

Stanovení laktózy v mléku metodou Ramanovy spektroskopie

Mgr. Iveta Bělicová

Diplomová práce
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Iveta Bělicová**
Osobní číslo: **T14766**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Stanovení laktózy v mléku metodou Ramanovy spektroskopie**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Obsah laktózy v mléku a její význam ve výživě lidí
2. Přehled metod používaných pro stanovení laktózy
3. Princip Ramanovy spektroskopie pro stanovení laktózy v mléku

II. Praktická část

1. Návrh a příprava vzorků s proměnlivým obsahem laktózy
2. Naměření Ramanovských spekter laktózy, jejích složek a vzorků mléka
3. Vyhodnocení spekter a diskuze výsledků

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

- [1] FOX P. F., McSWEENEY P.L.H. Dairy Chemistry and Biochemistry. Blackie Academic and Professional, 1998, 478 p.
- [2] SMITH, Ewen a Geoffrey DENT. Modern Raman spectroscopy: a practical approach. Chichester: John Wiley, 2005, 210 p.
- [3] LI, Meimei, Jun CHEN, Jiajie XU, Shuilin FU a Heng GONG. Determination of Lactose in Milk by Raman Spectroscopy. Analytical Letters. 2015, vol. 48, issue 8, p. 1333-1340.
- [4] PEREIRA, Paula C. Milk nutritional composition and its role in human health. Nutrition. 2014, vol. 30, issue 6, p. 619-627.

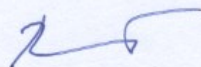
Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Martina Bučková, Ph.D.**

Ústav technologie potravin

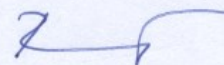
Datum zadání diplomové práce: **3. února 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **28. dubna 2017**

Ve Zlíně dne 3. února 2017



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: BĚLICOVÁ IVETA

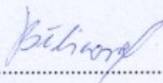
Obor: TECHNOLOGIE POTRAVIN

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 ¹⁾;
- 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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ 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 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít 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, považuji 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 11.5.2017


.....

¹⁾ 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 nevydávlečně 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 pořizovat 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.*

²⁾ *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).*

³⁾ *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 přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

ABSTRAKT

Tato práce je věnována stanovení laktózy v mléku metodou Ramanovy spektroskopie. V teoretické části je popsána laktóza („mléčný cukr“), její nutriční význam a možnosti stanovení. Část práce je věnována teorii Ramanovy spektroskopie s důrazem na stanovení laktózy. V praktické části práce byla naměřena spektra vzorků mléka, ve kterých byly vyhledány píky charakteristické pro laktózu, glukózu a galaktózu. Pro vyhodnocení intenzity vybraných píků byly využity dvě metody normování spekter – normování na fenylalanin a normování na krystalovou violet. Nejvýznamnější korelace s obsahem laktózy ve vzorku mléka byla nalezena u píku při 1085 cm^{-1} s použitím krystalové violeti. Pro kontrolní stanovení obsahu laktózy, glukózy a galaktózy v testovaných vzorcích mléka byla použita metoda HPLC.

Klíčová slova: laktóza, mléko, Ramanova spektroskopie, vibrační spektroskopie, HPLC

ABSTRACT

This thesis is dedicated to the determination of lactose in milk by the Raman spectroscopy. In the theoretical part, lactose („milk sugar“) and its nutrition value is described, as well as possibilities of lactose determination. Part of this study is focused on the theory of Raman spectroscopy and application of this method for the lactose determination. In the practical part of the thesis, spectra of milk samples were obtained and characteristic peaks for lactose, glucose and galactose were found. Two methods for spectra normalization were used – using phenylalanine peak and crystalline violet peak. Maximum at 1085 cm^{-1} showed a very strong correlation with lactose concentration in the sample using crystalline violet normalization. The HPLC method was applied for parallel determination of lactose, glucose and galactose content in milk samples.

Keywords: lactose, milk, Raman spectroscopy, vibrational spectroscopy, HPLC

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí své práce Mgr. Martině Bučkové, Ph. D. za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při tvorbě práce. Za pomoc při práci v laboratoři děkuji paní laborantce Ing. Ludmile Zálešákové.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 LAKTÓZA	12
1.1 CHEMICKÁ STRUKTURA A VLASTNOSTI	13
1.2 METABOLISMUS LAKTÓZY U ČLOVĚKA	15
1.3 VÝZNAM LAKTÓZY A JEJICH DERIVÁTŮ VE VÝŽIVĚ ČLOVĚKA	15
1.4 INTOLERANCE LAKTÓZY	17
2 PŘEHLED METOD POUŽÍVANÝCH PRO STANOVENÍ LAKTÓZY	20
2.1 POLARIMETRIE A REFRAKTOMETRIE	20
2.2 GRAVIMETRIE	21
2.3 KOLORIMETRIE.....	21
2.4 OXIDO-REDUKČNÍ TITRACE	22
2.5 ENZYMATICKÉ STANOVENÍ.....	22
2.6 CHROMATOGRFIE.....	23
2.6.1 Plynová chromatografie	24
2.6.2 HPLC.....	24
2.6.2.1 Obecný princip	24
2.6.2.2 Instrumentace	25
2.6.2.3 Stanovení sacharidů.....	27
3 RAMANOVA SPEKTROSKOPIE	28
3.1 OBECNÝ PRINCIP	29
3.1.1 Pružný rozptyl	30
3.1.2 Nepružný rozptyl.....	30
3.2 INSTRUMENTACE	31
3.3 INTERPRETACE RAMANOVÝCH SPEKTER	31
3.4 RAMANOVA SPEKTROSKOPIE PRO STANOVENÍ LAKTÓZY	32
II PRAKTICKÁ ČÁST	36
4 CÍL PRÁCE	37
5 MATERIÁL A METODY	38
5.1 CHARAKTERISTIKA VZORKŮ.....	38
5.2 CHEMIKÁLIE.....	38
5.3 PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	39
5.4 PŘÍPRAVA VZORKŮ.....	39
5.5 KONTROLNÍ STANOVENÍ SACHARIDŮ POMOCÍ HPLC.....	40
5.6 STANOVENÍ OBSAHU FENYLALANINU	41
5.7 RAMANOVA SPEKTROSKOPIE.....	41
5.8 NORMOVÁNÍ SPEKTER	42
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	43

6.1	STANOVENÍ LAKTÓZY V MLÉKU POMOCÍ HPLC	43
6.2	RAMANOVA SPEKTRA SACHARIDŮ.....	43
6.3	STANOVENÍ LAKTÓZY V MLÉKU POMOCÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE S VYUŽITÍM NORMOVÁNÍ NA FENYLALANIN	45
6.4	STANOVENÍ LAKTÓZY V MLÉKU POMOCÍ RAMANOVY SPEKTROSKOPIE S VYUŽITÍM NORMOVÁNÍ NA KRYSTALOVOU VIOLEŤ	49
6.5	SOUHRNNÁ DISKUZE	51
ZÁVĚR		54
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A INTERNETOVÝCH ZDROJŮ.....		55
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....		61
SEZNAM OBRÁZKŮ		62
SEZNAM TABULEK.....		63
SEZNAM PŘÍLOH.....		64

ÚVOD

Mléko je člověkem konzumováno již tisíce let a i v dnešní době má ve výživě svůj význam. Přestože se jedná o potravinu, kterou obestírá celá řada mýtů, jak je možné se přesvědčit nejen na nejrůznějších internetových stránkách a diskuzích, je nepopiratelným faktem, že je cenným zdrojem bílkovin, vápníku, fosforu, hořčíku a dalších nutrientů. Nezanedbatelné jsou také příjemné sensorické vlastnosti mléka i výrobků z něj. Ne všichni lidé jsou však schopni mléko konzumovat bez potíží. Kromě alergií vyvolaných mléčnými proteiny může způsobovat zdravotní komplikace porucha vstřebávání laktózy. Vzhledem k tomu, že odborníci na výživu důrazně varují před naprostým vyloučením mléka a mléčných výrobků z jídelníčku, reagují na to producenti výrobou produktů bez laktózy či s jejím sníženým obsahem. Monitorování obsahu laktózy je zde zásadní.

Stanovení laktózy v mléku či výrobcích z něj je možné několika způsoby. Pro využití v běžné praxi je však kladen důraz na rychlost a jednoduchost. Jednou z metod, která tyto požadavky splňuje, je Ramanova spektroskopie, jejíž popularita díky tomu nejen v potravinářství roste.

Teoretická část diplomové práce „Stanovení laktózy v mléku metodou Ramanovy spektroskopie“ je věnována popisu a významu „mléčného cukru“ spolu s přehledem možností jeho detekce a kvantifikace. Popsán je dále princip Ramanovy spektroskopie a interpretace získaných dat. Praktická část je věnována stanovení laktózy v běžném a bezlaktózovém mléku a ve vzorcích připravených jejich smísením. Jako referenční metoda je zde použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Pro vyhodnocení Ramanových spekter byly zvoleny dvě metody – první, založená na konstantním obsahu fenylalaninu ve vzorcích a druhá, která spočívá ve využití krystalové violeti coby interního standardu. Metoda s použitím krystalové violeti již byla publikována, v této práci jsou její výsledky ověřovány. Důraz je kladen zejména na testování fenylalaninu jakožto standardu, jelikož použití krystalové violeti s sebou nese jistá úskalí (nutnost přidání další chemické látky ke vzorku, určitá míra toxicity).

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 LAKTÓZA

Laktóza, označována také jako mléčný cukr, představuje hlavní sacharidovou složku mléka. Minoritně jsou v mléku zastoupeny i další sacharidy, ke kterým patří zejména glukóza, fruktóza, galaktóza, glukózaminy, galaktózaminy, neutrální a kyselé oligosacharidy [1].

Koncentrace laktózy v mléku je specifická v závislosti na živočišném druhu, viz Tab. 1. Mezi faktory, které dále ovlivňují obsah laktózy v mléku, patří zdravotní stav a výživa samice, stádium laktace aj. Obsah laktózy je nepřímo úměrný obsah lipidů a kaseinu v mléku, nejvyšší je v kolostru a v průběhu laktace postupně klesá [1, 2].

Tab. 1 Koncentrace laktózy v mléku vybraných druhů savců [1]

Druh	Laktóza [%]	Druh	Laktóza [%]	Druh	Laktóza [%]
Lachtan kalifornský	0,0	Myš	3,0	Kočka	4,8
Čepcolhřebenatý	0,0	Morče	3,0	Prase domácí	5,5
Medvěd banibal	0,4	Pes	3,1	Kůň	6,2
Delfin	0,6	Jelen sika	3,4	Šimpanz	7,0
Ježura	0,9	Koza	4,1	Makak	7,0
Plejtváč obrovský	1,3	Slon indický	4,7	Člověk	7,0
Králík	2,1	Kráva	4,8	Osel	7,4
Jelen lesní	2,6	Ovce	4,8	Zebra	7,4
Tuleň kuželozubý	2,6	Buvol	4,8	Kočkodan zelený	10,2
Krysa	2,6				

Zásadní vliv na obsah laktózy v mléku má mastitida. V případě tohoto onemocnění dochází k poškození tkáně, což vede ke snížení aktivity enzymů v sekrečních buňkách, a tedy k omezení biosyntézy laktózy. Z tohoto důvodu může být monitorování obsahu laktózy v mléku použito coby indikátor probíhajícího zánětu [3].

Laktóza je syntetizována v sekrečních váčcích Golgiho komplexu buněk mléčné žlázy pomocí enzymu laktózasyntázy z molekuly glukózy a UDP-galaktózy. UDP-galaktóza vzniká z glukózy sledem enzymaticky katalyzovaných reakcí a do Golgiho komplexu je aktivně transportována, na rozdíl od glukózy, pro jejíž vstup prostřednictvím specifického nosiče GLUT1 není zapotřebí energie [2, 4].

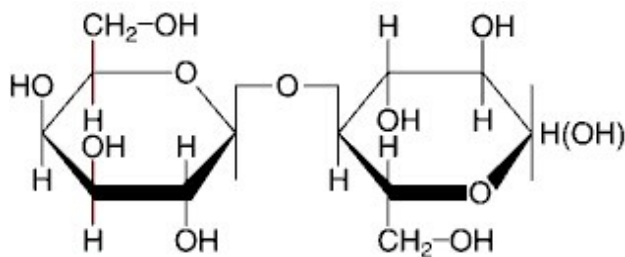
Spolu se sodnými, draselnými a chloridovými ionty má laktóza zásadní význam pro udržování osmotické rovnováhy mléka. Rychlost její syntézy tak představuje významný faktor ovlivňující objem produkovaného mléka v důsledku snahy o zachování osmolarity [4].

Význam laktózy spočívá primárně ve výživě sajících mláďat, kdy slouží jako zdroj energie. Důležitou roli sehrává také v technologii výroby celé řady mléčných výrobků. Laktóza představuje substrát pro bakterie mléčného kvašení, které jsou z ní schopny vytvořit kyselinu mléčnou, jež je nezbytná pro výrobu kysaných mléčných výrobků a sýrů. U zahuštěných, mražených a sušených výrobků ovlivňuje jejich texturní vlastnosti. Při použití vysokých teplot pro výrobu mléčných produktů se podílí na změnách jejich barvy a chuti. Změny stavu (amorfní x krystalická laktóza) mají zásadní vliv na produkci dehydratovaných mléčných výrobků [1].

Značná část lidské populace (přes 70 %) je postižena malabsorpcí laktózy. Tato porucha vstřebávání je zapříčiněna absencí, či příliš nízkou aktivitou enzymu laktázy (β -galaktozidázy), který štěpí laktózu v tenkém střevě [1, 2].

1.1 Chemická struktura a vlastnosti

Laktóza, chemicky O- β -D-galaktopyranozyl-(1 \rightarrow 4)-D-glukopyranóza (C₁₂H₂₂O₁₁), je disacharid, který se skládá z glukózy a galaktózy. Molekuly těchto jednoduchých sacharidů jsou spojeny β 1 \rightarrow 4 glykosidickou vazbou, viz Obr. 1. Laktóza se řadí mezi tzv. redukující sacharidy v důsledku přítomnosti volného poloacetalového hydroxylylu na C1 uhlíku glukózy, který se vyznačuje redukujícími účinky. Na základě polohy tohoto hydroxylylu jsou rozlišovány dva anomery laktózy – α a β [5].



Obr. 1 Molekula laktózy [6]

Vlivem podmínek prostředí podléhá laktóza mutarotaci. Při teplotě 20 °C se asi 62 % disacharidu nachází ve formě β -anomeru. S rostoucí teplotou se však poměr obou forem mění ve prospěch α -anomeru. Na rychlost mutarotace má vliv také pH. Při pH 4,0-6,0 dochází k nejméně intenzivním změnám, avšak pokud dojde k vychýlení mimo rozsah těchto hodnot, celý proces se významně urychluje [1, 5].

Jednotlivé anomery se liší svými vlastnostmi, především se jedná o:

- rozpustnost
- tvar a velikost krystalů
- hygroskopicitu
- schopnost stáčet rovinu lineárně polarizovaného světla
- sladivost

[1]

Rozpustnost α -laktózy je při 20 °C asi 7 g a v případě β -laktózy 50 g na 100 ml vody. V systému však souběžně probíhají procesy mutarotace a rozpouštění, a to do ustálení rovnováhy přibližně v poměru $\beta/\alpha \approx 1,60$. Celková rozpustnost laktózy při 20 °C tak odpovídá hodnotě 18,2 g na 100 ml vody (7 g α -laktózy + 1,60 x 7 g β -laktózy \approx 18,2 g). Rozpustnost α -anomeru výrazně roste v závislosti na zvyšující se teplotě prostředí. Při dosažení teploty 93,5 °C je rozpustnost obou forem shodná. Po překonání této hodnoty je již rozpustnějším anomerem α -laktóza [1].

Zahušťováním vodného roztoku laktózy při teplotách do 93,5 °C za vzniku přesyceného roztoku mohou být krystaly α -laktózy získány jako monohydrát. Krystaly jsou pevné a málo rozpustné. Jejich průměrná velikost by při výrobě mléčných výrobků neměla překročit 10 μm , aby nedošlo ke vzniku sensorické vady, tzv. písčitosti. Při teplotách nad 93,5 °C krystalizuje laktóza jako β -anhydrid (bezvodá forma). Optická otáčivost je u α -monohydrátu +89,4 ° a u β -anhydridu +35,0 °. V případě příliš rychlého sušení přesyceného roztoku laktózy krystalizace nemusí proběhnout, vzniká tak tzv. amorfní forma. Amorfní laktóza se vyznačuje vysokou viskozitou a značnou hygroskopicitou, což vede v přítomnosti vzdušné vlhkosti k tvorbě hrudek v sušených produktech [1, 7].

Mezi jednotlivými anomery existuje také rozdíl ve sladivosti. Zatímco α -laktóza se vyznačuje sladivostí 16 % standardu, u β -laktózy je tato hodnota dvakrát vyšší. Výsledná sladivost po ustavení rovnováhy mezi oběma formami se odhaduje na 27 – 32 % standardu roztoku sacharózy [1].

1.2 Metabolismus laktózy u člověka

Laktóza prochází trávicím traktem v nezměněné podobě až do tenkého střeva, kde se podrobuje štěpení enzymem laktázou (β -galaktosidáza, laktáza-phlorizin hydroláza). Tento enzym je vázán ke slizniční membráně enterocytů. Po rozštěpení vznikají z laktózy molekuly glukózy a galaktózy. Tyto monosacharidy jsou následně aktivně vstřebávány a přepravovány do jater portální žílou. Galaktóza je poté v játrech převedena na glukózu prostřednictvím tzv. Leloirovy dráhy. Pokud dojde vlivem deficience jednoho nebo více enzymů této dráhy k blokování konverze galaktózy na glukózu, dochází k vývoji galaktosemie. Galaktosemie je vrozená porucha, jejíž jedinou možností léčby je naprostá absence laktózy ve stravě. Pokud vynechána není, může dojít k fatálnímu poškození jater, či dokonce slepotě. Část galaktózy, která vzniká po rozštěpení laktózy, je také využita pro tvorbu glykoproteinů a glykolipidů, což jsou významné stavební prvky buněčných membrán [1, 8, 9].

1.3 Význam laktózy a jejích derivátů ve výživě člověka

Laktóza je pro člověka využitelná jako zdroj energie, její příjem vede ke zvýšení hladiny glukózy v krvi. Ve srovnání s ostatními jednoduchými sacharidy se vyznačuje nižší sladivostí, z tohoto důvodu je považována za vhodné sladidlo pro výrobu kojenecké výživy, neboť se předpokládá, že konzumace vysoce sladké potravy v tomto období může vést k přejídání a rozvoji preference sladké chuti v pozdějším věku [10].

Fermentace sacharidů v ústní dutině vede ke vzniku organických kyselin, které poškozují sklovinu zubu a zapříčiňují tak tvorbu zubního kazu. Za nejvíce kariogenní sacharid je považována sacharóza, jelikož *Streptococcus mutans*, dominantní bakterie ústní mikroflóry, je z ní schopen tvořit dextrany, které přispívají k tvorbě zubního plaku. Naopak laktóza je, společně s galaktózou, kariogenní v mnohem menší míře [10, 11].

Laktóza je dávana do souvislosti také se vstřebáváním vápníku. Ačkoli byla provedena řada studií, tento vztah zatím není zcela objasněn. Zatímco u zvířat byl pozitivní vliv laktózy pro vstřebávání vápníku v tenkém střevě prokázán, výsledky experimentů zaměřených na člověka jsou rozporuplné. Pozitivní vliv laktózy byl zaznamenán u kojenců, u dospělých je zmiňován spíše probiotický vliv laktózy uniklé štěpení v tenkém střevě, kdy dochází ke zvýšení transportu minerálů přes epiteliální stěnu buněk tlustého střeva. Jedním z možných vysvětlení rozdílných závěrů studií je fakt, že kromě laktózy se na vstřebávání vápníku podílí řada dalších složek potravy, proto je poměrně komplikované získat relevantní výsledky u dospělých ve srovnání se zvířaty nebo kojenci [10, 12, 13].

