

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra chemie**



**Stanovení vybraných vitaminů skupiny B v mléce metodou HPLC**

(Determination of selected B group vitamins in milk using HPLC)

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Jaroslav Valenta**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Alena Hejtmánková, CSc.**

© 2018 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Stanovení vybraných vitaminů skupiny B v mléce metodou HPLC " jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 16.04.2018

---

**Bc. Jaroslav Valenta**

### **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval vážené paní doc. Ing. Aleně Hejtmánkové, CSc., za její velkou trpělivost a motivaci, podnětné rady a připomínky, konzultace a odborné vedení při vypracovávání této diplomové práce.

# Stanovení vybraných vitaminů skupiny B v mléce metodou HPLC

## Souhrn

Vitaminy rozpustné ve vodě jsou pestrá skupina biologicky aktivních látek různé chemické povahy zahrnující thiamin (B1), riboflavin (B2), niacin (B3), kyselinu pantothenovou (B5), pyridoxin (B6), biotin (B7), kyselinu listovou (B9), kobalamin (12) a vitamin C. Většina ve vodě rozpustných vitaminů zaujímá roli koenzymů důležitých enzymů. Hydrofilní vitaminy je nutné neustále doplňovat stravou. Mléko a mléčné výrobky jsou oblíbenou a výživnou součástí jídelníčku a klíčovou potravinou živočišného původu v dětském věku. Mléko je také významným zdrojem některých vitaminů. Některé vitaminy rozpustné ve vodě jsou v mléce v nízkých koncentracích, řada z nich je termolabilní a fotosenzitivní, a tak bývá stanovení jejich obsahu složité. Vhodným způsobem jejich kvantifikace je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). V současné době jen velmi málo původních prací pojednávajících o této problematice.

V rámci diplomové práce bylo zavedeno simultánní stanovení vitaminů B1, B2, B3, B6, B9 a C v různých druzích mléka metodou HPLC. Optimalizace metodiky přípravy byla realizována na 140 vzorcích. U poloviny vzorků byl použit enzym takadiastáza, který uvolňuje vázané formy vitaminů. Vhodnost jeho použití byla statisticky prokázána. Součástí manipulace se vzorky bylo jejich důkladné odstínění pro ochranu fotosenzitivních vitaminů (B2, B6, B9). Pro analýzu vzorků byla použita kolona s pevným jádrem Kinetex 2,6  $\mu\text{m}$  Polar C18 (100 x 4,6 mm, 100 Å), kdy separace jednotlivých vitaminů, jejich detekce a kvantifikace byla přesně podle postupu vyvinutého firmou Phenomenex. Analyzovány byly vzorky různých typů kravského, ovčího a kozího mléka. Jednalo se vzorky čerstvého a tepelně ošetřeného. Kvantifikace obsahu vitaminů B1 a B9 nebyla uspokojivě provedena, neboť téměř ve všech vzorcích byly jejich obsahy pod mezí detekce. Statisticky významný rozdíl v obsahu vitaminů byl stanoven u ovčího mléka oproti kravskému a kozímu. Výsledky obsahu vitaminů pro ostatní posuzované vztahy naznačují určité trendy a je potřeba je brát pouze jako orientační, avšak zasluhují pozornost pro další práce. Metodou HPLC se povedlo stanovit obsah většiny vitaminů, je však nutné pokračovat v optimalizaci i při přípravě vzorků.

**Klíčová slova:** mléko, thiamin, riboflavin, niacin, pyridoxin, listová kyselina, HPLC

# Determination of selected B group vitamins in milk using HPLC

## Summary

The Water-soluble vitamins (WSV) are a diverse group of biologically active substances of different chemical natures, including thiamine (B1), riboflavin (B2), niacin (B3), pantothenic acid (B5), pyridoxine (B6), biotin (B7), folate (B9), cobalamin (12) and vitamin C. Most of the water-soluble vitamins takes act as coenzymes of important enzymes. Hydrophilic vitamins need to be continuously supplemented through diet. Dairy and dairy products are popular and a nutritious part of diet and a key animal source food in childhood. Milk is also an important source of several vitamins. Some WSV are present in milk in low concentration and many of them are thermolabile and photosensitive, so it is often complicated to determine their content. A suitable way of their quantitation is high-performance liquid chromatography (HPLC). Currently, there are very few original works dealing with this issue.

Within the thesis, a simultaneous determination of B1, B2, B3, B6, B9 and C vitamin content in different kinds of milk was implemented through the HPLC method. Optimization of the preparation methodology was carried out on 140 samples. On half of the samples, a takadiastase enzyme was used, as it releases bound forms of vitamins. The suitability of its use has been statistically proven. Part of the manipulation with samples was their thorough shielding, in order to protect photosensitive vitamins (B2, B6, B9). For the analysis of the samples, a core-shell column Kinetex 2,6  $\mu\text{m}$  Polar C18 (100 x 4,6 mm, 100  $\text{Å}$ ) was used, where the separation of each vitamin, their detection, as well as quantification, was conducted in the exact accordance with the procedure developed by the Phenomenex company. The analysis was performed on samples of different kinds of cow, sheep and goat milk. These were always fresh and heat-treated samples. The quantification of both B1 and B9 vitamin content was not satisfactory, because in almost all analyzed samples, their concentration was below the limit of detection. Statistically significant difference in the vitamin content was determined for sheep milk, in comparison with both cow and goat milk. Vitamin content results for other relations considered suggest some trends and they need to be taken only as tentative, although, they deserve attention for future works. Through the HPLC method, it was possible to determine the content of most vitamins, nevertheless, it is necessary to continue with optimization even during the samples preparation.

**Keywords:** milk, thiamine, riboflavin, niacin, pyridoxine, folate, HPLC

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	1
<b>2</b>	<b>Cíl práce a vědecká hypotéza</b> .....	2
2.1	Cíle práce .....	2
2.2	Vědecké hypotézy .....	2
<b>3</b>	<b>Literární přehled</b> .....	3
3.1	Mléko.....	3
3.1.1	Mléko různých hospodářských zvířat.....	3
3.1.2	Bovinní mléko.....	4
3.1.3	Vybrané faktory ovlivňující obsah mléčných komponent kravského mléka.....	4
3.1.4	Ovčí mléko.....	5
3.1.5	Kozí mléko.....	6
3.2	Vitaminy.....	7
3.2.1	Vitaminy rozpustné v tucích.....	7
3.3	Vitaminy rozpustné ve vodě.....	8
3.3.1	Thiamin (B1) .....	10
3.3.2	Riboflavin (B2) .....	11
3.3.3	Nikotinamid (B3) .....	12
3.3.4	Kyselina panthotenová (B5) .....	13
3.3.5	Pyridoxin (B6) .....	14
3.3.6	Biotin (B7) .....	14
3.3.7	Kyselina listová (B9) .....	15
3.3.8	Kobalamin (B12) .....	16
3.3.9	Vitamin C .....	17
3.4	Vitaminy v kravském, ovčím a kozím mléce.....	18
3.4.1	Vitaminy skupiny B v mléce.....	20
3.4.2	Vitamin C v mléce.....	23
3.5	HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	24
3.5.1	Stanovení vitaminů rozpustných ve vodě podle různých autorů.....	25
<b>4</b>	<b>Materiál a metodika</b> .....	26
4.1	Laboratoř.....	26

4.2	Přístroje.....	26
4.3	Pomůcky.....	26
4.4	Chemikálie.....	27
4.5	Příprava roztoků mobilní fáze.....	27
4.6	Příprava vzorků mléka.....	28
4.7	Podmínky chromatografie.....	29
4.8	Přehled vzorků mléka.....	30
<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>32</b>
5.1	Kalibrace.....	32
5.2	Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	33
5.3	Chromatogramy.....	33
5.4	Porovnání obsahu vitaminů v kravském ovčím a kozím mléce.....	36
5.5	Porovnání obsahu vitaminů v mléce různých plemen skotu.....	38
5.6	Obsah vitaminů v mléce v závislosti na fázi laktace.....	46
5.7	Porovnání obsahu vitaminů v mléce různě starých dojnic.....	46
5.8	Porovnání obsahu vitaminů ve vzorcích bovinních komerčních mlék.....	48
<b>6</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>58</b>
<b>9</b>	<b>Přílohy</b> .....	<b>63</b>
<b>10</b>	<b>Seznam příloh</b> .....	<b>87</b>

# 1 Úvod

Mléko a mléčné výrobky jsou velmi oblíbeným živočišným produktem, kterému se dostává celosvětově významné pozornosti. Zejména v dětském období je velmi vhodným zdrojem důležitých látek. Mimo tak nutričně významné látky, jakými jsou např. kasein a vápník, obsahuje mléko také různé množství vitaminů. V dnešní době existuje již celá řada studií, které se věnují stanovování obsahu vitaminů rozpustných v tucích v mléce a mléčných výrobcích. U vitaminů rozpustných ve vodě je situace trochu jiná. Vzhledem k jejich velkému množství, různým chemickým vlastnostem a různým koncentracím, není zcela jednoduché jejich stanovení a obzvláště v tak složité matrici, jakou mléko je. Současné literární zdroje nejsou nedovolují hlubší pohled do problematiky stanovení a zároveň přehledu jejich obsahů v různých typech mléka. Obecně se dnes ví, že existují rozdíly v obsahu vitaminů mezi jednotlivými hospodářskými zvířaty, dokonce se ví, že určité faktory, jakými jsou plemenná příslušnost, zdravotní stav, fáze laktace, věk a mnohé další mají vliv na různé složky mléka, nicméně v oblasti vitaminů rozpustných ve vodě nejsou žádné trendy publikovány. Stanovení hydrofilních vitaminů není úplně předmětem velkého zájmu, ale vzhledem k tomu, že je v dnešní době zejména vlivem EU vyvíjen velký tlak na správné označování potravin a uvádění přesného obsahu složení, může být kvantifikace obsahu jednotlivých vitaminů v různých potravinách rutinní záležitostí. V současné době se pro analýzu vitaminů rozpustných ve vodě v různých zdrojích používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Jakmile se rozvinou reprodukovatelné postupy přípravy vzorků a proces bude optimalizován, vznikne poté možnost sledování obsahu a změn obsahu ve vztahu k určitým dějům, díky nimž bude možné postoupit k hlubšímu poznání různých fyziologických procesů a souvislostí.



## **2 Cíl práce a vědecká hypotéza**

### **2.1 Cíle práce**

Cílem práce je zavést a optimalizovat přípravu vzorku a vlastní stanovení vybraných vitaminů skupiny B v mléce metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Dále je cílem opakované stanovení jejich obsahu v různých druzích mléka a statisticky porovnat rozdíly v obsahu jednotlivých vitaminů mezi analyzovanými druhy mléka.

### **2.2 Vědecké hypotézy**

- Vhodnou metodou HPLC lze s dostatečnou spolehlivostí stanovit jednotlivé vybrané vitaminy skupiny B v mléce simultánní analýzou.
- Zastoupení jednotlivých vybraných vitaminů skupiny B v mléce různých druhů hospodářských zvířat se liší.
- Obsah jednotlivých vybraných vitaminů skupiny B v kravském mléce je během roku stálý.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Mléko

Mléko je sekretem mléčné žlázy samic savců, které svým složením odráží potřeby mláďat, mezi které patří nutriční, imunologické a mnohé další fyziologické požadavky. Ačkoliv existuje asi 4500 druhů savců a s tím i některé druhově velmi specifické rozdíly, tak ve své podstatě se jedná o podobný sekret (Thompson *et al.*, 2009). Mléko u savců je přirozeným a hlavním zdrojem výživy novorozených jedinců, ale v současnosti i hodnotnou potravinou pro člověka (Jelínek *et Koudela*, 2003). Člověk využívá mléko ve své stravě již 8000 let a v dnešní době se jedná zejména o kravské, buvolí, kozí a ovčí mléko. Kolem zpracování mléka se rozvinul poměrně velký průmysl, především ten potravinářský, kdy se mléko stalo pružnou surovinou v mlékárenském odvětví a slouží pro výrobu širokého a velmi rozmanitého spektra produktů (Thompson *et al.*, 2009).

Cesta k mléku jako potravíně byla velmi dlouhá. Nejprve započala domestikací skotu, ovcí a koz, která se datuje asi 8 tisíc let př. n. l. někde do oblasti Blízkého Východu. Významným krokem v procesu domestikace bylo využití tzv. druhotných produktů (tah, vlna, mléko aj.). V současnosti není zcela jasné, kde a kdy přesněji započalo využívání mléka, ale podle analýz a identifikací mléčného tuku z nádob se dnes ví, že mléko jako potravina byla jistě využita již někdy mezi 7 až 5 tisíci lety př. n. l. (Evershed *et al.*, 2008).

Mléko je polydisperzní systém s různým stupněm disperze jednotlivých částic (Jelínek *et Koudela*, 2003). Bližší charakteristika ho definuje jako vodný roztok laktózy, řady anorganických, organických solí a sloučenin ve stopových množstvích, ve kterém jsou dispergované koloidní částice (syrovátkové bílkoviny, kaseiny, micely) a tuky ve formě emulze tukových kapének (Thompson *et al.*, 2009).

#### 3.1.1 Mléko různých hospodářských zvířat

V České republice patří mezi nejdůležitější dojená hospodářská zvířata krávy, ovce a kozy. Z celosvětového hlediska má spolu s uvedenými druhy významný podíl na trhu (11 %) mléko buvolí. Jednotlivá specifika mléka 3 základních druhů přežvýkavců budou uvedeny v příslušných kapitolách. Při porovnávání mléka kravského, ovčího a kozího nalezneme velké

množství rozdílů ve složení, vlastnostech a dalších aspektech, kdy detailnější popis by byl nad rámec této práce. Porovnání základních složek mléka ve vztahu k uvedeným hospodářským zvířatům uvádí tabulka 1. Nejvyšší obsah sušiny (dáno zejm. bílkovinou a tukem) se nachází v mléce ovčím. Mléko kozí obsahuje o něco málo vyšší hodnoty než mléko kravské. Obsah laktózy je však vyšší u bovinního mléka a ovčího mléka.

**Tabulka 1: Procentuální obsah vybraných složek mléka u různých druhů hospodářských zvířat (upraveno dle Fuquay *et al.*, 2011)**

<b>Druh mléka</b>	<b>Sušina %</b>	<b>Bílkovina %</b>	<b>Tuk %</b>	<b>Laktóza %</b>	<b>Popeloviny %</b>
Kravské	12,7	3,4	3,7	4,8	0,7
Ovčí	19,3	4,5	7,4	4,8	1
Kozí	12,3	2,9	4,8	4,1	0,8

### **3.1.2 Bovinní mléko**

Kravské mléko představuje přibližně 85 % veškerého mléka nabízeného k prodeji (Fuquay *et al.*, 2011). Jedná se tedy o nejdůležitější mléko pro mléčné zpracovatelské odvětví. V České republice se vyrobí ročně více jak 2,7 miliard litrů mléka a spotřeba čerstvých mléčných výrobků (mléko, jogurty) se pohybuje přes 90 l na obyvatele a rok (Veselá, 2013). Kravské mléko je tedy významnou živočišnou komoditou, která zaujímá z hlediska výživy člověka zejména v dětském věku významné postavení. Z nutričního a technologického hlediska je významný obsah jednotlivých mléčných komponent.

### **3.1.3 Vybrané faktory ovlivňující obsah mléčných komponent kravského mléka**

Nejsledovanějšími složkami jsou bílkovina a tuk. Obsah složek mléka se mění ve vztahu k individualitě dojnice, plemenné příslušnosti, věku, kondice, fázi a pořadí laktace, výživě, období roku a mnohým dalším faktorům (Boro *et al.*, 2016, Fuquay *et al.*, 2011, Hofírek *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2014). S nárůstem zájmu o mléko jako významnou potravinářskou komoditu se v průběhu historie jednotlivá dojná plemena skotu šlechtila velmi intenzivně směrem k vysoké mléčné užitkovosti. Důsledkem této snahy jsou vysokoužitkové dojnice zejména holštýnského plemene s mléčnou užitkovostí 8 - 12 000 Kg za rok (Strapák, 2013).

S vysokou produkcí souvisí i určitá změna složek mléka oproti plemenům s nižší užitkovostí. Pro mléko holštýnského skotu je typický nižší obsah tuku a bílkovin. Nejbohatším mlékem na složky mléka se uvádí dojné plemeno jersey (Chitchyan *et* Grigoryan, 2016). Dojnice jerseyjského skotu tvoří mléko s obsahem tuku (5 - 7 %) a bílkovin (4 %) (Strapák, 2013). Czerniewicz *et al.* (2006) uvádí v mléce u plemene jersey v porovnání s holštýnským skotem vyšší obsah bílkovin o 19 % a obsah tuku o 50 %.

Dalším faktorem ovlivňující obsah některých složek mléka a především jeho množství je stádium laktace. Po otelení dochází k nárůstu množství mléka dojnice a postupně s tím i zpravidla k nižšímu obsahu tuku a bílkovin související se zápornou energetickou bilancí. Po vyrovnání deficitu až k období zasušení postupně obsah tuku a bílkovin stoupá, to je dáno především snižováním produkce mléka v poslední třetině laktace (Strapák, 2013). Obsah laktózy nepodléhá výkyvům (Strapák, 2013) a je v mléce velice stabilní z hlediska obsahu (Hofírek *et al.*, 2009). Obsah minerálních látek v mléce také nevykazuje významné výkyvy (Strapák, 2013). Další v mléce se spíše ve stopových množstvích vyskytující látky málokdy stanovují. Jak uvádí Hofírek *et al.* (2009), i když lze předpokládat určité vztahy mezi obsahem stopových látek a např. úrovní zásobení dojnic těmito látkami, nelze mléko k těmto účelům příliš využívat.

Obsah vitaminů v kravském mléce s ohledem na výše uvedené faktory je jen velmi málo zmapovanou oblastí. U vitaminů rozpustných v tucích, kde se předpokládá jejich korelace s obsahem tuku, je situace z hlediska literárních informací o něco lepší. Vitamin E a vitamin A se netvoří vlivem bachorové mikroflóry, a tak jejich obsah úzce souvisí s množstvím přijatém krmivem. U obsahu vitaminu D je velmi patrná sezónnost, kdy v letních měsících jsou jeho hladiny v mléce výrazně vyšší než v zimních měsících (Strapák, 2013). Vliv různých faktorů na obsah vitaminů rozpustných ve vodě v mléce není autory uváděn.

### **3.1.4 Ovčí mléko**

Ovčí mléka zaujímá přibližně 2 % z celkové světové produkce mléka (cca 8 mil. tun). Jsou ovšem země, kde má tento druh mléka významné postavení i z hlediska zpracování tradičních mléčných výrobků. Jedná se především o země Blízkého Východu, oblasti perského zálivu a některé evropské země (Francie, Itálie, Řecko, Španělsko) (Fuquay *et al.*, 2011). Středomořská oblast produkuje 66 % světového ovčího a 18 % světového kozího mléka (Pandya *et* Ghodke, 2006). V České republice se můžeme s tímto mlékem setkat většinou v bio kvalitě na farmářských trzích nebo v odděleních zdravé výživy. Ačkoliv je ovčí

mléko velmi bohaté na složky v porovnání s mlékem kravským, zřídka je využíváno pro výrobu konzumního mléka. Daleko častěji se zpracovává pro výrobu sýrů.

Ovčí mléko nese charakteristickou vůni, je daleko viskóznější a kyselější než mléko kravské a v prvních hodinách po vydojení disponuje vyšší údržností než mléka ostatních druhů (Fuquay *et al.*, 2011). Jak ukazuje tabulka 1, jeho základní předností je značný obsah sušiny díky vyššímu obsahu bílkovin a tuku, pro výrobu sýrů má tak větší výtěžnost. Stejně tak jako u bovinního mléka má vliv na obsah složek plemeno, fáze laktace, věk a mnohé další (Fuquay *et al.*, 2011). Produkce ovčího stejně tak kozího mléka je zatížena vlivem sezonnosti. Obsahy tuku, bílkovin a minerálních látek se s koncem laktace zvyšují (Park *et al.*, 2007), tak obsah laktózy se snižuje z 4,1 % na 3,4 % (Fuquay *et al.*, 2011). Obsah minerálních látek a vitaminů je vyšší než u mléka kravského a kozího (Park *et al.*, 2007).

### **3.1.5 Kozí mléko**

Produkce kozího mléka je velmi blízká produkci ovčího mléka a představuje asi 2 % celosvětové produkce. Významný je chov koz a produkce kozího mléka v zemích, v nichž klimatické podmínky nedovolují chov skotu. Cenným živočišným produktem je kozí mléko a jeho produkty především v rozvojových zemích (Fuquay *et al.*, 2011).

Kozí mléko je více podobné humánnímu mléku a je považováno za velmi vhodnou alternativu mléka kravského (Kumar *et Sharma*, 2016). Složení kozího mléka je stejně jako u předešlých přežvýkavců ovlivněno celou řadou faktorů a obsahem sušiny i řady dalších látek je podobný mléku kravskému (tabulka 1). Typická kozí vůně mléka je podmíněna specifickým složením mléčného tuku. Mezi významné složky kozího mléka se řadí oligosacharidy, které mají vliv na rozvoj CNS a hovoří se o využití fortifikace kojenecké výživy těmito látkami (Fuquay *et al.*, 2011). Kozí mléko obsahuje asi o 10 % méně laktózy než mléko kravské, navíc prochází střevní pasáží podstatně rychleji, a tak je daleko lépe snášeno u lidí s laktózovou intolerancí. Další předností kozího mléka je vysoká stravitelnost, kdy kravské mléko je tráveno člověkem 2 - 3 hodiny, ale mléko kozí kolem 20 minut (Kumar *et Sharma*, 2016). Kozy transformují veškerý karoten do vitamínu A, kterého je tak v kozím mléce vysoce obsaženo a podmiňuje bělejší zbarvení mléka (Fuquay *et al.*, 2011).

## 3.2 Vitaminy

Charakterizovat a univerzálně definovat tak pestrou skupinu látek není zcela jednoduchou záležitostí. Jedná se o pestré spektrum různorodých biologicky aktivních látek, které jsou rostlinného, mikrobiálního a v případě přeměny z provitaminů živočišného původu, zasahují do intermediárního metabolismu a ovlivňují řadu biochemických procesů (Hofírek *et al.*, 2009). Společnou a významnou vlastností všech vitaminů je jejich účinek již při velmi nízkých koncentracích (Ledvina *et al.*, 2009). Vitaminy jsou esenciálními složkami potravy (Hlúbik *et Opltová*, 2004).

Již v 19. století bylo známo, že existují určité nepostradatelné látky pro výživu jedince, které byly dlouhou dobu označovány jako výživové faktory (Matouš, 2010). Daleko dříve se však lidé setkávali s onemocněními, která byla často zapříčiněna jejich karencí. Taková onemocnění se nazývají hypovitaminózy, známé jsou však i hypervitaminózy. Pro často velmi typické uplatnění jednotlivých vitaminů v metabolismu jsou hypo- nebo hypervitaminózy specifickými klinickými syndromy (Bender, 2008).

Vitaminy jsou z chemického hlediska velmi rozmanitou skupinou organických látek mezi nimiž se jen velmi těžce hledají strukturální vztahy, podle nichž by se daly klasifikovat (Hlúbik *et Opltová*, 2004). Nejdůležitějším rozlišovacím znakem je jejich rozpustnost ve vodě nebo v tucích, a proto se dělí na vitaminy rozpustné ve vodě (hydrofilní) a vitaminy rozpustné v tucích (lipofilní) (Matouš, 2010). Mezi hydrofilní vitaminy řadíme vitaminy skupiny B a vitamin C. Lipofilními vitaminy jsou vitaminy A, D, E a K.

### 3.2.1 Vitaminy rozpustné v tucích

Jedná se o 4 látky, které mají velmi podobnou strukturu a lze je zařadit mezi izoprenoidy (Matouš, 2010). Společná je i jejich cesta vzniku z acetyl-CoA (Combs, 2008). Lipofilní vitaminy jsou v těle ukládány hlavně v jaterních hepatocytech (Velíšek *et Hajšlová*, 2009) a díky tomu je nutné jejich příjem kontrolovat, zejména při aplikacích v humánní i veterinární praxi, neboť může vzniknout hypervitaminóza (Matouš, 2010), dobře známá u vitaminu D a vitaminu A (Velíšek *et Hajšlová*, 2009). Vstřebávání lipofilních vitaminů se odehrává při současném nenarušeném vstřebávání tuků. Poruchy žlučového systému a nevhodná strava jsou základními příčinami hypovitaminóz (Murray *et al.*, 2002). Snížení obsahu vitaminů

rozpuštěných v tucích se odehrává cestou jejich oxidace (Velíšek *et* Hajšlová, 2009). Přehled lipofilních vitaminů, jejich základní funkce a doporučené denní dávky uvádí tabulka 2.

**Tabulka 2: Přehled lipofilních vitaminů, základní funkce a doporučené denní dávky (upraveno dle Ledvina *et al.*, 2009, Combs, 2008)**

Vitamin	Triviální název	Základní funkce v metabolismu	Dospělí jedinci 25 - 30 let (mg/den)	
			Muži	Ženy *
Vitamin A	retinol	proces vidění, diferenciacie epitelových buněk	1	0,8
Vitamin D	kalciferol	kostní metabolismus, vápníková homeostáza	0,005	0,005
Vitamin E	tokoferol	membránový antioxidant	10	8
Vitamin K	fylochinon	srážení krve, kalciový metabolismus	0,08	0,065

\* ženy těhotné a kojící o 25 % vyšší hodnoty

### 3.3 Vitaminy rozpustné ve vodě

Tato skupina látek nemá, až na svou charakteristickou rozpustnost ve vodě, z chemického hlediska nic významně společného (Murray *et al.*, 2002). Hydrofilní vitaminy nejsou zpravidla v organismu skladovány nebo jen velmi omezeně (Velíšek *et* Hajšlová, 2009), neboť jejich rozpustnost ve vodě jim dovoluje nadbytečné množství vyloučit močí (Matouš, 2010). Díky omezeným zásobám v organismu (až na kobalamin), musí být vitaminy rozpustné ve vodě plynule doplňovány (Murray *et al.*, 2002). Základem jejich rozpustnosti ve vodě jsou polární a ionizovatelné skupiny (fosfátové, karboxylové, hydroxylové, atd.) (Combs, 2008). Z výše uvedených skutečností vyplývá, že nejdůležitějšími onemocněními budou jejich karence, hypovitaminózy až avitaminózy. Nepřítomnost nebo relativní nedostatek vitaminů vede k charakteristickým poruchám a chorobám. Nedostatek jednoho z vitaminů skupiny B je poměrně vzácný, neboť základní příčinou jejich karence je nedostatečná výživa, která je spojena s nedostatkem více těchto vitaminů současně (Murray *et al.*, 2002). Historicky velmi známá avitaminóza vitaminu C (kurděje) je v civilizovaném světě již literární vzpomínkou (Matouš, 2010). K největším ztrátám vitaminů rozpustných ve vodě dochází ve většině případů během technologického a kulinárního zpracování potravin k největším ztrátám výluhem (Velíšek *et* Hajšlová, 2009).

Mezi rozpustné vitaminy ve vodě se řadí vitaminy skupiny B (B1 - thiamin, B2 - riboflavin, B3 - niacin, B5 - kyselina pantothenová, B6 - pyridoxin, B7 - biotin, B9 - kyselina

listová, B12 - kobalamin) a vitamin C. Nomenklatura hydrofilních vitaminů je poměrně složitá a liší se napříč literárními zdroji, kdy největší variabilita spočívá v zařazování různých vitaminů do komplexu vitaminů B a mimo něj. Autoři Ledvina *et al.* (2009) zahrnují do komplexu vitaminů B pouze thiamin (B1), riboflavin (B2), nikotinamid (B3), pyridoxin (B6) a kobalamin (B12). Přehled vitaminů rozpustných ve vodě, jejich základní funkce a doporučené denní dávky uvádí tabulka 3.

**Tabulka 3: Přehled hydrofilních vitaminů, základní funkce a doporučené denní dávky (upraveno dle Ledvina *et al.*, 2009, Combs, 2008)**

Vitamin	Triviální název	Základní funkce v metabolismu	Dospělí jedinci 25 - 30 let (mg/den)	
			Muži	Ženy *
<b>B1</b>	thiamin	dekarboxylace 2-oxokyseliny	<b>1,5</b>	<b>1</b>
<b>B2</b>	riboflavin	oxidoredukčních reakcí	<b>1,7</b>	<b>1,3</b>
<b>B3</b>	nikotinamid	koenzym dehydrogenáz	<b>19</b>	<b>15</b>
<b>B5</b>	kyselina pantotenová	metabolismus mastných kyselin	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>B6</b>	pyridoxin	metabolismus aminokyselin	<b>2</b>	<b>1,6</b>
<b>B7</b>	biotin	karboxylační reakce	<b>není nutný</b>	<b>není nutný</b>
<b>B9</b>	kyselina listová	přenos jednouhlíkových funkčních skupin	<b>0,2</b>	<b>0,18</b>
<b>B12</b>	kobalamin	metabolismus aminokyselin	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>
<b>C</b>	kyselina askorbová	oxidoredukční systém, syntéza kolagenu	<b>60</b>	<b>60</b>

\* ženy těhotné a kojící o 25 % vyšší hodnoty

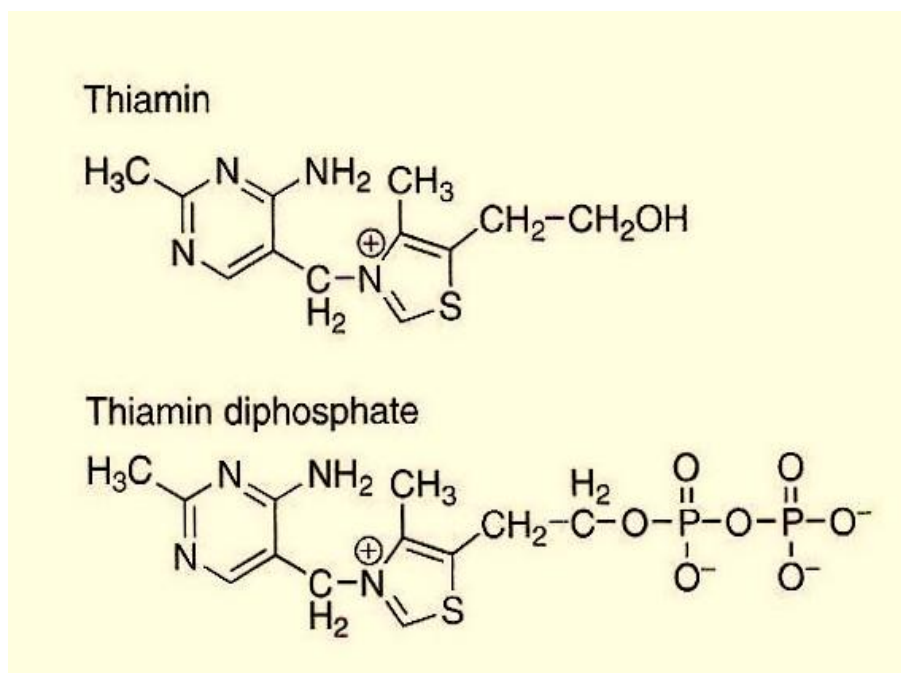
Vedle různých specifických funkcí působí tato skupina vitaminů jako kofaktory enzymů, nebo jako prekurzory takových kofaktorů (Ledvina *et al.*, 2009). Funkční vztah mají především k metabolismu bílkovin a sacharidů, ale také k činnosti endokrinních žláz a nervového systému. U přežvýkavců na rozdíl od lidí nejsou karence vitaminů skupiny B časté. Bachorová mikroflóra dostatečně kryje svou syntézou potřebná množství vitaminů (Hofírek *et al.*, 2009).



### 3.3.1 Thiamin (B1)

Thiamin je znám již z konce 19. století, byl objeven v roce 1897 a chemicky potvrzen syntézou v roce 1936 (Jelínek *et Koudela*, 2003), v podstatě je to nejdéle známý vitamin (Ledvina *et al.*, 2009). Nachází se prakticky ve všech rostlinných a živočišných tkáních. Je poměrně pevnou součástí membrán buněk nervového systému (někdy označovaný jako aneurin) (Jelínek *et Koudela*, 2003).

Z chemického hlediska se jedná o derivát pyrimidinu a thiazolu, které jsou spojeny methylenovým můstkem (obrázek 1) (Ledvina *et al.*, 2009). Aktivní formou thiaminu je thiamindifosfát (obrázek 1) vznikající v mozku a játrech. Thiamindifosfát je koenzymem oxidativní dekarboxylace 2-oxokyselin (např. pyruvátu) a transketolázových reakcí (např. pentózafosfátový cyklus) (Murray *et al.*, 2002).



Obrázek 1: Thiamin a jeho fosforylovaný derivát thiamindifosfát (Bender, 2008).

