

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2017

Bc. Veronika Kaňová



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM RŮZNÝCH METOD PŘÍPRAVY VZORKU MLÉKA PRO ANALÝZU MLÉKA TECHNIKOU ICP-OES

THE STUDY OF VARIOUS METHODS OF PREPARATION OF THE MILK SAMPLE FOR MILK ANALYSIS BY
ICP-OES TECHNIQUE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Veronika Kaňová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1040/2016
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Veronika Kaňová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Studium různých metod přípravy vzorku mléka pro analýzu mléka technikou ICP-OES

Zadání diplomové práce:

1. vypracování literární rešerše k tématu práce
2. příprava vzorku mléka různými postupy před analýzou makroprvků v mléce pomocí ICP-OES
3. zpracování naměřených výsledků
4. diskuse k naměřeným výsledkům

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Veronika Kaňová
student(ka)

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Teoretická část diplomové práce se věnuje chemickému složení kravského mléka, popisu vybraných metod přípravy vzorku a popisu používané techniky ICP-OES. Experimentální část je zaměřena na jednotlivé přípravy vzorků a analýzu vybraných prvků (Ca, Na, K a Mg).

Mléko je velice složitý polydisperzní systém a proto je jeho příprava vzorku velice důležitým krokem před samotným měřením. Při výběru metody úpravy vzorku se musí kromě správnosti a přesnosti zvážit i další důležité faktory, jako je čas, intenzita práce nebo náklady. V této práci bylo provedeno porovnání čtyř metod přípravy vzorku: přímá analýza mléka, mikrovlnný rozklad na mokré cestě, rozklad pomocí činidla Tritonu-X100 a pomocí činidla TMAH (tetramethylammonium hydroxid). Vybrané prvky byly následně analyzovány pomocí ICP-OES. Diplomová práce navazuje na bakalářskou práci, která se zabývala stejnou problematikou.

Výsledné koncentrace prvků jednotlivých úprav byly porovnány s certifikovanými hodnotami odtučněného sušeného mléka. Výsledky práce ukázaly, že nejvhodnější metodou pro přípravu vzorku mléka je metoda rozkladu pomocí činidla TMAH a následně metoda mikrovlnného rozkladu. U těchto metod se nejvíce podařilo odstranit vliv mléčné matrice, která při analýze způsobovala problémy. Metoda prostého ředění vzorku a rozklad pomocí činidla Tritonu-X100 vykazovaly větší odchylku měření, jelikož při analýze docházelo k větším ztrátám analytu díky tukovým složkám obsažených v mléce.

KLÍČOVÁ SLOVA

kravské mléko, příprava vzorku, elementární analýza, ICP-OES, minerální látky

ABSTRACT

The theoretical part of the thesis deals with the chemical composition of cow's milk, with the description of chosen methods of sample pretreatment and with the description of the used technique ICP-OES. The practical part is aimed at individual preparations of samples and at analysis of chosen chemical elements (Ca, Na, K and Mg).

Milk is a really complicated polydisperse system, that's the reason why the preparation of samples with milk is very important step before the measurement itself. In addition to accuracy choosing the sample adjustment method, other factors such as time, work intensity, or cost need to be considered when.

In the thesis a comparison of four selected methods of sample preparation was made: direct analyse of milk, dilution with addition of Triton X-100, wet microwave ashing and destruction of matrix with TMAH (tetramethylammonium hydroxide). Selected elements were analysed with the help of ICP-OES. This diploma thesis builds on the bachelor thesis, which deals with the same problem.

Final concentrations were compared with certified values of skimmed powdered milk. Data showed that the most accurate are methods of preparation of wet microwave ashing and destruction of matrix with TMAH. By using these methods, the effect of the dairy matrix that caused problems in the analysis, was largely eliminated. The diluted samples with and without Triton X-100 showed a bigger anomaly of measuring than the mineralization of wet ashing which came to the loss of analyte because of fat elements contained in milk.

KEY WORDS

bovine milk, sample pretreatment, elementary analysis, ICP-OES, minerals

KAŇOVÁ, V. *Studium různých metod přípravy vzorku mléka pro analýzu mléka technikou ICP-OES*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 56 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem úplně a správně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům pouze se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Srdečně bych chtěla poděkovat a vyslovit uznání rodině a přátelům, kteří mi pomáhali při vzniku této diplomové práce. Největší díky však patří především doc. Ing. Pavlu Divišovi Ph.D. za námět, trpělivé vedení, praktické rady a připomínky v průběhu zpracování této práce.

OBSAH

1 ÚVOD	9
2 TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 Mléko.....	10
2.1.1. Složení mléka.....	10
2.1.1.1. Voda	10
2.1.1.2. Mléčné proteiny.....	11
2.1.1.3. Sacharidy	13
2.1.1.4. Tuky.....	14
2.1.1.5. Vitaminy	15
2.1.1.6. Minerální látky a soli.....	15
2.1.1.7. Další látky.....	16
2.2 Technologie konzumního mléka	17
2.2.1. Zisk a příjem mléka	17
2.2.2. Čištění a odstředování mléka	17
2.2.3. Tepelné ošetření mléka	18
2.2.4. Standardizace a homogenizace	18
2.2.5. Plnění a balení.....	18
2.3 Analyzované prvky.....	18
2.3.1. Vápník.....	19
2.3.2. Hořčík	19
2.3.3. Sodík.....	20
2.3.4. Draslík.....	20
2.4 Metody prvkové analýzy	20
2.4.1. Optická emisní spektrometrie s buzením v plazmatu (ICP-OES)	21
2.4.1.1. Princip metody.....	21
2.4.1.2. Instrumentace	21
2.4.1.3. Zmlžovače	23
2.4.1.4. Indukčně vázané plazma (Inductively Coupled plasma – ICP).....	23
2.4.1.5. Monochromátory	24

2.4.1.6. Způsob detekce	25
2.4.1.7. Interference	26
2.5 Vybrané metody přípravy vzorku	26
2.5.1. Přímá analýza mléka	26
2.5.2. Rozklad matrice pomocí činidel	28
2.5.2.1. Triton X-100	28
2.5.2.2. Tetramethylammonium hydroxid	29
2.5.3. Rozklad vzorku	30
2.5.3.1. Rozklad na mokré cestě	30
2.5.3.2. Rozklad na suché cestě	32
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
3.1 Vzorek a metoda	34
3.1.1. Typy vzorků	34
3.1.2. Nastavení metody ICP-OES	35
3.1.3. Vlnové délky	35
3.2 Laboratorní vybavení	36
3.2.1. Chemikálie a vzorky	36
3.2.2. Přístroje	36
3.2.3. Používané pomůcky	37
3.3 Analýza vzorků mléka	37
3.3.1. Metoda prostého ředění vzorku	37
3.3.1.1. Příprava vzorku certifikovaného materiálu mléka	37
3.3.1.2. Příprava reálných vzorků mléka	37
3.3.1.3. Příprava kalibrační křivky	37
3.3.2. Metoda prostého ředění vzorku s přídavkem Tritonu X-100	38
3.3.2.1. Příprava vzorku certifikovaného materiálu mléka	38
3.3.2.2. Příprava reálných vzorků mléka	38
3.3.2.3. Příprava kalibrační křivky	38
3.3.3. Metoda rozkladu vzorku za použití TMAHu	38
3.3.3.1. Příprava vzorku certifikovaného materiálu mléka	38

3.3.3.2. Příprava reálných vzorků mléka	38
3.3.3.3. Příprava kalibrační křivky	39
3.3.4. Metoda mikrovlnného mokrého rozkladu	39
3.3.4.1. Příprava vzorku certifikovaného materiálu mléka	39
3.3.4.2. Příprava reálných vzorků mléka	39
3.3.4.3. Příprava kalibrační křivky	39
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	40
4.1 Analýza ředěného vzorku mléka	40
4.2 Analýza ředěného vzorku mléka s přidavkem Tritonu X-100	41
4.3 Analýza mléka pomocí činidla TMAH	43
4.4 Analýza mléka pomocí mikrovlnného rozkladu.....	44
4.5 Prvky.....	47
4.5.1. Vápník.....	47
4.5.2. Sodík.....	48
4.5.3. Draslík.....	49
4.5.4. Hořčík	50
5 ZÁVĚR	51
6 LITRATURA	52
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	56

1 ÚVOD

Mléko patří od nepaměti k základní potravíně člověka. Pro lidskou výživu a průmyslové zpracování se využívá především kravské mléko. Mléko obecně obsahuje v dostatečném množství i v optimálně vyváženém poměru všechny výživné i esenciální látky, které organismus potřebuje pro výživu a stavbu těla.

Mléko je především zdrojem velmi kvalitních proteinů, mléčného tuku a laktózy. Kromě těchto látek mléko také obsahuje anorganické *minerální látky*. Minerální látky mají v našem těle významnou stavební roli, protože se podílejí se na tvorbě tkání, na růstu orgánů a jejich funkci, jsou také součástí mnoha biochemických procesů v metabolismu živin, podílejí se na vedení nervových vzruchů a jiných fyziologických činností. Mnohé z nich jsou pro organismus esenciální. Minerální látky jsou v mléce přítomny v různých formách. Mohou být přítomny v mléčném séru v roztoku nebo v koloidní formě nebo jsou vázány na některé organické mléčné součásti. Z makroprvků je v mléce obsažen zejména vápník, fosfor, sodík, draslík a hořčík. Významné jsou také přítomné mikroprvky, jako je zinek, měď, mangan a železo.

Vysoký obsah bílkovin, sacharidů, vitamínů a dalších složek představuje velice složitou matici. Prvková analýza mléka je z těchto důvodů poměrně komplikovaná. Většina technik pro elementární analýzu mléka vyžaduje *mineralizaci na mokré* či *suché cestě* nebo jiné způsoby úprav vzorku. Tyto úpravy vzorku jsou složité, časově náročné a jsou také spojeny s jistým rizikem kontaminace. Výjimku tvoří *mikrovlňný rozklad*, při němž je mléčná matrice rozložena v systému podporovaném mikrovlňným zářením a je tak považována za účinnější a rychlejší metodu než je klasický rozklad na mokré cestě.

Snaha *přímé analýzy* vzorku mléka nevedla k příliš uspokojivým výsledkům. Předpokládá se, že nedostatečná přesnost a citlivost je při přímé analýze způsobena díky tukové povaze mléka, velikostí tukových kapiček a nekompletní atomizací mléčného vzorku. Nežádoucím účinkem mléčné matrice na analýzu minerálních látek v mléce by se mohlo zabránit použitím různých *činidel*. Přídavek *tetramethylammonium hydroxidu* nebo *Tritonu X-100* by měl způsobit rozrušení matrice a uvolnění jednotlivých prvků, které jsou z největší části vázané v kaseinových bílkovinách mléka.

Úpravou vzorků složitých biologických materiálů jako je mléko se zabývalo několik odborných článků a vědeckých publikací. Cílem této práce je proto posouzení a nalezení nejvhodnější, rychlé, nenáročné metody úpravy vzorku mléka před samotnou elementární analýzou pomocí optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mléko

Mlékem je nazýván tekutý sekret mléčné žlázy savců, které je pro svoje nutričně významné složení první a nenahraditelnou potravou savců. Pro člověka má konzumace mléka význam především jako zdroj vápníku, fosforu [1] a některých vitamínů [2].

2.1.1. Složení mléka

Mléko lze charakterizovat jako bílou až slabě nažloutlou tekutinu, která představuje velice komplikovaný disperzní systém. Kaseinové molekuly tvoří micelární disperze, bílkoviny syrovátky koloidní disperze, tuk přítomný ve formě tukových kapének tvoří emulzi, částice lipoproteinů koloidní suspenzi a nízkomolekulární látky (laktóza, volné aminokyseliny, minerální látky, vitaminy, atd.) tvoří pravý roztok [5].

Složení mléka může značně kolísat a nelze ho tedy uvést absolutně jednoznačně [2]. Průměrné složení mléčných komponent v procentech ukazuje níže uvedená Tabulka 1.

Tabulka 1 Obsah živin v mléce [5]

složka	obsah v mléce [%]			
	kravském	kozím	ovčím	lidském
proteiny celkem	3,2	3,2	4,6	0,9
kaseiny	2,6	2,6	3,9	0,4
proteiny syrovátky	0,6	0,6	0,7	0,5
tuky	3,9	4,5	7,2	4,5
sacharidy	4,6	4,3	4,8	7,1
minerální látky	0,7	0,8	0,9	0,2

V mléce se nachází také vitaminy, enzymy nebo hormony [3]. Chemické složení komponent je ovlivněno řadou faktorů – plemenem dojnice, laktační dobou, krmením nebo průběhem a dobou dojení [2]. Nejvýznamnějším faktorem je složení krmiva dojnic, se kterým souvisí i sezónní změny ve složení a vlastnostech mléka. Vliv na složení může mít samozřejmě také druh plemene a jeho zdravotní stav [8].

2.1.1.1. Voda

Nejvíce zastoupenou složkou mléka je voda. Obsah vody v mléce se u různých zvířecích druhů liší. Například kravské mléko obsahuje zhruba 87–91 % vody, která se vyskytuje jako volná, vázaná na koloidy nebo chemicky vázaná [5].

Většina vody v mléce je formě vody volné [8], kterou lze z mléka odpařit nebo vymrazit. Koloidní voda se váže na bílkoviny, tvoří ochranný hydratační povrch obalů koloidních částic a zajišťuje tak stabilitu mléčných bílkovin. Chemicky vázaná voda je přítomna v molekulách laktózy a solí [1].

2.1.1.2. Mléčné proteiny

Z nutričního hlediska jsou proteiny jednou z nejdůležitějších složek mléka. Mléčné proteiny jsou heterogenní směsí řady frakcí, které tvoří dvě hlavní skupiny:

- kaseiny (zhruba 80 % z celkového množství proteinů v mléce),
- syrovátkové (sérové) proteiny (tvoří asi 20 % proteinů mléka).

Obě tyto skupiny se liší jak v chemických, tak technologických vlastnostech.

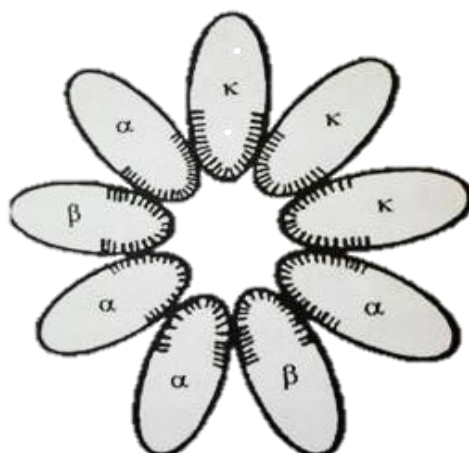
Kaseiny

Kasein je v mléce obsažen ve formě komplexů, tzv. kaseinových micel, které kromě bílkovin obsahují kalcium kaseinát, fosfát, vápník, hořčík a citrát. Celkový kasein je definován jako fosfoprotein, který se vyznačuje vysokým obsahem prolinu a nízkým obsahem sirných aminokyselin. Kaseinové molekuly jsou syntetizovány mléčnou žlázou, jsou specifické a nenacházejí se tudíž jinde v přírodě. Kaseiny představují směs několika různých bílkovin, a to hlavně α_{S1} , α_{S2} , β , γ a χ kaseinu, které tvoří asi 80 % bílkovin mléka, jejichž jednotlivá zastoupení v mléce ukazuje Tabulka 2 [5].

Tabulka 2 Složení kaseinových proteinů v kravském mléce [5]

Proteiny	Podíl [%]	Obsah [g · dm ⁻³]
Kaseiny celkem	80	25,6
α -kasein	42	13,4
β -kasein	25	8,0
γ -kasin	4	1,3
χ -kasein	9	2,9

Jednotlivé kaseiny se vyskytují v několika různých formách – liší se primární strukturou, tj. odlišnou sekvencí aminokyselin [6]. Kaseiny nejsou v mléce ve formě monomerů. Až 95 % z nich je agregováno do koloidních komplexů, tzv. kaseinových micel. Micely jsou vysoce hydratovány a váží až 2,5 g vody na 1 g bílkoviny [4]. Molekuly α_s -, β - a χ -kaseinu tvoří nejprve tzv. submicely, které obsahují přibližně 25–30 molekul. Nepolární části těchto molekul jsou orientovány do středu submicely, kde dochází k hydrofobním interakcím [1].



