Univerzita Františka Palackého

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



Využití plynové chromatografie v analýze mléka

Diplomová práce

Autor: Bc. Tomáš Sulovský

Studijní program: Analytická chemie

Studijní obor: Chemie

Typ studia: Prezenční

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Olomouc 2019

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením   
[Doc. RNDr. Petra Bartáka, Ph.D.](https://newportal.upol.cz/wps/myportal/default/!ut/p/c1/lY7NboJAFIWfhSeY4wQGWQ5WGH5mKDCkwIaQtlGMijG0FJ--NG4aE2t6z_LL-c4lNZlzbD-7TTt0_bHdk5LUrBG-ufa5A_gic0F1mHuIGMDZzKvfPHVNUCuzV08yoQAetF9-9v7o2w84rhx3joMo0R_eSUVq--4fS0Y0KWE2-W7qP_L8K3QKNiyCphh0OsldRdUlGNVZjkqvhewuyhHyzcsKdwqsZMUN48afRDEFDSNte8tkAZj_84_KKa_-19iKvXT2nw4luuft2eq58Q0h0C0o/dl2/d1/L0lDU0lKSmhpZ3BSQ2dwUkNncFJBL29Ob2dBRUlRaGpFQ0VRQWdBVVpSbk1JQVFGQlNGTGdsYVZyaWdBISEvNEEwYWRHbkp1MGhja3liaWg1Smt2Rkh5VEotS0FRISEvN19IRzRFR0E5MDBPS0wyMDJKS1Q3RjhPMTAwNC8wQ0YyTjUyOC9kZXRhaWwvdWNpdGVsSW5mby91Y2l0ZWxVY2l0aWRuby82OTAvcHJvaGxpemVuaUFjdGlvbi9jei56Y3Uuc3RhZy5wb3J0bGV0czE2OC5wcm9obGl6ZW5pLnVjaXRlbC5VY2l0ZWxEZXRhaWxBY3Rpb24!/#7_HG4EGA900OKL202JKT7F8O1004) s použitím uvedené literatury. Souhlasím s tím, aby má diplomová práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci

V Olomouci 18. dubna 2019

…………………………

Sulovský Tomáš

Chtěl bych velice poděkovat [Doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D.](https://newportal.upol.cz/wps/myportal/default/!ut/p/c1/lY7NboJAFIWfhSeY4wQGWQ5WGH5mKDCkwIaQtlGMijG0FJ--NG4aE2t6z_LL-c4lNZlzbD-7TTt0_bHdk5LUrBG-ufa5A_gic0F1mHuIGMDZzKvfPHVNUCuzV08yoQAetF9-9v7o2w84rhx3joMo0R_eSUVq--4fS0Y0KWE2-W7qP_L8K3QKNiyCphh0OsldRdUlGNVZjkqvhewuyhHyzcsKdwqsZMUN48afRDEFDSNte8tkAZj_84_KKa_-19iKvXT2nw4luuft2eq58Q0h0C0o/dl2/d1/L0lDU0lKSmhpZ3BSQ2dwUkNncFJBL29Ob2dBRUlRaGpFQ0VRQWdBVVpSbk1JQVFGQlNGTGdsYVZyaWdBISEvNEEwYWRHbkp1MGhja3liaWg1Smt2Rkh5VEotS0FRISEvN19IRzRFR0E5MDBPS0wyMDJKS1Q3RjhPMTAwNC8wQ0YyTjUyOC9kZXRhaWwvdWNpdGVsSW5mby91Y2l0ZWxVY2l0aWRuby82OTAvcHJvaGxpemVuaUFjdGlvbi9jei56Y3Uuc3RhZy5wb3J0bGV0czE2OC5wcm9obGl6ZW5pLnVjaXRlbC5VY2l0ZWxEZXRhaWxBY3Rpb24!/#7_HG4EGA900OKL202JKT7F8O1004) za cenné rady, za odborné vedení práce, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracovávání diplomové práce. Také bych chtěl poděkovat Mgr. Marii Dufkové za jazykovou korekci. Tato závěrečná práce byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou UP (IGA\_PrF\_2018\_027 a IGA\_PrF\_2019\_028).

**Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora: Tomáš Sulovský

Název práce: Využití plynové chromatografie v analýze mléka

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2019

Abstrakt: Cílem této práce je studium možností aplikace plynové chromatografie při analýze mléka. Nejprve byly analyzovány látky obsažené v jeho vůni. Látky byly zachyceny na SPME vlákno a následně analyzovány plynovou chromatografii. Dále byly zkoumány možnosti použití plynové chromatografie v analýze tukových složek mléka. Bylo vyšetřováno, jaké mastné kyseliny jsou v mléce obsaženy. Poslední část práce se zaměřuje na kvantitativní stanovení cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu.

Klíčová slova: mléko, GC, GC/MS, 7-dehydrocholesterol, cholesterol, mastné kyseliny, extrakce tukových složek, SPME.

Počet stran: 54

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

**Bibliographic identification:**

Author’s first name and surname: Tomáš Sulovský

Title: Utilization of gas chromatography in milk analysis

Type of thesis: Diploma thesis

Department: Department of analytical chemistry

Supervision: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

Year of presentation: 2019

Abstract: The aim of this work is to study application of gas chromatography in milk analysis. First, volatile substances responsible for the milk smell were analysed. Substances was captured by SPME fiber and analyse by gas chromatography. Then, utilization of gas chromatography for analysis of milk fat and determination of fatty acids profile was investigated. Last part of the work is focused on quantitative determination of cholesterol and 7-dehydrocholesterol.

Keywords: milk, GC, GC/MS, 7-dehydrocholesterol, cholesterol, fatty acids, extraction of fatt components, SPME.

Number of pages: 54

Number of appendices: 0

Language: Czech

Obsah

[I. Úvod 7](#_Toc6263479)

[II. Teoretická část 8](#_Toc6263480)

[2.1. Mléko 8](#_Toc6263481)

[2.2. Analýza mléka 10](#_Toc6263482)

[2.2.1. Analýza mléka pomocí GC 12](#_Toc6263483)

[2.3. Chromatografie a metody použité k analýze 12](#_Toc6263484)

[2.3.1. Plynová chromatografie 16](#_Toc6263485)

[2.3.2. Hmotnostní spektrometrie 17](#_Toc6263486)

[2.3.3. Kombinace GC a MS dat 18](#_Toc6263487)

[2.4. SPME 19](#_Toc6263488)

[2.5. Cholesterol a skvalen v mléce 22](#_Toc6263489)

[2.5.1. Biosyntéza cholesterolu 24](#_Toc6263490)

[3. Experimentální část 27](#_Toc6263491)

[3.1. Použité chemikálie 27](#_Toc6263492)

[3.2. Použité přístroje 28](#_Toc6263493)

[3.3. Laboratorní postupy 30](#_Toc6263494)

[3.3.1. Analýza látek mléka obsažených v jeho vůni pomocí SPME 30](#_Toc6263495)

[3.3.2. Extrakce tukové složky z mléka: Společný postup pro další úpravy vzorků 30](#_Toc6263496)

[3.3.3. Analýza triacyl glycerolů a mastných kyselin 31](#_Toc6263497)

[3.3.4. Analýza steroidních látek 31](#_Toc6263498)

[3.3.5. Silanizace steroidních látek 31](#_Toc6263499)

[3.3.6. Postup souběžného stanovení MK a steroidních látek 31](#_Toc6263500)

[IV. Výsledky a diskuze 32](#_Toc6263501)

[4.1. Headspace SPME analýza látek obsažených ve vůní mléka 32](#_Toc6263502)

[4.2. Analýza mastných kyselin v mléku 34](#_Toc6263503)

[4.3. Analýza steroidních látek v mléku 35](#_Toc6263504)

[4.4. Postup souběžného stanovení MK a steroidních látek 37](#_Toc6263505)

