264 s. ISBN 80-246-0852-9

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Daniela Sumczynski, Ph.D.**  
Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání diplomové práce: **11. února 2013**

Termín odevzdání diplomové práce: **17. května 2013**

Ve Zlíně dne 11. února 2013

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



  
doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: LINHARTOVÁ LUDMILA

Obor: TECHNOLOGIE, HYGIENA  
A EKONOMIKA VÝROBY POTRAVIN

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 25. 10. 13

Ludmila Linhartová

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce požítovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlíádne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

V teoretické části diplomové práce je pojednáno o chemickém a nutričním složení kravského mléka, zejména se zaměřením na vitamin D. Dále je popsán princip HPLC – Vysokoučinné kapalinové chromatografie. Cílem praktické části byla izolace a stanovení vitaminu D pomocí HPLC a stanovení základních složek syrového kravského mléka na přístroji MilkoScan.

Klíčová slova: mléko, HPLC, vitamin D, MilkoScan

## **ABSTRACT**

In the theoretical part of the graduation theses is treated of chemical and nutritional structure of cow's milk, especially vitamin D. Next there is a description of the high performance liquid chromatography method. The aim of the experimental part was isolation and determination of vitamin D by HPLC and the determination of basic chemical structure of raw cow's milk by MilkoScan appliance during six months.

Keywords: milk, HPLC, vitamin D, MilkoScan

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí práce Ing. Daniele Sumczynski, Ph.D. za vedení při praktické části této práce, dále za cenné rady, informace a zejména za korekce při vypracování této práce. Chtěla bych také poděkovat paní laborantce Ing. Lence Fojtíkové za pomoc při stanovení a vyhodnocení praktické části diplomové práce. Na závěr bych ráda poděkovala mé trpělivé rodině, která mne podporovala po celou dobu studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 SLOŽENÍ MLÉKA</b> .....	<b>11</b>
1.1 PROTEINY .....	11
1.2 LIPIDY .....	13
1.3 SACHARIDY.....	15
1.4 MINERÁLNÍ LÁTKY .....	16
1.4.1 Vápník.....	17
1.4.2 Fosfor.....	18
1.5 VITAMINY .....	19
1.6 ENZYMY .....	23
1.7 FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI MLÉKA .....	23
<b>2 VITAMIN D</b> .....	<b>25</b>
2.1 FYZIOLOGIE VITAMINU D.....	25
2.2 STANOVENÍ VITAMINU D .....	28
2.2.1 Zmýdelnění .....	28
2.2.2 Extrakce a čištění vzorku .....	28
2.2.3 Chemické metody se spektrofotometrickou detekcí.....	29
2.2.4 Chromatografické metody.....	29
2.2.5 Radioimunoanalýza .....	29
<b>3 CHROMATOGRAFIE</b> .....	<b>31</b>
3.1 KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE .....	32
3.2 ADSORPČNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE .....	32
3.3 RP-HPLC .....	33
3.4 INSTRUMENTACE PRO VYSOKOÚČINNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ .....	34
3.4.1 Zařízení pro odplynění mobilní fáze .....	35
3.4.2 Čerpadlo .....	35
3.4.3 Směšovací zařízení .....	35
3.4.4 Dávkování vzorků .....	35
3.4.5 Kolony .....	36
3.4.6 Detektory.....	37
<b>4 VSTUPNÍ KONTROLA A ZÁKLADNÍ PARAMETRY PŘI PŘÍJMU SYROVÉHO MLÉKA</b> .....	<b>39</b>
4.1 ANALÝZA POMOCÍ PŘÍSTROJE MILKOSCAN.....	40
4.2 DALŠÍ MOŽNOSTI STANOVENÍ ZÁKLADNÍCH SLOŽEK MLÉKA .....	40
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>42</b>
<b>5 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>43</b>
<b>6 METODIKA</b> .....	<b>44</b>



6.1	CHEMIKÁLIE .....	44
6.2	POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	44
6.3	VZORKY SYROVÉHO MLÉKA.....	46
6.4	PŘÍPRAVA A MĚŘENÍ VZORKŮ POMOCÍ MILKO SCANU.....	47
6.5	PŘÍPRAVA A ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ KE STANOVENÍ VITAMINU D.....	47
6.5.1	Příprava vzorků .....	47
6.5.2	Příprava etanolického roztoku hydroxidu draselného .....	47
6.5.3	Zmýdelnění .....	48
6.5.4	Extrakce .....	48
6.5.5	Chromatografické stanovení vitamínu D <sub>3</sub> .....	48
6.5.6	Kalibrační křivka pro chromatografické stanovení vitamínu D.....	48
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>50</b>
7.1	VÝSLEDKY STANOVENÍ ZÁKLADNÍCH FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH PARAMETRŮ SYROVÉHO MLÉKA.....	50
7.2	VÝSLEDKY CHROMATOGRFICKÉHO STANOVENÍ VITAMINU D V SYROVÉM MLÉCE METODOU HPLC.....	59
7.3	VÝSLEDKY MĚŘENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY PRO CHROMATOGRFICKÉ STANOVENÍ VITAMINU D METODOU HPLC .....	69
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>71</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>73</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>80</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>82</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>83</b>

## ÚVOD

Mléko patří mezi jednu ze základních potravinových komodit. Jde o produkt mléčné žlázy savců, jehož prvořadým úkolem je plnohodnotná výživa narozených mláďat, která jsou krmena pouze mateřským mlékem. To znamená, že musí obsahovat všechny nutričně významné látky. Pro lidskou výživu je nejvíce využívané mléko kravské, z něhož se připravuje také mléčná kojenecká výživa.

Mezi jednu ze základních složek patří bílkoviny, jež se řadí spolu s bílkovinami vajec mezi nejkvalitnější z nutričního hlediska, protože obsahují všechny esenciální aminokyseliny, zejména leucin, izoleucin a valin. Mléko obsahuje také laktózu, tuk a významné množství vápníku. Díky kombinaci energie (z laktózy) a triacylglycerolů s přísunem bílkovin je podmínkou pro růst organismu. Zároveň mléko obsahuje enzymy, minerální látky (zejména Ca, P) a vitaminy, jak rozpustné ve vodě (vitaminy skupiny B), tak rozpustné v tuku (A, D, E, K).

Rychlé stanovení základních složek mléka (stanovení sušiny, tukuprosté sušiny, bílkovin, laktózy a tuku) lze provést pomocí přístroje MilkoScan, jež pracuje na principu interferometrie.

Vitamin D, který je rovněž součástí mléka, se podílí na správném metabolismu vápníku a fosforu, čímž významně ovlivňuje správný vývin kostí a zubů. Také hraje významnou úlohu v imunitním systému člověka. V letním období bývá v lidském organismu dostatek tohoto vitamínu, protože se syntetizuje v těle z provitaminu 7-dehydrocholesterolu pomocí UV – záření (290 – 310 nm). V zimních měsících, kdy je nedostatek slunečního záření je třeba doplňovat vitamin D především stravou.

Stanovení vitamínu D není jednoduché. Je třeba zvolit vhodnou metodu pro izolaci z mléka, což je jedna z nejobtížnějších matric, vzhledem k dalším látkám, které jsou v mléce přítomné a ztěžují stanovení. Při stanovení vitamínu je třeba brát v úvahu také to, že je citlivý na světlo a oxidaci. Jednou z možností, jak stanovit vitamin D v mléce, je alkalické zmýdelnění, extrakce pomocí nepolárního rozpouštědla a následné stanovení pomocí HPLC s obrácenými fázemi, jež je popsáno v praktické části.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 SLOŽENÍ MLÉKA

Mléko je produkt mléčné žlázy savců, určený pro výživu mláďat, a proto musí obsahovat v dostatečném množství všechny potřebné živiny. Kravské mléko patří mezi základní skupiny potravin. Je to komplexní potravina, obsahující základní živiny jako jsou proteiny, lipidy a sacharidy, prakticky celé spektrum vitaminů, je důležitým zdrojem dobře vstřebatelné formy vápníku a dalších důležitých minerálních látek [1,2].

Tabulka 1 Průměrné složení kravského mléka [3]

Složení mléka	g.100 g <sup>-1</sup>
Energie (kJ)	268,00
Voda	87,69
Sušina	12,31
Proteiny	3,28
Lipidy	3,66
Sacharidy	4,65
Minerální látky	0,72

### 1.1 Proteiny

Proteiny jsou polymery aminokyselin, které vznikly procesem proteosyntézy. Obsahují v molekule běžně více než 100 aminokyselin vzájemně vázaných peptidovou vazbou. Kromě peptidových vazeb se na struktuře bílkovin podílejí i disulfidové, esterové a jiné typy amidových vazeb [4].

Bílkoviny mléka jsou z nutričního hlediska nejvýznamnější složkou mléka. Jejich obsah v mléce se nejčastěji pohybuje v rozmezí 3,2 – 3,6 %. Jsou to plnohodnotné proteiny, které dodávají mléku významnou biologickou hodnotu. Jsou výsledným produktem biosyntetických procesů v mléčné žláze, kdy je syntetizováno a dále vylučováno šest hlavních mléčných proteinů. Mezi ně patří  $\alpha_{S1}$ -kasein ( $\alpha_{S1}$ -CN),  $\alpha_{S2}$ -kasein ( $\alpha_{S2}$ -CN),  $\beta$ -kasein ( $\beta$ -CN) a  $\kappa$ -kasein ( $\kappa$ -CN), dále  $\beta$ -laktoglobulin ( $\beta$ -LG) a  $\alpha$ -laktalbumin ( $\alpha$ -LA). Ostatní proteinové frakce (bovinní sérový albumin nebo imunoglobuliny) přecházejí do mléka z krve [5,6].

Hlavní složkou kaseinové frakce mléka jsou  $\alpha_S$ -kaseiny. Ty se v mléce vyskytují jako fosfoproteiny  $\alpha_{S1}$ -CN a  $\alpha_{S2}$ -CN (oba ve čtyřech genetických variantách A, B, C, D). Další  $\alpha_{S1}$ -kaseiny obsahují ve variantě B polypeptidové řetězce složené ze 199 aminokyselin a 8 fosfoserinových zbytků, díky nimž se tato část molekuly stává polární. Postranní řetězce aminokyselin jsou nepolární. S vápenatými ionty tvoří  $\alpha_{S1}$ -CN nerozpustnou vápenatou sůl.  $\alpha_{S2}$ -CN mají podobnou strukturu, nejsou ale tak citlivé k přítomnosti vápenatých iontů jako  $\alpha_{S1}$ -CN. Polypeptidové řetězce  $\beta$ -kaseinů se skládají z 209 zbytků aminokyselin a obsahují 5 fosfoserinových zbytků, řadí se rovněž mezi fosfoproteiny. S vápenatými ionty vzniká  $\beta$ -CN sůl rozpustná při teplotách 1 °C a nižších, při vyšších teplotách nerozpustná. Za produkty degradace  $\beta$ -CN proteolytickými enzymy mléka jsou považovány  $\gamma$ -kaseiny.

Ve dvou genetických variantách (A a B) se v kravském mléce vyskytují  $\kappa$ -kaseiny. Molekula varianty B se skládá ze 169 zbytků aminokyselin, tyto molekuly se vyskytují jako trimery a vyšší oligomery spojené vzájemně pomocí disulfidových vazeb. S vápenatými ionty vznikají z  $\kappa$ -kaseinu rozpustné soli stabilizující  $\alpha_{S1}$ -kasein a  $\beta$ -kasein v mléce v přítomnosti vápenatých iontů [7,8].

Sérové proteiny tvoří asi z 50 % globulární protein  $\beta$ -laktoglobulin, jehož řetězec je tvořen 162 aminokyselinami. V mléce se nachází jako dimer, který při záhřevu nevratně denaturuje. Termicky částečně denaturovaný protein reaguje prostřednictvím zpřístupněné jediné thiolové skupiny s dalšími mléčnými proteiny ( $\kappa$ -kaseinem a  $\alpha$ -laktalbuminem), tím vznikají dimery spojené disulfidovou vazbou. Nejméně se vyskytující, ale biologicky významné proteiny jsou vysokomolekulární globulární glykoproteiny imunoglobuliny, které mají účinnost protilátek. Shlukování tukových globulí v syrovém mléce má za následek vznik vrstvy smetany na povrchu mléka, jež není způsobeno pouhou koalescencí globulí, nýbrž pak specifickým minoritním proteinem makroglobulinem, který vytvoří příčné vazby mezi membránami těchto globulí. Dalším známým proteinem syrovátky je  $\alpha$ -laktalbumin, který plní biologickou funkci jako součást některých enzymů. V menším množství je v syrovátce zastoupen také sérový albumin (sérumalbumin) [9].

Mléčné proteiny jsou tvořeny dvěma hlavními typy proteinů, kaseiny (tvoří asi 80 % mléčných proteinů) a sérové proteiny (zbývající proteiny mléka). Složení uvádí tabulka 2.

Tabulka 2 Průměrné složení proteinů kravského mléka [9]

Proteiny	Podíl v %	Obsah v g.dm <sup>-3</sup>
Kasein celkem	80	25,6
α-kasein	42	13,4
β-kasein	25	8,0
γ-kasein	4	1,3
κ-kasein	9	2,9
proteiny syrovátky celkem	20	6,4
α-laktalbumin	4	1,3
sérový albumin	1	0,3
β-laktoglobulin	9	2,9
imunoglobuliny	2	0,6
polypeptidy	4	1,3

## 1.2 Lipidy

Lipidy jsou přírodní nepolární sloučeniny, které jsou téměř nebo zcela nerozpustné ve vodě, avšak rozpustné v jiných nepolárních rozpouštědlech, např. chloroformu, etanolu, éteru apod. Lipidy mají několik biologických funkcí. Jsou součástí biologických membrán, tvoří hlavní zásobní formu energie. Mohou být prekurzory dalších důležitých látek, jako jsou vitaminy a hormony. Zároveň slouží jako ochranný obal organismů a buněk proti dehydrataci či infekci [10].

Z chemického hlediska jsou to estery (nebo amidy) mastných kyselin a alkoholů (glycerolu nebo sfingozinu). Lipidy se rozdělují podle svého chemického složení na homolipidy (obsahují pouze mastnou kyselinu a alkohol), heterolipidy (navíc od homolipidů obsahují ještě další složku navíc, př. zbytek kyseliny fosforečné, sacharidy...), komplexní lipidy (tzv. složené lipidy, které jsou tvořeny asociáty homo- a heterolipidů) a doprovodné látky lipidů (tzv. lipoidy) [11].

Mastné kyseliny jsou alifatické monokarboxylové kyseliny, obvykle obsahující sudý počet atomů uhlíku. Podle množství a druhu vazeb se rozdělují na nasycené a nenasycené. Nena-

sycené mastné kyseliny mohou obsahovat jednu a více dvojných vazeb, poté je označujeme jako monoenové, dienové, trienové atd. [12,13].

Obsah tuku v mléce je závislý především na původu a energetické hodnotě stravy dojnice, což dokládají jeho poměrně velké rozptyly z různých farem. Nejčastěji se setkáváme s rozmezím mezi 3,5 – 4,5 %. V mléce se nacházejí lipidy z 98 % ve formě triacylglycerolů (ester glycerolu a tří různých či stejných mastných kyselin). Dále se v mléce nacházejí lipidy ve formě monoacylglycerolů, diacylglycerolů, steroly, fosfolipidy nebo jako volné mastné kyseliny. Lipidy tvoří v mléce tukové kuličky o velikosti 1 – 20  $\mu\text{m}$  (nejčastěji 3 – 4  $\mu\text{m}$ ), jejichž obal tvoří především bílkoviny a fosfolipidy a jádro obsahuje látky s hydrofobní povahou [14,15].

Označení  $\omega$ -3 a  $\omega$ -6 mastné kyseliny přísluší polynenasyceným MK, které mají první dvojnou vazbu na třetím respektive šestém uhlíku od metylové skupiny. Z pohledu výživy jsou významné především  $\omega$ -3 MK (např. EPA – eikosapentaenová nebo DHA – dokosa-hexaenová kyselina), které působí jako protizánětlivé faktory a snižují riziko kardiovaskulárních chorob, zatím co  $\omega$ -6 MK (např.  $\gamma$ -linolenová) působí opačně. Jejich poměr ve stravě člověka by měl být přibližně v poměru 5 : 1 ve prospěch  $\omega$ -6 MK [16].

Zastoupení MK v kravském mléce uvádí tabulka 3.

Tabulka 3 Zastoupení vybraných mastných kyselin mléčného tuku [17]

Mastné kyseliny nasycené		(% všech mastných kyselin)
C <sub>4:0</sub>	máselná	2 – 5
C <sub>6:0</sub>	kapronová	1 – 5
C <sub>8:0</sub>	kaprylová	1 – 3
C <sub>10:0</sub>	kaprinová	2 – 4
C <sub>12:0</sub>	laurová	2 – 5
C <sub>14:0</sub>	myristová	8 – 14
C <sub>16:0</sub>	palmitová	22 – 35
C <sub>18:0</sub>	stearová	9 – 14
Monoenové nenasycené		
C <sub>16:1</sub>	palmitolejová	1 – 3
C <sub>18:1</sub>	olejová	20 – 30
Polyenové nenasycené		
C <sub>18:2 n-6</sub>	linolová	1,5 – 2,6
C <sub>18:3 n-3</sub>	$\alpha$ -linolenová	0,7 – 1,6
C <sub>20:4 n-6</sub>	arachidonová	0,09 – 0,12
C <sub>20:5 n-3</sub>	eikosapentaenová (EPA)	0,05 – 0,09
C <sub>22:6 n-3</sub>	dokosahexaenová (DHA)	0,01
$\Sigma \omega-3$		1,1 – 2,5
$\Sigma \omega-6$		2,4 – 4,4

### 1.3 Sacharidy

Sacharidy je název pro mono-, oligo-, polysacharidy a heteroglykosidy. Název „cukry“ je v obecné terminologii vyhrazen sacharidům, které se vyznačují sladkou chutí. V mléce se nachází redukující disacharid laktóza. Laktóza obsahuje glukózovou a galaktózovou jednotku spojenou  $\beta$ -(1-4)-glykosidovou vazbou. Je to méně sladká látka, která je většinou kvasinek nezkravitelná, bakterie ji však dokáží zkravit na kyselinu mléčnou. Toho se využívá hlavně při výrobě zakysaných mléčných výrobků a sýrů. Laktóza se získává ze syrovátky. Z hlediska nutričního je významným zdrojem energie. Kojené děti mají v trávicím traktu přítomen enzym  $\beta$ -D-galaktosidázu neboli laktázu, která hydrolyzuje laktózu na její



monosacharidy. U některých lidí tento enzym schází nebo ho mají málo, což způsobuje průchod laktózy do tlustého střeva, kde se fermentuje za vzniku  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  a organických kyselin. Tím se zvyšuje obsah a tlak v tlustém střevě za současné vazby molekul vody, což se v konečné podobě projevuje vznikem vodnatého průjmu. Obsah laktózy v kravském mléce se pohybuje v rozmezí 4,6 – 4,8 % [2,5,18].

#### 1.4 Minerální látky

Mléko je velmi vhodným zdrojem hlavně vápníku, fosforu a draslíku. Poměr mezi vápníkem a fosforem v mléce je 1 : 1,3. Tento poměr je ideální z hlediska výživy. Vápník z mléka je lépe stravitelný než z potravin rostlinného původu. Resorpci podporuje řada mléčných složek, například laktóza, lyzin, valin, histidin, vitamin D a kyselina citronová. Při konzumaci zakysaných mléčných výrobků se může resorpce vápníku zvýšit i dvojnásobně. Strava, ve které se nenachází mléčné výrobky, zajišťuje denně 0,4 až 0,5 g vápníku. Pro udržení rovnováhy mezi příjmem a výdejem vápníku a následně také stavu kostí je ale třeba u žen před menopauzou a u mužů do 65 let denní přívod 1 g vápníku, což znamená, že je třeba zajistit dalších 0,5 g vápníku (půl litru nízkotučného mléka, 65 g tvrdého tvarohu nebo eidamského sýra nebo čtvrt litru bílého jogurtu). Pouze při nesnášenlivosti mléka je vhodnější zajistit příjem vápníku 500 mg denně medikamenty (nejlépe s jídlem) [8,19, 20].

Minerální látky lze v mléce nalézt v různé formě. Mohou být v mléčném séru v roztoku nebo koloidní formě a jsou také vázány na některé organické součásti mléka. Obsah minerálních látek v mléce je znázorněn v tabulce 5. Minerální látky jsou do mléka přenášeny z krve. Zastoupení jednotlivých forem vápníku a fosforu v mléce je silně závislé na obsahu proteinů, hlavně kaseinu, proto může poměrové zastoupení významně ovlivňovat zdravotní stav dojnic, stádium laktace, zastoupení ostatních minerálních látek atd. Obsah minerálních látek je významný jak z nutričního hlediska, tak pro regulaci acidobazických rovnováh v mléce, tj. pro udržení pH mléka (zejména K, Na, Ca), udržení osmotického tlaku (K, Na a laktóza) apod. [5].

Vzhledem k tématu a zaměření diplomové práce, budou dále blíže charakterizovány pouze vápník a fosfáty, na jejichž metabolismu se vitamin D bezprostředně podílí.

Tabulka 4 Obsah minerálních látek v 1 l mléka [5]

Minerální látky celkem (jako popeloviny)	6,00 – 8,00 g
Vápník	1,20 – 1,40 g
Hořčík	0,10 – 0,13 g
Sodík	0,50 g
Draslík	1,45 – 1,50 g
Fosfáty (jako $\text{PO}_4^{3-}$ )	2,10 g
Chloridy	1,00 g
Sírany	0,10 g
Citráty (jako kys. citronová)	2,00 g
Laktáty	0,02 g
Zinek	1,00 – 6,00 mg
Křemík	0,87 – 2,27 mg

### 1.4.1 Vápník

Celkové množství v těle člověka je 1200 – 1300 g. Z toho se nachází 99 % v kostech jako hydroxyapatit. Koncentrace v séru, resorpce i vylučování kalcia jsou regulovány PTH (parathormonem), kalcitoninem a vitamínem D.  $\text{Ca}^{2+}$  má prvotní význam pro nervové vedení vzruchu, svalovou kontrakci, vylučování hormonů, hemokoagulaci aj. Sníženou kalcémií nacházíme u některých onemocnění (těžké pankreatiny, hypotyreózy, renální insuficience), také u hypomagnezémie, hypoproteinémie, deficitu D-vitaminu, dále u některých kostních onemocnění a nádorů spojených s novotvorbou kosti, u těžké alkalózy a po masivních transfuzích. Projevuje se neurologickými příznaky (tetanie), břišními kolikami a dušností. Hyperkalcémií nacházíme u hypertyreózy, hypervitaminózy D, metastáz nádoru kostí a hyperproteinémie. Projevuje se slabostí, zmateností, nechutenstvím, únavou, zvracením a změnami EKG (ElektroKardioGram – záznam srdeční činnosti) [4].