Obrázek 1 Příčný řez typickou submicelou [1]

Polární části molekul kaseinů (fosfoserinové zbytky molekul α_s -kaseinů, β -kaseinů a treoninový zbytek s vázanými oligosacharidy v molekule χ -kaseinu) interagují s vápenatými ionty a vodou. Jednotlivé submicely se vzájemně spojují do micel pomocí fosfátových skupin α_s -kaseinů, β -kaseinů a vápenatých iontů buď přímo, nebo prostřednictvím volných fosfátů a citrátů [1]. Strukturu kaseinových micel ukazuje Obrázek 1 a Obrázek 2.

Biologická hodnota mléčných bílkovin je vysoká. Bílkoviny obsažené v jednom litru mléka pokryjí asi polovinu denní potřeby bílkovin dospělého člověka [7]. Obsahují řadu esenciálních aminokyselin. Nejdůležitější jsou histidin, leucin, isoleucin, lysin, methionin, fenylalanin, threonin, tryptofan a valin. Nedostatek esenciálních aminokyselin vede k těžkému poškození organismu a onemocnění. Veliký význam mají i některé neesenciální aminokyseliny mléka, např. glutamová, která ovlivňuje růst a zasahuje do procesů látkové výměny, mozkového a nervového systému [10].



Obrázek 2 Spojení submicel pomocí fosfátů (P), vápenatých iontů (Ca) a citrátů (Ci)

Díky tomu, že jsou micely koloidních rozměrů, mohou rozptylovat světlo. Bílá barva mléka je tedy hlavně důsledkem lehkého rozptylu kaseinovými micelami. Barva se ztrácí, pokud jsou micely porušeny, a to například odstraněním koloidního kalcium-fosfátu, zvýšením pH, přidáním močoviny nebo SDS [3].

Proteiny syrovátky

Syrovátkové nebo-li sérové proteiny tvoří přibližně 20 % bílkovin mléka. V nativní formě se vyskytují ve formě koloidního roztoku a vytvářejí kompaktní globulární konformaci. Tato struktura se během tepelného opracování mléka mění, čímž dochází k jejich denaturaci a k navázání na kaseinovou micelu. Během denaturace dochází k rozbalení terciální struktury proteinů a k odkrytí funkčních skupin aminokyselin, především thiolových. Thiolová skupina vyvolává tzv. vařivou chuť mléka [1].

Mezi základní syrovátkové proteiny patří:

- β -laktoglobulin;
- α -laktoglobulin;
- imunoglobuliny IgG, IgA, IgM, IgE;
- sérový albumin.

β -laktoglobulin patří mezi nejvýznamnější syrovátkovou bílkovinu a tvoří asi 50 % všech syrovátkových proteinů. Tento protein je v mléce přítomen jako dimer a při zahřevu nad 65 °C se nevratně denaturuje a disociuje na monomery. Částečně denaturovaný protein reaguje pomocí thiolové skupiny s dalšími mléčnými kaseinovými proteiny za vzniku dimerů spojených disulfidovou vazbou. Vznik těchto dimerů způsobuje změny v povrchových vlastnostech kaseinových micel a ve snížení schopnosti srážení mléka [12].

Mezi další hlavní složky kravského mléka patří proteiny jako *α -laktoglobulin* a krevní *sérový albumin*, které představují zhruba 20 a 10 % v tomto pořadí.

Syrovátka obsahuje kromě zmíněných *imunoglobulinů* také další stopová množství zejména laktotransferinu, serotransferinu a několika dalších enzymů [3, 13].

2.1.1.3. Sacharidy

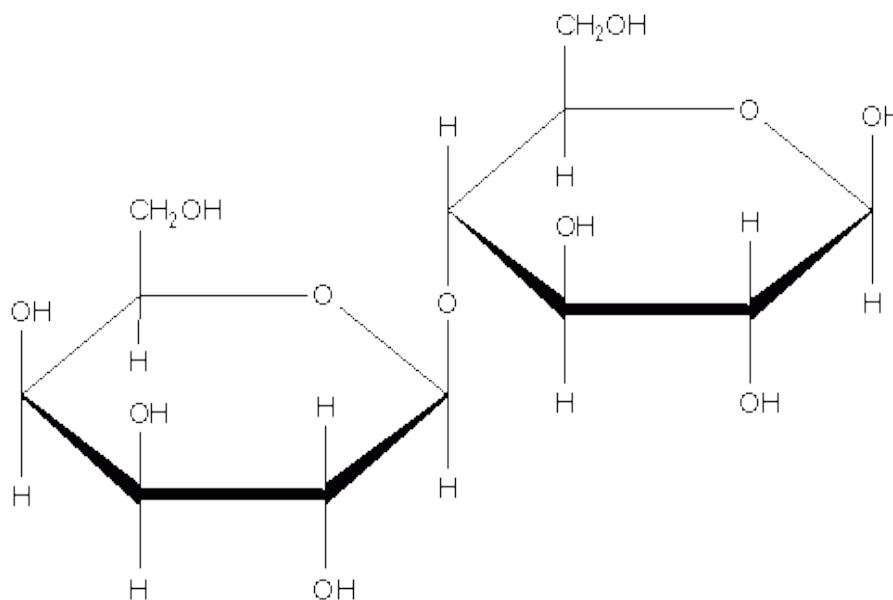
Ze sacharidů obsahuje mléko především laktózu. Jedná se o disacharid složený ze dvou hexóz, glukózy a galaktózy, který ukazuje Obrázek 3. Laktóza má nízkou sladivost a dobrou stravitelnost [6] a v mléce se nachází ve formě pravého roztoku [13].

Působením mikrobiálních enzymů se mění tento disacharid na monosacharidy, dále na kyseliny, zejména mléčnou, někdy na alkohol až oxid uhličitý a vodu.

Hlavní význam laktózy spočívá v tom, že je vedle tuků pohotovostním zdrojem energie, napomáhá vstřebávání vápníku, fosforu, draslíku a vitamínů přijímaných stravou a podporuje činnost trávicího ústrojí.

Štěpení laktózy začíná v žaludku a probíhá hlavně v tenkém střevě za působení enzymu β -galaktosidázy nebo-li laktázy. U lidí, kterým tento enzym chybí, dochází k nestrávení laktózy a značným potížím (průjmy, plynatost) [13].

Vedle laktózy jsou v mléce obsaženy i další sacharidy v malých koncentracích, a to jednak ve volné formě, vázané na bílkoviny, lipidy nebo fosfáty. Z monosacharidů je to například glukóza a galaktóza [8].



Obrázek 3 Disacharid laktózy

2.1.1.4. Tuky

Mléčný tuk je významným zdrojem energie, je lépe stravitelný než jiné tuky a je proto považován z hlediska výživy důležitou složkou potravy. V mléce je jemně rozptýlen ve formě emulze tukových kuliček jako rozmanitý přirozený lipidový systém [7]. Velikost tukových kuliček se pohybuje v rozmezí 1 až 22 mikrometrů, což způsobuje snadný přístup k enzymům při jejich trávení [13]. Velikost tuku je však značně kolísavá a závislá na celé řadě okolností, např. v čerstvě nadojeném mléce tvoří tukové kuličky shluky, které se přepravou, skladováním a zahříváním rozpadají [10].

Mléčný tuk obsahuje tri-, di- a monoacylglyceroly, fosfolipidy, steroly a jejich estery, volné mastné kyseliny a vitaminy rozpustné v tucích. Nejvíce zastoupenou tukovou složkou jsou triacylglyceroly, které tvoří až 98 % lipidů mléka a jsou složeny z glycerolu a mastných kyselin jak nasycených, tak nenasycených. Z hlediska výživy jsou nejdůležitější nenasycené (esenciální) mastné kyseliny jako jsou kyseliny linolová a linolenová. V mléce se nachází také kyselina olejová nebo arachidonová. Mléčný tuk má ze všech přirozených tuků nejrozmanitější složení a je pro něj typický obsah poměrně vysokého množství mastných kyselin s krátkým řetězcem [8].

Malé množství lipidů je také přítomno ve formě fosfolipidů a sterolů v membráně tukových kuliček. [8, 10]. V povrchových membránách je nejvíce vázán lecithin, který přispívá ke stabilizaci tukové emulze. S obsahem tuku v mléce je také závislý obsah cholesterolu, jelikož je v něm rozpuštěný [13].

Záhřevem mléka do 200 °C se mléčný tuk nemění. Při teplotách nad 100 °C se však mění vnější lecithin-proteinový obal tukových kuliček a dochází k vytvoření tzv. sulphydrylových sloučenin. K rozkladu mléčného tuku dochází buď hydrolyzou (žluknutím) nebo oxidací [10].

2.1.1.5. Vitaminy

Vitaminy jsou organické látky nezbytné pro udržení života organismu, jeho růstu a správného vývoje. Uplatňují se zejména jako katalyzátory různých metabolických dějů v lidském organismu, který ve většině případů není schopen si je sám vyprodukovat, a proto musí být dodávány zvenčí [10].

Mléko je bohatým zdrojem vitaminů, které obsahuje jak hydrofilní, tak lipofilní vitaminy. Z hydrofilních vitaminů se jedná o vitaminy skupiny B jako B5, B2, B6, PP a B12. Zastoupen je i vitamin C a H (biotin), inositol a kyselina listová. Z lipofilních vitaminů mléko obsahuje vitamin A a jeho provitaminy – karoteny. Vitamin D i E se v kravském mléce vyskytují pouze v malých koncentracích [6, 10].

Vlivem moderních technologií zpracování mléka dochází k úbytku obsahu vitaminů v mléce, a proto je nutná, zejména u dětské výživy, fortifikace některými vitaminy [8].

2.1.1.6. Minerální látky a soli

Mléčnou sušinu tvoří převážně organické látky, jejichž hlavními stavebními jednotkami jsou organogenní prvky a minerální látky. Mléko obsahuje organické a anorganické soli. Soli zahrnují kromě minerálních látek také sloučeniny organických kyselin. Soli se nacházejí v mléce v různých formách: v mléčném séru v podobě rozpustných solí, kde tvoří pravý roztok, nebo v koloidní formě, případně jsou vázány na organické složky mléka [12].

Minerální látky jsou pro lidský organismus velmi důležité, ačkoliv je naše tělo potřebuje jen v malých koncentracích. Ovlivňují důležité biochemické pochody v našem těle, mají význam pro růst a tvorbu tkání, aktivují, regulují a kontrolují látkovou výměnu v těle a také se účastní na vedení nervových vzruchů. Organismus člověka si minerální látky nedovede sám vytvořit a tak je musí dostat spolu s potravou [14].

Mléko i mléčné výrobky jsou bohatým minerálních látek, zejména vápníku a fosforu. Mléko obsahuje i další minerální látky jako je draslík, sodík, chlór nebo hořčík a další látky ve stopových množstvích [7] např. železo, mangan, zinek a měď [6]. Níže uvedené Tabulky 3 a 4 uvádějí potřebné denní množství minerálních látek a jejich obsah v různých typech mléka. Významnost jednotlivých prvků vybraných k analýze je popsána v kapitole 2.3.

Tabulka 3 Potřebné denní množství majoritních prvků [23] a jejich koncentrace v mléce [24]

Minerální prvek	Potřebné denní množství	obsah prvku v mléce			
		kravském	kozím	ovčím	lidském
	[mg]	[mg · kg ⁻¹]	[mg · kg ⁻¹]	[mg · kg ⁻¹]	[mg · kg ⁻¹]
Ca	800	1070–1330	1060–1920	1360–2000	220–410
P	1000	630–1020	920–1480	800–1450	120–170
K	1500	1440–1780	1000–1980	1740–1900	460–550
Na	1150	400–580	340–500	290–310	120–150
Cl	2000	900–1060	1000–1980	710–920	320–490
Mg	300	90–160	100–210	80–190	30–34

Tabulka 4 Potřebné množství minoritních látek [23] a jejich koncentrace v mléce [24]

Stopové prvky	Potřebné denní množství	obsah prvku v mléce			
		kravském	kozím	ovčím	lidském
	[mg]	[μg · kg ⁻¹]	[μg · kg ⁻¹]	[μg · kg ⁻¹]	[μg · kg ⁻¹]
Cu	2	20–300	110	110–880	220–770
Fe	12	300–700	360–750	620–1000	260–580
Zn	7	740–1450	2420	4510	3,8
Mn	3	13–40	55	53	7000 ng

2.1.1.7. Další látky

Kromě již popsaných komponent v mléce můžeme najít [13]:

- *enzymy*: původní (peroxidázy, lipázy, katalázy a fosfatázy) a druhotné (hydrolázy a desmodázy);
- *kyseliny*: mléčná, citrónová, atd.;
- *barviva*: karoten, xantofyl a flavinová barviva;
- *somatické buňky*: převážně buňky krevní řady (makrofágy, lymfocity, atd.), spolu s mikroorganismy jsou základním ukazatelem kvality mléka;
- *plyny*: po nadojení mléko obsahuje oxid uhličitý (5–7 %, jehož množství po určité době stání klesá).

2.2 Technologie konzumního mléka

Výroba konzumního mléka se skládá z několika základních operací, které popisuje schéma na Obrázku 4.



Obrázek 4 Schéma technologie konzumního mléka

2.2.1. Zisk a příjem mléka

Získávání mléka lze realizovat ve speciálních dojárnách s využitím mechanizace a při zajištění vysoké hygieny. Čerstvě nadojené mléko se čistí filtrací. Mléko musí být zchlazeno do 150 minut od začátku dojení a je uchováváno a převáženo do mlékárenských závodů při teplotě 4–7 °C.

V mlékárenském závodě se při příjmu mléka měří množství, teplota, měrná hmotnost, čistota a odebírá se vzorek na další hodnocení. Teplota mléka se udržuje na 5 °C a mléko je před dalším zpracováním uchováváno v silech (tancích) [2].

2.2.2. Čištění a odstřed'ování mléka

Základní ošetření mléka představuje po jeho příjmu čištění a odstřed'ování. Čištěním mléka se rozumí zbavení mléka jemných mechanických nečistot, části mikroorganismů a buněčných částic. Provádí se současně s tzv. odsmetaňováním mléka v talířových odstředivkách, kdy se na základě rozdílné měrné hmotnosti získá odstředěné mléko se zbytkovým obsahem tuku kolem 0,05 % a smetana s tučností obvykle kolem 40 % [2, 22].

2.2.3. Tepelné ošetření mléka

Následuje tepelné ošetření pomocí deskových výměníků, kdy dochází k usmrcení většiny mikroorganismů. Důležitým faktorem je rychlé dosažení teploty, pohyb mléka během záhřevu a rychlé vychlazení po zahřátí. Podle použité teploty máme několik způsobů tepelného ošetření:

- pasterace dlouhodobá (63–65 °C po dobu 30 minut);
- pasterace šetrná (71–74 °C po dobu 20 sekund);
- pasterace vysoká (85–95 °C po dobu 5 sekund);
- sterilace (teploty nad 100 °C s různou výdrží).

Pro výrobu konsumního mléka se nejčastěji využívá pasterace vysoká. Sterilace se provádí převážně kontinuálním způsobem přímým nebo nepřímým kontaktem s ohřívacím médiem na teplotu 140–144 °C po dobu 2–5 sekund a dále aseptickým plněním do nevratných obalů. Druh takto ošetřeného mléka se nazývá trvanlivé mléko, UHT (Ultra-High-Temperature).

2.2.4. Standardizace a homogenizace

Proces standardizace zahrnuje úpravu obsahu tuku v mléce. Úpravu tučnosti lze provádět několika způsoby. Šaržovitě, kdy do standardizačního tanku nebo přímo do výrobniku se napustí vypočítaný objem odstředěného mléka a mléka s vyšším obsahem tuku nebo smetany [22].

Pro zlepšení kvality mléka se rovněž provádí homogenizace, jejímž cílem je zmenšení velikosti tukových kuliček pod 1 μm a tím zabránění vyvstávání mléčného tuku při skladování [2].

2.2.5. Plnění a balení

Mléko se může plnit do vratných nebo nevratných obalů. Nejčastěji se plní do lahví či (PE) sáčku, případně do papírových kartonových obalů, uvnitř krytých polyethylenovým nástřikem. Pro trvanlivé mléko se tento obal skládá z pěti vrstev, mezi které patří i hliníková vrstva, která brání přístupu vzduchu a světla [2].

2.3 Analyzované prvky

Minerální látky se v mléce nachází v různých chemických formách např. v podobě anorganických iontů a solí, nebo jsou součástí organických sloučenin – bílkovin, tuků, sacharidů a nukleových kyselin [12].

Nejvýznamnější soli mléka a jejich průměrný obsah v mléce a v kaseinových micelách ukazuje následující Tabulka 5.