[4.5. Porovnání mléčných produktů s různým obsahem tuku. 41](#_Toc6263506)

[V. Závěr 50](#_Toc6263507)

[VI. Citace: 51](#_Toc6263508)

# Úvod

Mléko je jedna s nejvíce rozšířených potravin na zemi. Používá se nejen k přímé konzumaci, ale také k výrobě rozmanitých produktů. Asi nejrozšířenější mléčné produkty jsou sýry. Existuje mnoho druhů sýrů. Mohou se dělit podle různých vlastností, například podle obsahu tuku v sušině, nebo podle způsobu srážení. Tak se sýry dělí na tvarohové sýry, sýřené sýry, které se nechávají zrát, a tavené sýry. Jiné možné dělení je podle tvrdosti. Podle ní rozeznáváme čerstvé sýry, ty nemají kůrku a nenechávají se zrát, jsou to například lučina, maskarpone a další, patří zde i měkké sýry, které obsahují menší množství tuku a vody a zrají krátce, je to například brynza, nebo plísňové sýry, jde například o hermelín. Následuje skupina polotvrdých a tvrdých sýrů. Tyto sýry zrají dlouho, tvrdé sýry nejdéle. Mezi polotvrdé sýry patří eidam nebo gouda, tvrdý sýr je například parmezán. Poslední skupinu tvoří sýry tavené, ty se mohou vyrábět z jakéhokoli druhu sýru pomocí tavicích solí.

Další mléčným výrobkem je máslo. To vzniká zakoncentrováním mléčného tuku a následným obrácením fází na emulzi vody v tuku. Významným mléčným produktem je smetana. Je to nejtučnější část mléka, která se shromažďuje na jeho povrchu. Z mléka se získává sběrem nebo odstřeďováním. Minimální obsah tuku je 10 %, smetana s nejméně 30 % tuku se označuje jako smetana ke šlehání a slouží k výrobě šlehačky. Rozlišujeme smetanu sladkou nebo kysanou. Z mléka se vyrábí také jogurty. Jogurt je kysaný mléčný výrobek s nízkým pH a vysokým obsahem bílkovin. Jeho výroba spočívá ve fermentaci mléka. Tímto procesem dojde k přeměně velkého množství laktózy na kyselinu mléčnou. Fermentace poskytuje i další látky, jako těkavé mastné kyseliny, acetaldehyd, ethanol a další. Díky fermentaci dojde k poklesu pH a vysrážení bílkovin.

Mléko je významným zdrojem živin, zejména cukrů, tuků a bílkovin. Mimo to je mléko také zdrojem vápníku, vitaminů a minerálů. Protože je zdravým zdrojem již zmíněných živin, slouží i jako potrava pro novorozené potomky savců.

K výrobě většiny mléčných výrobků je důležitá jeho tuková frakce, složená z mastných kyselin a steroidních látek, a proto se tak tématem mé diplomové práce stala analýza mléka a zejména jeho tukové části. Přímou analýzu tukové části mléka umožňuje plynová chromatografie, a proto se možnosti jejího využití při analýze mléka staly cílem mé diplomové práce.

# Teoretická část

## Mléko

Kravské mléko bylo a je už dlouhou dobu spojováno s pevným a dobrým zdravím, což z něj dělá jeden z nejvíce konzumovaných nápojů v Evropě i Spojených státech amerických. Mléko je tekutina, bílé barvy produkovaná mléčnými žlázami savců. Všichni savci, včetně lidí, poskytují mléko svým mláďatům, dětem po dobu, než jsou schopné jíst běžnou stravu. Mléko obsahuje velké množství živin. Mezi hlavní živiny obsažené v mléku patří cukry, tuky a bílkoviny. V mléku se vyskytují i tzv. přídatné živiny, jde o vitaminy, minerály a další, řadíme zde například i vápník, který je dobrý proti osteoporóze. Právě mléko je významným zdrojem vápníku.

Mléko je největší a nejbohatší zdroj vápníku. Ten má velký vliv na správný vývoj a stavbu kostí a zubů, je také potřebný pro srážení krve a k hojení ran, dále k udržování zdravého krevního tlaku a k svalové práci. Aby tělo mohlo vápník přijímat, je dobré ho podávat společně s vitaminem D, který pomáhá vstřebat vápník ve střevech, a hořčíkem, který pomáhá absorbovat vápník do kostí. [1] Na osteoporózu kolenních kloubů dosud nebyl vynalezen lék, vědecký výzkum však zjistil, že pravidelná konzumace mléka může výrazně snižovat problémy s kolenními klouby. [2]

Jak už bylo zmíněno výše, mléko obsahuje vápník a vitamín D, který je vhodný pro kosti a zuby a předchází osteoporóze. Na druhou stranu mléko obsahuje také velké množství nasycených mastných kyselin a cholesterolu a ty zapříčiňují srdeční problémy. Vitamin D hraje významnou roli při regulaci růstu buněk a při ochraně před rakovinou. Výzkumy ukazují, že u lidí v oblastech s nižší intenzitou slunečního záření dochází k častějšímu výskytu kolorektální rakoviny. Potlačit výskyt tohoto onemocnění lze i pomocí konzumace mléka, které obsahuje právě vitamin D. Mezinárodní rakovinový institut také zveřejnil, že vápník a laktóza nacházející se v mléce mohou chránit před vznikem rakoviny vaječníků. Dobrá hladina vitaminu D v lidském těle podporuje produkci serotoninu – hormonu spojovaného s dobrou náladou, chutí k jídlu a spánku. Jeho absence vede k depresím a k chronické únavě. Kravské mléko slouží hlavně pro rychlý růst telat, a tak je jasné, že lidé, kteří mléko pijí, mohou zesílit a získat svalovou hmotu. Kravské mléko je bohatý zdroj bílkovin zahrnující i esenciální aminokyseliny, zdroj nasycených tuků, které mohou být přeměněny na energii. Mléko nelze použít při snižování nadváhy, pohyb je nutný, nicméně můžeme jím při pohybové aktivitě vhodně doplňovat živiny. Konzumace mléka má spoustu pozitiv. Vitamin D se v mléce sám o sobě běžně nevyskytuje, ale bývá do mléka přidáván k jeho obohacení spolu s dalšími vitaminy jako A nebo některým druhem vitaminu B. Vitamin D je důležitý pro formování, zdravý růst a obnovu kostí. Také hraje významnou roli v absorpci vápníku do těla a v imunitním systému, jeho nedostatek vede k osteoporóze, chronické únavě a svalové bolesti. [1]

V tabulce č. 1 jsou porovnané výživové hodnoty jednotlivých mlék, a to mléka kravského 3,25 %, dále odtučněného nebo netučného kravského mléka, sójového a mandlového mléka. [1]

Tabulka č. 1: Porovnání výživnosti různých běžných druhů mlék. Látky uvedené v tabulce jsou uvedeny pro jednu sklenici (250 ml) plnotučného mléka s 3,25 % tuku. [1]

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | mléko kravské plnotučné s 3,25 % tuku | odtučněné kravské mléko | čisté sójové mléko | čisté mandlové mléko |
| Energie (cal) | 146 | 86 | 80-110 | 50-60 |
| Tuk (g) | 8 | 0 | 3-4 | 2,5 |
| sacharidy (g) | 16 | 12 | 6-7 | 5-7 |
| bílkoviny (g) | 8 | 8 | 5-7 | 1 |

V mléku se vyskytuje i cholin který, jak bylo zjištěno, podporuje dobrý spánek, svalový pohyb, učení a paměť. Cholin také pomáhá udržovat strukturu buněčných membrán, k přenosů nervových impulzů a asistuje při vstřebávání tuků. [1]