Některé studie dávají do souvislosti konzumaci mléka a mléčných výrobků s rozvojem některých typů rakoviny. Laktóza, respektive galaktóza coby produkt jejího metabolismu, je spojována s rakovinou ovarií. Na tuto asociaci poukazují výsledky experimentů provedených na zvířatech, které nicméně při testování lidí nebyly potvrzeny, za což může i multifaktoriální charakter onemocnění tohoto typu [10, 14].

V posledních letech je pozornost zaměřována také na deriváty laktózy s prebiotickým účinkem. Jedná se především o laktulózu, laktitol, laktosacharózu, či galaktooligosacharidy. Tyto látky nejsou hydrolyzovány v tenkém střevě, pokračují proto do tlustého střeva, kde jsou metabolizovány bakteriemi mléčného kvašení a bifidobakteriemi [10].

Prebiotika jsou tak definována jako „nestravitelné složky potravy, které příznivě ovlivňují zdraví hostitele tím, že selektivně stimulují růst a / nebo aktivitu bakterií v tlustém střevě“. Na pozitivním vlivu prebiotik se podílejí také konečné produkty jejich metabolismu, především laktát a mastné kyseliny s krátkým řetězcem. Mléko přežvýkavců se vyznačuje ve srovnání s mlékem mateřským menším počtem oligosacharidů, které mají bifidogenní vliv. Aplikace prebiotik do náhradní dětské výživy však vede k vyrovnání počtu bifidobakterií ve střevě ve srovnání s kojenými dětmi. Tyto látky se tak podílejí na snížení nežádoucí mikrobiální kolonizace v dětském trávicím traktu a mohou také stimulovat imunitní systém v důsledku své protizánětlivé aktivity [10, 15].

1.4 Intolerance laktózy

Jak již bylo výše zmíněno, pro vstřebání laktózy je stěžejní její enzymatické štěpení v tenkém střevě, které je zajištěno prostřednictvím enzymu laktázy. Aktivita tohoto enzymu je již při porodu značně vysoká a ještě nějakou dobu po něm stoupá. V pozdním dětském věku však u velké části lidské populace dochází ke značnému poklesu produkce laktázy. Nedostatek enzymu, nezbytného pro štěpení laktózy se nazývá hypolaktázie a zapříčňuje poruchy vstřebávání (malabsorpci), které mohou vést k nesnášenlivosti laktózy. Laickou veřejností je laktózová intolerance často zaměňována s alergií na mléko, v případě intolerance však nedochází k imunitní odezvě organismu, jako je tomu u alergie, která je vyvolávána mléčnými bílkovinami [1, 14, 16].

Hypolaktázie může být také vrozená, což znamená, že k produkci laktázy nedochází ani v kojeneckém věku. Takovýto deficit je však velmi vzácný a byl zdokumentován pouze u několika desítek jedinců, zejména ve Finsku. Za určitých okolností může dojít ke vzniku sekundární hypolaktázie. Jedná se o případy, kdy je plocha střeva zmenšena, např. resekcí, nebo poškozena. K poškození střevního epitelu dochází v případě některých onemocnění, jako je neléčená celiakie nebo střevní záněty. Pokud je střevní epitel zahojen, produkce laktázy je opět obnovena [17].

Výskyt primární hypolaktázie, tedy stav, kdy po skončení kojení dochází ke snižování produkce laktázy, je z geografického hlediska rozdílný. Prevalence nad 50 % byla zaznamenána v Jižní Americe, Africe a Asii, přičemž v některých asijských státech je to 100 %. V Evropě je to od 2 % (skandinávské země) do 70 % (Sicílie) [17].

Primárním mechanismem, který určuje, zda bude aktivita enzymu laktázy zachována i v pozdějším věku, je regulace genové transkripce. Gen pro lidskou laktázu (LCT) je lokalizován na dlouhém raménku druhého chromozomu, jeho konečný produkt má velikost 220 kDa a je silně glykosylován. Rozdíly v produkci laktázy jsou způsobeny mutacemi – ne však v genu LCT, ale v blízkce sousedícím genu MCM6, který reguluje genovou expresi LCT. Především se jedná o záměnu tyminu za cytosin v pozici 13910, částečně se uplatňuje také výměna adeninu za guanin v pozici 22018. Homozygoti (genotyp TT, AA) jsou schopni přijímat a štěpit laktózu po celý život. Tuto schopnost mají také heterozygoti (genotyp CG/AT), tito jsou však náchylnější ke vzniku intolerance v důsledku onemocnění

tlustého střeva apod. Naopak homozygoti (genotyp GG, CC) se vyznačují nonpersistencí laktózy, ztrácejí tedy schopnost štěpit mléčný cukr mimo dětský věk [18, 19, 20].

Základní hypotézy o tom, proč je schopnost trávit laktózu v dospělém věku u několika populací na světě běžná, existují celkem tři. První z nich, kterou podporují výsledky fylogenetických analýz, předpokládá, že se jedná o evoluční adaptaci ke konzumaci mléka jako dostupného zdroje energie, která souvisí s domestikací zvířat. Dále je konzumace mléka dávána do souvislosti s příjmem vápníku v populacích, jež se potýkají s nedostatkem vitamínu D. Třetí hypotéza potom mléku přisuzuje význam náhradního zdroje vody ve vyprahlých oblastech [21].

Intolerance laktózy je definována jako soubor příznaků (bolest a distence střev, barborygmus, plynatost, průjem), které jsou způsobeny přítomností laktózy v tlustém střevě v důsledku hypolaktázie. Nesnášenlivost laktózy však způsobuje i další potíže, jako je nevolnost nebo zvracení, ale vyznačuje se i celou řadou systémových příznaků, mezi které patří např. bolesti a točení hlavy, ztráta koncentrace, únava, bolesti svalů a kloubů, bolest v krku, ztráta koncentrace [22].

Výše popsané příznaky vznikají z několika důvodů. Laktóza, jakožto sacharid, je osmoticky aktivní, což zapříčiňuje vyšší sekreci elektrolytů a vody do střeva. Dilatace tenkého střeva, způsobená osmózou, vede ke zrychlení pohybu tráveniny tenkým střevem a následnému průjmu. V tlustém střevě je pak laktóza rozkládána přítomnými bakteriemi za vzniku plynů [17].

Diagnostika laktózové intolerance je možná několika způsoby. Orientační expoziční test je snadno proveditelný i v domácích podmínkách. Jeho princip spočívá ve sledování příznaků 4 hod po požití 1 litru mléka. Další možností je tzv. laktózový toleranční test, kdy je perorálně podán roztok 50 g laktózy a následně je sledována hladina glukózy v krvi. V tomto případě však mohou vést některá onemocnění, např. diabetes k falešně negativním výsledkům. Dechový vodíkový test představuje neinvazivní, jednoduchou metodu, kdy je podáván testovací roztok laktózy a následně se po dobu 3 hodin v 30 minutových intervalech měří množství vodíku v dechu. I tento způsob může přinést falešné výsledky v případě kouření, plicních poruch, nedostatečném hladovění apod. Informace o aktivitě laktázy je

možné získat také při biopsii sliznice tenkého střeva s následným imunohistochemickým vyšetřením. Nejspolehlivější metodou je však genetické vyšetření, pomocí kterého jsou stanoveny polymorfismy odpovědné za deficit laktázy [20, 23, 24].

Lidé trpící laktózovou intolerancí musejí snížit příjem laktózy. Nejsou však nuceni zcela se vzdát mléka a mléčných výrobků. V dnešní době jsou již dostupné produkty, do kterých je přidávána laktáza, a kde tudíž dochází k hydrolýze laktózy za vzniku glukózy a galaktózy. Takto upravené mléko se vyznačuje sladší chutí, která může být spotřebiteli vnímána jako nepřírozená. Proces je také poměrně finančně náročný, což se odráží na maloobchodní ceně bezlaktózového mléka. Alternativu tak představují chromatografické procesy, které umožňují separaci laktózy. Aby byl výsledný produkt svou chutí co nejpodobnější běžnému mléku, mohou být při výrobě kombinovány oba postupy [25].

Obsah laktózy se v jednotlivých druzích výrobků značně liší. Zatímco její nejvyšší obsah se vyskytuje v mléku jako takovém, a to i sušeném, v másle či dlouho zrajících sýrech se jedná o výrazně menší množství [26].

2 PŘEHLED METOD POUŽÍVANÝCH PRO STANOVENÍ LAKTÓZY

Rané pokusy o stanovení obsahu laktózy v mléku vycházely z jednoduché matematické operace, a sice rozdílu. Laktóza byla vypočtena odečtením obsahu bílkovin, tuků a popela od celkového obsahu pevných látek. Tato metoda byla nespecifická a nepřesná. Jelikož byla laktóza považována za jediný mléčný sacharid a další sacharidické složky nebyly uvažovány, docházelo k mylným interpretacím výsledků. Od těchto prvotních pokusů uplynulo již bezmála 100 let, které s sebou přinesly technologický pokrok a rozvoj metod, takže je v současné době k dispozici široká škála možností pro detekci a kvantifikaci laktózy v mléku, potažmo mléčných výrobcích [27].

2.1 Polarimetrie a refraktometrie

Obě tyto metody jsou založeny na měření optických fyzikálních vlastností laktózy. V případě refraktometrie je měřen index lomu. Index lomu je poměr rychlosti světla ve dvou optických prostředích, je měřen refraktometrem a u mléka nabývá hodnot 1,3440 – 1,3485. Na naměřené hodnotě má podíl zejména obsah vody a laktózy. Z tohoto důvodu je při analýze používána voda jako slepý vzorek [28].

Laktóza ve své molekule obsahuje chirální (asymetrický) uhlík, tudíž se řadí mezi opticky aktivní látky. Tyto látky charakterizuje schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla. Tato vlastnost je využívána při měření polarimetrem. Úhel stáčení roviny polarizovaného světla je pak přímo úměrný koncentraci laktózy, což je možné vyjádřit následujícím vztahem:

$$[\alpha]_D^{20} = 100 * \frac{\alpha}{l * c},$$

kde α je naměřený úhel stočení, $[\alpha]_D^{20}$ měrná otáčivost měřené látky při teplotě 20 °C a dané vlnové délce D (obvykle je využívána sodíková výbojka – 589 nm), l šířka vrstvy stanovované látky, respektive šířka květy v dm a c koncentrace stanovované látky v g*ml⁻¹.

¹. Hodnota $[\alpha]_D^{20}$ pro bezvodou laktózu odpovídá +55,4 ° [2, 28].

Před samotným měřením musí být vzorek mléka upraven odstraněním lipidů a proteinů, čehož je dosaženo pomocí precipitace a filtrace. Je nezbytné, aby byl vzorek po tomto procesu čirý, jelikož i malé množství srážecího činidla negativně ovlivňuje měření [28].

2.2 Gravimetrie

Princip této metody spočívá ve využití redukujících vlastností některých sacharidů včetně laktózy. Při tomto typu stanovení dochází k vyredukování oxidu měďnatého z Fehlingova činidla, následně probíhá sušení a vážení. Obsah laktózy koreluje s obsahem Cu_2O a je určován pomocí Munsen-Walkerových tabulek [27].

2.3 Kolorimetrie

Kolorimetrické stanovení je založeno na reakci laktózy coby redukujícího sacharidu s určitými látkami v silně kyselém nebo zásaditém prostředí za vzniku barevných roztoků. Intenzita tohoto zbarvení je měřena a následně srovnávána s hodnotami standardů. Reaktanty využívané pro kolorimetrické stanovení a vlnová délka jejich absorpčních maxim jsou uvedeny v Tabulce 2 [29].

Tab. 2 Reaktanty pro kolorimetrii a vlnová délka pro jejich stanovení [29]

Reagencie	Vlnová délka [nm]
antron	580
fenol	480
metylamin	540
hexakynoželezitan draselný	420
3,5 – dinitrosalicylová kyselina	570

Kolorimetrie je citlivá metoda, je však nezbytné, aby probíhala za přesně stanovených podmínek. Kromě samotné laktózy je možné současně stanovovat také produkty její hydrolyzy - glukózu a galaktózu. Podmínky jsou nastaveny tak, aby sloučeniny jednotlivých

sacharidů měly absorpční maxima při odlišných vlnových délkách a nedocházelo tak k vzájemným interferencím [30].

2.4 Oxido-redukční titrace

Pro stanovení laktózy pomocí oxido-redukční titrace je opět využívána přítomnost volného poloacetalového hydroxylylu na její molekule, který je schopen redukce, v tomto případě obvykle mědi. Pro analýzu je využíváno Fehlingovo činidlo nebo chloramin-T. Ze vzorku musejí být předem odstraněny lipidy a proteiny, proto je upravován stejně jako pro polari-metrické stanovení, viz výše [1, 2].

Při využití Fehlingova činidla dochází k redukci CuSO_4 za varu na Cu_2O . Síran měďnatý, který se nachází v baňce je postupně redukován laktózou přidávanou z byrety až do bodu ekvivalence, kdy dojde ke změně barvy přítomného indikátoru. Objem roztoku laktózy potřebný pro dosažení tohoto bodu je zaznamenáván a ze získaného výsledku je výpočtem stanoven obsah laktózy. Tato metoda je označována jako Lane-Eyónova. Jelikož stanovení komplikuje nízká ostrost bodu ekvivalence při použití CuSO_4 , je dnes preferován chloramin-T [1, 2].

2.5 Enzymatické stanovení

Na biochemických reakcích enzymů je založena řada metod pro stanovení laktózy. Jejich základem je tzv. Boehringer-Manheimova metoda, kdy dochází k hydrolýze laktózy ve vzorku na galaktózu a glukózu za účasti enzymu β -galaktosidázy ve vodném prostředí. D-galaktóza je následně oxidována na galaktonovou kyselinu pomocí NAD^+ za přítomnosti β -galaktózodehydrogenázy. Poté je spektrofotometricky při 340 nm stanovována koncentrace NADH, která dle stechiometrického poměru odpovídá koncentraci kyseliny galaktonové. Tato metoda je jednoduchá, specifická a levná, limitující je ale práce s termolabilními enzymy [31].

Další snížení finanční náročnosti přinášejí modifikace původní metody, např. při použití thio- NAD^+ namísto NAD^+ je získaný thio-NADH možné analyzovat při 405 nm. Tento

posun vlnové délky je zcela zásadní, jelikož přístroje pro analýzu ve viditelné oblasti spektra jsou levnější než UV analyzátory [32].

V posledních letech se do centra pozornosti dostávají také biosenzory s imobilizovanými enzymy a následnou elektrochemickou detekcí. Některé jsou založeny na hydrolýze laktózy na glukózu a galaktózu. Glukóza je pomocí enzymu glukózooxidázy přeměněna na glukonát a peroxid vodíku, který může být měřen např. pomocí platinové elektrody nebo redukován pomocí peroxidázy a detekován argentchloridovou elektrodou [33, 34].

Na využití enzymatických reakcí je postavena také tzv. diferenční pH metoda. Laktóza je stanovována měřením změn pH v důsledku reakce glukózy a ATP za přítomnosti hexokinázy po přidání β -galaktozidázy ke vzorku. Změna pH je přímo úměrná obsahu laktózy [35].

2.6 Chromatografie

Chromatografické metody jsou založeny na separaci složek obsažených ve vzorku. Po rozdělení je možné identifikovat a stanovit mnoho anorganických i organických látek. Svým určením jsou to především metody kvalitativní a kvantitativní analýzy, jsou však také využitelné coby metody preparativní, kdy slouží k získání vyššího množství čistých látek. Tyto metody jsou založeny na nanášení vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. První z nich je stacionární (nepohyblivá), na jejíž začátek je umístován vzorek a přes kterou prochází fáze druhá – mobilní. Mobilní fází může být kapalina nebo plyn. Svým pohybem unáší vzorek soustavou. Složky vzorku, které jsou zachycovány stacionární fází, se při pohybu zpožďují, v důsledku čehož dochází k rozdělení jednotlivých složek v závislosti na síle této interakce [36].

Chromatografických metod existuje celá řada, je možné je rozdělit podle skupenství mobilní fáze, uspořádání fáze stacionární, či podle povahy děje, ke kterému během separace dochází. Pro stanovení laktózy v mléku jsou využívány především dvě metody, a to plynová a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [29, 36].

2.6.1 Plynová chromatografie

Vzorek je u této metody aplikován do proudu tzv. nosného plynu, který jej unáší kolonou a představuje tak mobilní fázi. Složky vzorku se během prostupu kolonou rozdělují a při výstupu z kolony jsou postupně zaznamenávány detektorem v podobě elučního píku. Veličiny charakterizující tento pík (plocha, výška, šířka v poloviční výšce) korelují s koncentrací analyzované složky [36].

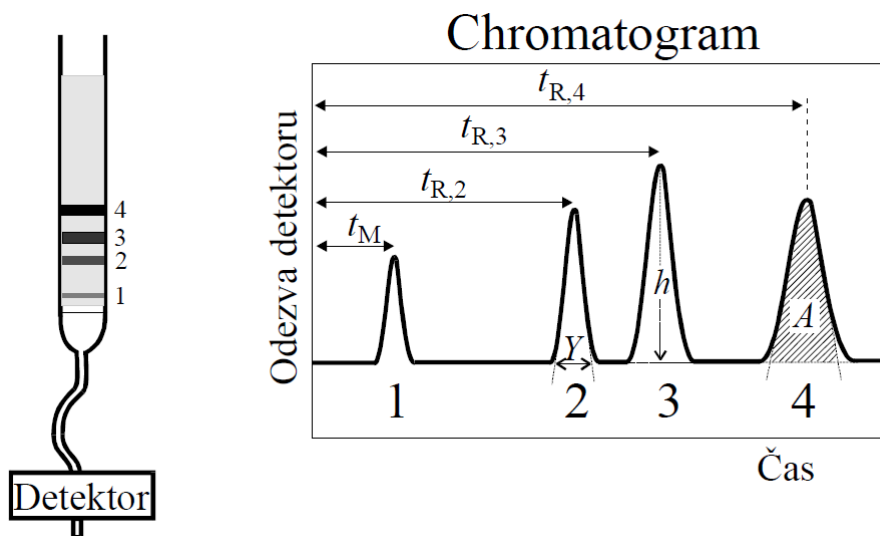
Aby bylo možné analyzovat nedostatečně těkavé látky, tedy i laktózu, je nutné do přípravy vzorku zařadit derivatizaci. Ta spočívá v převedení analytu na jeho derivát, jenž se vyznačuje vyšší těkavostí. Nejpoužívanější metodu derivatizace představuje silylace, kdy je kyselý vodík nahrazen alkylsilyl- nebo halogensilyl- skupinou [37].

2.6.2 HPLC

Při HPLC neboli vysokoúčinné kapalinové chromatografii je, jak už název napovídá, mobilní fáze tvořena kapalinou. V klasické kapalinové chromatografii je pohyb mobilní fáze realizován pouze prostřednictvím gravitační síly. Tento způsob však neposkytuje potřebnou účinnost, proto je zařazováno vysokotlaké čerpadlo, které umožňuje prostup kapaliny drobnými zrníčky sorbentu, jež kladou mobilní fázi značný odpor [36].

2.6.2.1 Obecný princip

Nejběžnější technikou, která je prováděna za konstantních podmínek, je tzv. eluční metoda, která je založena na vymývání vzorku nosnou kapalinou. Vzorek je dávkován jednorázově do proudu nosné kapaliny před vstupem do kolony. Jednotlivé složky jsou postupně zachycovány různou měrou ve stacionární fázi. Doba setrvání látky v této fázi je závislá na velikosti interakcí a je určující pro pořadí, ve kterém látky opouštějí kolonu. Z kolony tak nejdříve vychází složka, která je zachycována nejméně. Čas, za který analyzovaná složka projde kolonou, je pro ni za daných experimentálních podmínek charakteristický. Signál z detektoru je zaznamenáván v závislosti na čase, případně objemu proteklé kapaliny. Vzniklý záznam se nazývá chromatogram, viz Obr. 2 [36, 38].