Tabulka 5 Průměrný obsah minerálních látek v mléce a jejich množství v kaseinech [12]

složka	obsah v mléce [mg · kg ⁻¹]	obsah v kaseinu [mmol · g ⁻¹]
Na	480	0,04
K	1430	0,08
Ca	1200	0,77
Mg	110	0,06
PO ₄	2030	0,39

2.3.1. Vápník

Mléko je důležitým zdrojem vápníku. Pokrývá asi 60 % potřeby organismu a svým složením, přítomností fosforu, vitamínu D a laktózy přispívá k jeho maximálnímu využití [3].

Vápník je důležitý pro tvorbu kostí, zubů a je nezbytný pro srážení krve. Dále ovlivňuje dráždivost nervového systému. Řada lidí trpí nedostatkem vápníku právě díky nízké spotřebě mléka a mléčných výrobků.

Vstřebávání vápníku závisí na jeho chemické formě a také na složení potravy. Vápník přijatý stravou se vstřebává v tenkém střevě. Regulační schopnost organismu je poměrně malá a nestačí tak vyrovnávat nedostatečný příjem nebo jeho sníženou resorpci [16].

Denní potřeba vápníku je přibližně 800 mg. Pro vstřebávání je také důležitý poměr vápníku a fosforu, který by měl být 1 : 1,5. Při nedostatku vápníku v těle člověka se vyskytuje osteomalacie a osteoporóza [14].

Aktivita vápníku v mléce má velký vliv na koloidní stabilitu kaseinu, ovlivňuje tedy termolabilitu mléka a jeho srážení. Přítomnost vápníku v mléce činí v průměru 1200 mg · l⁻¹. V kravském mléce se 99 % Ca nachází v mléčné plazmě. Asi 2/3 z celkového obsahu Ca je v koloidní formě jako fosforečnan vápenatý, obsažený v kaseinových micelách. Zbývající 1/3 představuje rozpustnou formu solí a iontů. Volný ionizovaný Ca v rozpustné fázi tvoří pouze asi 10 % z celkového obsahu a větší část rozpustného Ca tvoří citrát vápenatý. Malé množství Ca, asi 0,15 %, je vázáno na bílkovinu α-laktalbumin [1].

2.3.2. Hořčík

Hořčík je uložen převážně v kostech, kosterní svalovině, játrech, slinivce a pouze 1 % hořčíku je obsaženo v krvi. Hořčík se podílí na normální stavbě kostí a zubů. Je důležitý v energetickém metabolismu, kde aktivuje řadu dějů a spolu s vápníkem ovlivňuje svalovou a nervovou činnost [16].

Vstřebává se zejména v tenkém střevě a při nadbytku vápníku, fosforečnanů a při nedostatku lipidů se jeho vstřebávání snižuje.

Denní spotřeba hořčíku pro člověka činí 300–600 mg. K nadbytku hořčíku dochází většinou jen při předávkování léky či doplňky stravy. Projevuje se nevolností, zvracením, nízkým krevním tlakem [14].

V mléce je Mg přítomen pouze v malém množství. Až 98-100 % Mg je v kravském mléce přítomno v mléčné plazmě a jeho malé množství je vázáno na mléčný kasein [12].

2.3.3. Sodík

Sodík je důležitý pro udržení osmotického tlaku a iontové síly tělních tekutin včetně krve. Přijímá se hlavně ve formě jedlé soli, jejíž příjem by měl být asi 5 g denně.

Při nadbytku sodíku dochází k zadržování vody v těle, zvyšuje se riziko vysokého krevního tlaku a také vylučování vápníku [16].

Technologický význam sodíku při zpracování mléka spočívá hlavně v jeho vlivu na koligativní vlastnosti. Tyto vlastnosti nezávisí na rozpustné látce, ale pouze na její koncentraci. Přesněji jsou určeny molární koncentrací, resp. aktivitou rozpustných látek v mléce, přibližně z poloviny koncentrací laktózy a z poloviny rozpustnými solemi. Velice podobný technologický význam má i draslík [1].

2.3.4. Draslík

Draslík významně ovlivňuje činnost svalů, zejména srdce. V lidském organismu se draslík vyskytuje zejména jako součást nitrobuňkové tekutiny. Jeho hlavní funkcí je přenos nervových vzruchů a zadržování vody v buňkách, čímž pomáhá regulovat osmotický tlak. Poměr sodíku a draslíku (jejich vylučování ledvinami) regulují kortikoidní hormony, jmenovitě aldosteron.

V potravinách se draslík většinou vyskytuje ve formě volných iontů a v dostatečném množství. Jeho denní příjem činí asi 4 g a hlavním zdrojem jsou převážně potraviny rostlinného původu. Hlavní příznaky nedostatku draslíku jsou svalové křeče, srdeční arytmie a pokles funkce ledvin. Mezi další příznaky patří například ztráta chuti k jídlu a zvracení [4,25].

2.4 Metody prvkové analýzy

V současnosti se pro prvkovou analýzu využívá zejména spektrometrických metod, které se podle jejich základních principů rozdělují na atomovou emisní, atomovou absorpční a hmotnostní spektrometrii. V případě iontů kovů (Cu, Fe, Zn aj.) se jejich naprostá většina stanovuje především atomovou spektrometrií po mineralizaci. Pro vyšší koncentrace se volí plamenové techniky jako je F-AAS, pro stopové koncentrace se často využívají elektrotermické atomizace (ET-AAS) v grafitové nebo wolframové kyvetě nebo plazmové techniky (ICP-OES nebo ICP-MS). Ke stanovení alkalických kovů (Na, K) a kovů alkalických zemin (Ca, Mg) je nejčastěji používána plamenová fotometrie (FP) a atomová absorpční spektrometrie (F-AAS) [23]. Následující Tabulka 6 ukazuje meze detekce vybraných nepoužívanějších metod prvkové analýzy.

Pro elementární analýzu v této práci byla vybrána technika ICP-OES.

Tabulka 6 Meze detekce spektrometrických metod [29]

Metoda	Mez detekce [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]
ICP-MS	0,01–1
ETA-AAS	0,01–2
ICP-OES	2–1000
F-AAS	> 5

2.4.1. Optická emisní spektrometrie s buzením v plazmatu (ICP-OES)

ICP-OES se stala jednou z nejuniverzálnějších metod prvkové analýzy a dnes umožňuje principálně přímou analýzu kapalných, plynných i pevných vzorků [30]. V praxi se však používá převážně pro roztokovou analýzu [19].

Zavedení plazmy do praxe znamenalo kvalitativní změnu ve významu, možnostech a použití této důležité analytické metody. Výhodou buzení v ICP jsou nízké meze stanovitelnosti pro značný počet prvků, relativně malé interference a snadná kalibrace na modelové roztoky a také značný rozsah linearit závislosti signálu na koncentraci prvku [18].

2.4.1.1. Princip metody

Metoda slouží k určení složení analyzovaného vzorku pomocí záření, které atomy vzorku vysílají. Aby vzorek toto záření vysílal, musí se atomy prvku převést do excitovaného stavu dodáním energie.

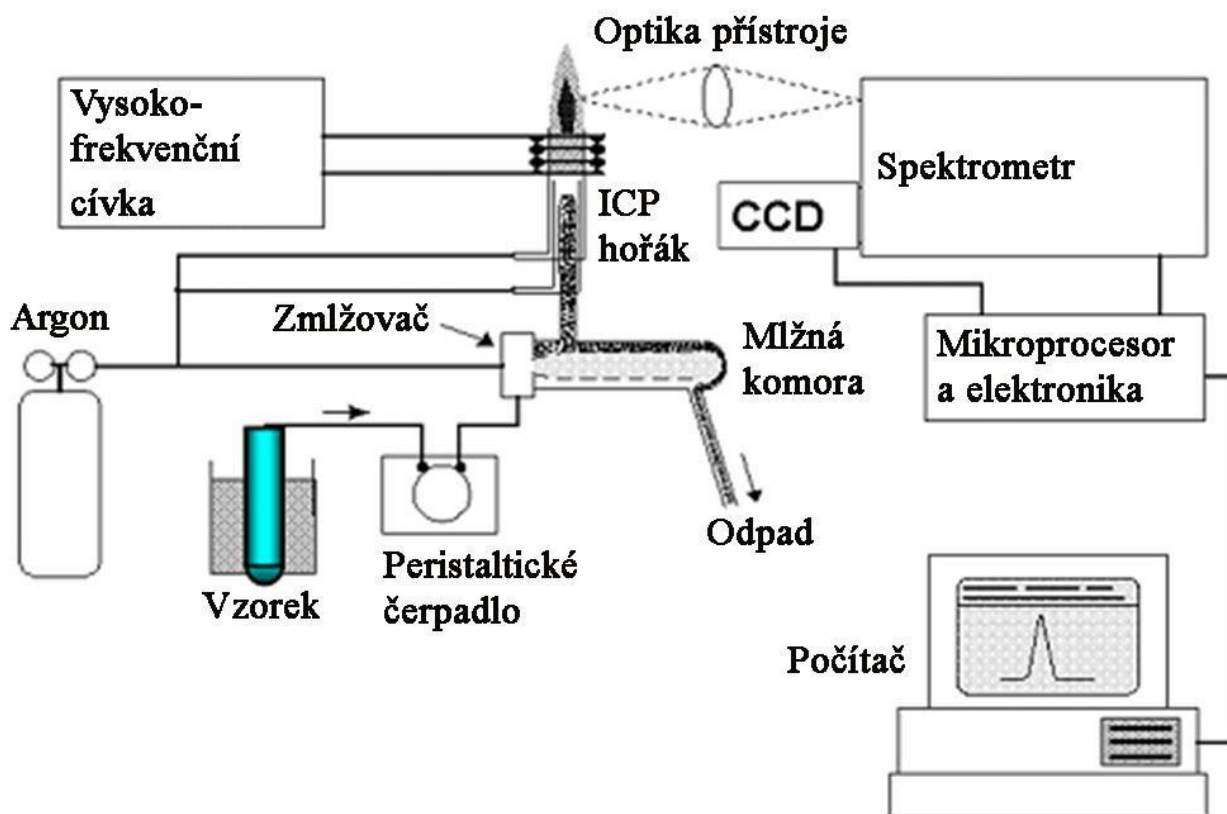
Protože excitovaný stav atomu je nestabilní, vrací se vybuzené elektrony zpět na své původní energetické hladiny a přitom emitují fotony o přesně definované vlnové délce, které nazýváme spektrum prvku. Kvalitativní složení prvku je určeno přítomností charakteristických vlnových délek, kvantitativní složení poměrným rozdělením intenzity záření na tyto frekvence [18].

2.4.1.2. Instrumentace

Přístroj ICP-OES obsahuje budící zařízení jako zdroj energie a napájecí generátor. Základem budícího zařízení je plazmová hlavice s indukční cívkou [19]. Každý spektrální přístroj má kromě zdroje excitační energie ještě tyto části: vstupní štěrbinu, monochromátor, zaostřovací systém a detektor záření [18]. Schéma přístroje je vidět na Obrázku 5.

Převážnou většinu vzorků pro techniku ICP-OES je třeba před analýzou převést do roztoku. Transport vzorku do plazmatu probíhá obvykle pomocí peristaltické pumpy, která přivádí roztok analytického vzorku do zmlžovače. Vzorek je v tomto zmlžovači zmlžen, čímž se vytvoří aerosol vzorku. Ten se pak vede přes mlžnou komoru, kde dochází k odloučení velkých kapek, do injektorové trubice plazmové hlavice. Vzniklá mlha je proudem argonu vedena do hořáku, ve kterém je za pomoci střídavého vysokofrekvenčního magnetického pole udržováno argonové plazma o teplotě až 10 000 K.

Energie v plazmatu je dostatečná k tomu, aby došlo k excitaci elektronů přítomných atomů do vyšších energetických hladin. Tato emise elektro-magnetického záření je zpracována monochromátorem na jednotlivé vlnové délky. Záření o určité vlnové délce je na konci snímáno opticky citlivým detektorem. Na základě odezvy detektoru je výsledný signál zpracován počítačem [20].



Obrázek 5 Základní schéma ICP-OES

2.4.1.3. Zmlžovače

Zmlžovače dělíme dle principu na dvě základní skupiny:

- pneumatické;
- ultrazvukové.

2.4.1.3.1. Pneumatické zmlžovače

Při pneumatickém zmlžování je roztok vnesen do proudu nosného plynu, nejčastěji argonu, za vzniku aerosolu. Vzorek je často transportován do zmlžovače peristaltickou pumpou. Pneumatické zmlžovače se dále dělí na dva typy: pneumatické zmlžovače se sacím účinkem a bez sacího účinku.

U pneumatických zmlžovačů se sacím účinkem jsou roztoková i plynová kapilára vzájemně uspořádány buď koncentricky, nebo svírají pravý úhel. U pneumatických zmlžovačů bez sacího účinku vzniká aerosol narušováním filmu tvořeného kapilárou stékající po kulovém povrchu, V-štěrbínou nebo Pt sítěce přes malý otvor, jímž je přiváděn nosný plyn. Obvykle se zmlžovače bez sacího účinku používají pro viskóznější kapaliny nebo pro vzorky s vysokým obsahem solí.

Účinnost zmlžování se obvykle pohybuje asi do 5 %, u zmlžování bez sacího účinku je účinnost zpravidla nižší. Jejich velkou výhodou je jednoduchá a relativně levná konstrukce.

2.4.1.3.2. Ultrazvukové zmlžování

Při zmlžování ultrazvukem vzniká aerosol díky kmitání keramické piezoelektrické destičky, na kterou je přiváděn pomocí peristaltického čerpadla. Vzniklý aerosol je velmi jemný a dostatečně monodisperzní. Oproti pneumatickému zmlžování je účinnost vysoká (až 70 %), a proto je nutná následná desolvatace vzorku, protože zavádění velkého množství rozpouštědla do plazmatu vede k neúměrnému zvyšování pozadí spektra.

Využívá se zejména při stopové analýze vod, některých mineralizátů biologických materiálů a dalších vzorků s malou solnou maticí.

2.4.1.4. Indukčně vázané plazma (*Inductively Coupled plasma – ICP*)

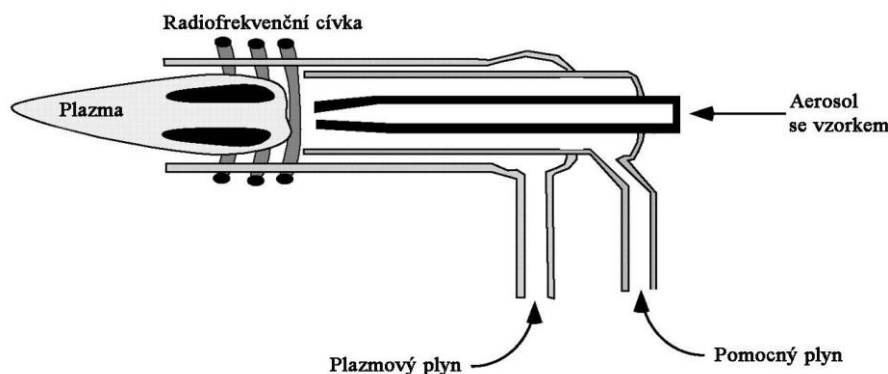
ICP patří mezi novější zdroje buzení optických spekter atomů a iontů. Představuje ionizovaný plyn, složený z plyných iontů, metastabilních atomů argonu a elektronů. Plazma je kvazineutrální a silně elektricky vodivé. Zvláštní význam má argonové plazma za atmosférického tlaku [30].

Plazma vzniká v plazmové hlavici působením vysokofrekvenčního elektromagnetického pole pomocí indukční cívky v prostředí argonu. Plazmová hlavice, v níž hoří plazma, má tři toky plynu: prostřední trubicí prochází aerosol vzorku s nosným plynem (argon, dusík), další trubicí proudí plyn, z něhož vzniká plazma (vnitřní plazmový plyn), a tangenciálně další argon jako chladicí plyn (vnější plazmový plyn). Plazma se zapaluje Teslovým výbojem [34]. Aerosol prochází analytickým kanálem, který je obklopen plazmou o vysoké teplotě. Dochází k vypaření vzorku, atomizaci a ionizaci volných atomů a iontů. Plazmová hlavice je zobrazena na Obrázku 6.

Výboj ICP má zásadně dvě odlišné oblasti, a to indukční zónu, v níž dochází k přenosu elektromagnetického pole cívky do plazmatu a analytický kanál, kde je soustředěn vzorek transportovaný nosným plynem.

Nejrozšířenějším typem ICP výboje je dosud Ar/Ar plazma. Vysoká spotřeba argonu však značně zvyšuje provozní náklady a cenu analýzy.

Výhodou buzení vzorku v ICP jsou v nízké meze stavitelnosti, relativně malé interference, snadná kalibrace na modelové roztoky a rozsah linearit závislosti signálu na koncentraci prvků [19].