Mléko je jedním nejvýznamnějších zdrojů vápníku, obsahuje průměrně 1,2 – 1,37 g.l<sup>-1</sup> vápníku. Vápník se v mléce nachází jako kaseinát vápenatý a fosforečnan vápenatý nebo v rozpustné formě jako citráty a fosforečnany. Pokrývá přibližně 60 % potřeby lidského

organismu. K jeho dokonalému využití přispívá přítomnost fosforu, hořčíku, vitamínu D a laktózy. Pro organismus je jednoznačně přirozenější a mnohem výhodnější získávat vápník z potravy než farmakologickou suplementací tabletami. Mezi potraviny bohaté na vápník patří v současné době zejména mléko a mléčné výrobky. Štěpy mléčného cukru absorpci přítomného vápníku střevní sliznicí významně zvyšují. Ve vztahu ke skeletu však nejde jen o vápník. Mléko obsahuje celou řadu dalších složek, které mají podle našich současných poznatků na kostní hmotu příznivý vliv: zásadité mléčné proteiny, fosfoproteiny z kaseinu a peptidy po fermentaci mléka mohou modifikovat regulaci, diferenciaci a aktivitu buněk chrupavky i kostní tkáň. Laktoferin podporuje tvorbu a přežívání osteoblastů – buněk tvořících kostní hmotu. Proto nechybí na seznamu látek, požadovaných za slibné v budoucím vývoji nových anabolických přípravků k léčbě osteoporózy. Nutno konstatovat, že přínos mléka a mléčných výrobků k udržení kostního skeletu je dosud často podceňován [2,21].

### 1.4.2 Fosfor

Celkové množství v lidském těle je 600 – 800 g, 80 % z toho je uloženo v kostech jako hydroxyapatit, zbytek se nachází v buňkách. Fosfátové anionty jsou důležité pro udržení acidobazické rovnováhy v ledvinách. Fosforylované molekuly sacharidů, lipidů a proteinů tvoří významný podíl organického fosfátu v organismu. Fosfáty se ve střevě vstřebávají ve vazbě na organické sloučeniny. Rozsah jejich resorpce ve střevě závisí na přítomnosti některých iontů, které tvoří s fosfáty málo rozpustné či nerozpustné soli (Fe, Al, ale i Ca). Regulace metabolismu fosfátů je řízena hormonálně. Paratyridin a kalcitonin působí na metabolismus fosfátů opačně, při poklesu  $\text{Ca}^{2+}$  fosfáty obvykle klesají a naopak. Hypofosfatémii nalézáme u alkalózy stimulující glykolýzu, provázenou přesunem fosfátů do buněk, kde jsou potřebné pro fosforylace, dále u chronické léčby antacidy (vážou fosfáty) a malabsorpce, hypertyreózy a deficitu vitamínu D. Dlouhodobá metabolická acidóza vede k trvalým ztrátám fosfátů, stejně jako alkoholismus a parenterální výživa bez úhrad fosfátů. Při hypofosfatémii vzniká z nedostatku makroergních fosfátů svalová slabost, hrozí srdeční a dechové selhávání. Příčiny hyperfosfatémie jsou akutní renální selhání a chronická renální insuficience, hojení fraktur, zvýšená sekrece růstového hormonu, předávkování vitamínem D, nadměrný přívod fosfátů při zhoršených renálních funkcích, uvolnění fosfátů z buněk. Při hyperfosfatémii klesá  $\text{Ca}^{2+}$  a dochází k ukládání kalcium-fosfátových solí do měkkých tkání. Může vznikat tetanie i závažné klinické komplikace z kalcifikace tkání orgánů, včetně akutního selhání ledvin. U chronického selhání ledvin vede retence fosfátů

k sekundárnímu hypertyreoidizmu, kalcifikaci měkkých tkání i cévní stěny a k další progresi renální nedostatečnosti [4].

V kravském mléce se nachází vápník a fosfor v poměru 1 : 1,3. Ve stravě se doporučuje vápník a fosfor v poměru 1 : 1 až 1 : 1,5, což mléko ideálně splňuje. Obsah fosforu v mléce je asi 95 mg ve 100 g mléka. Fosfor se v mléce nachází jak ve formě organické (esterifikovaný serinem, vázaný fosfatidylcholinem, s některými koenzymy a lipidy), tak ve formě anorganické. Ve formě anorganické se vyskytuje v množství přibližně 200 mg ve 100 g mléka. Téměř 45 % anorganického fosforu je vázáno v kaseinových micelách v podobě fosforečnanu vápenatého, zbytek se v mléce nachází v podobě pravého roztoku, jsou to především  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgHPO}_4$ ,  $\text{CaHPO}_4$  a  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  [19].

## 1.5 Vitaminy

Vitaminy jsou organické, exogenní biokatalyzátory, které jsou mnohdy nepostradatelné (esenciální) pro správný metabolismus. Lidský organizmus je nedokáže syntetizovat vůbec nebo jen v nedostatečném množství (až na některé výjimky, např. vitamin D), proto se musí doplňovat potravou. Některé vitaminy jsou potravou přijímány ve formě tzv. provitaminů, což jsou inaktivní prekurzory, které se v organizmu mění na vlastní účinnou látku, zvanou vitamin. Vitaminy jsou strukturně velmi různorodé látky, rozdělují se podle své rozpustnosti na vitaminy rozpustné v tucích – lipofilní (A, D, E, K) a vitaminy rozpustné ve vodě – hydrofilní (hlavně B-komplex a vit. C). Lipofilní vitaminy se mohou v těle ukládat do zásoby (v játrech a tukové tkáni) a může proto dojít k předávkování. Naproti tomu nadbytek přijatých hydrofilních vitaminů je vylučován bezprostředně močí [12,22].

Tabulka 5 Obsah vitaminů v kravském mléce [7]

Vitamin A	0,3 – 1,0	Vitamin B <sub>3</sub>	0,8 – 5,0
Provitamin A	0,1 – 0,6	Vitamin B <sub>6</sub>	0,2 – 2,0
Vitamin D	0,001	Vitamin B <sub>5</sub>	0,4 – 4,0
Vitamin E	0,2 – 1,2	Biotin	0,01 – 0,09
Vitamin K	0,01 – 0,03	Vitamin B <sub>9</sub>	0,03 – 0,28
Vitamin B <sub>1</sub>	0,3 – 0,7	Vitamin B <sub>12</sub>	0,003 – 0,038
Vitamin B <sub>2</sub>	0,2 – 3,0	Vitamin C	5,0 – 20,0

Vitamin A (retinol) přijímáme v potravě přímo nebo ve formě provitaminu A ( $\beta$ -karotenu). Významně se podílí na fotoreceptci v oční sítnici. Mlézivo obsahuje 10 krát více karotenů a vitamínu A než mléko, což způsobuje typické zbarvení mléziva přítomnými karoteny. Při pasteraci, UHT (Ultra High Temperature – sterilace při vysoké teplotě) a při sušení se ztrácí 6 % tohoto vitamínu, k dalším ztrátám dochází při skladování. V UHT mléce tyto ztráty činí 3 – 7 % za 4 týdny. V přítomnosti kyslíku a na světle (při skladování v nevhodných obalech) pak činí ztráty vitamínu 20 až 30 % za hodinu. V sušeném mléce je vitamin velmi stabilní, při dlouhodobém skladování nepřesahují ztráty 10 %. V sýrech bývá obsah vitamínu vyšší než v mléce (o 50 % i více, podle obsahu tuku). Při skladování másla dochází k jen malým ztrátám karotenoidů i retinolu [7,23].

Vitamin D se vyskytuje ve dvou formách – jako cholekalciferol (vitamin  $D_3$ ), který se tvoří v kůži účinkem ultrafialového záření ze 7-dehydrocholesterolu, a jako vitamin  $D_2$  (ergokalciferol), který se tvoří po ozáření rostlinného ergosterolu. Vzhledem k zaměření diplomové práce, bude více podrobně pojednáno o vitamínu D v samostatné kapitole.

Vitaminy E (tokoferoly) jsou skupina 8 přírodních derivátů, z nichž je biologicky nejúčinnější a nejvýznamnější  $\alpha$ -tokoferol. Patří mezi významné přirozené antioxidanty, které působí jako ochrana polynenasycených vyšších karboxylových kyselin proti poškození volnými radikály. Hypovitaminóza vzniká při poruchách vstřebávání lipidů a při jeho nedostatečném příjmu. Ke správné funkci vitamínu napomáhá selen, který je součástí enzymu glutathionperoxidázy. Tokoferol a selen se vzájemně podporují při působení vůči peroxidům lipidů. Selen je dále důležitý pro normální činnost pankreatu, jehož činnost je nezbytná pro trávení tuků a s ním i vitamínu E. Jejich koncentrace v kravském mléce je 5 – 10 krát nižší ve srovnání s mateřským mlékem [7,24].

Vitaminy K (naftochinony, farnochinony) jsou nezbytné pro tvorbu faktorů srážení a protrombinu. Vstřebávání vitamínu K z potravy závisí na příjmu tuků a funkci žluče. Vstřebává se v tenkém střevě a do jater se transportuje vázaný v chilomikrách. Malé zásoby se ukládají v játrech a slezině. V mléce, stejně jako v ostatních živočišných produktech jsou zjišťovány jen ve stopách. Sušené mléko pak obsahuje 30 – 70 % původního množství vitamínu. K vyšším ztrátám dochází, podobně jako u riboflavinu, je-li mléko vystaveno účinkům slunečního záření. [7,24]

Vitamin  $B_1$  (tiamin) je součástí koenzymu dekarboxyláz. V mléce se tiamin vyskytuje především volný a jako difosfát, z části vázaný na proteiny. V kravském mléce je asi

50 – 75 % volného a 18 – 45 % fosforylovaného tiaminu a 5 – 17 % vázaného na proteiny. Vázaná forma v mléce vykazuje přibližně 90 % aktivity volného vitamínu. Při pasteraci a sterilaci (včetně UHT záhřevu) nebo sušení mléka za běžných technologických podmínek se ztráty tiaminu udržují v rozmezí 10 – 20 %. Během skladování tepelně ošetřeného mléka nejsou ztráty nijak vysoké a samozřejmě jsou úměrné době skladování a teplotě. Stabilita tiaminu v sušeném mléce závisí na podmínkách při skladování, zejména na teplotě a přítomnosti kyslíku. Ztráty však většinou nepřesahují 20 % [7,23,24].

Vitamin B<sub>2</sub> (riboflavin) je součástí kofaktoru FMN (flavinmononukleotidu) a FAD (flavinadeninukleotidu) při dehydrogenačních reakcích. Je produkován mikroflórou zažívacího traktu skotu a z toho důvodu je v kravském mléce ve výraznější koncentraci než v mléce mateřském. Odhaduje se, že téměř 40 % vitamínu získávaného potravou zajišťuje mléko a mléčné výrobky. Při běžných technologických operacích (např. při pasteraci a sterilaci) je riboflavin v mléce velmi stálý, ztráty nedosahují ani 5 %. Např. retence vitamínu v UHT mléce je asi 80 %. Také ztráty během skladování trvanlivého mléka jsou poměrně malé (asi 10 %). K značným ztrátám riboflavínu v mléce ale dochází přímým ozářením slunečním světlem. Při skladování mléka na slunci degraduje za 1 hodinu asi 20 – 40 % riboflavínu [7,24,25,28].

Vitamin B<sub>6</sub> (pyridoxin) je název, který zahrnuje skupinu strukturně podobných látek, jako jsou pyridoxin, pyridoxal a pyridoxamin. Vitamin B<sub>6</sub> je kofaktorem enzymů, které se účastní metabolismu aminokyselin. V mléce je pouze asi 10 % vázaného vitamínu. Obsah v mléce a sýrech je relativně malý. Při běžných způsobech zpracování mléka jsou ztráty vitamínu pouze malé. Při pasteraci činí asi do 5 % obsahu vitamínu a při použití UHT technologie nedosahují ani 10 %. Vyšší ztráty vznikají až následným skladováním, pak jsou celkové ztráty v UHT mléce asi 40 – 45 %. Během tepelného zpracování mléka přechází pyridoxal částečně na pyridoxamin. V čerstvém mléce se nachází hlavně kyselina pyridoxová (38 %), potom pyridoxal-fosfát (32 %), pyridoxal (24 %), pyridoxamin (4 %) a pyridoxamin-fosfát (2 %). V pasterovaném mléce je hlavní formou pyridoxal (41 %), pak pyridoxalfosfát (24 %), pyridoxová kyselina (20 %), pyridoxamin-fosfát (9 %) a pyridoxamin (6 %). Během pasterace a hlavně při sušení mléka reaguje pyridoxal s cysteinem a lyzinem (volnými aminokyselinami i aminokyselinami vázanými v proteinech) [7,23,24,26,29,30].

Vitamin B<sub>3</sub> (kyselina nikotinová a její amid) jsou nazývány také jako niacin. Do organismu se vitamin B<sub>3</sub> přivádí zejména ve formě NAD<sup>+</sup> (nikotinamidadeninukleotidu) nebo

NADP<sup>+</sup> (nikotinamidadeninukleotidfosfátu). Niacin je součástí kofaktorů mnoha dehydrogenáz. Mléko obsahuje překvapivě nízké množství niacinu. Ztráty při zpracování mléka jsou velmi malé (do 5 %). Při výrobě sýrů přechází značná část niacinu do syrovátky. Při skladování sýrů jsou již ztráty pouze minimální [25].

Vitamin B<sub>5</sub> (kyselina pantotenová) je významným faktorem v biochemických systémech metabolismu mastných kyselin, především koenzymu A. U přežvýkavců je kyselina pantotenová syntetizována mikroflórou zažívacího traktu. Pasterace mléka má na obsah vitamínu minimální vliv. U UHT mléka činí ztráty vitamínu po zahřevu asi 5 % původního množství a ztráty po 6 týdnech skladování UHT mléka tvoří celkem 20 – 35 %. Přirozený obsah vitamínu ve fermentovaných mléčných výrobcích nebývá fermentací ovlivněn nebo jen nepatrně. Během sušení a skladování sušeného mléka jsou ztráty rovněž nízké [25,26,28].

Vitamin B<sub>9</sub> (kyselina listová) obsahuje v molekule pterin, kyselinu *p*-aminobenzoovou a jednu (nebo více molekul) kyseliny glutamové. Kyselina listová se redukuje na metabolicky účinnou formu – tetrahydrofolát (THF) a zúčastňuje se přenosu jednouhlíkatých zbytků. Stabilita folacinu v mléce závisí na přítomnosti kyslíku. Obvyklé ztráty při pasteraci dosahují 5 %, ztráty při výrobě UHT mléka bývají 10 – 20 %, při výrobě kondenzovaného mléka až 75 %. Obsah folacinu v jogurtech závisí na druhu použitých mikroorganismů. Může být nižší, ale i vyšší než v použitém mléce [7,24,27].

Vitamin B<sub>12</sub> (kyanokobalamin) je vitamin, který obsahuje jako centrální atom uprostřed porfyrinového kruhu kobalt. Je nepostradatelný pro tvorbu nukleových kyselin a pro dělení buněk. Při běžných technologických podmínkách zpracování mléka se obsah vitamínu příliš nemění. Při pasteraci jsou ztráty do 10 %, v UHT mléce o něco více, asi 10 – 20 %. Při výrobě tvrdých sýrů zůstává asi 60 – 90 % původního obsahu vitamínu. Při výrobě fermentovaných mléčných výrobků za použití bakterie *Propionibacterium shermanii* narůstá obsah vitamínu oproti použitému mléku až třicetinásobně [7,24,25,28, 30].

Biotin je cyklický derivát močoviny. Působí jako kofaktor karboxyláz a uplatňuje se při přenosu karboxylu. Nedostatek biotinu je méně častý, doprovází ho deprese, nauzea a častější záněty. Při běžné pasteraci mléka dochází k 10 – 15% ztrátám. Během sušení jsou ztráty o něco vyšší, ale skladováním se však již podstatným způsobem nezvyšují. V sýrech se koncentrace biotinu snižuje asi o 20 – 35 % ve srovnání s použitým mlékem.

Obsah biotinu v zakysaných mléčných výrobcích je ovlivněn použitou mikroflórou (*Lactobacillus* spp.) a bývá o 45 – 60 % nižší než obsah v mléce. Oproti tomu některé bakterie (rodu *Micrococcus* aj.) biotin naopak produkují a tím se obsah v jogurtu může zvýšit o 5 – 25 % [7,24,25].

Vitamin C (kyselina L-askorbová a L-dehydroaskorbová) je odvozen od glukózy, z této se pak syntetizuje. Výjimku tvoří např. člověk, primáti a morčata, kteří kyselinu askorbovou nedokáží syntetizovat. Hraje důležitou úlohu v oxidačně redukčních systémech. Příznaky nedostatku jsou znát hlavně na podpurných tkáních (kosti, chrupavka, vazivo), k příznakům nedostatku patří krvácivost, uvolňování zubů, suchá pokožka, suché sliznice, pomalé hojení ran a lehká lámavost kostí. Z důvodu tepelného ošetření mléka je obsah kyseliny askorbové v mléce malý. Ztráty askorbové kyseliny jsou již při skladování syrového mléka značné. Při běžném chladírenském skladování činí asi 50 % a zvyšují se s rostoucí teplotou skladování. Při tepelném záhřevu mléka klesá obsah vitamínu C v závislosti na teplotě a době záhřevu o 20 – 50 %. Při krátkodobé pasteraci a při vysoké teplotě (např. v UHT mléce) jsou ztráty kolem 10 – 30 %. Relativně dobrá je stabilita askorbové kyseliny u sušeného, vitaminem C obohaceného mléka, které je baleno v inertní atmosféře [5,7,26,30].

## 1.6 Enzymy

Enzymy jsou biokatalyzátory, které umožňují nebo urychlují biochemické přeměny určitého typu reakcí. Obsahují bílkovinný nosič (apoenzym) a mnohdy i kofaktor (prostetickou skupinu či koenzym), jež je účinnou složkou. V mléce se nacházejí nativní enzymy z leukocytů a z buněk mléčné žlázy. Větší množství enzymů se nachází v mlezivu, čerstvé pravé mléko od zdravých dojnic obsahuje enzymů málo. V mléce se nachází kromě nativních enzymů také enzymy mikrobiální z přítomných mikroorganismů. Technologickým zpracováním (pasterace) dochází k denaturaci a inaktivaci enzymů. Rozdílné citlivosti k záhřevu se využívá při průkazu pasterace mléka. Mezi oxidoreduktázy nacházející se v mléce patří laktoperoxidáza, xantinoxidáza a kataláza. Z hydroláz jsou to pak lipázy, fosfatázy, proteázy, amylázy a lysozym [5].

## 1.7 Fyzikální vlastnosti mléka

Specifická hmotnost kravského mléka se pohybuje mezi 1,026 – 1,036 g.cm<sup>-3</sup>. Hodnota je závislá na obsahu bílkovin, laktózy a tuku, protože zvýšený obsah tuku hmotnost snižuje



a tukuprostá sušina (bílkoviny, laktóza a min. látky) naopak hmotnost zvyšuje. Celkovou sušinu tvoří veškeré látky obsažené v mléce kromě vody a plynů. Tukuprostá sušina pak tvoří rozdíl mezi celkovou sušinou a obsahem tuku. Bod mrznutí se nachází v intervalu - 0,540 až - 0,579 °C. Používá se především ke kontrole porušenosti mléka (přídavek vody). Titrační kyselost mléka dle Soxhlet-Henkela udává spotřebu NaOH o koncentraci  $0,25 \text{ mol.dm}^{-3}$ , který je potřeba k neutralizaci kyselých reagujících látek ve 100 ml mléka na indikátor fenolftalein, u čerstvého syrového mléka bývá v rozmezí 6,2 – 7,8 SH. Aktivní kyselost (koncentrace vodíkových iontů) syrového mléka se pohybuje v intervalu 6,4 – 6,8 pH [15].

## 2 VITAMIN D

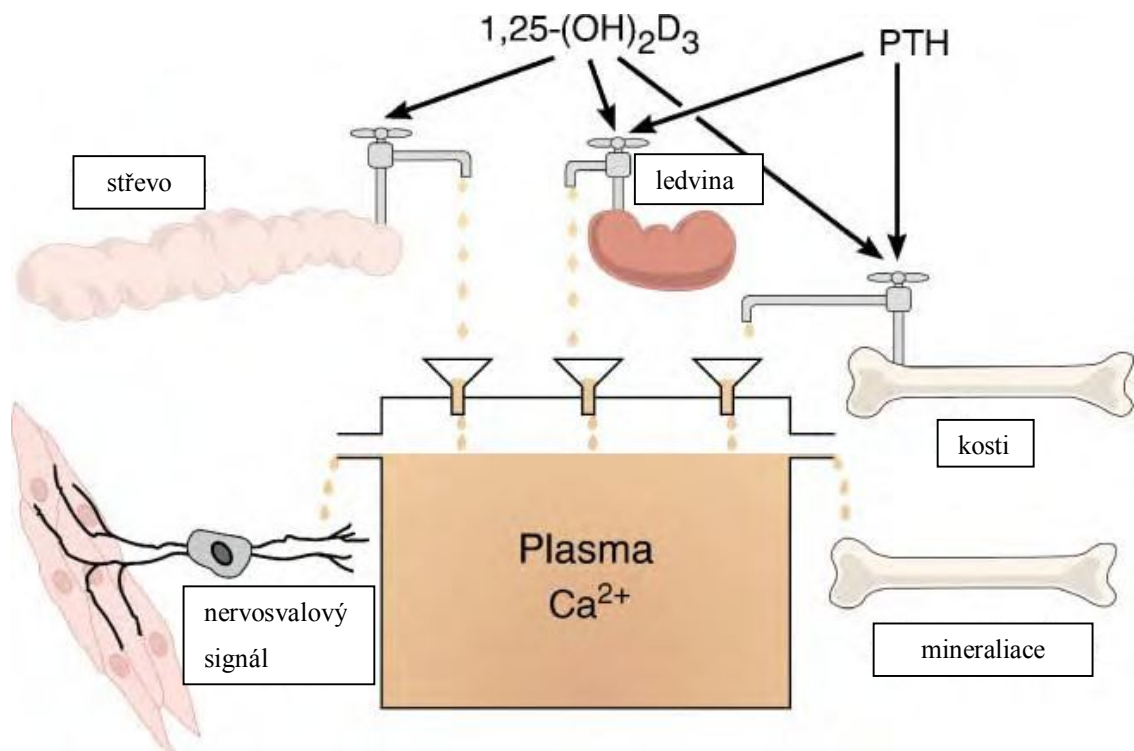
### 2.1 Fyziologie vitaminu D

Vitamin D patří mezi steroidní prohormony. Základem jsou steroidy nacházející se u živočichů, rostlin a také kvasinek. Z těchto steroidů pak různými metabolickými pochody vzniká v těle hormon kalcitriol s antirachitickým účinkem, který je nepostradatelný zejména při metabolismu vápníku a fosforu [25].