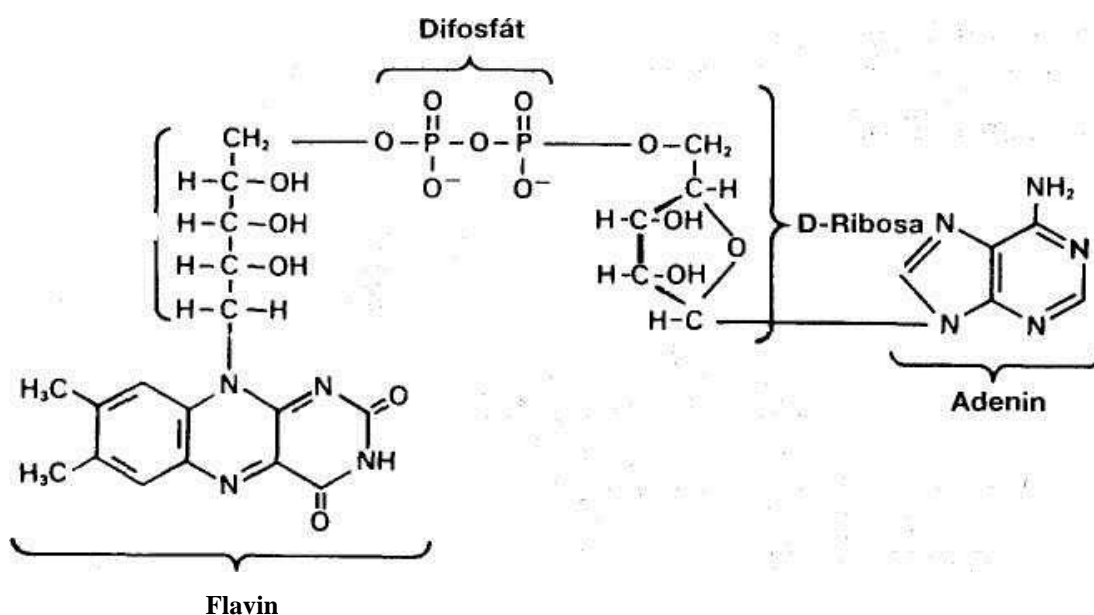
Zdrojem thiaminu jsou jak rostlinné tak živočišné produkty. Poměrně málo je zastoupen v bílém pečivu a hlazené rýži, kdežto např. otruby a kvasnice vykazují vysoký obsah tohoto vitamínu (Ledvina *et al.*, 2009). Právě hlazená rýže se stala problémem v jihovýchodní Asii, kdy v této spojitosti byl velký problém s onemocněním beri-beri (Bender, 2008). Onemocnění je charakterizované neurologickými a kardiovaskulárními poruchami (Ledvina *et al.*, 2009).

Thiamin se rychle rozkládá v alkalickém prostředí. Volný thiamin snadno oxiduje na thiamindisulfid a některé další deriváty, kterým je např. thiochrom s výrazně modrou fluorescencí, které se využívá v kvantitativním stanovení (Combs, 2008). Dospělý člověk má zásoby kolem 30 mg (50 % svaly, zbytek játra a ledviny), kdy asi 80 % thiaminu je vázáno na dehydrogenázy (Kohlmeier, 2015).

### 3.3.2 Riboflavin (B2)

Riboflavin se podařilo izolovat ve 30. letech 20. století a pojmenování získal díky chemické a biologické identitě s fluoreskujícími flaviny (Hlúbik *et Opltová*, 2004). Základem struktury riboflavinu je isoalloxasinové jádro, které je v poloze 7 a 8 substituováno dvěma methyly a cukerný alkohol ribitol je neglykosidově vázaný primárně alkoholovou skupinou na dusík isoalloxasinového jádra (Matouš, 2010). Po fosforylaci se stává riboflavin součástí FMN (flavinmononukleotidu) a FAD (flavinadeninonukleotidu, obrázek 2) (Velíšek *et Hajšlová*, 2009). FMN a FAD jsou tedy aktivními formami riboflavinu (Ledvina *et al.*, 2009), které fungují jako kofaktory flavoproteinů (enzymů), které se účastní jedno- a dvouelektronových oxidačně-redukčních reakcí (Velíšek *et Hajšlová*, 2009).

Obrázek 2: Flavinadeninonukleotid (FAD) (Murray *et al.*, 2002)



Riboflavin se nachází v potravinách rostlinného i živočišného původu (Ledvina *et al.*, 2009). Jako volný riboflavin se vyskytuje např. v syrovátce, vázaný ve formě FMN a FAD ve

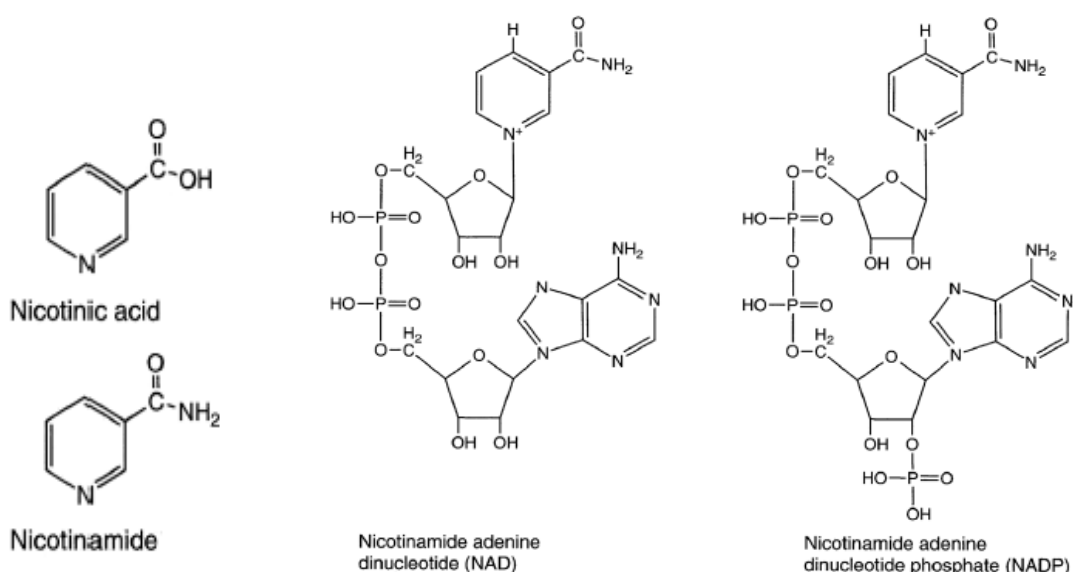
větším množstvím v droždí. Z rostlinných zdrojů je zejména v luštěninách a z živočišných surovin je jeho velké množství v játrech a mléčných výrobcích (Hlúbik *et* Opltová, 2004).

Riboflavin je na jedné straně termostabilní látkou, na straně druhé je citlivý na světlo (Murray *et al.*, 2002) a alkalické prostředí (Kohlmeier, 2015). Fotosenzitivita se projevuje fotochemickou degradací ribitolového postranního řetězce, která vede k tvorbě nežádoucího lumiflavinu a lumichromu (Combs, 2008).

### 3.3.3 Nikotinamid (B3)

Vitamin B3 označovaný též jako niacin a objevený v roce 1937 (Hlúbik *et* Opltová, 2004), je společným názvem pro kyselinu nikotinovou a nikotinamid (obrázek 3) (Murray *et al.*, 2002). Kyselina nikotinová (pyridin-3-karboxylová kyselina) a její amid nikotinamid mají stejnou biologickou účinnost. Obě látky jsou základem oxidoredukčního koenzymu NAD (nikotinamidadenindinukleotidu), v oxidované (NAD<sup>+</sup>) a redukované (NADH) variantě, a dále jeho fosforečného esteru nikotinamidadenindinukleotid-fosfátu NADP (oxidovaný NADP<sup>+</sup> a redukovaný NADPH) (Velíšek *et* Hajšlová, 2009). NAD a NADP (obrázek 3) se v organismu široce uplatňují jako koenzymy mnoha dehydrogenačních enzymů (např. laktátdehydrogenáza, malátdehydrogenáza aj.) (Murray *et al.*, 2002) a zajišťují tedy přenos elektronů v respiračních systémech a ve většině redoxních reakcí Krebsova cyklu (Velíšek *et* Hajšlová, 2009).

**Obrázek 3: Vitamin B3 jako kyselina nikotinová (vlevo nahoře) a její amid (vlevo dole). Uprostřed koenzym NAD a vpravo koenzym NADP (Kohlmeier, 2015).**

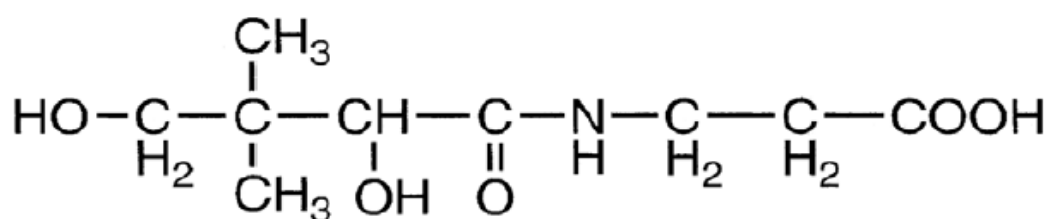


Niacin se nachází v malém množství téměř ve všech potravinách, většinou ve vázané formě. V potravinách živočišného původu ho nalezneme především ve formě NAD a NADP, kdežto v potravinách rostlinného původu ve formě kyseliny nikotinové. Nejvýznamnějšími zdroji jsou kvasnice, čerstvá zelenina, maso, játra a ryby (Matouš, 2010). Určitá zásoba vitamínu (zejména v podobě NAD) pro případ potřeby při nedostatku se nachází v játrech (Kohlmeier, 2015). Metabolismu vitamínu B3 úzce souvisí s esenciálním tryptofanem, který může být převeden na NAD<sup>+</sup> v případě potřeby (na 1 mg NAD je potřeba 60 mg tryptofanu). Nedostatek vitamínu B3 je spojen až s deficitem této aminokyseliny. Takovým případem jsou populace odkázané na kukuřici jako hlavní zdroj výživy, onemocnění které vzniká se nazývá pelagra a zahrnuje zažívací problémy, dermatitidu a v konečném důsledku i demenci (Murray *et al.*, 2002).

### 3.3.4 Kyselina pantothenová (B5)

Vitamin byl poprvé izolován v roce 1939, na vysvětlení jeho biologických účinků se však čekalo ještě do let 1945 - 1947 (Hlúbik *et Opltová*, 2004). Z chemického hlediska jde o sloučeninu kyseliny pantoové a β-alaninu (obrázek 4). Kyselina pantothenová je důležitou součástí koenzymu A (Matouš, 2010).

Obrázek 4: Kyselina pantothenová (Kohlmeier, 2015)

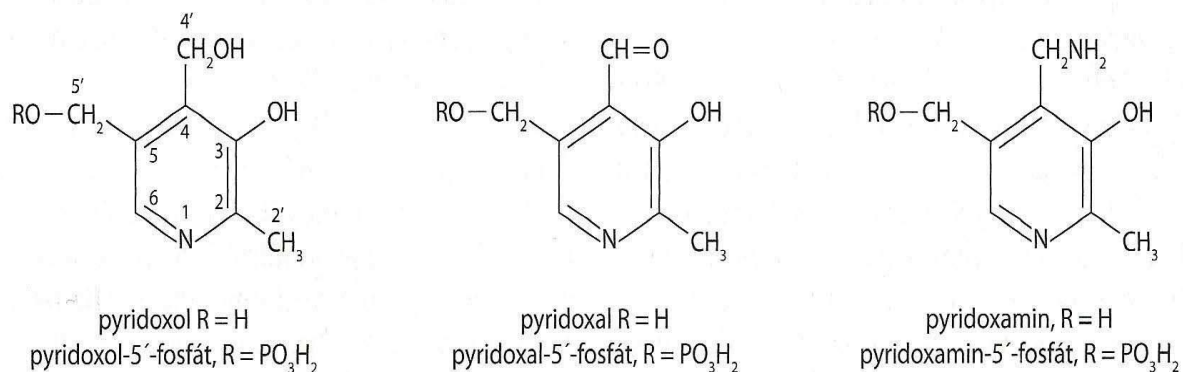


Hlavní funkcí vitamínu B5 v molekule koenzymu A je přenos acylových zbytků (Murray *et al.*, 2002). Obvykle v malém množství se vyskytuje v rostlinných i živočišných potravinách zejména ve vázané formě (Velíšek *et Hajšlová*, 2009). Hypovitaminóza je velmi vzácná (Matouš, 2010). Vydatným zdrojem vitamínu je maso (Velíšek *et Hajšlová*, 2009) a chleba, kdy mléko není příliš dobrým zdrojem tohoto vitamínu (Matouš, 2010).

### 3.3.5 Pyridoxin (B6)

Pyridoxin byl poprvé izolován v krystalické formě v roce 1938 (Hlúbik *et Opltová*, 2004). Vitamin B6 se souhrnným pojmem pro 3 blízce příbuzné deriváty: pyridoxal, pyridoxol a pyridoxamin a jim odpovídající fosfáty (obrázek 5) (Murray *et al.*, 2002).

Obrázek 5: Pyridoxin vyskytující se ve třech podobách (Matouš, 2010)



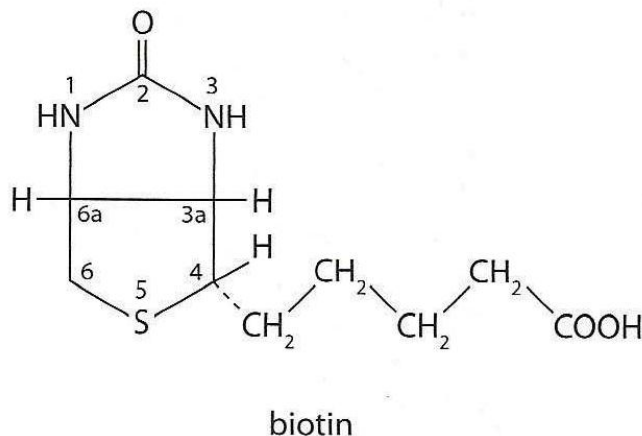
Základní funkcí těchto látek je, že se po esterifikaci kyselinou fosforečnou koenzymy řady aminotransferáz a dekarboxyláz aminokyselin (Matouš, 2010). Nejúčinnější formou vitaminu B6 je pyridoxalfosfát (Murray *et al.*, 2002). Vitamin B6 je nestálý v alkalickém prostředí a zvláště na světle. Nejstálejší ze všech je 3 je pyridoxol. V živočišných produktech se vyskytuje především ve formě fosforečných esterů pyridoxalu a pyridoxaminu, v rostlinných zdrojích jako pyridoxol a pyridoxal (Velíšek *et Hajšlová*, 2009). Významným zdrojem vitaminu jsou játra, ryby, mléko, celozrnná mouka, banány a zelenina (Ledvina *et al.*, 2009).

### 3.3.6 Biotin (B7)

Biotin byl poprvé izolován ve 40. letech 20 století a v přírodě se vyskytuje v 8 stereoizomerech, avšak biologicky aktivní je pouze D-biotin (Hlúbik *et Opltová*, 2004). Z chemického hlediska se jedná o derivát imidazolu (obrázek 6). Ačkoliv je vitamin velmi rozšířený ve všech přírodních potravinách, velkou část lidské potřeby pokrývá syntéza biotinu střevními bakteriemi (Murray *et al.*, 2002). Aktivní formou biotinu je karboxybiotin, který je kofaktorem karboxyláz a tak je zodpovědný za přenos CO<sub>2</sub> a tvorbu C-C vazeb (Matouš, 2010).

Ačkoliv je vitamin citlivý k alkalickému prostředí a oxidaci, tak účinkem světla a zahříváním se jeho obsah nemění (Velišek *et* Hajšlová, 2009).

Obrázek 6: Struktura biotinu ukazuje dva heterocykly se sírou a dusíky (Matouš, 2010)

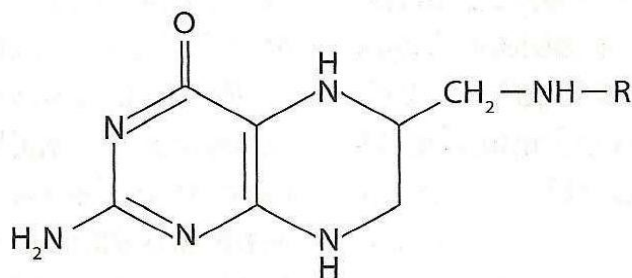


### 3.3.7 Kyselina listová (B9)

Vitamin B9 byl objeven v první polovině 40. let minulého století (Hlúbik *et* Opltová, 2004). Kyselina listová se skládá z pteridinu s připojenou kyselinou p-aminobenzoovou (PABA) a kyselinou glutamovou. Jelikož živočišný organismus nedovede spojovat glutamát s pteridinem nebo syntetizovat PABA, jsme odkázáni na příjem vitaminu stravou (Murray *et al.*, 2002). Kyselina listová se většinou vyskytuje ve formě polyglutamových derivátů obsahující 7 zbytků kyseliny glutamové (Matouš, 2010). Aktivní formou kyseliny listové je tetrahydrofolát (obrázek 7), který přenáší jednouhlíkaté zbytky na různém stupni oxidace (methylová, methylenová atd.) (Ledvina *et al.*, 2009).

Kyselina listová je poměrně nestálá v kyselém, neutrálním i alkalickém prostředí, dále je citlivá na vysoké teploty, světlo a kyslík (Velišek *et* Hajšlová, 2009). Významným zdrojem je zelenina (objeven ve špenátu), kvasnice, játra, maso, vejce a mléko (Ledvina *et al.*, 2009). Nejvýznamnějším metabolickým projevem nedostatku kyseliny listové je inhibice syntézy DNA (Matouš, 2010). Nejznámějším důsledkem nedostatku kyseliny listové je megaloblastická anémie (Murray *et al.*, 2002).

Obrázek 7: Tetrahydrolistová kyselina (Matouš, 2010)



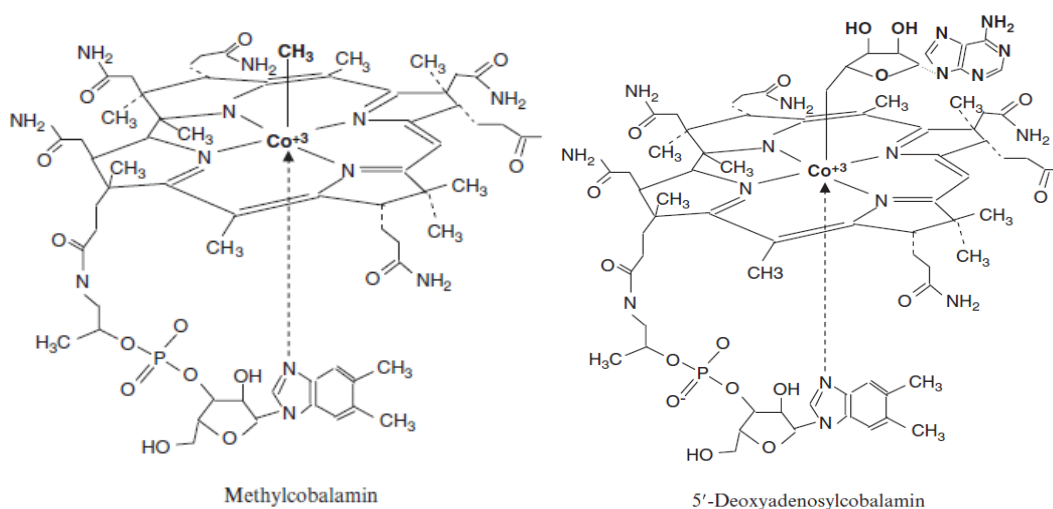
tetrahydrolistová kyselina ( $H_4$ PteGlu, R)

Kyselina listová je poměrně nestálá v kyselém, neutrálním i alkalickém prostředí, dále je citlivá na vysoké teploty, světlo a kyslík (Velíšek *et* Hajšlová, 2009). Významným zdrojem je zelenina (objeven ve špenátu), kvasnice, játra, maso, vejce a mléko (Ledvina *et al.*, 2009). Nejvýznamnějším metabolickým projevem nedostatku kyseliny listové je inhibice syntézy DNA (Matouš, 2010). Nejznámějším důsledkem nedostatku kyseliny listové je megaloblastická anémie (Murray *et al.*, 2002).

### 3.3.8 Kobalamin (B12)

Historie vitamínu B12 je úzce spojena s perniciózní anémií, která byla až do roku 1926 pokládána za neléčitelnou nemoc. Poprvé byl Kobalamin izolován v roce 1948 (Velíšek *et* Hajšlová, 2009). Z pohledu chemické struktury patří mezi korinoidy, jejichž strukturním základem je korinové jádro, které tvořené třemi pyrrolinovými a jedním pyrolidinovým kruhem spojené vzájemně methinovými můstky (Matouš, 2010). Mezi vitamíny tak disponuje nejsložitější strukturou (Velíšek *et* Hajšlová, 2009). Kobalamin mezi biologickými látkami zaujímá velmi zvláštní postavení. Je to jediná biogenní sloučenina obsahující vzácný kobalt. Vitamin B12 je esenciální látkou pro všechny živočichy a velké množství mikroorganismů. Zdrojem kobalaminu jsou výhradně živočišné potraviny, zejména pak játra, vnitřnosti, mléko a ryby (Ledvina *et al.*, 2009). Aktivními formami B12 jsou methylkobalamin a deoxyadenosylkobalamin (obrázek 8). Methylkobalamin je koenzymem klíčové reakce v glukoneogenezi a deoxyadenosylkobalamin má své významné postavení v metabolismu purinů, pyrimidinu a nukleových kyselin (Murray *et al.*, 2002)

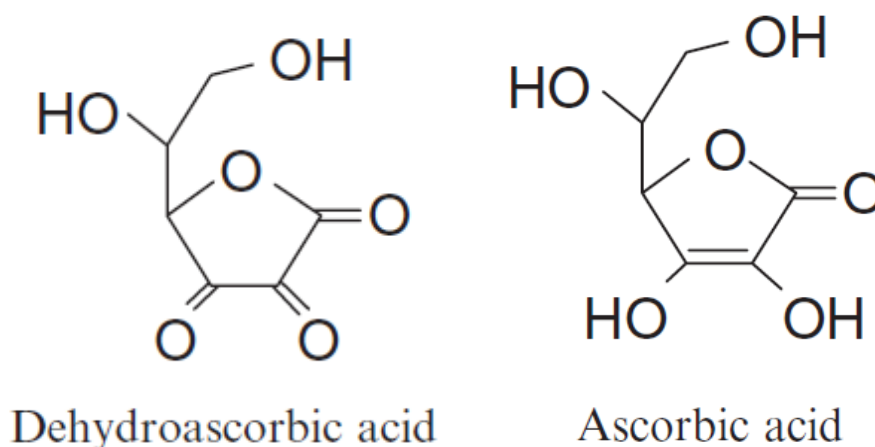
Obrázek 8: Vlevo methylkobalamin a vpravo deoxyadenosylkobalamin (Combs, 2008)



### 3.3.9 Vitamin C

Pravděpodobně nejznámější vitamin s triviálním názvem kyselina L-askorbová. Oxidací kyseliny L-askorbové vzniká kyselina L-dehydroaskorbová, kdy obě formy (obrázek 9) jsou významným redoxním systémem organismu a rovněž působí jako antioxidant proti některým reaktivním formám kyslíku. Svými schopnostmi chrání i jiné antioxidanty (tokoferol a retinol) (Matouš, 2010).

Obrázek 9: Dehydroaskorbová kyselina (vlevo) a askorbová kyselina (vpravo) (Combs, 2008)



Struktura vitaminu C nápadně připomíná glukózu, ze které se u většiny savců tvoří. U primátů, člověka, ryb ptáků a dalších syntéza probíhat pro nepřítomnost L-gulanolaktonoxidázy nemůže. Kyselina askorbová nemá jinou aktivní formu, je účinná již ve své základní struktuře. Spektrum účinku v organismu je velmi široké, někde působí přímo,



jinde nepřímo. Příkladem jejího uplatnění je syntéza kolagenu, kdy při nedostatku vitamínu C je porušena syntéza kolagenu a vlivem poruch v pojivové tkáni vzniká onemocnění zvané kurděje. Mimo to je vitamin C významný pro odbourávání tyrosinu, syntéze adrenalinu, tvorbě žlučových kyselin, vstřebávání železa a mnohé další (Murray *et al.*, 2002).

Vitamin C je kyselé chuti, málo odolný působením tepla a citlivý je k oxidačním změnám. V kyseljším vodném roztoku bez převaření díky vysokému obsahu CO<sub>2</sub> oxiduje podstatně rychleji (Ledvina *et al.*, 2009). Nejbohatším zdrojem kyseliny askorbové jsou šípky, černý rybíz, citrusové ovoce a kysané zelí (Matouš, 2010). Pro představu 1 kg šípků obsahuje až 10 000 mg vitamínu C oproti mléku, u kterého se udává v 1 kg do 20 mg (Velíšek *et Hajšlová*, 2009).

### **3.4 Vitaminy v kravském, ovčím a kozím mléce**

V mléce jsou přítomny všechny známé vitaminy (Walstra *et al.*, 2006). Jejich zdrojem je především krmivo a činnost bachorových mikroorganismů, kdy sekreční buňky mléčné žlázy pouze umožňují jejich transport z krve do mléka (Strapák, 2013). Bachorové mikroorganismy se podílejí především na tvorbě vitaminů skupiny B, tím není obsah této skupiny vitaminů výrazně ovlivněn kvalitou krmiva. Mléko je pak bohaté zejména na riboflavin, biotin, cholin, ale i další vitaminy skupiny B (Jelínek *et Koudela*, 2003). Čerstvě nadojené mléko obsahuje i vitamin C, jeho množství také není možné regulovat příjmem v potravě, neboť se tvoří v organismu přežvýkavců (Strapák, 2013). Obsah vitaminů rozpustných v tuku se odvíjí od obsahu tokoferolu, karotenu a ergosterolu v krmivu a koreluje s obsahem mléčného tuku. Mléko je dobrým zdrojem řady obsažených vitaminů, kdy 1 litr kravského mléka pokryje u člověka denní potřebu vitamínu A, C a D z více než jedné třetiny (Jelínek *et Koudela*, 2003).

Některé vitaminy ovlivňují v mléce a mléčných výrobcích řadu vlastností. Karoteny způsobují žlutou barvu mléčného tuku, kterou lehce vnímáme u nativního mléka. Nažloutlé zbarvení syrovátky naopak způsobuje fluorescenčními vlastnostmi riboflavin. Tokoferoly fungují jako významné antioxidanty a redukuje ztráty typické mléčné příchuti dané mléčným tukem (Walstra *et al.*, 2006).

Mezi jednotlivými mléky různých přežvýkavců existují rozdíly v obsahovém spektru vitaminů (tabulka 4). Kozí a ovčí mléko má ve srovnání s mlékem kravským obecně více vitaminů. Kozí mléko má však ve srovnání s mlékem kravským nízký obsah kyseliny listové

a vitamínu B<sub>12</sub>, kdy v mléce kravském dosahuje obsah 5 x vyšších hodnot. Nejlepší metodou tepelného ošetření pro zachování vitaminů v kozím mléce a prodloužení trvanlivosti je krátkodobá vysokoteplotní pasterizace (HTST - High Temperature Short Time), i když dochází k určitým ztrátám thiaminu, riboflavinu a vitamínu C. Obsah vitaminů v mléce ovčím je převážně vyšší oproti kravskému a kozímu, s výjimkou vitamínu A. Výzkumné údaje o vitaminech u ovčího mléka jsou obecně chudé (Park *et al.*, 2007).

Mlezivo oproti zralému mléku disponuje vyšším obsahem vitamínu A, E, riboflavinu a niacinu (Jelínek *et Koudela*, 2003). Rozdíl obsahu některých vitaminů oproti tržnímu mléku je poměrně značný. Např. u vitamínu B<sub>9</sub> hodnota 4,9 µg.ml<sup>-1</sup> v mlezivu oproti 0,6 µg.ml<sup>-1</sup> v tržním mléce. U telat se potřeba vitaminů s věkem mění, a to zejména v důsledku rozvoje bachoru a jeho mikroflóry (Strapák, 2013). Již obecnou znalostí je, že mláďata přežvýkavců jsou závislá na příjmu kolostra zejména kvůli protilátkám, tak jsou chráněna v prvních dnech života proti sepsi a systémovým infekcím (Toman, 2000). Vyšší obsah vitaminů v mlezivu má také svůj podstatný vliv na podpoře imunitních pochodů. Obecně tak platí zásada obohacovat krmení telatům o všechny vitaminy až do doby, než se plnohodnotně rozvine bachor (Strapák, 2013). Jak ukazují ve své práci Zmiya *et Golovach* (2016), není potřeba se u výživy telat a jiných věkových kategorií v rámci vitaminů skupiny B spoléhat jen na bachorovou mikroflóru a soustředit se jen na karoten, vitamin D a E. Podle studií byl prokázán velký význam přidávání komplexu vitaminů B do krmiva zejména pro podporu složek humorální imunity.

**Tabulka 4: Přehled vybraných vitaminů a jejich hodnot ve 100 g různých druhů mléka (upraveno dle Parka *et al.*, 2007).**

<b>Vitaminy a jednotky</b>	<b>Kráva</b>	<b>Koza</b>	<b>Ovce</b>	<b>Člověk</b>
Vitamin A (IU)	126	185	146	190
Vitamin D (IU)	2	2,3	0,18 (µg)	1,4
Vitamin C (mg)	0,94	1,29	4,16	5
Thiamin (mg)	0,045	0,068	0,08	0,017
Riboflavin (mg)	0,16	0,21	0,376	0,02
Niacin (mg)	0,08	0,27	0,416	0,17
Pantothenová kyselina (mg)	0,32	0,31	0,408	0,2
Pyridoxin (mg)	0,042	0,046	0,08	0,011
Listová kyselina (µg)	5	1	5	5,5
Biotin (µg)	2	1,5	0,93	0,4
Kobalamin (µg)	0,357	0,065	0,712	0,03

Mlezivo oproti zralému mléku disponuje vyšším obsahem vitamínu A, E, riboflavínu a niacinu (Jelínek *et* Koudela, 2003). Rozdíl obsahu některých vitaminů oproti tržnímu mléku je poměrně značný. Např. u vitamínu B9 hodnota  $4,9 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  v mlezivu oproti  $0,6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  v tržním mléce. U telat se potřeba vitaminů s věkem mění, a to zejména v důsledku rozvoje bachoru a jeho mikroflóry (Strapák, 2013). Již obecnou znalostí je, že mláďata přežvýkavců jsou závislá na příjmu kolostra zejména kvůli protilátkám, tak jsou chráněna v prvních dnech života proti sepsi a systémovým infekcím (Toman, 2000). Vyšší obsah vitaminů v mlezivu má také svůj podstatný vliv na podpoře imunitních pochodů. Obecně tak platí zásada obohacovat krmení telatům o všechny vitaminy až do doby, než se plnohodnotně rozvine bachor (Strapák, 2013). Jak ukazují ve své práci Zmiya *et* Golovach (2016), není potřeba se u výživy telat a jiných věkových kategorií v rámci vitaminů skupiny B spoléhat jen na bachorovou mikroflóru a soustředit se jen na karoten, vitamin D a E. Podle studií byl prokázán velký význam přidávání komplexu vitaminů B do krmiva zejména pro podporu složek humorální imunity.

### 3.4.1 Vitaminy skupiny B v mléce

Obsah jednotlivých vitaminů a jejich ztráty se různí od čerstvě nadojeného mléka až po veškeré metody ošetření, zpracování, použití obalové techniky a délku skladování. Různé hodnoty obsahů a ztrát jednotlivých vitaminů odráží skutečnost, že je poměrně významné, kdy jsou vzorky analyzovány. Tyto rozdíly pak můžeme vnímat v literárních zdrojích jako odlišné hodnoty, kterými se autoři prezentují ve svých pracích. Vlastnosti složek mléka podstatně mění metody sterilace mléka a také délka skladování i při použití šetrnějších metod ošetření mléka. Z hlediska ztrát vitaminů skupiny B v mléce pro nás má nejvyšší význam obsah vitaminů B1, B2 a B6. Naopak z nutričního hlediska pro nás nemá význam ztráta vitamínu C (Sluková *et al.*, 2016).