Obrázek 6 Plazmová hlavice

2.4.1.5. Monochromátory

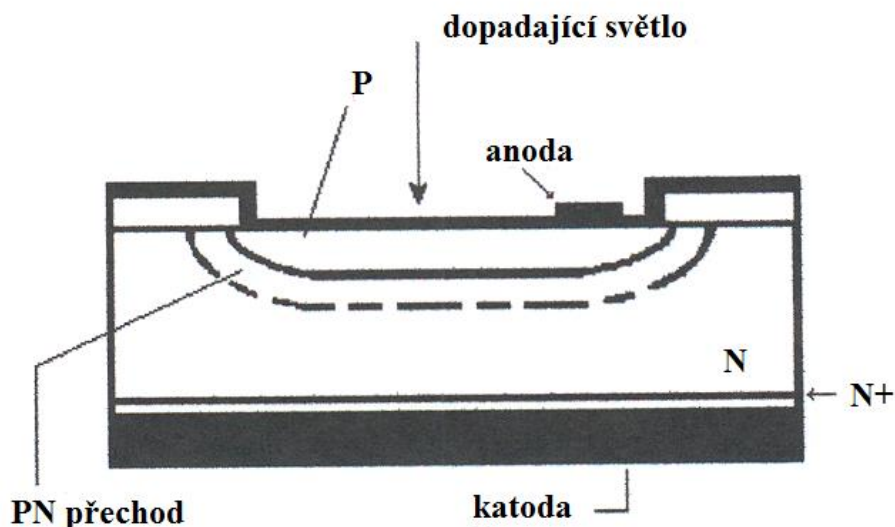
Nároky na kvalitu monochromátoru se u jednotlivých spektrálních metod liší. V metodě OES se vyžaduje vymezení úzkého spektrálního intervalu monochromátorem s vysokou rozlišovací schopností [18]. Monochromátory se skládají z: vstupní štěrbin, disperzního prvku (mřížka, hranol), výstupní štěrbin a zaostřovací pomocné optiky (čochky, zrcadla) [19].

Samotné záření je nejdříve filtrováno monochromátorem na fotony o určité vlnové délce, příslušející požadované analytické čáře daného prvku. V případě nedisperzních monochromatických zařízení se z polychromatického zařízení vydělí jen požadovaná oblast bez rozkladu záření na spektrum. Mezi monochromátory patří různé druhy optických filtrů pracujících na principu absorpce, interference, rozptylu, polarizace záření apod. V případě disperzních monochromatizačních zařízení je využito principů umožňujících rozklad záření na prostorově uspořádané spektrum, ze kterého se mechanickým způsobem (štěrbínami) mohou vydělit požadované úzké oblasti umožňující simultánní měření několika monochromatických složek [21]. Pootočením soustavy nebo posuvem výstupní štěrbin můžeme tak postupně skenovat celé spektrum a při zvolených vlnových délkách změřit potřebné spektrum sekvenčním způsobem. V současnosti se na spektrální rozklad téměř bez výjimky používají difrakční mřížky, a to buď rovinné, nebo duté [41].

2.4.1.6. Způsob detekce

Jako detektor se nejčastěji používají různé druhy fotočlánků, emisní fotoelektrické články, jako jsou fotonky nebo fotonásobiče, fotocitlivé diody aj.

Nejčastější používané detektory fotočlánků jsou fotodiody, jejichž schéma je na Obrázku 7. Asi nejvíce spolehlivé a všestranně použitelné jsou křemíkové fotodiody. Na krystaly křemíku této diody je připojeno vnější napětí. V oblasti *N* je přebytek elektronů a v oblasti *P* přebytek děr. Dopadající záření uvolňuje elektrony uvnitř materiálu polovodiče. Elektrony přechází do *N* vrstvy, díry do *P* vrstvy a vzniká elektrický proud, který se měří.



Obrázek 7 Schéma fotodiody

Velkým pokrokem v detekci je zavádění diodových polí (Diode Array – DA) nebo snímačů s nábojovou vazbou, tj. detektorů CCD (Charge Coupled Device).

Fotonásobiče pracují tak, že dopadající fotony vyrážejí z citlivého povrchu fotokatody elektrony. Jejich proud následně směřuje k anodě a je zesilován zařazením dynod mezi katodu a anodu. Elektron vyražený fotonem mířící na první dynodu vyráží až dva nové elektrony. Ty míří na další dynodu, odkud vyráží další elektrony atd. Každá následující dynoda má potenciál asi o 90 V pozitivnější než předcházející [24].

2.4.1.7. Interference

Při měření technikou ICP-OES vznikají se jak nespektrální, tak spektrální interference.

U nespektrálních interferencí se jedná především o interference snadno ionizovatelných prvků. Ty se liší v jednotlivých zónách plazmatu a u atomových a iontových čar. Míra jejich uplatnění závisí také na průtoku plynů a příkonu do plazmatu. Další nespektrální interference byly zaznamenány při zmlžování roztoků s vyšším obsahem minerálních kyselin. Tento vliv se uplatňuje jak u atomových, tak u iontových čar zpravidla v celém rozsahu axiálního rozdělení intenzity záření. Vliv nespektrálních interferencí je možné minimalizovat přesným modelováním matrice analyzovaného vzorku při kalibraci ICP-OES.

Spektrální interference jsou doposud zásadním problémem ICP-OES, zejména jsou-li ve vzorku přítomny vyšší koncentrace prvků s komplexním emisním spektrem nebo intenzivními emisními čarami. Dochází k částečnému nebo úplnému překryvu emisních linií dvou nebo více čar s blízkými vlnovými délkami. Předpokladem pro minimalizaci spektrálních interferencí jsou disperzní prvky s dostatečným rozlišením [34].

2.5 Vybrané metody přípravy vzorku

Příprava vzorku patří k základním úkonům při analýze biologických vzorků a na jejím provedení záleží celkový úspěch analytického stanovení. Při analýze biologických maticí se prakticky v žádném případě nelze vyhnout aplikaci některé z metod přípravy vzorku. Většina instrumentálních analytických metod prvkové analýzy vyžaduje, aby byl vzorek v kapalném stavu [15].

Mléko, jakožto složitá matrice se může pomocí ICP-OES analyzovat různými způsoby. Z odborných textů a publikací byly vybrány následující metody úpravy vzorku:

- přímá analýza;
- rozložení mléčné matrice přidáním činidla (Triton-X100, TMAH);
- rozklad na mokré cestě;
 - mikrovlnné zpopelnění;
- rozklad na suché cestě.

Každá z metod je teoreticky popsána v kapitolách uvedených níže. Ke každé z těchto kapitol jsou také kromě teorie popsány postupy přípravy vzorku mléka a jejich vyhodnocení z vybraných článků a publikací.

2.5.1. Přímá analýza mléka

Při přímé analýze vzorku mléka je vzorek přímo dávkován do optického emisního spektrometru bez předchozí mineralizace nebo bez jakékoli jiné úpravy. Mléko je pouze vhodně naředěno, a to tak, aby se koncentrace tukových složek snížila na takové množství, které nijak výrazně neovlivní výsledky analýzy [11].

Snaha *přímé analýzy* vzorku mléka však nevedla k příliš uspokojivým výsledkům. Předpokládá se, že nedostatečná přesnost a citlivost je způsobena tukovou povahou mléka, velikostí tukových kapiček a nekompletní atomizací mléčného vzorku [26].

Murcia a kol., 1999 [26] ve své práci analyzovaly vzorky certifikovaného materiálu sušeného mléka (CRM) a tři vzorky plnotučného kravského mléka přímým dávkováním do přístroje ICP-AES. Pro analýzu využívali naředění vzorku s destilovanou vodou v poměru 1 : 50 jak pro CRM, tak pro reálné vzorky plnotučného mléka. Výsledky analýzy CRM ukazuje Tabulka 7. Aby byl zjištěn vliv tuku na výsledky měření, byl proveden rozklad mléčné matrice a všechny výsledky byly porovnány v Tabulce 8.

Tabulka 7 Naměřené výsledky vzorku CRM bez mineralizace [26]

Minerální prvek	Sušené mléko - CRM	
	vzorek	CRM
	[g · kg ⁻¹]	[g · kg ⁻¹]
Ca	13,34 ± 0,12	13,49 ± 0,10
Na	4,38 ± 0,02	4,37 ± 0,03
K	17,72 ± 0,20	17,68 ± 0,19
Mg	1,296 ± 0,10	1,263 ± 0,60

Tabulka 8 Porovnání výsledků přímé analýzy mléka a jeho mineralizací [26]

Minerální prvek	Mléko		
	plnotučné 1 [mg · kg ⁻¹]	plnotučné 2 [mg · kg ⁻¹]	plnotučné 3 [mg · kg ⁻¹]
Ca	1212 ± 9 (1220 ± 12)	1291 ± 11 (1300 ± 12)	1189 ± 47 (1193 ± 49)
Na	669,2 ± 10,2 (665,3 ± 26,5)	751,3 ± 20,0 (761 ± 23,6)	591,7 ± 12,5 (585,2 ± 24,7)
K	1769 ± 12 (1790 ± 18)	1767 ± 61 (1780 ± 66)	1804 ± 56 (1799 ± 58)
Mg	128,5 ± 0,2 (122,3 ± 1,2)	118,1 ± 1,3 (120,7 ± 1,5)	121,2 ± 2,9 (118,3 ± 3,2)

Pozn: data v závorkách byly získány po mineralizaci vzorků mléka

Hodnoty certifikovaného materiálu se nijak zvlášť neliší od naměřených hodnot. Také nebyl prokázán vliv mléčného tuku na výsledky měření. Data uvedená v závorkách ukazují koncentrace minerálních látek ve vzorcích, které byly podrobeny rozkladu koncentrovanou kyselinou dusičnou za zvýšené teploty. Tyto hodnoty se shodují s těmi, které byly získány přímou analýzou mléka. Metoda proto byla vyhodnocena jako spolehlivá, jednoduchá, rychlá s nižším rizikem kontaminace či ztráty analytu [26].

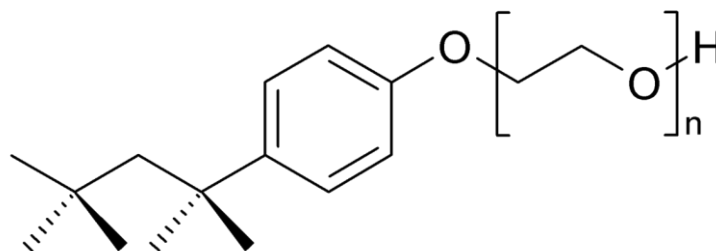
2.5.2. Rozklad matrice pomocí činidel

Pro omezení vlivu matrice vzorku mléka probíhali různé studie, které pro dosažení vhodných výsledků při analýze používaly různá *alkalická činidla*. Přídavek *tetramethylammonium hydroxidu* [38] nebo *Tritonu X-100* [26] má způsobit rozrušení mléčné matrice a uvolnění jednotlivých prvků navázaných hlavně v kaseinových bílkovinách mléka.

2.5.2.1. Triton X-100

Jednou z alternativ přípravy vzorku je úprava vzorku pomocí povrchově aktivních látek, jako je již zmiňovaný Triton X-100. Malý přídavek Tritonu X-100 k vhodně naředěnému vzorku slouží k uvolnění membrány obalující mléčný tuk a k zamezení srážení mléčných bílkovin.

Triton X-100 je běžně používaný v laboratořích jako neiontový detergent a je široce používán k lyzi buněk, při extrakci proteinů, organel nebo je využíván k izolaci membránových proteinů [26].



Obrázek 8 Triton X-100

Jeho účinek na matrici mléka byl zkoumán ve článku společně s přímou analýzou mléka, kdy ke 100 ml vhodně naředěného vzorku (1:50) bylo přidáno 100 μ l Tritonu X-100. Porovnání přímé analýzy bez Tritonu X-100 a s jeho přídavkem ukazuje Tabulka 9.

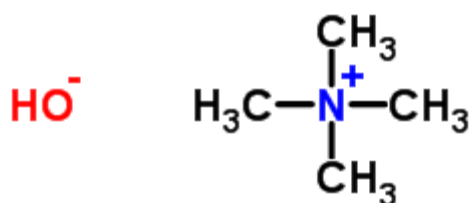
Tabulka 9 Porovnání analýz bez a s přídavkem Tritonu X-100 [26]

Minerální prvek	Plnotučné mléko	
	vzorek bez tritonu [mg · kg ⁻¹]	vzorek s tritonem [mg · kg ⁻¹]
Ca	1384 ± 45,5	1212 ± 9
Na	661,6 ± 39,8	669,2 ± 10,2
K	1833 ± 23	1769 ± 12
Mg	128,1 ± 3	128,5 ± 0,2

Vzorky mléka s přísávkem Tritonu X-100 vykazují oproti prostému ředění lepší reprodukovatelnost, ale výtěžnosti u vápníku a draslíku jsou nižší. Příprava vzorku mléka pomocí Tritonu X-100 je tak vhodná pouze pro analýzu některých prvků [26].

2.5.2.2. Tetramethylammonium hydroxid

Tetramethylammonium hydroxid, dále jen TMAH je silně alkalické, ve vodě rozpustné činidlo se schopností rozložení různých druhů tkání, chemických sloučenin a tvorbou komplexů s mnoha kovy. Ačkoli je TMAH z velké části používán v procesech, jako je plynová chromatografie, termochemolýza nebo extrakce, jeho využívání jako rozkladného činidla pro organické materiály, zejména u potravin, je velmi omezené. Jeho chemickou strukturu můžeme vidět na následujícím obrázku.



Obrázek 9 Tetramethylammonium hydroxid

Působení tetramethylammonium hydroxidu na vzorky sušeného mléka zkoumali ve své práci Ribeiro a kol. 2003 [38]. Pro rozklad matrice pomocí TMAH není potřeba příliš velké množství. Přísávkem 1 ml TMAH k 350 mg vzorku mléka a jeho následném zahřívání vzniká čirý, tmavě hnědý roztok, po naředění vhodný analýze. Výsledky měření certifikovaného materiálu ukazuje následující Tabulka 10.

Tabulka 10 Naměřené výsledky vzorku CRM pomocí činidla TMAH

Minerální prvek	Sušené mléko - CRM	
	vzorek [g · kg ⁻¹]	CRM [g · kg ⁻¹]
Ca	-	-
Na	4,37 ± 0,140	4,42 ± 0,33
K	18,10 ± 0,80	17,20 ± 1,00
Mg	1,07 ± 0,02	1,10 ± 0,08

Z tabulky můžeme vidět, že naměřené koncentrace prvků sodík a hořčík jsou shodné s hodnotami v certifikovaném materiálu. Draslík vykazuje poněkud vyšší koncentraci. Vápník v této práci nebyl u certifikovaného materiálu mléka analyzován.

Konečným ustanovením experimentu byla možná využitelnost navržené metody s použitím činidla TMAH a ICP-OES pro stanovení některých prvků ve vzorcích práškového mléka. Metoda je rychlá, snadná a reprodukovatelná. TMAH navíc podporuje úplnou solubilizaci vzorků a metoda je tak vhodná pro rutinní analýzu. Navíc je metoda TMAH méně náchylná ke kontaminaci nebo ke ztrátě analytu, zejména těkavých druhů. Na druhou stranu, TMAH představuje problémy s kontaminací některých analytů jako je K, který ke své analýze vyžaduje použití činidla s vysokým stupněm čistoty.

2.5.3. Rozklad vzorku

Při stanovení prvků v biologických i jiných materiálech destruktivními technikami je rozklad vzorku významnou analytickou operací. Smyslem této destruktivní techniky je získání vhodnější konzistence, zvýšení homogenity a snížení viskozity. Z chemického hlediska se tato úprava využívá zejména k uvolnění analytu z různých vazeb a forem a k odstranění složek, které mohou při měření interferovat [15].

2.5.3.1. Rozklad na mokré cestě

K rozkladu se používá nejčastěji minerálních kyselin, jejich směsí, či kyselin s přídavkem oxidačního činidla, nejčastěji peroxidu vodíku. Rozklad lze provádět za běžných podmínek jako *otevřený rozklad* (může být se zvýšenou teplotou za atmosferického tlaku) nebo jako *uzavřený rozklad*, který se provádí za zvýšené teploty a tlaku nejčastěji v mikrovlnných pecích.

Biologická matrice je oxidována příslušnými činidly. Nejprve je rozrušena struktura matrice kyselou hydrolýzou a její meziprodukty jsou následně oxidovány. Rozklad probíhá za nižších teplot než u suchého rozkladu, protože maximální teplota je určena bodem varu oxidačních činidel nebo jejich směsí. Čím má vzorek více tuku, tím je rozklad složitější [23].