Samotný vitamin D vzniká z provitaminů ergosterolu a 7-dehydrocholesterolu působením slunečního záření. Ergokalciferol (vitamin D<sub>2</sub>) vzniká v rostlinách z ergosterolu, zatímco u živočichů se pak v kůži vystavené slunečnímu záření (290 – 310 nm) ze 7-dehydrocholesterolu tvoří cholekalciferol (vitamin D<sub>3</sub>). Oba vitaminy mají stejné účinky a vedou ke vzniku D<sub>2</sub>-kalcitriolu nebo D<sub>3</sub>-kalcitriolu. Oba dva se vzájemně liší pouze svým postranním řetězcem, jenž je u ergosterolu nenasycený a obsahuje vedlejší metylovou skupinu [25,27].

Vitamin D<sub>3</sub> vznikající působením slunečního záření i vitamin D<sub>3</sub> (nebo D<sub>2</sub>) z potravy po vstřebávání z micel ve střevě dále kolují v krvi, kde jsou navázány na specifický globulin. D<sub>3</sub> se zachycuje v játrech, ve kterých se hydroxyluje na 25-hydroxycholecalciferol enzymem D<sub>3</sub>-25-hydroxylázou z endoplazmatického retikula, který může být limitující pro vznik vitaminu D. 25-hydroxycholecalciferol je nejčastější formou vitaminu D v oběhu a zároveň také tvoří většinu jaterních zásob tohoto vitaminu. Další neméně významná část 25-hydroxycholecalciferolu vstupuje do enterohepatálního oběhu, takže narušení tohoto procesu může rovněž způsobit nedostatek vitaminu D [31].

V ledvinových kanálcích, kostech a placentě je 25-hydroxy-D<sub>3</sub> dále hydroxylován v pozici 1 mitochondriálním enzymem 25-hydroxy-D<sub>3</sub>-1-hydroxylázou. Takto vzniklý 1- $\alpha$ -25-dihydroxycholecalciferol (kalcitriol) je zatím nejúčinnější metabolit vitaminu D. Jeho produkce se reguluje pomocí jeho vlastní koncentrace, hormonem příštítných tělísek a hladinou fosfátů v séru [7,30].



Obr. 1 Regulace hladiny vitamínu D [32]

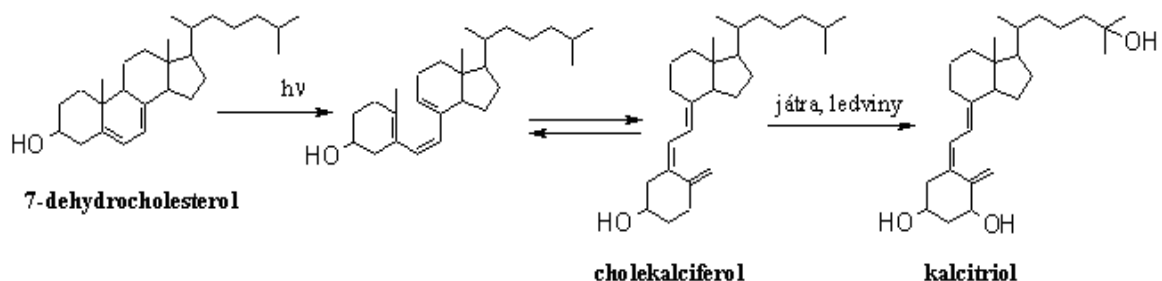
25-hydroxy- $D_3$  může být také hydroxylován i na uhlíku 24 mitochondriálním enzymem, který se nachází v ledvinových tubulech, střevu, chrupavce a placentě. Množství výsledného produktu 24,25-dihydroxy- $D_3$  v séru je v reciproční rovnováze s množstvím 1,25-dihydroxy- $D_3$ . Z nových poznatků vyplývá, že vit. D (podobně jako vit. A) může působit prostřednictvím aktivace specifických genů [33,34].

Biologicky aktivní formy tohoto vitamínu zasahují do nitrobuňčných receptorů v kostech a ve střevě. V kostech působí zejména na osteoklasty, ale i osteoblasty. Umožňují mobilizaci vápníku ze starších částí kostí, a tím zvyšují hladinu vápníku v plazmě. Při udržení dostatečné hladiny vápníku v plazmě naopak zajišťují ukládání vápníku do kosti. Ve střevě kalcitriol zajišťuje syntézu vazebného proteinu pro přenos vápníku ze střevního lumen do plazmy. Zvyšuje vstřebávání vápníku a také fosfátu. V ledvinách zvyšuje reabsorpci  $Ca^{2+}$  [29].

Nedostatek vitamínu D se projevuje křivicí neboli rachitis. Toto onemocnění může výrazně postihnout zejména děti a mladistvé, v období intenzivního růstu. Při nedostatečném ukládání vápníku dochází k měknutí kostí (osteomalacii) a dalším poruchám vývinu kostí. Mezi hlavní příznaky rachitidy proto patří značná měkkost lebečních kostí v záhlaví, zduření

žeber v místě styku s hrudní kostí (hrudní kost vyčnívá kupředu, z boku je hrudník oploštělý) a příliš propadlý nebo vpáčený hrudník v místě úponu bránice. Křivice se může také projevit opožděným prořezáváním zubů (u dětí), neklidem, nervozitou a nespavostí. Vyrůstá rovněž riziko opakovaných infekčních onemocnění dýchacích cest. Křivici lze (v případě včasné diagnózy) léčit dlouhodobě zvýšeným příjmem vitamínu D. V mateřském mléce není koncentrace vitamínu D dostatečná, proto se u kojenců vyživovaných pouze mateřským mlékem doporučuje v průběhu prvního roku života provádět anti-rachitickou profylaxi. Proto se dětem, které jsou kojeny výhradně mateřským mlékem, podává malé množství vitamínu D pomocí medikamentů (např. Vigantol). U kojenců, kteří jsou vyživováni počáteční a pokračovací kojeneckou stravou, není tato profylaxe potřebná, jelikož tato strava je již fortifikována. Nadbytek vitamínu D se projevuje nechutenstvím, zvracením, nápadnou bledostí a značně rychlým poklesem tělesné hmotnosti. Předávkování ve větší míře může být i životu nebezpečné. Doporučená denní dávka pro dospělého člověka je 10 – 15  $\mu\text{g}$  [35,36].

Příjem vitamínu D není dostatečný v Evropě ani v našem geografickém pásu, neboť v potravě získáváme nejvýše 100 IU denně. Vitamin D lze ve větším množství nalézt pouze v rybím oleji, játrech, fortifikovaných margarinech nebo vaječném žloutku. Zároveň sluneční záření postačuje tvořit dostatek vitamínu D v kůži jen během 3 – 4 měsíců v roce. Doporučený denní příjem 400 IU vitamínu D by proto bylo vhodné zajistit zejména v zimních měsících. U starších lidí se doporučuje až 800 IU. Příjem vitamínu D až do 2000 IU denně se považuje za zdravotně bezpečný. IU je mezinárodní jednotka, jež odpovídá 0,025  $\mu\text{g}$  vitamínu D. Vitamin D se uplatňuje jak přímým účinkem na kostní buňky, tak také úpravou svalové slabosti v důsledku hypovitaminózy vitamínu D [20].



Obr. 2 Syntéza vitamínu D<sub>3</sub> [37]

## 2.2 Stanovení vitamínu D

Při stanovení vitamínu D je nutné vycházet z jeho fyzikálních a chemických vlastností. Identifikovat lze teoreticky 64 možných sférických konfigurací izomerů, z nichž asi polovina vykazuje charakteristické spektrum v UV oblasti ( $A_{\max} = 264 \text{ nm}$ ). Vitamíny vykazují citlivost na teplo a vzduch, přičemž dochází ke katalýze, která vede k izomeraci a zároveň k oxidaci molekuly.

### 2.2.1 Zmýdelnění

Vlastní chromatografické stanovení je třeba provést po zmýdelnění a extrakci. V případě mléka se nejčastěji používá ke zmýdelnění alkoholický (metanol, etanol) nebo vodný roztok KOH, který slouží k odstranění neutrálních tuků. Zmýdelnění může probíhat za tepla nebo za studena. Za tepla se nejčastěji používá ultrazvuková lázeň při teplotě 60 – 80 °C nebo po zahřívání na teplotu varu pod zpětným chladičem po dobu 30 minut. Oxidaci se zabraňuje pomocí pyrogalolu, BHT (butylhydroxytoluenu), kyseliny askorbové, hydrochinonu nebo sulfidu sodného, vhodné je také zmýdelňovat pod proudem dusíku. Důležité je rovněž zabránění přístupu světla, neboť vitamin D je fotolabilní. Zmýdelnění za studena probíhá při pokojové teplotě přibližně 12 – 18 hodin (ideálně na třepačce), při tomto způsobu zmýdelnění nedochází k izomeraci vitamínu D na jeho previtamin [38,39,40].

### 2.2.2 Extrakce a čištění vzorku

Přípravy vzorku pro stanovení vitamínu D zahrnují obvykle dva kroky, a to extrakci rozpouštědlem a poté čisticí fází na chromatografické SPE (Solid Phase Extraction, extrakce na tuhé fázi) kolonce. Důležitá je polarita použitého rozpouštědla, jestli lipidová extrakce obsahuje vitamin D i s metabolity nebo zda je orientovaná selektivně. Pro extrakci celkového vitamínu D se používají směsi chloroform a metanol nebo dichlormetan a metanol, pro další dělení vitamínu D jsou vhodná extrakční činidla s nízkou polaritou jako je hexan nebo cyklohexan a jejich směsi s etylacetátem nebo alkoholem, které se používají pro izolaci metabolitů a zajišťují také uvolnění vazby z komplexu vitamínu D a proteinu. Podobně se používají k extrakci dietyléter, dichlormetan, benzen-toulen. SPE umožňuje jednak odstranit interferující lipidy, ale také předseparovat frakce metabolitů vitamínu D. Náplněmi kolon mohou být např. Sephadex LH-20, alumina,  $\text{NH}_2$ - nebo  $\text{C}_{18}$  [41].

### 2.2.3 Chemické metody se spektrofotometrickou detekcí

Lze využít přímé UV-VIS spektrometrické stanovení vitamínu D, které je ovšem limitováno koncentrací a čistotou vzorku. Ten nesmí obsahovat další vitamíny rozpustné v tucích. V jedné ze starších fotometrických metod je hodnocena absorbance (500 nm) barevného produktu vznikajícího reakcí mezi vitamínem D a chloridem antimonitým. Při této reakci však interferuje především přítomnost vitamínu A. Další fotometrické postupy využívají jako dehydratační činidlo trifluoroctovou nebo trichloroctovou kyselinu. Fluorometrické ani fotometrické (barevné reakce s chloridem antimonitým nebo s trifluoroctovou kyselinou) nejsou pro dnešní účely dostatečně citlivé a specifické [30].

### 2.2.4 Chromatografické metody

TLC (Thin Layer Chromatography, tenkovrstvá chromatografie) a varianta HPTLC (High-Performance Thin Layer Liquid Chromatography – vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie), slouží jako levnější podoba kapalinové chromatografie především pro fázi čištění a předseparaci extraktů vzorků před další chromatografickou nebo ligandovou analýzou metabolitů vitamínu D, a to zejména v biologických materiálech. Použití TLC pro přípravu vzorků je stále více nahrazováno LC (Liquid Chromatography, kapalinová chromatografie) s použitím SPE kolonek [30].

Stanovení vitamínu D a jeho metabolitů pomocí GC (Gas Chromatography, plynová chromatografie) je provázáno řadou nepříjemných doprovodných jevů (adsorpce v koloně, dehydratace 25-hydroxy derivátů, tepelná degradace apod.). Vhodným řešením bývá derivatizace využívající acylchloridy nebo acylanhydridy. Úspěšné je především spojení GC s hmotnostní detekcí (GC-MS).

LC, HPLC (High-Performance Liquid Chromatography – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie) velmi dobře separuje metabolity vitamínu D. Nejčastěji se využívá technika s reverzní stacionární fází a s mobilními fázemi obsahujícími vodu-metanol nebo vodu-acetonitril. Detekce se běžně provádí v UV oblasti absorpčního maxima 264 nm [30,40].

### 2.2.5 Radioimunoanalýza

Ke stanovení se používá  $^{125}\text{I}$ . Je to  $\gamma$ -zářič, poločas rozpadu je 60 dní. Je to metodika často náročná na ruční práci a zkušenost laborantek, ale také je třeba zohlednit i veškeré problémy a povinnosti plynoucí z práce s radioaktivitou. Její výhodou je ovšem cena, která je většinou příznivá a nenáročnost na složitá zařízení. Vlastní stanovení se provádí po imuno-

extrakci kontrolních a neznámých vzorků. Kalibrátory a extrahované kontrolní a neznámé vzorky se inkubují se značeným  $^{125}\text{I-D}_3$ . Během inkubace probíhá kompetitivní imunoreakce za vzniku imunokomplexů. Po separaci imunokomplexů precipitačním činidlem, následné centrifugaci a odsátí supernatantu se změří radioaktivita sedimentů na  $\alpha$ -počítači a vyhodnotí koncentrace  $\text{D}_3$  ve vzorcích. Naměřená radioaktivita je nepřímo úměrná koncentraci  $\text{D}_3$  [42,43].

### 3 CHROMATOGRAFIE

Všechny separační metody jsou odvozené od nějaké fyzikální vlastnosti analytů. V chromatografii se vzorek umístí mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, kde stacionární fáze je nepohyblivá a mobilní fáze je pohyblivá. Vzorek se aplikuje na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek unášen přes tuto soustavu. Složky vzorku jsou stacionární fází rozdílně zachycovány, a proto se při průchodu chromatografickým systémem zdržují různou dobu. Více se zdrží složky, které jsou pevněji poutány stacionární fází a tím se postupně složky od sebe oddělují. Ty složky vzorku, které mají slabé interakce se stacionární fází, vyplavuje systém jako první [44,45].

Chromatografii lze rozdělit podle skupenství mobilní fáze, podle uspořádání stacionární fáze a podle povahy děje, který při separaci převládá. Běžně se však při separaci uplatňuje více dějů současně. Podle polarity lze chromatografii rozlišovat na chromatografii v systémech s normálními fázemi (NP – Normal Phase), kde je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní. Dále pak na chromatografii v systémech s obrácenými fázemi (RP - Reverse Phase), kde je stacionární fáze méně polární než fáze mobilní. Toto rozdělení platí jednak pro chromatografii kapalina-kapalina, kapalina-tuhá fáze, zároveň pro kolonovou chromatografii i pro chromatografii v plošném uspořádání [46].

Rozdělení metod chromatografie popisuje tabulka 6. Barevně odlišená metoda v této tabulce je využita v praktické části stanovení vitamínu D. Pro účely této práce bude dále popsána zejména HPLC s adsorpčním mechanismem dělení.



Tabulka 6 Rozdělení chromatografických metod [46]

Mobilní fáze	Stacionární fáze	Mechanismus dělení	Metoda
plyn	kapalina	rozdělování, rozdělovací rovnováha	plynová rozdělovací chromatografie (GLC)
	pevná látka	adsorpce, adsorpční izoterma	plynová adsorpční chromatografie (GSC)
		sítový efekt	plynová chromat. na molekulových sítích (GSC)
kapalina	kapalina	rozdělování, rozdělovací rovnováha	kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC)
		sítový efekt	gelová permeační chromatografie (GPC)
	pevná látka	adsorpce, adsorpční izoterma	kapalinová chromatografie adsorpční (LSC)
			tenkovrstvá chromatografie (TLC)
		Iontová výměna, výměnná rovnováha	ionexová chromatografie (IEC)
		biospecifická chemická reakce	afinitní chromatografie

### 3.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie umožňuje dělení téměř všech látek, zejména organických. Lze ji provádět v uzavřeném systému (kolonová chromatografie, př. HPLC) nebo v otevřeném (tenkovrstvá, př. papírová chromatografie). Kapalinová chromatografie se využívá zejména k separaci různých směsí látek, jako jsou netěkavé nebo špatně těkavé a termicky labilní látky. Podle mechanismu separace se používají rozpouštědla různé polarity. Tyto vlastnosti mobilní fáze jsou v systému s danou stacionární fází rozhodujícím faktorem, který ovlivňuje retenci jednotlivých složek směsi a tím i jejich vzájemné rozdělení [47].

### 3.2 Adsorpční kapalinová chromatografie

Při adsorpční chromatografii dochází k adsorpci molekul analytu na povrch tuhé fáze – adsorbentu. Rozhodující význam při adsorpci má velikost a jakost povrchu adsorbentu, kde se nachází adsorpční centra. Separační funkci popisuje adsorpční koeficient a adsorpční izoterma dělených složek pro daný sorbent, která udává závislost adsorbovaného množství

látky na koncentraci téže látky v okolním prostředí. Obecně se používají porézní, pevné materiály s velkým povrchem, jako je silikagel, oxid hlinitý nebo aktivní uhlí. Volba rozpouštědla je velmi důležitá pro eluci analytu, protože rozpuštěné látky si s rozpouštědlem konkurují na povrchu stacionární fáze [44,48].

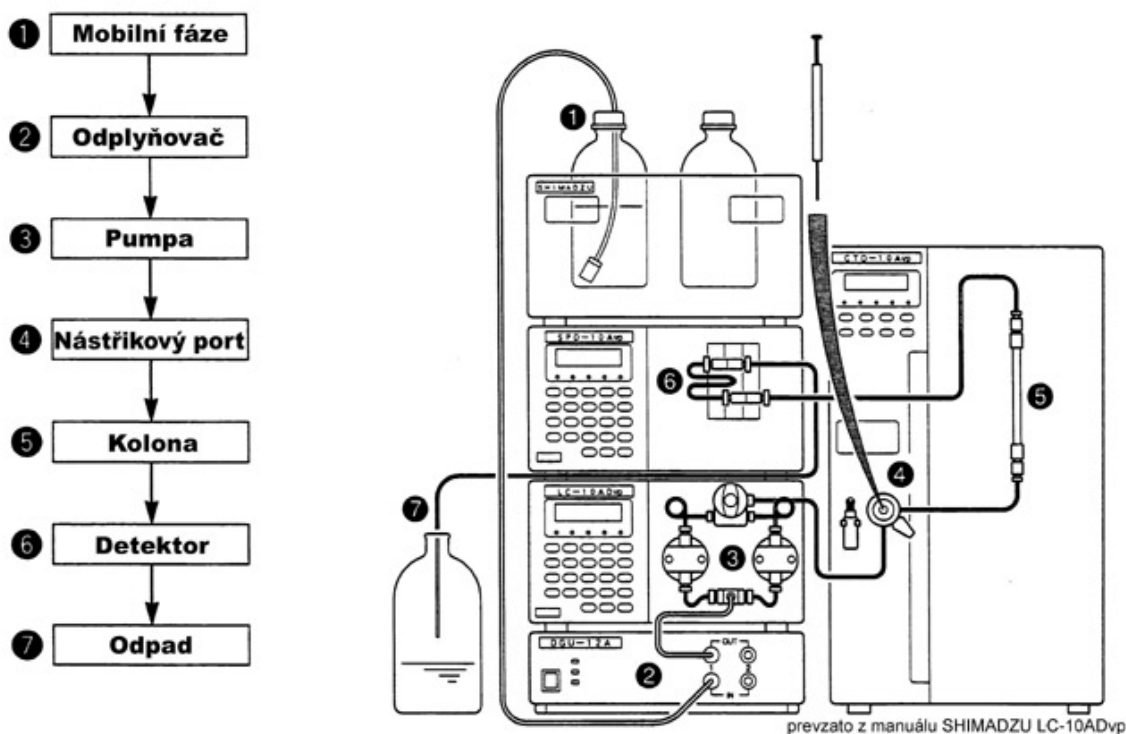
### 3.3 RP-HPLC

V současné době se používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC). Jako výhodou HPLC lze uvést především širokou oblast použitelnosti. Touto metodou lze analyzovat ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární látky (cca 80 % veškerých známých látek lze analyzovat metodou HPLC). Mezi další výhodou patří možnost ovlivňovat separaci složením mobilní fáze, která na rozdíl od GC není inertní, ale významně se podílí na separaci. Kromě analýzy lze HPLC použít také k preparacím. Jedinou nevýhodou ve srovnání s GC je náročnější instrumentace a složitější mechanismus separace [49,50].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie dělí látky ve dvoufázovém dělicím systému na základě adsorpce, výměny iontů, fyzikální distribuce látek mezi kapalnou mobilní fází a sní nemísitelnou kapalnou stacionární fází, nebo na principu pronikání molekul z mobilní fáze do pórů tuhých částic, které mají funkci molekulového síta. Účinnost chromatografických kolon je vysoká, dosahuje i několika set tisíc pater destilační kolony. HPLC pracuje s úzkými ocelovými, skleněnými nebo křemennými kolonami, které obsahují nosné částice ( $< 5 \mu\text{m}$ ) se stacionární fází. Průtok mobilní fáze probíhá obvykle pod tlakem 0,1 – 40 MPa. Vysokotlaká HPLC vyžaduje speciální ventil s dávkovací smyčkou, dnes už jsou běžné autosamplery, které lze vybavit termostatováním vzorků. Moderní přístroje využívají obvykle dvě pulzní pístová čerpadla, jejichž činnost je fázově posunuta a pohybují se tak, aby došlo k maximálnímu potlačení pulzace toku mobilní fáze. Eluční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky a eluční objem je objem proteklý za tuto dobu. Na výstupu u kolony je připojen detektor UV-VIS, detektor diodového pole (DAD), fluorimetrický, příp. elektrochemický, kde se sleduje coulometricky oxido-redukční reakce stanovovaných látek na pracovní elektrodě. Dále se používají RID (Refractive Index Detector) nebo MS. Jako detektor lze také použít již zmíněný hmotnostní spektrometr, což je analyticky vynikající, ale technicky náročné řešení, protože je nutné propojit vysokotlakou HPLC část s hmotnostním spektrometrem, kde je naopak vysoké vakuum. Pokud po celou dobu analýzy je složení mobilní fáze stejné a nemění se ani její

průtok, potom hovoříme o eluci izokratické. Pokud se však složení mobilní fáze a mnohdy i její průtok mění v čase analýzy, potom se hovoří a tzv. gradientové eluci [51,52].