Thiamin (B1) se v mléce vyskytuje volný a ve fosforylované formě (labilnější než volný), zčásti vázaný na proteiny. V kravském mléce je volná forma zastoupena až v 75 %, fosforylovaná v 18 - 45 % a vázaná až v 17 % (Velíšek *et* Hajšlová, 2009). Combs (2008) uvádí koncentraci thiaminu v mléce kolem  $0,04 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ , kdežto Velíšek *et* Hajšlová (2009) pracují s širším rozmezím mezi  $0,3 - 0,7 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  mléka. Park *et al.* (2007) specifikují koncentrace thiaminu pro jednotlivé druhy mlék. Pro mléko kravské  $0,045 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ , kozí  $0,068 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ , ovčí  $0,08 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$  a pro lidské  $0,017 \text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ . Mléčné výrobky zajišťují

příjem vitaminů asi z 8 - 14 % (Velíšek *et* Hajšlová, 2009). Zpracování mléka má vliv na koncentraci vitamínu. Pasterace způsobuje ztrátu asi 5 - 10 % (Sluková *et al.*, 2016), 9 - 20 % (Combs, 2008). Velíšek *et* Hajšlová (2009) potvrzují ztrátu pasterací, sterilací (včetně UHT) a sušením do 20 %. Sluková *et al.* (2016) rozvádí ztrátu UHT na 5 -15 % po přímém záhřevu a ztrátu u UHT mléka po 3 měsících skladování 10 - 20 %. Nejvyšší ztráty, až 40 %, má za následek konzervace mléka (Combs, 2008) a sterilace v obalu (Sluková *et al.*, 2016).

Riboflavin (B2) je v mléce zčásti vázán na  $\alpha$ - a  $\beta$ - kasein, významných je však 14 % riboflavinu ve formě FAD a 4 % jako FMN (Velíšek *et* Hajšlová, 2009). Combs (2008) uvádí, že až 50 % příjmu riboflavinu potravou zajišťují mléko a mléčné výrobky. Obsah vitamínu v kravském mléce je 0,16 mg.100g<sup>-1</sup>, kozím 0,21 mg.100g<sup>-1</sup>, ovčím 0,376 mg.100g<sup>-1</sup> a 0,02 mg.100g<sup>-1</sup> v lidském (Park *et al.*, 2007). U riboflavinu obecně platí vysoká citlivost vůči ozáření (zejm. fotochemická degradace). Skladování mléka na slunci může vést až ke 40 % ztrátě během 1 hodiny. Klasické tepelné technologické postupy jeho hladinu v mléce významně neovlivní. Jeho ztráty během pasterace a sterilace se odhadují do 5 %. V UHT mléku je retence až 98 %. Při sušení mléka se odhadují ztráty až 2 %. Fermentované mléčné výrobky obsahují vyšší obsah, neboť produkci vitamínu zajišťují použité mikroorganismy (Velíšek *et* Hajšlová, 2009).

Niacin (B3) se v živočišných produktech vyskytuje zejména jako nikotinamid (zejm. NAD a NADP), mléko však nepatří mezi významné zdroje tohoto vitamínu, jako tomu bylo např. u riboflavinu. S vyšším obsahem se setkáme u sýrů (Velíšek *et* Hajšlová, 2009). V mléce se pohybují hodnoty kolem 0,2 mg.100g<sup>-1</sup> a v sýrech kolem 1,2 mg.100g<sup>-1</sup> (Combs, 2008). Potřebu vitamínu uspokojuje především maso, mléko a mléčné výrobky se podílí asi jen z 10 % (Velíšek *et* Hajšlová, 2009). Detailněji rozvádí hodnoty obsahu niacinu Park *et al.* (2007), kdy v kravském mléce nacházíme kolem 0,08 mg.100g<sup>-1</sup>, kozím 0,27 mg.100g<sup>-1</sup>, ovčím 0,416 mg.100g<sup>-1</sup> a v lidském 0,17 mg.100g<sup>-1</sup>. Niacin je jeden z odolnějších vitaminů, ztráty při zpracování jsou do 5 %, kdy při výrobě sýrů jde značná část niacinu do syrovátky, ovšem ztráty v hotových sýrech jsou již minimální. V jogurtech díky přítomnosti mikroorganismů se můžeme setkat s vyšším obsahem niacinu (Velíšek *et* Hajšlová, 2009).

Kyselina pantothenová (B5) je v relativně nízkém množství obsažena téměř ve všech potravinách (Velíšek *et* Hajšlová, 2009), zejména však ve vázané formě v podobě koenzymu A (Combs, 2008). V živočišných produktech je významně obsažena v mase, vnitřnostech a vejcích, její obsah v mléce je nízký (Velíšek *et* Hajšlová, 2009). Obsah B5 v kravském mléce je 0,32 mg.100g<sup>-1</sup>, kozím 0,31 mg.100g<sup>-1</sup>, ovčím 0,408 mg.100g<sup>-1</sup> a mateřském mléce 0,20 mg.100g<sup>-1</sup> (Park *et al.*, 2007). Změny obsahu tohoto vitamínu při různém ošetření a

skladování mléka nejsou nijak velké. Fermentace, pasterace, sušení ani skladování se na změně obsahu zásadně nepromítá. Po UHT záhřevu jsou ztráty jen kolem 5 % (Velíšek *et* Hajšlová, 2009).

Pyridoxin (B6) se v živočišných produktech vyskytuje jako pyridoxal a pyridoxamin, kdy v mléce oproti masu z 90 % převažuje volná forma. Obsah vitamínu v mléce a mléčných výrobcích je obecně poměrně nízký. Odhaduje se, že pokrytí příjmu pyridoxinu mléko s mléčnými výrobky dosahuje jen asi 12 % (Velíšek *et* Hajšlová, 2009). Combs (2008) uvádí hodnoty pyridoxinu 0,04 mg.100g<sup>-1</sup> v mléce, 0,05 mg.100g<sup>-1</sup> v jogurtech a 0,04 - 0,08 mg.100g<sup>-1</sup> v sýrech. Jednotlivé druhy mlék pak disponují hodnotami pro mléko kravské 0,042 mg.100g<sup>-1</sup>, kozí 0,046 mg.100g<sup>-1</sup>, ovčí 0,08 mg.100g<sup>-1</sup> a lidské 0,011 mg.100g<sup>-1</sup> (Park *et al.*, 2007). Konvenční zpracování mléka nevede k velkým ztrátám, pasterizace do 5 % (Velíšek *et* Hajšlová, 2009, Sluková *et al.*, 2016), UHT do 10 % (Velíšek *et* Hajšlová, 2009, Sluková *et al.*, 2016), sterilace v obalu 10 - 20 %, ovšem velmi významné jsou ztráty při následném skladování, kdy například u UHT mléka po 3 měsících jsou až 50 % (Sluková *et al.*, 2016). Nejvyšší ztráty původního množství pyridoxinu zapříčiňuje sušení mléka (až 70 %), nezanedbatelné jsou i ztráty vlivem slunečního světla jako u riboflavinu. Tepelné ošetření mléka mění i spektrum jednotlivých forem vitamínu. Čerstvé mléko z 38 % obsahuje kyselinu pyridoxovou a z 32 % pyridoxalfosfát, kdežto v pasterizovaném mléku dominuje s 41 % pyridoxal (Velíšek *et* Hajšlová, 2009).

Biotin (B7) je vitamínem zastoupeným v celé řadě potravin ovšem s hodnotami obsahu poměrně nízkými. V mléce se objevuje ve volné formě a jeho koncentrace je malá (Velíšek *et* Hajšlová, 2009). V kravském mléce se nachází 2,0 µg.100g<sup>-1</sup>, v kozím 1,5 µg.100g<sup>-1</sup>, v ovčím 0,93 µg.100g<sup>-1</sup> a v mateřském mléce 0,4 µg.100g<sup>-1</sup> (Park *et al.*, 2007). Pokud bychom porovnali obsah B7 v mléčných výrobcích, je jeho zastoupení v mléce oproti sýrům a jogurtů vyšší. Nejvyšších ztrát dosáhneme sušením, pasterací však jen do 15 %. Skladování se významně na ztrátách nepodílí (Velíšek *et* Hajšlová, 2009).

Kyselina listová (B9) je přirozeně v živočišných produktech představována z 50 % zejména polyglutamylpeptidy 5-methyltetrahydrofolové kyseliny. V mléce však převažuje asi z 60 % 10-formyltetrahydrofolová kyselina (Velíšek *et* Hajšlová, 2009). Mléko a mléčné výrobky nejsou významným zdrojem tohoto vitamínu. Větší množství se dá nalézt v sýrech, kdy při výrobě se zachová až 90 % původního množství. V kravském mléce se setkáme s hodnotou kolem 5 µg.100g<sup>-1</sup>, kozím 1 µg.100g<sup>-1</sup>, ovčím 5 µg.100g<sup>-1</sup> a lidském 5,5 µg.100g<sup>-1</sup> (Park *et al.*, 2007). Stabilita kyseliny listové v mléce se odvíjí od přítomnosti kyslíku. Pasterace způsobí ztrátu do 5 %, UHT mléko do 20 % (Velíšek *et* Hajšlová, 2009, Sluková *et*

*al.*, 2016). Sterilizace v obalu způsobuje až 50 % ztráty (Sluková *et al.*, 2016). Výroba kondenzovaného mléka sebou nese však ztráty dosahující až 75 % (Velíšek *et Hajšlová*, 2009). UHT mléko skladované 3 měsíce může znamenat ztrátu až 100 %.

Kobalamin (B12) je přítomen výhradně v potravinách živočišného původu, kdy v mléce ho nalezneme v podobě adenosylkobalaminu a methylkobalaminu. V mléce se jeho hodnoty pohybují v jedlém podílu kolem 0,3 - 3,8  $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  (Velíšek *et Hajšlová*, 2009). Park *et al.* (2007) pak uvádí hodnoty u kravského mléka 0,357  $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ , koziho 0,065  $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ , ovčího 0,712  $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  a mateřského 0,03  $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ . Hodnoty obsahu u mléčných produktů ještě rozšiřuje Combs (2008), kdy u mléka obecně uvádí hodnotu 0,36  $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ , u sýru 0,36 - 1,71  $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  a jogurtu 0,06 - 0,62  $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ . Běžné postupy při zpracování mléka na jeho obsah vliv nemají. Pasterizace vede ke ztrátám do 10 % a UHT do 20 % (Velíšek *et Hajšlová*, 2009).

### 3.4.2 Vitamin C v mléce

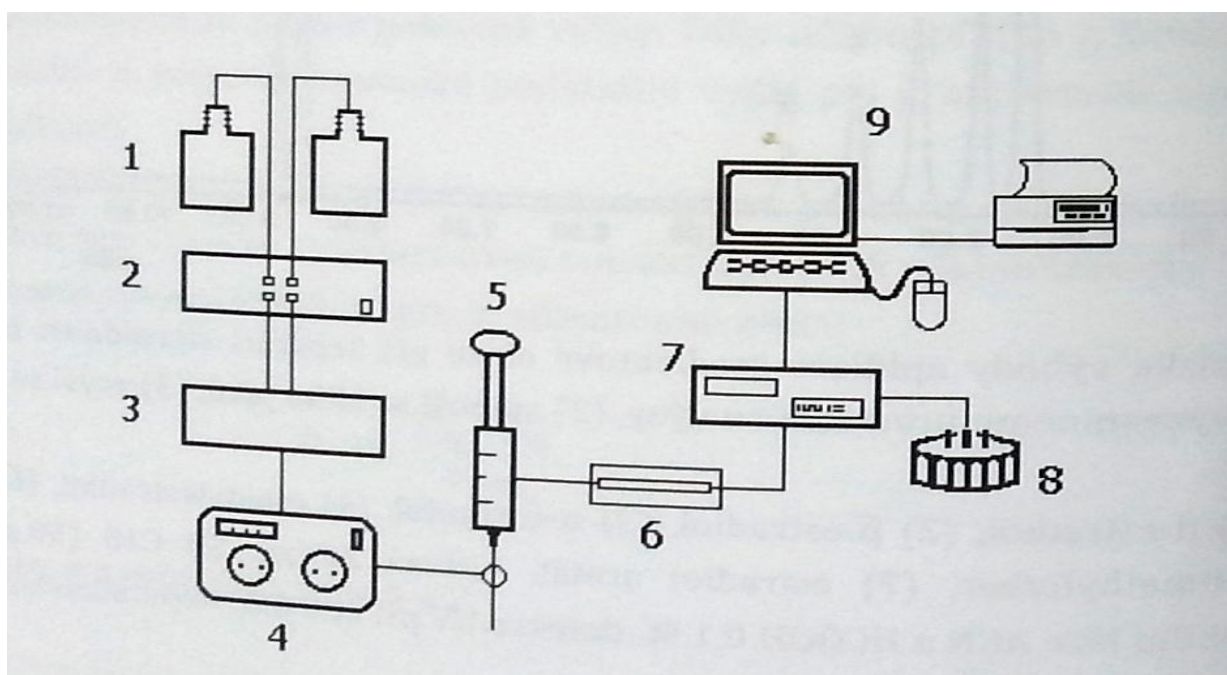
Vitamin C je obsažen dle různých autorů ve 100 mg čerstvého mléka v hodnotách od 0,5 do 2 mg (Velíšek *et Hajšlová*, 2009, Combs, 2008, Park *et al.*, 2007). U koziho mléka jsou hodnoty někde kolem 1,29 mg/100g, u ovčího 4,16 mg/100g a v lidském mléce 5 mg/100g (Park *et al.*, 2007). Mléko tedy nepatří mezi významné zdroje tohoto vitamínu. V podstatě až na játra mají obecně živočišné produkty jako zdroj vitamínu C zanedbatelný význam. Nehledě na tuto skutečnost jsou poměrně značné ztráty při chladírenském skladování syrového mléka (až 50 %) a různá tepelná ošetření jeho hodnoty dále snižují (Velíšek *et Hajšlová*, 2009). Sluková *et al.* (2016) popisují ztráty pasterizací do 25 %, u UHT přímého záhřevu 10 - 20 %, u 3 měsíce skladovaného mléka až 100 % a sterilací v obalu do 60 %.

### 3.5 HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Základním principem chromatografických metod je dělení analytu mezi fázi mobilní a stacionární. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, *high performance liquid chromatography*) se řadí mezi nejrozšířenější techniky, přičemž principem metody je analýza složek vzorku unášených chromatografickou kolonou kapalnou mobilní fází (Nováková et Douša, 2013a).

Pro stanovení vitaminů se využívá gradientová eluce, kdy se mobilní fáze přivádí z více zásobníků a dle programu ve směšovači se mísí. Důležitým pohonem pro mobilní fázi je vysokotlaké čerpadlo. Po odplynění je mobilní fáze dávkována do chromatografické kolony, která nese specifickou stacionární fázi. Kolona je spojena s detektorem. Detekční zařízení je pak spojeno s se softwarem datové stanice. HPLC může mít velké množství obměň. Základní schéma HPLC aparatury zobrazuje obrázek 10.

Obrázek 10: Blokové schéma HPLC (Nováková et Douša, 2013a)



- |                             |                            |                   |
|-----------------------------|----------------------------|-------------------|
| 1) Zásobníky mobilních fází | 4) Vysokotlaké čerpadlo    | 7) Detektor       |
| 2) Odplyňovač               | 5) Dávkovač vzorku         | 8) Sběrač frakcí  |
| 3) Směšovač                 | 6) Chromatografická kolona | 9) Datová stanice |

### 3.5.1 Stanovení vitaminů rozpustných ve vodě pomocí HPLC podle různých autorů

Jak již bylo v předešlých kapitolách uvedeno, vitaminy rozpustné ve vodě tvoří velké spektrum rozličných látek různé chemické povahy a chování. Některé z vitaminů jsou nestabilními, např. vitamin B2 velmi fotosenzitivní, vitamin C termolabilní, řada z vitaminů podléhá oxidaci. Vzhledem k těmto skutečnostem a ve vztahu k často poměrně nízkým a variabilním koncentracím v uvažovaných matricích, je pro jejich stanovení nutná citlivá a spolehlivá analytická metoda. Z možných metod, které se dají pro analýzu vitaminů použít lze uvést kolorimetrii, fluorometrii, spektrofotometrii, titrační i řadu mikrobiologických metod, většinou však umožňují individuální stanovení (Engel *et al.*, 2010).

Chromatografické techniky jsou nejvhodnější z hlediska vícekomponentního stanovování a možnosti separace analytu do matrice (Zafra-Gomez *et al.*, 2006). V dnešní době se vyvinuly metody HPLC, které umožňují simultánní stanovení (Moreno *et al.*, 2000). Po simultánní stanovení ve vodě rozpustných vitaminů se jako nejslibnější metoda jeví kapalinová chromatografie s reverzními fázemi (RP-HPLC). RP-HPLC je v praxi nejběžněji používaná metoda HPLC zaměřená na stanovování polárních látek. Principem je využití nepolární stacionární fáze, která se skládá ze vhodného nosiče (nejčastěji silikagel) k němuž je vhodně navázaný velmi často oktadecylový uhlíkový řetězec (-C18) nebo oktylový uhlíkový řetězec (-C8). Typické je pak následně i složení mobilní fáze, která většinou sestává ze směsi pufrů nebo vody s polárními rozpouštědly. Velmi často se používá acetonitril a methanol. Systém pak pracuje v režimu gradientové eluce, která umožňuje měnit polaritu mobilní fáze během analýzy a usnadní tak eluci nepolárních látek směrem ven z kolony (Nováková *et al.*, 2013a, Nováková *et al.*, 2013b, Engel *et al.*, 2010, Zafra-Gomez *et al.*, 2006). Izokratická metoda, jejíž podstatou je konstantnost složení mobilní fáze, je vhodná pro stanovení 2 až 3 vitaminů současně, ale pro složitější vzorky v rámci simultánního stanovování je vyžadovaná gradientová eluce (Engel *et al.*, 2010). Hampel *et al.* (2015) uvádí, že chromatografické metody jsou v rámci simultánní analýzy vhodné pro analýzu vitaminů, jejichž vázaný podíl v matrici není vysoký, jedná se především o vitamin B1, B2, B3 a B6. Nejčastěji používané metody pro stanovení vitaminů skupiny B jsou HPLC separace na reverzní fázi za použití kolony C18 pro polární látky (Abano *et al.*, 2014). V přípravě vzorku je zapojena kyselá extrakce pomocí HCl a enzymová extrakce působením takadiastázy (Khair-un-Nisa *et al.*, 2010, Van Wyk *et al.*, 2010).



## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Laboratoř

Veškeré činnosti související s analýzou vzorků probíhaly v prostorách laboratorních místností a zázemí katedry chemie ve 4. patře hlavní budovy FAPPZ ČZU v Praze.

### 4.2 Přístroje

- Kapalinový chromatograf Waters Alliance e2695 (USA)
- Detektor diodového pole Waters 996 PDA (USA)
- Centrifuga Eppendorf 5810R (Německo)
- Vodní lázeň Julabo 19 (Německo)
- Laboratorní váha Kern 770 (Německo)
- Laboratorní třepačka GFL 3006 (Německo)
- Přístroj pro přípravu destilované vody (vodivost cca  $1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) Goldman Water, (Česká republika)
- Přístroj na přípravu deionizované vody (odpor  $18 \text{ M}\Omega$ ) Millipore (Francie)
- Lednice Candy (Itálie)
- pH - meter Schott (Německo)

### 4.3 Pomůcky

- Chladicí box EDA 25 l (Francie)
- Chladicí vložky a teploměr
- Jednokanálové pipety s nastavitelným objemem ( $\mu\text{l}$ , ml)
- Špičky k pipetám ( $\mu\text{l}$ , ml)
- Laboratorní sklo (baňky, kádinky)
- Injekční stříkačky (3 ml)
- Stříkačkové filtry PVDF LUT Syringe 25 mm  $0,45 \mu\text{m}$ , Labicom, s.r.o. (ČR)
- Centrifugační zkumavky s víčky, plastové (45 ml, 50 ml)
- Alobal na odstínění vzorkovnic a centrifugačních zkumavek

- Plastové vzorkovnice se šroubovacím víčkem (100 ml, 250 ml)
- Vialka 2 ml se šroubovacím závitem 9 mm, Chromservis, s.r.o. (ČR)
- Modrá plastová víčka pro vialky Red PTFE, White Silicone, 9 mm, Chromservis, s.r.o. (ČR)
- Plastový stojan na zkumavky
- Laboratorní lžičky

#### 4.4 Chemikálie

- různě upravené druhy vody (destilovaná, demineralizovaná)
- 1M HCl (připraveno z 36% HCl p.a., Lachner, ČR)
- 2,5M acetátový pufr pH = 4,6 (připraveno smícháním 102 ml 2,5M octové kyseliny a 98 ml 2,5M octanu sodného)
- roztoky pro kalibraci pH - metru, pro pH 2,0 a pH 7,0 Fisher Scientifics (Německo)
- sodná sůl kyseliny hexan-1-sulfonové pro HPLC, Fisher Scientifics (Německo)
- triethylamin pro HPLC, Acros Organics (Lachner, ČR)
- kyselina octová ACS reagent  $\geq 99.7\%$ , Sigma - Aldrich (ČR)
- octan sodný p.a. (Lachner, ČR)
- taka - Diastáza z *Aspergillus oryzae*, Sigma – Aldrich (ČR)
- methanol gradient grade pro HPLC (Lachner, ČR)

#### 4.5 Příprava roztoků mobilní fáze

V průběhu přípravy vzorků pro HPLC a pro přípravu mobilní fáze byla využita demineralizovaná (DEMI) voda.

- **Mobilní fáze A:**  
992,5 ml DEMI voda + 7,5 ml kyselina octová + 0,2 ml + triethylamin + 1,5 g sodné soli kyseliny hexan-1-sulfonové
- **Mobilní fáze B:**  
100% methanol

## 4.6 Příprava vzorků mléka

Záměrem této práce byla simultánní analýza více druhů vitaminů rozpustných ve vodě. Pro analýzu byly zvoleny vitaminy C, B1, B2, B3, B6 a B9. Postup přípravy vzorků byl vypracován na základě práce autorů Khair-un-Nisa *et al.* (2010).

Čerstvé vzorky mléka byly odebrány do vzorkovnic a uchovány během transportu a při uskladnění při teplotě 4 – 8 °C. S ohledem na skutečnost vysoké citlivosti flavinů vůči UV záření a fotochemické degradaci (Combs, 2008, Guneser *et Yuceer*, 2012), byly čerstvé vzorky ochráněny proti světlu. Vzorky komerčního mléka byly ponechány v původním obalu. Během přípravy vzorků v laboratoři byly všechny vzorky odstíněné alobalem (příloha 1).

Běžnou součástí extrakce vitaminů rozpustných ve vodě je kyselá a enzymatická hydrolýza (Engel *et al.*, 2010). Pro extrakci vitaminů kyselou hydrolýzou byl vzorek smíchán s 1 ml 1M HCl (Khair-un-Nisa *et al.*, 2010). K enzymové extrakci se využívá takadiastáza (Van Wyk *et al.*, 2010), která má vliv na uvolnění thiaminu a riboflavinu (Hampel *et Allen*, 2015). Dle autorů Khair-un-Nisa *et al.* (2010), byl ke vzorkům po úpravě pH přidán 10% roztok takadiastázy a vzorky byly inkubovány ve vodní lázni.

Před chromatografickou analýzou byly vzorky připraveny odstředěním při vysokých otáčkách, vymražením a filtrací (příloha 2).

Jako optimální byl zvolený následující postup:

- každý konkrétní vzorek mléka byl rozdělen do 4 alobalem odstíněných zkumavek po 15 ml (2 zkumavky pro analýzu bez enzymu, 2 zkumavky pro analýzu s enzymem)
- ke vzorku byl přidán 1 ml 1M HCl
- vzorky byly třepány 15 minut na třepačce s nejvyšším výkonem
- u protřepaných vzorků bylo upraveno pH na 4,0 - 4,5 použitím 2,5M acetátového pufru
- k polovině vzorkům bylo přidáno 5 ml 10% roztoku takadiastázy
- vzorky byly opět umístěny na třepačku po dobu 15 minut
- vzorky s přídavkem takadiastázy byly umístěny do vodní lázně o teplotě 50 °C na dobu 2 hodin, zkumavky byly každých 30 minut promíchány a protřepány

- po vyjmutí zkumavek z vodní lázně byly ponechány cca 30 minut při pokojové teplotě
- vzorky po úpravě pH, ke kterým nebyl přidán enzym a zároveň i vzorky s enzymem po zchlazení na pokojovou teplotu byly doplněny DEMI vodou na objem 25 ml
- 10 ml zředěného vzorku mléka bylo pipetováno do alobalem odstíněných centrifugačních zkumavek
- vzorky byly centrifugovány v centrifuze při 10 000 otáčkách po dobu 5 minut
- zcentrifugované zkumavky byly zchlazeny v mrazáku po dobu 5 minut (byl vymražen tuk)
- supernatant byl pomocí 3 ml injekční stříkačky filtrován přes PVDF filtr s průměrem 0,45  $\mu\text{m}$  do vialek s objemem 2 ml
- obsah vialky byl analyzován metodou HPLC

#### 4.7 Podmínky chromatografie

Chromatografická analýza byla provedena podle podmínek, které byly navrženy firmou Phenomenex pro použitou chromatografickou kolonu. Podmínky analýzy jsou následující:

- Analytická kolona: Kinetex 2,6  $\mu\text{m}$  Polar C18 100 Å LC Column 100 x 4,6 mm (Phenomenex, Inc., USA)
- Teplota chromatografické klony: 26 °C
- Typ eluce: gradientová (schéma uvedeno v tabulce 5)
- Mobilní fáze A: H<sub>2</sub>O (992,5 ml), kyselina octová (7,5 ml), triethylamin (0,2 ml), sodná sůl kyseliny hexan-1-sulfonové (1,5 g)
- Mobilní fáze B: methanol 100%
- Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min
- Objem analyzovaného vzorku: 5  $\mu\text{l}$
- Délka trvání analýzy: 20 min.
- Podmínky detekce: PDA detektor, vlnová délka  $\lambda = 270 \text{ nm}$

Tabulka 5: Podmínky HPLC gradientové eluce (20 minut)

Čas (min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)	Průtok (ml/min)
0.00	95.0	5.0	0.5
12.00	53.0	47.0	0.5
12.10	2.0	98.0	0.5
15.00	2.0	98.0	0.5
15.10	95.0	5.0	0.5
20.00	95.0	5.0	0.5

#### 4.8 Přehled vzorků mléka

Byly provedeny analýzy vzorků kravského, ovčího a kozího mléka. Jednotlivá mléka pocházela z různých zdrojů. Spektrum vzorků bylo od mléka čerstvého přes různé varianty tepelného ošetření až po komerční pultová mléka. Pro porovnání byly poskytnuty vzorky mléka 3 plemen dojeného skotu (český strakatý skot - ČESTR, holštýnský skot, jersey), dále vzorky mléka plemene ČESTR lišící se fází laktace a stářím dojnic. Vzorky mléka pultové (komerční) byly zakoupeny v obchodních řetězcích, ostatní vzorky mléka byly získány přímo od farmářů na farmě. Cílem analýzy bylo opakování měření každého typu vzorku s odstupem času alespoň dvakrát po sobě. Časový harmonogram analýzy vzorků a jejich označení je uveden v příloze 3.

Základní přehled analyzovaných vzorků:

##### 1. Vzorky kravského mléka

- Holštýnský skot, směsné mléko z tanku, farma Jehnědí
- ČESTR, čerstvé směsné mléko z tanku, farma Svídnice
- ČESTR, čerstvá směsná mléka vybraných dojnic dle fází laktace a stáří dojnic
- ČESTR, čerstvé směsné mléko 12 dojnic, soukromý zemědělec
- Jerseyký skot, čerstvé směsné mléko 4 dojnic, farma Tehov (příloha 4)
- Choceňská mlékárna, směsné mléko z tanku před a po pasterizaci
- Komerční mléka polotučná pasterizovaná značek Madeta, Olma, Bohemilk a Dr. Halíř (příloha 5)

- Komerční mléka plnotučná pasterizovaná značek Bio Olma a Tesco finest (mléko jerseyského skotu) (příloha 5)

## 2. Vzorčky ovčího mléka

- ovčí mléko čerstvé, východofríské ovce, farma Pěňčín
- ovčí mléko pasterizované, východofríské ovce, farma Pěňčín
- ovčí mléko pultové, pasterizované, východofríské ovce, farma Pěňčín (příloha 6)
- ovčí žinčice pultová, pasterizovaná, východofríské ovce, farma Pěňčín (příloha 6)

## 3. Vzorčky kozího mléka

- kozí mléko čerstvé, kozy bílé a hnědé krátkosrsté, farma Pěňčín
- kozí mléko pasterizované, kozy bílé a hnědé krátkosrsté, farma Pěňčín
- kozí mléko pultové, pasterizované, kozy bílé a hnědé krátkosrsté, farma Pěňčín (příloha 6)
- kozí mléko pultové zahraniční, UHT, značka Bettine (Holandsko) (příloha 6)

## 5 Výsledky

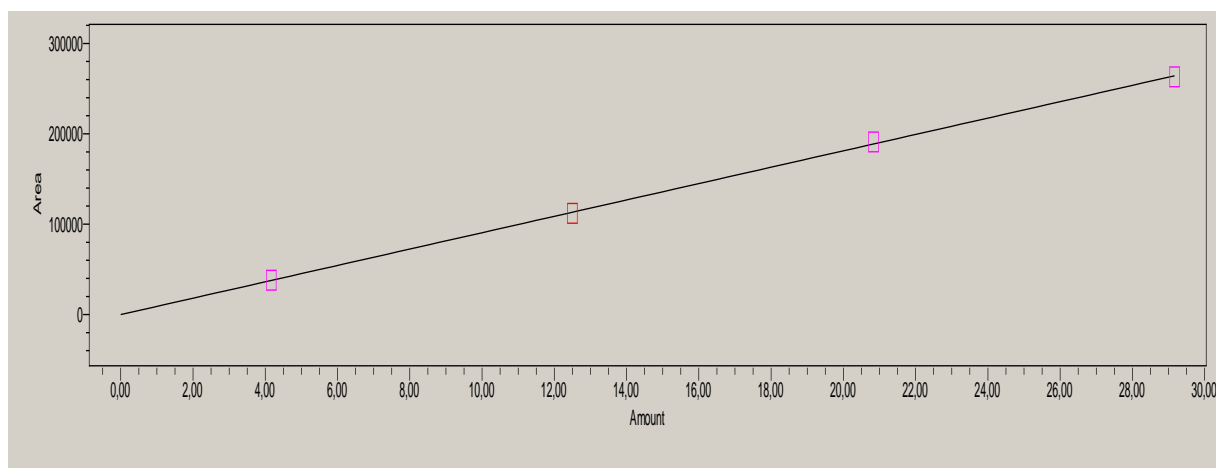
### 5.1 Kalibrace

Pro kvantitativní hodnocení je potřeba najít závislost mezi plochou píku a množstvím eluované látky. Jednoduchou variantou kvantitativního hodnocení je metoda kalibrační křivky (metoda vnějšího standardu), kdy je předpokládána a doporučována linearita kalibrační závislosti (Nováková *et* Douša, 2013b). Stanovení kalibrační závislosti bylo provedeno pomocí 4 standardů v rámci vícebodové kalibrace. Kalibrační rozsahy jednotlivých vitaminů včetně koeficientu korelace a determinace pro jednotlivé kalibrační závislosti jsou uvedeny v tabulce 6. Kalibrační křivky všech vitaminů vykazují lineární průběh. Příklad kalibrační závislosti vitaminu B2 je patrný z obrázku 11.

Tabulka 6: Kalibrační závislosti jednotlivých vitaminů

Vitamin	Kalibrační rozsah (µg/ml)	R <sup>2</sup> - koeficient determinace	R – koeficient korelace
C	50 – 360	0,9998	0,9999
B3	16 – 120	0,9967	0,9998
B6	16 – 120	0,9996	0,9997
B9	8 – 60	0,9995	0,9998
B2	4 – 30	0,9997	0,9998
B1	4 – 30	0,9996	0,9998

Obrázek 11: Kalibrační křivka vitaminu B2 (osa x: koncentrace µg/ml, osa y: plocha píků)



## 5.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD, limit of detection) je taková koncentrace, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Mez stanovitelnosti (LOQ, limit of quantification) odpovídá koncentraci, při které přesnost a správnost stanovení dovoluje kvantitativní vyhodnocení (Nováková *et* Douša, 2013b). Meze detekce a stanovitelnosti jednotlivých vitaminů uvádí tabulka 7.