Jako oxidačních činidel je nejčastěji využíváno samotné kyseliny dusičné, kyseliny sírové, chloristé nebo jejich reakčních směsí ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$).

U vysokotučných výrobků musí být použito více kyseliny dusičné [9]. Pro mléko se používá kyselina dusičná ve směsi s peroxidem vodíku v poměru 5 : 2. Vzorek mléka se s touto směsí zahřívá při 200 °C po dobu 4 hodin.

Složitou matici mléka je možno také rozrušit za použití lučavky královské (směs kyseliny chlorovodíkové a kyseliny dusičné v poměru 3:1). Vystavením mléka působením kyseliny dochází k vysrážení kaseinu a k oddělení syrovátky (žlutá tekutina bez vysráženého kaseinu) [28]. Pro rozrušení vzniklých sraženin se vzorek mléka namísto zahřívání nechá působit v ultrazvukové lázni. Tento způsob rozrušování se nazývá *sonikace*, což je proces při kterém dochází k destrukci buněčných stěn pomocí ultrazvukových vln. Po sonikaci vzniká čirý vzorek vhodný k analýze [27].

Mikrovlnné zpopelnění

Modernějším a rychlejším způsobem je mokřý rozklad v systému podporovaném mikrovlnným zářením. Tento rozklad je účinnější a rychlejší než klasický, protože k přenosu tepla dochází kondukcí a sáláním. Zvýšená teplota, která vzniká přímo v rozkladné směsi, urychluje chemické reakce, ale i pohyb částic vyvolaný mikrovlnným polem. Vlastní rozklad probíhá stejně jako při klasických metodách. Probíhá ve třech stupních a to: karbonizace, oxidace a rozklad látky.

Uzavřené tlakové nádoby jsou zhotoveny z chemicky odolných materiálů, které nekontaminují vzorky a které neabsorbují mikrovlnnou energii. Také nedochází ke kontaminaci vzorků přímo z atmosféry a k případným ztrátám lehce těkavých analytů při rozkladu [11, 23].

Mineralizací na mokré cestě nebo-li mikrovlnným rozkladem mléka se již zabývalo několik odborných článků a publikací. Odborníci zabývající se touto problematikou většinou používali k rozkladu mléčné matrice směs kyseliny dusičné s peroxidem vodíku. Jednotlivé mikrovlnné rozklady se tak liší právě ve zvoleném poměru již zmíněných kyselin a také v nastavení programu mikrovlnného systému.

Například Tang a kol. 2014 [11] rozložili matici vzorku působením kyseliny dusičné a peroxidu vodíku v poměru 6:1 a za použití nastavení mikrovlnného systému, které ukazuje Tabulka 11.

Tabulka 11 Optimalizace mikrovlnného systému [11]

Stupeň rozkladu	1.	2.
Teplota rozkladu [°C]	100	170
Výkon rozkladu [W]	1 000	1 000
Doba rozkladu [min]	10	10

Za výše uvedených podmínek byl analyzován vzorek certifikovaného referenčního materiálu (Tabulka 12).

Jako další možné podmínky rozkladu mohou být: 4 cykly s koncentrovanou kyselinou dusičnou skládající se z 1 minuty při 500 W a 10 minut při 0 W. Ve druhé části rozkladu je ke vzorku přidána směs kyseliny dusičné a peroxidu vodíku v celkovém poměru 2 : 1 a směs je znovu vystavena mikrovlnnému záření ve stejných cyklech do doby vzniku čirého roztoku [27].

Tabulka 12 Naměřené výsledky vzorku CRM pomocí mikrovlnného rozkladu [11]

Minerální prvek	Sušené mléko - CRM	
	vzorek [g · kg ⁻¹]	CRM [g · kg ⁻¹]
Ca	11,6 ± 0,8	10,2 ± 0,5
Na	4,89 ± 0,21	5,26 ± 0,17
K	17,7 ± 0,6	18,6 ± 0,5
Mg	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,05

Mikrovlnný rozklad se ukázal být neoptimálnější metodou přípravy vzorku mléka z hlediska přesnosti i rychlosti, a to hlavně v porovnání s jinými metodami rozkladu jako je například rozklad na suché cestě. O rozdílech mezi mikrovlnným rozkladem a metodou suchého rozkladu je pojednáváno v následující kapitole.

2.5.3.2. Rozklad na suché cestě

Klasický rozklad na suché cestě spočívá v oxidaci organické matrice atmosférickým kyslíkem za zvýšené teploty (nejčastěji 450–550 °C) a za atmosférického tlaku [11]. Vzorek se zahřívá tak dlouho, až se organický materiál zcela zmineralizuje. Spálením se má získat bílý popel. Suchý rozklad zpravidla trvá až několik desítek hodin, provádí se v křemenných, skleněných nebo platinových nádobkách a probíhá ve čtyřech fázích: sušení, zuhelnění, zpopelnění a loužení popela [37]. První tři fáze mohou být realizovány v jednom zařízení (elektrická pec) nebo různých zařízení (sušárna, infralampa, topná deska, pec).

Tekuté výrobky se nejdříve odpaří a vysuší. Zuhelnění se pak nejčastěji provádí na topné desce nebo přímo v elektrické peci. Po ochlazení se používají zředěné minerální látky (kyselina dusičná). Obsah misky se zahřeje na vroucí lázni, tím se zvýší účinnost loužení a zfiltruje se. Filtrační papír se zbytkem analytu se vloží do původní misky a opět se vysuší, spálí a vyžihá. Druhý podíl popela se opět vylouží zředěnou minerální kyselinou, zfiltruje a smíchá s prvním filtrátem. Podle potřeby lze spojené filtráty odpařit na menší objem, poté jsou využity k vlastnímu stanovení prvků [15, 36].

U složitějších látek živočišného původu obsahuje popel mimo oxidy a bazické soli také zkoksovatělý uhlík, který není spalitelný ani v přítomnosti kyseliny dusičné a rozklad je pak nedokonalý. Po vytavení popela organického vzorku s uhličitánem sodným se minerální součásti extrahují zředěnou HCl [23].

Předmětem zkoumání článku stejných autorů zabývajících se mikrovlnným rozkladem byl také rozklad na suché cestě. Vzorek certifikovaného materiálu sušeného mléka (0,5 g) byl mineralizován v peci při 450–500°C po dobu 8 hodin. Získaný bílý popel byl vyloužen koncentrovanou kyselinou dusičnou a směs byla opět mineralizována v peci 4 hodiny. Mineralizovaný popel byl poté rozpuštěn v 1–2 ml 2% koncentrované kyselině dusičné a následně zfiltrován. Výsledné hodnoty takto upraveného vzorku jsou uvedeny v Tabulce 13 [11].

Tabulka 13 Naměřené výsledky vzorku CRM pomocí suchého rozkladu [11]

Minerální prvek	Sušené mléko - CRM	
	vzorek [g · kg ⁻¹]	CRM [g · kg ⁻¹]
Ca	10,7 ± 0,9	10,2 ± 0,5
Na	4,26 ± 0,19	5,26 ± 0,17
K	15,8 ± 0,8	18,6 ± 0,5
Mg	1,1 ± 0,1	1,30 ± 0,05

Podle naměřených hodnot ve vzorku se zjistilo, že v některých případech se nalezené hodnoty tak úplně neshodují s hodnotami v certifikovaném materiálu. Jedná se především o Na, K a Mg, jejichž koncentrace jsou, zejména u K, značně podhodnocené.

Tabulka 14 Porovnání naměřených hodnot CRM u suchého a mikrovlnného rozkladu [11]

Minerální prvek	Sušené mléko - CRM		
	suchý rozklad [g · kg ⁻¹]	mokrý rozklad [g · kg ⁻¹]	CRM [g · kg ⁻¹]
Ca	10,7 ± 0,9	11,6 ± 0,8	10,2 ± 0,5
Na	4,26 ± 0,19	4,89 ± 0,21	5,26 ± 0,17
K	15,8 ± 0,8	17,7 ± 0,6	18,6 ± 0,5
Mg	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,30 ± 0,05

Tabulka 14 ukazuje rozdíl mezi suchým a mikrovlnným rozkladem. Kromě Ca suchá metoda vykazuje horší výsledky, než je tomu u mikrovlnného rozkladu. Metoda suchého rozkladu tak byla díky menší přesnosti, větší složitosti a časové náročnosti vyhodnocena jako méně vhodná.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Vzorek a metoda

Diplomová práce navazuje na bakalářskou práci, kde byly taktéž ověřovány jednotlivé metody pro přípravu vzorku mléka. V experimentální části diplomové práce byly znovu proměřeny a porovnány vybrané metody úpravy vzorků z předchozí práce. Dále byly vybrány a vyzkoušeny nové způsoby přípravy vzorků mléka k následné elementární analýze pomocí ICP-OES.

Vzorky byly připraveny několika různými způsoby. Z literatury byly vybrány následující postupy přípravy vzorku:

- prosté ředění,
- mikrovlnný rozklad na mokré cestě,
- rozklad pomocí činidla Tritonu-X100 a
- rozklad pomocí činidla TMAH.

V teoretické části této práce jsou uvedené ještě další způsoby příprav vzorků mléka. Jedná se především o *mineralizaci na mokré a suché cestě*.

Mineralizace na mokré cestě nebyla ze zkušeností z měření v bakalářské práci znovu opakována. Při přípravě vzorků mléka totiž nastaly jisté komplikace, kdy při pokusu o rozložení matrice lučavkou královskou došlo ke srážení bílkovin a k vytvoření emulze. Během následné sonikace se nepodařilo sraženinu rozložit, ve vzorku byly patrné tukové částice a vzorek tak nebylo možné stanovit. Účinnějším způsobem by zřejmě bylo použití jiné směsi kyselin, např. $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ a dokončení rozkladu mléčné matrice v peci za zvýšené teploty. Tento rozklad je už ale časově náročnější (literatura uvádí až 4 hodiny) a proto není tento postup předmětem zkoumání této diplomové práce, která má za úkol nalezení jednoduché, přesné a hlavně časově nenáročné metody.

Ze stejných důvodů nebyla pro analýzu mléka vybrána mineralizace na mokré cestě, která je kromě své časové náročnosti (minimálně 6 hodin) mnohem náchylnější ke kontaminaci vzorku a ztrátě analytu díky svým vysokým teplotám.

3.1.1. Typy vzorků

K experimentu byly použity celkem tři různé druhy mléka. Mléko odstředěné s nejnižším obsahem tuku, a to méně než 0,5 %, dále bylo k analýze použito mléko polotučné s obsahem tuku 1,5 % a mléko plnotučné obsahující 3,5 % tuku, všechny od firmy Madeta. K ověření spolehlivosti vybraných metod úpravy vzorku byl použit certifikovaný referenční materiál sušeného mléka ERM-BD 150.

3.1.2. Nastavení metody ICP-OES

Před analýzou je nutné nastavení základních parametrů metody. Je třeba optimalizovat zejména průtok plynů, výkon plazmatu, výšku pozorování, výběr vlnových délek pro jednotlivé prvky apod. Jednotlivé parametry mohou významně ovlivňovat míru možných interferencí. Přehled základních optimalizovaných parametrů přístroje ukazuje následující Tabulka 15.

Tabulka 15 Nastavení přístroje ICP-OES

Přístroj	Opticky emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem, model Ultima 2, HORIBA Scientific Ltd.
Průtok argonu [$l \cdot \text{min}^{-1}$]	14,0 (plazmový plyn) 0,8 (pomocný plyn)
Zmlžovač	Typ „Mainhart“
Mlžná komora	Cyklonová
Rychlost otáček peristaltického čerpadla [rpm]	18
Tlak na zmlžovači [bar]	3
Výkon generátoru [W]	1300

Míra vlivu kolísání úrovně jednotlivých parametrů na výsledek analytického stanovení byla prověřena *testem robustnosti*. Termín robustnost analytické metody je schopnost zachovat si svoji funkčnost navzdory mírnému narušení či odchýlkám a změnám parametrů metody [39, 40].

V testu byly při analýze vyzkoušeny pozmeněné parametry (průtoky plynů, tlak, výkon generátoru atd.) a jejich kombinace. Při robustnosti bylo matematicko-statistickým postupem určeno, jak je analytický signál závislý na malých změnách parametrů. Výsledky testu ukázaly, že změnou daných parametrů metoda u většiny prvků poskytuje stále správné a přesné výsledky.

3.1.3. Vlnové délky

Vlnové délky pro každý prvek byly získány z normy ČSN EN ISO 11885 zabývající se stanovením prvků pomocí ICP-OES [33]. Pík analytu bývá obvykle ovlivněn maticí vzorku, proto standardy jednotlivých prvků byly jednotlivě proměřovány v napodobené reálné matici při různých vlnových délkách. Pomocí vzhledu píku a jeho okolí byly vybrány nejvhodnější vlnové délky ke každému prvku. Hodnoty těchto vybraných vlnových délek jsou uvedeny v Tabulce 16.

Tabulka 16 Vlnové délky prvků

Prvek	Vlnová délka [nm]
Ca	422,673
Na	588,900
K	766,490
Mg	285,213

3.2 Laboratorní vybavení

3.2.1. Chemikálie a vzorky

- Ultračistá neionizovaná voda vyrobena ELGA PureLab Classic; Veolia Water Systems LTD., UK;
- HNO₃ – Kyselina dusičná 67%, p.a.+; Analytika Praha spol. s.r.o., ČR;
- H₂O₂ – Peroxid vodíku 30%, kvalita p.a.; Analytika Praha spol. s.r.o., ČR;
- HCl – Kyselina chlorovodíková 37%, kvalita p.a.+; Analytika Praha spol. s.r.o., ČR;
- H₂SO₄ – Kyselina sírová 97%, kvalita p.a.+; Analytika Praha spol. s.r.o., ČR;
- Triton X-100; Sigma-Aldrich Praha spol. s.r.o., ČR;
- Tetramethylammonium hydroxide, 25 wt. v H₂O, Sigma-Aldrich Praha spol. s.r.o., ČR;
- Kalibrační roztoky ASTASOL, koncentrace 1,000 ± 0,002 g · l⁻¹; Analytika Praha spol. s.r.o., ČR;
- Kalibrační roztoky ASTASOL, koncentrace 10 000 ± 20 mg · l⁻¹; Analytika Praha spol. s.r.o., ČR;
- CRM – Certifikovaný referenční materiál, Skimmed milk powder ERM-BD 150
- Mléko odstředěné trvanlivé, MADATA 0,5 %;
- Mléko polotučné trvanlivé, MADETA 1,5 %;
- Mléko plnotučné trvanlivé, MADETA 3,5 %.

3.2.2. Přístroje

Při práci v laboratoři bylo využíváno těchto zařízení:

- optický emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem, model Ultima 2; HORIBA Scientific Ltd., FR;
- mikrovlnné zařízení – High performance microwave digestion unit, MILESTONE 1200 mega;
- analytické váhy AND HA-202M; A&D Company, JAP;
- topná deska ETA 2107;
- ultrazvuková lázeň – Ultrasonic Compact cleaner PSO 3000A; PowerSonic s.r.o.
- filtrační papír – Munktell, Ahlstrom, 5-8 μm.

3.2.3. Používané pomůcky

V laboratoři bylo využíváno následující vybavení:

- běžné laboratorní sklo;
- plastové odměrné baňky a kádinky;
- plastové zkumavky;
- automatické pipety a mikropipety.

3.3 Analýza vzorků mléka

Pro prvkovou analýzu mléka byly použity vzorky plnotučného, polotučného a odstředěného mléka. Ověření správnosti laboratorních postupů a výsledků bylo provedeno pomocí certifikovaného referenčního materiálu. Pro tuto analýzu byl použit vzorek odstředěného sušeného mléka (Skimmed milk powder ERM-BD 150).

3.3.1. Metoda prostého ředění vzorku

Metoda spočívá v přímém dávkování kapalného vzorku mléka do optického spektrometru pomocí následujících postupů.

3.3.1.1. Příprava vzorku certifikovaného materiálu mléka

Asi 0,1 g vzorku certifikovaného sušeného mléka bylo zváženo s přesností na čtyři desetinná místa a převedeno do odměrné baňky na 50 ml. Odměrná baňka byla následně doplněna po rysku destilovanou vodou a řádně promíchána až do úplného rozpuštění mléka. Rozpuštěný vzorek byl následně změřen pomocí ICP-OES.