Dříve bylo také uvedeno, že v mléku se vyskytuje draslík spojovaný se snížením rizik výskytu mrtvice a srdečních chorob, může sloužit také jako prevence ztráty svalové hmoty, k zachování hustoty kostních minerálů a k redukci ledvinových kamenů. Draslík je dobrý pro správnou funkci srdce, snižuje krevní tlak. Výzkum ukázal, že ti, kteří přijímali 4069 mg draslíku denně, měli o 49 % procent méně problémů s ischemickými srdečními chorobami v porovnání s těmi, již měli příjem pouze 1000 mg. Bylo zjištěno, že pouze 2 % Američanů zkonzumují doporučovaných 4000 mg denně. Při průjmu spojeném s laktózovou intolerancí může dojít k poklesu hladiny draslíku. [1]

I přes výhody, které mléko má, může některým lidem způsobovat problémy při trávení, jedná se především o cukernou složku mléka obsahující laktózu. Ke trávení mléka je potřebný enzym laktáza. Někteří z nás produkují, tohoto enzymu málo, a nemůžou tedy správně mléko strávit. Laktózová intolerance je stav, kdy v těle člověka chybí enzym laktáza, který je odpovědný za trávení a rozklad sacharidu laktózy obsaženého v mléce. Lidé, s nedostatkem tohoto enzymu, nemůžou správně trávit mléko už od dětství. Dostatek laktázy neprodukuje odhadem 80 % lidí s černou barvou pleti a Hispánců a více jak 90 % Asiatů. Laktózová intolerance může vést k nadýmáni a průjmu, což negativně ovlivňuje vstřebávaní jiných živin. A právě proto jsou na trhu mléka, která laktózu neobsahují nebo jsou laktózy zbavena. Pro tyto jedince jsou vyráběny jiné druhy mléka jako mandlové nebo sójové. [1]

## Analýza mléka

Balené mléko by mělo být před analýzou promícháno, aby všechny jeho části byly rovnoměrně rozprostřeny, protože mléčný tuk může mít tendenci usazovat se v různých částech skladovací nádoby. Nejjednodušším testem pro hodnocení kvality mléka je test organoleptický. K němu není nutné žádné speciální vybavení, je pouze požadováno, aby hodnotitel měl ve výborném stavu a dobře vycvičené smysly, a to zrak, čich a chuť. Výsledky jsou rychle dostupné a cena testu je nízká. Hodnocení pomocí organoleptických testů probíhá otevřením mléka a přičichnutím k němu. Dále pozorováním jeho vzhledu, a nakonec posouzením chuti. Vzorek mléka se ale nepolyká, po ochutnání se vyplivuje do kbelíku.

Mléko, které nemůže být adekvátně souzeno organolepticky se musí podrobit dalším, specifičtějším testům. K hodnocení kyselosti mléka slouží test tvoření sraženiny za varu. Na lžičku nebo do zkumavky se dá malý vzorek mléka. Ten se nechá zahřát na kahanu, a pokud se utvoří sraženina, znamená to, že vzorek testem neprošel, protože obsahoval velké množství kyselin. To je možné dokázat i alkohol-alizarinovým testem. Alizarin mění barvu v kyselém pH. Bakterie v mléce produkují proměnlivé množství kyseliny mléčné, odpovědné za kyselost mléka. Aciditu mléka lze zjistit neutralizací 0,1 M hydroxidem sodným. Z jeho spotřeby lze dopočítat množství kyseliny mléčné.

K hodnocení mikrobiální aktivity mléka je vhodný test resazurinový - resazurin je barevný indikátor. K hodnocení množství tuku v mléku slouží butyrometr. Test probíhá tak, že do butyrometru se přidá 10 ml kyseliny sírové, 11 ml dobře zamíchaného mléka, a 1 ml amylalkoholu. Butyrometr se zazátkuje a opatrně se jím třepe tak dlouho, než zmizí bílý zákal. Pak se dá do vodní lázně o teplotě 65 °C, a až je obsah připraven k odstředění, umístí se do centrifugy na 5 minut při 1100 otáčkách. Po skončení centrifugace se butyrometr vloží na 3 minuty do 65 °C teplé vodní lázně a odečte se hodnota množství tuku. [3]



Obrázek č. 1: Butyrometr. [4]

Pomocí laktometrického testu lze zjistit pančování mléka jeho ředěním vodou nebo dalšími látkami. K tomu se používá laktometr, který měří hustotu mléka. K zjištění pravosti mléka se dá použít i vymrazování. [5]

K analýze bílkovin obsažených v mléce a kaseinu lze upotřebit kapilární elektroforézu, isoelektrickou fokusaci a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC). [6] Analýza všech složek mléka je možná pomocí infračervené spektrometrie s furieorovou transformací. Takto lze vyhodnotit laktózu, tukovou, a i proteinovou část mléka. [7]

### Analýza mléka pomocí GC

Plynová chromatografie v analýze mléka má jednu nevýhodu: triacylglyceroly nelze detekovat celé. U plynové chromatografie dojde k jejich rozštěpení a analýza potom ukazuje volné mastné kyseliny nebo jejich estery. Navzdory tomuto faktu má ale plynová chromatografie i spoustu kladů. Plynovou chromatografií například lze analyzovat aroma mléka nebo látky spojené s jeho vůní. Toto lze provést pomocí headspace SPME extrakce a následné analýzy pomocí GC/MS nebo přímo metodou GC/MS na přístroji vybaveném headspace, případně headspace-SPME autosamplerem. [8]

Rozbor mléka pomocí plynového chromatografu s plamenově ionizační detekcí lze udělat velmi rychle a vyhodnotit tak krátké i dlouhé řetězce. [9]

Plynové chromatografie lze použít k analýze mastných kyselin v mléce pomocí jednoduché extrakce a následného převedení mastných kyselin na jejich methylestery. Detekci lze realizovat s plamenoionizačním detektorem. Kolona použitá při této analýze byla kapilární s rozměry 100 m × 0.250 μm, 0.25 μm (CP-Sil 88). [10]  
Jestliže chceme v mléce vyhodnotit obsah polychlorovaných bifenylů (PCB) lze použít pro extrakci těchto látek magnetickou uhlíkovou mikroextrakci s následnou disperzní mikroextrakcí v sytému kapalina – kapalina. Pro detekci se uplatnila plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu (ECD). [11]

## Chromatografie a metody použité k analýze

Slovo chromatografie poprvé použil Tswett v roce 1906. Je odvozeno od řeckých slov chroma (barva) a graphien (psát). Zpočátku technika nevyžadovala žádné speciální vybavení, šlo o sloupcovou a papírovou chromatografii. Už podle názvu techniky se dá vyvodit, že tyto techniky byly nejčastěji používány k separaci barevných složek ve směsi. Tyto postupy se stále používají, ale větší důraz je dnes kladen na instrumentální techniky. Jde o plynovou chromatografii (GC), vysoce účinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) a superkritickou fluidní chromatografii (SFC).