### Blokové schéma HPLC



Obr. 3 Blokové schéma HPLC [53]

### 3.4 Instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii

Přístroje pro kapalinovou chromatografii se nazývají kapalinové chromatografy. Skládají se ze zařízení pro odplynění mobilní fáze, z vysokotlakých čerpadel, která zabezpečují transport mobilní fáze kolonou, dávkovače vzorků, chromatografické kolony, kde se složky vzorku separují a detektoru, poskytujícího elektrický signál při průchodu separovaných látek jako odezvu úměrnou změně sledované vlastnosti eluátu, který vytéká z kolony.

Separční kolona je zpravidla umístěna v termobloku, kdy lze separaci složek analytu ovlivnit i teplotou. Přístroj je napojen na zařízení pro záznam a ukládání signálu detektoru, vyhodnocování chromatografů a zpracování chromatografických dat. Časová závislost elektrického signálu se po úpravě zaznamená jako chromatogram pomocí integrátoru či počítače s analogově – digitálním převodníkem a sběrnici dat, kde se signál automaticky vyhodnocuje a zpracovává pomocí chromatografického softwaru (chromatografické datové stanice). Píky separovaných látek využíváme k jejich identifikaci, každá složka analytu

v dané metodě má svůj typický retenční čas (ukazatel kvalitativní), plocha píku je úměrná koncentraci této složky (ukazatel kvantitativní) [54,55].

### 3.4.1 Zařízení pro odplynění mobilní fáze

Mobilní fázi je třeba odplynit, aby po uvolnění tlaku v koloně nebo na výstupu kolony nedocházelo k uvolnění rozpuštěných plynů. Mobilní fázi lze odplyňovat ultrazvukem, probubláváním heliem, pomocí vakua (vakuové odplynění a vakuová filtrace) a ohřevu. Dnes se pro odplynění používají hlavně degaséry. Tyto metody lze použít samostatně nebo v kombinaci [56].

### 3.4.2 Čerpadlo

Kapalina se běžně čerpá do kolony pístovými nebo membránovými čerpadly. Použit lze také pneumatická čerpadla nebo čerpadla injekčního typu. Čerpadla musí být především vysokotlaká (kolony s velikostí částic okolo 2,5 – 10  $\mu\text{m}$  a menší kladou velký odpor průtoku mobilní fáze a k dosažení optimálních průtoků jsou nutné vysoké vstupní tlaky, až desítky MPa). Průtok musí být stálý, reprodukovatelný a bez pulzů. Kvalitní čerpadlo dosahuje průtoku v rozsahu od mikrolitrů do mililitrů za minutu s méně než 1% kolísáním průtoku. Materiál čerpadla (nerezová ocel, keramika, plast) nesmí být narušován agresivní mobilní fází a ta je nesmí nijak ovlivňovat. Ventily, které řídí tok eluentu, jsou obvykle vyrobeny z pryže nebo safíru. Jsou používána čerpadla dvojčinná, v sérii zapojená čerpadla nebo čerpadla využívající dvou nebo více pístů. Řízení čerpadla mikroprocesorem umožňuje vyhlazení tlakových pulzů [47,49,54,57,58].

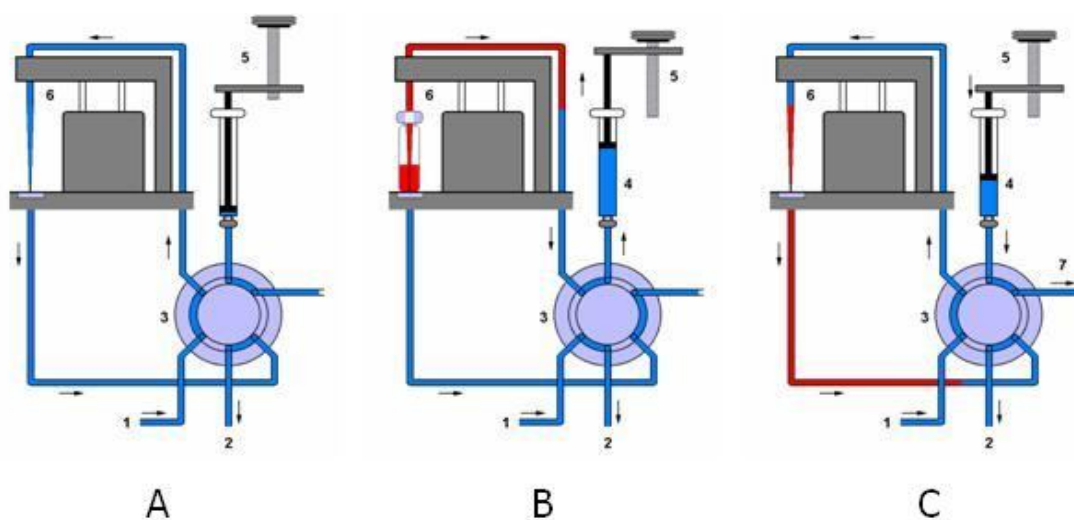
### 3.4.3 Směšovací zařízení

Slouží k řízení složení mobilní fáze. Její složení může zůstat stálé (izokratická eluce) nebo se během separace mění (gradientová eluce). Naprogramované směšovací zařízení může s využitím zásobníků různých kapalin připravovat směs kapalin stálého složení nebo řídit změny ve složení výsledné mobilní fáze v průběhu celé doby separace [56].

### 3.4.4 Dávkování vzorků

Dávkování lze provádět injekční stříkačkou, to však přináší nevýhody z hlediska těsnosti, udržení tlaku a především vnášení stop materiálu injekční stříkačky. Jestliže je použito injekčních zařízení, musí být zhotovena z inertních materiálů (nerezová ocel, titan, některé polymery). Injekční zařízení může být ovládáno buď ručně nebo automaticky (autosample-

ry). Byly vyvinuty další techniky označované jako dávkování při zastavení toku (stop-flow injection). Injekční dávkování se v nich provádí za běžného tlaku při přerušení toku eluentu. V současné době bývají injekční systémy nahrazeny dávkováním obtokovým dávkovacím kohoutem. Dávkovací smyčka má objem cca 5 až 50  $\mu\text{l}$ . Smyčka je připojena na kohout a plněna pomocí injekční stříkačky. Dávkování je reprodukovatelné a lze je snadno automatizovat. Nejnovější přístroje obsahují vestavené autosamplery, které jsou spojené se zásobníkem vzorku, v němž jsou uloženy vialky uzavřené septem [56].



Obr. 4 Princip dávkování autosampleru Agilent [57]

A - separace - mobilní fáze kontinuálně protéká z čerpadla (1) přes šesticestný ventil (3) a dávkovací jednotkou (6) na chromatografickou kolonu (2). Tímto je zajištěn kontinuální oplach jehly. B - plnění jehly vzorkem - po přepnutí ventilu dochází k naplnění jehly (smyčky) na požadovaný objem přes krokový motor (5), který ovládá píst injekční stříkačky dávkovače (4). C - dávkování vzorku - po opětovném přepnutí ventilu (6) je proudem mobilní fáze vzorek vytlačen na kolonu (2), jednotka se dostane do stavu (A) a současně dojde k vyprázdnění injekční stříkačky dávkovače do odpadu (7).

### 3.4.5 Kolony

Kolony pro HPLC používáme pouze náplňové. Pro většinu běžných analýz bývají kolony zhotoveny z nerezové oceli, někdy mohou být skleněné nebo plastové. Kolony pro analytické využití bývají poměrně krátké (zpravidla 5 – 25 cm). Vnitřní průměr je 2 – 4,6 mm. Běžný průtok eluentu je 0,5 – 2 ml za minutu. Pro rychlé separace, stačí-li účinnost do 4000 teoretických pater, postačují krátké analytické kolony délky jen 3 cm. Jsou levněj-

ší a potřebují malé množství mobilní fáze. Objemový průtok eluentu je 4 ml za minutu. Náplňový materiál pro analytické kolony má velikost částic stacionární fáze 2,5 až 5  $\mu\text{m}$  (kratší kolony jsou plněny jemnější náplní). Kolony s velmi malým vnitřním průměrem mají vnitřní průměr 1 – 2 mm a délku 25 – 50 cm. Mají vysokou účinnost, jsou levnější a spotřebují málo rozpouštědla (10 – 100  $\mu\text{l}$  za minutu) [47,48,49,58].

Nejčastěji používané HPLC kolony jsou na bázi silikagelu s chemicky vázanou fází  $\text{C}_{18}$  popř.  $\text{C}_8$ . Pro zlepšení separace je nutné upravovat pH mobilní fáze, aby se potlačila disociace molekul separovaných látek. Při hodnotách pH 7,5 a vyšších (u moderních typů nosičů až při pH 10) dochází k rozpuštění a destabilizaci silikagelové matrice. Při pH 3 a nižším může docházet k jeho hydrolyze. Pokud je nutné použít mobilní fáze s hodnotou pH mimo doporučené rozmezí, je lépe se těmto kolonám vyhnout a použít jiné náhradní nosiče. V současné době to mohou být hlavně kolony na bázi oxidu zirkoničitého ( $\text{ZrO}_2$ ) s nepolárními stacionárními fázemi jako je Discovery Zr-PS (zesíťovaný polystyren), Discovery Zr-PBD (zesíťovaný polybutadien), Discovery Zr-Carbon (souvislá vrstva uhlíku) nebo Discovery Zr-Carbon $\text{C}_{18}$  (souvislá vrstva uhlíku, která je poté modifikovaná kovalentně vázanými oktadecylovými skupinami). Kolony Discovery Zr jsou na rozdíl od silikagelových stabilní v celém rozsahu hodnot pH, navíc jsou tepelně stabilní až do 100  $^{\circ}\text{C}$  a při speciální úpravě pláště kolony a těsnění dokonce až 150  $^{\circ}\text{C}$  popř. 200  $^{\circ}\text{C}$ . Zatímco silikagel je tepelně stabilní do teplot 60 – 70  $^{\circ}\text{C}$  [60,61].

Pro separace v mobilních fázích s vysokým obsahem vody se osvědčily např. stacionární fáze s alkylovým řetězcem s vloženou polární skupinou, materiály s fluorovanými alkylovými a arylovanými skupinami, a nebo např. fáze obsahující polyetylen glykol. Tyto alternativní sorbenty mají ve srovnání s fází oktadecylovanou ( $\text{C}_{18}$ ) jinou selektivitu, což se vhodně využívá při dělení analytů, které nelze separovat na běžných oktadecylových fázích [62].

### 3.4.6 Detektory

Signál detektoru by měl být stabilní a reprodukovatelný, lineárně závislý na koncentraci v co nejširším záběru (měl by mít široký lineární dynamický rozsah), citlivost (směrnice závislosti odezvy na koncentraci) by měla být co největší, mez detekce (obvykle se vyjadřuje jako koncentrace látky, která způsobí signál, jenž je určitým násobkem průměrné hodnoty šumu – dvojnásobkem až čtyřnásobkem) co nejnižší. Signál by měl mít šum co nejmenší a neobsahovat drift (pomalý únik nulové linie). K detekci se využívá analytic-

ká vlastnost systému, která je ve známém a reprodukovatelném vztahu ke koncentraci analytu. HPLC využívá zejména tyto typy detektorů: spektrofotometrický (UV-VIS), fluorescenční detektor, hmotnostní spektrometr, refraktometrický detektor, elektrochemický a další. Nejčastěji používaným detektorem je detektor spektrofotometrický (UV-VIS) a fluorescenční. Pokud analyt sám o sobě neabsorbuje záření v UV-VIS nebo neemituje fluorescenční záření, je použití těchto detektorů podmíněno derivatizací vzorku (vzorek je chemickou reakcí převeden na sloučeniny, které mají potřebné vlastnosti – absorpce UV-VIS, fluorescence). V současnosti je také používán detektor s diodovým polem (DAD – photoDiode Array Detector), který umožňuje snímat UV-VIS spektrum každé látky v separované směsi v nastaveném rozsahu vlnových délek. Hmotnostní spektrometr lze použít jako detektor umožňující kromě běžné registrace zón látek eluovaných z kolony umožnit také jejich identifikaci na základě zaznamenaného hmotnostního spektra. Refraktometrické detektory se řadí mezi univerzální detektory. Měří se rozdíl indexů lomu solutu v mobilní fázi proti mobilní fázi. Tyto rozdíly jsou ale malé, takže refraktometrický detektor je málo citlivý [47,49,50,63,64].

## 4 VSTUPNÍ KONTROLA A ZÁKLADNÍ PARAMETRY PŘI PŘÍJMU SYROVÉHO MLÉKA

Při příjmu mléka dochází k přejímce jak kvantitativní, tak kvalitativní. Přejímka mléka začíná již při odběru mléka z prvovýroby. Pracovník pověřený svozem mléka na místě zjišťuje množství, teplotu a kyselost pomocí lakmusového papírku. Zároveň u prvovýrobce odebírá 2 vzorky pro další kontrolu (jeden na mikrobiální kontrolu a druhý na analytickou). Další kontrola probíhá v mlékárně, kde se kontroluje opět množství, teplota, titrační kyselost a přítomnost inhibičních látek (např. pomocí Delvotestu). Následuje vypuštění cisterny, za současného odebírání vzorku vzorkovacím zařízením, které je umístěno na příjmovém potrubí a lze u něj nastavit rychlost odkapávání (tzv. cisternový vzorek) [15, 65, 66].

Pracovník svozu odevzdá odebrané vzorky od jednotlivých prvovýrobců v mlékárně. Vzorky z jednotlivých farem i cisternové vzorky jsou po předchozím nahřátí na 42 °C podrobeny analýze na MilkoScanu, který kontroluje obsah bílkovin, tuku, laktózy, sušiny a tukuprosté sušiny. Vzorky určené k mikrobiologickému rozboru jsou podrobeny vyšetření na počet somatických buněk a celkový počet mikroorganismů.

Kromě vstupní kontroly v mlékárně probíhá souběžně stanovení v referenční laboratoři. Výsledky z této laboratoře slouží k hodnocení kvality dodaného mléka a klasifikaci jakosti dodaného mléka. Zároveň slouží pro kontrolu správnosti stanovení v laboratoři mlékárny. V této referenční laboratoři je mléko podrobena několika analýzám. Zjišťuje se obsah tuku, bílkovin, laktózy, sušina, tukuprostá sušina, navíc obsah kaseinu a močoviny a stanovení bodu mrznutí [67, 68].

Z mikrobiologického hlediska se stanovuje SOM (počet somatických buněk) a CPM (celkový počet mikroorganismů). Předmětem zpeněžení mléka bývá kromě mikrobiologického hlediska (třída jakosti – třída Q, I, II a III) nejčastěji obsah bílkovin a obsah tuku. Každá mlékárna má však vlastní systém zpeněžování mléka. Vykupuje i mléko s nestandardním složením, avšak v smlouvě jsou uvedeny rozmezí pro příplatky nebo případné srážky. Vyloučeno je mléko obsahující RIL (rezidua inhibičních látek) nebo mléko s nevyhovující kyselostí. Minimální obsah tuku je dle ČSN 570509 33 g.l<sup>-1</sup>, obsah bílkovin min. 28 g.l<sup>-1</sup> a obsah tukuprosté sušiny min. 8,5 %. Obsah SOM < 400 000.1 ml<sup>-1</sup> a obsah CPM < 100 000 KTJ.1 ml<sup>-1</sup> (kolonie tvořící jednotky) [15,65,66,67,68].



## 4.1 Analýza pomocí přístroje MilkoScan

Hlavními součástmi MilkoScanu FT 120 jsou: vibrační pipeta, výměník tepla, homogениzátor, kyveta, peristaltické čerpadlo, sběrná nádoba pro odpad s čidlem hladiny přeplnění, zásobníky kapaliny pro čištění a nastavení nuly s čidlem pro spodní hladinu a interferometr [67].

### Princip interferometrie

Podle interference světla, kterou se mění amplituda signálu jako funkce rozdílu délky dráhy mezi dvěma interferujícími zdroji, zaznamená interferometr intenzitu světla zachyceného detektorem jak funkci rozdílu drah, vytvořením otáčením pohyblivého zrcadla. Měření nepatrného posunu tohoto zrcadla se provádí pomocí laserového paprsku, který sleduje stejnou dráhu jako IR paprsek. Infračervený paprsek z IR zdroje dopadá na dělič paprsku, který paprsek rozděluje na polovinu. První polovina dopadá na pevné zrcadlo a druhá na pohyblivé zrcadlo. IR paprsky se odráží od zrcadel a než dosáhnou detektoru, tak se rekombinují. Všechny IR frekvence procházejí interferometrem ve stejnou dobu a rychlé malé změny zrcadla umožňují vyvolat současně celé IR spektrum [67,68,69].

Princip Fourierovy transformace vychází z toho, že každá periodická funkce může být rozložena do souboru sinusových funkcí, přičemž každá sinusová funkce je určena dvěma hodnotami, a to její frekvencí (vlnovou délkou) a její amplitudou (intenzitou). Jde o matematický postup, který umožňuje rozložit interferogram do souboru sinusových funkcí, z nichž každá reprezentuje určitou vlnu. Její frekvence a amplituda se vypočítá z údajů interferogramu. V několika sekundách je spektrometrem získán interferogram, který je pak rozpracován Fourierovou transformací a převeden na celé spektrum vzorku. Odtud pokračuje postup na bázi obecné teorie spektrometrie, intenzity světla, transmitance, absorbance a jejich rozsahu k složení komponent určitého vzorku [67,68,69].

## 4.2 Další možnosti stanovení základních složek mléka

Kromě infračervené spektrometrie se v mlékárnách využívá i řada dalších, převážně provozních metod pro zjištění obsahu základních složek mléka. Pro stanovení některých hodnot lze využít i výpočtu.

Ke stanovení sušiny lze využít vázkové (rozhodčí metody), která spočívá ve vysušení vzorku při teplotě  $102 \pm 2$  °C do konstantní hmotnosti. Jako provozní metodu lze použít

výpočet z hustoty a obsahu tuku, kdy sušina je podíl všech složek mléka zjištěný výpočtem z hustoty stanovené laktodenzimetry a obsahu tuku stanoveného acidobutyrometry. Výpočtem lze také zjistit tukuprostou sušinu mléka, což je beztukový podíl mléčné sušiny. K výpočtu je třeba znát buď obsah celkové sušiny a obsah tuku nebo obsah tuku a měrnou hmotnost ( $L_{20}$  – laktodenzimetrické číslo) [66].

Provozní metodou pro stanovení tuku je acidobutyrometrická metoda. Její princip spočívá v rozpuštění bílkovin kyselinou sírovou s přidavkem amylalkoholu s následným odstředěním a oddělením tukové vrstvy. Obsah tuku se odečítá přímo na butyrometru. Rozhodčí metodou je metoda gravimetrická podle Röse-Gottlieba, při které se bílkoviny rozpouští amoniakem a za přidavku etanolu se extrahuje tuk směsí dietyléteru a petroléteru, pak se zváží množství tuku. Mezi instrumentální metody lze také zařadit metodu turbidimetrickou, jež spočívá v turbidimetrickém měření zákalu tukových kuliček homogenizovaného mléka ředěného vhodným rozpouštědlem [65,66].

Pro stanovení obsahu bílkovin v mléce je referenční metodou stanovení podle Kjeldahla, tato metoda spočívá v mineralizaci vzorku koncentrovanou kyselinou sírovou a následným stanovením obsahu dusíku ve zmineralizovaném vzorku a přepočtem na obsah bílkovin (koeficient 6,38). Jako instrumentální metody lze využít kromě infračervené spektrometrie také spektrofotometrii nebo metody s využitím iontově selektivní elektrody. Spektrofotometrická metoda využívá schopnosti bílkovin mléka vázat barvivo (amidočern 10B), jehož úbytek je úměrný obsahu bílkovin [65,68].

Koncentrace laktózy lze vypočítat z velikosti úhlu stočení roviny polarizovaného světla. Obsah laktózy se stanovuje po filtraci z vyčeřeného mléka polarimetrem se sodíkovým spektrem [66,68].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍL PRÁCE

Cílem praktické části této práce bylo odebrat reprezentativní vzorky mléka z pěti svozných linek z Olomouckého kraje. Mezi dané vzorky zařadit i svoznou linku s bio mlékem.

U těchto odebraných vzorků stanovit obsah bílkovin, tuku, laktózy, celkové sušiny a tukuprosté sušiny pomocí přístroje MilkoScan FT 120, který pracuje na principu absorpční infračervené spektrometrie. Tento přístroj je přítomen v příjmové laboratoři mlékárny.