3.3.1.2. Příprava reálných vzorků mléka

Přibližně 1 ml vzorků plnotučného, polotučného a odstředěného mléka bylo převedeno do odměrných baněk na 100 ml a zváženo s přesností na čtyři desetinná místa. Všechny odměrné baňky se vzorky byly následně doplněny po rysku destilovanou vodou, promíchány a změřeny pomocí ICP-OES.

3.3.1.3. Příprava kalibrační křivky

Pro kalibrační křivku byly připraveny tři 25 ml odměrné baňky vodných standardů o koncentracích 1, 20 a 50 mg · l⁻¹. Jako *blank* sloužila čistá destilovaná voda (0 mg · l⁻¹). Do první odměrné baňky bylo pipetováno 25 μl (1 mg · l⁻¹), do druhé 500 μl (20 mg · l⁻¹) a do třetí odměrné baňky 1,25 ml (50 mg · l⁻¹) z každého kalibračního roztoku (Ca, Na, K a Mg). Všechny odměrné baňky byly poté doplněny po rysku destilovanou vodou, řádně promíchány a následně dávkovány do ICP-OES.

3.3.2. Metoda prostého ředění vzorku s přidavkem Tritonu X-100

Jedná se o metodu, která je shodná s metodou přímé analýzy s jediným rozdílem, a tím je přidavek Tritonu X-100.

3.3.2.1. Příprava vzorku certifikovaného materiálu mléka

Přibližně 0,1 g vzorku certifikovaného sušeného mléka bylo převedeno do odměrné baňky na 50 ml a zváženo s přesností na čtyři desetinná místa. Odměrná baňka byla doplněna téměř po rysku destilovanou vodou a poté bylo přidáno 100 μl Tritonu X-100. Vzorek mléka byl nakonec řádně promíchán a proměřen v ICP-OES.

3.3.2.2. Příprava reálných vzorků mléka

Asi 1 ml vzorků plnotučného, polotučného a odstředěného mléka bylo převedeno do 100 ml odměrných baněk a zváženo s přesností na čtyři desetinná místa. Ke vzorkům bylo přidáno 200 μl Tritonu X-100. Všechny odměrné baňky se vzorky byly následně doplněny po rysku destilovanou vodou, promíchány a změřeny pomocí ICP-OES.

3.3.2.3. Příprava kalibrační křivky

Pro kalibrační křivku byly připraveny tři 25 ml odměrné baňky vodných standardů o koncentracích 1, 20 a 50 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Jako *blank* sloužila čistá destilovaná voda (0 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Do první odměrné baňky bylo pipetováno 25 μl (1 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$), do druhé 500 μl (20 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) a do třetí odměrné baňky 1,25 ml (50 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) z každého kalibračního roztoku (Ca, Na, K a Mg). Ke vzorkům bylo přidáno 50 μl Tritonu X-100. Všechny odměrné baňky byly poté doplněny po rysku destilovanou vodou, řádně promíchány a následně dávkovány do ICP-OES.

3.3.3. Metoda rozkladu vzorku za použití TMAHu

3.3.3.1. Příprava vzorku certifikovaného materiálu mléka

Přibližně 0,15 g vzorku certifikovaného sušeného mléka bylo převedeno do skleněné kádinky a zváženo s přesností na čtyři desetinná místa. Sušený vzorek byl nejprve rozpuštěn v 1000 μl destilované vody. Poté bylo k rozpuštěnému vzorku přidáno 1000 μl 25% TMAHu. Kádinka se vzorkem sušeného mléka byla zahřívána ve vodní lázni při 80 C za současného míchání po dobu 30 minut. Po vzniku tmavě hnědého čirého roztoku byl vzorek převeden do odměrné baňky na 50 ml a doplněn po rysku destilovanou vodou. Vzorek mléka byl nakonec řádně promíchán a proměřen v ICP-OES.

3.3.3.2. Příprava reálných vzorků mléka

Asi 2 ml vzorku plnotučného, polotučného a odstředěného mléka bylo převedeno do skleněné kádinky a zváženo s přesností na čtyři desetinná místa. K jednotlivým vzorkům mléka bylo přidáno 2000 μl 25% TMAH. Kádinka se vzorkem sušeného mléka byla zahřívána ve vodní lázni při 80 C za současného míchání po dobu 30 minut. Po vzniku hnědých roztoků byly vzorky převedeny do odměrných baněk na 100 ml. Všechny tyto odměrné baňky byly následně doplněny po rysku destilovanou vodou, promíchány a změřeny pomocí ICP-OES.

3.3.3.3. Příprava kalibrační křivky

Pro kalibrační křivku byly připraveny tři 25 ml odměrné baňky vodných standardů o koncentracích 1, 20 a 50 mg · l⁻¹. Jako *blank* sloužila čistá destilovaná voda (0 mg · l⁻¹). Do první odměrné baňky bylo pipetováno 25 µl (1 mg · l⁻¹), do druhé 500 µl (20 mg · l⁻¹) a do třetí odměrné baňky 1,25 ml (50 mg · l⁻¹) z každého kalibračního roztoku (Ca, Na, K a Mg). Ke vzorkům bylo přidáno 500 µl TMAHu. Všechny odměrné baňky byly poté doplněny po rysku destilovanou vodou, řádně promíchány a následně dávkovány do ICP-OES.

3.3.4. Metoda mikrovlnného mokrého rozkladu

3.3.4.1. Příprava vzorku certifikovaného materiálu mléka

Do rozkladných vysokotlakých nádob bylo naváženo přibližně 0,15 g vzorku CRM. K této navážce byly následně přidány 3 ml kyseliny dusičné a 1 ml peroxidu vodíku. Vzorek byl utěsněn a vložen do mikrovlnného zařízení. Rozklad probíhal v 5 stupních podle nastavení programu uvedeného v Tabulce 17. Po uplynutí doby mineralizace byly nádoby vyjmuty z mineralizačního zařízení a ke vzorku bylo opět přidáno stejné množství kyseliny dusičné a peroxidu vodíku. Vzorek byl znovu mineralizován za stejných podmínek. Po skončení druhé části rozkladu byl obsah nádobky se vzorkem kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky, doplněn po rysku předem připraveným roztokem 2% HNO₃ a dávkován do ICP-OES.

Tabulka 17 Nastavení mikrovlnného systému

Stupeň rozkladu	1.	2.	3.	4.	5.
Výkon rozkladu [W]	500	1 000	500	1 000	ventilace
Doba rozkladu [min]	5	5	5	10	5

3.3.4.2. Příprava reálných vzorků mléka

Asi 0,5 g vzorku plnotučného, polotučného a odstředěného mléka bylo naváženo do rozkladných vysokotlakých nádob. Následně bylo postupováno stejným způsobem jako při rozkladu certifikovaného materiálu.

3.3.4.3. Příprava kalibrační křivky

Pro kalibrační křivku byly připraveny dvě 25 ml odměrné baňky o koncentracích 20 a 40 mg · l⁻¹. Do první odměrné baňky bylo pipetováno 500 µl (20 mg · l⁻¹) a do druhé 1 000 µl (40 mg · l⁻¹) z každého kalibračního roztoku (Ca, Na, K a Mg). Ke standardům byly přidány 3 ml kyseliny dusičné a 1 ml peroxidu vodíku. Jako *blank* sloužil roztok 3 ml kyseliny dusičné a 1 ml peroxidu vodíku. Všechny tři odměrné baňky byly poté doplněny po rysku 2% kyselinou dusičnou, řádně promíchány a následně dávkovány do ICP-OES.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Všechny vzorky byly použity a připraveny pomocí vybraných metod, které jsou zmíněny v kapitole 2.5 a jejichž postup je podrobně popsán v kapitole 3.3.

4.1 Analýza ředěného vzorku mléka

Jednotlivé vzorky mléka, naředěné v poměru 1:100, byly přímo analyzovány pomocí metody ICP-OES. Všechny získané výsledky byly následně vyhodnoceny a zobrazeny v Tabulce 18.

Tabulka 18 Výsledné hodnoty obsahu minerálních látek bez úpravy mléka

Minerální prvek	Mléko		
	plnotučné	polotučné	odstředěné
	[mg · kg ⁻¹]	[mg · kg ⁻¹]	[mg · kg ⁻¹]
Ca	1039 ± 44	1055 ± 45	1117 ± 39
Na	428 ± 15	429 ± 13	443 ± 10
K	1059 ± 88	1099 ± 78	1133 ± 79
Mg	239 ± 4	240 ± 9	247 ± 8

CRM lze obecně označit za vzorky se známým obsahem stanovovaných složek. Proto byla přesnost výsledků ověřena jeho analýzou, jejíž výsledky ukazuje následující Tabulka 19.

Tabulka 19 Výsledné hodnoty certifikovaného materiálu bez úpravy mléka

Minerální prvek	Sušené mléko - CRM		
	vzorek	CRM	výtěžnost
	[g · kg ⁻¹]	[g · kg ⁻¹]	[%]
Ca	11,82 ± 0,95	13,90 ± 0,80	85,03
Na	4,02 ± 0,18	4,18 ± 0,19	96,20
K	15,26 ± 0,81	17,00 ± 0,70	89,80
Mg	1,69 ± 0,21	1,26 ± 0,10	126,29

Mléko obsahuje organické a anorganické látky. Tyto látky se nacházejí v mléce v různých formách: v mléčném séru v podobě rozpustných solí (pravý roztok), nebo v koloidní formě, případně jsou vázány na organické složky mléka. Některé prvky jsou součástí organických sloučenin, jako jsou bílkoviny, tuky, sacharidy nebo nukleové kyseliny [12].

Z výsledků shrnutých v Tabulce 19 vyplývá, že stanovení vybraných prvků v mléce po úpravě vzorku prostým ředěním demineralizovanou vodou je poměrně nepřesné. Porovnáním naměřených koncentrací sledovaných makroprvků v certifikovaném materiálu a koncentracemi uvedenými v certifikačním listu lze konstatovat, že uspokojivých výsledků bylo dosaženo pouze v případě stanovení sodíku. Kromě koncentrace hořčiku, která byla přímou analýzou certifikovaného materiálu nadhodnocena, byly všechny stanovené koncentrace ostatních sledovaných prvků nižší v porovnání s certifikovanou hodnotou. Podhodnocení naměřených koncentrací vápníku a draslíku může být způsobeno vazbou těchto prvků na bílkovinnou a tukovou složku mléka. Protože pouhým naředěním vzorku nejsou bílkovinná ani tuková složka mléka narušena, mohou být tyto složky včetně některých navázaných prvků ze vzorku odstraněny v mlžné komoře ICP-OES. Bílkovinné a tukové molekuly mají větší hmotnost a mohou být tak odváděny jako odpad z cyklonové mlžné komory. Do indukčně vázané plazmy se potom dostanou jen částice ve formě jemného aerosolu, což může mít za následek pokles stanovených koncentrací sledovaných makroprvků.

Tabulka 18 ukazuje naměřené koncentrace sledovaných makroprvků v reálných vzorcích mléka. Rozdíl mezi koncentracemi jednotlivých prvků v mléce s různým obsahem tuku byl statisticky nevýznamný ($P > 0,05$), nicméně jak bude diskutováno dále v práci, celková koncentrace jednotlivých prvků byla nižší v porovnání s nejpřesnější použitou metodou (úprava vzorku pomocí TMAH, statisticky významný rozdíl na hladině spolehlivosti $\alpha = 0,05$). Podhodnocení naměřených koncentrací v reálných vzorcích mléka může být způsobeno již popsaným vlivem matrice mléka (bílkoviny, tuky). V literatuře není vliv agregace makroprvků s bílkovinou složkou mléka a z toho vznikající problémy při analýze pomocí ICP-OES dostatečně diskutován. Vliv obsahu tuku na měření studovali Murcia a kol. 1999 [26], kteří dospěli k názoru, že obsah tuku v mléce nemá vliv na stanovení makroprvků v mléce pomocí spektroskopických technik.

4.2 Analýza ředěného vzorku mléka s přídavkem Tritonu X-100

Podobných výsledků jako při analýze zředěného mléka bylo dosaženo pomocí přípravy vzorku mléka před měřením přídavkem povrchově aktivní látky Triton X-100. Výsledky analýzy tučného, polotučného a odstředěného mléka jsou shrnuty v Tabulce 20 a výsledky certifikovaného materiálu v Tabulce 21.

Tabulka 20 Výsledné hodnoty obsahu minerálních látek s přidavkem Tritonu X-100

Minerální prvek	Mléko		
	plnotučné	polotučné	odstředěné
	[mg · kg ⁻¹]	[mg · kg ⁻¹]	[mg · kg ⁻¹]
Ca	912 ± 28	969 ± 31	1013 ± 29
Na	245 ± 9	252 ± 10	277 ± 9
K	887 ± 51	961 ± 49	966 ± 49
Mg	128 ± 4	133 ± 6	137 ± 5

Přídavek Tritonu X-100 zlepšil přesnost stanovení hořčíku (výťažnost R = 99 %), nicméně jako v případě úpravy vzorku mléka prostým ředěním vodou, koncentrace ostatních makroprvků byly významně podhodnoceny. Koncentrace stanovených makroprvků v reálných vzorcích mléka pomocí úpravy vzorku Tritonem X-100 byla také nižší v porovnání s koncentracemi stanovenými po ředění vzorku mléka vodou. K podhodnocení stanovených koncentrací mohlo dojít díky značné pěnovitosti způsobené přidavkem Tritonu X-100 do vzorku. Vzorky s přidavkem tohoto činidla tak nemusely být doplněny přesně po rysku v odměrné baňce.

Tabulka 21 Výsledné hodnoty certifikovaného materiálu s přidavkem Tritonu X-100

Minerální prvek	Sušené mléko - CRM		
	vzorek	CRM	výťažnost
	[g · kg ⁻¹]	[g · kg ⁻¹]	[%]
Ca	11,56 ± 0,55	13,90 ± 0,80	83,22
Na	3,70 ± 0,11	4,18 ± 0,19	88,49
K	13,45 ± 0,61	17,00 ± 0,70	79,09
Mg	1,24 ± 0,08	1,26 ± 0,10	99,01

Analýzou vzorků mléka po přidavku Tritonu X-100 se také zabývali Murcia a kol. 1999 [26]. Tito autoři v tomto případě dosáhli podobných výsledků v porovnání s touto diplomovou prací, kdy s přidavkem Tritonu X-100 stanovili vyšší koncentrace sodíku a hořčiku a poněkud nižší koncentrace vápníku a draslíku v mléce než při úpravě vzorku ředěním vodou.

4.3 Analýza mléka pomocí činidla TMAH

Rozrušení mléčné matrice bylo v této metodě dosaženo pomocí alkalického činidla TMAH a jeho zahřívání. Naměřené hodnoty jsou vidět v následujících Tabulce 22 a 23.

Tabulka 22 Výsledné hodnoty obsahu minerálních látek s činidlem TMAH

Minerální prvek	Mléko		
	plnotučné	polotučné	odstředěné
	[mg · kg ⁻¹]	[mg · kg ⁻¹]	[mg · kg ⁻¹]
Ca	1714 ± 64	1671 ± 65	1731 ± 69
Na	354 ± 11	377 ± 13	391 ± 11
K	1513 ± 75	1616 ± 78	1659 ± 79
Mg	127 ± 8	121 ± 9	137 ± 6

Tabulka 23 Výsledné hodnoty certifikovaného materiálu s činidlem TMAH

Minerální prvek	Sušené mléko - CRM		
	vzorek	CRM	výtěžnost
	[g · kg ⁻¹]	[g · kg ⁻¹]	[%]
Ca	13,85 ± 0,81	13,90 ± 0,80	99,67
Na	4,89 ± 0,21	4,18 ± 0,19	114,83
K	17,94 ± 0,67	17,00 ± 0,70	105,53
Mg	1,23 ± 0,09	1,26 ± 0,10	97,71

Úpravou vzorku mléka pomocí TMAH bylo dosaženo nejpřesnějších výsledků. Stanovená výtěžnost po analýze certifikovaného materiálu se pohybovala v rozmezí 97-114 %. Nadhodnocení koncentrace sodíku ($R = 114 \%$), popřípadě draslíku ($R = 106 \%$) mohlo být způsobeno silně alkalickým pH použitého činidla TMAH. Vzhledem k tomu, že během analýzy byly použity skleněné odměrné baňky a také zmlžovač a mlžná komora u ICP-OES byly vyrobeny ze skla, mohlo dojít k vyluhování sodíku ze struktury skla a k ovlivnění naměřených výsledků. Tento problém by bylo možné vyřešit použitím plastových odměrných baněk, jiného typu zmlžovače a teflonové mlžné komory. Koncentrace makroprvků v reálných vzorcích mléka stanovených po úpravě vzorku mléka činidlem TMAH se v porovnání s ostatními koncentracemi stanovenými po úpravě vzorku mléka ředěním nebo Tritonem X-100 liší až o 50 %, převážně u vápníku a draslíku. Celkově vyšší stanovené koncentrace makroprvků ve vzorcích mléka po úpravě TMAH naznačují, že díky agresivnímu prostředí došlo k rozrušení vazeb makroprvků na bílkoviny nebo tuky v mléčné matrici.