Chromatografie je definována jako fyzikální separační metoda, při níž jsou jednotlivé složky rozdělovány mezi dvěma fázemi. Jedna je stacionární a druhá mobilní pohybující se určitým směrem. I přes velkou variabilitu mají všechny chromatografie společný základ: obsahují stacionární a mobilní fázi. Bez ohledu na typ chromatografie jsou vzorky nejprve rozpuštěny v mobilní fázi, která proudí přes stacionární fázi. Separace je možná, protože separované látky mají různé vlastnosti, mají k fázím různé afinity, a proto dochází k různé distribuci látek mezi oběma fázemi a jejich separaci. [12]

Výsledek je dán rozdílem v distribučních konstantách. Distribuční konstanta je také nazývána rozdělovací koeficient, jenž je definován pro každý analyt v daném chromatografickém systému. Je to poměr mezi koncentracemi analytu ve stacionární a mobilní fázi. Tento vztah vyjadřuje rovnice:

,

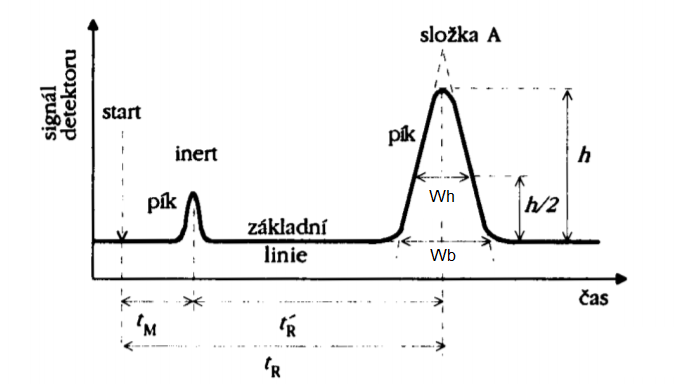
kde cs je koncentrace ve stacionární fázi a cm v mobilní. [12]

Chromatografie rozděluje látky na základě rozdílu v čase, v němž vyjdou z kolony, a proto tomu byl uzpůsoben i systém popisu daného jevu. Jde o retenční čas (tr), který je měřen od nástřiku po detekci na detektoru. Je specifický pro danou kolonu a je to kvalitativní údaj. Kvantitativní informace, tedy množství dané látky ve směsi, lze vyčíst z výšky píku a – především – z plochy píku. [12]

Další důležitý parametr je účinnost. Účinnost kolony je měřena počtem teoretických pater (N), nebo lépe výškovým ekvivalentem teoretického patra (H). To je vyjádřeno pomocí následujících vztahů:

,

kde tR znamená retenční čas, Wb je šířka píku v základní linii a Wh je šířka píku v polovině výšky. [12]



Obrázek č. 2: Chromatogram (tM mrtvý čas, t´R upravený retenční čas) [12]

Čím větší je číslo N, tím je větší účinnost kolony. Výšku efektivních teoretických pater lze vypočítat, jestliže známe počet N a délku kolony (L) ze vztahu [12]:

,

Čím menší tato hodnota je, tím je lepší účinnost pro danou látku. Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární průtokové rychlosti mobilní fáze popisuje van Deemterova rovnice [13]:

,

kde H…HETP výška teoretického patra,

A…faktor vlivu turbulentní difúze,

B…faktor vlivu molekulární difúze,

C…faktor vlivu odporu vůči převodu hmoty,

u…střední lineární rychlost toku mobilní fáze.

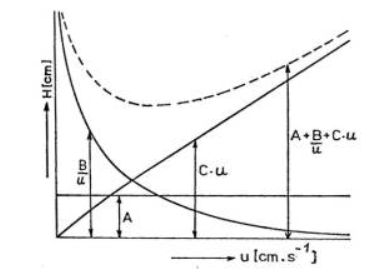
Lineární rychlost toku mobilní fáze lze vypočítat z následující rovnice [12]:

,

kde L…délka kolony,

tM…mrtvý čas.

Van Deemterova rovnice popisuje závislost výšky teoretického patra na lineární průtokové rychlosti. Grafické vyjádření se nazývá van Deemterův graf. Je zobrazen na obrázku č. 3. [12]



Obrázek č. 3: Grafické vyjádření van Deemterovy rovnice. [13]

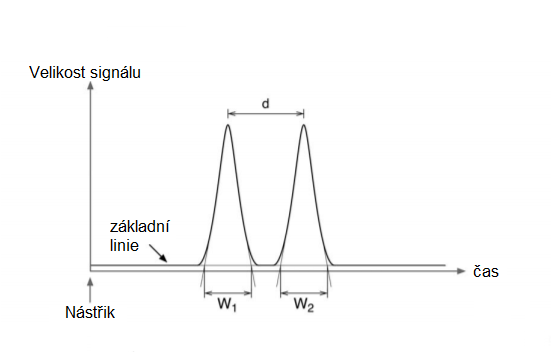
Další důležitou veličinou popisující chromatogram je rozlišení. Vyjadřuje pravou separaci dvou po sobě jdoucích píků. Tento vztah vyjadřuje rovnice:

,

kde d…vzdálenost mezi dvěma píky, měřena mezi vrcholy obou píků,

W1, W2…šířky základní linie piku.

Na obrázku č. 4 lze vidět tyto veličiny v grafickém vyjádření.



Obrázek č. 4: Veličiny použité ve výpočtu rozlišení [12]

### Plynová chromatografie

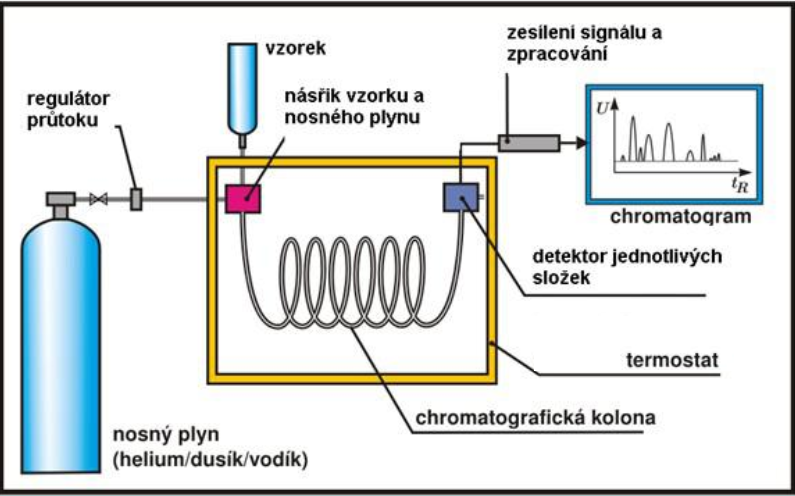
Plynová chromatografie je analytická separační metoda, jež slouží k analýze a rozdělení velmi komplexních a složitých směsí s různým bodem varu a polaritou. Mobilní fáze je tvořena inertním plynem a stacionární fáze může být tvořena kapalinou nebo pevnou látkou. [14]

Vzorek je zplyněn, vstříknut na začátek chromatografické kolony a transportován kolonou plynnou mobilní fází. Kolona je složená z kapalné stacionární fáze, která je adsorbovaná nebo chemicky vázaná na vnitřní povrch kolony nebo na povrch inertní pevné látky naplněné v koloně. [15]

Přestože chromatografie byla objevena už na začátku 20 století, první článek o plynové chromatografii byl publikován až v roce 1952. Poprvé byla použita k separaci těkavých mastných kyselin.

Někdy se plynová chromatografie v obvyklém uspořádání označuje jako rozdělovací chromatografie v systému plyn – kapalina (GLC). Můžeme se setkat také s pojmenováním adsorpční chromatografie v systému plyn – pevná látka (GSC).

Instrumentace v plynové chromatografii se neustále vyvíjí, ale základy zůstávají složeny stále ze stejných komponentů. Analýza začíná vstříknutím vzorku pomocí injekčního portu do vstupu. Mobilní fází je nosný plyn, ten prochází nástřikem a unáší vzorek ke koloně, která obsahuje stacionární fázi. Kolona je umístěna v peci s kontrolovatelně řízenou teplotou. Jak vzorek cestuje kolonou, uskutečňuje se chromatografická separace. Na konci kolony oddělené složky směsi vstupují do detektoru, a ten poskytuje elektronický signál úměrný množství euluovaných látek. [16]



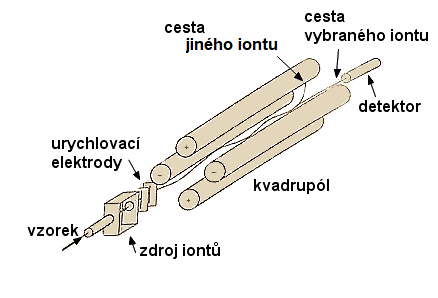
Obrázek č. 5: Schéma plynového chromatografu [16]

### Hmotnostní spektrometrie

Pro plynovou chromatografii jsou důležité detektory. Jako detektor může sloužit hmotnostní spektrometr.