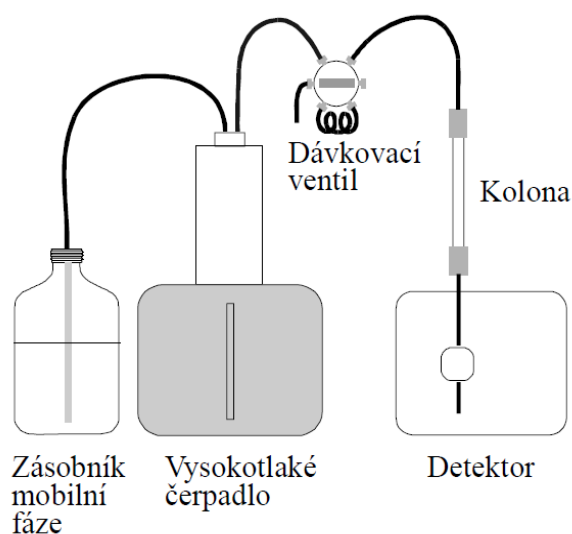
Obr. 2 Ukázka chromatogramu [38],

kde: t_M - mrtvý čas kolony, t_R - retenční čas složky vzorku, Y - šířka píku při základně, h - výška píku, A - plocha píku

Chromatogram je tvořen sérií elučních křivek neboli píků. Plocha uzavřená píkem koreluje s kvantitativním zastoupením dané složky. Doba, po kterou se nachází molekula analyzované složky v koloně, se označuje jako retenční čas t_R . Tuto dobu je možné rozdělit na dvě části – čas, po který molekula setrvává v mobilní fázi, tzv. mrtvý retenční čas t_M a čas strávený ve stacionární fázi neboli redukovaný retenční čas – t'_R . Retenční data vyjadřují umístění maxima daného píku a jsou tak nezbytná k jeho identifikaci [36, 38].

2.6.2.2 Instrumentace

Vysokoučinná kapalinová chromatografie je instrumentálně náročnou technikou kapalinové chromatografie. K účinné separaci je zapotřebí dostatečně malých zrníček sorbentu. Ta ale kladou prostupující kapalině značný odpor, proto je nutné pracovat při vysokém tlaku [38].



Obrázek 1

Obr. 3 Základní schéma přístroje pro HPLC [38]

Transport mobilní fáze zajišťuje vysokotlaké čerpadlo. Materiál čerpadla je volen tak, aby nedošlo k narušení mobilní fáze, případně její kontaminaci uvolňujícími se látkami. Jedná se tak např. o nerezovou ocel, keramiku nebo plast. Pro dávkování vzorku je běžně využíván šesticestný ventil s dávkovací smyčkou definovaného objemu. Při dávkování nesmí dojít k přílišným fluktuacím průtokové rychlosti mobilní fáze [39].

Samotná separace složek probíhá v náplňových kolonách. Ty musejí odolat vysokému tlaku mobilní fáze, jsou proto vyrobeny z ocelové nebo tlustostěnné skleněné trubice. Kolony pro analytické využití jsou poměrně krátké: 3 – 30 cm, jejich vnitřní průměr je 2 – 5 mm. Stacionární fáze bývá obvykle oxid křemičitý. Dále jsou používány také hydrofobní fáze s navázanými uhlovodíkovými funkčními skupinami, granulované iontoměniče apod. [39].

Nejpoužívanějším typem detektorů pro analýzu sacharidů jsou detektory založené na měření refrakčního indexu. Je tomu tak proto, že tento typ detektoru nevyžaduje použití fluoroforu nebo chromoforu, tudíž není nutná ani derivatizace vzorků. Dalšími typy detektorů v HPLC jsou fotometrické, fluorimetrické, či elektrochemické detektory. Stále častěji je využíván také hmotnostní detektor s možností identifikace jednotlivých látek vycházejících z kolony na základě získaných hmotnostních spekter [40].

2.6.2.3 Stanovení sacharidů

Metoda HPLC je pro stanovení sacharidů v potravinářské praxi běžně využívána, ať už se jedná o mono-, či oligosacharidy, potažmo polysacharidy, které však musejí být před měřením podrobeny hydrolyze. Každá analýza vždy začíná přípravou vzorku, což obvykle zahrnuje extrakci a přečištění. Extrakce je takový proces, který vede k přechodu stanovené složky z původní směsi, ve které se nachází, do rozpouštědla. Ideálním rozpouštědlem pro mono- a disacharidy se zdá být voda, její nevýhoda však tkví v tom, že při jejím použití dochází k extrakci také dalších polárních látek nacházejících se v mléku a dalších potravinách, např. aminokyselin nebo proteinů, které mohou v chromatografickém procesu interferovat. Z tohoto důvodu jsou využívány extrakční směsi, např. etanol s vodou [39].

V získaném cukerném roztoku se stále nachází část rozpuštěných látek nesacharidového původu, která se spolu se zákalem ze vzorku odstraňuje v procesu čiření. Čiřící přípravky reagují s koloidními látkami za vzniku sraženiny, která je v následujícím kroku odstraněna filtrací za vzniku čirého roztoku. Čiřící prostředky jsou voleny na základě metody stanovení, vždy ale tak, aby docházelo k co nejmenší adsorpci sacharidů. Široce používaným čiřidlem je octan olovnatý či Carrezovy reagentie (síran zinečnatý a hexakyanoželeznatan draselný) [39].

K samotné separaci může dojít několika způsoby v závislosti na ději, který během rozdělování převládá:

- gelová chromatografie – rozdělení složek podle velikosti v pórovité stacionární fázi, je zde uplatňován „efekt molekulového síta“, kdy jsou nejmenší molekuly v gelu zadržovány nejdéle
- iontově výměnná chromatografie – rozdělení na základě různé velikosti elektrostatických přitažlivých sil mezi funkčními skupinami stacionární fáze, které jsou označovány jako iontoměniče, a ionty vzorku
- rozdělovací chromatografie – rozdělení na základě odlišné rozpustnosti složek ve stacionární a mobilní fázi
- adsorpční chromatografie – rozdělení na základě různé schopnosti jednotlivých složek poutat se na stacionární fázi [36, 39].

3 Ramanova spektroskopie

Spektroskopie je studium interakce elektromagnetického záření se sledovanou látkou. Spektroskopické metody jsou založeny na fyzikálních jevech, jako je absorpce, emise, fluorescence nebo rozptyl. Jedná se o metody využitelné v kvalitativní i kvantitativní analýze vzorků.

Základy Ramanovy spektroskopie byly položeny ve 20. letech 20. století, kdy byl Adolfem Smekalem pozorován a popsán jev neelastického optického rozptylu dopadajícího paprsku světla. Rakouský vědec publikoval svou teoretickou práci v roce 1923, experimentální důkaz tohoto jevu získal o 5 let později indický vědec Chandrasekhara Venkata Ramanovi, který byl za svůj objev v roce 1930 oceněn Nobelovou cenou a jehož jménem byla tato metoda vibrační molekulové spektroskopie nazvána [41].



Obr. 4 C. V. Raman [42]

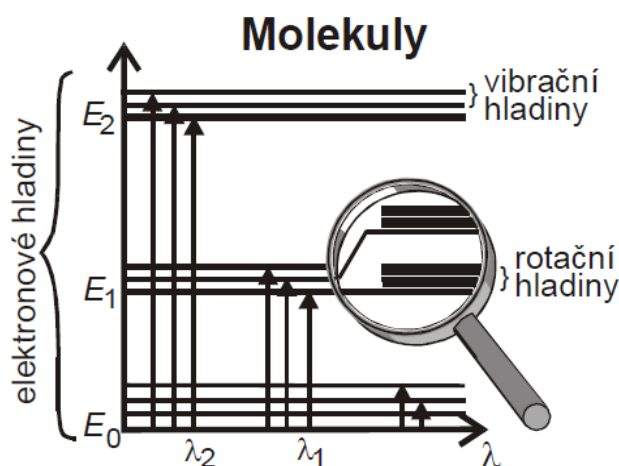
Přes veškeré výhody, které analýza pomocí Ramanovy spektroskopie nabízí, se do popředí zájmu analytických chemiků dostala tato metoda až na konci 80. let. Její rozšíření pro rutinní praxi bylo limitováno především náročností výroby využívaných přístrojů a z toho plynoucí vysokou cenou analýz. Technologický pokrok, který přinesl rozvoj zdrojů světla, detektorů, ale také výpočetní techniky nezbytné pro interpretaci získaných dat, vedl ke značnému rozšíření využívání Ramanovy spektroskopie. Potravinářství představuje pouze

jednu z mnoha oblastí využití této metody. Své uplatnění nalézá v medicínském a farmaceutickém výzkumu, kriminalistice, ale také např. ve strojírenství [43].

3.1 Obecný princip

Principem Ramanovy spektroskopie je měření rozptýleného záření vzniklého v důsledku interakce excitačního záření s molekulami vzorku za současné změny jejich vibračních a rotačních stavů. Ramanův efekt popisuje stav, kdy se frekvence malého zlomku rozptýleného záření liší od frekvence dopadajícího monochromatického záření. Zdrojem světla jsou lasery. Při dopadu fotonu na vzorek může dojít k pružné nebo nepružné srážce. Většina fotonů svou energii po interakci s molekulou vzorku nezmění, pouze velmi malé množství ano. Rozdíl energií dopadajícího a rozptýleného fotonu vždy odpovídá některému z rotačních nebo vibračních energetických přechodů v molekule [36, 41].

Atomy a molekuly z nich složené mohou měnit svůj energetický stav přijutím nebo vyzářením energie, přičemž tato energie může nabývat pouze určitých diskrétních hodnot. V atomech za tyto interakce zodpovídají elektrony. Elektronové hladiny existují také v molekulách, jejich energie je však ovlivňována také kmitáním atomů kolem rovnovážných poloh. I tato energie je kvantována a jednotlivým vibračním stavům odpovídá určitá energie. Kromě tohoto molekula vykonává další pohyb jako celek, a to pohyb rotační. Kromě elektronových energetických hladin tak v molekule vznikají vibrační a rotační energetické podhladiny [38].



Obr. 5 Schématické znázornění pochodů spojených s výměnou energie mezi zkoumanou látkou a zářením [38]

3.1.1 Pružný rozptyl

Pružný rozptyl, označován jako Rayleighův, představuje takový stav, kdy molekula po srážce s fotonem přejde do vyššího energetického stavu a po návratu do stavu základního emituje stejné množství energie. Foton vyzářený vzorkem má tak stejnou vlnovou délku jako foton pocházející ze zdroje světla [41, 43].

3.1.2 Nepružný rozptyl

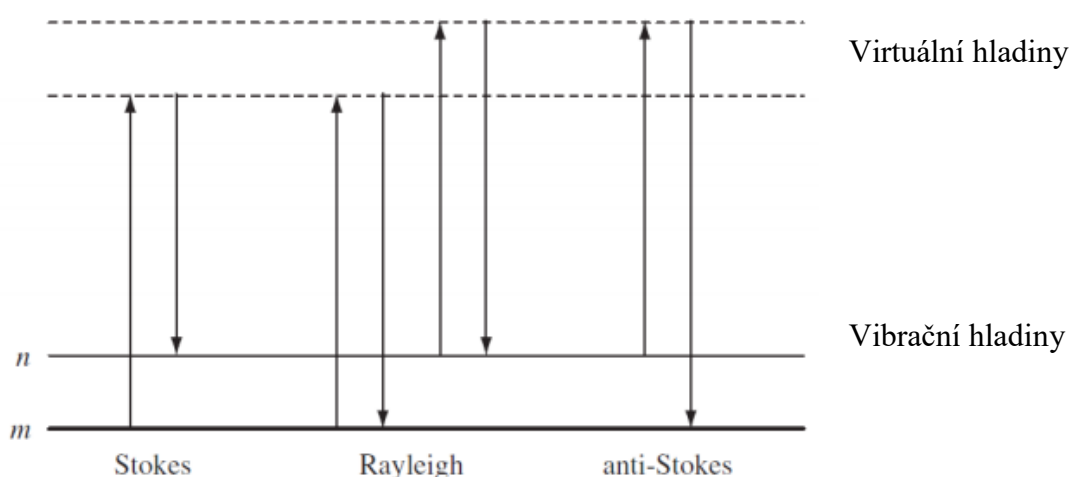
Nepružný rozptyl je označován jako Ramanův. Dochází k němu po neelastické srážce fotonu s molekulou. Existují dvě možnosti vzniku tohoto jevu:

1) Stokesův posun

Molekula po srážce s fotonem přejde na vyšší energetickou hladinu, ale při zpětném přechodu se nevrátí do stavu základního, ale zůstane v některém vibračním nebo rotačním mezistavu. Vyslaný foton je proto charakterizován nižší energií a delší vlnovou délkou.

2) Anti – Stokesův posun

Molekula se nachází v některém z energeticky vyšších stavů již před srážkou s fotonem a v důsledku této srážky se vrací do stavu základního. Vyslaný foton má tedy vyšší energii a nižší vlnovou délku [36, 41, 43].



Obr. 6 Diagram energetických hladin po interakci fotonu a molekuly [36]

3.2 Instrumentace

Ramanovy spektrofotometry je možné rozdělit na disperzní a nedisperzní. Disperzní spektrofotometry využívají pro rozklad světla hranol nebo difrakční mřížku. Druhou skupinu představují spektrofotometry s interferometry. Tento typ přístrojů pracuje na principu interference světla, pro získání klasického spektrálního záznamu vyžaduje matematickou metodou Fourierovy transformace [44].

Jako zdroj světla byly původně využívány rtuťové lampy, v 60. letech se však dostaly do popředí laserové zdroje, které tyto lampy postupně zcela nahradily. Laserové zdroje poskytují stabilní a intenzivní paprsek záření. V Ramanově spektroskopii je využívána široká škála laserů, např. argonový iontový, krypton iontový, či helium-neonový laser. K oddělení relativně slabých Ramanových čar od silných Ralyeighových jsou využívány filtry [44].

Jako detektory byly v minulosti využívány termoelektricky chlazené fotonásobiče a fotodiody. Byly však nahrazeny zařízeními vyznačujícími s vyšší citlivostí, tzv. CCD čipy [44].

V laboratorních podmínkách bývá k Ramanově spektrofotometru připojen mikroskop, který se používá pro zaostření paprsku na vzorek a jeho vizuální kontrolu. Součástí je počítačová technika umožňující ovládání. Existují však také přístroje přenosné a kapesní, které jsou nezastupitelné např. při zkoumání velmi křehkých vzorků. Využití krátkovlnných laserových zdrojů v Ramanových spektrofotometrech otevírá dveře využívání telekomunikačních typů optických vláken, kdy mohou být sondy provozovány na velké vzdálenosti (někdy až >10 m) a Ramanovo spektrum tak může být zaznamenáno, aniž by došlo k ohrožení výzkumníka v nebezpečném prostředí [44].

3.3 Interpretace Ramanových spekter

V získaných Ramanových spektrech je možné identifikovat strukturní jednotky v molekulách pomocí charakteristických frekvencí a jejich intenzit. Tato spektra poskytují informace o vibračních pohybech víceatomových částic a jsou pro každou látku jedinečná,

představují proto ekvivalent k lidskému „otisku prstu“. V Ramanově spektru intenzita naměřených pásů odpovídá druhé mocnině změny polarizovatelnosti během vibračního pohybu. Vzhled spekter je tak silně ovlivněn symetrií molekul a symetrií jednotlivých vibračních pohybů [45].

Ramanova spektroskopie umožňuje identifikaci chemických individuí, často je však využívána jako doplňková metoda k jiným analytickým metodám, především infračervené spektroskopii, kdy je využívána ke stanovení nepolárních skupin (C=C, C-C, C-S, S-S), které jsou v infračerveném spektru málo intenzivní.

3.4 Ramanova spektroskopie pro stanovení laktózy

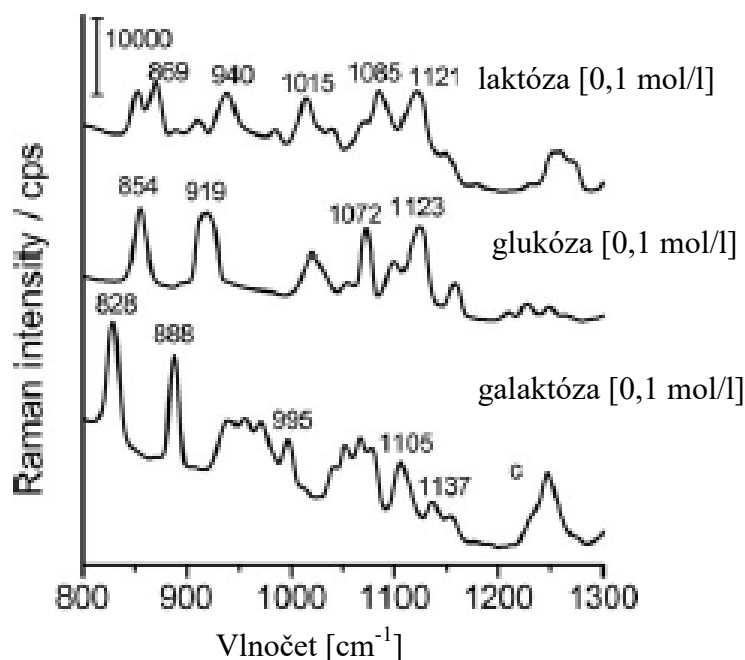
Ramanova spektroskopie představuje ekonomicky výhodný, rychlý a jednoduchý způsob analýzy biologických vzorků, tedy i komponent mléka včetně laktózy. Jakožto vibrační metoda spektroskopie nabízí možnost rozlišení strukturně podobných molekul, jako jsou galaktóza a glukóza [46].

Jako charakteristická oblast Ramanova spektra pro mléčné sacharidy byl určen rozsah vlnočtu $1200 - 800 \text{ cm}^{-1}$. Vznik píků v této oblasti souvisí s protahováním vazeb C=O a C-C a deformací C-O-C, což odkazuje na glykosidickou vazbu [47].

Na determinaci laktózy v mléku se ve svém výzkumu blíže zaměřili Li a kol. [46] Pro analýzu bylo nezbytné naměřit Ramanova spektra laktózy jako takové, ale také jejich samotných složek – monosacharidů glukózy a galaktózy, viz Obr. 3. Roztoky jednotlivých sacharidů stejně jako vzorky mléka není nutné před vlastním měřením speciálně upravovat. Detekce laktózy ve vodném prostředí je však komplikovaná. Z tohoto důvodu bylo z připravených cukerných roztoků a vzorků před samotným měřením odpařováno rozpouštědlo. Mléko ve své sušené podobě bývá při měření Ramanových spekter využíváno běžně z důvodu eliminace nežádoucí fluorescence [46, 48].

Aby bylo možné kvantifikovat laktózu v mléku, je potřebné změřit standardy jednotlivých sacharidů v širším rozsahu koncentrací a získat tak kalibrační křivku, se kterou je možné srovnat data analyzovaných vzorků mléka a stanovit tak obsah laktózy v nich. Vzorky i

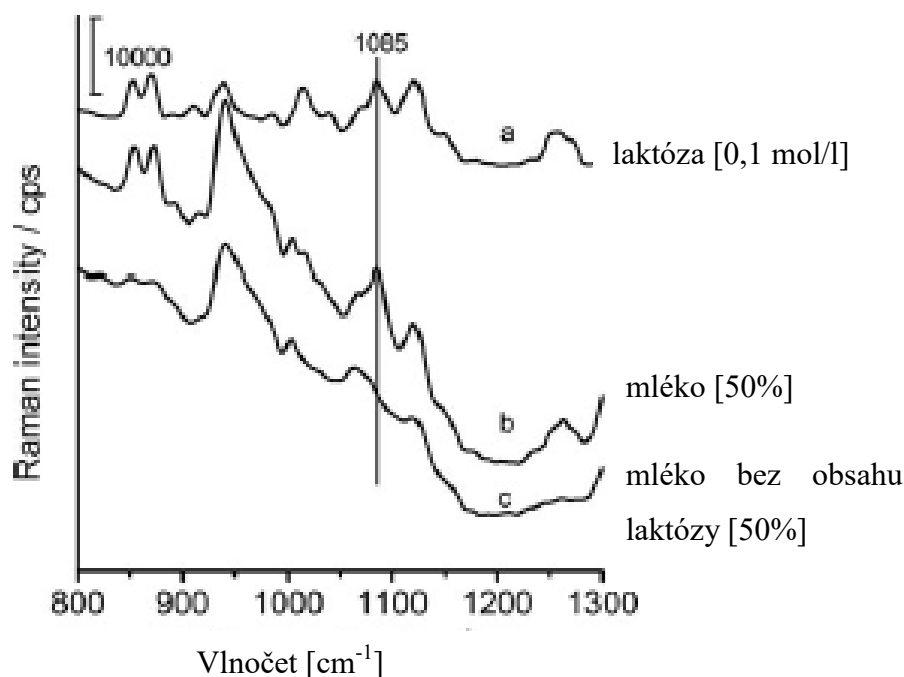
standards ve studii Li a kol. byly měřeny Ramanovým spektrofotometrem, který byl napojen na software umožňující vizualizaci a ukládání obrazů získaných spekter. Jako zdroj světla byl použit 785 nm helium-neonový laser [46].