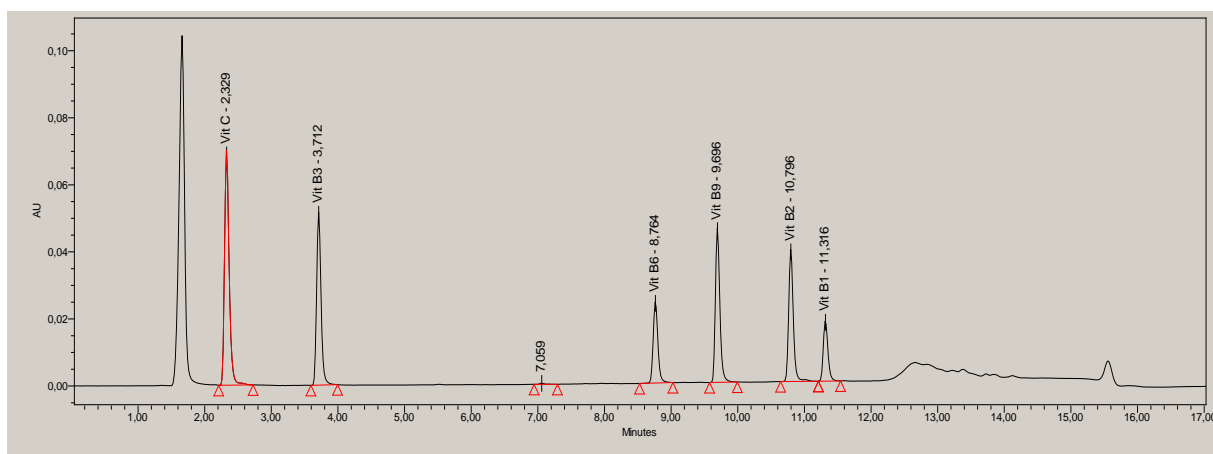
Tabulka 7: Mez detekce a kvantifikace vitaminů

Vitaminy	LOD (mg/100 ml)	LOQ (mg/100 ml)
C	0,0083	0,0249
B1	0,0003	0,0009
B2	0,001	0,003
B3	0,0057	0,0171
B6	0,008	0,024
B9	0,001	0,003

## 5.3 Chromatogramy

Analyzovány byly různé vzorky kravského, ovčího a koziho mléka. Chromatogram směsného standardu je znázorněn na obrázku 12. Příklady jednotlivých vybraných chromatogramů mlék představují obrázky 13, 14, 15, 16 a 17.

Obrázek 12: Chromatogram standardu

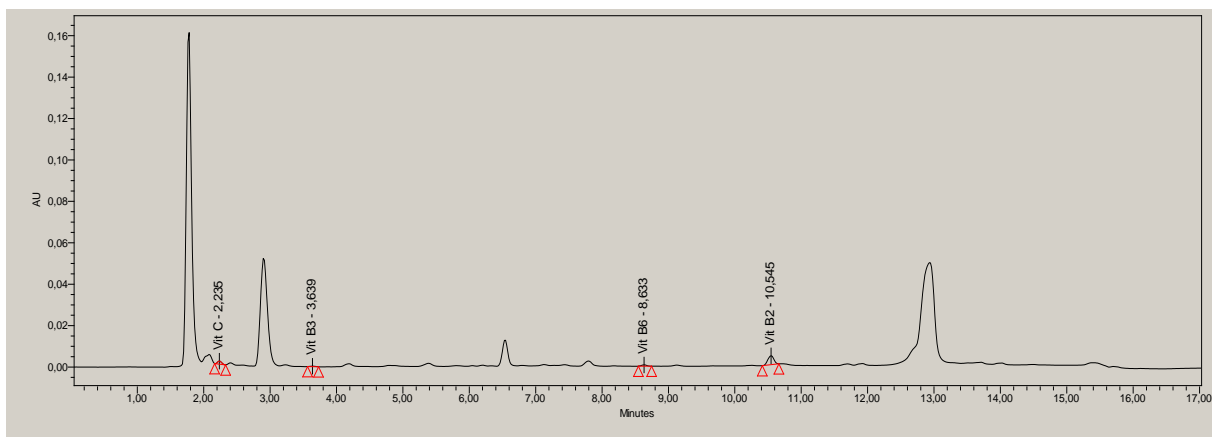




Retenční časy vitaminů:

**vit. C: 2,329 min.; vit. B3: 3,7112 min.; vit. B6: 8,764 min.; vit. B9: 9,696 min.; vit. B2: 10,545 min.; vit.B1: 11,316 min.**

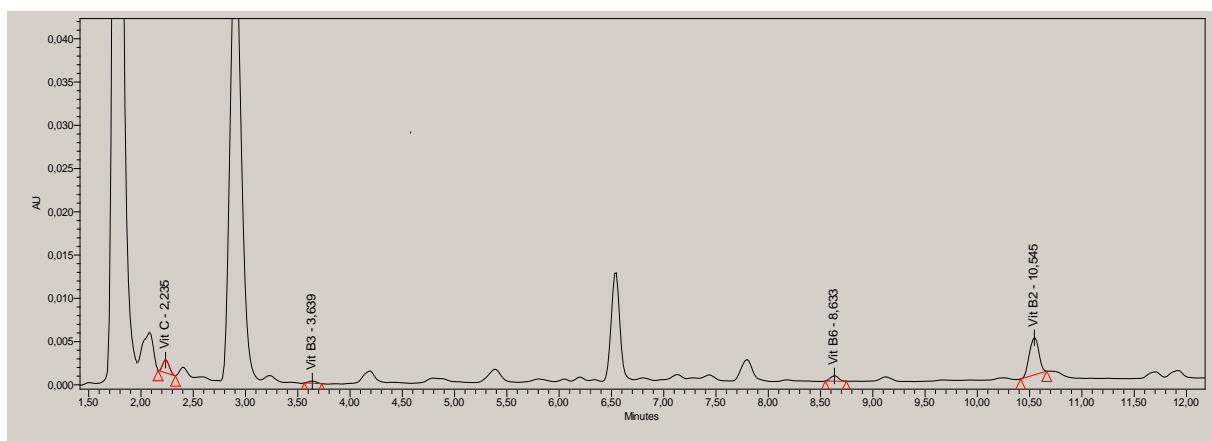
Obrázek 13: Chromatogram kravského mléka vzorku 2K (Madeta bez takadiastázy)



Retenční časy vybraných vitaminů:

**vit. C: 2,235 min.; vit. B3: 3,639 min.; vit. B6: 8,633 min.; vit. B2: 10,545 min.**

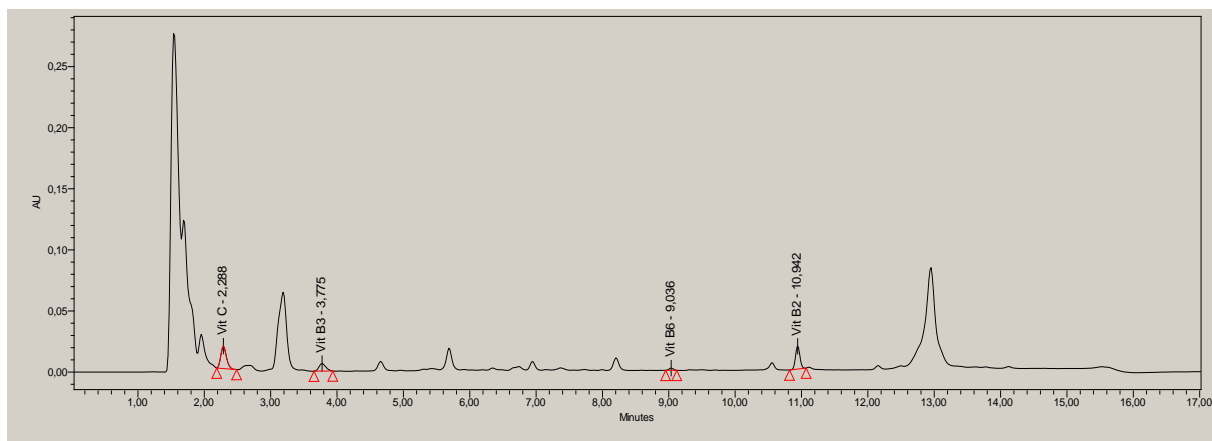
Obrázek 14: Výřez chromatogramu kravského mléka vzorku 2K (Madeta bez takadiastázy)



Retenční časy vybraných vitaminů:

**vit. C: 2,235 min.; vit. B3: 3,639 min.; vit. B6: 8,633 min.; vit. B2: 10,545 min.**

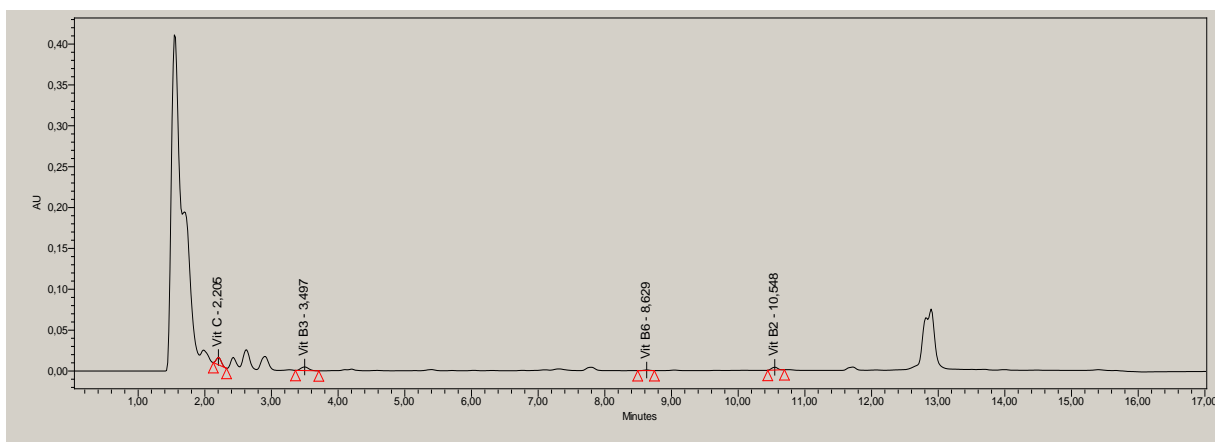
Obrázek 15: Chromatogram ovčího mléka vzorku O1T (pultové mléko takadiastázou)



Retenční časy vybraných vitaminů:

**vit. C: 2,288 min.; vit. B3: 3,775 min.; vit. B6: 9,036 min.; vit. B2: 10,942 min.**

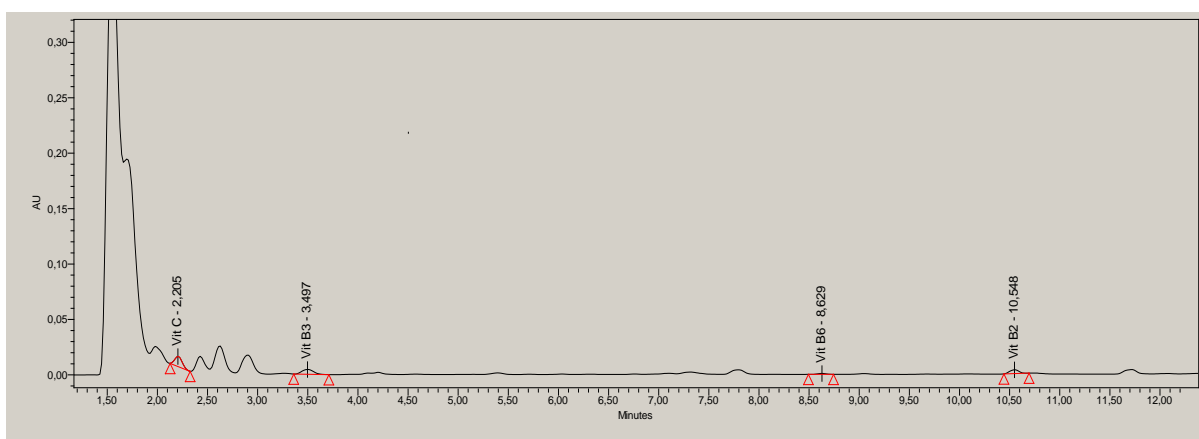
Obrázek 16: Chromatogram koziho mléka z 19.03.2018 (mléko pultové)



Retenční časy vybraných vitaminů:

**vit. C: 2,205 min.; vit. B3: 3,497 min.; vit. B6: 8,629 min.; vit. B2: 10,548 min.**

Obrázek 17: Výřez chromatogram koziho mléka z 19.03.2018 (mléko pultové)



Retenční časy vybraných vitaminů:

**vit. C: 2,205 min.; vit. B3: 3,497 min.; vit. B6: 8,629 min.; vit. B2: 10,548 min.**

#### 5.4 Porovnání obsahu vitaminů v kravském, ovčím a kozím mléce

U jednotlivých druhů přežvýkavců bylo analyzováno více různých typů vzorků mléka. Pro porovnání byly zvoleny vzorky pasterizovaného mléka a statisticky vyhodnoceny byly obsahy vitaminů C a B2. Z porovnání byly vynechány vitaminy B1, B3, B6 a B9, jejichž obsahy byly často pod mezí detekce.

Obsahy vitaminů C a B2 pasterizovaného kravského, ovčího a koziho mléka jsou uvedeny v tabulce 8. Pro každou ze dvou paralelních hodnot v daném typu vzorku byl vypočítán průměr, směrodatná odchylka (Sm. odch.) a relativní směrodatná odchylka (Rel. sm. odch.). Hodnoty byly zaokrouhleny na 3 desetinná místa.

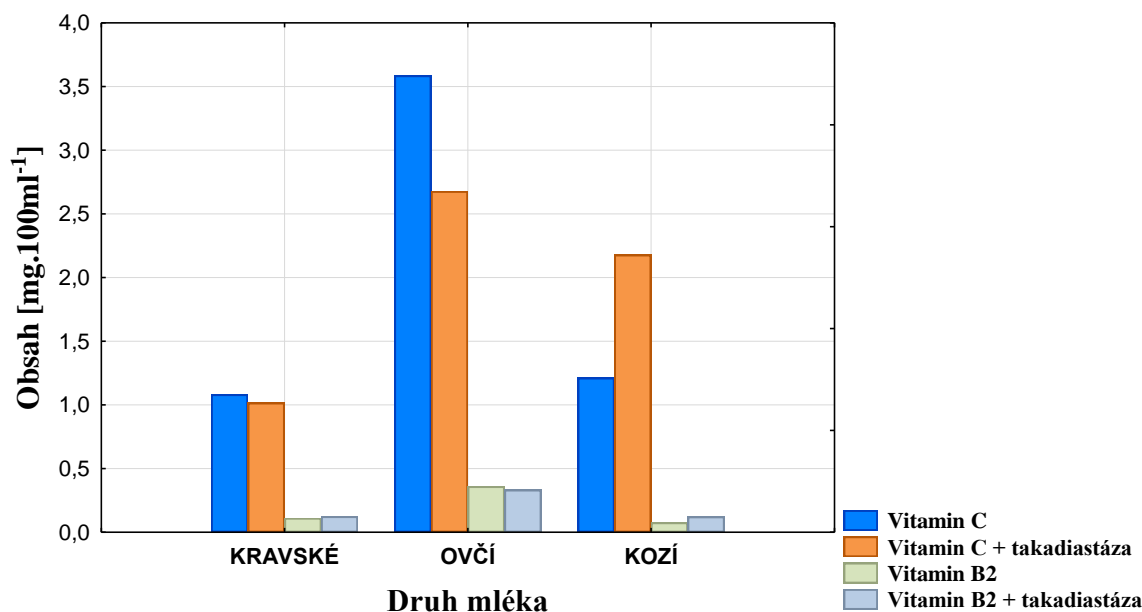
Obsahy vitaminů jednotlivých hospodářských zvířat z tabulky 8 byly statisticky testovány. Principem všech nulových hypotéz bylo konstatování rovnosti středních hodnot. Nulová hypotéza poté byla podle intervalu spolehlivosti ( $\alpha = 0,05$ ). Statistické šetření se nachází v příloze 8.

Tabulka 8: Obsahy t vitaminů C a B2 v kravském, ovčím a kozím pasterizovaném mléce

	<b>KRAVSKÉ</b>		<b>OVČÍ</b>		<b>KOZÍ</b>	
	[mg.100ml <sup>-1</sup> ]		[mg.100ml <sup>-1</sup> ]		[mg.100ml <sup>-1</sup> ]	
Vzorky	M1	M2	O1	O2	K	KK
<b>Vitamin C</b>	1,108	1,057	3,904	3,269	1,162	1,263
<b>Průměr</b>	<b>1,083</b>		<b>3,587</b>		<b>1,213</b>	
Sm. odch.	0,026		0,318		0,050	
Rel. sm. odch. [%]	2,356		8,853		4,138	
Vzorky	M1T	M2T	O1T	O2T	KT	KTK
<b>Vit. C - takadiastáza</b>	0,096	1,074	2,643	2,712	2,168	2,191
<b>Průměr</b>	<b>1,016</b>		<b>2,677</b>		<b>2,179</b>	
Sm. odch.	0,058		0,035		0,012	
Rel. sm. odch. [%]	5,731		1,302		0,529	
Vzorky	M1	M2	O1	O2	K	KK
<b>Vitamin B2</b>	0,115	0,108	0,384	0,337	0,077	0,075
<b>Průměr</b>	<b>0,111</b>		<b>0,361</b>		<b>0,076</b>	
Sm. odch.	0,004		0,024		0,001	
Rel. sm. odch. [%]	3,440		6,591		1,495	
Vzorky	M1T	M2T	O1T	O2T	KT	KTK
<b>Vit. B2 - takadiastáza</b>	0,126	0,122	0,322	0,344	0,120	0,125
<b>Průměr</b>	<b>0,124</b>		<b>0,333</b>		<b>0,123</b>	
Sm. odch.	0,002		0,011		0,003	
Rel. sm. odch. [%]	1,976		3,299		2,202	

Průměrné hodnoty obsahu vitaminů v jednotlivých druzích mléka jsou zobrazeny v grafu 1.

Graf 1: Porovnání průměrného obsahu vitaminů C a B2 v kravském, ovčím a kozím pasterizovaném mléce (StatSoft, 2013)



Z tabulky 8 a grafu 1 je patrný rozdíl hodnot v obsazích vitaminů mezi jednotlivými dojenými hospodářskými druhy přežvýkavců. V tabulce 9 je uvedeno srovnání stanovených průměrných hodnot pro vitaminy C a B2 s hodnotami udávanými autory Park *et al.* (2007).

Tabulka 9: Porovnání stanovených hodnot vitaminů C a B2 z tabulky 8 s hodnotami uváděnými v práci autorů Parka *et al.* (2007)

Vitamin	Kráva [mg.100ml <sup>-1</sup> ]	Ovce [mg.100ml <sup>-1</sup> ]	Koza [mg.100ml <sup>-1</sup> ]
C	1,083	3,587	1,213
C (takadiastáza)	1,016	2,677	2,179
<b>C *</b>	<b>0,940</b>	<b>4,160</b>	<b>1,290</b>
B2	0,111	0,361	0,076
B2 (takadiastáza)	0,124	0,333	0,123
<b>B2 *</b>	<b>0,160</b>	<b>0,376</b>	<b>0,210</b>

\* hodnoty dle autorů Parka *et al.* (2007)

## 5.5 Porovnání obsahu vitaminů v mléce různých plemen skotu

Pro porovnání zastoupení jednotlivých vodorozpustných vitaminů v mléce plemene jersey, ČESTR a holštýnského skotu byly vybrány vzorky čerstvého mléka bez použití enzymu

takadiastáza. Mléko bylo analyzováno opakovaně ve 2 paralelních stanoveních. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 10. Pro každou skupinu hodnot daného typu vzorku byl vypočítán průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka. Hodnoty byly zaokrouhleny na 3 desetinná místa.

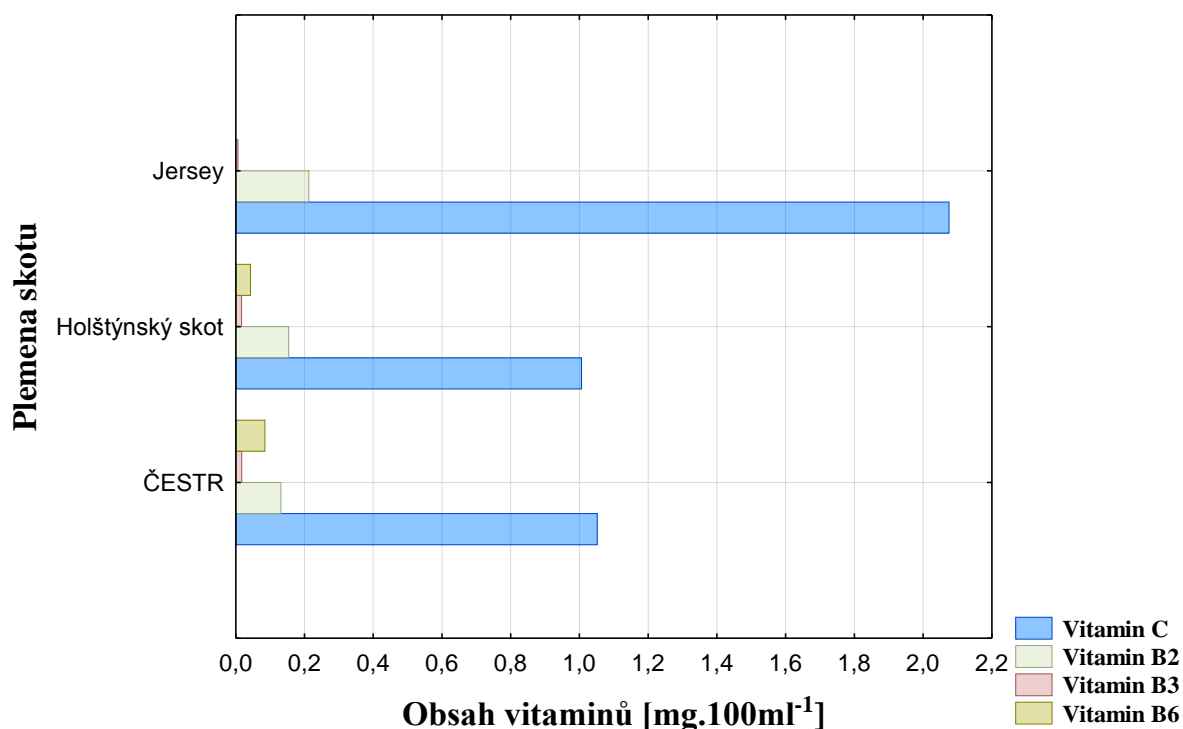
Tabulka 10: Porovnání vitaminů C, B2, B3 a B6 u různých plemen dojeného skotu

	PLEMENA		
	ČESTR [mg.100ml <sup>-1</sup> ]	HOLŠTÝN [mg.100ml <sup>-1</sup> ]	JERSEY [mg.100ml <sup>-1</sup> ]
	<b>Vitamin C</b>	<b>Vitamin C</b>	<b>Vitamin C</b>
	0,934	1,156	2,141
Obsahy vitaminu	1,296	1,276	2,009
	0,989	0,789	*
	0,988	0,802	*
	<b>Průměr</b>	<b>1,051</b>	<b>1,006</b>
Sm. odch.	0,143	0,215	0,066
Rel. sm. odch. [%]	13,584	21,348	3,192
	<b>Vitamin B2</b>	<b>Vitamin B2</b>	<b>Vitamin B2</b>
	0,112	0,27	0,214
Obsahy vitaminu	0,145	0,123	0,211
	0,133	0,113	*
	0,135	0,11	*
	<b>Průměr</b>	<b>0,131</b>	<b>0,154</b>
Sm. odch.	0,012	0,067	0,002
Rel. sm. odch. [%]	9,319	43,71	0,902
	<b>Vitamin B3</b>	<b>Vitamin B3</b>	<b>Vitamin B3</b>
	0,012	0,026	0,008
Obsahy vitaminu	0,012	0,006	0,005
	0,022	0,019	*
	0,024	0,016	*
	<b>Průměr</b>	<b>0,018</b>	<b>0,017</b>
Sm. odch.	0,006	0,007	0,002
Rel. sm. odch. [%]	31,687	42,922	23,077
	<b>Vitamin B6</b>	<b>Vitamin B6</b>	<b>Vitamin B6</b>
	< MD	0,025	< MD
Hodnoty vzorků	< MD	0,002	< MD
	0,083	0,073	*
	0,087	0,072	*
	<b>Průměr</b>	<b>0,085</b>	<b>0,043</b>
Sm. odch.	0,002	0,031	---
Rel. sm. odch. [%]	2,353	71,168	---

\* neproběhlo opakované měření

Jak je patrné z tabulky 10, ve vzorku plemene jersey nebylo provedeno opakování analýzy čerstvého mléka, a tak jsou základní statistické ukazatele vypočítány pouze ze 2 hodnot. Obsahy vitamínu B6 v mléce plemen ČESTR a jersey byly v rámci 1 měření pod mezí detekce. Grafický výstup tabulky 10 je patrný z grafu 2.

Graf 2: Porovnání obsahu vybraných vitaminů v mléce různých plemen skotu (StatSoft, 2013)



Z grafu 2 je patrný především rozdíl v obsahu vitaminů C a B2 v mléce plemene jersey oproti mléku holštýnského skotu a plemene ČESTR.

### 5.6 Obsah vitaminů v mléce v závislosti na fázi laktace

Je všeobecně známou skutečností, že v průběhu laktační fáze dochází k určitým změnám v obsahu různých komponent mléka (Chen *et al.*, 2014). Výsledky hodnot obsahů vybraných vitaminů v mléce plemene ČESTR dokumentují tabulky 11, 12 a 13. Mléko bylo získáno (nadojeno) v různých fázích laktace. Jednotlivé skupiny dojnic jsou charakterizovány v přehledu v příloze 7. Pro 2 paralelní hodnoty byl vypočítán průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka. Hodnoty byly zaokrouhleny na 3 desetinná místa.

Tabulka 11: Obsahy vitaminů v mléce dojníc v rozdoji [mg.100ml<sup>-1</sup>]

ROZDOJ								
	vit. C	vit. C *	vit. B2	vit. B2 *	vit. B3	vit. B3 *	vit. B6	vit. B6 *
Hodnoty -	1,436	2,101	0,118	0,137	0,028	0,042	0,093	0,125
Prosinec	1,586	1,387	0,138	0,117	0,031	0,036	0,104	0,104
<b>Průměr</b>	<b>1,511</b>	<b>1,744</b>	<b>0,128</b>	<b>0,127</b>	<b>0,030</b>	<b>0,039</b>	<b>0,099</b>	<b>0,115</b>
Sm. odch.	0,075	0,357	0,010	0,010	0,002	0,003	0,006	0,011
Rel. sm. odch. [%]	4,964	20,470	7,813	7,874	5,085	7,692	5,584	9,170
	0,799	1,837	0,121	0,14	0,017	0,026	0,079	0,118
Hodnoty - Leden	0,868	1,770	0,125	0,145	0,021	0,024	0,084	0,128
<b>Průměr</b>	<b>0,834</b>	<b>1,804</b>	<b>0,123</b>	<b>0,143</b>	<b>0,019</b>	<b>0,025</b>	<b>0,082</b>	<b>0,123</b>
Sm. odch.	0,035	0,034	0,002	0,003	0,002	0,001	0,003	0,005
Rel. sm. odch. [%]	4,139	1,858	1,626	1,754	1,053	4,000	3,067	4,065
Prosinec + Leden								
<b>Průměr</b>	<b>1,172</b>	<b>1,774</b>	<b>0,126</b>	<b>0,135</b>	<b>0,024</b>	<b>0,032</b>	<b>0,090</b>	<b>0,119</b>
Sm. odch.	0,344	0,255	0,008	0,011	0,006	0,007	0,010	0,009
Rel. sm. odch. [%]	29,323	14,392	6,081	7,895	22,844	22,964	10,57	7,795

\* hodnoty s takadiastázou

 Tabulka 12: Obsahy vitaminů v mléce dojníc na vrcholu laktace [mg.100ml<sup>-1</sup>]

VRCHOL								
	vit. C	vit. C *	vit. B2	vit. B2 *	vit. B3	vit. B3 *	vit. B6	vit. B6 *
Hodnoty -	1,289	0,761	0,112	0,123	0,017	0,026	0,071	0,100
Prosinec	1,191	1,012	0,113	0,112	0,023	0,032	0,076	0,101
<b>Průměr</b>	<b>1,240</b>	<b>0,887</b>	<b>0,113</b>	<b>0,118</b>	<b>0,020</b>	<b>0,029</b>	<b>0,074</b>	<b>0,100</b>
Sm. odch.	0,049	0,123	0,001	0,006	0,003	0,003	0,003	0,001
Rel. sm. odch. [%]	3,952	14,157	0,444	4,681	15,000	9,777	3,401	0,498
	0,849	1,047	0,123	0,136	0,015	0,021	0,071	0,116
Hodnoty - Leden	0,871	1,021	0,123	0,136	0,016	0,023	0,075	0,113
<b>Průměr</b>	<b>0,860</b>	<b>1,034</b>	<b>0,123</b>	<b>0,136</b>	<b>0,155</b>	<b>0,022</b>	<b>0,073</b>	<b>0,115</b>
Sm. odch.	0,011	0,013	0,000	0,000	0,001	0,001	0,002	0,002
Rel. sm. odch. [%]	1,279	1,257	0,000	0,000	3,226	4,546	2,740	1,310
Prosinec + Leden								
<b>Průměr</b>	<b>1,050</b>	<b>0,960</b>	<b>0,118</b>	<b>0,127</b>	<b>0,018</b>	<b>0,026</b>	<b>0,073</b>	<b>0,108</b>
Sm. odch.	0,193	0,116	0,005	0,010	0,003	0,004	0,002	0,007
Rel. sm. odch. [%]	18,409	12,054	0,447	7,917	17,535	16,288	3,109	6,594

\* hodnoty s takadiastázou



Tabulka 13: Obsahy vitaminů v mléce dojníc na konci laktace [mg.100ml<sup>-1</sup>]

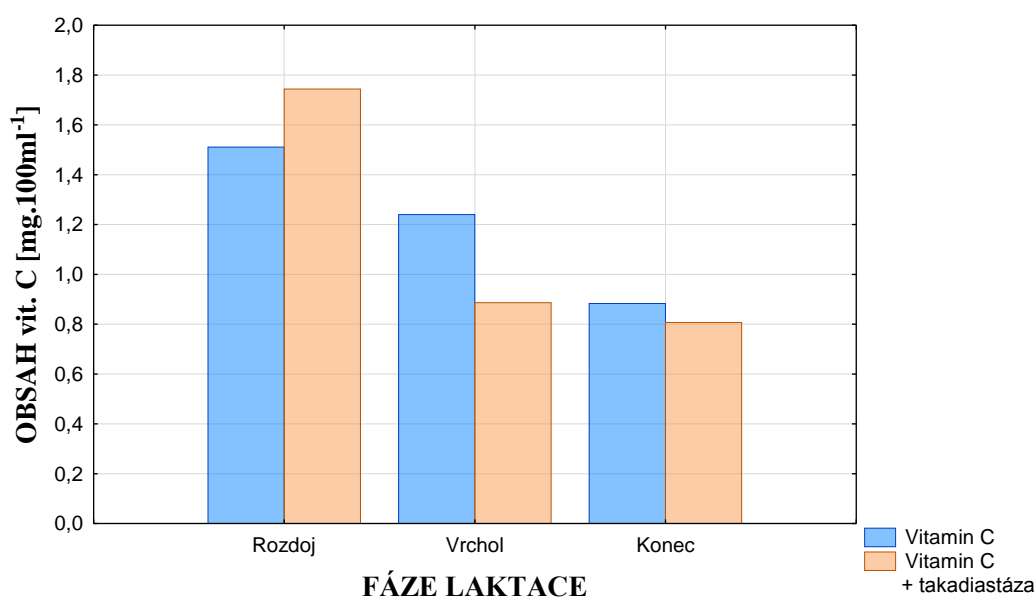
	KONEC							
	vit. C	vit. C *	vit. B2	vit. B2 *	vit. B3	vit. B3 *	vit. B6	vit. B6 *
Hodnoty -	0,708	0,742	0,100	0,142	0,009	0,020	0,064	0,114
Prosinec	1,059	0,873	0,149	0,156	0,016	0,019	0,091	0,118
<b>Průměr</b>	<b>0,884</b>	<b>0,808</b>	<b>0,125</b>	<b>0,149</b>	<b>0,013</b>	<b>0,020</b>	<b>0,078</b>	<b>0,116</b>
Sm. odch.	0,176	0,066	0,025	0,007	0,004	0,001	0,014	0,002
Rel. sm. odch. [%]	19,864	8,112	19,679	4,698	28,000	2,564	17,419	1,724
	0,617	0,487	0,148	0,161	0,016	0,022	0,088	0,123
Hodnoty - Leden	0,519	0,584	0,142	0,16	0,014	0,022	0,088	0,110
<b>Průměr</b>	<b>0,568</b>	<b>0,536</b>	<b>0,145</b>	<b>0,161</b>	<b>0,015</b>	<b>0,022</b>	<b>0,088</b>	<b>0,117</b>
Sm. odch.	0,049	0,049	0,003	0,001	0,001	0,000	0,000	0,007
Rel. sm. odch. [%]	8,627	9,057	2,069	3,115	6,667	0,000	0,000	5,579
	<b>Prosinec + Leden</b>							
<b>Průměr</b>	<b>0,726</b>	<b>0,671</b>	<b>0,135</b>	<b>0,155</b>	<b>0,014</b>	<b>0,021</b>	<b>0,083</b>	<b>0,116</b>
Sm. odch.	0,204	0,148	0,020	0,008	0,003	0,001	0,011	0,005
Rel. sm. odch. [%]	28,065	21,997	15,021	4,908	20,810	6,260	13,165	4,142

\* hodnoty z takadiastázou

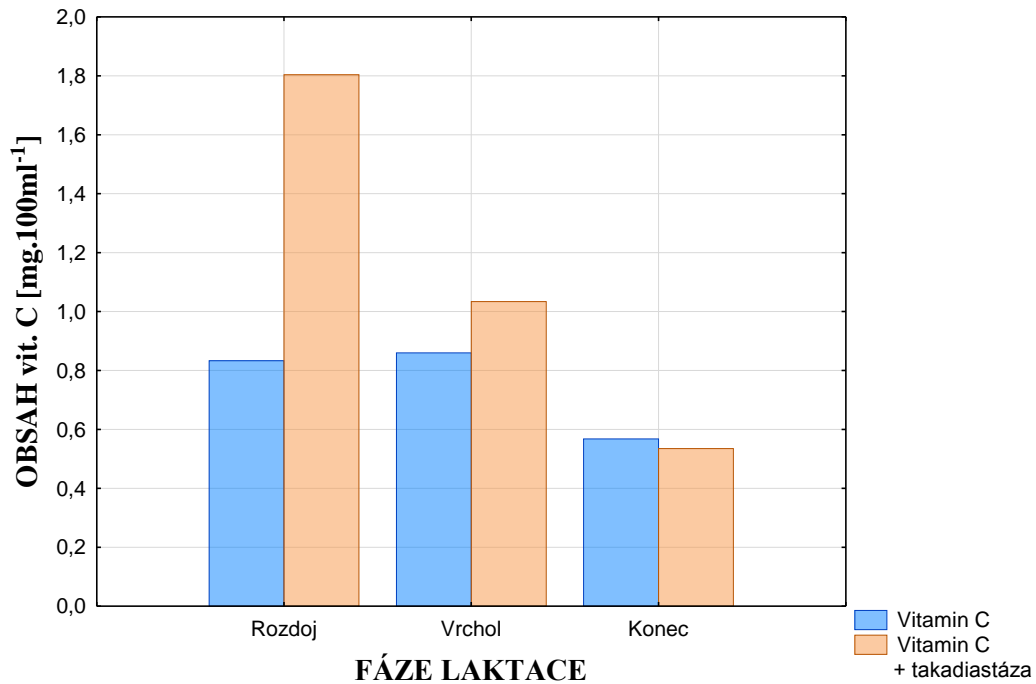
Porovnání průměrných hodnot obsahu vitaminů C a B2 v mléce odebraném v různé fázi laktace zobrazují grafy 3, 4, 5 a 6. Vitamin B3 a B6 ukazují grafy 7, 8, 9 a 10.