Přípravou vzorků mléka pomocí TMAH před měřením pomocí spektroskopických metod se také zabývali Ribeiro a kol. 2003 [38], kteří také tuto metodu vyhodnotili jako přesnou a vhodnou pro analýzu některých prvků.

4.4 Analýza mléka pomocí mikrovlnného rozkladu

Poslední testovanou metodou přípravy vzorku mléka pro stanovení makroprvků metodou ICP-OES byl mikrovlnný rozklad s použitím minerálních kyselin. Výsledky dosažené touto metodou jsou shrnuty v Tabulce 24 a v Tabulce 25. Analýzou certifikovaného materiálu pomocí této metody bylo dosaženo dobré výtěžnosti pro vápník a sodík ($R = 92-95 \%$), výtěžnost pro draslík a hořčík však byla nižší ($R = 83-88 \%$). Nižší výtěžnosti draslíku a hořčíku mohou být způsobeny nedokonalou optimalizací mikrovlnného rozkladného programu. Mikrovlnná rozkladná pec byla k dispozici až k samotnému konci této diplomové práce (duben 2017), tím pádem bylo pro optimalizaci celého procesu méně času.

Vzhledem k tomu, že Tang a kol. 2014 [11] doporučují mikrovlnný rozklad jako nejlepší přípravu vzorku před analýzou pomocí ICP-OES, lze předpokládat, že po optimalizaci by bylo dosaženo podobných výsledků jako v případě úpravy vzorku mléka pomocí TMAH.

Tabulka 24 Výsledné hodnoty obsahu minerálních látek pomocí mikrovlnného rozkladu

Minerální prvek	Mléko		
	plnotučné	polotučné	odstředěné
	[mg · kg ⁻¹]	[mg · kg ⁻¹]	[mg · kg ⁻¹]
Ca	1479 ± 54	1483 ± 55	1476 ± 61
Na	230 ± 14	241 ± 13	242 ± 11
K	860 ± 38	815 ± 39	859 ± 37
Mg	94 ± 5	95 ± 9	91 ± 5

Tabulka 25 Výsledné hodnoty certifikovaného materiálu pomocí mikrovlnného rozkladu

Minerální prvek	Sušené mléko - CRM		
	vzorek	CRM	výtěžnost
	[g · kg ⁻¹]	[g · kg ⁻¹]	[%]
Ca	13,22 ± 0,72	13,90 ± 0,80	95,11
Na	3,85 ± 0,21	4,18 ± 0,19	92,11
K	14,20 ± 0,67	17,00 ± 0,70	83,53
Mg	1,12 ± 0,09	1,26 ± 0,10	88,89

Nižší výtěžnosti zjištěné při analýze certifikovaného materiálu se projevili také při analýze reálných vzorků mléka. Stanovené koncentrace makroprvků byly sice vyšší než v případě analýzy mléka po úpravě ředěním, nebo po úpravě Tritonem X-100, nicméně v porovnání s nejúčinnější metodou přípravy vzorku pomocí TMAH byly stále nízké.

Všechny výsledky metod příprav vzorků certifikovaného materiálu byly shrnuty do Tabulky 26 a výsledky všech příprav odstředěného mléka do Tabulky 27. Výsledky analyzovaných prvků jsou jednotlivě okomentovány v následujících kapitolách.

Tabulka 26 Přehled výsledných hodnot certifikovaného materiálu všech typů příprav vzorku

Sušené mléko - CRM					
Minerální prvek	přímá analýza	Triton X-100	TMAH	mikrovltný rozklad	CRM
	[g · kg⁻¹]	[g · kg⁻¹]	[g · kg⁻¹]	[g · kg⁻¹]	[g · kg⁻¹]
Ca	11,82 ± 0,95	11,56 ± 0,55	13,85 ± 0,81	13,22 ± 0,41	13,90 ± 0,80
Na	4,02 ± 0,18	3,70 ± 0,11	4,89 ± 0,21	3,85 ± 0,15	4,18 ± 0,19
K	15,26 ± 0,81	13,45 ± 0,61	17,94 ± 0,67	14,20 ± 0,52	17,00 ± 0,70
Mg	1,69 ± 0,21	1,24 ± 0,08	1,23 ± 0,09	1,12 ± 0,10	1,26 ± 0,10

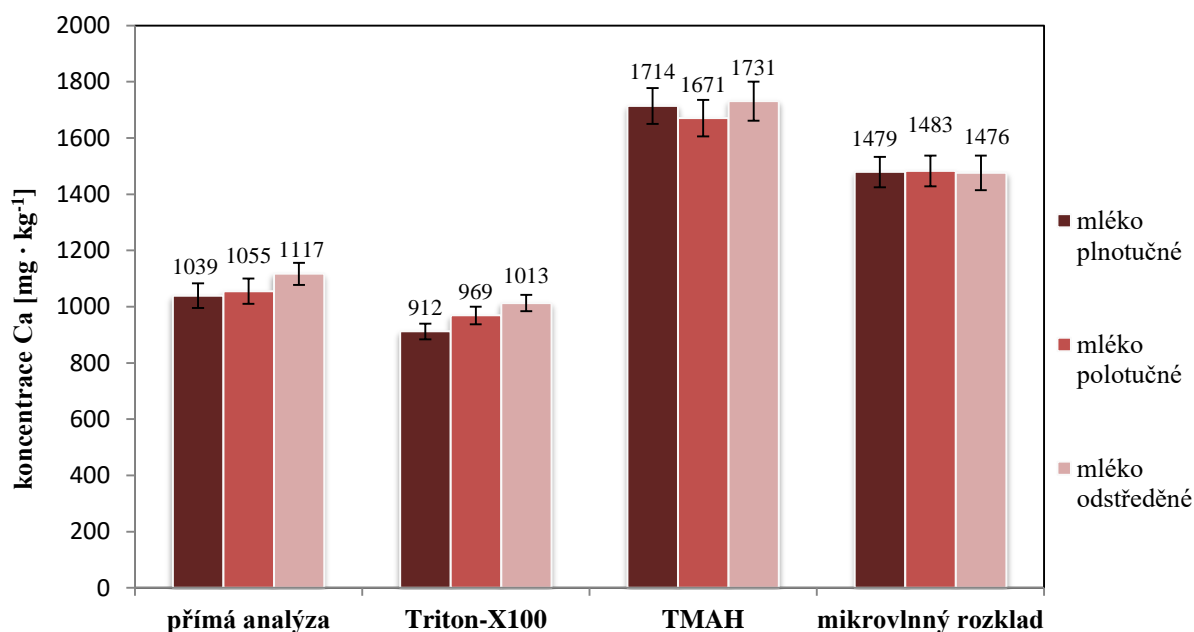
Tabulka 27 Přehled výsledných hodnot odstředěného mléka pro všechny typy příprav vzorku

Odstředěné mléko				
Minerální prvek	přímá analýza	Triton X-100	TMAH	mikrovltný rozklad
	[mg · kg⁻¹]	[mg · kg⁻¹]	[mg · kg⁻¹]	[mg · kg⁻¹]
Ca	1117 ± 39	1013 ± 29	1731 ± 69	1476 ± 61
Na	443 ± 10	277 ± 9	391 ± 11	242 ± 11
K	1133 ± 79	966 ± 49	1659 ± 79	859 ± 37
Mg	247 ± 8	137 ± 5	137 ± 6	91 ± 5

4.5 Prvky

4.5.1. Vápník

Prvková analýza vzorků mléka ukázala, že ze stanovovaných prvků mléko obsahovalo nejvíce vápníku. Koncentrace vápníku u všech reálných vzorků připravených čtyřmi odlišnými metodami jsou zobrazeny v Grafu 1. V literatuře se udává obsah tohoto prvku v rozmezí 1070–1330 mg · kg⁻¹ [24]. Naměřené koncentrace vápníku u *přímé analýzy bez a s přidavkem Tritonu X-100* se pohybují v dolní hranici tohoto intervalu. Výjimku tvoří *metoda TMAH a mikrovlnný rozklad*, při které bylo naměřeno 1731 ± 69 mg · kg⁻¹ a 1476 ± 61 mg · kg⁻¹ vápníku u odstředěného mléka. Tyto hodnoty se již pohybují nad horní hranici tabelovaných hodnot. Nicméně, jak bylo diskutováno výše, tyto metody by měly být nepřesnější.

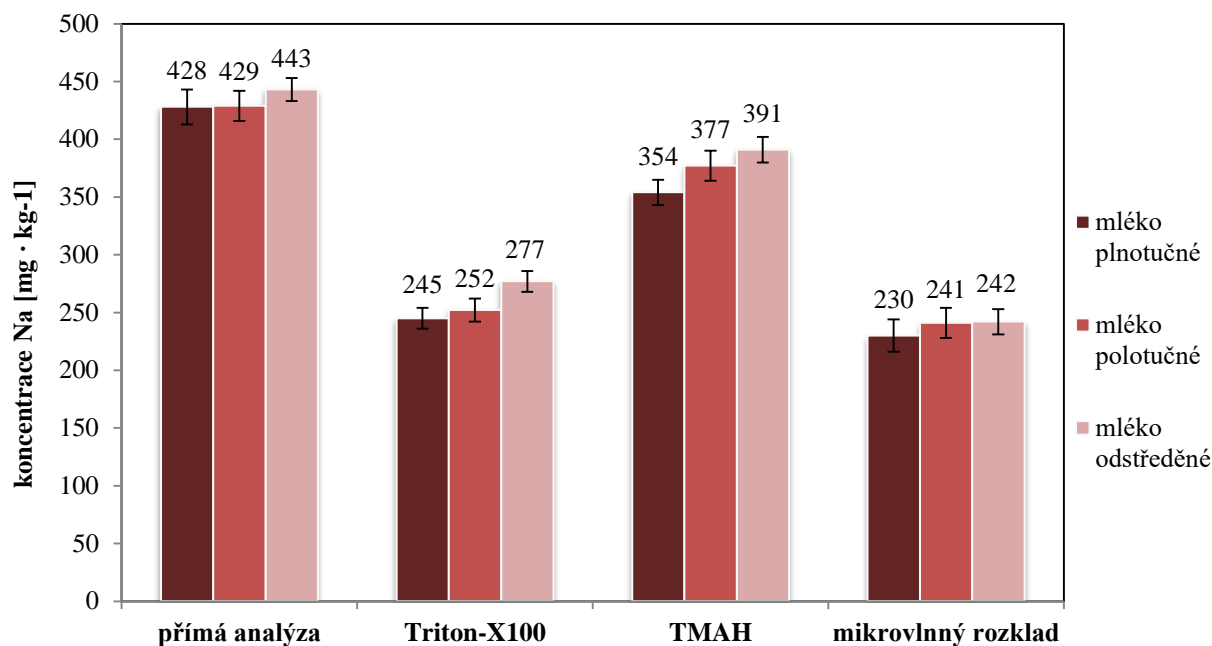


Graf 1 Koncentrace vápníku v reálných vzorcích mléka

Většina vápníku obsaženého v mléce je přítomno v mléčné plazmě (až 99 %). Jak již bylo řečeno, vápník je přibližně z 30 % rozpuštěný v mléčném séru a jeho zbytek je vázán v micelách kaseinu převážně ve sloučeninách s kyselinou fosforečnou. Volný vápník v rozpustné fázi tvoří pouze 10 % z celkového obsahu a větší část rozpustného vápníku představuje citrát vápenatý. Tuk v mléce by na obsah vápníku neměl mít vliv, neboť vápník není na tukovou složku vázán ve větším množství. Tuková matrice nicméně může ovlivnit procesy zmlžování v mlžné komoře a atomizace v indukčně vázané plazmě a způsobit tak nepřesnosti při analýze jiných prvků. Tento problém byl dobře pozorovatelný i při stanovování ostatních prvků v mléce, kdy díky nedokonalému rozkladu mléčné matrice byla stanovená koncentrace například u hořčičku nadhodnocena až o 100 %. Koncentrace vápníku jsou v mléce mírně zvýšené v kolostru (tzv. prvotní mléko savců) a ke konci laktace [12].

4.5.2. Sodík

Koncentrace sodíku uváděné v literatuře se pohybují v rozmezí 400–580 mg · kg⁻¹ [24]. V odstředěném mléce byla koncentrace sodíku při *přímé analýze* stanovena na 443 ± 10 mg · kg⁻¹. Při úpravě vzorku pomocí TMAH potom 391 ± 11 mg · kg⁻¹. Stanovené koncentrace tedy souhlasí s koncentracemi sodíku uváděnými v literatuře. U ostatních metod přípravy vzorku byla stanovená koncentrace vždy výrazně podhodnocena. Všechny naměřené koncentrace sodíku ve vzorcích plnotučného, polotučného a odstředěného mléka jsou zobrazeny v Grafu 2.

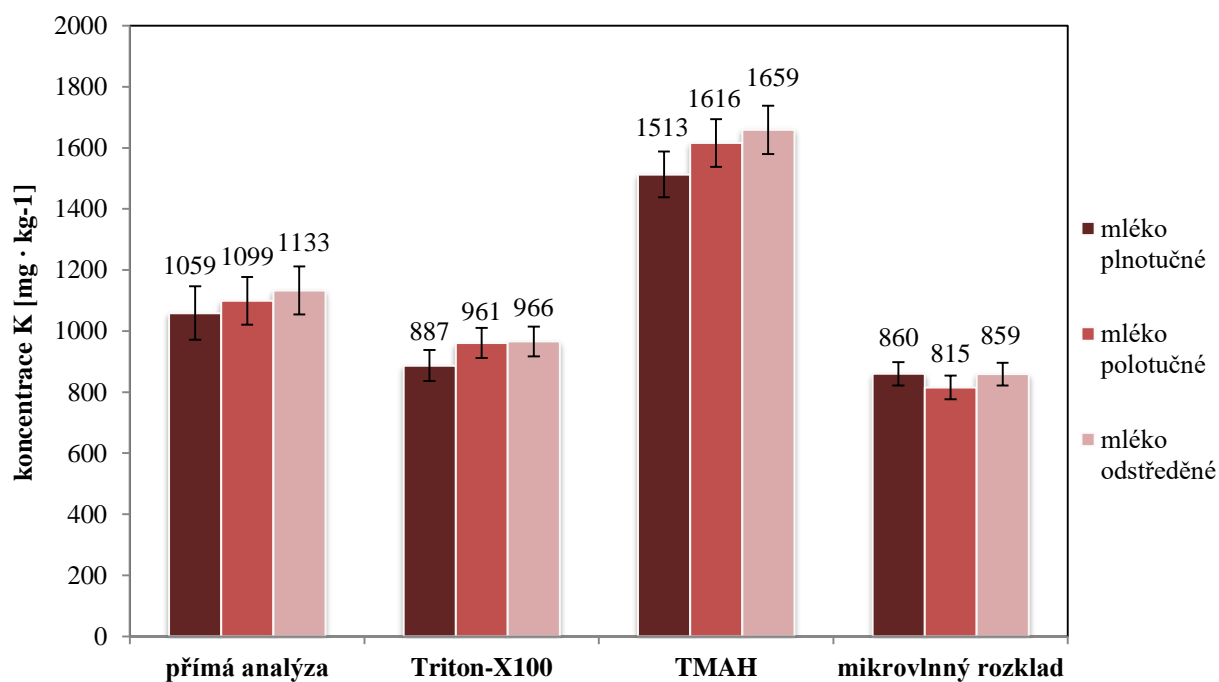


Graf 2 Koncentrace sodíku v reálných vzorcích mléka

V mléčném séru se sodík nachází především ve formě solí. Jeho převážná většina (cca 95 %) je v mléčném séru přítomna v pravém roztoku v lehce disociovatelných solích. Zbylých 5 % sodíku je vázáno na kasein. Vysoký podíl sodíku se nachází v kolostru, kde se jeho obsah během několika dní po porodu snižuje a ke konci laktace se opět zvyšuje. Koncentrace sodíku v mléce nejsou zcela ovlivněny jeho příjmem v krmné dávce.