Hmotnostní spektrometr poskytuje rozšiřující strukturní informaci týkající se chemického složení analyzovaných komponentů, může být použit pro kvantitativní i pro kvalitativní analýzu. Informace dodaná hmotnostním spektrometrem je dostatečná k identifikaci neznámé sloučeniny. Hmotnostní spektrometr tedy dává informaci o struktuře. Jeho záznam je hmotnostní spektrum. Sloučeniny vstupující do hmotnostního spektrometru dostávají energii, jež způsobuje jejich ionizaci a následnou fragmentaci na mnoho iontů. Tyto ionty jsou poté tříděny podle jejich hodnoty m/z, to je hmota ku náboji, a následně detekovány. Relativní hodnoty m/z různých iontů jsou potom seřazeny a ukázány v hmotnostním spektru. Je to závislost relativní intenzity na m/z. Pík s největší intenzitou je prezentován jako základní pík a je mu udělena 100 % intenzita. Ostatní píky jsou vyjádřeny jako procenta ze základního píku. Hmotnostní spektrum může sloužit pro identifikaci většiny organických sloučenin, ačkoli v případě izomerů může být velice těžké je od sebe odlišit, hlavně pokud jde o stereoizomery. [12]

Hmotnostních spektrometrů existuje velké množství. Nejběžněji používaný bývá kvadrupólový. [12]



Obrázek č. 6: Schéma kvadrupólového analyzátoru v MS [17]

Vzorek je přiveden do ionizační komory přes vstupní dávkovač. V ionizační komoře probíhá ionizace a fragmentace. Ionty jsou poté urychleny přes hmotnostní filtr neboli analyzátor, a v něm jsou separovány podle hodnot m/z. Po separaci jsou dopraveny do detektoru, kde je měřena a zaznamenaná jejich intenzita. Celý systém musí být neustále udržován ve vakuu, obvykle v rozmezí od 10-5 až 10-6 torr. [12]

Moderní hmotnostní spektrometry mají všechny části spektrometru řízeny počítačem, takže jejich ovládání je jednoduché. Kromě toho systém shromažďuje data v reálném čase, což umožnuje kontinuální sběr dat v průběhu celé GC analýzy. [12]

### Kombinace GC a MS dat

Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie s sebou přináší řadu výhod. Asi největší spočívá v tom, že pomocí retenčního času z chromatografie a spektrálního záznamu z hmotnostní spektrometrie lze určit neznámé látky obsažené ve zkoumaném vzorku. Spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie se může nazývat také hmotnostní chromatografie. [12] Spojení těchto technik poskytuje záznam, který ukazuje intenzitu signálu z detektoru v závislosti na čase a hodnotě m/z. Když se z tohoto záznamu vybere jedna konkrétní hodnota m/z, například m/z 91, typická pro toluen a další alkylbenzeny, získáme chromatogram, který ukazuje, že látky s tímto m/z se ve vzorku skutečně vyskytují. Tato informace nás ale nezpravuje o tom, o jakou látku ze jmenované skupiny se jedná. Zpřesnit můžeme analýzu pomocí retenčního času a spolu se záznamem m/z tak látku přesně identifikovat. Retenční čas souvisí s tím, jak jsou látky těkavé, s tím souvisí rychlost, s jakou kolonu opouštějí. Látky tak mohou být určeny na základě těchto dvou informací. Hmotnostní spektrometr může data sbírat neselektivně, to znamená, že sbírá všechny ionty procházející detektorem. Díky tomu jsou detegovány všechny složky vzorku, ale možné interference jsou značné. Druhý způsob vybere selektivní ionty společné pro vybranou skupinu látek, a ty analyzuje. Obě metody slouží ale ke stejnému cíli a jejich výběr záleží na zkušenostech analyzátora. [12]

## SPME

Mikroextrakce pevnou fází je metoda úpravy vzorků založená na absorpci nebo adsorpci látek na extrakční vlákno. O jaký typ sorpce se jedná, to záleží na složení extrakčního vlákna. Extrakci lze provádět buď přímo v roztoku, nebo je vlákno umístěno v plynné fázi nad ním. Toto uspořádání se nazývá headspace. Princip headspace SPME analýzy kapalných vzorků spočívá v rozdělovací rovnováze mezi dvěma fázemi. Po adsorpci částic na vlákno mohou být tyto částice převedeny rovnou do plynového chromatografu a tepelnou desorpcí se z vlákna uvolní do analytické kolony. [18]

Mikroextrakce pevnou fází je inovativní metoda nezávislá na rozpouštědlu, v němž se analyty nacházejí. [19]

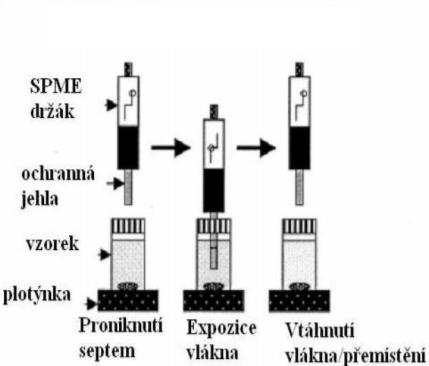
Tato metoda je komerčně dostupná od roku 1993, v dnešní době je dostupná s řadou různých sorbentů a o různé tloušťce vlákna. Poprvé byla metoda využívána k analýze znečišťujících látek ve vodě. Od 90 let se SPME aplikuje hlavně při hodnocení látek způsobujících chuť a pachuť potravin, ale nejvíce při analýze těkavých látek. S její pomocí lze provádět rozbor různých druhů potravin, například kávy, ovoce zeleniny, mléka masa a vína. Metoda SPME ve srovnání s konvenčními technikami úpravy vzorků má řadu výhod. Je jednoduchá, je provedená za méně než hodinu, není drahá, nevyžaduje extrakci kapalinou a dovoluje headspace analýzu. Konvenční metody jako parní destilace nebo přímá kapalinová extrakce reprezentují pouze kapalnou matrici a nedávají informaci o složení par nad kapalinou. Látky, které se v této oblasti nacházejí, jsou také zodpovědné za pach nebo vůni daného vzorku. Nevýhodou konvenčních metod je nutnost provádět před analýzou prekoncentraci, jenž může vést ke ztrátám nízkovroucích těkavých látek. Použité rozpouštědlo navíc může zakrýt první píky analyzovaných látek. [18]



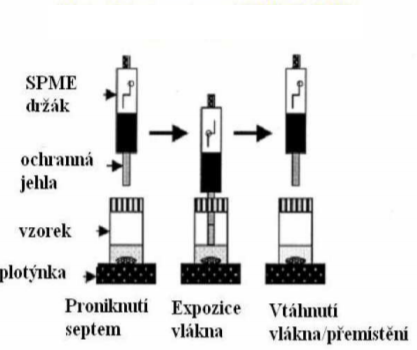
Obrázek č. 7: Pohled na SPME extraktor. [20]

SPME je tedy jednoduchá, nepotřebuje žádné složité aparatury pro zakoncentrování těkavých a netěkavých látek z roztoku nebo headspace prostoru. Tato technika je kompatibilní s plynovou i kapalinovou (HPLC) chromatografií a umožňuje analyzovat látky o široké škále koncentrací. Díky tomu, že si můžeme volit tloušťku vlákna a měnit polaritu můžeme pracovat i s analyty s nízkou koncentrací. Analýza pomocí této metody probíhá tak, že se do viálky s analyzovaným roztokem se septem napíchne jehla a vysune se jednocentimetrové křemenné vlákno s polymerem. Vlákno se může ponořit přímo do roztoku nebo nechat nad roztokem s analyty. Po adsorpci látek na vlákno (trvá obvykle od dvou do třiceti minut), se vlákno zasune do jehly a ta se vytáhne z viálky. Poté může být jehla napíchnuta přímo do plynového chromatografu, kde se vlákno opět vysune, a tepelnou desorpcí se nechají látky z vlákna uvolnit do chromatografické kolony. Jehla může být použita i pro analýzu pomocí HPLC. [21]

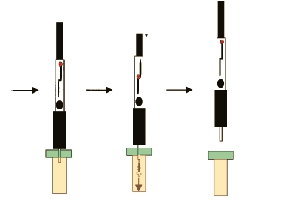
Průběh extrakce je schematicky vyobrazen na obr č. 8 a 9. Na obrázku č. 8 je vidět přímá SPME extrakce na obrázku č. 9 je provedení v headspace režimu, obrázek č. 10 znázorňuje desorpci do analyzátoru.