Dále pak u odebraných vzorků stanovit obsah vitamínu D kapalinovou chromatografií po zmýdelnění za tepla pomocí  $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$  etanolického roztoku hydroxidu draselného a extrakcí pomocí n-hexanu. Samotnou analýzu provést za pomoci přístroje HPLC Dionex Ultimate 3000 s použitím reverzní fáze v analytické laboratoři UTB. Formulovat a zpracovat výsledky práce.

## 6 METODIKA

Metodika pro stanovení vitamínu D byla propracována na základě diplomové práce studentky Vandy Stránské, která ve své práci uveřejnila optimální způsob přípravy vzorku pro HPLC analýzu v podmínkách analytické laboratoře FT-UTB. Na základě této práce bylo zvoleno zmýdelnění za tepla pomocí  $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$  etanolickeho roztoku hydroxidu draselneho, který na rozdíl od vodného a metanolickeho roztoku hydroxidu draselneho následně umožňoval optimální extrakci pomocí n-hexanu. Samotná analýza však probíhala na novějším chromatografu HPLC Dionex Ultimate 3000 [70].

Stanovení ostatních základních složek mléka bylo provedeno na přístroji MilkoScan FT 120, který pracuje na principu absorpční infračervené spektrometrie.

### 6.1 Chemikálie

Stanovení vitamínu D:

Hydroxid draselny (Ing. Petr Lukeš, Osvoboditelů 1815, Uherský Brod, ČR)

Etanol (Ing. Petr Lukeš, Osvoboditelů 1815, Uherský Brod, ČR)

Kyselina askorbová (Ing. Petr Lukeš, Osvoboditelů 1815, Uherský Brod, ČR)

n-hexan (Ing. Petr Lukeš, Osvoboditelů 1815, Uherský Brod, ČR)

Metanol (Fischer Scientific)

Stanovení základních složek mléka:

Čistící přípravek S-470, FOSS Analytical A/S, Hillerod, Dánsko

Liquid concentrate S-6060 - nulovací roztok, FOSS Analytical A/S, Hillerod, Dánsko

FTIR Equalizer – kalibrační roztok, FOSS Analytical A/S, Hillerod, Dánsko

Dichroman draselny (Ing. Petr Lukeš, Osvoboditelů 1815, Uherský Brod, ČR)

### 6.2 Pomůcky a přístroje

Stanovení vitamínu D:

Analytické váhy Adam (AFA – 210 LC, Schoeller instruments)

Ultrazvuková vodní lázeň Powersonic PS 04000A (Notus – Powersonic, Vráble, SR)

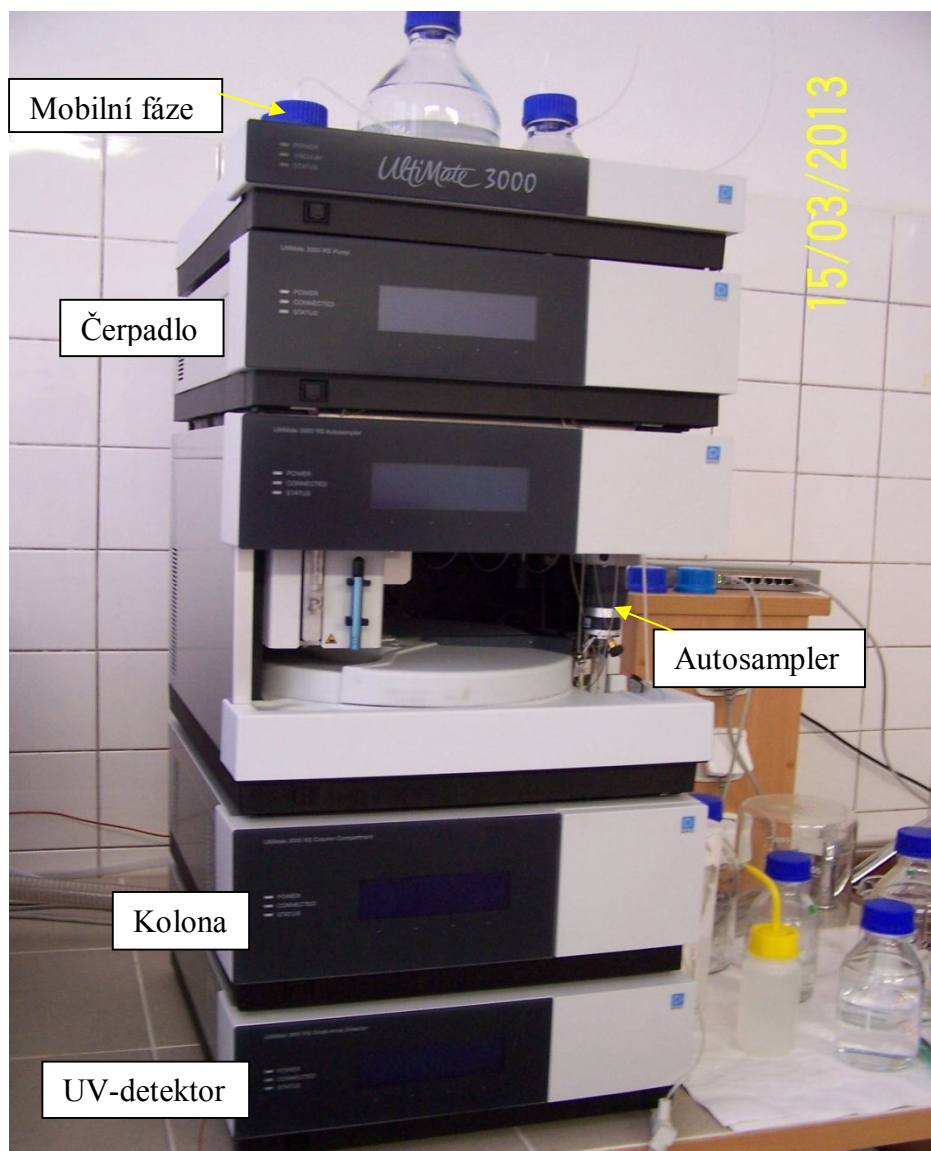
Filtry LUT Syringe filters Nylon (průměr 13 mm, velikost pórů  $0,45 \mu\text{m}$ )

HPLC Dionex Ultimate 3000

Kolona Discovery C<sub>18</sub>, velikost částic 5 μm, průměr 4,6 mm, délka 25 cm

Detektor DAD UV-VIS

Software HyStar Post Processing



Obr. 5 Chromatograf Dionex Ultimate 3000

Stanovení základních složek mléka:

MilkoScan FT 120, Foss electric, Dánsko



Obr. 6 MilkoScan FT 120, Foss electric

### 6.3 Vzorky syrového mléka

Pro analýzu byly vybrány vzorky syrového kravského mléka z pěti svozných linek (č. 6, 7, 8, 9 a 30) v Olomouckém kraji. Svozné linky svázely 18 000 – 25 000 l mléka. Svozné linky byly směsné z více farem, z toho jedna linka (č. 30) obsahovala mléko v bio kvalitě. Po kontaktování jednotlivých farem bylo zjištěno, že dojnice, jejichž mléko pocházelo ze svozů č. 6, 7, 8 a 30 (bio), jsou od října do dubna umístěny v uzavřené stáji. Jedna farma ze svozné linky 9 měla uzpůsobený chov dojnic tak, že jim byl umožněn pohyb na volném prostranství, druhá farma ze stejné svozné linky měla dojnice opět v uzavřené stáji. Poměr mléka z obou farem z linky č. 9 byl v poměru 2 : 1 (ve prospěch farmy s venkovním pohybem).

#### Odběr vzorků pro chemické analýzy

Vzorky byly odebrány pomocí vzorkovacího zařízení, které je umístěno na příjmovém vypouštěcím potrubí mléka, kde po celou dobu čerpání mléka odkapává, v nastavených intervalech, část přijímaného mléka. Během jedné hodiny čerpání (25 000 l) je možné odebrat 100 až 1000 ml. Vzorkovací zařízení bylo poměrně zastaralé a nebyla k němu nalezena kvalitní dokumentace. Odběr spočíval v otevření ventilu a nastavení velikosti jeho otvoru v rozmezí 0 – 100 (hodnoty nemají žádnou jednotku, jde pouze o rozpětí min. a max.), přičemž nejnižší hodnota umožňovala největší průtok (přibližně 1000 ml z 25 000 l) a hodnota blízká se hranici 100 znamenala nejnižší možný odběr (přibližně 100 ml z 25 000 l). Odebrané množství zároveň závisí na vypouštěném objemu mléka. Vzhledem ke kombinaci množství vypouštěného mléka a vhodného nastavení otvoru ve vzorkovacím ventilu, je nastavení závislé především na zkušenostech obsluhy. Pro běžné každodenní stanovení je

dostačující množství 100 ml, pro účely této práce bylo odebráno přibližně 500 ml syrového mléka.

Část vzorků (přibližně 40 – 50 ml) byla podrobena analýze na přístroji MilkoScan FT 120, zbytek vzorků byl uchován v neprůhledných lahvích v lednici a do 24 hodin převezen do laboratoře v chladicí tašce tak, aby teplota nepřesáhla 8 °C. Poté byly vzorky ihned zpracovávány pro následné chromatografické stanovení vitamínu D.

#### **6.4 Příprava a měření vzorků pomocí MilkoScanu**

Cisternové vzorky odebrané vzorkovacím zařízením, byly uloženy do vodní lázně, kde došlo k zahřátí na 42 °C. Přístroj byl uveden do chodu po zapnutí a nastavení nuly (pomocí roztoku S-6060, se kterým provedl přístroj 5 měření). Následně proběhla kalibrace pomocí tzv. pilotních vzorků, které jsou uchovány v lednici a konzervovány dichromanem draselným. Jednou měsíčně je také prováděna kalibrace pomocí FTIR Equilizer. Po nahřátí a homogenizaci promícháním byly vzorky podrobeny vlastní analýze na MilkoScanu. Analýza probíhá u každého vzorku v praxi pouze dvakrát a výsledkem je průměr z těchto stanovení. Výsledky byly odečteny za použití softwaru Windows Menu bar a následně vytisknuty.

#### **6.5 Příprava a zpracování vzorků ke stanovení vitamínu D**

##### **6.5.1 Příprava vzorků**

Vzorky byly umístěny do třepací vodní lázně o teplotě 45 °C, aby došlo k homogenizaci syrového mléka, zejména k rovnoměrnému rozptýlení tuku v celém objemu vzorku. U každého vzorku probíhalo duplicitní stanovení, výsledkem pak byl průměr těchto souběžných stanovení.

##### **6.5.2 Příprava etanolického roztoku hydroxidu draselného**

Pro dané množství vzorků bylo třeba 600 ml 1,9 mol.dm<sup>-3</sup> etanolického roztoku hydroxidu draselného. Aby byla vytvořena rezerva, bylo namícháno 700 ml, a to ve dvou odměrných baňkách na 500 ml a 200 ml. Vypočítané množství pevného hydroxidu draselného bylo převedeno do kádinky s etanolem a mícháno do rozpuštění pomocí magnetického míchadla. Po rozpuštění byl roztok kvantitativně převeden do odměrné baňky a doplněn etanolem po rysku.



### 6.5.3 Zmýdelnění

Ke stanovení bylo odpipetováno vždy po 30 ml syrového promíchaného mléka do lékovek z tmavého skla. K nim bylo přidáno 30 ml  $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$  etanolickeho roztoku hydroxidu draselného a malé množství sytké kyseliny L-askorbové, aby se zabránilo případné oxidaci vitamínu D. Lékovky byly umístěny do ultrazvukové lázně po dobu 2 hodin, kde probíhalo zmýdelnění při teplotě  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po uplynutí dvou hodin, byly vzorky umístěny do vodní lázně, kde byly zchlazeny.

### 6.5.4 Extrakce

K extrakci bylo použito nepolární rozpouštědlo n-hexan. Vychlazený zmýdelněný vzorek byl kvantitativně převeden do dělicí nálevky spolu se 30 ml n-hexanu. Dělicí nálevkou bylo intenzivně třepáno přibližně 2 minuty, následně byla ponechána v klidu až do rozdělení obou fází (přibližně 5 – 7 minut). Spodní zmýdelněná část byla oddělena do kádinky a po té opět kvantitativně převedena do dělicí nálevky, tentokrát již jen s 20 ml n-hexanu. Odloučená n-hexanová část byla slita do baňky s kulatým dnem. Dělicí nálevkou bylo opět třepáno asi 2 minuty, po ponechání v klidu opět došlo k oddělení vrstev. Spodní vrstva byla odpuštěna, vrstva s n-hexanem byla spojena s prvním odloučeným podílem, který již byl v baňce s kulatým dnem. Po odpaření rozpouštědla byly odparky rozpuštěny v 5 ml metanolu a přefiltrovány přes nylonový filtr o velikosti pórů  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$  do tmavých vialek.

### 6.5.5 Chromatografické stanovení vitamínu D<sub>3</sub>

Separace probíhala na kapalinovém chromatografu Ultimate 3000 firmy Dionex, za použití kolony s reverzní fází Discovery C<sub>18</sub> (4,6 mm x 25 cm, 5  $\mu\text{m}$ ). Mobilní fáze byla složena z metanolu a redestilované vody v poměru 95 : 5. Stanovení probíhalo v izokratickém režimu, průtok mobilní fáze byl nastaven na  $1 \text{ ml.min}^{-1}$ , termostat kolony byl nastaven na  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Čas analýzy byl nastaven na 35 minut. Tlak se při zvoleném průtoku pohyboval kolem 17 MPa. Z každého extraktu vzorku byly provedeny dva nástřiky na kolonu a tyto poté vyhodnoceny. Detekce byla provedena pomocí detektoru diodového pole (DAD) při vlnové délce 254 nm.

### 6.5.6 Kalibrační křivka pro chromatografické stanovení vitamínu D

K přípravě kalibrační řady byl použit standard cholekalciferol. Bylo naváženo 0,01 g cholekalciferolu s přesností na 0,0001 g a kvantitativně byl převeden do odměrné baňky

na 10 ml, ta byla doplněna po rysku metanolem, čímž vznikl zásobní roztok o koncentraci  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Ten byl následně naředěn na pracovní roztok o koncentraci  $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Z tohoto zásobního roztoku byla postupně naředěna kalibrační řada roztoků o koncentracích 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 a  $5,0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Měření kalibrační řady roztoků proběhlo za shodných chromatografických podmínek jako měření vitamínu D v mléce. Odečet byl podveden u vlnové délky 254 nm.

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 7.1 Výsledky stanovení základních fyzikálně-chemických parametrů syrového mléka

Měření základních parametrů syrového mléka probíhalo na přístroji MilkoScan, který pracuje na principu infračervené spektrometrie. Výsledky měření základních složek mléka uvádí následující tabulky 7 - 17. Výsledky byly zpracovány v programu Microsoft Excel a Statistica 7.

Tabulka 7 Základní rozbor syrového mléka v závislosti na čase u svozné linky č. 6 [%]

Měsíc	Tuk	Bílkoviny	Laktóza	Sušina	TPS
říjen 2012	3,74	3,67	4,77	12,97	9,19
listopad 2012	3,92	3,42	4,8	12,93	8,95
prosinec 2012	4,07	3,58	4,81	13,24	9,12
leden 2013	3,87	3,36	4,86	12,88	8,94
únor 2013	4,04	3,55	4,88	13,29	9,15
březen 2013	3,94	3,47	4,92	13,13	9,11

Tabulka 8 Popisná statistika základních složek mléka u svozné linky č. 6 [%]

Složka	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm. odch.
Tuk	6	3,93	3,74	4,07	0,120
Bílkoviny	6	3,51	3,36	3,67	0,113
Laktóza	6	4,84	4,77	4,92	0,056
Sušina	6	13,07	12,88	13,29	0,171
TPS	6	9,08	8,94	9,19	0,106

Tabulka 9 Základní rozbor syrového mléka v závislosti na čase u svozné linky č. 7 [%]

Měsíc	Tuk	Bílkoviny	Laktóza	Sušina	TPS
říjen 2012	3,78	3,42	4,85	12,82	9,00
listopad 2012	3,7	3,31	4,89	12,66	8,91
prosinec 2012	3,75	3,26	4,87	12,61	8,85
leden 2013	3,58	3,24	4,88	12,47	8,84
únor 2013	3,68	3,24	4,97	12,65	8,92
březen 2013	3,57	3,21	4,95	12,49	8,87

Tabulka 10 Popisná statistika základních složek mléka u svozné linky č. 7 [%]

Složka	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm. odch.
Tuk	6	3,68	3,57	3,78	0,086
Bílkoviny	6	3,28	3,21	3,42	0,076
Laktóza	6	4,90	4,85	4,97	0,048
Sušina	6	12,62	12,47	12,82	0,128
TPS	6	8,90	8,84	9,00	0,059

Tabulka 11 Základní rozbor syrového mléka v závislosti na čase u svozné linky č. 8 [%]

Měsíc	Tuk	Bílkoviny	Laktóza	Sušina	TPS
říjen 2012	3,71	3,42	4,9	12,79	9,05
listopad 2012	3,79	3,36	4,88	12,82	8,99
prosinec 2012	3,72	3,34	4,86	12,67	8,92
leden 2013	3,95	3,55	4,89	13,2	9,17
únor 2013	3,7	3,28	4,89	12,66	8,89
březen 2013	3,71	3,27	4,96	12,71	8,95

Tabulka 12 Popisná statistika základních složek mléka u svozné linky č. 8 [%]

Složka	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm. odch.
Tuk	6	3,76	3,70	3,95	0,097
Bílkoviny	6	3,37	3,27	3,55	0,104
Laktóza	6	4,90	4,86	4,96	0,034
Sušina	6	12,81	12,66	13,20	0,202
TPS	6	9,00	8,89	9,17	0,102

Tabulka 13 Základní rozbor syrového mléka v závislosti na čase u svozné linky č. 9 [%]

Měsíc	Tuk	Bílkoviny	Laktóza	Sušina	TPS
říjen 2012	3,6	3,3	4,89	12,56	8,90
listopad 2012	3,86	3,31	4,87	12,82	8,91
prosinec 2012	3,92	3,35	4,86	12,87	8,93
leden 2013	3,7	3,26	4,9	12,63	8,87
únor 2013	3,91	3,33	4,87	12,9	8,92
březen 2013	4,12	3,4	4,86	13,18	8,98

Tabulka 14 Popisná statistika základních složek mléka u svozné linky č. 9 [%]

Složka	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm. odch.
Tuk	6	3,85	3,60	4,12	0,182
Bílkoviny	6	3,33	3,26	3,40	0,048
Laktóza	6	4,88	4,86	4,90	0,016
Sušina	6	12,83	12,56	13,18	0,220
TPS	6	8,92	8,87	8,98	0,037

Tabulka 15 Základní rozbor syrového mléka v závislosti na čase u svozné linky č. 30 [%]

Měsíc	Tuk	Bílkoviny	Laktóza	Sušina	TPS
říjen 2012	4,1	3,42	4,87	13,15	9,03
listopad 2012	4,17	3,41	4,81	13,19	8,97
prosinec 2012	4,3	3,43	4,78	13,28	8,93
leden 2013	4,09	3,35	4,83	13,06	8,79
únor 2013	4,12	3,4	4,86	13,18	8,98
březen 2013	4,05	3,42	4,84	13,13	8,99

Tabulka 16 Popisná statistika základních složek mléka u svozné linky č. 30 [%]

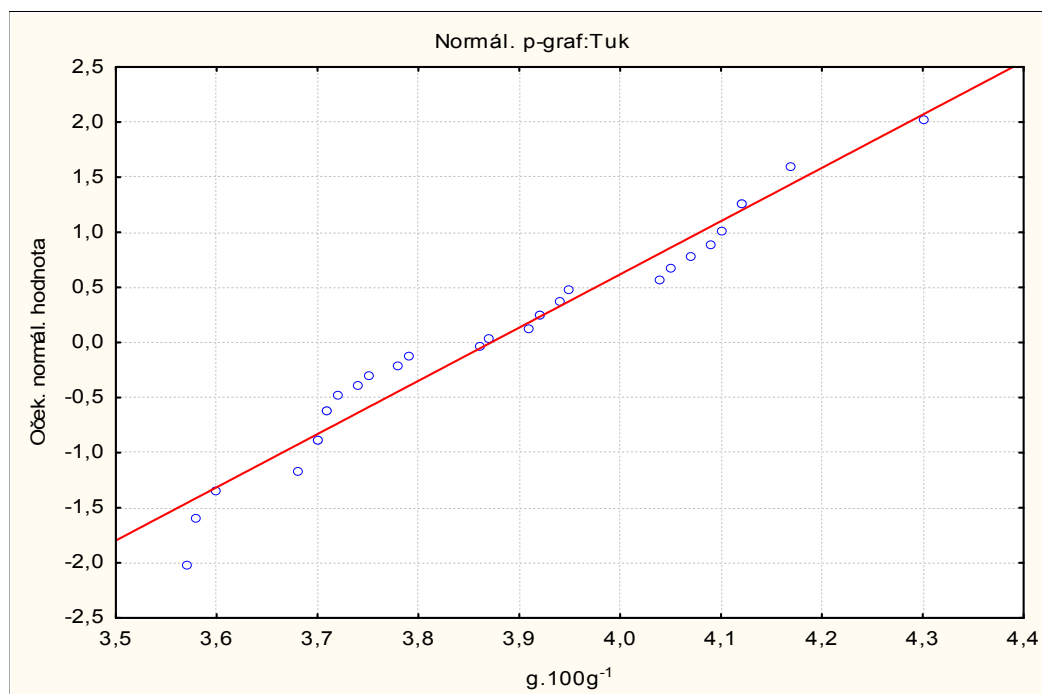
Složka	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm. odch.
Tuk	6	4,14	4,05	4,30	0,088
Bílkoviny	6	3,41	3,35	3,43	0,029
Laktóza	6	4,83	4,78	4,87	0,033
Sušina	6	13,17	13,06	13,28	0,073
TPS	6	8,95	8,79	9,03	0,084

### Společné vyhodnocení základních složek mléka

Tabulka 17 Souhrnná popisná statistika měření u všech svozných linek [%]

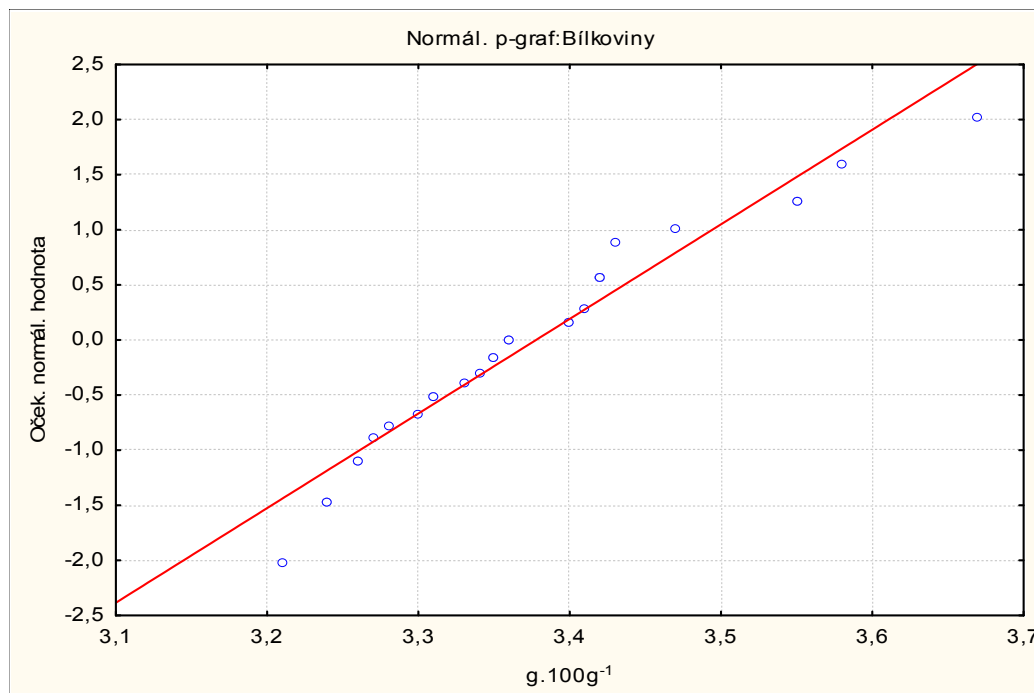
Složka	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm. odch.
Tuk	30	3,87	3,57	4,30	0,196
Bílkoviny	30	3,38	3,21	3,67	0,109
Laktóza	30	4,87	4,77	4,97	0,047
Sušina	30	12,90	12,47	13,29	0,254
TPS	30	8,97	8,79	9,19	0,100

U žádné ze složek mléka nebyla nalezena souvislost mezi obsahem složky v závislosti na měsíci odběru. Všechny složky byly naměřeny v hodnotách odpovídajících kvalitnímu syrovému kravskému mléku. Výsledky měření a statistické zpracování jednotlivých svozných linek je uvedeno v tabulkách 1 – 16, souhrnná statistika všech měření je uvedena v tabulce 17. Nejvyšší tučnost 4,3 % byla naměřena u svozné linky č. 30, rovněž nejvyšší průměrná tučnost 4,14 % za celé období byla u této svozné bio linky. U této jediné linky zároveň nepoklesla tučnost pod 4,05 % (viz. tab. 16). Běžná průměrná tučnost mléka se pohybuje v rozmezí 3,5 – 4,5 % [6], což splňují všechny odebrané vzorky. Grafické rozložení všech naměřených hodnot tučnosti je znázorněno na obr. 7.