Obr. 7 Ramanova spektra laktózy, glukózy a galaktózy [46]

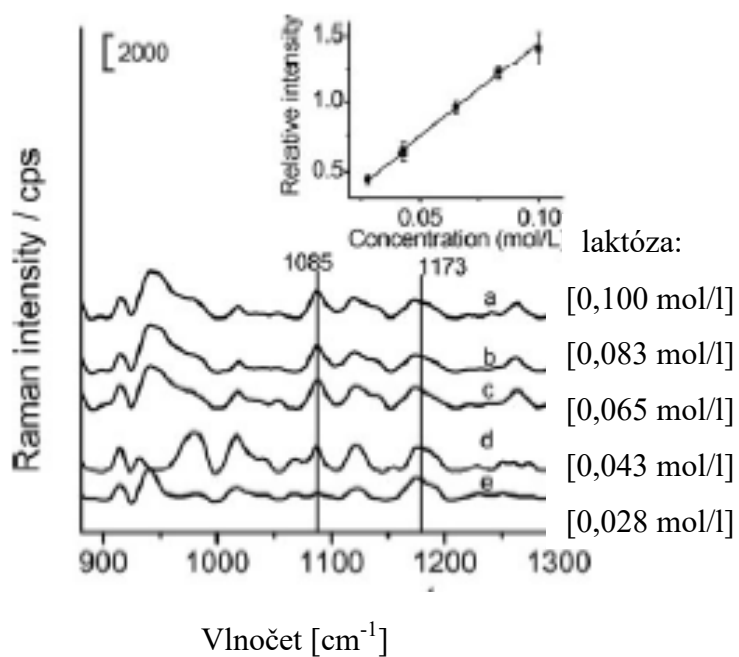
Jak je patrné z Obrázku 7, spektrum laktózy má 5 hlavních píků – při 869, 940, 1015, 1085 a 1121 cm^{-1} , které chybějí u glukózy i galaktózy. Také oba tyto monosacharidy mají své charakteristické píky, na základě kterých je možné je od sebe poměrně snadno odlišit. Jednotlivé píky odpovídají jednotlivým funkčním skupinám v molekulách. Píky při 940, 1015 a 1121 cm^{-1} u laktózy pravděpodobně odpovídají protahování vazby C-C, při 840 cm^{-1} deformacím vazby O-C-O a při 869 cm^{-1} vibračnímu protahování vazby C-O-C. Píky při 1015 a 1121 cm^{-1} se však překrývají se spektrem glukózy [46].

Na Obrázku 8 jsou naměřena Ramanova spektra roztoku laktózy, mléka a mléka bez obsahu laktózy. Na tomto obrázku je pík při 940 cm^{-1} přítomen i ve vzorku bezlaktózového mléka, ke vzniku tohoto píku tedy patrně přispěla přítomnost jiné složky mléka. Intenzita píku při 869 cm^{-1} se neměnila s rostoucí koncentrací laktózy, z tohoto důvodu se tak pro kvantitativní měření ukázalo vhodné sledování píku při 1085 cm^{-1} . Vliv měnící se koncentrace laktózy na intenzitu tohoto píku je zobrazen na Obr. 9 [46].



Obr. 8 Ramanova spektra laktózy, mléka
a mléka bez obsahu laktózy [39]

Pro kvantitativní stanovení laktózy byla ke vzorkům přidána krystalová violet' coby interní standard. Metoda vnitřní standardizace spočívá v přidání známého množství standardu ke vzorku. Jako standard je volena taková látka, která ve vzorku není obsažena a tvoří ve spektru samostatný pík v blízkosti píku stanovované složky. Koncentraci této složky je poté možno určit pomocí přímého srovnání. Pík odpovídající krystalové violeti je na Obr. 9 možné pozorovat při 1173 cm⁻¹. Ve směsi mléka, případně roztoku laktózy a krystalové violeti o koncentraci 0,1 mmol/l nebyly zjištěny žádné interference. Mezi relativní intenzitou píku při 1085 cm⁻¹ a koncentrací laktózy byl pozorován lineární vztah s limitem detekce 0,019 mol/l laktózy ve vzorku. Získaný výsledek koreloval také s hodnotami měření stejných vzorků pomocí HPLC a Lane-Eynonovy metody, pík při 1085 cm⁻¹ je tedy možné považovat za charakteristický pro laktózu, a tedy vhodný pro její determinaci [46].



Obr. 9 Ramanova spektra vzorků mléka s konstantním obsahem krystalové violeti při různé koncentraci laktózy [46]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo ověření použití Ramanovy spektroskopie pro stanovení laktózy v mléku. Aby bylo možné tohoto hlavního cíle dosáhnout, bylo stanoveno několik cílů dílčích:

- návrh a příprava vzorků s proměnlivou koncentrací laktózy
- stanovení koncentrace laktózy ve vzorcích pomocí metody HPLC coby metody referenční
- stanovení koncentrace fenylalaninu ve vzorcích
- naměření Ramanových spekter připravených vzorků
- vyhledání jednoho či více píků odpovídajících laktóze, potažmo glukóze a galaktóze
- vyhodnocení spekter, srovnání normování na fenylalanin a krystalovou violet' a diskuze výsledků

5 Materiál a metody

5.1 Charakteristika vzorků

Pro stanovení laktózy bylo vybráno trvanlivé polotučné mléko běžně dostupné v distribuční síti a jeho bezlaktózová varianta. Jednalo se o mléko značky Meggle, konkrétně „Trvanlivé mléko polotučné“ a „Bezlaktózové mléko“. Na obalech obou výrobků byly shodně uvedeny následující údaje:

Průměrné výživové hodnoty ve 100 g mléka

Energetická hodnota: 200 KJ/48 kcal

Tuky: 1,5 %

- z toho nasycené mastné kyseliny: 0,9 %

Sacharidy: 4,9 %

- z toho cukry: 4,9 %

Bílkoviny: 3,4 %

Sůl: 0,15 %

Bezlaktózová varianta mléka byla vyrobena enzymatickým štěpením laktózy, jejíž koncentrace v mléku by dle výrobce neměla převyšovat hodnotu 0,01 %, která je stanovena vyhláškou č. 54/2004 Sb. pro daný typ výrobku, a jejíž dodržení deklaruje výrobce na obalu [49].

5.2 Chemikálie

α -Laktóza monohydrát (Sigma-Aldrich, USA)

Acetonitril pro HPLC ($\geq 99,9$ %; Sigma-Aldrich, USA)

Azid sodný (ZMBD Chemik s.r.o., ČR)

Carrez I (30% ZnSO₄; Penta, ČR)

Carrez II (15% K₄[Fe(CN)₆]; Penta, ČR)

Citronová kyselina (Lach-Ner s.r.o., ČR)

Citran sodný (ZMBD Chemik s.r.o., ČR)

D-(+) glukóza (Sigma-Aldrich, USA)

D-(+) galaktóza (Sigma-Aldrich, USA)

Hydroxid sodný (ZMBD Chemik s.r.o., ČR)

Kyselina boritá (ZMBD Chemik s.r.o., ČR)

Kyselina chlorovodíková (ZMBD Chemik s.r.o., ČR)

Thioglykol (ZMBD Chemik s.r.o., ČR)

Ultra čistá voda pro HPLC (přečištěná systémem Aqua Max™ Ultra 370 Series; Young Lin, Korejská republika)

5.3 Přístroje a pomůcky

Ramanův spektrofotometr inVia Basis (Renishaw, Velká Británie)

Termoblok Evaterm (Labicom, ČR)

Analytické váhy GR-200 (Labicom, ČR)

Automatický analyzátor aminokyselin AAA 400 (Ingos, ČR)

Kapalinový chromatograf LC-20AD Prominence

- kvartérní pumpa
- pětikanálový degaser DGU-20A5R
- autosampler SIL-20ACHT
- diferenciální refraktometrický detektor RID-20A (vše Shimadzu, Japonsko)

Kolona Zorbax NH2 (4,6 x 250 mm x 5 µm) (Agilent, USA)

Předkolonový cartridge filtr 0,2 µm (Optimize Technologies, USA)

Stříkačkové filtry 0,22 µm Cronus (SMI Labhut, Velká Británie)

Laboratorní sklo

5.4 Příprava vzorků

Pro měření byla připravena řada vzorků o objemu 100 ml s rostoucí koncentrací laktózy smícháním běžného a bezlaktózového mléka, viz Tab. 3. Aby byla vyloučena případná zbytková aktivita enzymů přítomných v mléku, byly oba typy mléka zahřáty na 72 °C po dobu 20 s.

Tab. 3 Poměr běžného a bezlaktózového mléka ve vzorcích

LM [%]	0	20	40	50	60	80	100
BM [%]	100	80	60	50	40	20	0

* LM = mléko s přirozeným obsahem laktózy (běžné mléko)

BM = mléko s enzymaticky rozštěpenou laktózou

Pro měření na Ramanově spektrofotometru se kapalně vzorky mléka bez jakékoli úpravy ukázaly jako nevhodné v důsledku vzniku fluorescence. Z každého vzorku byla odebrána kapka o objemu 150 μ l, která byla kápnuta na alobal. Dále byl odebrán objem potřebný pro HPLC, viz níže a ke zbytku vzorků byla přidána krystalová violet tak, aby její výsledná koncentrace činila 0,002 mol/l. Po promíchání na magnetické míchače bylo odebráno 150 μ l z každého obarveného vzorku mléka. Alobal s kapkami byl ponechán při laboratorní teplotě do dalšího dne, čímž došlo k vysušení kapek. Byly tak získány dvě varianty vzorku pro následné hodnocení spekter [46, 50].

Vzorky pro HPLC byly připraveny odebráním 20 ml z mlék či jejich směsí (Tab. 3) do 100ml odměrné baňky. K tomuto objemu bylo přidáno 5 ml činidla Carrez I a 5 ml činidla Carrez II a odměrná baňka byla po rysku doplněna vodou. Takto připravené vzorky byly ponechány 15 min při laboratorní teplotě za občasného promíchání a následně zfiltrovány přes filtrační papír a dále ještě přes stříkačkový mikrofiltr (velikost pórů 0,2 μ m). Každý vzorek byl takto připraven dvakrát [51].

5.5 Kontrolní stanovení sacharidů pomocí HPLC

Všechny vzorky byly analyzovány za stejných podmínek pomocí kapalinového chromatografu s refrakčním detektorem. Jako mobilní fáze byl použit 70% roztok acetonitrilu ve vodě. Vzorky byly eluovány izokraticky při rychlosti průtoku mobilní fáze 1,4 ml.min⁻¹. Doba trvání analýzy činila 15 minut. Každý vzorek byl analyzován dvakrát. Hodnota koncentrace sacharidů glukózy, galaktózy a laktózy (Příloha I, Tabulka 1) byla stanovena z regresních rovnic jejich kalibračních křivek. Kalibrační křivky (Příloha II, Obr. 1-3) byly získány proměřením roztoků výše uvedených sacharidů v rozsahu koncentrací 0,1 – 20 g.l⁻¹, přičemž každý z roztoků byl proměřen třikrát.

5.6 Stanovení obsahu fenylalaninu

Pro stanovení fenylalaninu, a také dalších aminokyselin, které však nebyly bodem zájmu tohoto měření, byla využita iontově-výměnná kapalinová chromatografie na automatickém analyzátoru aminokyselin s postkolonovou ninhydrinovou derivatizací a spektrofotometrickou detekcí při 570 nm (440 nm pro prolin) [52].

Nejdříve bylo do vialky s přesností na čtyři desetinná místa odváženo 50 mg vzorku, ke kterému bylo poté přidáno 6 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 6 mol/l, aby mohlo dojít k uvolnění vázaných aminokyselin prostřednictvím kyselé hydrolyzy. Ze vzorku byl vytěsněn vzduch s následným použitím argonu po dobu 1 minuty. Posléze byl vzorek ponechán po dobu 23 hod při 117 °C v termobloku a po vyjmutí přenesen do 25ml odměrné baňky a zředěn pufrům. Takto připravená směs byla zfiltrována přes 0,45mm filtr. Z filtrátu bylo odebráno a vstříkováno do automatického analyzátoru aminokyselin vždy 100 µl. Program pro eluci aminokyselin z kolony a složení sodno-citrátových pufrů je uvedeno v Tab. 4. Regenerace kolony probíhala po dobu 10 min pomocí hydroxidu sodného o koncentraci 0,2 mol/l s následnou stabilizací po dobu 17 min pomocí pufru A. Teplota kolony činila 60 °C (0 – 60 min, 90 – 120 min) a 74 °C (60 – 90 min).

Tab. 4 Složení pufrů a program pro eluci aminokyselin z kolony

Chemikálie	Pufr				dávkovací pufr
	A	B	C	D	
Citronová kyselina - monohydrát	11,11	10,00	7,53	0	14,00
Citran sodný - dihydrát	4,04	5,60	9,06	19,60	0
Chlorid sodný	9,29	8,36	18,00	52,60	11,50
Kyselina boritá	0	0	0	2,05	0
Azid sodný	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Hydroxid sodný	0	0	0	0,50	0
Thioglykol [ml]	2,50	2,50	2,50	0	5,00

5.7 Ramanova spektroskopie

Pro měření Ramanovských spekter byl využit přístroj Renishaw in Via Basis s připojeným mikroskopem Leica. Systém je ovládán pomocí počítače prostřednictvím softwaru WIRE 3.0. Tento program umožňuje také úpravu a hodnocení spekter, aby však bylo možné data

zpracovávat mimo laboratoř, byl pro vyhodnocování a tvorbu grafů použit program MS Excel.

Pro samotné měření byly nastaveny následující parametry:

- zdroj excitačního záření – diodový NIR laser s vlnovou délkou 785 nm
- výkon laseru - 100 %
- počet akumulací - 20
- expoziční čas - 5 s
- spektrální rozsah - 300 - 1 800 cm^{-1}
- zvětšení objektivu - 20 x

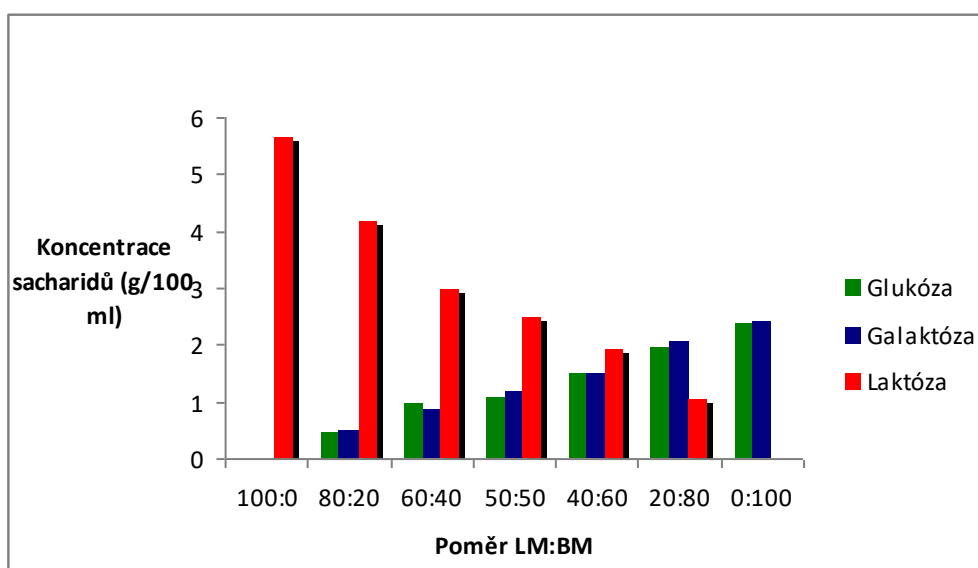
5.8 Normování spekter

Jelikož zaznamenávaná intenzita může kolísat, může být celé spektrum posunuto k vyšším nebo nižším hodnotám. Proto, aby bylo možné vyhodnocovat jednotlivé píky, je využíváno tzv. normování spektra, tj. vyjádření spektra pomocí relativní intenzity. Pro úpravu spektra je nezbytné nalézt pík, který by měl ve všech vzorcích odpovídat konstantní hodnotě analytu a všechny ostatní píky jsou vůči němu vztahovány. Na ose y je pak ve spektru vynášena relativní intenzita. Konstantní analyt může být ve vzorcích přítomen nebo k nim může být přidán. V této práci byly využity oba způsoby – v prvním z nich byla spektra normována na aminokyselinu fenylalanin, která je v mléku přirozeně přítomná (Příloha III, Obr. 4-10). Při druhém způsobu byla ke vzorkům přidávána krystalová violet' (Příloha IV, Obr. 11-17).

6 Výsledky a diskuze

6.1 Stanovení laktózy v mléku pomocí HPLC

HPLC byla v této práci využita jako referenční metoda pro stanovení laktózy a produktů jejího štěpení, sacharidů glukózy a galaktózy ve vzorcích mléka a mléka s přidavkem krystalové violeti. Jak je patrné z Obr. 10, nejvyšší koncentraci mléčného cukru vykazoval vzorek běžného mléka, přičemž koncentrace klesala s rostoucím podílem bezlaktózové varianty ve směsi. U samotného bezlaktózového mléka koncentrace laktózy nepřekročila detekční limit 0,01 g/100 ml vzorku a označení tohoto mléka tedy odpovídá požadavkům platné legislativy. Dle poměru běžného a bezlaktózového mléka ve vzorku se s klesající koncentrací laktózy zvyšovala koncentrace glukózy a galaktózy.