Obrázek č. 8: Extrakce SPME přímo z rozpouštědla [22]



Obrázek č. 9: Extrakce headspace SPME [22]



Obrázek č. 10: Desorpce do GC [23]

Během SPME extrakce se ustanovuje rovnováha mezi koncentracemi analytu ve vzorku, v prostoru nad vzorkem a na polymeru upevněném na vlákně. Množství analytu adsorbovaného na vlákno závisí na tloušťce polymerové vrstvy a na rozdělovacím koeficientu analytu. Distribuční konstanta obecně roste se zvětšující se molekulovou hmotností a bodem varu analytu. Selektivně může být ovlivněna druhem polymeru na vlákně a tloušťkou polymerní vrstvy. Obecně platí, že těkavé látky potřebují tlustší vrstvu a látky částečně těkavé mohou mít vrstvu tenčí. U kapalných polymerních vrstev je množství analytu adsorbovaného na tuto vrstvu přímo úměrné odpovídající koncentraci analytu ve vzorku. Rovnice pro porovnání počáteční koncentrace a množství analytu adsorbované vláknem při rovnováze ukazuje, že jde o lineární vztah. [21]

,

Kde   
n…množství analytu adsorbované vláknem

C0…počáteční koncentrace analytu ve vzorku

Kfs…rozdělovací koeficient mezi vrstvou polymeru na vláknu a matricí vzorku

Vf…objem vrstvy na vláknu

Vs…objem vzorku

## Cholesterol a skvalen v mléce

Cholesterol je přítomen téměř ve všech tkáních zvířat a lidí. Cholesterol je planární molekula obsahující jádro se čtyřmi kondenzovanými kruhy, z nichž tři jsou šestiuhlíkaté a jeden pětiuhlíkatý. Molekula je amfifilní, má hydrofobní část a hydrofilní hydroxylovou skupinu. U savců hraje cholesterol významnou roli, zajištuje totiž normální funkci buněk. Je součásti jejich membrán a slouží také jako prekurzor pro syntézu různých steroidních hormonů. Membrány buněk jsou velmi rozsáhlý komplex, který odděluje cytosol, vnitřní prostředí buňky, od vnějšího prostředí nebo od média uvnitř buněk. Jeho hlavní funkce je ohraničení buňky, ale i přes to stále umožnuje za určitých podmínek vyměňovat látky z nebo do buňky. Membrány si můžeme zjednodušeně představit jako fosfolipidovou dvojvrstvu. Cholesterol je normálně obsažen v membránách. Porozumět jeho funkci nám pomáhá srovnání různé viskozity membrány při různých koncentrací cholesterolu. Polární část cholesterolu interaguje s polární částí fosfolipidu, zatímco nepolární část cholesterolu interaguje s hydrofobní částí fosfolipidu. Cholesterol je „tvrdší“ než fosfolipidy, a tedy membrány s větší koncentrací cholesterolu jsou pevnější a kompaktnější než membrány s menší koncentrací, ty jsou viskóznější. [24]

Cholesterol se významně podílí také na endocytóze [24], to je způsob, jakým buňky přijímají nebo vylučují větší molekuly nebo mikroorganismy. [25]

Cholesterol není pouze součástí membrán, ale slouží i jako prekurzor pro biosyntézu některých žlučových kyselin, vitaminu D a několika steroidních hormonů, které jsou produkovány nadledvinami a pohlavními žlázami mužů a žen. [24]

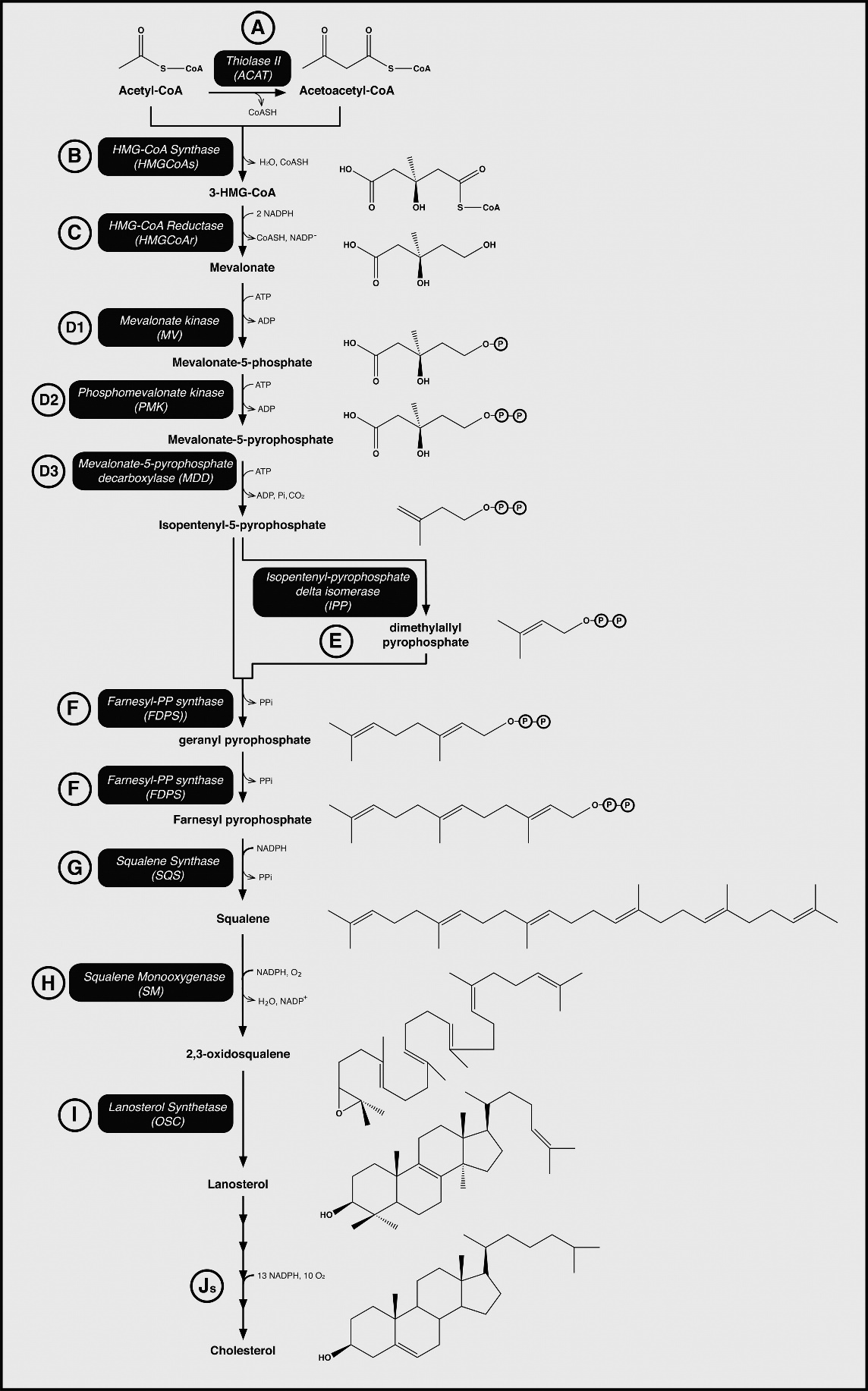
Dnes získal cholesterol špatnou pověst, protože je spojován s výskytem kardiovaskulárních nemocí. Jako nejčastější příčina smrti je světovou zdravotnickou organizací (WHO) uváděna ischemická srdeční příhoda následovaná mozkovou příhodou. Obě tyto nemoci jsou zapříčiněny vysokou hladinou cholesterolu v krvi. Navzdory těmto negativním vlivům by cholesterol neměl být látkou, které bychom se měli za každou cenu vyhýbat. Je možné rozlišovat dva typy cholesterolu: „dobrý“ a „špatný“. Protože cholesterol je lipid, nemůže být rozpuštěn v krevním oběhu, ten je založen především na vodě. Tělo pracuje tak, že zabalí tuky - tedy i cholesterol do bílkovinových soustav nazývaných lipoproteiny, které se s krví smísí dobře. Takto použité proteiny se označují jako apolipoproteiny. Pokud je poměr bílkovin k tukům v lipoproteinu vysoký, je toto uspořádání známo jako lipoprotein s vysokou hustotou, tzv. HDL nebo také „dobrý “ cholesterol. Když je poměr malý, to znamená, že převládá tuková složka, je toto uskupení nazýváno lipoprotein s nízkou hustotou, tzv. LDL známý jako „zlý“ cholesterol. Vysoká hladina cholesterolu v krvi je nebezpečná, jestliže koncentrace LDL v krvi je větší než HDL. Vysoká hladina LDL může vést k ateroskleróze, která je jedna s hlavních příčin obou kardiovaskulárních problémů zmíněných výše. Ateroskleróza je akumulace tuků, tedy i cholesterolu v cévách. LDL obsahuje vysoké množství cholesterolu a jeho esterů, které v oxidované formě jsou toxické pro buňky ve stěnách tepen, a tak dochází k zánětlivé reakci a k jejich ukládání do cév, kde tvoří pláty a zužují cévy. Ateroskleróza se vyskytuje, pokud množství cholesterolu v krvi překračuje množství potřebné pro výrobu steroidů, žlučových kyselin a membrán, a to kvůli neregulované syntéze. Často k ní vede konzumace potravin bohatých na cholesterol. Existují léky a diety pro snížení hladiny LDL cholesterolu v krvi, ale tento proces není snadný a vyžaduje někdy kombinaci léků spolu s dietou. Řada léků způsobuje vedlejší projevy, je přesto nutné úlohu cholesterolu v organismu dále studovat a dobře porozumět jeho biosyntéze. [24]