Obr. 7 Grafické rozložení všech naměřených hodnot tučnosti

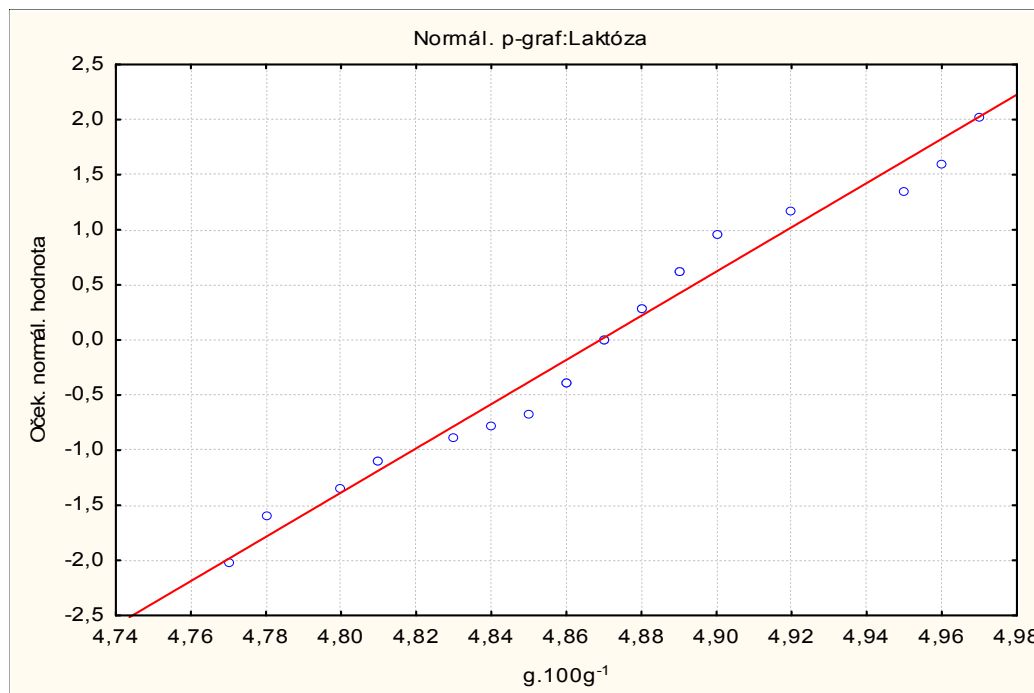
Průměrný obsah bílkovin všech vzorků byl  $3,38 \pm 0,109$  %. Nejvyšší obsah bílkovin 3,67 % byl naměřen v říjnu u svozné linky č. 6 (viz. Tab. 7), což je hodnota poměrně vysoká. Ostatní hodnoty všech vzorků odpovídají běžnému obsahu bílkovin v mléce, jejichž množství bývá uváděno mezi 3,2 – 3,6 % [19]. Grafické rozložení všech naměřených hodnot bílkovin je znázorněno na obr. 8.



Obr. 8 Grafické rozložení všech naměřených hodnot bílkovin

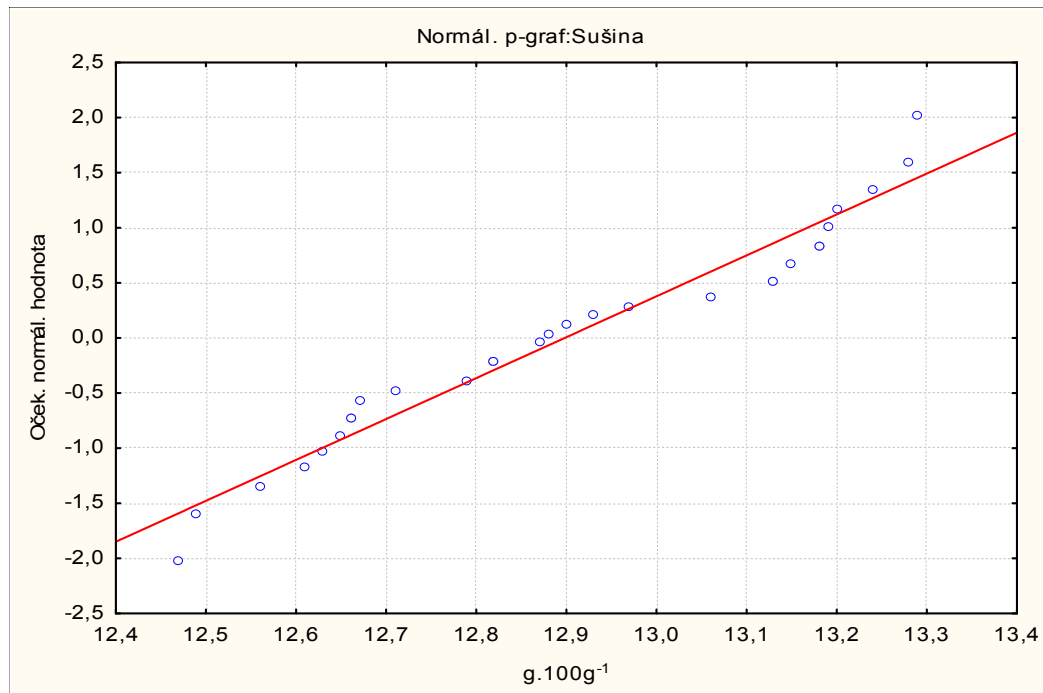
Průměrný obsah laktózy ve všech naměřených vzorcích byl  $4,87 \pm 0,047$  %. Množství laktózy bylo vyrovnané vzhledem ke svozným linkám i vzhledem k časovému období. Průměrný obsah laktózy v syrovém kravském mléce je nejčastěji uváděn v rozmezí 4,7 – 4,8 % [6,8]. Ve studii Hejtmánkové se však obsah laktózy v kravském mléce pohyboval v rozmezí 4,3 – 5,14 % [18]. Naměřené hodnoty jsou mírně nad uváděným průměrem. Hodnoty naměřené pomocí přístroje MilkoScan (jež pracuje na principu adsorpční infračervené spektrometrie) v laboratoři mlékárny a hodnoty naměřené na novějším typu MilkoScanu v Laboratoři pro rozbor mléka Brno – Tuřany, se však dlouhodobě shodují, tento rozdíl nelze tedy přisuzovat nepřesnosti měření. Obsah laktózy však nebývá předmětem zpeněžování syrového mléka. Grafické rozložení všech naměřených hodnot laktózy je znázorněno na obr. 9.





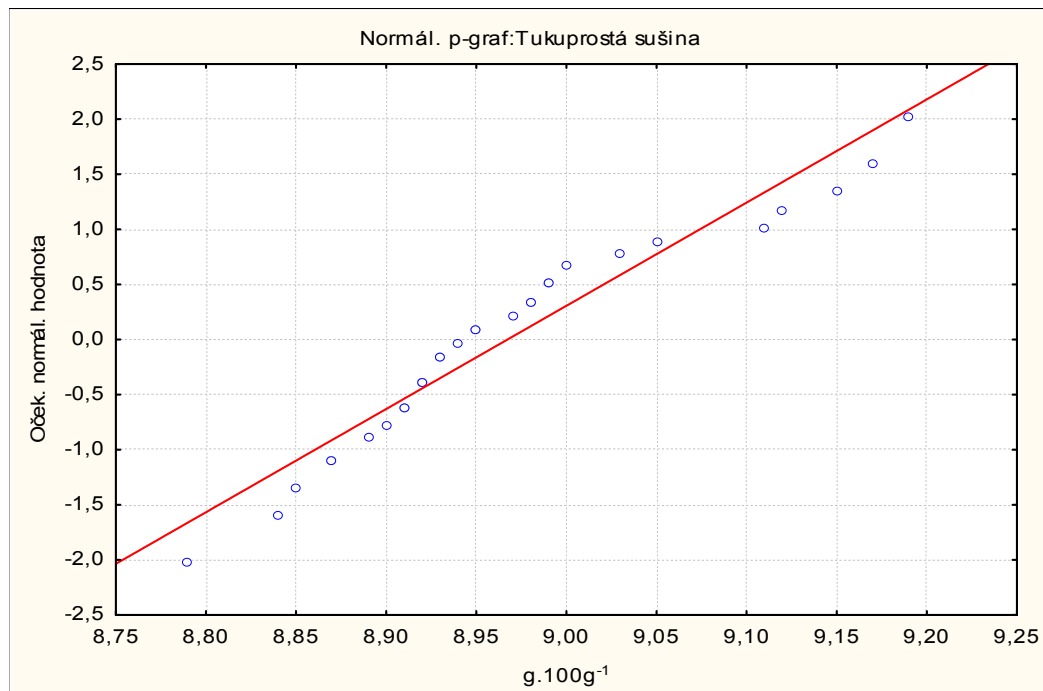
Obr. 9 Grafické rozložení všech naměřených hodnot laktózy

Obsah sušiny všech vzorků byl  $12,9 \pm 0,254$  %. Nejvyšší sušina 13,29 % a 13,28 % byla naměřena u linky č. 6, resp. linky č. 30. Tyto dvě svozné linky zároveň udržely průměrný obsah sušiny v celém zkoumaném období nad 13 %. Naopak nejnižší obsah sušiny 12,47 % byl analyzován u svozné linky č. 7 v lednu 2013, v celém období nedosáhla sušina této svozné linky hranice 13 %. Obsah sušiny v syrovém kravském mléce se uvádí v průměru 12,3 – 12,8 % [3,8]. Průměr naměřených hodnot se nacházel mírně nad běžně uváděným průměrem syrového kravského mléka, přičemž bylo naměřeno 10 hodnot z celkových 30, které vykazovaly sušinu vyšší než 13 %. Tyto hodnoty svědčí o vysoké kvalitě analyzovaného mléka a jsou úměrné vyššímu obsahu tuku. Grafické rozložení všech naměřených hodnot celkové sušiny je znázorněno na obr. 10.



Obr. 10 Grafické rozložení všech naměřených hodnot sušiny

U obsahu tukuprosté sušiny dle ČSN 570529 je dolní hranice 8,5 % [65]. Průměrný obsah tukuprosté sušiny ve všech analyzovaných vzorních byl  $8,97 \pm 0,10$  %. Tato hodnota je poměrně konstantní a příliš se nemění ani v čase, ani v různých svozných linkách. Grafické rozložení všech naměřených hodnot tukuprosté sušiny je znázorněno na obr. 11.



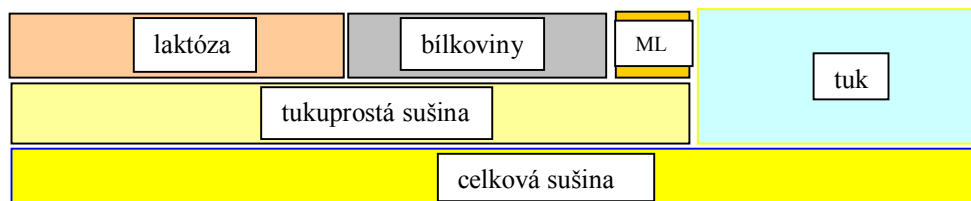
Obr. 11 Grafické rozložení všech naměřených hodnot tukuprosté sušiny

Stanovení základních složek mléka pomocí MilkoScanu probíhalo v laboratoři mlékárny. Kontrola přesnosti je měření je prováděna několikrát během dne pomocí tzv. pilot vzorků (vzorek mléka o známých hodnotách, konzervovaný dichromanem draselným). Nulování přístroje probíhá každou hodinu pomocí S-6060. Kalibrace pracovníky laboratoře probíhá 4 x ročně pomocí roztoku FTIR Equalizer. Externí kalibrace probíhá jedenkrát ročně. Výsledky rozborů lze zároveň následně kontrolovat s výsledky Laboratoře pro rozbor mléka – Brno. Výsledky dlouhodobě prokazují přesnost měření tohoto přístroje.

Z výsledků lze posoudit, že rozdíly mezi jednotlivými svoznými linkami a v rámci několika měsíců nejsou příliš rozdílné. Celkově lze hodnotit nejlépe svoznou linku č. 6 a č. 30 (bio), které po celou dobu vzorkování vykazovaly nejvyšší hodnoty tuku a bílkovin a tím empiricky i vyšší obsah sušiny. Naopak nejnižší hodnoty tuku, bílkovin a sušiny vykazovala svozná linka č. 7. Žádná naměřená hodnota ze všech měření nevykazovala známky porušení mléka ani jiné známky nekvalitní suroviny. Tento rozbor není rozhodující pro zpeněžení mléka, pro zpeněžení se využívá jednotlivých stanovení z odebraného mléka u prvovýrobce, jež se stanovuje v referenční laboratoři pro rozbor mléka v Brně. Stanovení složek u jednotlivých svozných linek je důležité pro zajištění, zda byla kvalita zachována i během svozu mléka, kdy mohlo dojít k porušení mléka vinou dopravce.

Norma ČSN 570529 uvádí pouze minimální množství tukuprosté sušiny 8,5 % hmotnosti, obsah tuku nejméně 33,0 g.l<sup>-1</sup> a obsah bílkovin pro zpeněžování nejméně 28,0 g.l<sup>-1</sup>[65]. Každá mlékárna má svůj systém zpeněžování, ve kterém jsou zpravidla přesně definované příplatky a srážky vzhledem k mlékárnou vhodně stanoveným hodnotám u jednotlivých ukazatelů.

Celkovou sušinu mléka tvoří 3 základní složky, jsou to tuk, laktóza a bílkoviny, dále je potřeba do sušiny zahrnout minerální látky, které se vyskytují v mléce přibližně v množství 0,7 – 0,8 %. Tyto složky se jen málo mění a tvoří celkovou sušinu, proto je lze využít pro orientační výpočet obsahu celkové sušiny a tukuprosté sušiny, které mají význam pro zjištění porušení mléka. Tukuprostá sušina (TPS) je pak rozdílem mezi celkovou sušinou a obsahem tuku. Vztah mezi složkami mléka je uveden na obr. 12.



Obr. 12 Vztah mezi základními složkami mléka

Zpracování výsledků pomocí absorpční infračervené spektroskopie, je nenáročné na obsluhu a použití chemikálií. Během několika minut lze získat výsledky několika základních složek mléka, zatím co stanovení běžnými metodami, jako je například stanovení sušiny sušením do konstantní hmotnosti, probíhá několik hodin. Tím se snižují i náklady na jednotlivá stanovení. Tento přístroj je vhodný zejména v laboratořích, kde je třeba analyzovat velké množství vzorků během krátkého času.

## 7.2 Výsledky chromatografického stanovení vitamínu D v syrovém mléce metodou HPLC

Obsah vitamínu D v mléce, byl měřen v pěti svozných linkách vždy 1x za měsíc v období říjen 2012 – březen 2013. Výsledky jednotlivých měření svozných linek jsou uvedeny v následujících tabulkách 18 - 22.

Doba zmýdelnění byla prodloužena z původních 30 minut na 120 minut, protože původní čas zmýdelnění se ukázal jako nedostačující, neboť po odpaření rozpouštědla a rozpouštění odparků vznikaly ve vzorku kousky nezmýdelněného tuku, zmýdelnění tudíž nebylo kvantitativní. Po dalším prodlužování času byl zvolen čas zmýdelnění 2 hodiny, kdy se již žádné nezmýdelnitelné zbytky v rozpuštěných odparcích nevyskytovaly.

Tabulka 18 Obsah vitamínu D u svozné linky č. 6

měsíc	množství vzorku [ml]	plocha píku [mA.V.s]	koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	obsah vitamínu D [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	obsah vitamínu D [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	obsah vitamínu D [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Směrodatná odchylka
říjen 2012	60	397,1	0,1604	13,3667	13,2292	12,9	0,32
		392,2	0,1571	13,0917			
	60	381,7	0,1502	12,5167	12,5792		
		384	0,1517	12,6417			
listopad 2012	60	388,5	0,1547	12,8917	13,0167	13,06	0,04
		393	0,1577	13,1417			
	60	390,3	0,1559	12,9917	13,1125		
		394,7	0,1588	13,2333			
prosinec 2012	60	394,2	0,1585	13,2083	13,3167	12,77	0,54
		398,2	0,1611	13,425			
	60	377	0,147	12,25	12,2209		
		375,9	0,1463	12,1917			
leden 2013	60	355,8	0,1329	11,075	11,175	11,48	0,30
		359,4	0,1353	11,275			
	60	366,8	0,1403	11,6917	11,7834		
		370,1	0,1425	11,875			
únor 2013	60	350,7	0,1296	10,8	10,9459	10,81	0,13
		356	0,1331	11,0917			
	60	351,6	0,1302	10,85	10,6792		
		345,5	0,1261	10,5083			
březen 2013	60	359,7	0,1355	11,2917	11,475	11,57	0,09
		366,3	0,1399	11,6583			
	60	367	0,1404	11,7	11,6709		
		365,9	0,1397	11,6417			

Tabulka 19 Obsah vitamínu D u svozné linky č. 7

měsíc	množství vzorku [ml]	plocha píku [mA.V.s]	koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	průměrná koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	obsah vitamínu D [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	obsah vitamínu D [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Směrodatná odchylka
říjen 2012	60	357,2	0,1339	11,1583	11,1	11,28	0,17
		355,2	0,1325	11,0417			
	60	365	0,1391	11,5917	11,4584		
		360,2	0,1359	11,325			
listopad 2012	60	362,7	0,1375	11,4583	11,7167	11,75	0,02
		372	0,1437	11,975			
	60	367,3	0,1406	11,7167	11,775		
		369,4	0,142	11,8333			
prosinec 2012	60	344,1	0,1252	10,4333	10,375	10,17	0,20
		342	0,1238	10,3167			
	60	341,2	0,1232	10,2667	9,9625		
		330,2	0,1159	9,6583			
leden 2013	60	338,7	0,1216	10,1333	10,1625	9,86	0,29
		339,8	0,1223	10,1917			
	60	330,1	0,1159	9,6583	9,5667		
		326,8	0,1137	9,475			
únor 2013	60	339,1	0,1219	10,1583	10,1333	10,12	0,01
		338,2	0,1213	10,1083			
	60	336	0,1198	9,9833	10,1083		
		340,6	0,1228	10,2333			
březen 2013	60	337,7	0,1209	10,075	10,1459	9,96	0,19
		340,2	0,1226	10,2167			
	60	334,1	0,1185	9,875	9,7667		
		330,1	0,1159	9,6583			