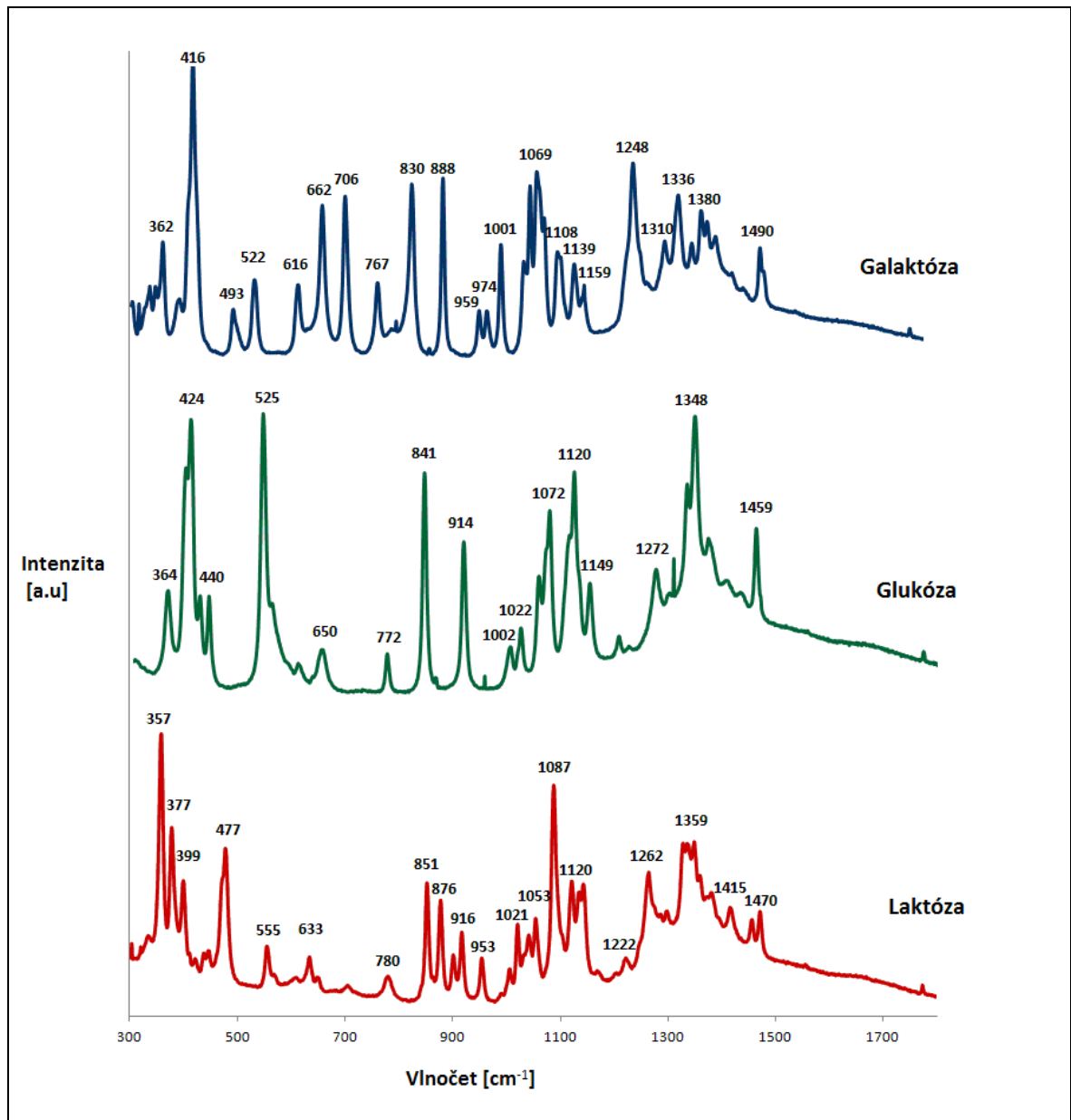


Obr. 10 Graf výsledku stanovení sacharidů ve vzorcích pomocí HPLC

6.2 Ramanova spektra sacharidů

Aby bylo možné ve spektrech mléka identifikovat píky odpovídající jednotlivým sacharidům, byly nejdříve proměřeny laktóza, glukóza a galaktóza ve své krystalické podobě. Na Obr. 11 je možné pozorovat odlišnosti získaných spekter. Ve spektrech lze nalézt píky charakteristické pro jednotlivé sacharidy obdobně jak byly popsány v literatuře. Ve spektru galaktózy jsou nejvýraznější píky při 416, 662, 706, 830, 888, 1069 a 1248 cm^{-1} , u glukózy

jsou to píky při 405, 542, 841, 914, 1072, 1120 a 1138 cm^{-1} a pro laktózu píky při 359, 377, 477, 851, 1087, 1262 a 16359 cm^{-1} [46, 53, 54].



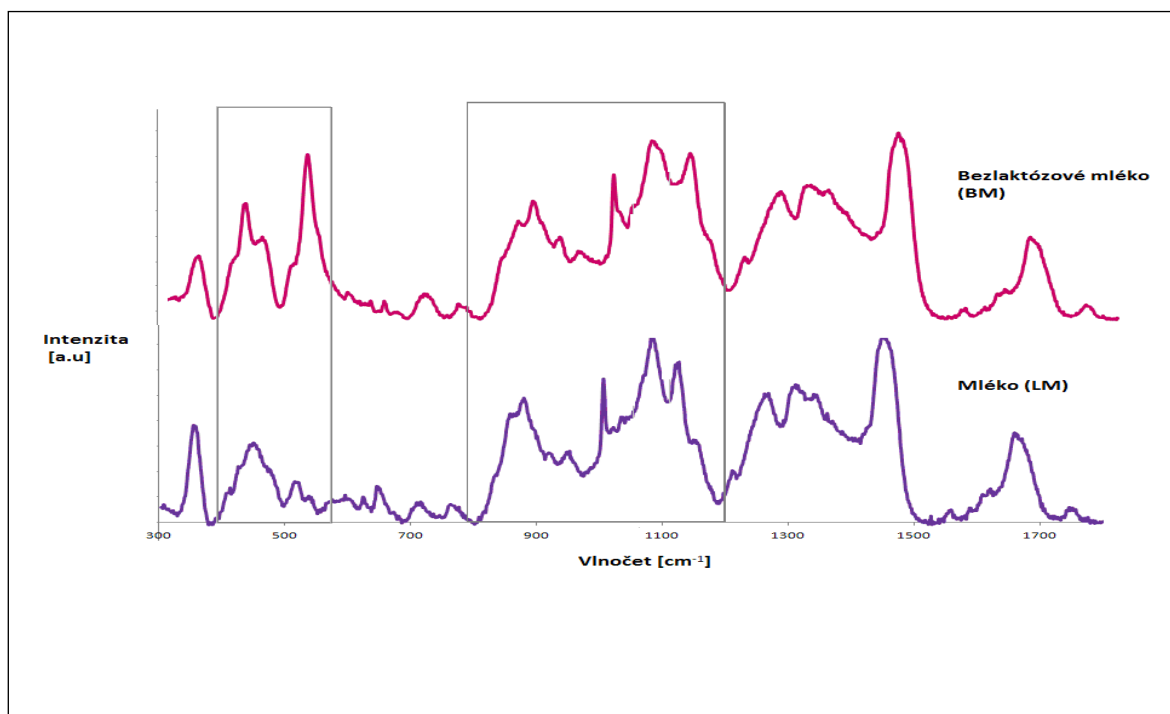
Obr. 11 Ramanova spektra laktózy, glukózy a galaktózy

Na základě měření čistých látek byl vybrán rozsah vlnových délek 300 – 1800 cm^{-1} . Tato oblast je z hlediska potřeb této práce nejvýznamnější, jelikož obsahuje většinu dostupných informací o vibracích molekul. Oblasti 2 800 – 3 000 cm^{-1} a 3 100 a 3600 cm^{-1} , které od-

povídají protahování vazeb C-H a O-H nebyly využity, neboť dle literatury mají vibrační pásy v této oblasti tendenci být široké a špatně definované [55].

6.3 Stanovení laktózy v mléku pomocí Ramanovy spektroskopie s využitím normování na fenylalanin

Na výsledném Ramanově spektru mléka participují všechny jeho složky. Interpretace spekter a identifikace píků příslušejících laktóze (potažmo glukóze a galaktóze) je tak ztížena v důsledku překryvu píků přítomných bílkovin a tuků. V získaných spektrech byly hledány vlnočty píků, které jsou charakteristické pro běžné a bezlaktózové mléko v důsledku přítomnosti odpovídajících sacharidů, viz Obr. 12. Významné rozdíly se objevily v oblasti $350 - 600 \text{ cm}^{-1}$, kdy píky zde vyskytnuvší odpovídají deformacím endocyklických a exocyklických vazeb. Oblast vlnové délky do 500 cm^{-1} odpovídá endocyklickým a $500 - 700 \text{ cm}^{-1}$ exocyklickým deformacím, rozdíly jsou patrné také v oblasti $800 - 1200 \text{ cm}^{-1}$, která odpovídá deformaci vazeb C-O, C-C a deformacím C-O-C v tahu, což odkazuje na glykosidickou vazbu [55, 56].



Obr. 12 Ramanova spektra běžného a bezlaktózového mléka

Při vyhodnocování Ramanova spektra mléka jako takové byly již dříve zjištěny dva píky odpovídající laktóze – 357 a 445 cm^{-1} . Tyto píky je možné nalézt také ve spektru mléka (LM) naměřeném v rámci této práce. Problémem však je výskyt píků v této oblasti i v mléku bez laktózy, jelikož zde dochází k překrývání signálů odpovídajících jednotlivým sacharidům. V důsledku tohoto může dojít ke zkreslení výsledků a nesprávné interpretaci, což vede k vystavení se riziku falešné negativity či positivity [48, 57].

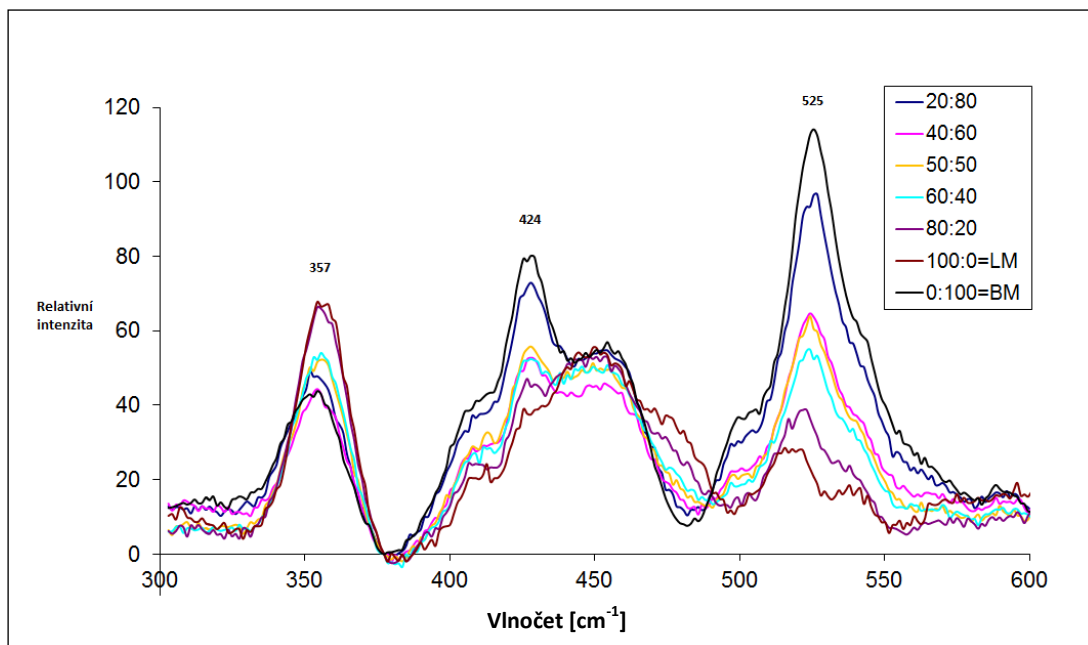
Ideální pík, který by byl využitelný pro stanovení koncentrace laktózy v mléku, by tedy kromě výskytu ve spektru mléka a absence ve spektru mléka bezlaktózového měl vykazovat co možná nejvyšší korelaci s koncentrací laktózy stanovenou pomocí metody HPLC.

Fenylalaninu, jedné z aminokyselin nacházejících se v mléku, odpovídá v Ramanově spektru výrazný pík při 1006 cm^{-1} . Pokud se v jednotlivých vzorcích koncentrace fenylalaninu výrazně neliší, je možné jej využít pro tzv. normování spekter, což spočívá v přisouzení konkrétní hodnoty intenzitě fenylalaninového píku (v tomto případě 100 %) a intenzita ostatních píků ve spektru je pak k této hodnotě vztažena, viz Kapitola 5.8. Koncentrace fenylalaninu ve vzorcích, které byly získány pomocí iontově-výměnné kapalinové chromatografie, jsou uvedeny v Tab. 5. Jak je z této tabulky patrné, hodnoty vykazují jistou variabilitu. Zanedbáním tohoto rozptylu je tak do vyhodnocení vnášena chyba, která může ovlivnit výslednou korelaci relativní intenzity a koncentrace laktózy.

Tab. 5 Obsah fenylalaninu ve vzorcích

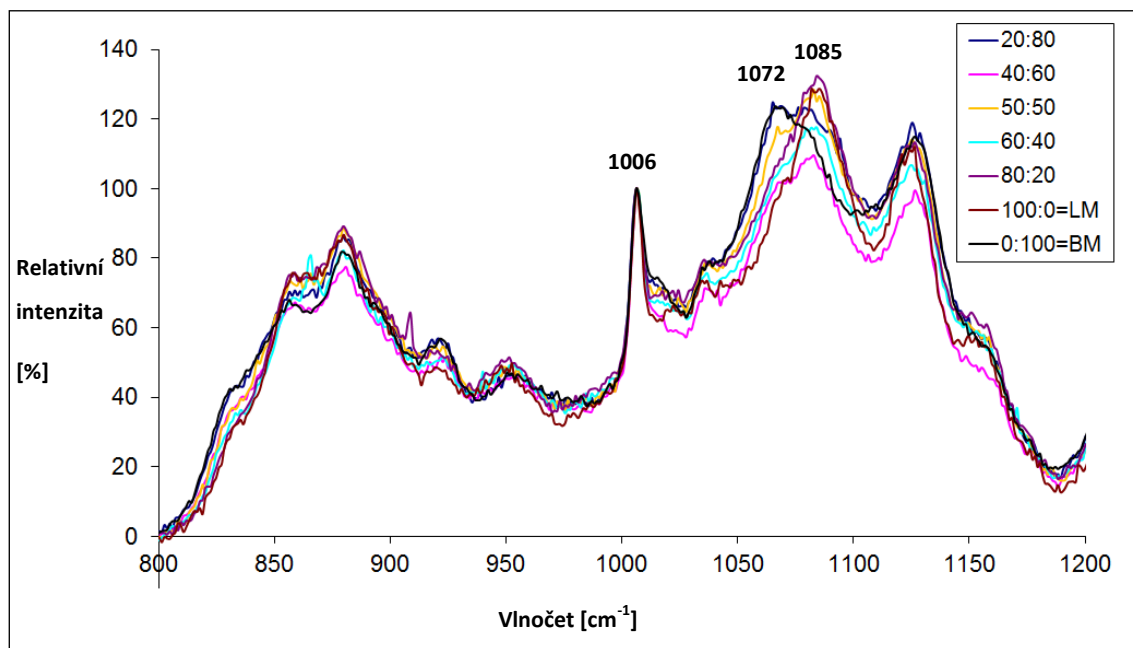
Vzorek LM:BM	Obsah fenylalaninu (g/kg)
100 : 0	0,90 ± 0,03
80 : 20	1,02 ± 0,04
60 : 40	1,00 ± 0,04
50 : 50	0,94 ± 0,04
40 : 60	0,85 ± 0,04
20 : 80	0,80 ± 0,03
0 : 100	0,97 ± 0,04

Na Obr. 13 je ze spektra vybrána oblast $300 - 600 \text{ cm}^{-1}$, ve které je možné pozorovat tři píky – při 357 cm^{-1} , který je přisuzován laktóze, dále pak píky při 424 a 525 cm^{-1} , které píky spojovány s přítomností glukózy v analytu. [58].



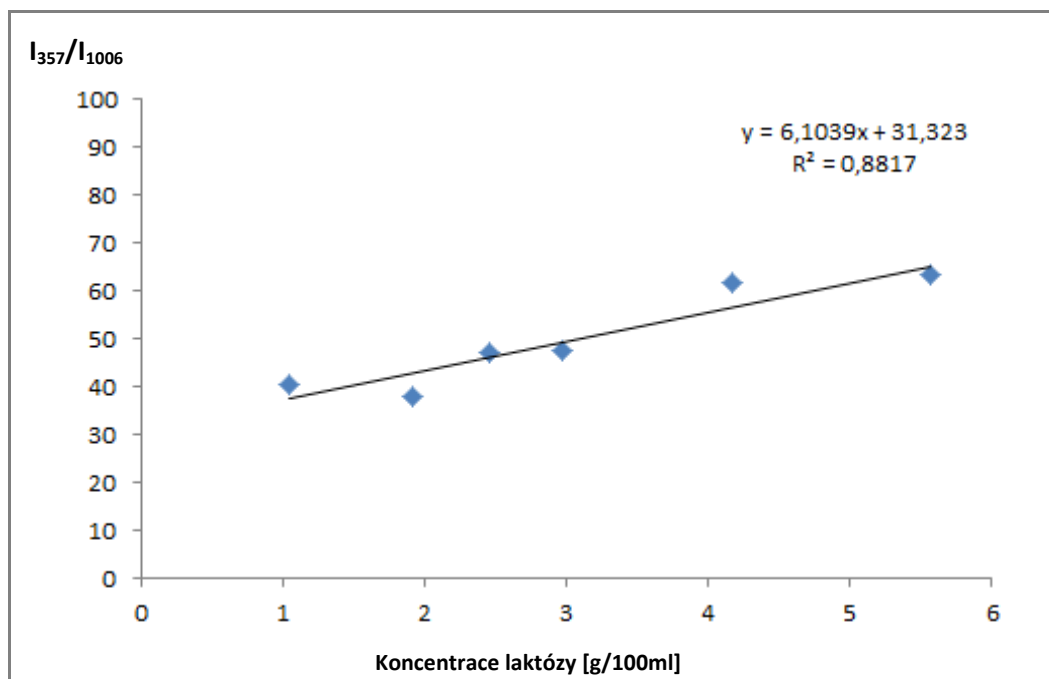
Obr. 13 Ramanovo spektrum vzorků při normování na fenylalanin v rozsahu vlnočtu $300 - 600 \text{ cm}^{-1}$

Při porovnání spekter běžného a bezlaktózového mléka bylo dále možné sledovat rozdíly v oblasti $800 - 1200 \text{ cm}^{-1}$, viz Obr. 14. V tomto spektru je jasně vidět pík při 1006 cm^{-1} , který odpovídá fenylalaninovému kruhu. Dále se jedná o píky příslušející glukóze (při 919 a 1072 cm^{-1}) a pík při 1085 cm^{-1} , který byl ve studii Li a kol. přiřazen laktóze [46, 58].



Obr. 14 Ramanovo spektrum vzorků při normování na fenylalanin v rozsahu vlnočtu 800 – 1200 cm^{-1}

Hodnota relativní intenzity jednotlivých píků byla vynesena do grafu v závislosti na koncentraci laktózy zjištěné pomocí HPLC. Výsledný graf pro pík 357 cm^{-1} je zobrazen na Obr. 15, stejně bylo postupováno u výše zmíněných píků. Zjištěné korelační koeficienty jsou zaznamenány v Tab. 6. Jak je z výsledků patrné, pík pro laktózu při 357 cm^{-1} a pík pro glukózu při 424 cm^{-1} vykazovaly silnou, pík při 525 cm^{-1} dokonce velmi silnou korelaci, což odpovídá poznatkům dosud publikovaných v literatuře. Pík při 1085 cm^{-1} , který Li a kol. označili za charakteristický pro laktózu však koreloval pouze středně. Jak je ale patrné z Obr. 14, oblast tohoto píku není jasně definována, neboť vibrační pásy jsou zde široké a dochází k překrývání v důsledku blízkosti píku při 1072 cm^{-1} , který se nachází ve spektru glukózy [46, 58].