Graf 3: Průměrné hodnoty vitaminu C v mléce v závislosti na fázi laktace (prosinec)

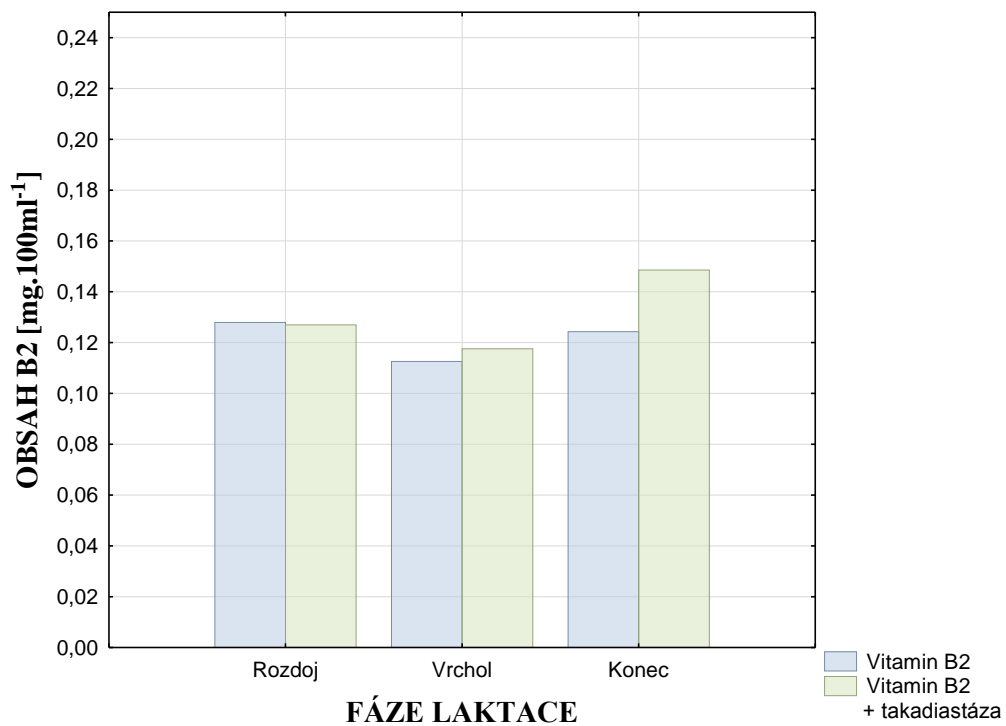
(StatSoft, 2013)



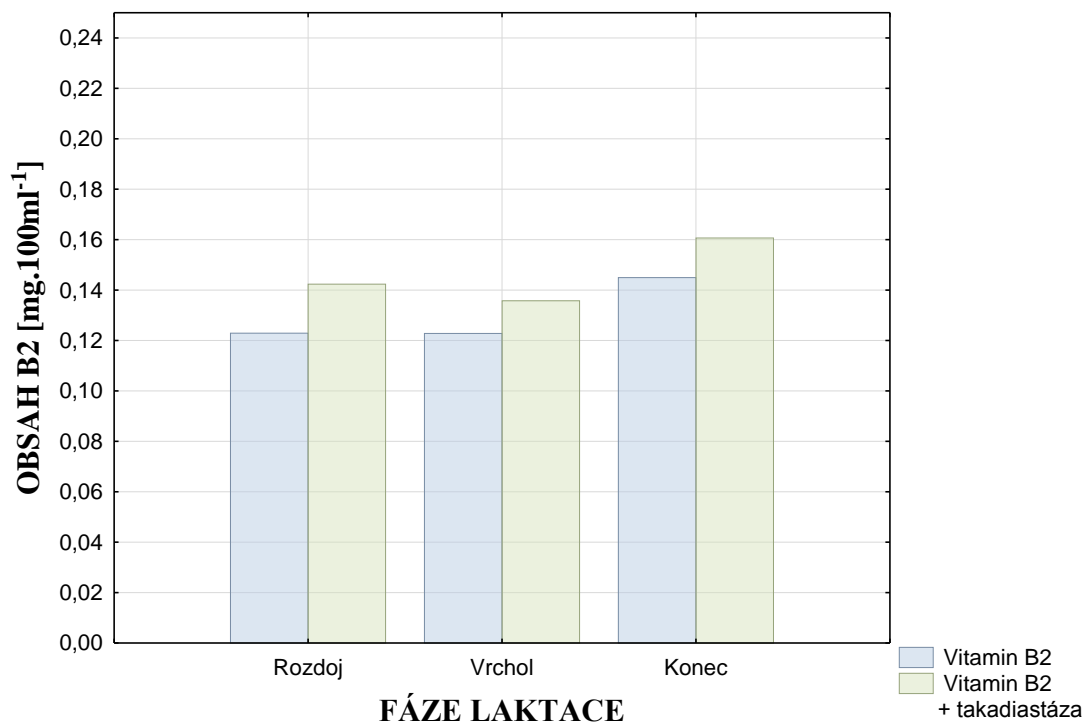
Graf 4: Průměrné hodnoty vitamínu C v mléce v závislosti na fázi laktace (leden) (StatSoft, 2013)



Graf 5: Průměrné hodnoty vitamínu B2 v mléce v závislosti na fázi laktace (prosinec) (StatSoft, 2013)

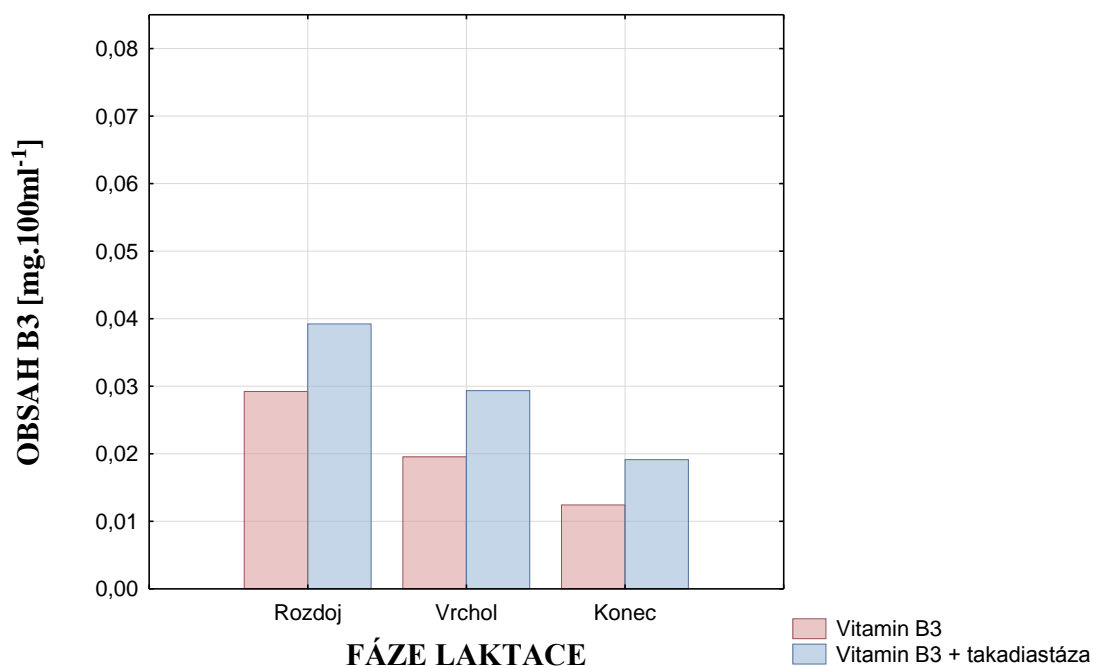


Graf 6: Průměrné hodnoty vitamínu B2 v mléce v závislosti na fázi laktace (leden) (StatSoft, 2013)

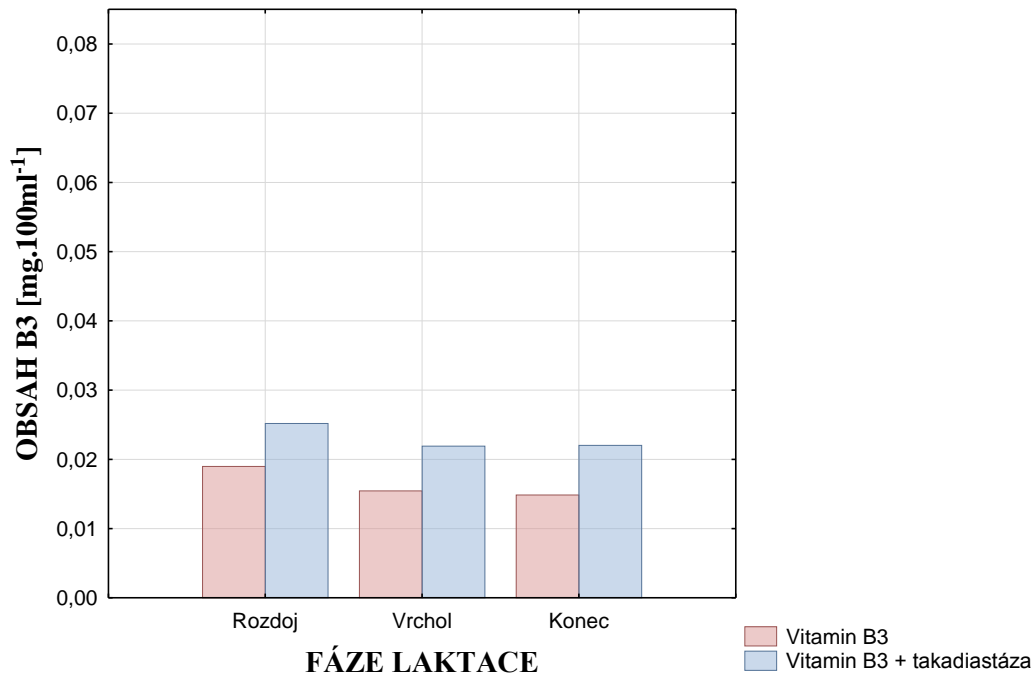


Z grafů 3 a 4 je patrná jistá tendence snižujících se hodnot obsahu vitamínu C v průběhu laktace. V grafech 5 a 6 je zřejmá určitá vyrovnanost obsahu vitamínu B2 během laktace.

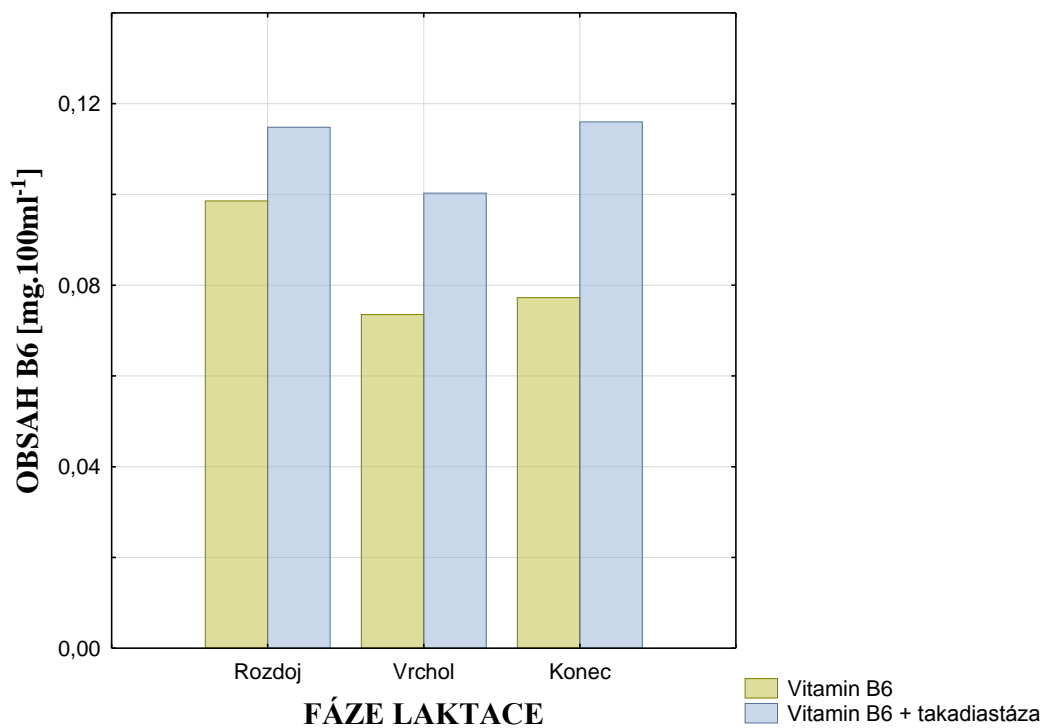
Graf 7: Průměrné hodnoty vitamínu B3 v mléce v závislosti na fázi laktace (prosinec) (StatSoft, 2013)



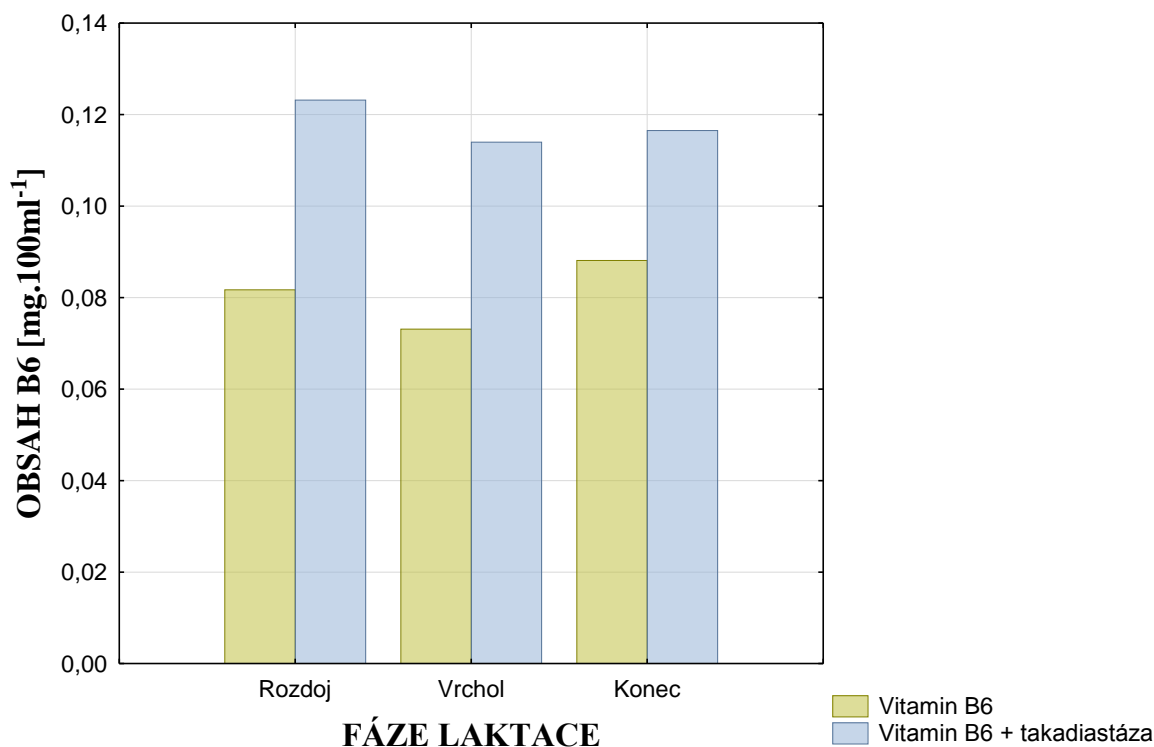
Graf 8: Průměrné hodnoty vitamínu B3 v mléce v závislosti na fázi laktace (leden) (StatSoft, 2013)



Graf 9: Průměrné hodnoty vitamínu B6 v mléce v závislosti na fázi laktace (prosinec) (StatSoft, 2013)



Graf 10: Průměrné hodnoty vitamínu B6 v mléce v závislosti na fázi laktace (leden)  
(StatSoft, 2013)



### 5.7 Porovnání obsahu vitamínů v mléce různě starých dojnic

Na obsah složek mléka má vedle mnohých dalších faktorů vliv i věk dojnic (Boro *et al.*, 2016). Pro srovnání byly využity vzorky směsného mléka celého stáda (421 dojnic) a vzorky směsného mléka 21 prvotetek.

Výsledky naměřených hodnot jsou v směsném mléce prvotetek jsou uvedeny v tabulce 14 a v směsném mléce celého stáda v tabulce 15. Pro hodnoty v jednotlivých skupinách byl vypočítán průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka. Hodnoty jsou zaokrouhleny na 3 desetinná místa. Z grafu 11 není patrný rozdíl v obsahu vitamínů v mléce různě starých dojnic.

Tabulka 14: Obsahů vybraných vitaminů v mléce prvotetek

PRVOTELKY								
obsah vitaminů [mg.100ml <sup>-1</sup> ]								
	vit. C	vit. C *	vit. B2	vit. B2 *	vit. B3	vit. B3 *	vit. B6	vit. B6 *
Hodnoty	1,150	1,403	0,114	0,121	0,021	0,028	0,070	0,097
	1,139	1,493	0,111	0,129	0,022	0,037	0,076	0,099
	0,882	1,389	0,122	0,119	0,077	0,025	0,083	0,092
	0,845	1,562	0,121	0,131	0,071	0,028	0,069	0,109
<b>Průměr</b>	<b>1,004</b>	<b>1,462</b>	<b>0,117</b>	<b>0,125</b>	<b>0,048</b>	<b>0,030</b>	<b>0,075</b>	<b>0,099</b>
Sm. odch.	0,141	0,070	0,005	0,005	0,026	0,005	0,006	0,006
Rel. sm. odch [%]	14,060	4,810	3,963	4,079	55,158	15,254	7,504	6,226

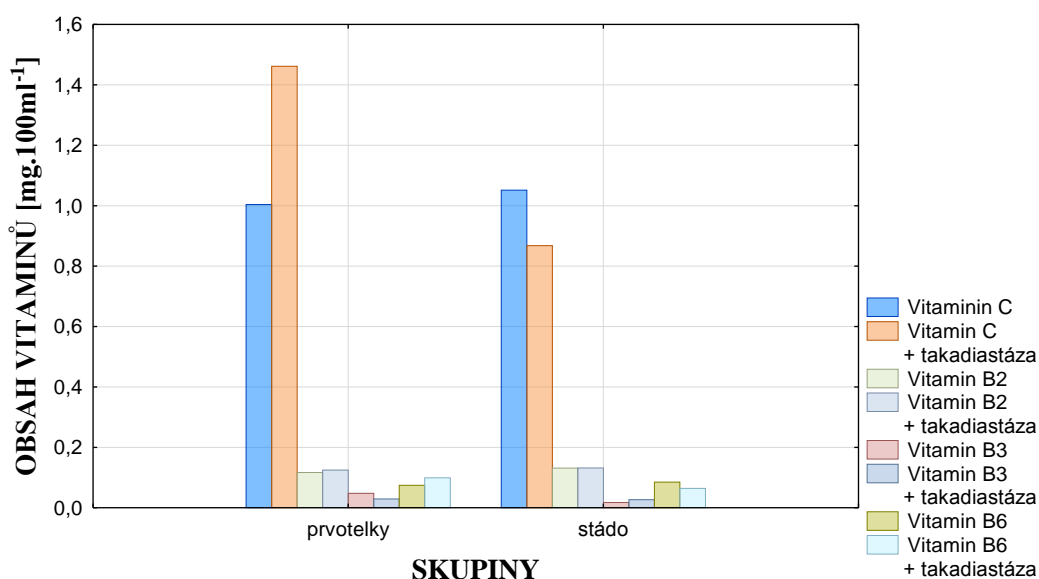
\* hodnoty s takadiastázou

Tabulka 15: Obsahy vybraných vitaminů v mléce celého stáda

CELÉ STÁDO								
obsah vitaminů [mg.100ml <sup>-1</sup> ]								
	vit. C	vit. C *	vit. B2	vit. B2 *	vit. B3	vit. B3 *	vit. B6	vit. B6 *
Hodnoty	0,934	1,072	0,112	0,14	0,012	0,022	<MD	0,022
	1,296	0,643	0,145	0,145	0,012	0,025	<MD	0,034
	0,989	0,786	0,133	0,117	0,022	0,027	0,083	0,097
	0,987	0,971	0,135	0,126	0,024	0,032	0,087	0,103
<b>Průměr</b>	<b>1,052</b>	<b>0,868</b>	<b>0,131</b>	<b>0,132</b>	<b>0,018</b>	<b>0,027</b>	<b>0,085</b>	<b>0,064</b>
Sm. odch.	0,143	0,166	0,012	0,011	0,006	0,004	0,002	0,036
Rel. sm. odch [%]	13,588	19,068	9,149	8,419	31,687	13,736	2,353	56,736

\* hodnoty s takadiastázou \*\* hodnoty pod mezí detekce

Graf 11: Porovnání obsahu vitaminů v mléce prvotetek a celého stáda (StatSoft, 2013)



## 5.8 Porovnání obsahu vitaminů ve vzorcích bovinních komerčních mlék

Srovnání bylo provedeno u 3 druhů komerčního pasterizovaného polotučného mléka zn. Olma, Madeta a Bohemilk s mlékem pasterizovaným plnotučným zn. Olma Bio. Pro příslušné skupiny hodnot byl vypočítán průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka. Hodnoty byly zaokrouhleny na 3 desetinná místa. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 16.

Tabulka 16: Obsahy vitaminu B2 v různých komerčních značkách mléka

<b>KOMERČNÍ MLÉKA</b>				
Obsah vit. B2 [mg.100ml <sup>-1</sup> ]				
	<b>OLMA</b>	<b>MADETA</b>	<b>BOHEMILK</b>	<b>BIO OLMA</b>
Hodnoty	0,104	0,105	0,103	*
	0,103	0,115	0,104	*
	0,094	0,104	0,091	0,150
	0,095	0,100	0,089	0,150
<b>Průměr</b>	<b>0,099</b>	<b>0,106</b>	<b>0,097</b>	<b>0,150</b>
Sm. odch.	0,005	0,006	0,007	0,000
Rel. sm. odch. [%]	4,573	5,210	7,024	0,000
Hodnoty s takadiastázou	0,123	0,128	0,123	*
	0,118	0,128	0,103	*
	0,122	0,131	0,115	0,178
	0,121	0,129	0,116	0,181
<b>Průměr</b>	<b>0,121</b>	<b>0,129</b>	<b>0,114</b>	<b>0,180</b>
Sm. odch.	0,002	0,001	0,007	0,002
Rel. sm. odch. [%]	1,546	0,949	6,293	0,836

\* neproběhlo opakované měření

Srovnání průměrných hodnot vitaminu B2 ve vzorcích komerčních mlék s hodnotou vitaminu B2 v kravském mléce uváděnou autory Park *et al.* (2007) poskytuje tabulka 17.

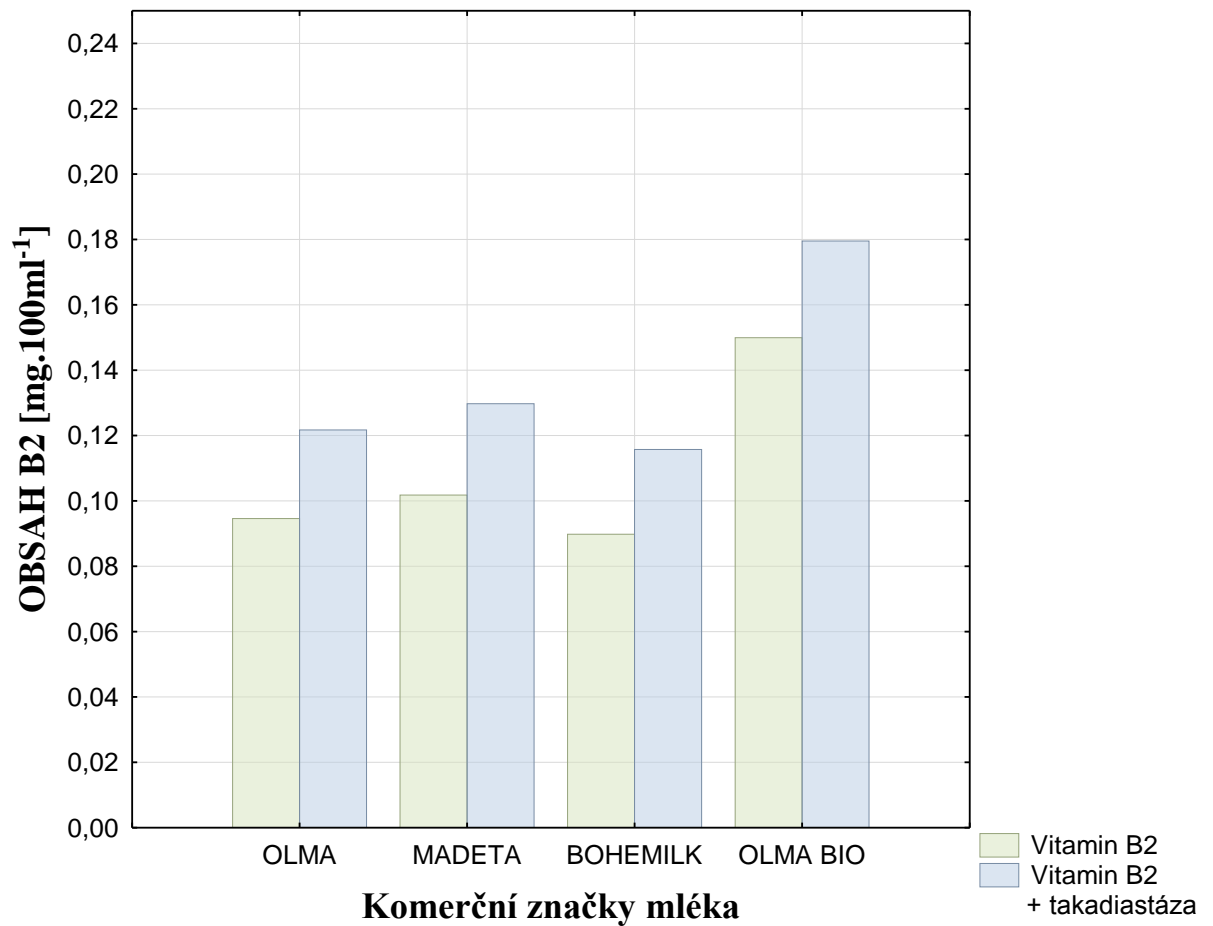
Tabulka 17: Srovnání hodnot obsahu vitaminu B2 v mléce

Vitamin B2 [mg.100ml <sup>-1</sup> ]				
	<b>OLMA</b>	<b>MADETA</b>	<b>BOHEMILK</b>	<b>BIO OLMA</b>
B2	0,099	0,106	0,097	0,150
B2 s takadiastázou	0,121	0,129	0,114	0,180
<b>B2*</b>	<b>0,160</b>	<b>0,160</b>	<b>0,160</b>	<b>0,160</b>

\* Obsah vitaminu B2 [mg/100ml] (Park *et al.*, 2007)

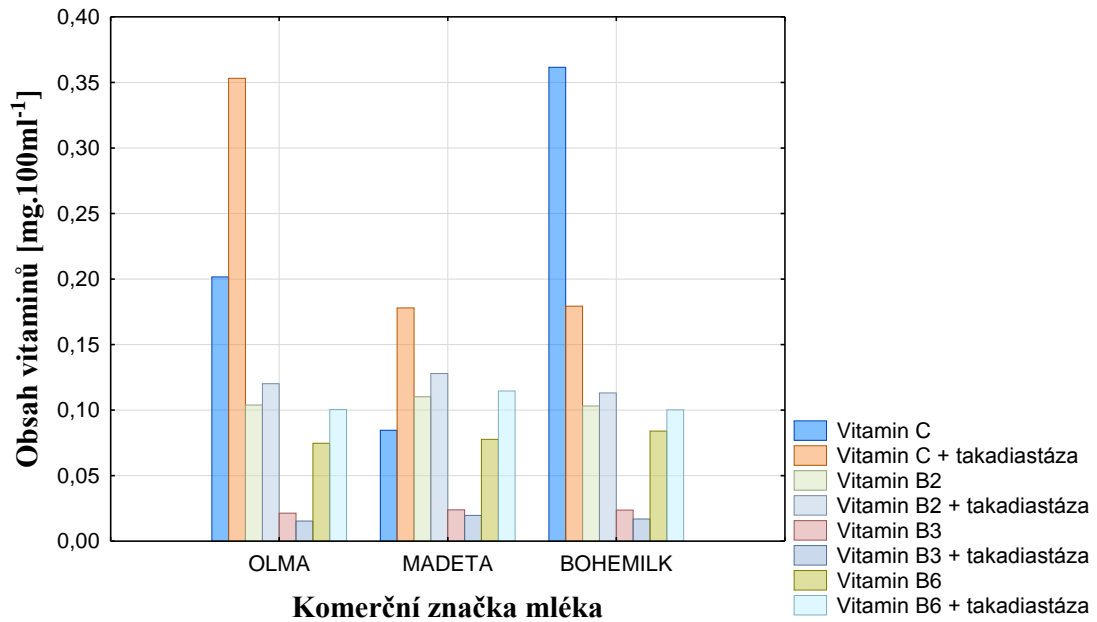
Z výše uvedených tabulek (16 a 17) a z grafu 12 je patrná určitá vyrovnanost obsahu vitamínu B2 v mléce zn. Olma, Madeta a Bohemilk, a vyšší obsah vitamínu B v mléce Olma Bio a ve vzorcích s použitým enzymem.