### Biosyntéza cholesterolu

Cholesterol se může do těla dostávat dvěma cestami: přímou syntézou v těle nebo z potravy. Přijímat cholesterol v potravě není nutné, protože si ho tělo umí samo syntetizovat. Pokud snížíme příjem cholesterolu v potravě, zvýší se jeho absorpce a biosyntéza.

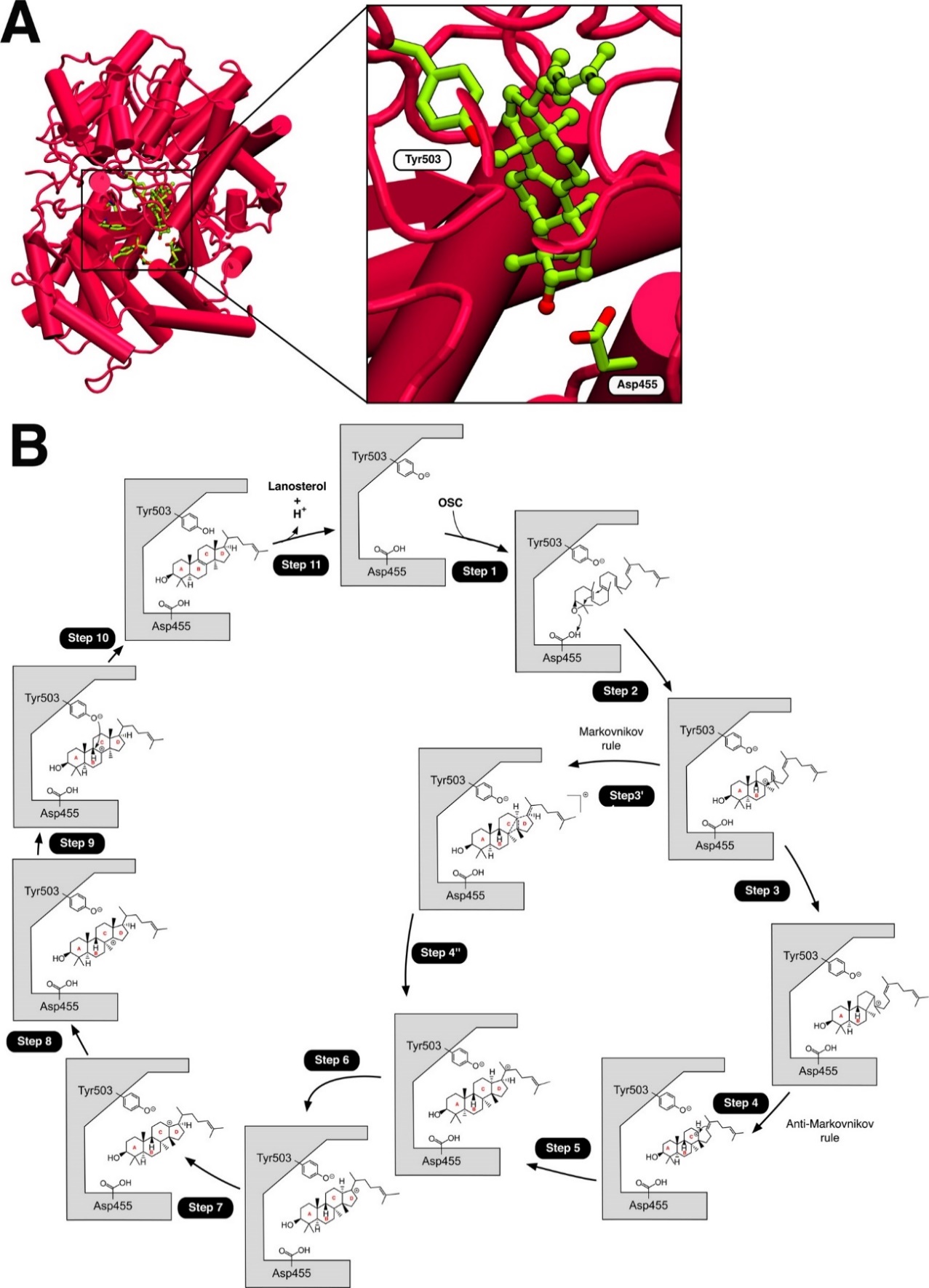
Biosyntéza cholesterolu je komplexní proces složený z více kroků. Sloučeniny vznikající v jednotlivých krocích mohou být použity jako prekurzory pro syntézu jiných látek. Při syntéze cholesterolu se nejprve tvoří mevalonát z acetátu. Proces začíná kondenzací dvou acetylkoenzymů A. Dojde k vytvoření acetoacetylkoenzymu A. Tento proces je katalyzován enzymem thiolázou. Další reakci katalyzuje enzym hydroxymethylglutaryl koenzym A syntháza (HMG-CoA), ten katalyzuje reakci mezi acetoacetyl koenzimu A a acetyl koenzymem A. Dojde k vytvoření hydroxymethylglutaryl koenzymu A. V závěru proběhne syntéza mavelonátu pomocí enzymu hydroxymethylglutaryl koenzym A reduktázy.