Tabulka 20 Obsah vitamínu D u svozné linky č. 8

měsíc	množství vzorku [ml]	plocha píku [mA.V.s]	koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	průměrná koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	obsah vitamínu D [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	obsah vitamínu D [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Směrodatná odchylka
říjen 2012	60	359,1	0,1351	11,2583	11,0458	11,07	0,02
		351,4	0,13	10,8333			
	60	360	0,1357	11,3083	11,0917		
		352,1	0,1305	10,875			
listopad 2012	60	373,5	0,1447	12,0583	11,9125	11,39	0,51
		368,2	0,1412	11,7667			
	60	351,2	0,1299	10,825	10,875		
		353	0,1311	10,925			
prosinec 2012	60	362,4	0,1373	11,4417	11,5667	11,19	0,38
		366,8	0,1403	11,6917			
	60	346,3	0,1266	10,55	10,8042		
		355,4	0,1327	11,0583			
leden 2013	60	347,8	0,1276	10,6333	10,5583	10,89	0,33
		345	0,1258	10,4833			
	60	362	0,1371	11,425	11,225		
		354,9	0,1323	11,025			
únor 2013	60	375,4	0,146	12,1667	12,0667	11,71	0,36
		371,9	0,1436	11,9667			
	60	357,1	0,1338	11,15	11,3459		
		364,2	0,1385	11,5417			
březen 2013	60	377,1	0,1471	12,2583	12,1333	11,87	0,26
		372,6	0,1441	12,0083			
	60	364,9	0,139	11,5833	11,6125		
		366	0,1397	11,6417			

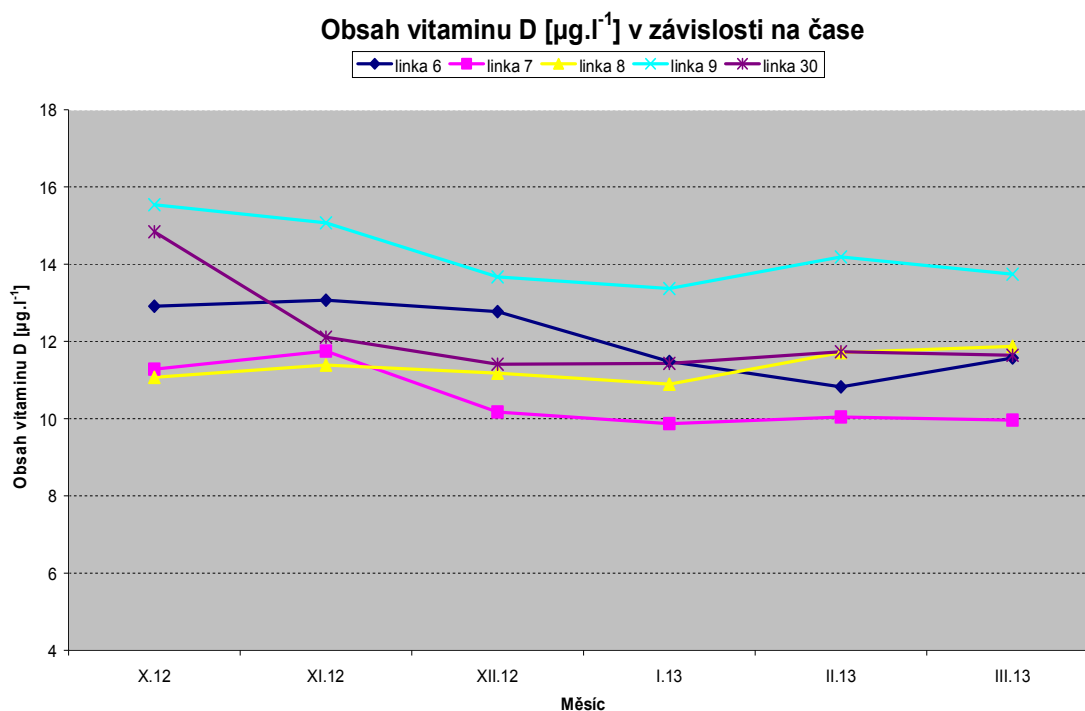
Tabulka 21 Obsah vitamínu D u svozné linky č. 9

měsíc	množství vzorku [ml]	plocha píku [mA.V.s]	koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	průměrná koncentrace [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	obsah vitamínu D [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	obsah vitamínu D [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	Směrodatná odchylka
říjen 2012	60	444,7	0,192	16	15,7584	15,54	0,21
		436	0,1862	15,5167			
	60	433,9	0,1848	15,4	15,3209		
		430,9	0,1829	15,2417			
listopad 2012	60	420,7	0,1761	14,675	14,9667	15,06	0,09
		431,2	0,1831	15,2583			
	60	430,7	0,1827	15,225	15,1625		
		428,4	0,1812	15,1			
prosinec 2012	60	394,2	0,1585	13,2083	13,3167	13,67	0,35
		398,2	0,1611	13,425			
	60	412,4	0,1706	14,2167	14,0292		
		405,7	0,1661	13,8417			
leden 2013	60	388,7	0,1548	12,9	13,1375	13,37	0,23
		397,2	0,1605	13,375			
	60	402,1	0,1637	13,6417	13,6084		
		400,9	0,1629	13,575			
únor 2013	60	406,2	0,1664	13,8667	14,0209	14,19	0,16
		411,7	0,1701	14,175			
	60	412	0,1703	14,1917	14,3584		
		418,1	0,1743	14,525			
březen 2013	60	399,2	0,1618	13,4833	13,65	13,74	0,08
		405,3	0,1658	13,8167			
	60	402,8	0,1642	13,6833	13,825		
		408	0,1676	13,9667			



Tabulka 22 Obsah vitamínu D u svozné linky č. 30

měsíc	množství vzorku [ml]	plocha píku [mA.V.s]	koncentrace [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ]	průměrná koncentrace [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ]	obsah vitamínu D [ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]	obsah vitamínu D [ $\mu\text{g.l}^{-1}$ ]	Směrodatná odchylka
říjen 2012	60	428,3	0,1811	15,0917	15,1625	14,84	0,32
		430,8	0,1828	15,2333			
	60	416	0,173	14,4167	14,5209		
		419,8	0,1755	14,625			
listopad 2012	60	373,1	0,1444	12,0333	12,1375	12,11	0,02
		376,8	0,1469	12,2417			
	60	371,5	0,1434	11,95	12,0834		
		376,4	0,1466	12,2167			
prosinec 2012	60	368	0,1411	11,7583	11,625	11,41	0,21
		363,2	0,1379	11,4917			
	60	355,4	0,1327	11,0583	11,1917		
		360,2	0,1359	11,325			
leden 2013	60	363,9	0,1383	11,525	11,2792	11,43	0,15
		355	0,1324	11,0333			
	60	367,8	0,1409	11,7417	11,5834		
		362,1	0,1371	11,425			
únor 2013	60	372,2	0,1438	11,9833	11,8958	11,83	0,06
		369	0,1417	11,8083			
	60	367,1	0,1405	11,7083	11,7583		
		368,9	0,1417	11,8083			
březen 2013	60	370,2	0,1425	11,875	11,9709	11,64	0,33
		373,7	0,1448	12,0667			
	60	360,1	0,1358	11,3167	11,3084		
		359,8	0,1356	11,3			



Obr. 13 Obsah vitamínu D v mléce dle jednotlivých svozných linek

Tabulka 23 Souhrnné popisné statistiky obsahu vitamínu D dle jednotlivých linek [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]

linka	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm. odch.
linka č. 6	6	12,10	10,81	13,06	0,932
linka č. 7	6	10,52	9,86	11,75	0,790
linka. č 8	6	11,35	10,89	11,87	0,379
linka č. 9	6	14,26	13,37	15,54	0,860
linka č. 30	6	12,21	11,41	14,84	1,315

Vzájemné porovnání obsahu vitamínu D u jednotlivých svozných linek je znázorněno na obr. 13 a souhrnné statistiky v tabulce 23. Z výše uvedených výsledků je patrné, že dlouhodobě nejvyšší obsah vitamínu D byl analyzován u linky č. 9 v průměrném množství  $14,26 \pm 0,860$  [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ] (viz. tab. 23). U této linky byla také naměřena nejvyšší hodnota vitamínu D  $15,54 \pm 0,21$  [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ], a to v říjnu 2012 (viz. tabulka 21). Tato linka obsahovala část mléka dojníc, kterým je umožněn celoroční venkovní výběh. Sluneční záření umožňu-

je syntézu vitamínu D a tím i vyšší hodnoty vitamínu D v mléce, které bývají u dojníc s venkovním výběhem v letním období vyšší než v zimním období [71,72]. Naopak nejnižší množství vitamínu D  $9,86 \pm 0,29$  [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ] bylo naměřeno u linky č. 7. U linky č. 30 (bio) byla v říjnu naměřena ještě vyšší hodnota  $14,84 \pm 0,32$  [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ] (v říjnu se ještě při pěkném počasí dojnice pasou, později jsou již jen v uzavřeném stání), avšak v následujících měsících již byla hodnota srovnatelná s hodnotami z ostatních linek. Vhodnější porovnání bio mléka ve srovnání s běžným mlékem by bylo třeba uskutečnit v letním období, kdy jsou dojnice z biofarem na pastvách. V zimním období lze říci, že mezi obsahem vitamínu D v běžném mléce a v mléce bio nebyly na hladině významnosti 0,05 shledány významné rozdíly.

Tabulka 24 Souhrnné popisné statistiky obsahu vitamínu D v daných měsících [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]

měsíc	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm. odch.
říjen 2012	5	13,13	11,07	15,54	2,028
listopad 2012	5	12,67	11,39	15,06	1,472
prosinec 2012	5	11,84	10,17	13,67	1,379
leden 2013	5	11,41	9,86	13,37	1,277
únor 2013	5	11,73	10,12	14,19	1,541
březen 2013	5	11,76	9,96	13,74	1,344

Z hlediska časového (viz. tabulka 24) byla nejvyšší průměrná hodnota naměřena v říjnu a následně v listopadu, v dalších měsících již byly hodnoty srovnatelné.

Tabulka 25 Souhrnné statistiky množství vitamínu D v syrovém kravském mléce [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]

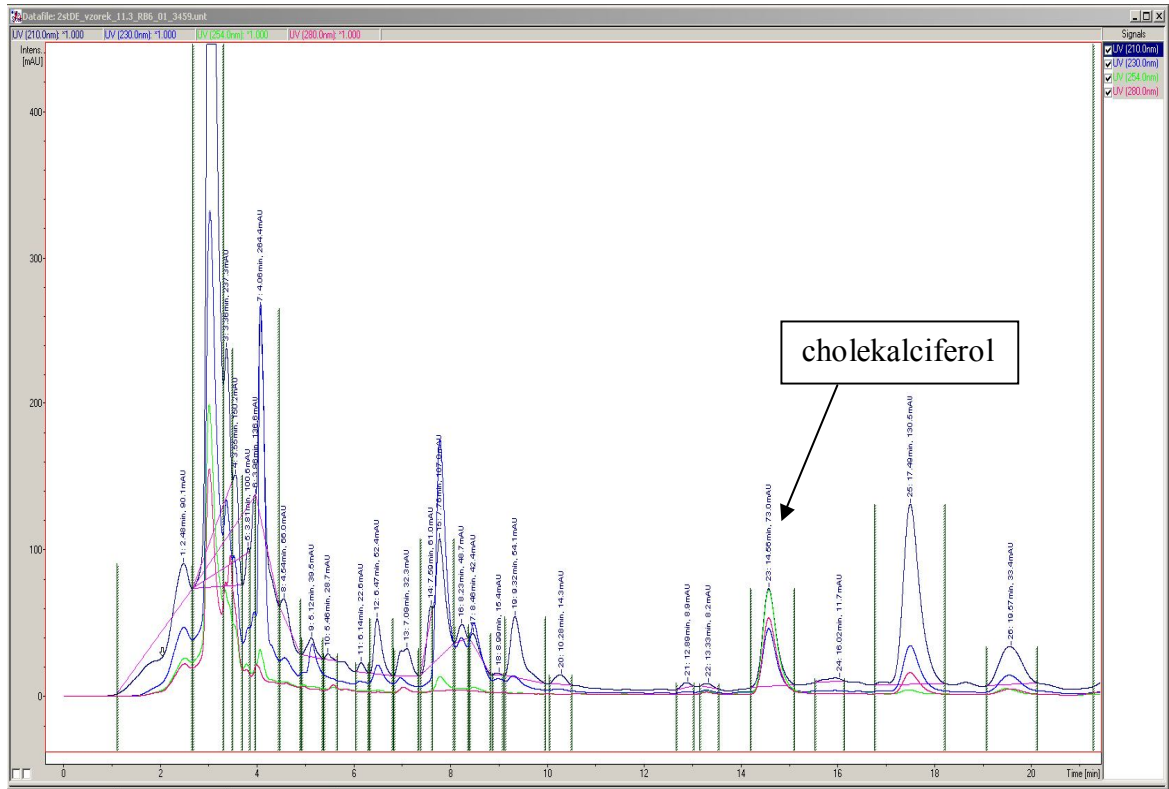
	N platných	Průměr	Minimum	Maximum	Sm. odch.
obsah vitamínu D [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	30	12,09	9,86	15,54	1,519

Naměřené průměrné množství vitamínu D v syrovém kravském mléce bylo  $12,09 \pm 1,519$  [ $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ], toto množství je však o něco vyšší, než je uváděno v odborných literaturách a člancích. Statistické zpracování uvádí tabulka 25. Hodnota vitamínu D v syrovém kravském mléce by se měla pohybovat v rozmezí 0,5 – 10  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  [39,73].

Stanovení vitamínu D metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie v syrovém mléku v průběhu 6 měsíců prokázalo vyšší hodnoty tohoto vitamínu pouze v měsíci říjnu oproti jiným měsícům. Tento výsledek lze přičíst především svozným linkám č. 30 (bio), kde byly dojnice ještě část měsíce na pastvě a svozné lince č. 9, kde část mléka pocházela od dojnic, kterým je umožněn pohyb na volném prostranství. Díky tomu lze doporučit, pro zvýšení obsahu vitamínu D v mléce, pobyt dojnic na přímém slunečním záření.

Celkové stanovení touto metodou je poměrně náročné, zmýdelnění bylo provedeno  $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$  etanolickým roztokem KOH. Zmýdelnění po 30 minutách neprobíhalo zcela optimálně, proto byl čas prodloužen až na 2 hodiny, protože vzorek nebyl dostatečně zmýdelněn. V diplomové práci Vanda Stránská uvedla, že výsledky měření po zmýdelnění  $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$  a  $3,8 \text{ mol.dm}^{-3}$  nepřineslo rozdílné výsledky [70]. Norma pro stanovení vitamínu D metodou HPLC v potravinách ČSN EN 12821 (560047) uvádí možnosti zmýdelnění pomocí KOH v rozmezí koncentrace přibližně  $1,3 - 1,5 \text{ mol.dm}^{-3}$  [74]. Michal Douša však uvádí koncentrace alkalického roztoku KOH až 40 - 50 hm. % (což odpovídá přibližně  $7,5 - 10 \text{ mol.dm}^{-3}$ ) [38]. Tato koncentrace, popřípadě zvýšení zmýdelňovací teploty, by celou přípravu značně urychlilo. Extrakce probíhala pomocí n-hexanu, kdy docházelo k optimálnímu rozdělení obou vrstev. Po odpaření rozpouštědla a rozpuštění v metanolu následovala HPLC analýza.

Chromatogram cholekalciferolu ve vzorku, po přidání standardu je znázorněn na obr. 14. Obr. 15 znázorňuje chromatogram z lednového vzorku svozné linky č. 6.



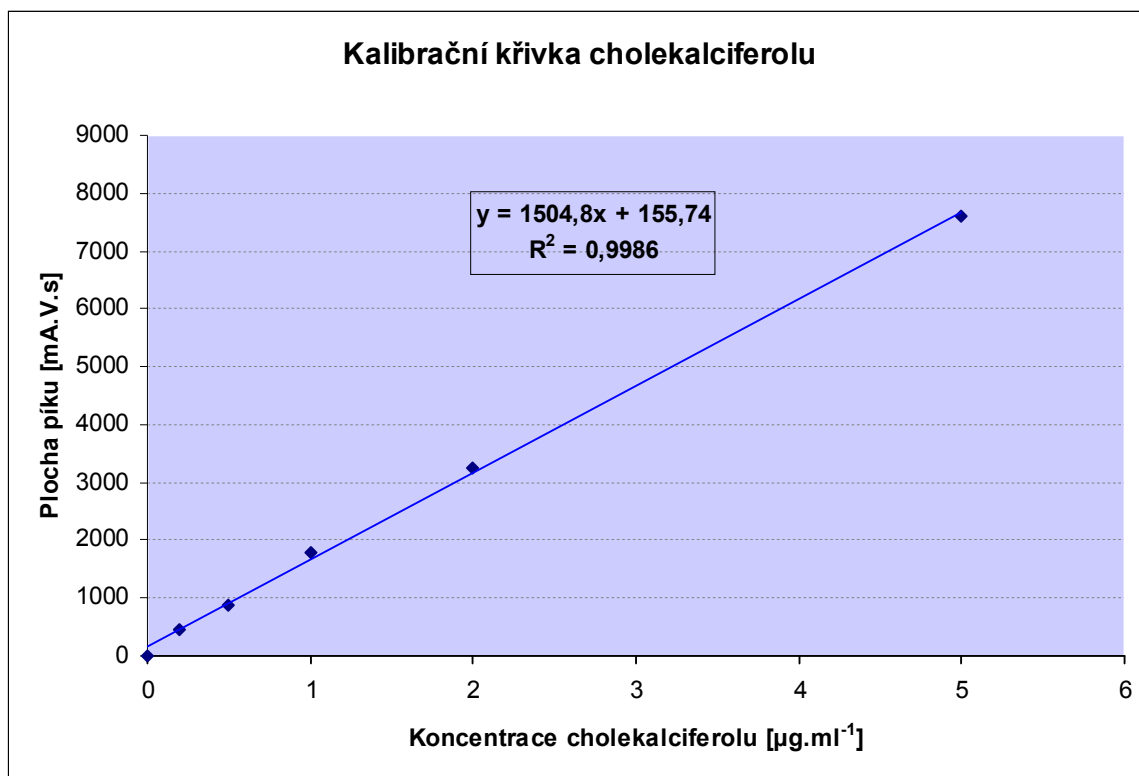
### 7.3 Výsledky měření kalibrační křivky pro chromatografické stanovení vitamínu D metodou HPLC

Na základě měření standardu a vzorku po přidání standardního přídatku cholekalciferolu byl identifikován retenční čas vitamínu D 14,56 min., vlnová délka detekce byla 254 nm. Vyhodnocení probíhalo pomocí software Hystare-Post processing, kde probíhala integrace jednotlivých ploch píků. Odečtené plochy píků [m.A.V.s] byly dosazeny do rovnice regrese kalibrační křivky a byl vypočten obsah vitamínu D v  $\mu\text{g.l}^{-1}$ .

Tabulka 26 Výsledky měření kalibrační řady

Koncentrace	0,2 [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ]	0,5 [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ]	1,0 [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ]	2,0 [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ]	5,0 [ $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ]
Měření 1. [m.A.V.s]	456,76	890,61	1806,11	3257,27	7605,42
Měření 2. [m.A.V.s]	471,76	899,29	1796,67	3259,56	7612,48
Měření 3. [m.A.V.s]	452,73	884,2	1787,42	3270,61	7627,42
Průměr 1-3. [m.A.V.s]	460,41	891,36	1796,73	3262,48	7615,10

Výsledek byl přepočítán pomocí rovnice regrese (viz. obr. 16), která měla tvar  $y = 1504,8x + 155,74$ .



Obr. 16 Kalibrační křivka cholekalciferolu v metanolu

## ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo popsat chemické složení syrového kravského mléka, popis principu kapalinové chromatografie, stanovení vitamínu D a stanovení základních složek mléka v syrovém kravském mléce u pěti svozných linek v průběhu šesti měsíců.

Stanovení základních složek mléka bylo provedeno na principu absorpční infračervené spektrometrie na přístroji MilkoScan FT 120 dánské firmy Foss electric. Na rozdíl od stanovení vitamínu D, nepotřebují vzorky téměř žádnou přípravu. Vzorky byly pouze vytemperovány na 42 °C, promíchány otáčením a vloženy do sampleru. Přístroj pracoval zcela samostatně a výsledky byly odečteny na monitoru za použití softwaru Windows Menu bar.

Výsledky stanovení základních složek mléka byly uvedeny v části 7.1. Všechny zkoušené vzorky vykazovaly výsledky v rozmezí běžného složení mléka. Nebyly shledány žádné extrémní hodnoty, které by naznačovaly porušenost mléka. Nejlepší výsledky složení byly zaznamenány u svozné linky č. 6 a linky č. 30, jež vykazovaly nejvyšší hodnoty celkové sušiny, bílkovin a tuku. Naopak svozná linka č. 7 vykazovala tyto hodnoty nejnižší. Z celkových výsledků měření byly vypočítány průměrné hodnoty tuku  $3,87 \pm 0,196$  %, bílkovin  $3,38 \pm 0,109$  %, laktózy  $4,87 \pm 0,047$  %, celkové sušiny  $12,9 \pm 0,254$  % a tukuprosté sušiny  $8,97 \pm 0,100$  %.

Stanovení vitamínu D v mléce je složité na přípravu vzorku a časově náročné. Příprava vzorku spočívala ve zmýdelnění za tepla a extrakci nepolárním rozpouštědlem, dále v odstranění rozpouštědla a rozpuštění odparků v polárním rozpouštědle a přefiltrování do vialek, které jsou následně použity k HPLC analýze.

Ke zmýdelnění mléka bylo použito  $1,9 \text{ mol.dm}^{-3}$  etanolickeho roztoku KOH po dobu 120 minut při 60 °C v ultrazvukové lázni. Zmýdelnění probíhalo v tmavých lékovkách s přísávkem kyseliny askorbové, aby bylo zabráněno oxidaci vitamínu D. K extrakci bylo použito n-hexanu, extrakce probíhala dvakrát, nejdříve se 30 ml a podruhé se 20 ml n-hexanu. Po odpaření rozpouštědla byly odparky rozpuštěny v 5 ml metanou a přefiltrovány přes nylonový filtr (13 mm x 0,45 mm) do vialek, ze kterých je autosamplerem odebírán vzorek pro vlastní separaci.

Vlastní analýza probíhala na vysoceúčinném chromatografu firmy Dionex Ultimate 3000. Byla použita mobilní fáze metanol : voda v poměru 95 : 5. K analýze byla využita izokratická eluce. Průtok mobilní fáze byl nastaven na  $1 \text{ ml.min}^{-1}$ . K separaci složek bylo využito



kolony s reverzní fází Discovery C<sub>18</sub> (velikost částic 5 µm, průměr 4,6 mm, délka 25 cm). Výsledky byly odečteny za použití software Hystare – Post processing. Retenční čas vitamínu D byl vyhodnocen v čase 14,56 min. Detektor DAD UV-VIS byl nastaven na měření při vlnové délce 254 nm.