Obr. 15 Závislost relativní intenzity píku při 357 cm^{-1} na koncentraci laktózy

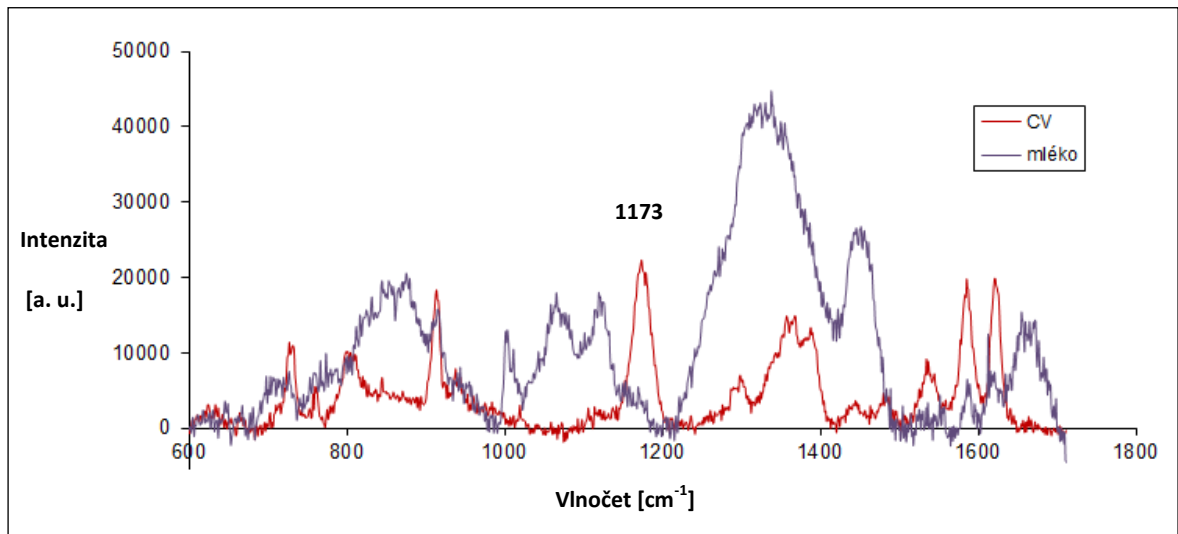
Tab.6 Vyjádření korelace mezi relativní intenzitou píků a koncentrací sacharidu

Sacharid	Pík	Rovnice přímky	Korelační koeficient
Laktóza	357	$y = 6,1039x + 31,323$	$R^2 = 0,8817$
	1085	$y = 3,8305x + 109,66$	$R^2 = 0,4128$
Glukóza	424	$y = 17,861x + 31,333$	$R^2 = 0,8914$
	525	$y = 41,921x + 12,799$	$R^2 = 0,9671$

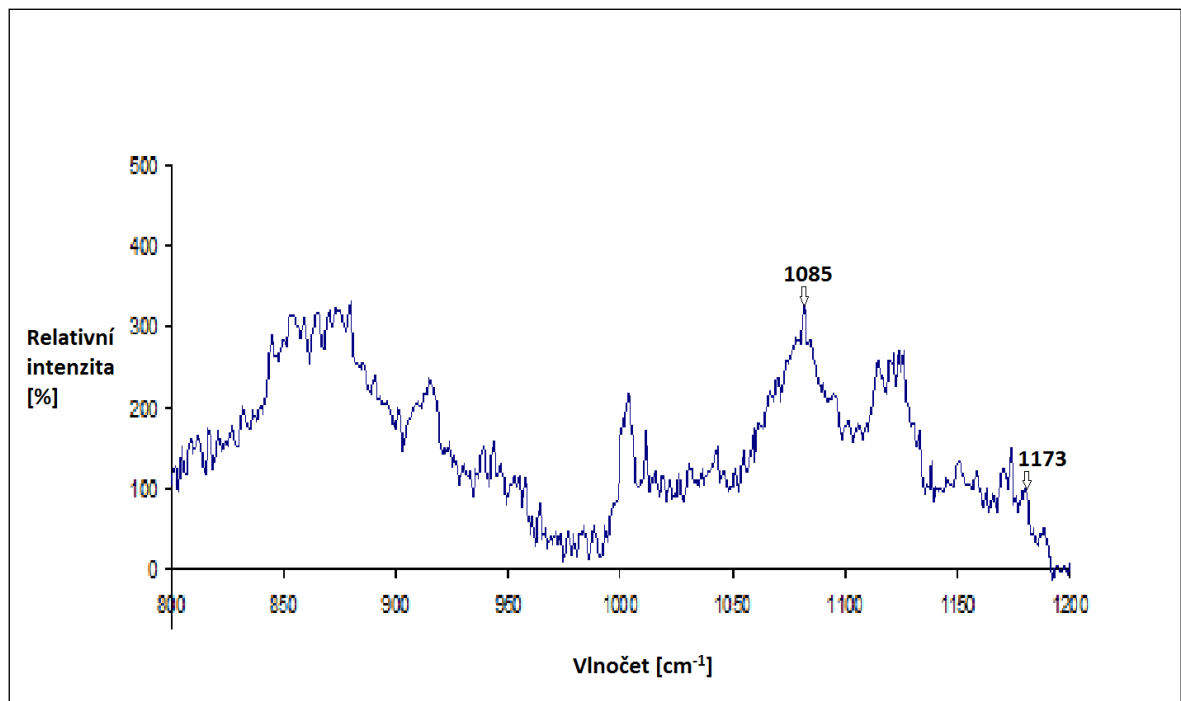
6.4 Stanovení laktózy v mléku pomocí Ramanovy spektroskopie s využitím normování na krystalovou violet'

Jelikož při využití normování na fenylalanin nebyla potvrzena velmi silná korelace u píku 1085 cm^{-1} , jako tomu bylo u Li a kol., bylo pro srovnání použito normování na krystalovou violet', dle metodiky ve zmíněné práci. Na Obr. 16 je možné vidět rozdíly v Ramanově spektru mléka a krystalové violeti. Při 1173 cm^{-1} se nachází charakteristický pík krystalové violeti. Jelikož se v této oblasti nenacházejí píky odpovídající mléku, byl tento pík vybrán

coby referenční. Na Obr. 17 je Ramanovo spektrum mléka s přidavkem krystalové violeti [46].



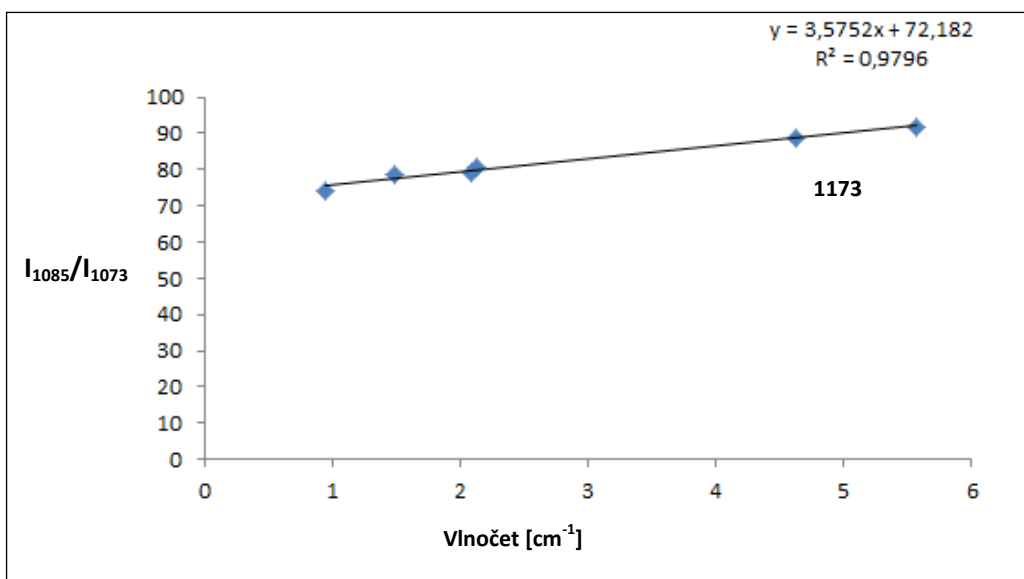
Obr. 16 Ramanovo spektrum běžného mléka a krystalové violeti



Obr. 17 Ramanovo spektrum běžného mléka s normováním na krystalickou violet'

Při normování bylo postupováno stejně jako v případě fenylalaninu. V tomto případě však byla hodnota 100 % přisouzena píku 1173 cm^{-1} . Získané spektrum pro oblast 800 – 1200 cm^{-1} je zobrazeno na Obr. 17.

Graf závislosti relativní intenzity na koncentraci laktózy pro pík 1085 cm^{-1} je vynesena na Obr. 18. Korelační koeficient píku při 1085 cm^{-1} je velmi silný, což odpovídá zjištění Li a kol. [46].



Obr. 18 Závislost relativní intenzity píku při 1087 cm^{-1} na koncentraci laktózy

6.5 Souhrnná diskuze

Laktózová intolerance je onemocnění s genetickým základem spojené s deficitem enzymu laktázy. Jelikož jsou v produkci tohoto enzymu zásadní rozdíly mezi jedinci, není v podstatě možné stanovit prahovou koncentraci laktózy, která by zaručovala její konzumaci bez jakýchkoli negativních důsledků. Aby člověk postižený intolerancí laktózy nebyl nucen z jídelníčku mléko, které je spojováno s řadou zdravotních benefitů, zcela vynechat, vyvíjí mlékárenský průmysl výrobky bez laktózy. Označování těchto výrobků je legislativně dáno a odvíjí se od koncentrace laktózy v daném produktu. Spolehlivé stanovení obsahu „mléčného cukru“ má tedy velký význam [49, 59, 60].

Možností detekce a kvantifikace laktózy v mléku je celé spektrum, jak je popsáno v teoretické části této práce. Tradiční metody, jako je např. HPLC – referenční metoda pro tuto práci, se vyznačují vysokou přesností. Stanovení je však časově náročné, vyžaduje použití chemických činidel a neumožňuje „on-line“ provedení. Ramanova spektroskopie oproti tomu představuje metodu rychlou a jednoduchou a je tedy využitelná v potravinářském průmyslu [46, 48, 56, 60, 61].

Oproti jiným moderním a rychlým metodám, jako je např. využití biosenzorů, má Ramanova spektroskopie výhodu v možnosti rozlišení jednotlivých molekul, což bylo také potvrzeno v této práci, kdy pro každý ze stanovovaných sacharidů (glukóza, galaktóza, laktóza) bylo naměřeno spektrum, které obsahovalo i píky charakteristické pro jednotlivé sacharidy. Tyto rozdílly se pak odrazily také na spektrech běžného a bezlaktózového mléka [46, 58].

Oproti infračervené spektroskopii má Ramanova spektroskopie výhodu v možnosti stanovování vzorků s vysokým podílem vody, jelikož v IČ spektroskopii má voda výrazné absorpční pásy. V rámci této práce se však měření tekutého mléka neukázalo jako vhodné v důsledku vysokého zašumění. Stejný problém se na pracovišti objevil při stanovování mléčného tuku, na základě dřívějších zkušeností byly tedy vzorky nejdříve vysušeny při laboratorní teplotě ponecháním na hliníkové folii do dalšího dne [50].

Pro stanovení laktózy byly v této práci využity dvě metody normování spekter. V první z nich bylo využito toho, že aminokyselina fenylalanin v důsledku svého chemického charakteru poskytuje ve spektru mléka dobře identifikovatelný pík při 1006 cm^{-1} . Je výhodou, že pro tento typ stanovení není potřeba přidání žádných chemických činidel. Podmínkou je naopak to, aby všechny měřené vzorky vykazovaly konstantní obsah fenylalaninu, poťazmo konstantní obsah bílkovin. V naměřených spektrech byly nalezeny píky pro glukózu při 424 a 525 cm^{-1} , které korelovaly s obsahem glukózy ve vzorcích stanoveným HPLC a údaji dostupnými v literatuře, stejně jako tomu bylo u píku pro laktózu při 357 cm^{-1} . Přestože tento pík vykazoval silnou korelaci s obsahem laktózy, nachází se pík v dané oblasti vlnočtu také u spektra bezlaktózového mléka, v důsledku čehož může dojít k chybné interpretaci a nesprávnému kvalitativní stanovení. Výše uvedené údaje by mohly poukazovat na

dobrou vypovídající hodnotu normování spekter na fenylalanin i v případě, že jeho obsah ve vzorcích vykazuje jistou variabilitu. Pík při 1085 cm^{-1} , který Li a kol. označili jako charakteristický pro laktózu vykazoval pouze střední korelaci. Jelikož je možné sledovat výskyt tohoto píku u běžného mléka a absenci u bezlaktózové varianty, je možné usuzovat na překrývání píku při 1085 cm^{-1} a při 1072 cm^{-1} , který dle literatury odpovídá glukóze [46, 58].

Pro srovnání bylo využito také normování na krystalovou violet'. Po jejím přidání do mléka je možné sledovat charakteristický pík při 1173 cm^{-1} , což koresponduje s výsledkem Li a kol. Viditelnost respektive intenzita tohoto píku ve spektru byla výrazně nižší, než tomu bylo u píku fenylalaninu. Rozdíly mezi vzorky z různým obsahem laktózy tak nebyly na první pohled příliš patrné. Při bližším vyhodnocení spekter však bylo možné sledovat i drobné odlišnosti, píky byly dobře definované a nedocházelo k jejich překrývání. Korelační koeficient pro pík 1085 cm^{-1} byl výrazně vyšší než při normování na fenylalanin. Velmi silná korelace při měření tak odpovídá závěrům Li a kol., tedy že je tento pík vhodný pro determinaci laktózy v mléku [46].

ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla věnována stanovení laktózy v mléku metodou Ramanovy spektroskopie. Tato metoda představuje rychlou, jednoduchou a ekonomicky výhodnou alternativu ke klasickým metodám stanovení, jelikož s sebou nese výhody v podobě malého množství vzorku potřebného k analýze či možnosti měření přes obal. Přestože byla dříve Ramanova spektroskopie doménou spíše farmacie, (forenzní) chemie či geologie, nachází si cestu také do oblasti potravinářství.

Popisu Ramanovy spektroskopie byla věnována teoretická část této práce, ve které byla dále popsána laktóza, její význam a problémy, které s sebou její konzumace může přinášet. Prostor byl věnován laboratorním metodám používaným pro její stanovení.

V rámci praktické části byly připraveny vzorky běžného a bezlaktózového mléka a jejich směsí, které byly podrobeny analýze pomocí HPLC. S rostoucím podílem běžného mléka ve vzorku byla potvrzena zvyšující se koncentrace laktózy a naopak klesající koncentrace produktů jejího štěpení – glukózy a galaktózy.

V naměřených Ramanových spektrech byly nalezeny píky, které s údaji zjištěnými pomocí HPLC korespondovaly. Při normování na fenylalanin byly nalezeny píky odpovídající glukóze (při 424 a 525 cm^{-1}), dále byl nalezen pík při 357 cm^{-1} , který silně koreloval s koncentrací laktózy ve vzorcích. Tento pík se však nachází také ve spektru bezlaktózového mléka, na rozdíl od píku 1085 cm^{-1} , který byl nalezen pomocí normování na krystalovou violet. Tento pík vykazoval velmi silnou korelaci s hodnotami zjištěnými HPLC. Metoda normování na krystalovou violet se ukázala jako citlivější a pro determinaci laktózy v mléku tedy jako vhodnější.

Ramanova spektroskopie se jeví jako vhodná metoda pro stanovení laktózy v mléku, jelikož byla nalezena korelace mezi intenzitou vybraných píků a koncentrací sledovaných sacharidů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A INTERNETOVÝCH ZDROJŮ

- [1] Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. 2nd Edition. Springer International Publishing. ISBN: 978-3-319-14892-2. 584 p.
- [2] McSweeney, P. L. H., & Fox, P. F. (2009). *Advanced Dairy Chemistry, Volume 3 - Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*. 3rd Edition. Springer-Verlag. ISBN: 978-0-387-84864-8. 825 p.
- [3] Pyörälä, S. (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary research*, 34(5), 565-578.
- [4] Cant, J. P., Trout, D. R., Qiao, F., & Purdie, N. G. (2002). Milk synthetic response of the bovine mammary gland to an increase in the local concentration of arterial glucose. *Journal of dairy science*, 85(3), 494-503.
- [5] Velíšek, J. (2002). *Chemie potravin 1*. 2. vyd. Tábor: OSSIS. 344 s. ISBN:8086659003.
- [6] leporelo.info/laktosa [online]. 2015 [cit. 2015-12-10]. Dostupné z: <https://leporelo.info/pics/pic/laktosa.jpg>
- [7] Thomas, M. E. C., Scher, J., Desobry-Banon, S., & Desobry, S. (2004). Milk powders ageing: Effect on physical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(5), 297-322.
- [8] Caspary, W. F. (1992). Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55(1), 299-308.
- [9] Berry, G. T., Segal, S., & Gitzelmann, R. (2006). Disorders of galactose metabolism. In *Inborn Metabolic Diseases*. Springer Berlin Heidelberg. ISBN: 978-3-662-03147-6. 121-130 p.
- [10] Schaafsma, G. (2008). Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, 18(5), 458-465.
- [11] Aimutis, W. R. (2012). Lactose cariogenicity with an emphasis on childhood dental caries. *International Dairy Journal*, 22(2), 152-158.
- [12] Kwak, H. S., Lee, W. J., & Lee, M. R. (2012). Revisiting lactose as an enhancer of calcium absorption. *International Dairy Journal*, 22(2), 147-151.

- [13] **Abrams, S. A., Griffin, I. J., & Davila, P. M. (2002).** Calcium and zinc absorption from lactose-containing and lactose-free infant formulas. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(2), 442-446.
- [14] **Pereira, P. C. (2014).** Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*. 30(6), 619-627.
- [15] **Legárová, V. (2011).** *Posouzení kvality sladké syrovátky vzhledem k možnosti využití pro potravinářské účely*. Dizertační práce. Česká zemědělská univerzita v Praze.
- [16] **www.foodreactions.org: Lactose Intolerance.** [online] [cit. 2015-12-10]. Dostupné z: <http://www.foodreactions.org/intolerance/lactose/index.html>
- [17] **Vesa, T. H., Marteau, P., & Korpela, R. (2000).** Lactose intolerance. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(2), 165-175.
- [18] **Olds, L. C., & Siebly, E. (2003).** Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element. *Human Molecular Genetics*, 12(18), 2333-2340.
- [19] **Grand, R. J., Montgomery, R. K., Chitkara, D. K., Hirschom, J. N. (2003).** Changing genes; losing lactase. *Gut*, 52(5), 617-619.
- [20] **Santonocito, C., Scapaticci, M., Guarino, D., Annicchiarico, E. B., Lisci, R., Penetente, R., & Capoluongo, E. (2015).** Lactose intolerance genetic testing: Is it useful as routine screening? Results on 1426 south-central Italy patients. *Clinica Chimica Acta*, 439, 14-17.
- [21] **Holden, C., & Mace, R. (2009).** Phylogenetic analysis of the evolution of lactose digestion in adults. *Human Biology*, 597-619.
- [22] **Matthews, S. B., Waud, J. P., Roberts, A. G., & Campbell, A. K. (2005).** Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgraduate Medical Journal*, 81(953), 167-173.
- [23] **Fojtík, P., Falt, P., Urban, O., Novosad, P., Richterová, L., & Bóday, A. (2013).** Laktózová intolerance. *Practicus*. 5, 7–11.
- [24] **Casellas, F., Aparici, A., Casaus, M., & Rodríguez, P. (2013).** Self-perceived lactose intolerance and lactose breath test in elderly. *European Geriatric Medicine*, 4(6), 372-375.

- [25] **Jelen, P., & Tossavainen, O. (2003).** Low lactose and lactose-free milk and dairy products-prospects, technologies and applications. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58(2), 161.
- [26] **www.foodintolerances.org. Food tables: lactose.** [online]. [cit. 2016-03-02]. Dostupné z: <http://www.foodintolerances.org/lactose-food-table.aspx>
- [27] **Jensen, R. G. (1995).** *Handbook of milk composition*. Academic Press. ISBN: 978-0-08-053311-7. 919 p.
- [28] **Caprita, R., Caprita, A., & Cretescu, I. (2014):** Determination of Lactose Concentration in Milk Serum by Refractometry and Polarimetry. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 47(1), 158-161.
- [29] **Nollet, L. M., & Toldrá, F. (Eds.). (2009).** *Handbook of dairy foods analysis*. CRC Press. ISBN: 978-1-42-004631-1. 918 p.
- [30] **Nickerson, T. A., Vujicic, I. F., & Lin, A. Y. (1976).** Colorimetric estimation of lactose and its hydrolytic products. *Journal of Dairy Science*, 59(3), 386-390.
- [31] **Kleyn, D. H. (1985).** Determination of lactose by an enzymatic method. *Journal of Dairy Science*, 68(10), 2791-2798.
- [32] **Shapiro, F., Shamay, A., & Silanikove, N. (2002).** Determination of lactose and D-galactose using thio-NAD⁺ instead of NAD⁺. *International Dairy Journal*, 12(8), 667-669.
- [33] **Conzuelo, F., Gamella, M., Campunzano, S., Ruiz, M. A., Reviejo, A. J., & Pingarrón, J. M. (2010).** An integrated amperometric biosensor for the determination of lactose in milk and dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7141-7148.
- [34] **Eshkenazi, I., Maltz, E., Zion, B., & Rishpon, J. (2000).** A three-cascaded-enzymes biosensor to determine lactose concentration in raw milk. *Journal of Dairy Science*, 83(9), 1939-1945.
- [35] **Luzzana, M., Agnellini, D., Cremonesi, P., Caramenti, G., & De Vita, S. (2003).** Milk lactose and lactulose determination by the differential pH technique. *Le Lait*, 83(5), 409-416.