Graf 12: Porovnání obsahu vitamínu B2 v mléce různých komerčních značek (StatSoft, 2013)

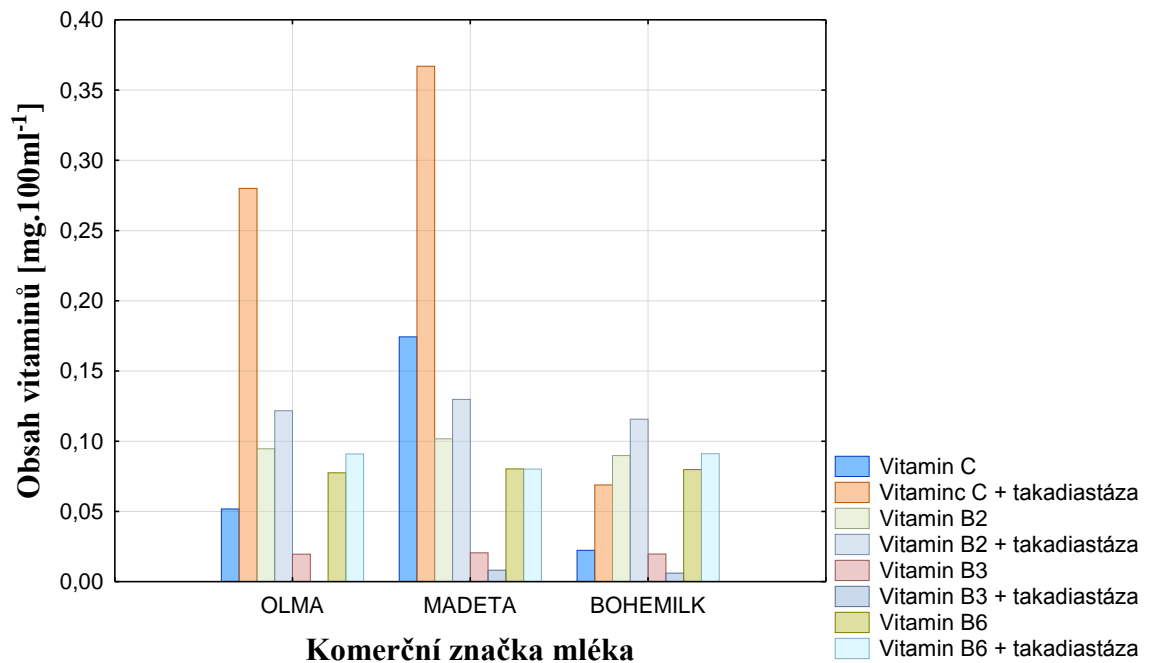




Graf 13: Porovnání obsahu vitamínu C, B2, B3 a B6 v mléce různých komerčních značek (leden) (StatSoft, 2013)



Graf 13: Porovnání obsahu vitamínu C, B2, B3 a B6 v mléce různých komerčních značek (březen) (StatSoft, 2013)



## 6 Diskuze

Hlavním cílem diplomové práce bylo zavedení, optimalizace a ověření metodiky přípravy vzorků mléka, pro spolehlivé a simultánní stanovení vybraných v mléce se vyskytujících vitaminů rozpustných ve vodě pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Nároky na analytické metody jsou velmi pestré a zahrnují např. časovou nenáročnost, spolehlivost, rutinní postup, cenovou dostupnost, stabilitu analytu během přípravy, reprodukovatelnost extrakce a chromatografických postupů. Stanovení vitaminů rozpustných ve vodě je pro jejich značnou nestabilitu obecně náročným úkolem (Abano *et* Dadzie, 2014).

Vedle nestability vitaminů je také dále nutné brát v úvahu jejich variabilitu z hlediska chemických vlastností, struktury, biologické aktivity, molekulové hmotnosti a mnohých dalších aspektů (Van Wyk *et al.*, 2010). Jak uvádí autoři Abano *et* Dadzie (2014), v současné době neexistuje spolehlivá metoda, která by dokázala stanovit simultánně všechny ve vodě rozpustné vitaminy.

Zavádění metodiky přípravy vzorků vycházelo z práce autorů Khair-un-Nisa *et al.* (2010), kteří porovnávali ztráty obsahu ve vodě rozpustných vitaminů při tepelném ošetření mléka. Podstata této metody spočívala zejména v dlouhé době zpracování vzorků. Autoři použili k extrakci vitaminů 0,1M HCl (mléko: 0,1M HCl, 50:65 v/v). Následně byl vzorek umístěn na 30 minut do vroucí vodní lázně. Po celou dobu zahřívání vzorku ve vodní lázni byl vzorek často promícháván. Využití varu vzorku v kyselém prostředí i s použitím chladiče pro zpětný reflux kondenzovaných par vedl k poměrně značnému výparu.

Z tohoto důvodu i s cílem zjednodušit přípravu vzorků byl postup upraven tak, že byl vynechán var v kyselině, a tím bylo možné zároveň zpracovat více vzorků najednou.

Enzym takadiastáza se přidává do mléka za účelem uvolnění vázaných vitaminů (Khair-un-Nisa *et al.*, 2010, Van Wyk *et al.*, 2010), lze tedy očekávat vyšší stanovené obsahy jednotlivých vitaminů v mléce s přidavkem tohoto enzymu než v mléce bez jeho přidavku. Efekt takadiastázy na vyšší výtěžnost vitaminů z analyzovaných vzorků byl statisticky testován a byl potvrzen statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) při použití enzymu takadiastáza.

Statistické šetření (příloha 9) potvrdilo vyšší obsahy naměřených vitaminů oproti paralelně stanovovaným vzorkům bez takadiastázy. Enzym je tak velmi vhodné zařadit do postupu přípravy vzorků.

Nejčastěji používané metody pro stanovení vitaminů skupiny B jsou HPLC separace na reverzní fázi za použití kolony C18 pro polární látky (Abano *et* Dadzie, 2014). Autoři Albalá-

Hurtado *et al.* (1997) použili pro analýzu vitaminů skupiny B v kojeneckém mléce rovněž RP-HPLC s kolonou C18, avšak Khair-un-Nisa *et al.* (2010) použili kolonu Zorbax SB-C8 (4,6 x 150 mm, 5 μm) pro společné stanovení vit. B1, B2, B3, B6 a B9. V této práci byla použita kolona s pevným jádrem Kinetex 2,6 μm Polar C18 (100 x 4,6 mm, 100 Å) pro stanovení vit. B1, B2, B3, B6, B9 a C. Malá velikost zrn stacionární fáze (2,6 μm) a pevné jádro částic poskytují užší eluční zóny separovaných látek, tím dochází ke zvýšení účinnosti separačního procesu. Chromatografická separace jednotlivých vybraných vitaminů, jejich detekce a kvantifikace byla provedena přesně podle postupu vyvinutého firmou Phenomenex speciálně pro tento typ kolony. Chromatogram směšného standardu je znázorněn na obrázku 12. Meze detekce a stanovitelnosti metody pro sledované analyty jsou uvedeny v tabulce 7. Parametry kalibračních závislostí pro jednotlivé sledované vitaminy jsou uvedeny v tabulce 6 (kap. 5.1).

Navržený postup přípravy vzorků i vlastní chromatografické stanovení bylo ověřováno analýzou 140 reálných vzorků různého typu mléka s cílem simultánní analýzou stanovit obsahy vitaminů B1, B2, B3, B6, B9 a C. Kvantifikace obsahu vitaminů B1 a B9 nebyla uspokojivě provedena, neboť téměř ve všech vzorcích byly jejich obsahy pod mezí detekce.

Nejvíce zastoupenými vitaminy ve všech vzorcích mléka byly vitaminy C a B2. Ze 140 provedených analýz vzorků mléka byl vitamin C stanoven celkem ve 136 vzorcích, vit. B2 ve všech 140 vzorcích, vit. B3 ve 122 vzorcích, B6 ve 127 vzorcích, vit. B1 v 18 a B9 ve 48 vzorcích mléka. Pro vyhodnocení rozdílů v kvalitě mléka v závislosti na sledovaných parametrech byly zvoleny především vitaminy C a B2 a v určitých případech i vitaminy B3 a B6.

Pro porovnání obsahu vitaminů v mléce kravském, ovčím a kozím (kap. 5.4) bylo zvoleno pasterizované mléko sledovaných druhů hospodářských zvířat (tabulka 8).

Stanovený průměrný obsah vitaminu C v kravském mléce bez přídavku enzymu takadiastázy byl  $1,083 \pm 0,026 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$  a v mléce s přídavkem takadiastázy činil  $1,016 \pm 0,058 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$ . V kozím mléce bez přídavku enzymu takadiastázy bylo stanoveno  $1,213 \pm 0,050 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$  ml a v kozím mléce s přídavkem takadiastázy  $2,179 \pm 0,012 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$ . Průměrný obsah vitaminu C v ovčím mléce bez přídavku takadiastázy odpovídal hodnotě  $3,587 \pm 0,318 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$  a v ovčím mléce s přídavkem takadiastázy odpovídal hodnotě  $2,677 \pm 0,035 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$ .

Velíšek *et Hajšlová*, (2009); Combs, (2008) a Park *et al.*, (2007) uvádějí obsah vitaminu C v kravském mléce v rozmezí 0,5 - 2  $\text{mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$ . V ovčím mléce bylo stanoveno 4,16

mg.100ml<sup>-1</sup> a v kozím 1,29 mg.100ml<sup>-1</sup> (Park *et al.*, 2007). Hodnoty vitamínu C v kravském mléce stanovené v této práci odpovídají rozmezí hodnot uváděných autory. Rovněž hodnoty obsahu vitamínu C v ovčím a zejména v kozím mléce bez přídavku takadiastázy jsou blízké údajům Parka *et al.* (2007).

Stanovený průměrný obsah vitamínu B2 pro kravské mléko byl bez takadiastázy 0,111 ± 0,004 mg.100ml<sup>-1</sup> a s takadiastázou 0,124 ± 0,002 mg.100ml<sup>-1</sup>. U kozího mléka bez takadiastázy 0,076 ± 0,076 mg/100 ml a s takadiastázou 0,123 ± 0,0123 mg.100ml<sup>-1</sup>. Pro mléko ovčí bez takadiastázy 0,361 ± 0,024 mg.100ml<sup>-1</sup> a s takadiastázou 0,333 ± 0,011 mg.100ml<sup>-1</sup>.

Park *et al.* (2007) uvádí pro vitamin B2 hodnoty v kravském mléce 0,16 mg.100ml<sup>-1</sup>, ovčím 0,376 mg.100ml<sup>-1</sup> a kozím 0,21 mg.100ml<sup>-1</sup>. Pasterizace nemá významný vliv na obsah vitamínu B2 v mléce (Khair-un-Nisa *et al.*, 2010). Velíšek *et Hajšlová* (2009) uvádějí ztrátu při pasterizaci do 5 %. Stanovený obsah vitamínu B2 v kravském mléce se blíží hodnotě uvedené v práci Parka *et al.* (2007). Khair-un-Nisa *et al.* (2010) uvádí obsah vitamínu B2 pro plnotučné pasterizované kravské mléko 0,23 mg.100ml<sup>-1</sup>, nicméně ve své práci ve vzorcích stanovili průměrnou hodnotu 0,115 ± 0,023 mg.100ml<sup>-1</sup> mléka. Stanovený obsah vitamínu B2 v kozím mléce se spíše blíží hodnotě 0,14 mg.100ml<sup>-1</sup> dle autorů Raynal-Ljutovac *et al.* (2008), než vyšší hodnotě 0,21 mg.100ml<sup>-1</sup> uvedené autory Parkem *et al.* (2007). Stanovený obsah vitamínu B2 v ovčím mléce odpovídá hodnotám uvedeným v literatuře (Park *et al.*, 2007, Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008).

Porovnání naměřených hodnot pro vitamin C a B2 v porovnání s hodnotami autorů Parka *et al.* (2007) uvádí tabulka 9. Z grafu 1 je patrný vyšší obsah vybraných vitaminů v mléce ovčím než v mléce kozím a kravském. Výsledky měření byly statisticky testovány (příloha 8). Signifikantně vyšší hodnoty vitamínu C a B2 v ovčím mléce byly statisticky potvrzeny (p<0,05) oproti mléku kravskému a kozímu a výsledek je ve shodě s údaji v literatuře (Pandya *et Ghodke*, 2006, Park *et al.*, 2007). Dále byl zjištěn statisticky významný rozdíl (p<0,05) v obsahu vitamínu C u kozího mléka oproti mléku kravskému. Kozí mléko obsahuje ve shodě s literárními zdroji vyšší množství vitamínu C než mléko kravské.

Pro porovnání obsahu vitaminů v mléce plemen jersey, ČESTR a holštýnský skot (kap. 5.5), byly zvoleny vitaminy C, B2, B3 a B6 stanovené ve vzorcích čerstvého mléka bez přídavku enzymu takadiastázy (tabulka 10, graf 2). Nejvyšší relativní směrodatné odchylky v obsahu vitaminů byly zjištěny v souboru vzorků mléka holštýnského skotu. Průměrné hodnoty pro vitamin C v mléce holštýnského skotu (1,006 ± 0,215 mg.100ml<sup>-1</sup>) a v mléce

plemene ČESTR ( $1,051 \pm 0,143 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$ ) odpovídají hodnotě  $0,94 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$  udávané Parkem *et al.* (2007). Hodnoty obsahu vitamínu B2 v mléce (ČESTR -  $0,131 \pm 0,012 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$ , holštýnský skot -  $0,154 \pm 0,067 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$ ) se také přibližují hodnotě  $0,16 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$  (Park *et al.*, 2007). Stanovený průměrný obsah vitamínu B6 v mléce holštýnského skotu  $0,043 \pm 0,031 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$  je téměř shodný s literárním údajem  $0,042 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$  (Park *et al.* 2007).

Vyšší průměrná hodnota obsahu vitamínu C i vitamínu B2 byla stanovena v mléce plemene jersey a to  $2,075 \pm 0,066 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$ , respektive  $0,212 \pm 0,002 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$ . Rovněž jinými autory jsou popisovány rozdíly mezi obsahem různých komponent mléka s ohledem na plemeno skotu (Boro *et al.*, 2016, Chen *et al.*, 2014).

Podle Fuquay *et al.* (2011), bývá v mléce jerseykého skotu vyšší obsah některých jeho složek v důsledku nižší užitkovosti tohoto plemene ve srovnání s plemenem ČESTR a zejména holštýnským skotem. Stanovené hodnoty naznačují, že by i obsah vitamínů v mléce tohoto plemene mohl být vyšší oproti vysokoužitkovým plemenům.

Stanovené obsahy vitamínu B3 v mléce všech sledovaných plemen byly velmi nízké ve srovnání s literárními údaji ( $0,09 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$ , Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008). Obsah vitamínu B6 se nacházel pod mezí detekce.

Chen *et al.* (2014) zmiňují možný vliv fáze laktace na obsah komponent mléka. Pro sledování obsahu vitamínů v mléce v závislosti na fázi laktace (kap. 5.6) byly zvoleny vzorky směsného mléka vždy od 20 vybraných dojnic v dané fázi laktace (rozdoj, vrchol a konec). Přesnější charakteristiky vybraných dojnic jsou uvedeny v příloze 7. Měření bylo provedeno dvakrát po sobě jdoucích měsících (prosinec a leden). Výsledky jsou uvedeny v tabulkách 11, 12 a 13 a grafech 3 a 4 pro vitamin C, grafech 5 a 6 pro vitamin B2, grafech 7 a 8 pro vitamin B3 a grafech 9 a 10 pro vitamin B6. Pro všechny naměřené hodnoty v jednotlivých souborech dat jsou relativní směrodatné odchylky poměrně nízké. Obsahy vitamínu C v mléce dojnic (graf 3 a 4) naznačují určitou sestupnou tendenci od fáze rozdoje směrem ke konci laktace. Naopak obsahy vitamínu B2 v mléce dojnic (graf 5 a 6) byly v průběhu jednotlivých fází laktace téměř vyrovnané a průměrné obsahy vitamínu B2 v jednotlivých fázích laktace se blíží literární hodnotě pro kravské mléko  $0,16 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$  (Park *et al.*, 2007). Obdobně ani v případě vitamínů B3 a B6 (graf 7, 8, 9, 10) nelze pozorovat výrazné tendence ve změně jejich obsahu v mléce v průběhu laktace, naopak jejich koncentrace v mléce jsou poměrně vyrovnané. Vitamin B3 dosahuje však v průměru pouze  $\frac{1}{4}$  obsahu vitamínu B3 ( $0,08$

mg.100ml<sup>-1</sup>), kterou uvádí (Park *et al.*, 2007) Stanovené hodnoty obsahu vitamínu. B6 jsou naopak vyšší (cca 2 - 3 krát) než hodnota 0,042 mg.100ml<sup>-1</sup> (Park *et al.*, 2007).

Věk dojnice je jeden z mnohých faktorů, který se udává v souvislosti se změnami obsahu složek mléka (především bílkovin a tuků) (Boro *et al.*, 2016, Fuquay *et al.*, 2011, Hofírek *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2014). Pro porovnání obsahu vitamínů ve vztahu ke stáří dojnice (kap. 5.7), byla vyčleněná skupina 21 prvotek, u jejichž směsného mléka (tabulka 14) se zjišťoval obsah vitamínů oproti směsnému mléku celého stáda (tabulka 15). Porovnání průměrných hodnot vybraných vitamínů (C, B2, B3 a B6) prvotek a celého stáda uvádí tabulka 2 (příloha 10). Výsledky měření byly statisticky testovány (příloha 10) a šetření neprokázalo statisticky významný rozdíl ( $p > 0,05$ ) mezi obsahy vitamínů prvotek a celého stáda.

Porovnání obsahu vitamín B2 bylo také provedeno u 3 běžných polotučných pasterizovaných komerčních mlék a 1 mléka čerstvého v bio kvalitě (kap. 5.8). Uvedené výsledky měření jsou v tabulce 16 a 17, dále pak na grafu 12 a pro více vitamínů na grafu 13 a 14. Hodnoty obsahu pro vždy pro 2 vzorky bez takadiastázy jsou  $0,099 \pm 0,005$  mg.100ml<sup>-1</sup> (Olma),  $0,106 \pm 0,006$  mg.100ml<sup>-1</sup> (Madeta),  $0,097 \pm 0,007$  mg.100ml<sup>-1</sup> (Bohemilk),  $0,150 \pm 0,000$  mg.100ml<sup>-1</sup> (Bio Olma) a s takadiastázou  $0,121 \pm 0,002$  mg.100ml<sup>-1</sup> (Olma),  $0,129 \pm 0,001$  mg.100ml<sup>-1</sup> (Madeta),  $0,114 \pm 0,007$  mg.100ml<sup>-1</sup> (Bohemilk),  $0,180 \pm 0,002$  mg.100ml<sup>-1</sup> (Bio Olma). Uvedené hodnoty naznačují určitou vyrovnanost hodnot mezi polotučnými mléky a nepatrně vyšší obsah vitamínu u mléka Bio Olma.

Pro vitamín B1 je udávaná hodnota jeho obsahu v kravském mléce 0,04 mg.100ml<sup>-1</sup> (Combs, 2008, Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008, Park *et al.*, 2007), v ovčím mléce 0,08 mg.100ml<sup>-1</sup> (Park *et al.*, 2007) a kozím mléce 0,05 mg.100ml<sup>-1</sup> (Park *et al.*, 2007). Obsah vitamínu B1 byl stanoven pouze v 1. cyklu měření (9. - 10.10.2017, tabulka 2, příloha 3) a to až o 2 řády méně než udává literatura Jednalo se až na 2 případy pouze o vzorky mléka s přidavkem enzymu takadiastáza. Mez detekce pro thiamin odpovídá hodnotě 0,0003 mg.100ml<sup>-1</sup> mléka. Ve vzorcích ovčího mléka OS1T, OS2T, OP1T, OP2T, O1T, O2T se pohybovaly hodnoty obsahu vitamínu B1 v rozmezí 0,002 - 0,005 mg.100ml<sup>-1</sup>. V kozím mléce byly obsahy tohoto vitamínu pod mezí detekce. V čerstvém mléce holštýnského skotu (H1 a H2) byly obsahy thiaminu v mléce bez přidavku takadiastázy 0,0005 a 0,0004 mg.100ml<sup>-1</sup>, tedy téměř na hranici meze detekce. V ostatních vzorcích kravského mléka s přidavkem takadiastázy se hodnoty obsahu thiaminu pohybovaly v rozmezí 0,001 - 0,002 mg.100ml<sup>-1</sup>. Vitamín B1 se obecně v mléce nachází ve velmi nízkém množství, tak z výše uvedených skutečností lze předpokládat, že i s použitím enzymu takadiastáza se jeho hodnoty

budou pohybovat na hranici detekce. Možnou příčinou může být metodický postup nebo skutečně nízká koncentrace v mléce.

Obsah vitamínu B9 byl v 65,7 % provedených analýz mléka pod mezí detekce. Ve zbývajících vzorcích mléka však stanovené obsahy vitamínu B9 v mléce, tedy všechny obsahy nad mezí detekce, byly o jeden řád vyšší než jsou hodnoty uváděné v literatuře a to v kravském mléce  $0,005 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$ , kozím  $0,001 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$  a ovčím  $0,005 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$  (Park *et al.*, 2007, Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008). Listová kyselina byla stanovena opět téměř výhradně v 1. cyklu měření (9. - 10.10.2017, tabulka 2, příloha 3). V kozího mléce bez přídavku enzymu (5 vzorků) byl průměrný obsah vitamínu B9  $0,010 \pm 0,002 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$ , a relativní směrodatná odchylka činila 19,011 %. V kozím mléce s přídavkem enzymu takadiastázy (3 vzorky) byl průměrný obsah vitamínu B9  $0,026 \pm 0,012 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$  a relativní směrodatná odchylka dosahovala hodnoty 44,522 %. Ve vzorcích ovčího mléka byl bez přídavku enzymu ze (4 vzorky) průměrný obsah  $0,011 \pm 0,001 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$ , a relativní směrodatná odchylka byla 8,248 %. Ve vzorcích ovčího mléka s přídavkem enzymu takadiastázy (4 vzorky) byl stanoven průměrný obsah vitamínu B9  $0,031 \pm 0,009 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$ , a relativní směrodatná odchylka dosahovala hodnoty 29,735 %. Ve vzorcích kravského mléka bez přídavku enzymu (4 vzorky) byl průměr obsah vitamínu B9  $0,010 \pm 0,0009 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$ , a rel. sm. odch. činila 9,116 %, a ve vzorcích kravského mléka s přídavkem enzymu (10 vzorků) byl průměrný obsah vitamínu B9  $0,009 \pm 0,005 \text{ mg} \cdot 100\text{ml}^{-1}$ , rel. sm. odch. byla 54,993 %. Z výše uvedených skutečností vyplývá, že v mléce koz a ovcí s přídavkem takadiastázy jsou obsahy vitamínu B9 vyšší než v mléce bez přídavku tohoto enzymu, což odpovídá předpokladu. Nejvyšší obsah vitamínu B9 byl stanoven v ovčím mléce, nejnižší naopak v mléce bovinním.

Pro určitou variabilitu vzorků a v některých případech i poměrně malého množství měření, nebylo vždy možné dané vztahy z dostupných hodnot testovat statisticky. Přesto tento určitý handicap lze vypožorovat určité souvislosti, možné trendy a vztahy, ovšem je nutné brát dané výsledky pouze orientačně.

## 6 Závěr

Byla zavedena a částečně optimalizována metodika přípravy a vzorků mléka pro simultánní stanovení vitaminů B1, B2, B3, B6, B9 a C metodou HPLC. Většinu vitaminů se povedlo opakovaně stanovit. Nejstabilněji stanovenými vitaminy napříč všemi vzorky byl vitamin B2 a C. Pouze kvantifikace obsahu vitaminů B1 a B9 nebyla uspokojivě provedena, neboť téměř ve všech vzorcích byly jejich obsahy pod mezí detekce.

Bylo by vhodné zvýšit spolehlivost metody a zajistit opakovatelnost naměřených výsledků s ohledem na přípravu vzorků. Jako velmi účinné se zdá být použití enzymu takadiastáza, jehož přínos pro enzymovou extrakci vázaných vitaminů byl statisticky potvrzen. V tomto případě by bylo vhodné zvážit delší dobu inkubace enzymu ve vodní lázni.

Většina výsledků měření jednotlivých vitaminů se pohybovala v rozmezí očekávaných hodnot vyplývajících z literárních zdrojů. Řadů vztahů se povedlo otestovat. Bylo potvrzeno vyšší zastoupení vitaminů u ovčího mléka. Dále pak nebyl prokázán rozdíl v obsahu vitaminů prvotek oproti celému stádu. Řada dalších vztahů byla zajímavým způsobem naznačena a je nutné jejich výsledky brát orientačně, ovšem nabízí prostor pro další analýzy a hledání souvislostí.

Složitost analýzy vitaminů rozpustných ve vodě a současně omezené možnosti srovnávání výsledků a zkušeností s jinými autory, nabízí možnost zdokonalování metody s očekávaným přínosem v rámci této problematiky.



## 8 Seznam použité literatury

Abano, E. E., Dadzie, R. G. 2014. Simultaneous detection of water-soluble vitamins using the high performance liquid chromatography (HPLC) - a review. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 6 (2): 116-123.

Albalá-Hurtado, S., Veciana-Nogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M., Mariné-Font, A. 1997. Determination of water soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 778 (1-2), 247 - 253.

Bender, D. A. 2008. *Introduction to nutrition and metabolism*. 4th ed. Boca Raton: CRC Press. ISBN 1420043129.

Boro, P., Naha, B. C., Prakash, C., Madkar, A., Kumar, N., Kumari, A., Channa, G. P. 2016. Genetic and non-genetic factors affecting milk composition in dairy cow. *International Journal Of Advanced Biological Research*, 6 (2), pp. 170 - 174. ISSN 2250 - 3579.

Combs, G. F. 2008. *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. 3rd ed. Burlington: Elsevier Academic Press. ISBN 978-0-12-183493-7.

Czerniewicz, M., Kielczewska, K., Kruk, A. 2006. Comparison of some physicochemical properties of milk from holstein-friesian and jersey cows. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 15, pp. 61 - 64. ISSN: 1230-0322.

Engel, R., Abrankó, L., Stefanovits-Bányai, Fodor, P. 2010. Simultaneous determination of water soluble vitamins in fortified food products. *Acta Alimentaria*, 39 (1). pp. 48-58. ISSN 0139-3006.

Evershed, R. P., Payne, S., Sherratt, A. G., Copley, M. S., Coolidge, J., Urem-Kotsu, D., Kotsakis, K., Özdoğan, M., Özdoğan, A. E., Nieuwenhuys, O., Akkermans, P. M. M. G., Bailey, D., Andeescu, R. R., Campbell, S., Farid, S., Hodder, I., Yalman, N., Özbaşaran, M.,

Fuquay, J. W., Fox, P. F. McSweeney, P. L. H. 2011. Encyclopedia of dairy sciences. 2. ed. Amsterdam: Academic Press. ISBN: 978-0-12-374402-9.

Gilting A. M., Crowe F. L., Lloyd-Wright Z., Sanders T. A., Appleby P. N., Allen N. E., Key T. J. 2010. Serum concentrations of vitamin B12 and folate in British male omnivores, vegetarians and vegans: results from a cross-sectional analysis of the EPIC-Oxford cohort study. *Eur J Clin Nutr.* 64(9): 933–939.

Griffiths, M. 2010. Improving the safety and quality of milk. First published. Boca Raton: CRC Press. Woodhead Publishing series in food science, technology and nutrition. ISBN 978-1-84569-806-5.

Guneser, O., Yuceer, Y., K. 2012. Effect of ultraviolet light on water- and fat-soluble vitamins in cow and goat milk. *Journal of Dairy Science* 95 (11), 6230 - 6241.

Hampel, D. Allen, L. H. 2015. Analyzing B - Vitamins in Human Milk: Methodological Approaches, Critical Reviews in Food Science and Nutrition. DOI: 10.1080/10408398.2013.783550.

Hlúbik, P., Opltová, L. 2004. Vitaminy. Grada Publishing, a.s.. Praha. 232 s. ISBN 80-247-0373-4.

Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležal, R., Pospíšil, Z. a kolektiv autorů. 2009. Nemoci skotu. 1. vyd. Brno: Česká buiatrická společnost, 1150 s. ISBN 978-80-86542-19-5.

Chen, B. Y., Lewis, M. J., Grandison, A. S. 2014. Effect of seasonal variation on the composition and properties of raw milk destined for processing in the UK. *Food Chemistry*, 158, pp. 216-223. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.02.118.

Chitchyan, Z. T., Grigoryan, A. A. 2016. Yield and quality of brine-ripened cheeses, production from the milk of jersey and simmental cows. *Annals of Agrarian Science*, 14, pp. 64 - 66. DOI: 10.1016/j.aasci.2016.05.003.

Jelínek, P. Koudela, K. 2003. Fyziologie hospodářských zvířat. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-7157-644-1.

Khair-un-Nisa, A., Tarar, O. M., Ali, S. A. Jamil, K., Begum, A. 2010. Study to evaluate the impact of heat treatment of water soluble vitamins in milk. *Journal of the Pakistani Medical Association*, 60, 909–912.

Kohlmeier, M. 2015. *Nutrient Metabolism: Structures, Functions and Genes*. Second edition. Academic Press, pp. 898. ISBN: 978-0-12-387784-0.

Kumar, A., Sharma, A. 2016. Nutritional and medicinal superiority of goat milk over cow milk in infants. *International Journal of Pediatric Nursing*, 2 (1). pp. 47 - 50. DOI: 10.21088/ijpen.2454.9126.2116.5.

Ledvina, M., Stoklasová, A., Cerman, J. 2009. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. V Praze: Karolinum. ISBN 978-80-246-1414-4.

Matouš, B. 2010. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-702-8.

Metzler, D. E. 2003. *Biochemistry: the chemical reactions of living cells*. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press. ISBN 0-12-492541-3.

Moreno, P., Salvado, V. 2000. Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulations by high-performance liquid chromatography. *J. Chromat. A*, 870, 207–215.

Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. 2002. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.). V H & H 3. Jinočany: H & H. ISBN 80-7319-013-3.

Nováková, L., Douša M. 2013a. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková. ISBN 978-80-260-4243-3.

Nováková, L., Douša M. 2013b. Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková. ISBN 978-80-260-4244-0.

O'Connor, D. L. 1994. Folate in goat milk products with reference to other vitamins and minerals: A review. *Small Ruminant Research*, 14, pp. 143-149. DOI: 10.1016/0921-4488(94)90104-X.

Park, Y.W., Juarez, M., Ramos, M., Haenlein, G.F.W. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*., 68. pp. 88-113. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2006.09.013.

Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., Chilliard, Y. 2008. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*, 79. pp. 57-72. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2008.07.009.

Sluková, M. a kol. 2016. Výroba potravin a nutriční hodnota. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. 168 s. ISBN 978-80-7080-947-1.

StatSoft, Inc. 2013. STATISTICA (data analysis software system), version 12. Dostupné z: <[www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)>.

Strapák, P. 2013. Chov hovädzieho dobytku. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre. ISBN 978-80-552-0994-4.

Thompson, A., Boland, M., Singh, H. 2009. Milk proteins: from expression to food. Amsterdam: Academic Press/Elsevier. ISBN 9780123740397.

Toman, M. 2000. Veterinární imunologie. Grada. Praha. p. 413. ISBN: 8071697273.

Trang, H. K., 2013. Development of HPLC methods for the determination of water-soluble vitamins in pharmaceuticals and fortified food products. Clemson University, South Carolina, United states. All Theses. Paper 1745.

Van Wyk, J., Britz, T. J. 2010. A rapid HPLC method for the extraction and quantification of vitamin B12 in dairy products and cultures of *Propionibacterium freudenreichi*. *Dairy Science and Technology*, 90, 509–520.

Velíšek, J., Hajšlová J. 2009. *Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd.* Tábor: OSSIS. ISBN 978-80-86659-17-6.

Veselá, Z. 2013. *Situační a výhledová zpráva: Mléko.* Ministerstvo zemědělství ČR. Praha. s. 116. ISBN: 978-80-7434-121-2.

Walstra, P., Wouters, J. T. M., Geurts, T. J. 2006. *Dairy science and technology. Second Edition.* CRC Taylor & Francis Group, Boca Raton, 782 pp. ISBN 978-0-8247-2763-5.

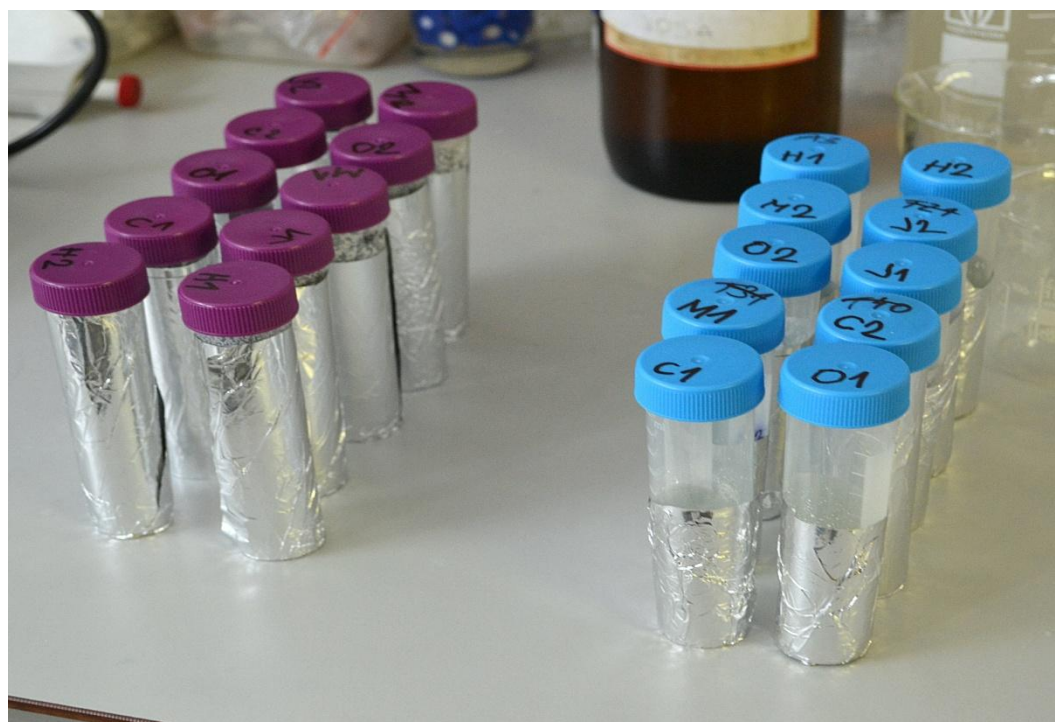
Watanabe, F.; Yabuta, Y.; Tanioka, Y.; Bito, T. 2013. Biologically active vitamin B<sub>12</sub> compounds in foods for preventing deficiency among vegetarians and elderly subjects. *J. Agric. Food Chem.* 61, 6769–6775.