Výsledky měření vitamínu D byly znázorněny formou tabulek a obrázků v části 7.2. Po celou dobu měření vykazovala nejvyšší hodnoty vitamínu D svozná linka č. 9, jejíž aritmetický průměr šesti stanovení byl  $14,26 \pm 0,860 \mu\text{g.l}^{-1}$ . Celkový průměr všech stanovení vitamínu D byl  $12,09 \pm 1,519 \mu\text{g.l}^{-1}$ .

Kalibrační křivka byla sestrojena na základě kalibrační řady roztoků cholekalciferolu o koncentracích 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 a 5,0 µg.ml<sup>-1</sup>. Jako standard byl použit cholekalciferol, který byl rozpuštěn v metanolu. Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost plochy píku na koncentraci cholekalciferolu.

Závěrem lze konstatovat, že v dnešní době zaujímají moderní instrumentální metody nezastupitelnou roli v chemických analýzách. Jejich citlivost umožňuje stanovit i stopové množství analyzovaných látek. Jejich vysoké pořizovací náklady kompenzují nízké náklady na personál, chemická činidla, rychlost a přesnost stanovení.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] BABIČKA, L. a L. KOUŘIMSKÁ. Význam mléka ve výživě člověka. *Drůbež a mléko ve výživě člověka: konference s mezinárodní účastí: 24.5.2006*. Vyd. 1. Praha: Katedra kvality zemědělských produktů, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, 2006. ISBN 80-213-1548-2.
- [2] ANDĚL, Michal. *Mléko a mléčné výrobky ve výživě*. 1. vyd. Praha: Potravinářská komora České republiky, 2010, 34 s. Publikace České technologické platformy pro potraviny. ISBN 978-80-254-9012-9.
- [3] Den mléka 2004: zaměřený na biologicko-technologické systémy chovu dojeného skotu: sborník referátů z konference s mezinárodní účastí Katedry chovu skotu a mlékařství České zemědělské univerzity v Praze 17.5.2004. Vyd. 1. V Praze: Česká zemědělská univerzita, Katedra chovu skotu a mlékařství, 2004. 87 s. ISBN 80-213-1166-5.
- [4] MATOUŠ, Bohuslav. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vyd. Praha: Galén, c2010, 540 s. ISBN 978-807-2627-028.
- [5] ZADRAŽIL, Karel. *Mlékařství: (přednášky)*. Vyd. 1. Praha: ISV, 2002, 127 s. Živočišná výroba (Česká zemědělská univerzita). ISBN 80-866-4215-1.
- [6] GAJDŮŠEK, Stanislav. *Laktologie*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003, 78 s. ISBN 80-715-7657-3
- [7] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 580 s. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [8] HRABĚ, Jan, Pavel BŘEZINA a Pavel VALÁŠEK. *Technologie výroby potravin živočišného původu: bakalářský směr*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2006, 180 s. ISBN 80-731-8405-2.
- [9] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin I*. 2. upr. vyd. Tábor: OSSIS, 2002, 331 s. ISBN 80-866-5903-8.
- [10] *Biochemie: základní kurz*. 4. vyd. Praha: Karolinum, 2009, 229 s. ISBN 978-80-246-1678-0.
- [11] HOZA, Ignác. *Potravinářská biochemie I*. Vyd. 2. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2011, 167 s. ISBN 978-80-7318-936-5.

- [12] DOSTÁL, Jiří, Hana PAULOVÁ, Jiří SLANINA a Eva TÁBORSKÁ. *Biochemie: pro posluchače bakalářských oborů*. Brno: Masarykova univerzita, 2009, 158 s. ISBN 978-80-210-5020-4.
- [13] PROCHÁZKOVÁ, Eva. *Studium hydrolytických a oxidačních změn tuku u válcově sušeného plnotučného mléka: Study of hydrolytic and oxidative changes of fat in roller dried whole milk powder : teze disertační práce*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2012, 41 s. ISBN 978-80-7454-202-2.
- [14] *Výživa dojníc a kvalita mléka: (ekologické, zdravotní a hygienické faktory kvality a bezpečnosti mléka jako suroviny a potraviny) : sborník příspěvků = Dairy cows nutrition and milk quality : (ecological, health and hygienic factors of quality and safety of milk as raw material and foodstuff : proceedings of contributions) : Poohořelice, 23.3.2007*. 1. vyd. Rapotín: Výzkumný ústav pro chov skotu, 2007, Vliv krmné dávky na obsah proteinu a tuku v mléce. ISBN 9788090314283.
- [15] HRABĚ, Jan. *Základy zbožiznalství potravin*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2011, 167 s. ISBN 978-80-7454-118-6.
- [16] Jak se mění pohled na tuky ve výživě. *Interní medicína pro praxi*. 2009, roč. 2009, č. 12, s. 549-551. ISSN 1212-7299.
- [17] *Výrobní zemědělská praxe a potravinářské biotechnologické úpravy pro zvýraznění pozitivních zdravotních vlivů mléka a mléčných výrobků: sborník příspěvků = Agricultural Production Practice and Food Biotechnological Manipulations for Support of Positive Health Impacts of Milk and Milk Products : proceedings of contributions : Rapotín, 8.10.2008*. 1. vyd. Rapotín: Výzkumný ústav pro chov skotu, 2008, 91 s. ISBN 978-80-87144-03-9.
- [18] *Den mléka 2002: zaměřený na problematiku složek mléka, jejich význam a ovlivňování z pohledu šlechtitelského, technologického, nutričního, zdravotního a ekonomického: sborník referátů z mezinárodní konference: Praha, 23.5.2002*. Vyd. 1. V Praze: Česká zemědělská univerzita, 2002. ISBN 80-213-0900-8.
- [19] PAVEL BŘEZINA, Jaroslav Jelínek. *Chemie a technologie mléka: určeno pro posl. fak. potravinářské a biochemické technologie*. 1. vyd. Praha: Mezinárodní organizace novinářů, 1990. ISBN 80-708-0075-5.
- [20] ŠTĚPÁN, J. Vztah mezi příjmem vápníku potravou a stavem skeletu. *Drůbež a mléko ve výživě člověka: konference s mezinárodní účastí: 24.5.2006*. Vyd. 1. Edi-

- tor Luboš Babička, Lenka Kouřimská. Praha: Katedra kvality zemědělských produktů, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, 2006, 91 s. ISBN 80-213-1548-2.
- [21] LUKÁŠOVÁ, J. a A. SMRČKOVÁ. *Obsah vápníku v mléce a jeho význam* [online]. 2003 [cit. 2013-01-08]. Dostupné z: [http://www.vetweb.cz/informace-z-oboru/hygiena-technologie/Obsah-vapniku-v-mlece-a-jeho-vyznam\\_\\_s1496x50823.html](http://www.vetweb.cz/informace-z-oboru/hygiena-technologie/Obsah-vapniku-v-mlece-a-jeho-vyznam__s1496x50823.html)
- [22] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich Röhm. Farbatf. von Jürgen WIRTH. *Taschenatlas Biochemie des Menschen*. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2009. ISBN 978-313-7594-048.
- [23] DOBROTA, Dušan. *Lekárska biochémia: vysokoškolská učebnica*. 1. slov. vyd. Martin: Osveta, 2012, 723 s. ISBN 978-808-0632-939.
- [24] MINDELL, Earl a Hester MUNDIS. *Nová vitaminová bible: vitaminy, minerální látky, antioxidanty, léčivé rostliny, doplňky stravy, léčebné účinky potravin i léky používané v homeopatii*. Vyd. 3. Překlad Miloš Máček. Praha: Ikar, 2010, 572 s. ISBN 978-80-249-1419-0.
- [25] FOŘT, Petr. *Zdraví a potravní doplňky* :. vyd. 1. Praha: Ikar, 2005, 398 s. ISBN 80-249-0612-0.
- [26] KORECKÁ, Lucie, Šárka ŠTĚPÁNKOVÁ a Alexander ČEGAN. *Obecná biochemie: pro speciální chemicko-biologické obory*. Vyd. 1. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2012, 163 s. ISBN 978-80-7395-470-3.
- [27] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Color atlas of biochemistry*. 2nd ed., rev. and enl. New York: Thieme, c2005, 467 p. Thieme flexibook. ISBN 15-889-0247-1.
- [28] HLÚBIK, Pavol a OPLTOVÁ, Libuše. *Vitaminy*. Vyd. 1. Praha: Grada Publishing, 2004. 232 s. ISBN 80-247-0373-4.
- [29] HYNIE, Sixtus. *Speciální farmakologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 2002, 202 s. Učební texty (Univerzita Karlova). ISBN 80-246-0416-7.
- [30] VÁVROVÁ, Jaroslava. *Vitaminy a stopové prvky 2007*. 1. vyd. Pardubice: SEKK, 2007. 155 s. ISBN 978-80-254-1171-1.

- [31] MITH, Colleen M, Allan D MARKS a Michael LIEBERMAN. *Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams-Wilkins, 2005, 977 s. ISBN 07-817-2145-8.
- [32] *Encyclopedia of biological chemistry*. 1st ed. Editor William J Lennarz, M Lane. Boston: Elsevier, 2004, 831 p. ISBN 01244371171.
- [33] MURRAY, Robert K. et al. *Harperova Biochemie*. (4. české vyd.), V H & H 3. Jinočany: H & H, 2002, 872 s. ISBN 80-7319-013-3.
- [34] KLOUDA, Pavel. *Základy biochemie*. 2. přeprac. vyd. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2005, 144 s. ISBN 80-863-6911-0.
- [35] KOČÁREK, Eduard. *Biologie člověka*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2010, 336 s. Biologie pro gymnázia. ISBN 978-808-6960-470.
- [36] PATTERSON, K.Y., K.M. PHILLIPS, R.L. HORST, W.C. BYRDWELL, J. EXLER, L.E. LEMAR a J.M. HOLDEN. Vitamin D content and variability in fluid milks from a US Department of Agriculture nationwide sampling to update values in the National Nutrient Database for Standard Reference. *Journal of Dairy Science*. 2010, Vol. 93, No. 11, s. 5082-5090. ISSN 00220302.
- [37] MURRAY, Robert K. *Harper's illustrated biochemistry*. 26th ed. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, c2003, ix, 693 s. Lange medical book. ISBN 00-713-8901-6.
- [38] DOUŠA, Michal. *Stanovení vitaminů, doplňkových látek a vybraných léčiv v krmivech*. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2007, 376 s. ISBN 978-80-86548-94-4.
- [39] PERALES, S. Review: Determination of Vitamin D in Dairy Products by High Performance Liquid Chromatography. *Food Science and Technology International*. 2005-12-01, Vol. 11, No. 6, s. 451-462. ISSN 1082-0132.
- [40] PERALES, S., M.M. DELGADO, A. ALEGRÍA, R. BARBERÁ a R. FARRÉ. Liquid chromatographic determination of Vitamin D<sub>3</sub> in infant formulas and fortified milk. *Analytica Chimica Acta*. 2005, Vol. 543, No. 1-2, s. 58-63. ISSN 00032670.
- [41] SALO-VÄÄNÄNEN, P., V. OLLILAINEN, P. MATTILA, LEHIKONEN, E. SALMELA-MÖLSÄ a V. PIIRONEN. Simultaneous HPLC analysis of fat-

- soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction. *Food Chemistry*. 2001, Vol. 2001, No. 71, s. 535-543
- [42] ŠTERN, Petr. *Obecná a klinická biochemie: pro bakalářské obory studia*. Praha: Karolinum, 2005, 219 s. ISBN 80-246-1025-6.
- [43] JAFRI, Lena, Aysha Habib KHAN, Anwar A. SIDDIQUI, Shamim MUSHTAQ, Romaina IQBAL, Farooq GHANI a Imran SIDDIQUI. Comparison of high performance liquid chromatography, radio immunoassay and electrochemiluminescence immunoassay for quantification of serum 25 hydroxy vitamin D. *Clinical Biochemistry*. 2011, Vol. 44, No. 10-11, s. 864-868. ISSN 00099120.
- [44] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [45] HOLME, David James a Hazel PECK. *Analytical biochemistry*. 3rd ed. Essex: Longman, 1998, 488 s. ISBN 05-822-9438-X.
- [46] JABOR, Antonín a Miroslav ZÁMEČNIK. *Encyklopedie laboratorní medicíny I*. 1. vydání. Pardubice: SEKK s.r.o., Katedra klinické biochemie IPVZ Praha, 2002. ISBN 80-238-9775-6.
- [47] MOTYKA, Kamil a Jan HLAVÁČ. *Stručný přehled separačních metod*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého Olomouc, 2009, 45 s. ISBN 978-80-244-2304-3.
- [48] PARÉ, J a J BÉLANGER. *Instrumental methods in food analysis*. New York: Elsevier, 1997, 487 p. ISBN 04-448-1868-5.
- [49] ŠTULÍK, Karel a kol. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 263 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [50] ŠTULÍK, K. *Vysokoučinné analytické separace biologicky aktivních látek*. Praha: VŠCHT, 2006, 112 s. ISBN 80-862-3813-X.
- [51] ŠTERN, Petr. *Obecná a klinická biochemie: pro bakalářské obory studia*. 2., upr. vyd. Praha: Univerzita Karlova, 2011, 269 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 978-802-4619-798.
- [52] HANCOCK, William S. *High performance liquid chromatography in biotechnology*. New York: Wiley, 1990, 564 p. ISBN 04-718-2584-0.

- [53] KVASNICOVÁ, V. a P. BALÍNOVÁ. *Praktické cvičení z lékařské chemie a biologie* [online]. Ústav biochemie, buněčné a molekulární biologie [cit. 2013-01-08]. Dostupné z: [http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/praktika/uloha\\_B2.htm](http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/praktika/uloha_B2.htm)
- [54] *Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu*. 2., upr. a dopl. vyd. Editor Václav Helán. Český Těšín: 2 THETA, 2005, 502 s. ISBN 80-863-8029-7.
- [55] MCMASTER, Marvin C. *HPLC, a practical user's guide*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2007, 238 p. ISBN 978-047-1754-015.
- [56] DOUŠA, Michal. *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Laboratorní odbor, 2002, 129 s. Učební texty pro pracovníky ÚKZÚZ. ISBN 80-865-4809-0.
- [57] DOUŠA, M. *Autosamplery HPLC* [online]. 2007 [cit. 2013-01-08]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [58] PACÁKOVÁ, Věra a Karel ŠTULÍK. *High Performance Liquid Chromatography: Určeno pro postgrad. studium UNALCO*. 1. vyd. Praha: SPN, 1990, 138 s. ISBN 80-706-6203-4.
- [59] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990, 384 s. ISBN 80-030-0569-8.
- [60] PROCHÁZKOVÁ, D. Nové stacionární fáze RP C18. *Pokroky v chromatografii a elektroforéze 2005: sborník [abstraktů z konference] : Olomouc, 7. až 10. února 2005*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2005, 145 s. ISBN 80-244-0984-4.
- [61] URBÁNEK, L., SOLICHOVÁ, D., SVOBODOVÁ, I., SOLICH, P. Využití monolitických kolon pro stanovení antioxidantních vitaminů A, E v klinické praxi. *Pokroky v chromatografii a elektroforéze 2005: sborník [abstraktů z konference] : Olomouc, 7. až 10. února 2005*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2005, 145 s. ISBN 80-244-0984-4.
- [62] PROCHÁZKOVÁ, D. Kolony pro separace, kde C<sub>18</sub> nestačí. *Advances in chromatography and electrophoresis 2007*. Olomouc: Univerzita Palackého Olomouc, 2007, s. 170. Original edition. ISBN 978-80-244-1705-9.
- [63] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 201 s. ISBN 80-246-0553-8.

- [64] ZHANG, Fa, Mathews NUNES, Brigitte SEGMULLER, Richard DUNPHY, Robert Henry HESSE a Sundara Katugam Srinivasetty SETTY. Degradation chemistry of a Vitamin D analogue (ecalcidene) investigated by HPLC-MS, HPLC-NMR and chemical derivatization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005, Vol. 40, No. 4, s. 850-863. ISSN 07317085.
- [65] ČSN 570509: Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování. Praha, Český normalizační institut, 1993, 6 s.
- [66] JANŠTOVÁ, Bohumíra. *Technologie mléka a mléčných výrobků*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012, 141 s. ISBN 978-80-7305-635-3.
- [67] DRAGOUNOVÁ, Hedvika. *Hodnocení jakosti mléka a mlékárenských výrobků: návody pro praktická cvičení*. Vyd. 1. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2003. 57 s. Živočišná výroba. ISBN 80-213-1029-4.
- [68] JANŠTOVÁ, Bohumíra a kol. *Hygiena a technologie mléka a mléčných výrobků: praktická cvičení*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2009. 2 sv. (84, 65 s.). ISBN 978-80-7305-061-0.
- [69] ANONYM. *MilkoScan FT 120: Operační manuál*. Dánsko, 1990.
- [70] STRÁNSKÁ, Vanda. *Izolace a stanovení vitamínu D v mléce*. FT-UTB Zlín, 2011. Diplomová. Univerzita Tomáše Bati. Vedoucí práce Ing. Daniela Sumczynski, Ph.D.
- [71] JAKOBSEN, J. *International Conference Vitamins, nutrition, diagnostics 2009: Vitamin D - The sunshine hormone in our food*. Vydání první. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009. Ediční středisko Univerzity Pardubice. ISBN 978-80-7318-809-2.
- [72] KURMANN, A. a H. INDYK. The endogenous vitamin D content of bovine milk: influence of season. *Food Chemistry*. 1994, Vol. 50, s. 75 - 81.
- [73] JENSEN, Robert G. *Handbook of milk composition*. San Diego: Academic Press, 1995, 919 p. Food science and technology international series.
- [74] ČSN EN 12821 (560047). *Potraviny - Stanovení vitamínu D metodou vysokoučinné kapalínové chromatografie - Stanovení cholekalciferolu nebo ergokalciferolu*. Prosinec 2012. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, 2012, 24 s.



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BHT	Butylhydroxidtoluen
CPM	Celkový počet mikroorganismů
DAD	Detektor diodového pole
DHA	Dokosahexaenová kyselina
EPA	Eikosapentaenová kyselina
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
GC	Gas chromatography - Plynová chromatografie
GC - MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HPTLC	High Thin Layer Liquid Chromatography Vysokoučinná tenkovrstvá chromatografie
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IR	Infrared - infračervené
KTJ	Kolonie tvořící jednotky
LC	Kapalinová chromatografie
MK	Mastné kyseliny
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NP	Normal Phase – normální fáze
PTH	Parathormon
RID	Refractive Index Detector – Refraktometrický detektor
RIL	Rezidua inhibičních látek
RP	Reverse phase - obrácená fáze

---

SPE	Solid Phase Extraction – extrakce na tuhé fázi
SOM	Počet somatických buněk
TLC	Thin Layer Chromatography – tenkovrstvá chromatografie
TPS	Tukuprostá sušina
THC	Tetrahydrofolát
UV	Ultraviolet - ultrafialové
UHT	Ultra High Temperature – vysoká teplota

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1 Regulace hladiny vitamínu D

Obr. 2 Syntéza vitamínu D<sub>3</sub>

Obr. 3 Blokové schéma HPLC

Obr. 4 Princip dávkování autosampleru Agilent

Obr. 5 Chromatograf Dionex Ultimate 3000

Obr. 6 MilkoScan FT 120

Obr. 7 Grafické rozložení všech naměřených hodnot tučnosti

Obr. 8 Grafické rozložení všech naměřených hodnot bílkovin

Obr. 9 Grafické rozložení všech naměřených hodnot laktózy

Obr. 10 Grafické rozložení všech naměřených hodnot celkové sušiny

Obr. 11 Grafické rozložení všech naměřených hodnot tukuprosté sušiny

Obr. 12 Vztah mezi základními složkami mléka

Obr. 13 Obsah vitamínu D v mléce dle jednotlivých svozných linek

Obr. 14 Chromatogram vzorku s přidavkem standardu cholekalciferolu

Obr. 15 Chromatogram svozné linky č. 6 - leden

Obr. 16 Kalibrační křivka cholekalciferolu v metanolu

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1 Průměrné složení kravského mléka

Tab. 2 Průměrné složení proteinů kravského mléka

Tab. 3 Zastoupení vybraných mastných kyselin mléčného tuku

Tab. 4 Obsah minerálních látek v 1 l mléka

Tab. 5 Obsah vitaminů v kravském mléce

Tab. 6 Rozdělení chromatografických metod

Tab. 7 Základní rozbor syrového mléka v závislosti na čase u svozné linky č. 6 [%]

Tab. 8 Popisná statistika základních složek mléka u svozné linky č. 6 [%]

Tab. 9 Základní rozbor syrového mléka v závislosti na čase u svozné linky č. 7 [%]

Tab. 10 Popisná statistika základních složek mléka u svozné linky č. 7 [%]

Tab. 11 Základní rozbor syrového mléka v závislosti na čase u svozné linky č. 8 [%]

Tab. 12 Popisná statistika základních složek mléka u svozné linky č. 8 [%]

Tab. 13 Základní rozbor syrového mléka v závislosti na čase u svozné linky č. 9 [%]

Tab. 14 Popisná statistika základních složek mléka u svozné linky č. 9 [%]

Tab. 15 Základní rozbor syrového mléka v závislosti na čase u svozné linky č. 30 [%]

Tab. 16 Popisná statistika základních složek mléka u svozné linky č. 30 [%]

Tab. 17 Souhrnná popisná statistika měření u všech svozných linek [%]

Tab. 18 Obsah vitamínu D u svozné linky č. 6

Tab. 19 Obsah vitamínu D u svozné linky č. 7

Tab. 20 Obsah vitamínu D u svozné linky č. 8

Tab. 21 Obsah vitamínu D u svozné linky č. 9

Tab. 22 Obsah vitamínu D u svozné linky č. 30

Tab. 23 Souhrnné popisné statistiky obsahu vitamínu D dle jednotlivých svozných linek

Tab. 24 Souhrnné popisné statistiky obsahu vitamínu D v daných měsících

Tab. 25 Souhrnné statistiky množství vitamínu D v syrovém kravském mléce