- [36] **Klouda, P. (2003).** *Moderní analytické metody* (Vol. 2). Pavel Klouda. ISBN: 978-80-86369-07-5. 132 p.
- [37] **Orata, F. (2012).** *Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis*. In *Advanced Gas Chromatography – Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. InTech. ISBN: 978-953-51-0298-4. 83-108.
- [38] **Opekar, F., Jelínek, I., Rychlovský, P., & Plzák, Z. (2002):** *Základní analytická chemie*. 1. vydání. Praha: Karolinum. ISBN: 80-246-0553-8. 201 p.
- [39] **Nollet, L. M. L., & Toldrá, F. (Eds.) (2012):** *Food analysis by HPLC*. 3rd Edition. CRC Press. ISBN: 978-1439830840. 1078 p.
- [40] **Sexton, D. L. (2004).** *Determination of Lactose by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography*. Dissertation thesis. East Tennessee State University
- [41] **Smith, E., & Dent, G. (2005).** *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. Chichester: John Wiley. ISBN: 0-471-49668-5. 210 p.
- [42] **en.wikipedia.org: C. V. Raman. [online]. [cit. 2016-03-02].** Dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e6/Sir_CV_Raman.JPG
- [43] **MCcCreery, R. L. (2000).** *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*. John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-471-25287-0. 452 p.
- [44] **Bumbrah, G. S., & Sharma, R. M. (2015).** Raman spectroscopy–Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*. [online]. [cit. 2016-02-22]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090536X15000477>
- [45] **Dendisová, M., Žvátora, P., & Matějka, P..** *Ramanova spektrometrie*. VŠCHT [online]. [cit. 2015-12-10] Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>
- [46] **Li, M., Chen, J., Xu, J., Fu, S., & Gong, H. (2015).** Determination of Lactose in Milk by Raman Spectroscopy. *Analytical Letters*, 48(8), 1333-1340.
- [47] **Almeida, M. R., Oliveira, K. D. S., Stephani, R., & De Oliveira, L. F. C. (2011).** Fourier-transform Raman analysis of milk powder: a potential method for rapid quality screening. *Journal of Raman Spectroscopy*, 42(7), 1548-1552.

- [48] McGoverin, C. M., Clark, A. S. S., Holroyd, S. E., & Gordon, K. C. (2010). Raman spectroscopic quantification of milk powder constituents. *Analytica Chimica Acta*, 673(1), 26-32.
- [49] Vyhláška č. 54/2004 Sb. o potravinách určených pro zvláštní výživu a o způsobu jejich použití. [online]. [cit 2017-04-10] Dostupné z: <http://www.psp.cz/sqw/sbirka.sqw?r=2004&cz=54>
- [50] Vašková, H., Bučková, M., & Zálešáková, L. (2016). Spectroscopic analysis of milk fat and its mathematical evaluation. *International Journal of Biology and Biomedical Engineering*, 10, 168–175.
- [51] Sanz, M., & Martínez-Castro, I. (2007). Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. *Journal of Chromatography A*, 1153, 74 – 89.
- [52] Buňka, F., Kříž, O., Veličková, A., Buňková, L., & Kráčmar, S. (2009). Effect of acid hydrolysis time on amino acid determination in casein and processed cheeses with different fat content. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22(3), 224-232.
- [53] Zhabankov, R. G., Andrianov, V. M., Ratajczak, H., & Marchewka, M. (1995). Vibrational spektra and stereochemistry of mono- and polysaccharides. *Journal of Structural Chemistry*, 36(2), 287-294.
- [54] De Gelder, J., De Gussem, K., Vandenabeele, P., & Moens, L. (2007). Reference database of Raman spektra of biological molecules. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38(9), 1133-1147.
- [55] Mrozek, M. F., & Weaver, M. J. (2002). Detection and identification of aqueous saccharides by using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 74(16), 4069-4075.
- [56] Júnior, P. H. R., De Sá OLIVEIRA, K., De Almeida, C. E. R.,..., & Perrone, I. T. (2016). FT- Raman and chemometric tools for rapid determination of quality parameters in milk powder: Classification of simplex for the presence of lactose and fraud detection by addition of maltodextrin. *Food Chemistry*, 196, 584-588.
- [57] Kirk, J. H., Dann, S. E., & Blatchford, C. G. (2007). Lactose: a definitive guide to polymorph determination. *International Journal of Pharmaceutics*, 334(1), 103-114.
- [58] Shih, C. J., Lupoi, J. S., & Smith, E. A. (2011). Raman spectroscopy measurements of glucose and xylose in hydrolysate: role of corn stover pretreatment and enzyme composition. *Bioresource Technology*, 102(8), 5169-5176.

- [59] Fardellone, P., Séjourne, A., Blain, H., Cortet, B., Thomas, T. & GRIO Scientific Committee (2016). Osteoporosis: Is milk a kindness or a curse?. *Joint Bone Spine*, 84, 275-281.
- [60] Trani, A., Gambacorta, G., Loizzo, P., Cassone, A., Fasciano, C., Zambrini, A. V., & Faccia, M. (2017). Comparasion of HPLC-RI, LC/MS-MS and enzymatic assays for the analysis of residua laktose in laktose-free milk. *Food Chemistry*, 235(15), 385-390.
- [61] Yaseen, T., Sun, D. W., & Cheng, J. H. (2017). Raman imaging for food quality and safety evaluation: Fundamentals and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 62, 177-189.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	Adenin
ATP	Adenosintrifosfát
BM	Bezlaktózové mléko
C	Cytosin
CCD	Charge-coupled device (elektronická součástka používaná pro snímání obrazové informace)
Cu ₂ O	Oxid měďný
CuSO ₄	Síran měďnatý
G	Guanin
GLUT1	Transportér glukózy 1
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LCT	Gen pro lidskou laktázu
LM	Běžné mléko
MCM6	Gen regulující expresi genu LCT
NAD ⁺	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
T	Thymin
UDP	Uridin-5-difosfogalaktóza

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1 Molekula laktózy [6]
- Obr. 2 Ukázka chromatogramu [38]
- Obr. 3 Základní schéma přístroje pro HPLC [38]
- Obr. 4 C. V. Raman [42]
- Obr. 5 Schématické znázornění pochodů spojených s výměnou energie mezi zkoumanou látkou a zářením [38]
- Obr. 6 Diagram energetických hladin po interakci fotonu a molekuly [36]
- Obr. 7 Ramanova spektra laktózy, glukózy a galaktózy [46]
- Obr. 8 Ramanova spektra laktózy, mléka a mléka bez obsahu laktózy [39]
- Obr. 9 Ramanova spektra vzorků mléka s konstantním obsahem krystalové violeti při různé koncentraci laktózy [46]
- Obr. 10 Graf výsledku stanovení sacharidů ve vzorcích pomocí HPLC
- Obr. 11 Ramanova spektra laktózy, glukózy a galaktózy
- Obr. 12 Ramanova spektra běžného a bezlaktózového mléka
- Obr. 13 Ramanovo spektrum vzorků při normování na fenylalanin v rozsahu vlnočtu $300-600\text{ cm}^{-1}$
- Obr. 14 Ramanovo spektrum vzorků při normování na fenylalanin v rozsahu vlnočtu $800 - 1200\text{ cm}^{-1}$
- Obr. 15 Závislost relativní intenzity píku při 357 cm^{-1} na koncentraci laktózy
- Obr. 16 Ramanovo spektrum běžného mléka a krystalové violeti
- Obr. 17 Ramanovo spektrum běžného mléka s normováním na krystalickou violet'
- Obr. 18 Závislost relativní intenzity píku při 1087 cm^{-1} na koncentraci laktózy

SEZNAM TABULEK

- Tab. 1* *Koncentrace laktózy v mléku vybraných druhů savců [1]*
- Tab. 2* *Reaktanty pro kolorimetrii a vlnová délka pro jejich stanovení [29]*
- Tab. 3* *Poměr běžného a bezlaktózového mléka ve vzorcích*
- Tab. 4* *Složení pufrů a program pro eluci aminokyselin z kolony*
- Tab. 5* *Obsah fenylalaninu ve vzorcích*

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I Stanovení koncentrace sacharidů ve vzorcích mléka pomocí HPLC – tabulka naměřených hodnot

Příloha P II HPLC – kalibrační křivky

Příloha P III Naměřená spektra – normování na fenylalanin

Příloha P IV Naměřená spektra – normování na krystalovou violet'

Příloha P I: Stanovení koncentrace sacharidů ve vzorcích mléka pomocí HPLC – tabulka naměřených hodnot

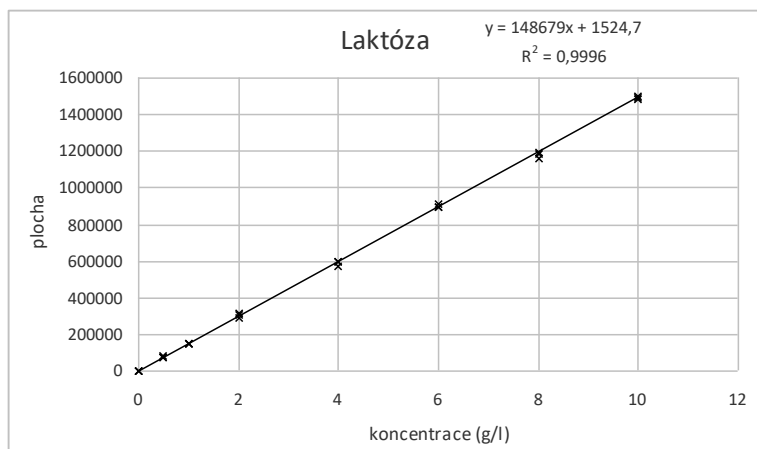
Tabulka 1 Hodnoty koncentrace sacharidů ve vzorcích stanovené pomocí HPLC

Vzorek LM:BM	Laktóza [g/100 ml]	Galaktóza [g/100 ml]	Glukóza [g/100 ml]
100 : 0	5,56 ± 0,11	NS*	NS*
80 : 20	4,17 ± 0,09	0,48 ± 0,01	0,46 ± 0,01
60 : 40	2,97 ± 0,07	0,85 ± 0,02	0,94 ± 0,03
50 : 50	2,46 ± 0,07	1,18 ± 0,03	1,05 ± 0,04
40 : 60	1,92 ± 0,05	1,48 ± 0,04	1,47 ± 0,04
20 : 80	1,04 ± 0,03	2,06 ± 0,06	1,93 ± 0,05
0 : 100	NS*	2,39 ± 0,06	2,36 ± 0,07
Vzorek LM:BM + CV	Laktóza [g/100 ml]	Galaktóza [g/100 ml]	Glukóza [g/100 ml]
100 : 0	5,57 ± 0,19	NS*	NS*
80 : 20	4,62 ± 0,10	0,14 ± 0,00	0,58 ± 0,01
60 : 40	2,13 ± 0,07	0,63 ± 0,01	0,81 ± 0,01
50 : 50	2,09 ± 0,05	1,50 ± 0,04	1,31 ± 0,04
40 : 60	1,49 ± 0,40	2,02 ± 0,05	1,57 ± 0,05
20 : 80	0,94 ± 0,03	2,61 ± 0,07	1,86 ± 0,05
0 : 100	NS*	3,39 ± 0,08	2,37 ± 0,04

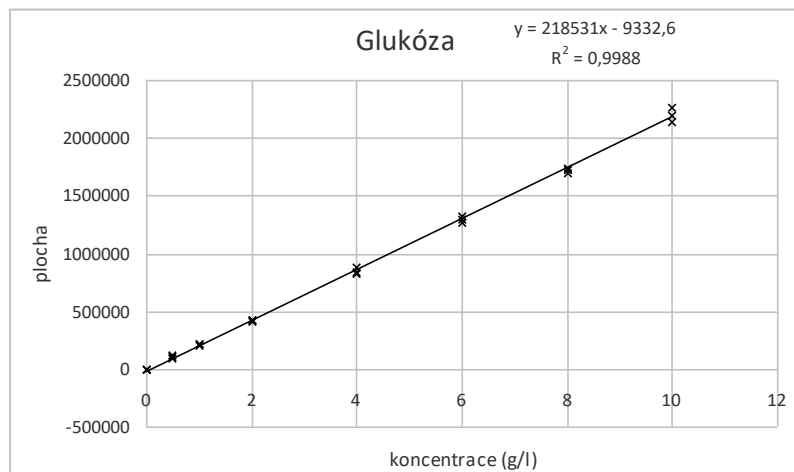
* pod mezí stanovitelnosti

CV – krystalová violet

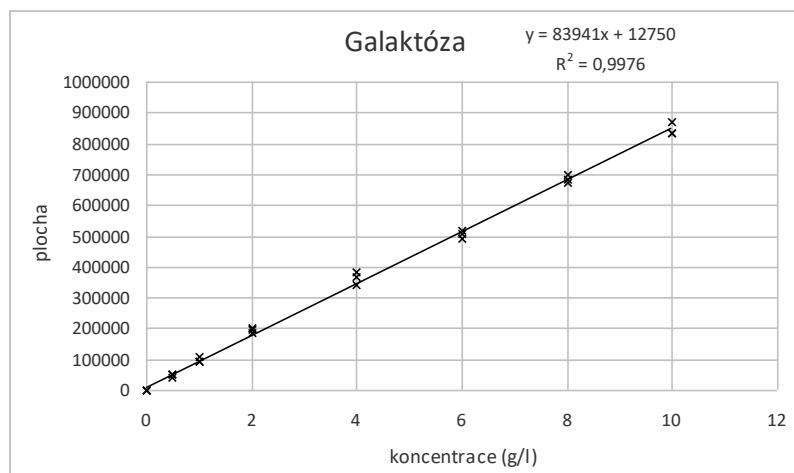
Příloha P II: HPLC – kalibrační křivky



Obr. 1 Kalibrační křivka laktózy

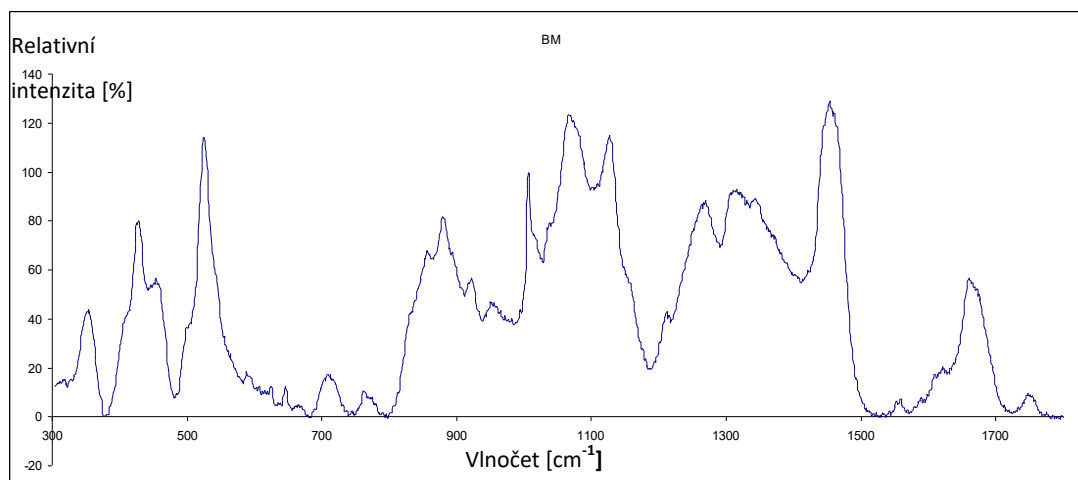


Obr. 2 Kalibrační křivka glukózy

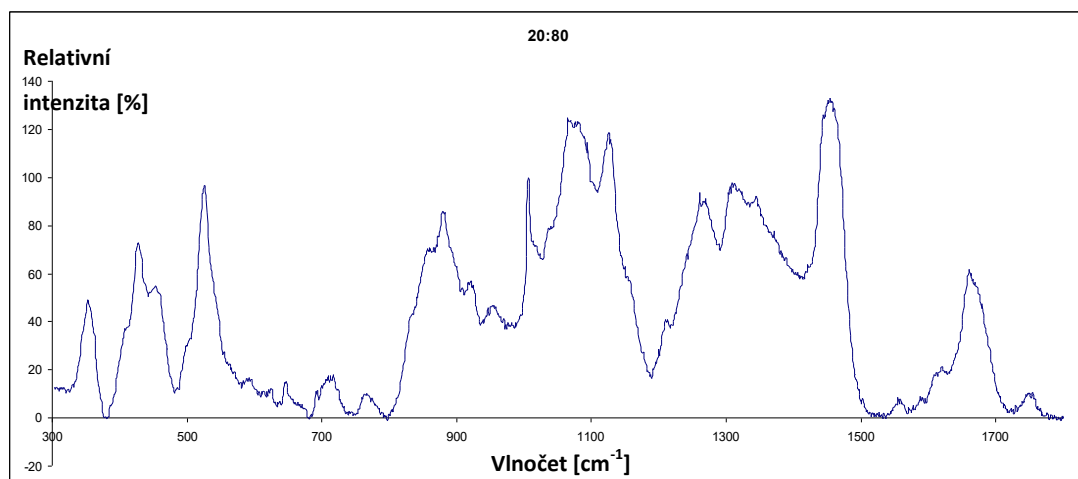


Obr. 3 Kalibrační křivka galaktózy

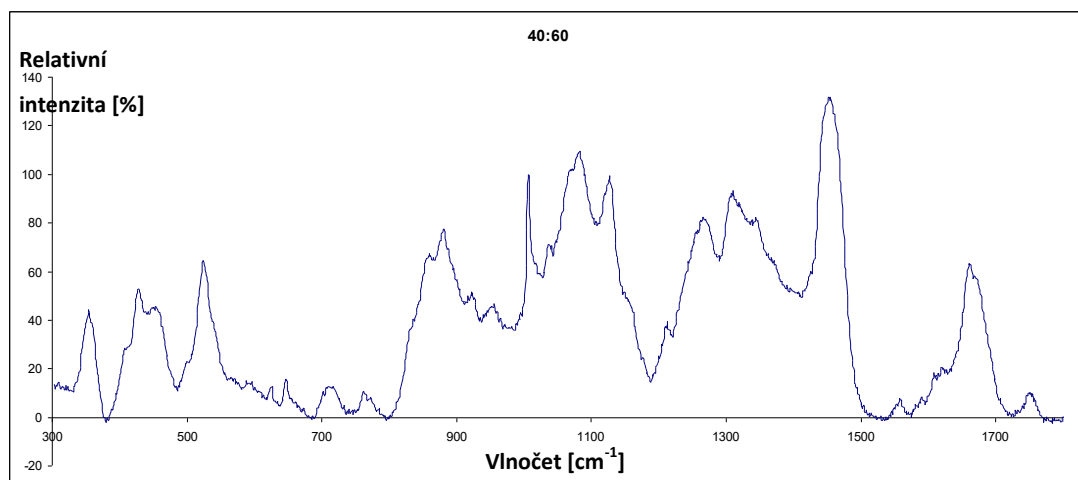
Příloha P III: Naměřená spektra – normování na fenylalanin



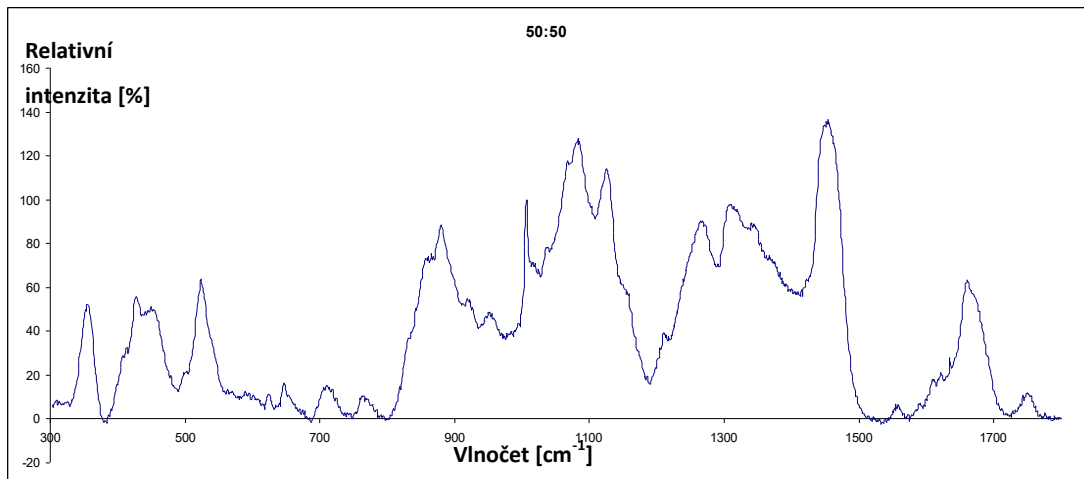
Obr. 4 Ramanovo spektrum bezlaktózového mléka (normováno na fenylalanin)