4.5.3. Draslík

Mléko je bohatým zdrojem draslíku. Literatura udává obsah draslíku v mléce v rozmezí 1440–1780 mg · kg⁻¹ [24]. V tomto rozmezí byly stanoveny koncentrace draslíku pouze ve vzorcích mléka upravených přidavkem TMAH. V odstředěném mléce byla neměřena koncentrace draslíku až 1659 ± 79 mg · kg⁻¹. U ostatních metod přípravy vzorku mléka došlo po analýze k výraznému podhodnocení koncentrace draslíku ve vzorku. Naměřené výsledky koncentrací draslíku ukazuje Graf 3.

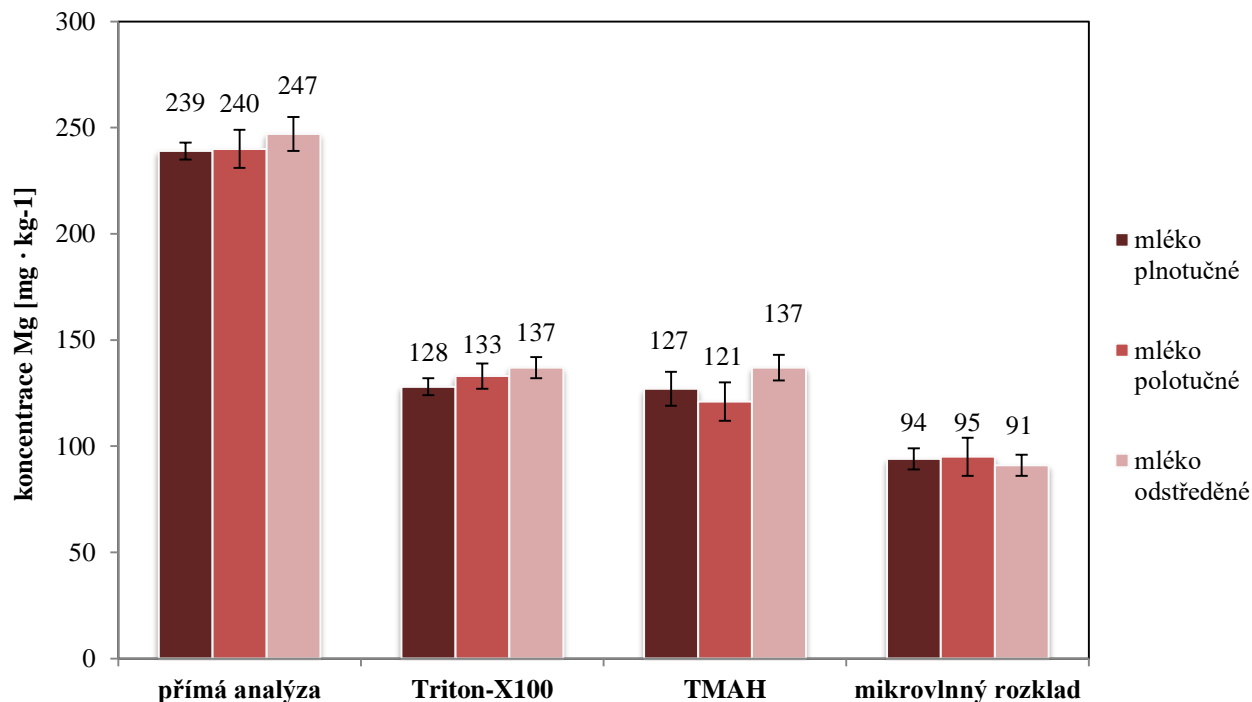


Graf 3 Koncentrace draslíku v reálných vzorcích mléka

Draslík je stejně jako sodík v mléce přítomen ve formě solí kyseliny fosforečné a citronové. Draslík je z 5 % vázán na kasein mléka a jeho převážná část je přítomna v rozpustné formě v mléčném séru. Na rozdíl od sodíku, draslík vykazuje nižší koncentrace v kolostru, než ve zralém mléce a jeho koncentrace se zvyšuje několik dní po porodu.

4.5.4. Hořčík

Koncentrace hořčíku v kravském mléce jsou v literatuře uváděny v rozmezí od 90 až do 160 mg · kg⁻¹ [24]. Stanovení koncentrace hořčíku bylo nejméně citlivé ke zvolené metodě přípravy vzorku. Kromě přípravy vzorku prostým ředěním vodou byly rozdíly ve stanovené koncentraci hořčíku zanedbatelné a souhlasily s publikovanými výsledky. Naměřené koncentrace hořčíku u jednotlivých druhů mlék zobrazuje Graf 4.



Graf 4 Koncentrace hořčíku v reálných vzorcích mléka

Hořčík je z 98–100 % v kravském mléce přítomný v mléčné plazmě. Až 65 % hořčíku je rozpuštěno v mléce, zbylý hořčík je opět vázán v kaseinových micelách v koloidní formě. Koncentrace hořčíku v kolostru je 2–3krát vyšší, než ve zralém mléce. K jeho poklesu dochází během prvních několika dnů v průběhu laktace, dále je koncentrace stálá, bez významnějších změn.

5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo zpracování literární rešerše k problematice prvkové analýzy mléka, zhodnocení různých metod přípravy vzorku mléka pro prvkovou analýzu a analýza různých druhů mléka pomocí techniky ICP-OES. Teoretická část diplomové práce se zabývá všemi analyzovanými prvky, jejich vlastnostmi a způsoby jejich analýzy. V této práci byly také navrženy a ověřeny tyto metody příprav vzorků pro analýzu ICP-OES: prosté ředění mléka, ředění s přidavkem Tritonu X-100, rozklad pomocí tetramethylammonium hydroxidu a mikrovlnný rozklad. Podle těchto metod byl analyzován certifikovaný referenční materiál (CRM) odstředěného odtučněného sušeného mléka a reálné vzorky odstředěného mléka, polotučného mléka a plnotučného mléka.

Analýza mléka spočívala ve stanovení makroprvků jako jsou Ca, Na, K a Mg. Stanovení obsahu minerálních látek v potravinách jako je mléko má velký význam, jelikož se jedná o komplexní často konzumovanou potravinu, která je pro člověka zdrojem základních živin.

Stanovení minerálních látek bylo při *přímé analýze* nejvíce ovlivněno matricí mléka, která může způsobovat problémy při zmlžování vzorku, nebo může vytvářet těžko modelovatelné podmínky v indukčně vázané plazmě. Přímá analýza mléka by byla ideálním postupem v případě, že by bylo možné provést kalibraci pomocí standardního přidavku. Metodu standardního přidavku však vzhledem ke kyselé povaze použitých standardů makroprvků nebylo možné použít, neboť i při velmi malém přidavku standardu ke vzorku docházelo ke srážení bílkovin.

Jako nejpřesnější byla v této diplomové práci vyhodnocena metoda přípravy vzorku pomocí činidla TMAH. Vyhovující by zřejmě byl i mikrovlnný rozklad vzorku minerálními kyselinami před měřením na ICP-OES, ale metoda pro rozklad by nejprve musela být optimalizována. Jako ideální se zdá být kombinace mikrovlnného rozkladu za použití činidla TMAH místo minerálních kyselin. Tato varianta vzhledem k nedostatku času nebyla vyzkoušena, nicméně pro dokonalý rozklad mléčné matrice bylo stejně potřeba vzorek po přidavku TMAH zahřát, takže podmínky mikrovlnného rozkladu byly kromě zvýšeného tlaku poměrně dobře modelovány.

Tato diplomová práce navazuje na bakalářskou práci a společně tyto práce prokázaly, že řada postupů přípravy vzorku mléka před analýzou ICP-OES je nepoužitelných, ať už se jedná o rozklad ultrazvukem, úpravu vzorku kyselinami nebo různými povrchovými látkami.

6 LITRATURA

- [1] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2009, 536 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-051-4.
- [2] ČEPIČKA, Jaroslav. *Obecná potravinářská technologie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-7080-239-1.
- [3] GAJDUŠEK, Stanislav. *Mlékařství II: (cvičení)*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1997. ISBN 80-7157-278-0.
- [4] GERRIT Smit. *Dairy processing: improving quality*. Boca Raton, Fla.: Cambridge: CRC Press; Woodhead, 2003. ISBN 1855736764.
- [5] VELÍŠEK, Jan, Sylva ŠMÍDOVÁ a Michal VOLDŘICH. *Chemie potravin: školní stravování, výživové normy (spotřební koš), dietní stravování ve školní jídelně, zásady správné výživy, výživa dětí, dospívajících, sportujících dětí a adolescentů, seniorů*. Rozšířené a přepracované 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-86659-17-6.
- [6] KOPŘIVA, Vladimír.: *Mléko a mlezivo – hlavní rozdíly a nutriční význam mléka ve výživě* [online]. [cit 25. 2. 2017].
Dostupné z: http://cit.vfu.cz/ivbp/wpcontent/uploads/2011/07/VY_04_07.pdf
- [7] VACOVÁ, Terézia. *Mlieko a mliečné prípravky vo výžive*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1986, 216 s.
- [8] ČERNÁ, Marie a kol. *Nutriční hodnota mléka a mléčných výrobků*. 1. vyd., Praha: VÚPP, 1979, 141 s.
- [9] ČERNÁ, Eva a Miloš MERGL. *Laboratorní kontrolní metody v mlékařství*. 1. vyd., Praha: Nakladatelství technické literatury, 1971, 263 s.
- [10] BALCAR, Jaromír. *Výroba sušených a zahuštěných mléčných výrobků*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1978. 1. vyd. 326 s.
- [11] TANG, Jun, Ying YING, Xiao-Dong PAN, Wei JIANG a Ping-Gu WU. *Elements analysis of infant milk formula by ICP-OES: a comparison of pretreatment methods*. Accreditation and Quality Assurance. 2014, vol. 19, issue 2, s. 99-103. DOI: 10.1007/s00769-014-1039-6.
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00769-014-1039-6>.
- [12] NAVRÁTILOVÁ, Pavlína. *Hygiena produkce mléka*. Brno: Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, 2012. 129 s. ISBN: 978-80-7305-625-4.
- [13] BULKOVÁ, Věra. *Nauka o poživatinách*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 1999. ISBN 80-7013-293-0.

- [14] PÁNEK, Jan. *Základy výživy a výživová politika*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002, 219 s. ISBN 80-708-0468-8.
- [15] MADER Pavel a Eva ČURDOVÁ. *Metody rozkladu biologických materiálů pro stanovení stopových prvků*, Chem. listy 91, str. 227–236, [cit.10.4.2017]. ISSN 1213-7103. Dostupné na www: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_04_227-236.pdf
- [16] PETROVÁ, Jana, Sylva ŠMÍDOVÁ a Michal VOLDŘICH. *Základy výživy pro stravovací provozy: školní stravování, výživové normy (spotřební koš), dietní stravování ve školní jídelně, zásady správné výživy, výživa dětí, dospívajících, sportujících dětí a adolescentů, seniorů*. 1. vyd. Plzeň: Jidelny.cz, 2014, 307 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-905557-0-9.
- [17] PÁNEK, Jan. *Základy výživy a výživová politika*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002, 219 s. ISBN 80-708-0468-8.
- [18] STUŽKA, Václav. *Analytická atomová optická spektrometrie*. 2. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2000, 81 s. ISBN 80-244-0206-8.19.
- [19] KLOUDA, Pavel, Sylva ŠMÍDOVÁ a Michal VOLDŘICH. *Moderní analytické metody: školní stravování, výživové normy (spotřební koš), dietní stravování ve školní jídelně, zásady správné výživy, výživa dětí, dospívajících, sportujících dětí a adolescentů, seniorů*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 80-863-6907-2.
- [20] HOLZBECHER, Zaviš a Jaroslav CHURAČEK. *Analytická chemie*. Vyd. 1. Praha: SNTL, 1987.
- [21] OTRUBA, Editor Vítězslav. *6. kurz ICP spektrometrie*. Brno: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, 2011. ISBN 978-809-0453-913.
- [22] BŘEZINA, Pavel a Jaroslav JELÍNEK. *Chemie a technologie mléka II. Část*, Praha: MON 1990.
- [23] KUBÁŇ, Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin: a tutorial for beginners*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007, 202 s. ISBN 978-80-7375-036-7.
- [24] ZAMBERLIN, Šimun. *Mineral elements in milk and dairy products, Mljekarstvo*. Zagreb: University of Zagreb, 2012. ISSN 0026-704X.
- [25] BARKER, Allen V. a D. J. PILBEAM. *Handbook of plant nutrition*. Boca Raton, FL: CRC/Taylor, 2007. ISBN 978-082-4759-049.

- [26] MURCIA, M. Antonia, Ana VERA, Magdalena MARTINEZ-TOME, Antonio MUNOZ, Manuel HERNANDEZ-CORDOBA a Roque ORTIZ-GONZALEZ. *Fast Determination of the Ca, Mg, K, Na and Zn Contents in Milk and Nondairy Imitation Milk Using ICP-AES without Mineralization Stage*. LWT - Food Science and Technology. 1999, vol. 32, issue 3, s. 175-179. DOI: 10.1006/fstl.1998.0524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643898905242>.
- [27] CAVA-MONTESINOS, Patricia, M. Luisa CERVERA, Agustín PASTOR, Miguel DE LA GUARDIA, Manuel HERNANDEZ-CORDOBA a Roque ORTIZ-GONZALEZ. *Room temperature acid sonication ICP-MS multielemental analysis of milk*. Analytica Chimica Acta. 2005, vol. 531, issue 1, s. 111-123. DOI: 10.1016/j.aca.2004.09.093. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267004012711>.
- [28] VELEMÍNSKÝ, Miloš. *Výživa kojenců* [online]. [cit.10.3.2017]. Dostupné na: <http://www.veleminsky.cz/vyziva/kojencka-vyziva.htm>
- [29] KOMÁREK, Josef. *Atomová absorpční spektrometrie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000, 85 s. ISBN 80-210-2500-X.
- [30] SOMMER, Lumír. *Analytická spektrometrie I*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986, 173 s.
- [31] ZADRAŽIL, Karel. *Mlékařství: (přednášky)*. Praha: ISV, 2002. Živočišná výroba (Česká zemědělská univerzita). ISBN 80-86642-15-1.
- [32] BARTOŠ, Martin. *Analytická chemie I*. Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, katedra analytické chemie, 2004. Dostupné také z: <http://meloun.upce.cz/docs/analchem1/skripta.pdf>
- [33] ČSN EN 11885: 2009. *Jakost vod – Stanovení vybraných prvků optickou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES)*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2009. 28 s.
- [34] ČERNOHORSKÝ, Tomáš, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Atomová spektroskopie: technologie potravin*. 1. vyd. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1997, 218 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 80-719-4114-X.
- [35] FOX, P. a P. MCSWEENEY. *Dairy chemistry and biochemistry*. 1st ed. New York: Blackie Academic, 1998. 478 p. ISBN 04-127-2000-0.
- [36] HÁLKOVÁ, Jana, Marie RUMÍŠKOVÁ a Jana RIEGLOVÁ. *Analýza potravin*. 2. vyd. Újezd u Brna: I. Straka, 2001. ISBN 80-86494-02-0.
- [37] RUPRICH, Jiří. *Monitoring zdravotního stavu obyvatelstva*, [on-line]. 2002, [cit. 3. 4. 2017]. Státní zdravotní ústav Praha. Dostupné z: <http://www.chpr.szu.cz/monitor/tds05c/CHEMON/anorg/PB.pdf>

- [38] RIBEIRO, Anderson S., Aloisia L. MORETTO, Marco A. Z. ARRUDA a Solange CADORE. *Analysis of Powdered Coffee and Milk by ICP OES after Sample Treatment with Tetramethylammonium Hydroxide*. *Microchimica Acta* [online]. 141(3-4), 149-155 [cit. 2017-04-15]. DOI: 10.1007/s00604-002-0935-3. ISSN 00263672. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00604-002-0935-3>.
- [39] HPLC: *Validace v HPLC: Robustnost metody* [online]. [cit.15.4.2017]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Validace/program_validace.htm#_3.5_Robustnost_metody, staženo 9. září 2015.
- [40] HPLC: *Validace metody - HPLC: Robustnost metody* [online]. [cit.15.4.2017]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Validace/robustnost.html>, staženo 9. září 2015.
- [41] THOMAS, Robert. *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2008, 347 p. *Practical spectroscopy*, v. 33. ISBN 14-200-6786-9.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
AES	Atomová emisní spektrometrie
AFS	Atomová fluorescenční spektrometrie
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
CRM	Certifikovaný referenční materiál
DA	<i>Diode Array</i>
ET-AAS	Elektrotermická atomová absorpční spektrometrie
F-AAS	Plamenová atomová absorpční spektrometrie
FP	Plamenová fotometrie
ICP	<i>Inductively Coupled Plasma</i>
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
OES	Optická emisní spektrometrie
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
TMAH	<i>Tetramethylammonium hydroxide</i>
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>