Zafra-Gomez, A., Garballo, A., Morales, J. C., Garcia-Ayuso, L. E. 2006. Simultaneous determination of eightwater-soluble vitamins in supplemented foods by liquid chromatography. *J. agric. Fd Chem.*, 54, 4531–4536.

Zmiya, M.M., Golovach, P.I. 2016. Humoral immunity state in bull fattening for correction racion on the effect of B vitamins (B1, B2, B5, B6, B10, B12). *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 18, 3(70), 115–118.

## 9 Přílohy

### Příloha 1: Odstínění zkumavek alobalem během přípravy vzorků



## Příloha 2: Odstředění, vymražení a filtrace vzorků

Obrázek 1: vzorky v centrifuze Eppendorf

Obrázek 2: vzorky po vymražení

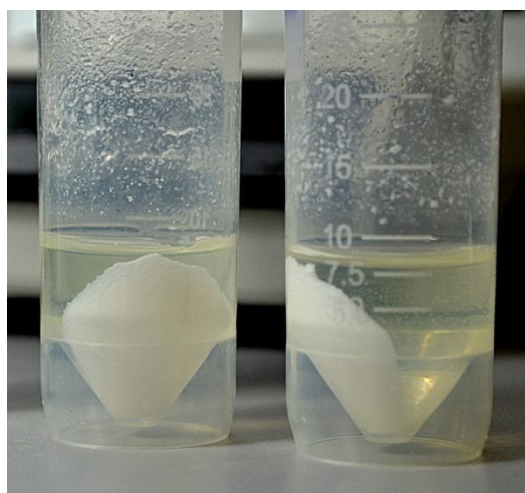
Obrázek 3: filtrace supernatantu do vialek

Obrázek 4: vzorky ve vialkách připraveny pro HPLC analýzu

Obrázek 1



Obrázek 2



Obrázek 3



Obrázek 4



### Příloha 3: Pracovní označení vzorků a časový harmonogram analýz

Přehled označení všech vzorků a typů mléka přináší tabulka 1. Časový harmonogram analýz jednotlivých typů vzorků dle jejich označení je uveden v tabulce 2.

Celkem bylo analyzováno 140 vzorků ve 4 různých termínech.

Tabulka 1: Přehled jednotlivých typů analyzovaného mléka s pracovním označením vzorků

Označení vzorku a typ mléka	Označení vzorku a typ mléka
<b>KS1</b> Kozí čerstvé	<b>H1</b> Holštýnské čerstvé
<b>KS2</b> Kozí čerstvé	<b>H2</b> Holštýnské čerstvé
<b>KS3</b> Kozí čerstvé	<b>C1</b> ČESTR čerstvé
<b>KP1</b> Kozí pasterizované	<b>C2</b> ČESTR čerstvé
<b>KP2</b> Kozí pasterizované	<b>J1</b> Jersey čerstvé
<b>OS1</b> Ovčí čerstvé	<b>J2</b> Jersey čerstvé
<b>OS2</b> Ovčí čerstvé	<b>O1</b> Ovčí pasterizované
<b>OP1</b> Ovčí pasterizované	<b>O2</b> Ovčí pasterizované
<b>OP2</b> Ovčí pasterizované	<b>M1</b> Mlékárna pasterizované
<b>MS2</b> Mlékárna čerstvé	<b>M2</b> Mlékárna pasterizované
<b>KS1T</b> Kozí čerstvé s takadiastázou	<b>H1T</b> Holštýnské čerstvé s takadiastázou
<b>KP1T</b> Kozí pasterizované s takadiastázou	<b>H2T</b> Holštýnské čerstvé s takadiastázou
<b>KP2T</b> Kozí pasterizované s takadiastázou	<b>C1T</b> ČESTR čerstvé s takadiastázou
<b>OS1T</b> Ovčí čerstvé s takadiastázou	<b>C2T</b> ČESTR čerstvé s takadiastázou
<b>OS2T</b> Ovčí čerstvé s takadiastázou	<b>J1T</b> Jersey čerstvé s takadiastázou
<b>OP1T</b> Ovčí pasterizované s takadiastázou	<b>J2T</b> Jersey čerstvé s takadiastázou
<b>OP2T</b> Ovčí pasterizované s takadiastázou	<b>O1T</b> Ovčí pasterizované s takadiastázou
<b>MS1T</b> Mlékárna čerstvé s takadiastázou	<b>O2T</b> Ovčí pasterizované s takadiastázou
<b>MS2T</b> Mlékárna čerstvé s takadiastázou	<b>M1T</b> Mlékárna pasterizované s takadiastázou
<b>MS3T</b> Mlékárna čerstvé s takadiastázou	<b>M2T</b> Mlékárna pasterizované s takadiastázou
<b>J1*</b> Jersey komerční	<b>PRa</b> Prvotelky
<b>J2*</b> Jersey komerční	<b>PRb</b> Prvotelky
<b>C1</b> ČESTR čerstvé	<b>PRTa</b> Prvotelky s takadiastázou
<b>C2</b> ČESTR čerstvé	<b>PRTb</b> Prvotelky s takadiastázou
<b>1a</b> Rozdoj	<b>OLa</b> Olma
<b>1b</b> Rozdoj	<b>OLb</b> Olma
<b>2a</b> Vrchol	<b>OLTa</b> Olma s takadiastázou
<b>2b</b> Vrchol	<b>OLTb</b> Olma s takadiastázou
<b>3a</b> Konec	<b>MAa</b> Madeta
<b>3b</b> Konec	<b>MAb</b> Madeta
<b>JT1*</b> Jersey komerční s takadiastázou	<b>MATa</b> Madeta s takadiastázou
<b>JT2*</b> Jersey komerční s takadiastázou	<b>MATb</b> Madeta s takadiastázou
<b>CT1</b> ČESTR čerstvé s takadiastázou	<b>HAa</b> Dr. Halíř



<b>CT2</b>	ČESTR čerstvé s takadiastázou	<b>HAb</b>	Dr. Halíř
<b>1Ta</b>	Rozdoj s takadiastázou	<b>HATa</b>	Dr. Halíř s takadiastázou
<b>1Tb</b>	Rozdoj s takadiastázou	<b>HATb</b>	Dr. Halíř s takadiastázou
<b>2Ta</b>	Vrchol s takadiastázou	<b>BOa</b>	Bohemilk
<b>2Tb</b>	Vrchol s takadiastázou	<b>BOb</b>	Bohemilk
<b>3Ta</b>	Konec s takadiastázou	<b>BOTa</b>	Bohemilk s takadiastázou
<b>3Tb</b>	Konec s takadiastázou	<b>BOTb</b>	Bohemilk s takadiastázou
<b>P1</b>	Prvotelky	<b>O</b>	Ovčí kysané pasterizované
<b>P2</b>	Prvotelky	<b>OK</b>	Ovčí kysané pasterizované
<b>H1</b>	Holštýnské čerstvé	<b>K</b>	Kozí pasterizované
<b>H2</b>	Holštýnské čerstvé	<b>KK</b>	Kozí pasterizované
<b>R1</b>	Rozdoj	<b>M</b>	Mlékárna čerstvé
<b>R2</b>	Rozdoj	<b>MK</b>	Mlékárna čerstvé
<b>V1</b>	Vrchol	<b>MP</b>	Mlékárna pasterizované
<b>V2</b>	Vrchol	<b>MPK</b>	Mlékárna pasterizované
<b>K1</b>	Konec	<b>S</b>	Kravské čerstvé z malochovu
<b>K2</b>	Konec	<b>SK</b>	Kravské čerstvé z malochovu Ovčí kysané pasterizované s takadiastázou
<b>PT1</b>	Prvotelky s takadiastázou	<b>OT</b>	Ovčí kysané pasterizované s takadiastázou
<b>PT2</b>	Prvotelky s takadiastázou	<b>OTK</b>	Ovčí kysané pasterizované s takadiastázou
<b>HT1</b>	Holštýnské čerstvé s takadiastázou	<b>KT</b>	Kozí pasterizované s takadiastázou
<b>HT2</b>	Holštýnské čerstvé s takadiastázou	<b>KTK</b>	Kozí pasterizované s takadiastázou
<b>RT1</b>	Rozdoj s takadiastázou	<b>MT</b>	Mlékárna čerstvé s takadiastázou
<b>RT2</b>	Rozdoj s takadiastázou	<b>MTK</b>	Mlékárna čerstvé s takadiastázou
<b>VT1</b>	Vrchol s takadiastázou	<b>MPT</b>	Mlékárna pasterizované s takadiastázou
<b>VT2</b>	Vrchol s takadiastázou	<b>MPKT</b>	Mlékárna pasterizované s takadiastázou Kravské čerstvé z malochovu s takadiastázou
<b>KT1</b>	Konec s takadiastázou	<b>ST</b>	Kravské čerstvé z malochovu s takadiastázou
<b>KT2</b>	Konec s takadiastázou	<b>SKT</b>	Kravské čerstvé z malochovu s takadiastázou
<b>1</b>	Olma	<b>1T</b>	Olma s takadiastázou
<b>1K</b>	Olma	<b>1TK</b>	Olma s takadiastázou
<b>2</b>	Madeta	<b>2K</b>	Madeta s takadiastázou
<b>2K</b>	Madeta	<b>2TK</b>	Madeta s takadiastázou
<b>3</b>	Bohemilk	<b>3T</b>	Bohemilk s takadiastázou
<b>3K</b>	Bohemilk	<b>3TK</b>	Bohemilk s takadiastázou
<b>4</b>	Olma Bio	<b>4T</b>	Olma Bio s takadiastázou
<b>4K</b>	Olma Bio	<b>4TK</b>	Olma Bio s takadiastázou
<b>5</b>	Kozí pultové UHT	<b>5T</b>	Kozí pultové UHT s takadiastázou
<b>5K</b>	Kozí pultové UHT	<b>5TK</b>	Kozí pultové UHT s takadiastázou

Tabulka 2: Časový harmonogram jednotlivých měření v roce 2017 a 2018

	9.10.2017	10.10.2017	18.12.2017	19.12.2017	10.1.2018	18.3.2018	19.3.2018
KS1	H1	J1 *	PRa	P1	O	1	
KS2	H2	J2 *	PRb	P2	OK	1K	
KS3	C1	C1	PRTa	H1	K	2	
KP1	C2	C2	PRTb	H2	KK	2K	
KP2	J1	1a	OLa	R1	M	3	
OS1	J2	1b	OLb	R2	MK	3K	
OS2	O1	2a	OLTa	V1	MP	4	
OP1	O2	2b	OLTb	V2	MPK	4K	
OP2	M1	3a	MAa	K1	S	5	
MS2	M2	3b	MAb	K2	SK	5K	
KS1T	H1T	JT1 *	MATa	PT1	OT	1T	
KP1T	H2T	JT2 *	MATb	PT2	OTK	1TK	
KP2T	C1T	CT1	HAa	HT1	KT	2K	
OS1T	C2T	CT2	HAb	HT2	KTK	2TK	
OS2T	J1T	1Ta	HATa	RT1	MT	3T	
OP1T	J2T	1Tb	HATb	RT2	MTK	3TK	
OP2T	O1T	2Ta	BOa	VT1	MPT	4T	
MS1T	O2T	2Tb	BOb	VT2	MPKT	4TK	
MS2T	M1T	3Ta	BOTa	KT1	ST	5T	
MS3T	M2T	3Tb	BOTb	KT2	SKT	5TK	

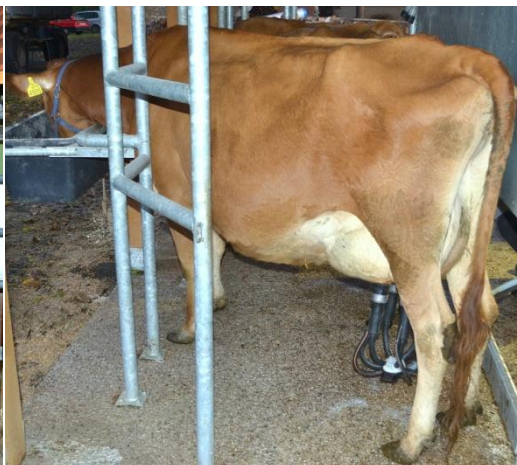
#### Příloha 4: Jerseyký skot na farmě Tehov

Na obrázku 1 patrná dojírna pro 3 dojnice a obrázek 2 ukazuje detail dojení.

Obrázek 1



Obrázek 2



## Příloha 5: Přehled analyzovaného mléka různých komerčních značek

Obrázky 1, 2 a 3 zobrazují jednotlivé typy analyzovaného komerčního mléka.

Obrázek 1 (Polotučná mléka zleva Madeta, Dr. Halíř, Olma a Bohemilk)



Obrázek 2: Olma Bio

Obrázek 3: Tesco finest



## Příloha 6: Kozí a ovčí mléka farmy Pěččín a kozí mléko komerční zahraniční

Na obrázcích 1 a 2 jsou bio mléka ovčí a kozí jako produkty farmy Pěččín. Na obrázku 3 je analyzované mléko kozí holandské UHT.

Obrázek 1: Vlevo Pěččínská ovčí zínčice, vpravo kozí pasterizované mléko.



Obrázek 2: Kozí pasterizované mléko

Obrázek 3: Kozí holandské UHT mléko



## Příloha 7: Dojnice dle fází laktace a termínu analýzy

Porovnání různých fází laktace u dojnic plemene ČESTR proběhlo v prosinci s opakováním v lednu. Vždy bylo odebráno směsné mléko od vybraných 20 dojnic v příslušné fázi laktace. Charakteristiky jednotlivých skupin uvádí následující tabulka 1, 2 a 3.

Tabulka 1: 20 dojnic v rozdoji v měsíci prosinec 2017 a leden 2018

PROSINEC			LEDEN		
ROZDOJ	Den po otelení	Laktace	ROZDOJ	Den po otelení	Laktace
kráva	10	4	kráva	8	5
kráva	11	3	kráva	10	3
kráva	12	5	kráva	13	3
kráva	14	5	kráva	13	3
kráva	14	5	kráva	15	4
kráva	14	4	kráva	16	5
kráva	15	3	kráva	16	4
kráva	17	5	kráva	18	4
kráva	18	3	kráva	18	3
kráva	18	3	kráva	19	5
kráva	21	4	kráva	20	3
kráva	22	4	kráva	20	5
kráva	23	5	kráva	23	4
kráva	26	5	kráva	28	3
kráva	26	3	kráva	29	3
kráva	27	3	kráva	31	5
kráva	28	3	kráva	32	3
kráva	30	3	kráva	33	4
kráva	33	5	kráva	33	3
kráva	39	4	kráva	38	5

Tabulka 2: 20 dojnic na vrcholu laktace v měsíci prosinec 2017 a leden 2018

PROSINEC			LEDEN		
VRCHOL	Den po otelení	Laktace	VRCHOL	Den po otelení	Laktace
kráva	88	4	kráva	78	5
kráva	88	5	kráva	89	4
kráva	92	3	kráva	89	4
kráva	94	4	kráva	90	4
kráva	99	3	kráva	91	5
kráva	100	5	kráva	95	3
kráva	102	4	kráva	94	4
kráva	102	3	kráva	100	3
kráva	102	3	kráva	101	5
kráva	106	3	kráva	101	5
kráva	111	3	kráva	108	3
kráva	113	4	kráva	109	4
kráva	113	3	kráva	112	4
kráva	115	4	kráva	114	5
kráva	120	4	kráva	115	3
kráva	120	3	kráva	118	3
kráva	121	4	kráva	120	4
kráva	121	5	kráva	126	3
kráva	123	4	kráva	126	5
kráva	125	3	kráva	127	5

Tabulka 1: 20 dojnic na konci laktace v měsíci prosinec 2017 a leden 2018

PROSINEC			LEDEN		
KONEC	Den po otelení	Laktace	KONEC	Den po otelení	Laktace
kráva	252	4	kráva	249	5
kráva	253	5	kráva	250	3
kráva	255	4	kráva	250	3
kráva	255	3	kráva	261	5
kráva	255	5	kráva	262	3
kráva	255	3	kráva	263	4
kráva	257	4	kráva	266	5
kráva	258	5	kráva	267	3
kráva	263	3	kráva	271	3
kráva	264	3	kráva	271	5
kráva	264	4	kráva	274	3
kráva	265	3	kráva	279	5
kráva	272	3	kráva	279	4
kráva	273	4	kráva	286	3
kráva	274	4	kráva	289	5
kráva	280	3	kráva	290	4
kráva	281	3	kráva	294	5
kráva	287	5	kráva	299	5
kráva	298	5	kráva	300	3
kráva	307	3	kráva	302	4

## Příloha 8: Statistické zhodnocení rozdílu obsahu vitaminů C a B2 u různých hospodářských zvířat

Úkolem následujícího statistického šetření je zjištění, zda li existují statisticky významné rozdíly mezi porovnávanými vzorky kravského, a ovčího mléka z kapitoly 5.5. Vstupními hodnotami jsou údaje z tabulky 8.

Pro vyhodnocení obsahu vitaminů B2 a C v kravském, ovčím a kozím mléce byla použita analýza rozptylu (ANOVA) s interakcemi. Závisle proměnnou je zde naměřená hodnota vitamínu a nezávislými kategoriálními proměnnými je vitamin a druh mléka. Testovaným efektem je zde vitamin, druh mléka a interakce mléka + vitamin. Testování bylo provedeno na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

### H0: Střední hodnoty jednotlivých skupin se rovnají.

Tabulka 1: ANOVA (StatSoft, 2013)

Efekt	Jednorozměrné testy významnosti pro Obsah vitamínu				
	SČ	Stupně volnosti	PČ	F	p
Vitamin	18,82362	3	6,27454	344,102	0,000000
Druh mléka	5,71639	2	2,85820	156,746	0,000000
Vitamin*Druh mléka	5,29649	6	0,88275	48,411	0,000000
Chyba	0,21881	12	0,01823		

SČ - střední čtverec, PČ - průměrný čtverec, F - testovací kritérium pro testování rozptylu

p - hodnota  $< \alpha = 0,05$

**Zamítám H0 na hladině významnosti 0,05.**

Bylo zjištěno, že existuje statisticky významný rozdíl mezi středními hodnotami jednotlivých skupin. Následně tedy bylo nutné zjistit, mezi kterými skupinami je statisticky významný rozdíl.

Pro další statistické šetření byla zvolena robustní metoda mnohonásobného porovnávání - Scheffého metoda. Na základě této metody bychom měli zjistit mezi kterými uvažovanými skupinami existuje statisticky významný rozdíl.

**H0: Střední hodnoty jednotlivých skupin se rovnají.**

Testování bylo provedeno na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .



Tabulka 2: Scheffého test (StatSoft, 2013)

Č. buňky	Vitamin	Druh mléka	Scheffeho test; proměnná Hodnota (Valenta edit.) Pravděpodobnosti pro post-hoc testy Chyba: meziskup. PČ = ,01823, sv = 12,000											
			{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}
			1,0825	3,5869	1,2127	1,0161	2,6774	2,1791	,11143	,36057	,07580	,12398	,33295	,12263
1	C	Kravné mléko		0,0000	0,9999	1,0000	0,0001	0,0022	0,0064	0,0578	0,0047	0,0072	0,0453	0,0071
2	C	Ovčí mléko	0,0000		0,0000	0,0000	0,0110	0,0002	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
3	C	Kozí mléko	0,9999	0,0000		0,9948	0,0001	0,0067	0,0021	0,0182	0,0016	0,0024	0,0142	0,0024
4	C+T	Kravné mléko	1,0000	0,0000	0,9948		0,0000	0,0013	0,0114	0,1031	0,0084	0,0128	0,0812	0,0126
5	C+T	Ovčí mléko	0,0001	0,0110	0,0001	0,0000		0,3586	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
6	C+T	Kozí mléko	0,0022	0,0002	0,0067	0,0013	0,3586		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
7	B2	Kravné mléko	0,0064	0,0000	0,0021	0,0114	0,0000	0,0000		0,9693	1,0000	1,0000	0,9868	1,0000
8	B2	Ovčí mléko	0,0578	0,0000	0,0182	0,1031	0,0000	0,0000	0,9693		0,9278	0,9786	1,0000	0,9777
9	B2	Kozí mléko	0,0047	0,0000	0,0016	0,0084	0,0000	0,0000	1,0000	0,9278		1,0000	0,9620	1,0000
10	B2 + T	Kravné mléko	0,0072	0,0000	0,0024	0,0128	0,0000	0,0000	1,0000	0,9786	1,0000		0,9916	1,0000
11	B2 + T	Ovčí mléko	0,0453	0,0000	0,0142	0,0812	0,0000	0,0000	0,9868	1,0000	0,9620	0,9916		0,9911
12	B2 + T	Kozí mléko	0,0071	0,0000	0,0024	0,0126	0,0000	0,0000	1,0000	0,9777	1,0000	1,0000	0,9911	

\* diagonála ukazuje rozhraní, kde by se porovnávaly stejné vzorky mezi sebou

Tabulka ukazuje p - hodnoty

červeně označené p hodnoty <  $\alpha = 0,05$

- 1 C Kravné mléko
- 2 C Ovčí mléko
- 3 C Kozí mléko
- 4 C+T Kravné mléko
- 5 C+T Ovčí mléko
- 6 C+T Kozí mléko
- 7 B2 Kravné mléko
- 8 B2 Ovčí mléko
- 9 B2 Kozí mléko
- 10 B2 + T Kravné mléko
- 11 B2 + T Ovčí mléko
- 12 B2 + T Kozí mléko

Tabulka 3: Přehled zamítnutí nebo potvrzení nulové hypotézy (StatSoft, 2013)

Zam. H0?	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		Ano	Ne	Ne	Ano	Ano	Ano	Ne	Ano	Ano	Ano	Ano
2	Ano		Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano
3	Ne	Ano		Ne	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano
4	Ne	Ano	Ne		Ano	Ano	Ano	Ne	Ano	Ano	Ne	Ano
5	Ano	Ano	Ano	Ano		Ne	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano
6	Ano	Ano	Ano	Ano	Ne		Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano
7	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano		Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
8	Ne	Ano	Ano	Ne	Ano	Ano	Ne		Ne	Ne	Ne	Ne
8	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ne	Ne		Ne	Ne	Ne
10	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ne	Ne	Ne		Ne	Ne
11	Ano	Ano	Ano	Ne	Ano	Ano	Ne	Ne	Ne	Ne		Ne
12	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	

Výše uvedené statistické šetření potvrdilo statisticky významný rozdíl v obsahu sledovaných vitaminů bez a s takadiastázou v ovčím mléce oproti mléku kravskému a kozímu, zároveň je statisticky potvrzen vyšší obsah vitamínu C bez a s takadiastázou oproti mléku kravskému.

## **Příloha 9: Statistické zhodnocení rozdílu obsahu vitaminů u vzorků s použitým enzymem takadiastáza oproti vzorkům bez použití takadiastázy**

Ze souboru 140 analyzovaných vzorků byly vybrány vzorky s naměřenými hodnotami obsahu vitaminů C, B2, B3 a B6. Tyto vzorky byly rozděleny do dvou skupin s ohledem na to, zdali u nich byl použitý enzym takadiastáza v průběhu přípravy vzorků pro chromatografickou analýzu. Stanovení všech vitaminů se nepovedlo ve všech vzorcích, tak jsou spolu porovnávány pouze vzorky bez a s enzymem 4 vybraných vitaminů, u kterých se povedlo obsah kvantifikovat.

Nejprve bylo nutné základní souhrnné statistické šetření pro zhodnocení využití dalšího vhodného testování pro větší množství různých typů vzorků. Souhrnnou obecnou statistiku uvádí tabulka 1.

Tabulka 1: Obecné souhrnné statistické šetření pro všechny hodnoty vybraných vzorků bez enzymu a s enzymem takadiastáza (StatSoft, 2013)

Proměnná	Popisné statistiky: Obsah vybraných vitaminů s a bez použití enzymu takatáza								
	N		Min.	Max.	Q1	Q2	Q3	S <sup>2</sup>	S
<b>vit. C</b>	66	0,8036	0,0205	3,9044	0,1971	0,8103	1,1075	0,5124	0,7158
<b>vit. C t</b>	65	1,0016	0,0088	2,7122	0,3887	0,8726	1,4359	0,4977	0,7055
<b>vit. B2</b>	68	0,1231	0,0433	0,3843	0,0926	0,1126	0,1341	0,0039	0,0627
<b>vit. B2 t</b>	68	0,1412	0,0874	0,3439	0,1168	0,1264	0,1415	0,0027	0,0521
<b>vit. B3</b>	58	0,0399	0,0045	0,3801	0,0146	0,0187	0,0235	0,0063	0,0793
<b>vit. B3 t</b>	60	0,1636	0,0061	0,8920	0,0194	0,0253	0,0365	0,0805	0,2837
<b>vit. B6</b>	55	0,0771	0,0024	0,1346	0,0715	0,0799	0,0882	0,0005	0,0229
<b>vit. B6 t</b>	68	0,0890	0,0080	0,1681	0,0842	0,0992	0,1132	0,0013	0,0366

N počet skutečných pozorování

$\bar{x}$  průměrná hodnota

Q1 hodnota dolního kvartilu

Q2 je medián

Q3 hodnota horního kvartilu,

$S^2$  je rozptyl a  $S$  směrodatná odchylka.

Pro další testování bylo potřeba zjistit, jestli hodnoty pocházejí z normálního rozdělení, k tomuto účelu byl použit Shapirův-Wilkův test pro testování normality dat.

Kde obecně platí:

**H0: Data pocházejí z normálního rozdělení.**

**H1: Data pocházejí z jiného než normálního rozdělení.**

Výsledky testování znázorňuje tabulka a doplňující grafy znázorňující histogramy proložené křivkou normálního rozdělení.

H0(1): Hodnoty obsahu vitamínu C vykazují normální rozdělení.

H0(2) Hodnoty obsahu vitamínu C s přidavkem enzymu taktádiastáza vykazují normální rozdělení.

H0(3) Hodnoty obsahu vitamínu B2 vykazují normální rozdělení.

H0(4) Hodnoty obsahu vitamínu B2 s přidavkem enzymu taktádiastáza vykazují normální rozdělení.

H0(5): Hodnoty obsahu vitamínu B3 vykazují normální rozdělení.

H0(6) Hodnoty obsahu vitamínu B3 s přidavkem enzymu taktádiastáza vykazují normální rozdělení.

H0(7) Hodnoty obsahu vitamínu B6 vykazují normální rozdělení.

H0(8) Hodnoty obsahu vitamínu B6 s přidavkem enzymu taktádiastáza vykazují normální rozdělení.

Testování probíhá na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$

Rozhodnutí o zamítnutí nulové hypotézy vyplývá ze vztahu :

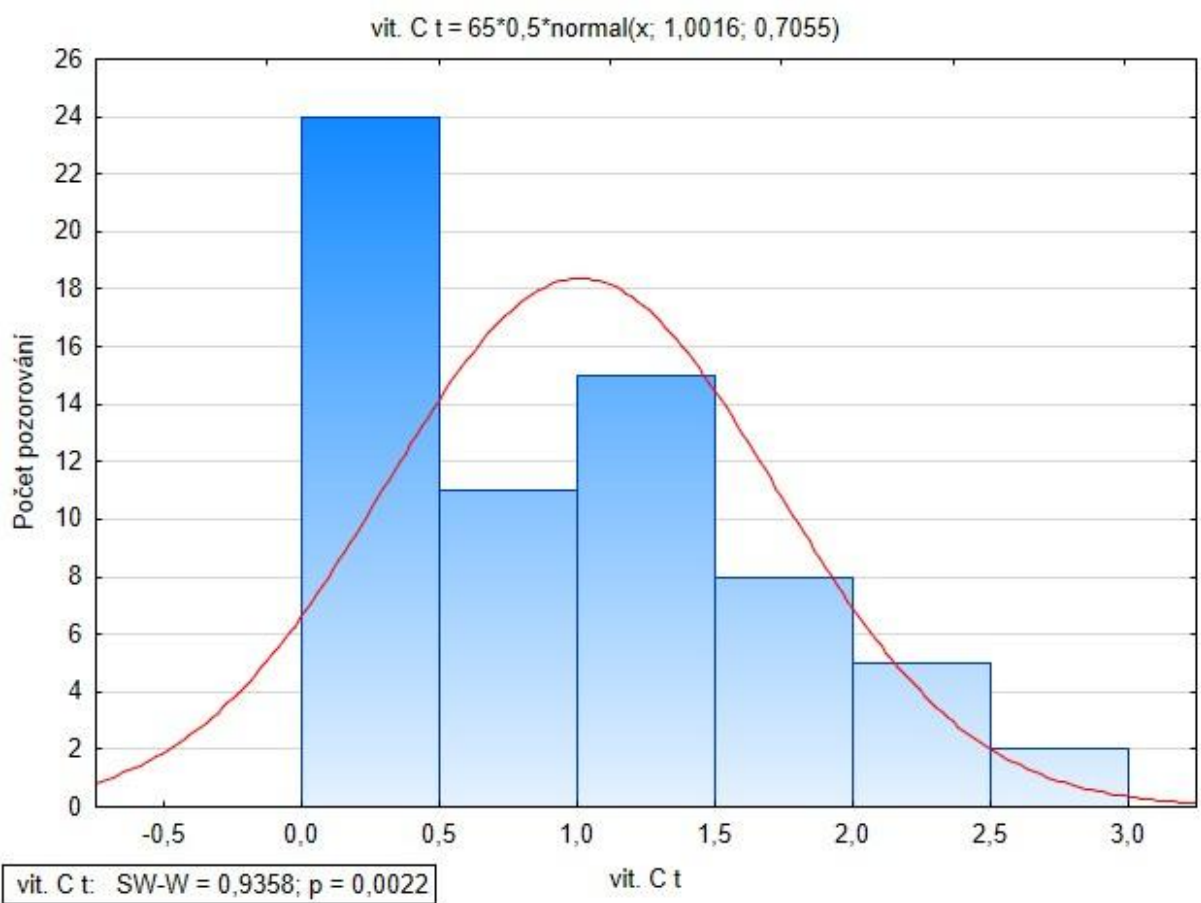
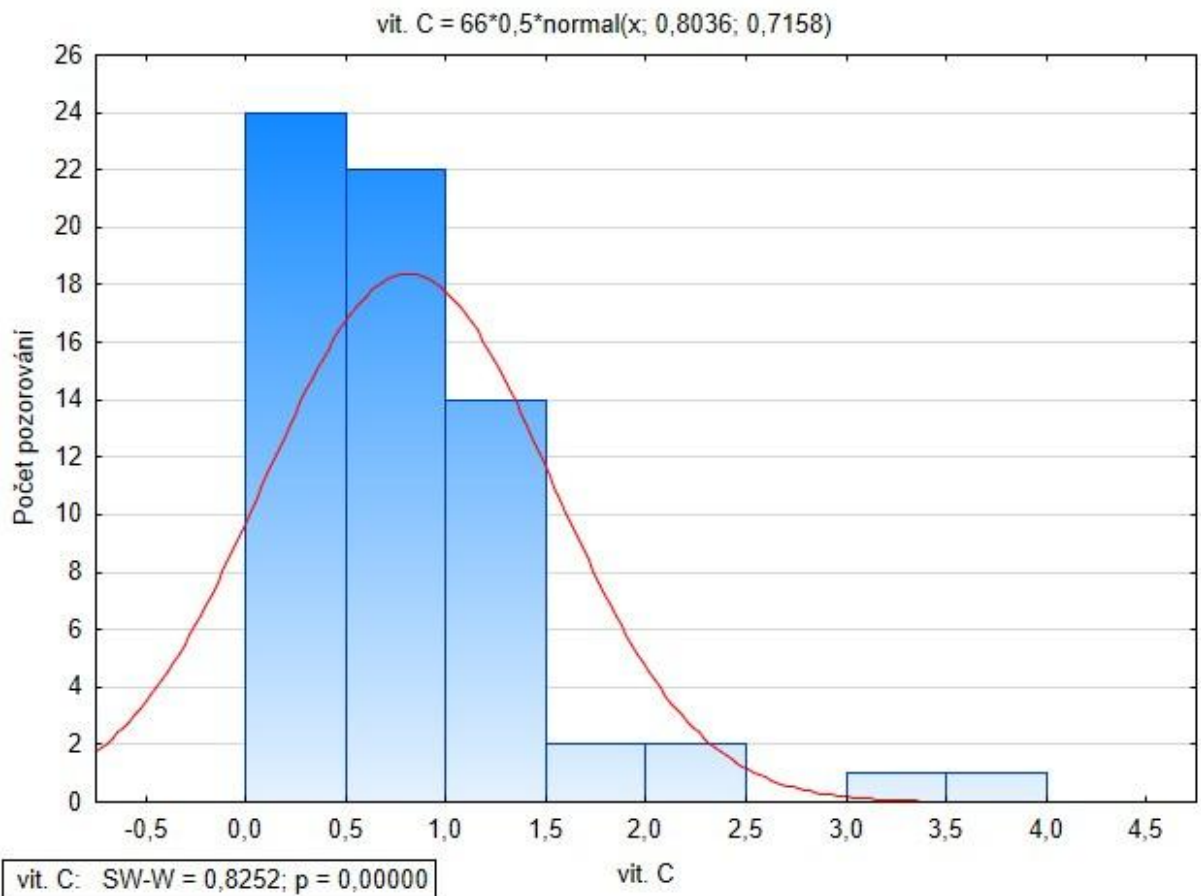
$p - \text{hodnota} > \alpha$  Nelze zamítnout nulovou hypotézu na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