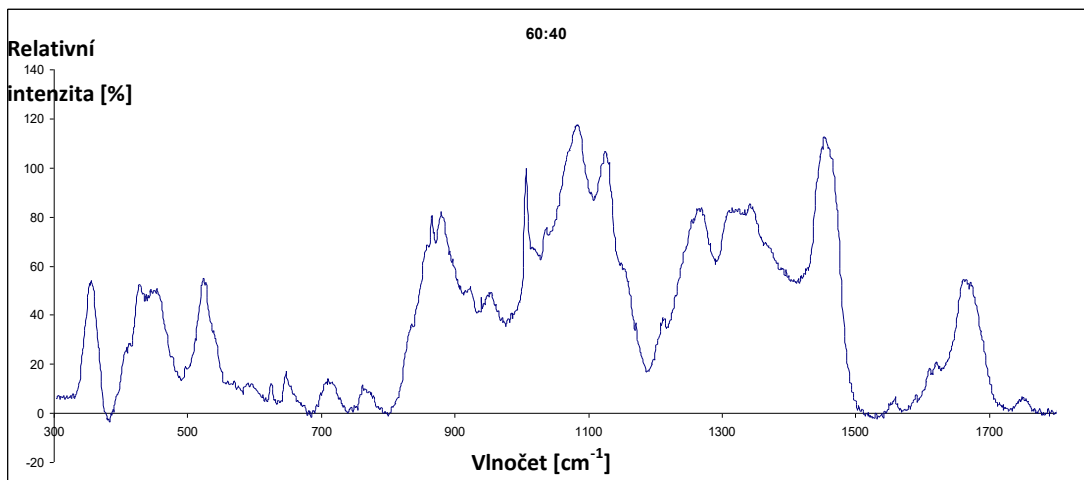
Obr. 5 Ramanovo spektrum mlék v poměru 20 (LM):80 (BM) (normováno na fenylalanin)



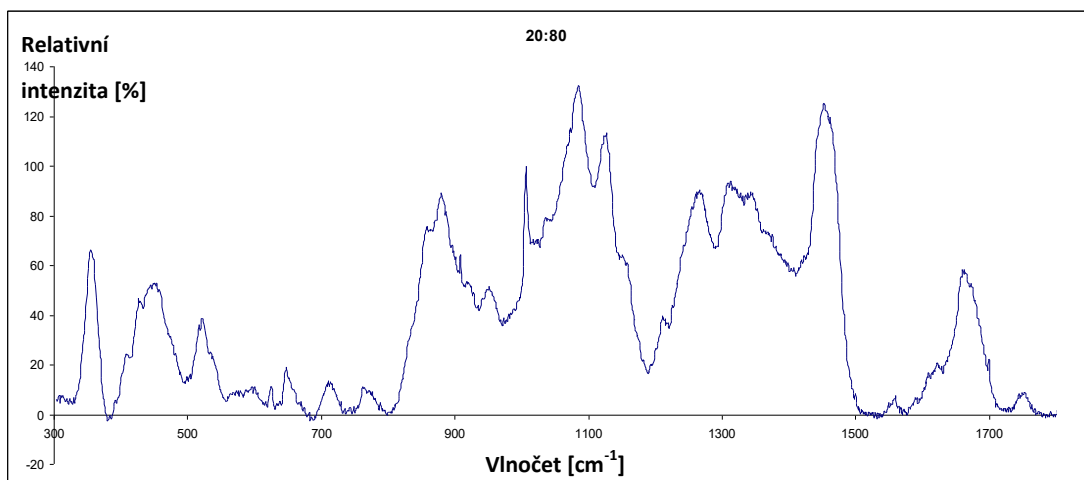
Obr. 6 Ramanovo spektrum mlék v poměru 40 (LM):60 (BM) (normováno na fenylalanin)



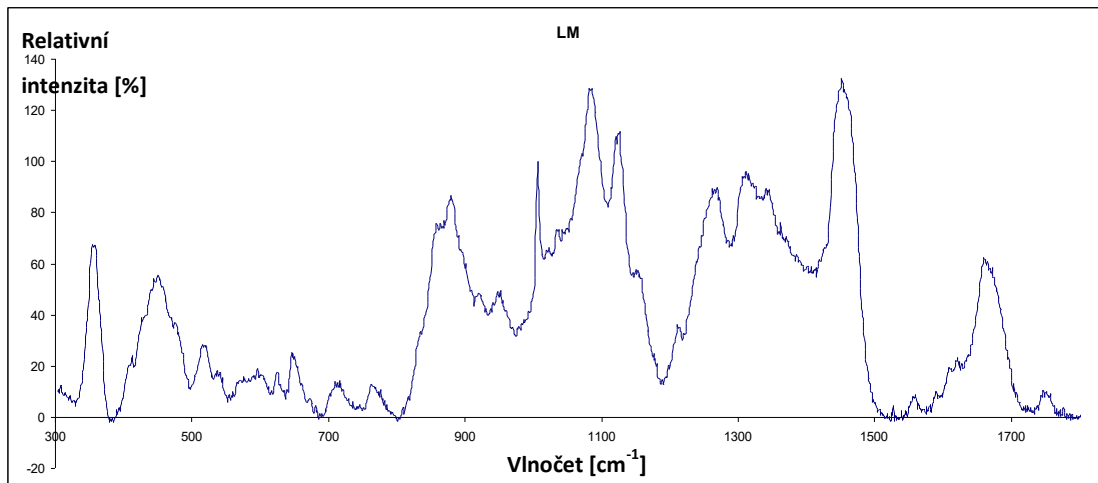
Obr. 7 Ramanovo spektrum mlék v poměru 50 (LM):50 (BM) (normováno na fenylalanin)



Obr. 8 Ramanovo spektrum mlék v poměru 60 (LM):40 (BM) (normováno na fenylalanin)

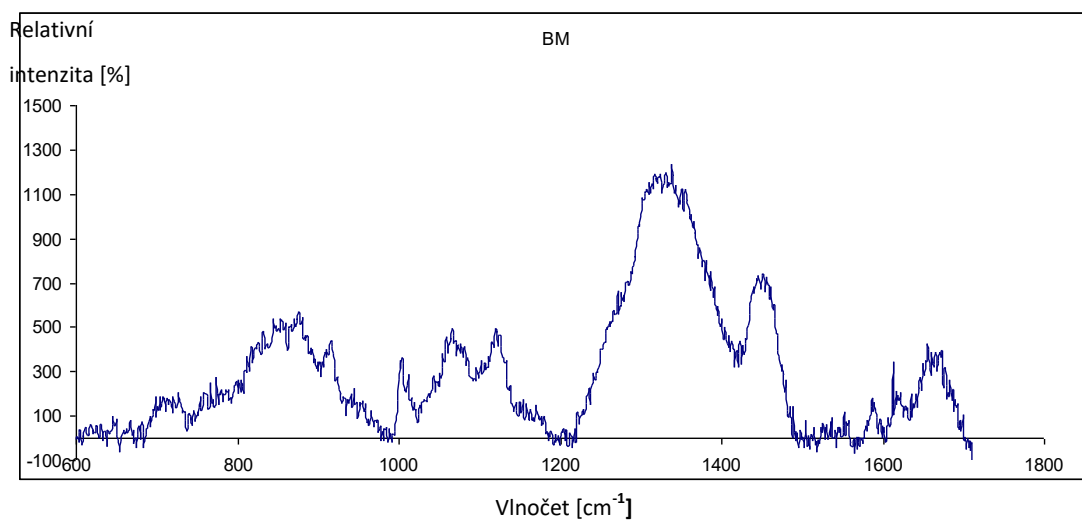


Obr. 9 Ramanovo spektrum mlék v poměru 20 (LM):80 (BM) (normováno na fenylalanin)

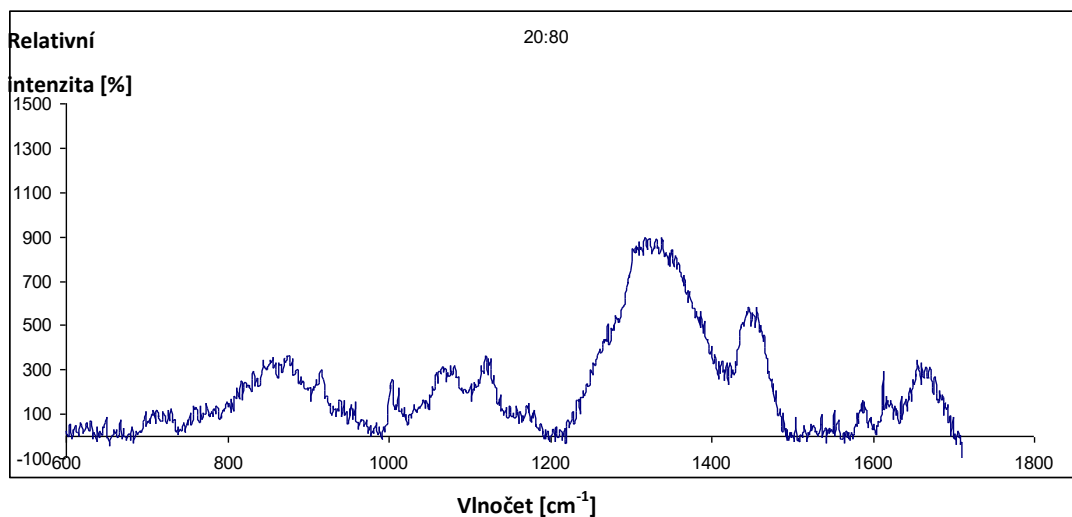


Obr. 10 Ramanovo spektrum běžného mléka (normováno na fenylalanin)

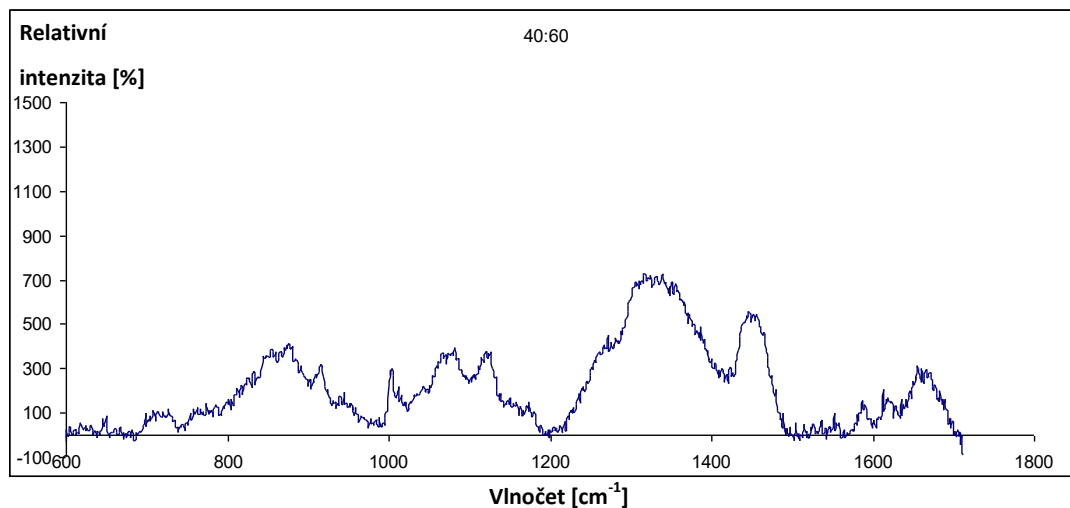
Příloha P IV: Naměřená spektra - normování na krystalovou violet'



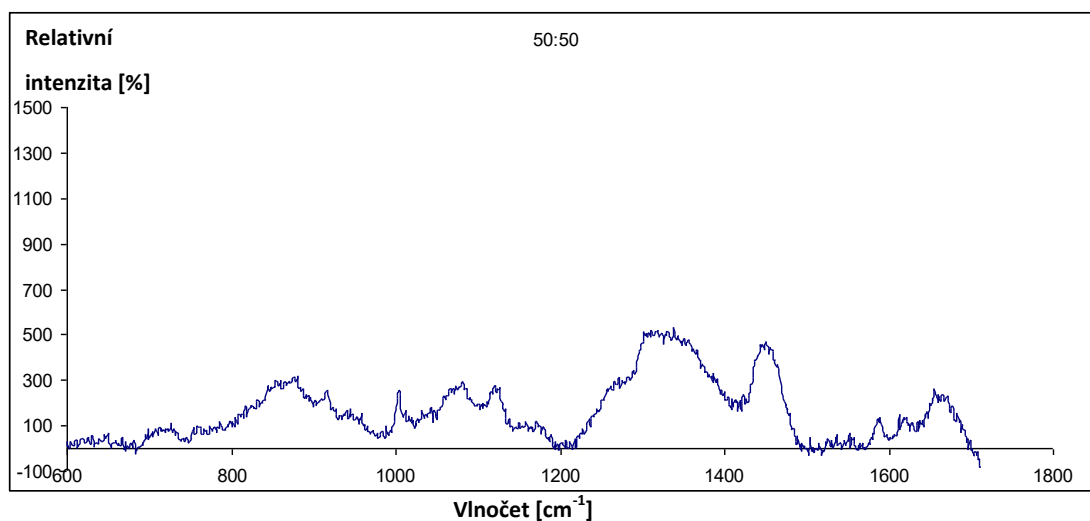
Obr. 11 Ramanovo spektrum bezlaktóзовého mléka (normováno na krystalovou violet')



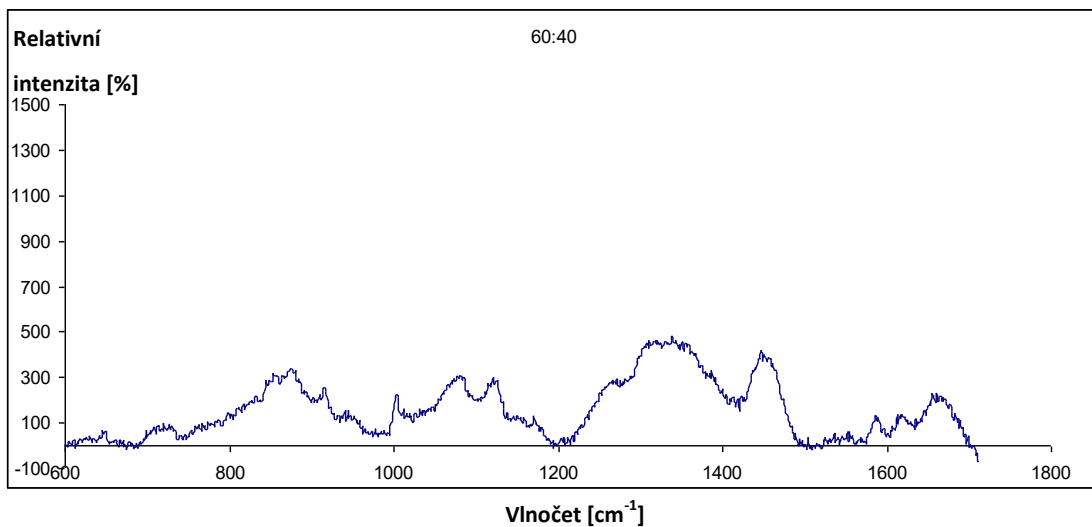
Obr. 12 Ramanovo spektrum mlék v poměru 20 (LM):80 (BM) (normováno na krystalovou violet')



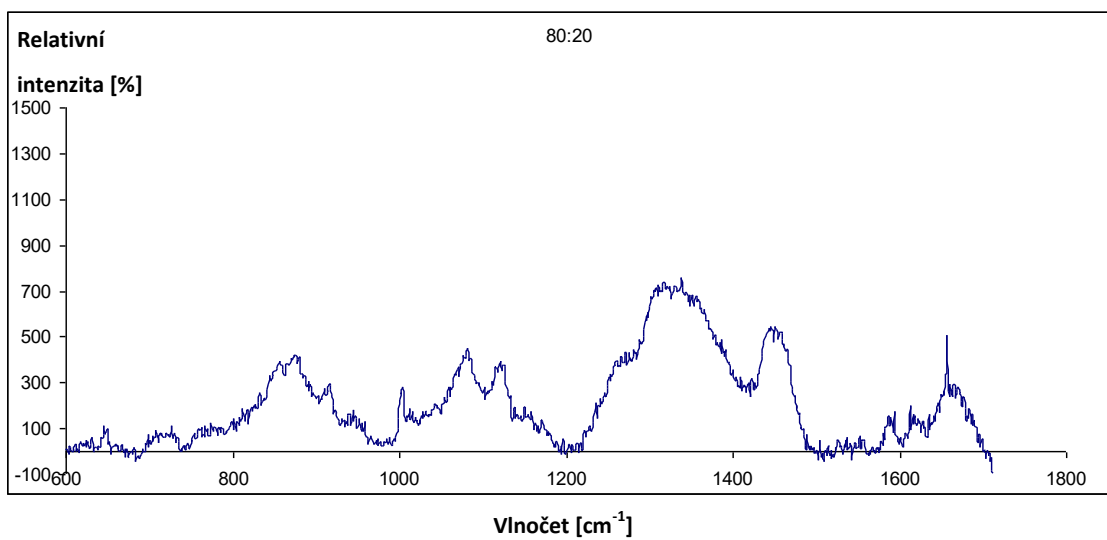
Obr. 13 Ramanovo spektrum mlék v poměru 40 (LM):60 (BM)(normováno na krystalovou violet')



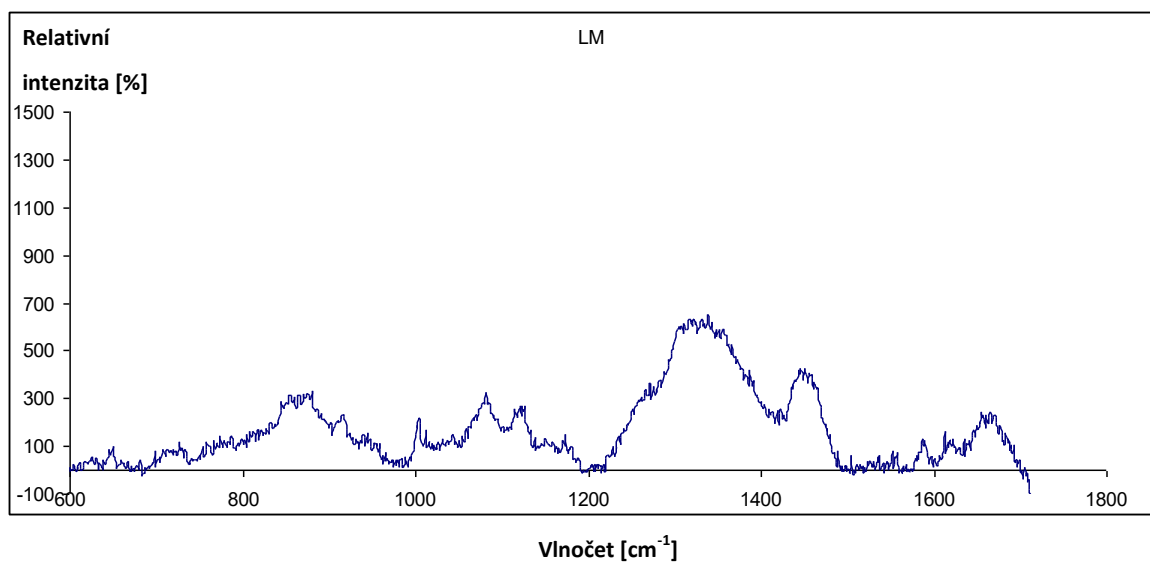
Obr. 14 Ramanovo spektrum mlék v poměru 50 (LM):50 (BM)(normováno na krystalovou violet')



Obr. 15 Ramanovo spektrum mlék v poměru 60 (LM):40 (BM) (normováno na krystalovou violet')



Obr. 16 Ramanovo spektrum mlék v poměru 80 (LM):20 (BM) (normováno na krystalovou violet')



Obr. 17 Ramanovo spektrum mlék v poměru běžného mléka)(normováno na krystalovou violet')