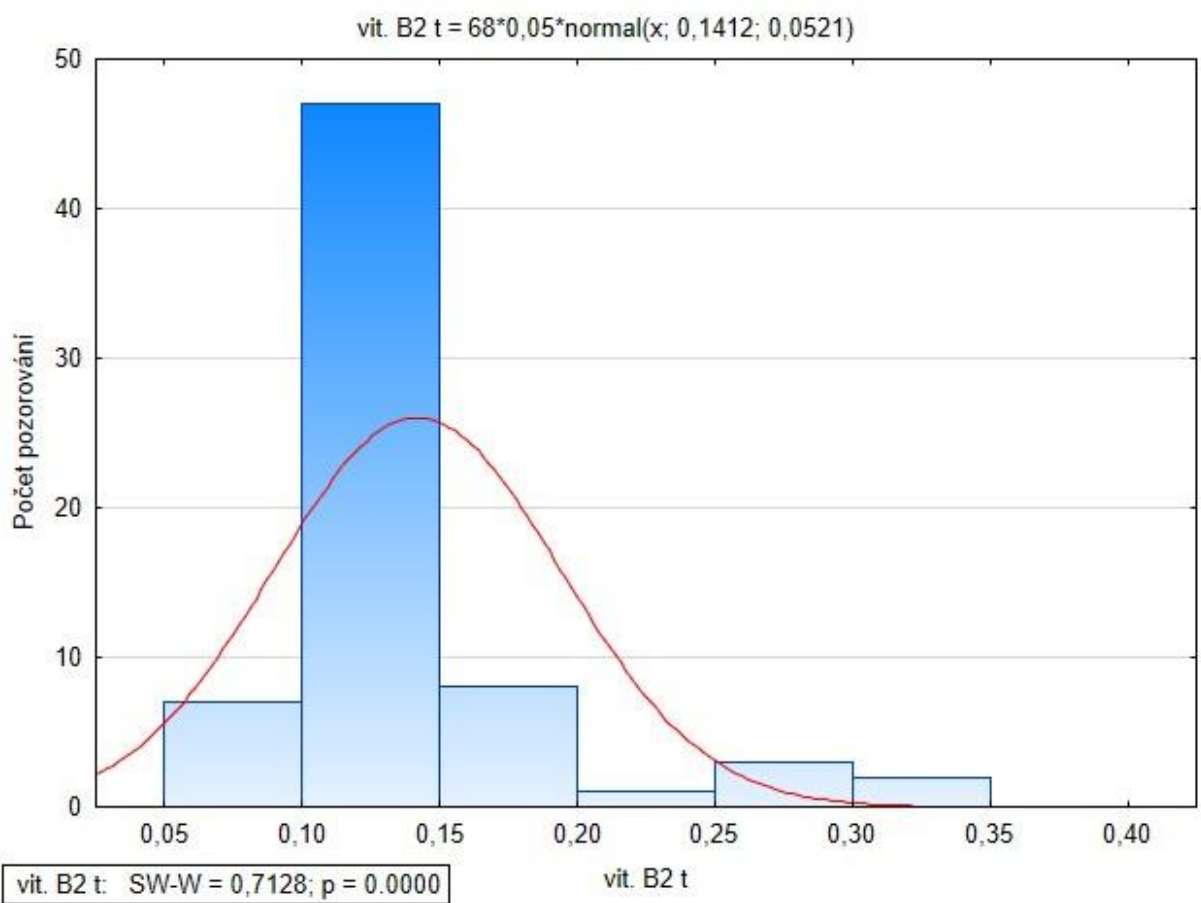
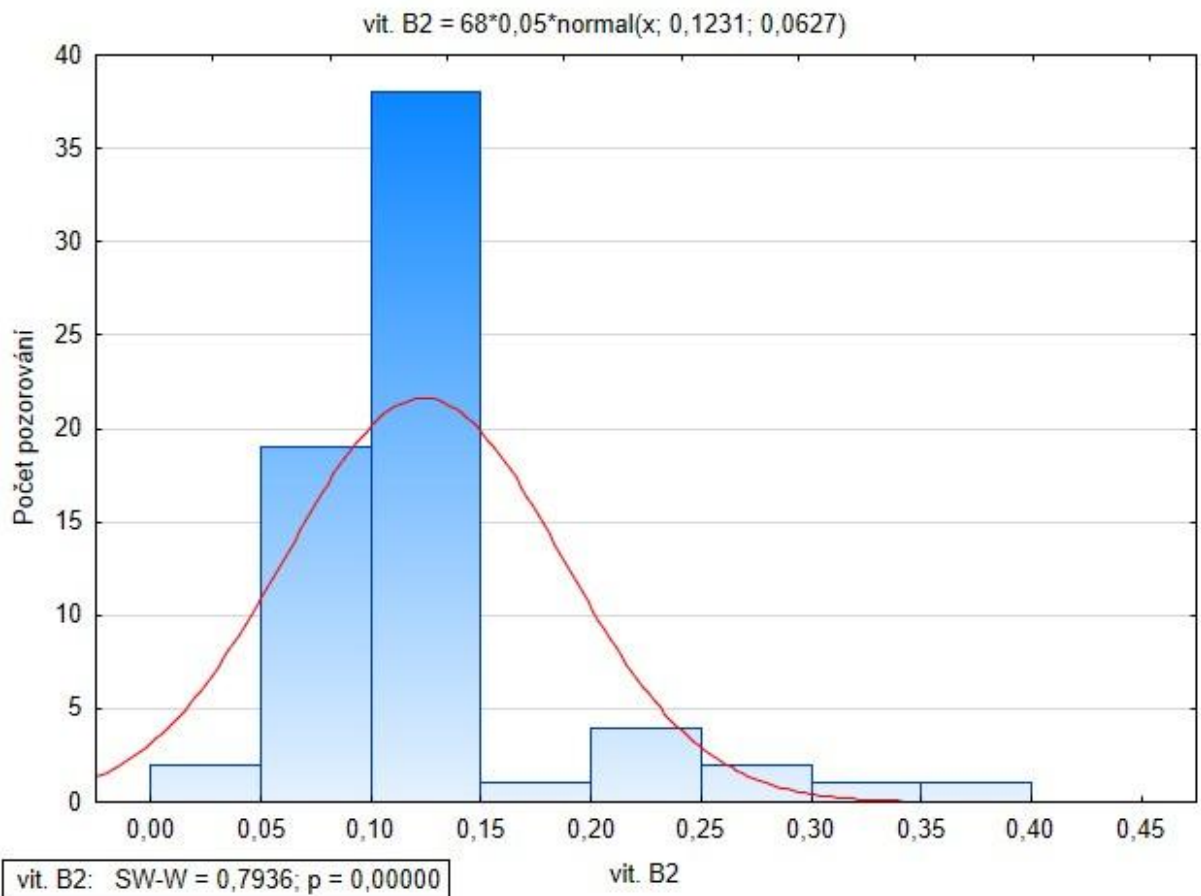
$p - \text{hodnota} < \alpha$  zamítáme nulovou hypotézu na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

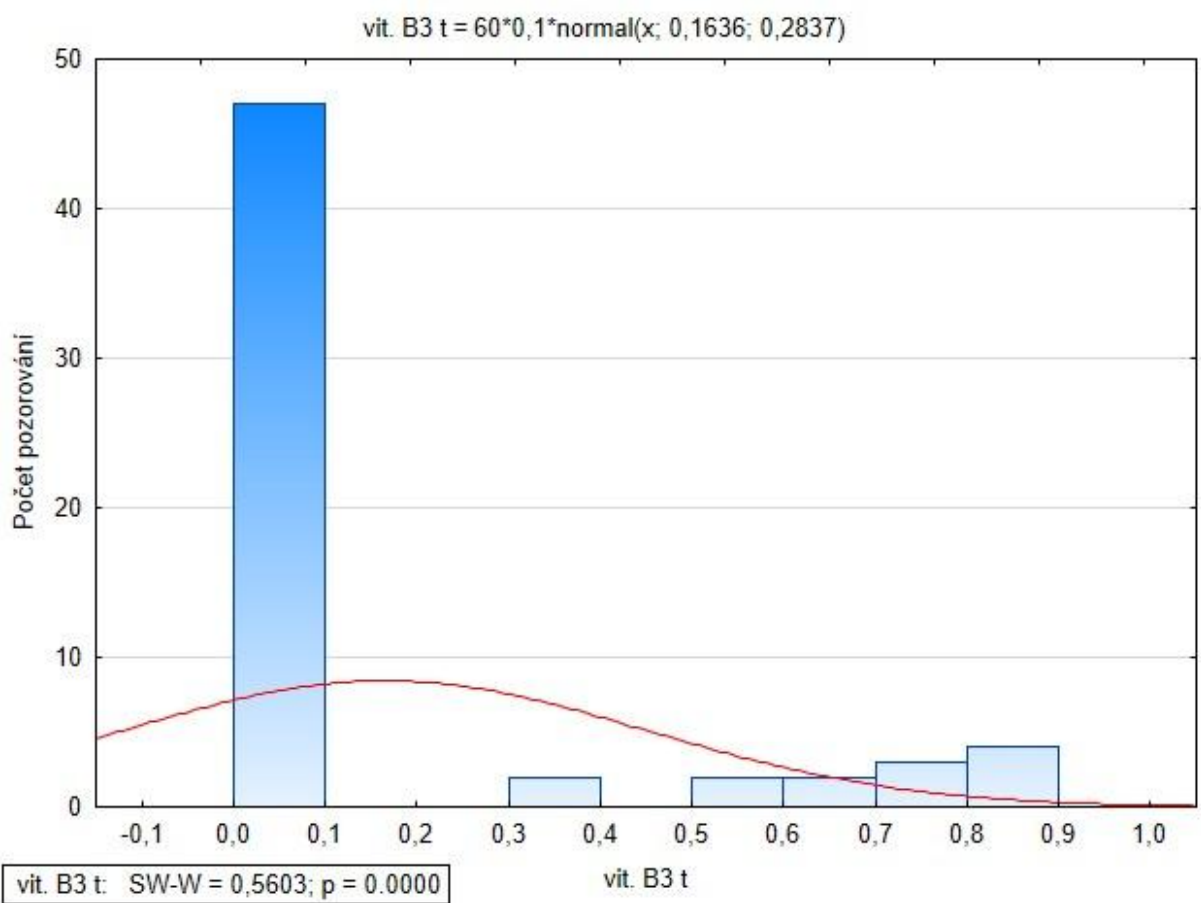
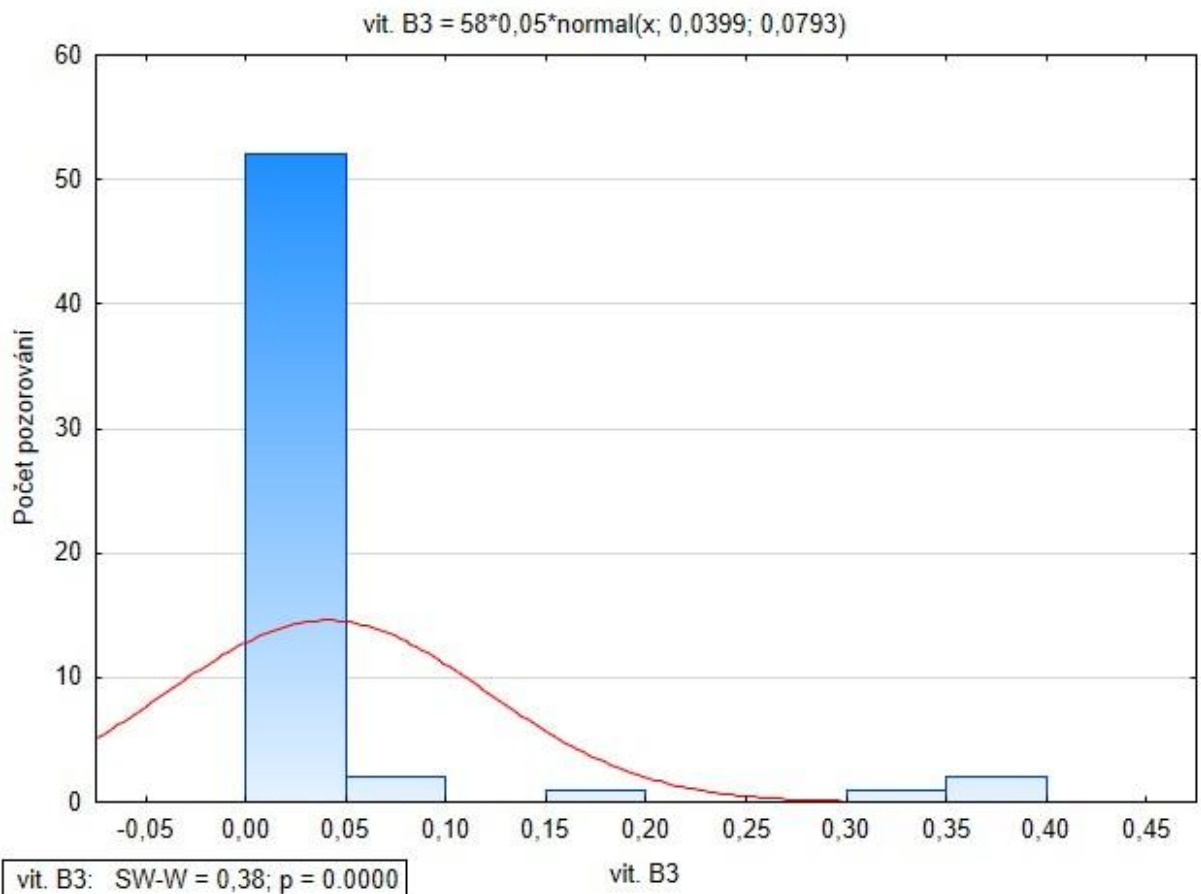
Tabulka XY – P-hodnoty pro Shapirův - Wilkův test normality dat

<b>Proměnná</b>	<b>p – hodnota Shapiro Wilkův test</b>	<b>H0 zamítnuto?</b>
<b>Vitamin C</b>	<b>0,0000</b>	Ano
<b>Vitamin C + takatáza</b>	<b>0,0022</b>	Ano
<b>Vitamin B2</b>	<b>0,0000</b>	Ano
<b>Vitamin B2 + takatáza</b>	<b>0,0000</b>	Ano
<b>Vitamin B3</b>	<b>0,0000</b>	Ano
<b>Vitamin B3 + takatáza</b>	<b>0,0000</b>	Ano
<b>Vitamin B6</b>	<b>0,0000</b>	Ano
<b>Vitamin B6 + takatáza</b>	<b>0,0000</b>	Ano

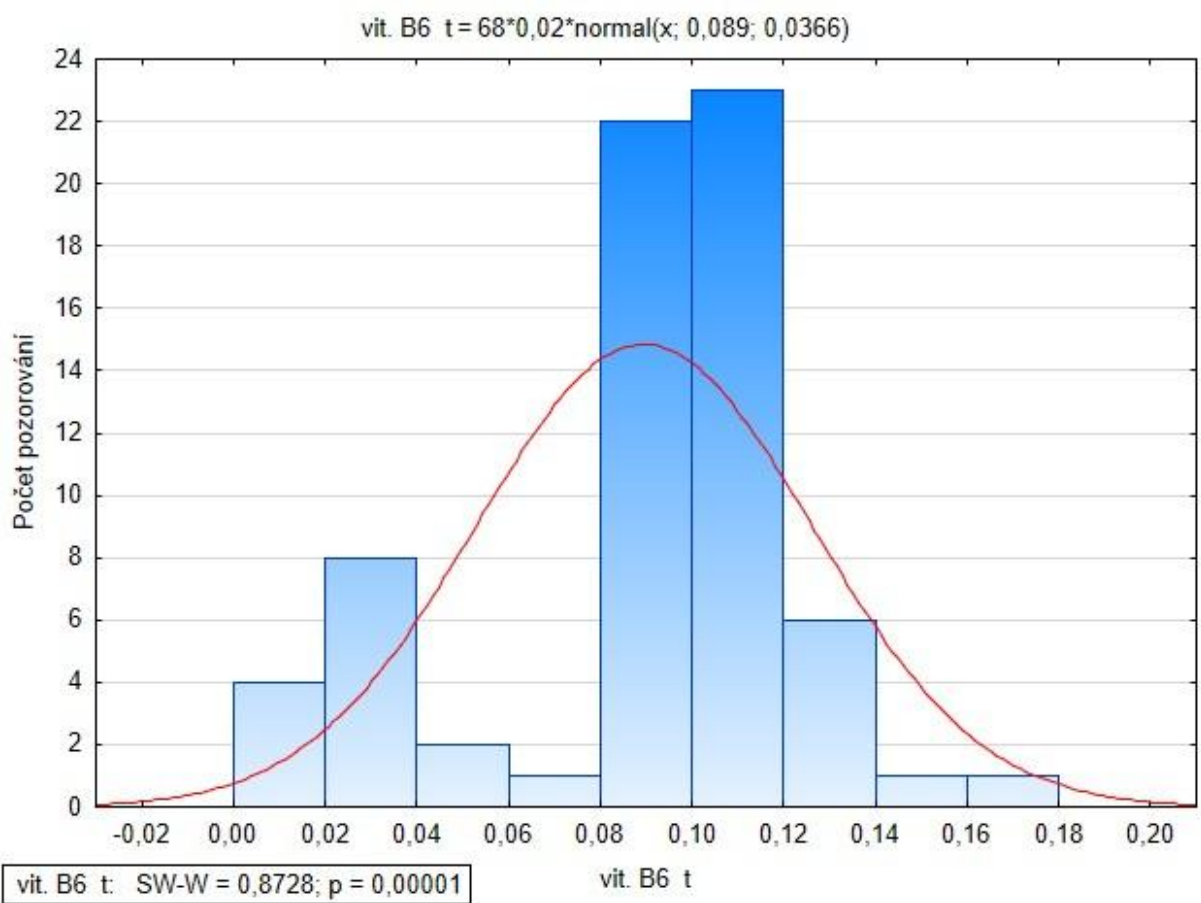
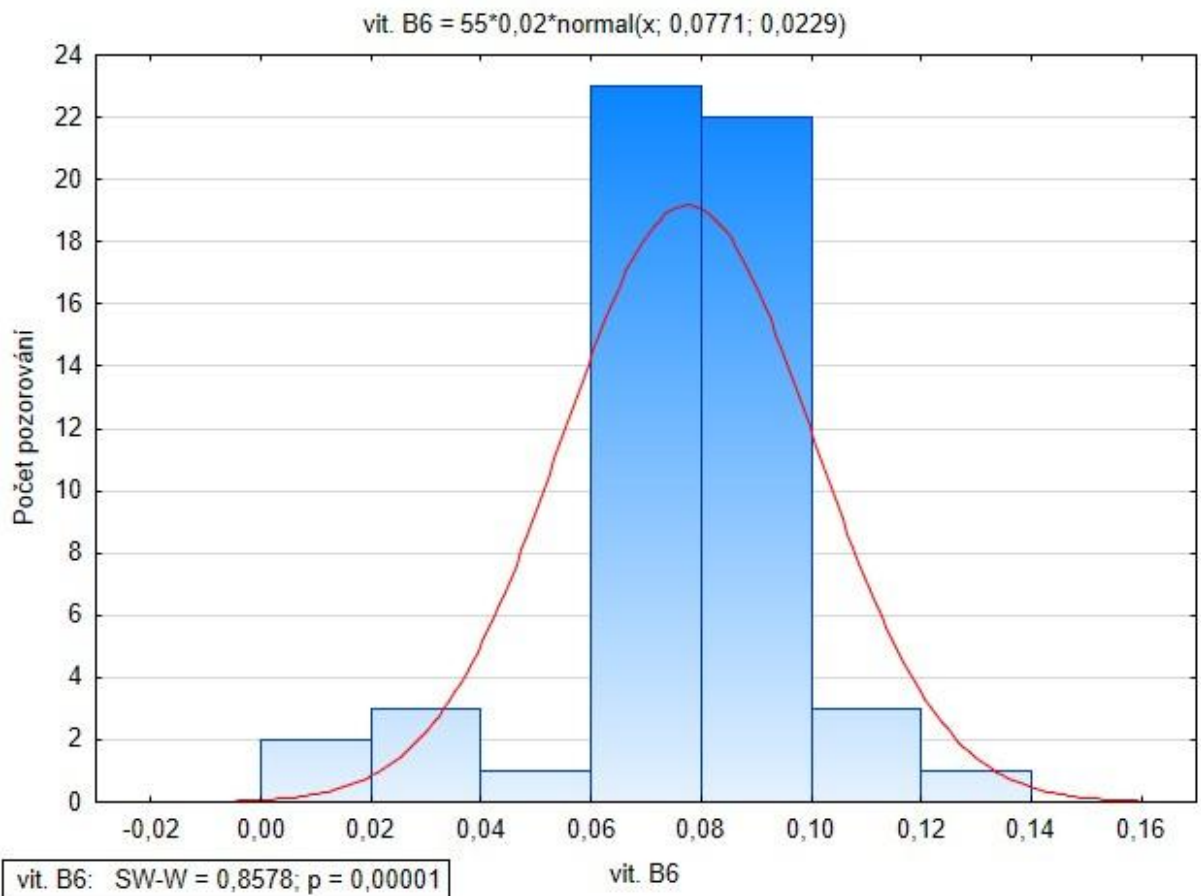
Data nepocházejí z normálního rozdělení.







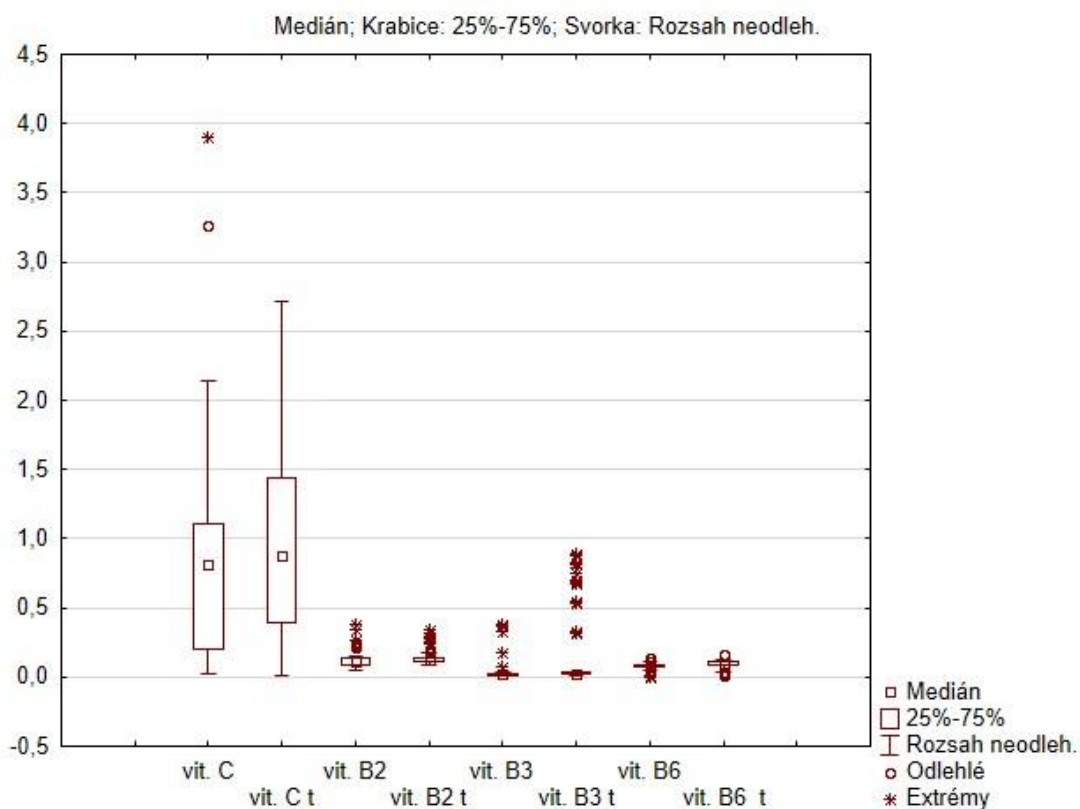




Z výše uvedeného testování je patrné, že se jedná o směs většího množství různých typů vzorků, které nevykazují hodnoty normální rozdělení. Taková skutečnost je patrná a dala se očekávat, a tak je zde toto šetření uvedeno jen pro ucelenost a přehlednost dané problematiky..

Z následujícího grafu znázorňujícím rozptyly hodnot lze předpokládat, že obsahy jednotlivých vitaminů vykazují nejednotnost dat. Lze vidět, že vyšších mediánů dosahuje obecně vitamin C, ostatní vitaminy vykazují o poznání nižší rozptyly hodnot. Vzhledem k tomu, že bylo zjištěno, že data nepocházejí z normálního rozdělení, nebyly porovnávány jejich střední hodnoty, ale pomocí neparametrického testování byla testována rozdělení jednotlivých veličin v závislosti na použití enzymu takadiastáza.

Boxplot rozptylu hodnot (StatSoft, 2013).



Pro obecné porovnání různých typů vzorků, které byly připravovány bez enzymu s těmi s enzymem, bylo nutné zvolit neparametrickou verzi párového t-testu (tabulka 2).

Wilcoxonův test je neparametrickou obdobou párového t-testu. Je založen na diferencích sledovaného znaku a následného výpočtu pořadí těchto diferencí.

Kde obecně platí:

**H0: Data pocházejí z konkrétního rozdělení**

**H1: Data nepocházejí z konkrétního rozdělení**

Nejprve se stanoví difference mezi proměnnými, kterým se následně přiřadí pořadí, kde  $S_w^+$  je součet pořadí přes kladné hodnoty a  $S_w^-$  součet pořadí přes záporné hodnoty. Následně je stanoveno testovací kritérium  $|U_w|$ , kde platí vztah:

$$U_w = \frac{S_w^+ - \frac{1}{4}n(n+1)}{\sqrt{\frac{1}{24}n(n+1)(2n+1)}}$$

Kde:

$S_w^+$  - součet pořadí přes kladné hodnoty

n – počet pozorování

H0(1): Neexistuje statisticky významný rozdíl v obsahu vitamínu C s použitím nebo bez použití enzymu takatáza

H0(2) Neexistuje statisticky významný rozdíl v obsahu vitamínu B2 s použitím nebo bez použití enzymu takatáza

H0(3) Neexistuje statisticky významný rozdíl v obsahu vitamínu B3 s použitím nebo bez použití enzymu takatáza

H0(4) Neexistuje statisticky významný rozdíl v obsahu vitamínu B6 s použitím nebo bez použití enzymu takatáza

Hypotézy jsou testovány na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Hladina významnosti představuje míru rizika zamítnutí nulové hypotézy, která platí.

Tabulka 2: Wilcoxonův párový test pro závislé vzorky (párové veličiny) (StatSoft, 2013 ).

Dvojice proměnných (vit. bez enzymu & vit. s enzymem)	Označené testy jsou významné na hladině $\alpha < 0,05000$				
	Počet platných	T	Z	p-hodn.	H0 zamítnuto?
vit. C & vit. C t	65	649,0000	2,767545	0,005648	Ano
vit. B2 & vit. B2 t	68	300,0000	5,334339	0,000000	Ano
vit. B3 & vit. B3 t	52	348,0000	3,105459	0,001900	Ano
vit. B6 & vit. B6 t	55	30,0000	6,200126	0,000000	Ano

První sloupec udává počet hodnot, se kterými se reálně pracuje . Druhý sloupec udává hodnotu testové statistiky  $\min(S_w^+, S_w^-)$ , třetí sloupec hodnotu statistiky  $|U_w|$ , čtvrtý p-hodnotu a pátý výsledek testování. Rozhodnutí o zamítnutí nulové hypotézy vyplývá ze vztahu :

$p - \text{hodnota} > \alpha$  Nelze zamítnout nulovou hypotézu na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

$p - \text{hodnota} < \alpha$  zamítáme nulovou hypotézu na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Z výsledků patrných z tabulky 2 vyplývá, že všechny p-hodnoty jsou nižší jak hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ , tak tedy můžeme zamítnout nulovou hypotézu. Existuje statisticky významný rozdíl mezi hodnotami měření daných vzorků bez a s enzymem takadiastáza.

## Příloha 10: Statistické zhodnocení rozdílu obsahu vitaminů u vzorků prvotetek a celého stáda dojnic

Pro analýzu bylo odebráno směsné mléko od 20 vybraných prvotetek na vrcholu laktace a pokus proveden dvakrát po sobě v různém období. Snahou bylo porovnání možnosti rozdílných hodnot obsahu vybraných vitaminů u prvotetek oproti směsnému mléku celého stáda.

V tomto statistickém šetření byly proti sobě postaveny hodnoty u vybraných vitaminů u prvotetek a u celého dojeného stáda. Po otestování normálního rozdělení hodnot bylo zjištěno normální rozdělení, tak byl zvolen dvouvýběrový test pro nezávislé vzorky (tabulka 1).

Tabulka 1: Dvouvýběrový test pro nezávislé vzorky (prvotelky vs. celé stádo) (StatSoft, 2013).

Skup. 1 vs. skup. 2	T-test pro nezávislé vzorky						
	Průměr skup. 1	Průměr skup. 2	Hodnota t	sv	p	F-poměr Rozptyly	p Rozptyly
P C vs. S C	1,003708	1,051400	-0,4112	6	<b>0,695222</b>	1,022	0,986214
P B2 vs. S B2	0,116967	0,131250	-1,8914	6	<b>0,107440</b>	6,967	0,145167
P B3 vs. S B3	0,047758	0,017450	1,9431	6	<b>0,100013</b>	26,442	<b>0,023359</b>
P B6 vs. S B6	0,074358	0,084950	-2,1906	4	<b>0,093632</b>	4,305	0,674390
P C T vs. S C enzym	<b>1,461733</b>	<b>0,867758</b>	<b>5,7188</b>	<b>6</b>	<b>0,001239</b>	<b>5,555</b>	<b>0,192762</b>
P B2 T vs. S B2 enzym	0,124917	0,131783	-0,9634	6	<b>0,372572</b>	5,114	0,213234
P B3 T vs. S B3 enzym	0,029417	0,026558	0,8718	6	<b>0,416845</b>	1,322	0,823916
P B6 T vs. S B6 enzym	0,099258	0,064142	1,6424	6	<b>0,151617</b>	35,434	0,015311

Není statisticky významný rozdíl mezi hodnotami prvotetek a stáda, p-hodnoty jsou vyšší než hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ .

Tabulka 2: Průměrné hodnoty vybraných vitaminů mg.100ml<sup>-1</sup>.

vzorek	vit. C	vit. B2	vit. B3	vit. B6	vit. C t	vit. B2 t	vit. B3 t	vit. B6 t
prvotelky	1,0037	0,1170	0,0478	0,0744	1,4617	0,1249	0,0294	0,0993
stádo	1,0514	0,1313	0,0175	0,0850	0,8678	0,1318	0,0266	0,0641

## 10. Seznam příloh

Příloha 1: Odstínění zkumavek alobalem během přípravy vzorků

Příloha 2: Odstředění, vymražení a filtrace vzorků

Příloha 3: Pracovní označení vzorků a časový harmonogram analýz

Příloha 4: Jerseyký skot na farmě Tehov

Příloha 5: Přehled analyzovaného mléka různých komerčních značek

Příloha 6: Kozí a ovčí mléka farmy Pěnčín a kozí mléko komerční zahraniční

Příloha 7: Dojnice dle fází laktace a termínu analýzy

Příloha 8: Statistické zhodnocení rozdílu obsahu vitaminů C a B2 u různých hospodářských zvířat

Příloha 9: Statistické zhodnocení rozdílu obsahu vitaminů u vzorků s použitým enzymem takadiastáza oproti vzorkům bez použití takadiastázy

Příloha 10: Statistické zhodnocení rozdílu obsahu vitaminů u vzorků prvotetek a celého stáda dojnic