Následující krok biosyntézy cholesterolu se skládá z konverze mavelonátu na aktivované isoprenoidy isopentanyl-5 -pyrofosfát a dimethylallyl pyrofosfát. Po řadě po sobě následných kondenzací aktivovaných isoprenoidů se vytvoří 30 uhlíkatá molekula skvalenu. Skvalen je biochemický prekurzor všech steroidů. Přestože jde o lineární molekulu, může vytvořit cyklické steroidy. Aby vznikl ze skvalenu cholesterol, musí projít řadou změn za vzniku lanesterolu, který se řadou reakcí přemění na cholesterol. Na obrázku č. 11 lze vidět schéma reakcí, které vedou k syntéze cholesterolu. [24]



Obrázek č. 11: Biosyntéza cholesterolu celkový přehled [24]

Enzym skvalensynthása slouží k utvoření skvalenu ze 2 molekul 2-farnesyl difosfátu. Následuje zacyklení skvalenu enzymem skvalen monooxydásou. K reakci je potřeba jedna molekula NADPH a molekulární kyslík, vznikne 2,3 oxoskvalen, který je enzymem 2,3oxidoskvalen cyklása-lanesterol syntázou transformován z lineární molekuly na cyklickou molekulu lanisterolu. Na obrázku č. 12 lze vidět toto zacyklení. [24]



Obrázek č. 12: Zacyklení 2,3 oxidoskvalenu a vznik lanisterolu. [24]

# Experimentální část

Experimentální část je věnovaná studiu a návrhu možností analýzy mléka pomocí plynové chromatografie. Jde hlavně o analýzu tukové složky mléka.

## Použité chemikálie

V tabulce č. 2 jsou uvedeny chemikálie, použité k extrakci a úpravě vzorků mléka. Jsou zde uvedeny i molekulové hmotnosti, výrobce a čistota látek, které byly použity. Tabulka č. 3 potom ukazuje analyzované mléčné produkty.

Tabulka č. 2: Použité chemikálie

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Chemikálie** | **Molekulová hmotnost (g/mol)** | **Výrobce** | **Čistota** |
| Hexan | 86,18 | Lach-ner s.r.o. | 99,19 % |
| Ethanol | 46,07 | Tereos TTD a.s. Kojetín | + 5 % MeOH |
| Methanol | 32,04 | Lach-ner s.r.o. | 99,98 % |
| NaOH | 39,997 | Lach-ner s.r.o. | 99,37 % |
| 1-naftol | 144,17 | Sigma-Aldrich s.r.o. | 99 % |
| Tetrakosan | 338,65 | Sigma-Aldrich s.r.o. | 99 % |
| Aceton | 58,08 | Penta s.r.o. | 99,19 % |
| Cholesterol | 386,654 | Sigma-Aldrich s.r.o. | 99 % |
| 7-dehydrocholesterol | 384,637 | Sigma-Aldrich s.r.o. | 95 % |
| Vitamin D3 | 384,64 | Sigma-Aldrich s.r.o. | 99 % |
| Destilovaná voda | 18 |  |  |
| Chloroform | 119,38 | Penta s.r.o. | 99,8 % |
| Dichlormethan | 84,93 | Penta s.r.o. | 99,5 % |
| Pyridin | 79,1 | Penta s.r.o. | 99,5 % |
| Hexamethyldisilazan | 161,39 | Sigma-Aldrich s.r.o. | 99 % |

Tabulka č. 3: Mléčné produkty použité k analýze

|  |  |
| --- | --- |
| Analýza 1 |  |
| označení | Výrobek |
| 1,5 | Trvanlivé polotučné mléko Pragolactos |
| 3,5 | Trvanlivé plnotučné mléko Boni |
| 10 | Smetana do kávy 10 % Albert |
| 12 | Smetana na vaření Basic 12 % |
| Analýza 2 |  |
| označení | Výrobek |
| 1,5 krab | čerstvé mléko polotučné Kunín |
| 1,5 plast | Mléko čerstvé polotučné 1,5 % česká chuť |
| 3 krab | Madeta jihočeské mléko lahodné plnotučné |
| 4 plast | Selské mléko Olma |
| kefir 1,1 | Kefírové mléko basic 1,1 % |
| jogurt | Bílý jogurt Basic |
| 16 zakys | Zakysaná smetana Basic 16 % |

## Použité přístroje

**Eppendorf® Centrifuge 5702**

Eppendorf® Centrifuge 5702 je kompaktní centrifuga s menší rychlostí. Rotor dosahuje otáček 4.400 rpm, což odpovídá 3000x násobku g (tíhové zrychlení Země). [26]



Obrázek č. 13: centrifuga Eppendorf® Centrifuge 5702

**Blokový termostat**

Blokový termostat Stuart SBH130 pro viálky je přenosné zařízení, které slouží k ohřevu nádobek s malým objemem různé velikosti. Jde o dvojblokové uspořádaní. [27]



Obrázek č. 14: Blokový termostat

**Plynový chromatograf s hmotnostní detekcí**

Použitý plynový chromatograf je Agilent 7890 A (Agilent, USA) s hmotnostním spektrometrem Agilent 5975C Inert sloužící pro detekci analyzovaných látek. V plynovém chromatografu byla použita kolona ZB-5HT Inferno (Phenomenex, USA) s rozměry 30 m x 0,25 mm x 0,1 µm. Jde o kolonu, jež vydrží vysoké tepelné zatížení, a to až 430 °C. [28], [29]



Obrázek č. 15: Plynový chromatograf je Agilent 7890 A s hmotnostním spektrometrem Agilent 5975C Inert.

## Laboratorní postupy

### Analýza látek mléka obsažených v jeho vůni pomocí SPME

V úvodním experimentu se mléko nechalo hodinu při 40 °C ve viálce, do níž se dalo SPME vlákno, na které se nechaly adsorbovat dané látky. Analýza potom proběhla na plynovém chromatografu s hmotností detekcí, kde se látky z vlákna nechaly desorbovat. Pro adsorpci bylo zvoleno vlákno 57348-U. Je to SPME vlákno složené s divinylbenzenu/Carboxenu/Polydimethylsiloxanu (DVB/CAR/PDMS), nese označení StableFlex (Supelco, Bellefonte, USA).

### Extrakce tukové složky z mléka: Společný postup pro další úpravy vzorků

Tento postup byl inspirován postupem nalezeným v citovaném článku. [30] Nejdříve bylo smícháno 2,4 ml mléka, 3,2 ml dichlormethanu a 1,6 ml ethanolu denaturovaného 5 % methanolu. Potom byla směs 15 minut třepána a následně byla směs centrifugována po dobu 4 minut při 4400 otáček/minutu. Dále bylo přidáno 1,6 ml vody, směs se opět nechala 15 minut třepat a vzniklý roztok se umístil do centrifugy na 4 minuty. Dalším krokem bylo odlití horní vodné fáze od spodní fáze, ta se dále používala. Pro lepší oddělení fází bylo přidáno 1,6 ml nasyceného roztoku NaCl a směs se opět nechala 15 minut třepat a 4 minuty centrifugovat. Po centrifugaci byla opět odlita horní fáze a dále se používala fáze dolní (je možné přidat síran sodný pro vysušení a směs centrifugovat, ale není to nutné). Spodní fáze byla automatickou pipetou převedena do viálky a nechala se odpařit do sucha pomocí foukání dusíku pro snadnější odpaření při 50 °C.

### Analýza triacyl glycerolů a mastných kyselin

Po odpaření tukové části se odparek rozpustil v jednom mililitru směsi toluenu a methanolu v poměru 1:1. K roztoku bylo přidáno 1 ml methanolického roztoku 0,2 M KOH a probíhala methanolýza. Dále se směs neutralizovala 200 μl kyseliny octové a bylo přidáno 2 ml vody. Pro extrakci se směs nechala extrahovat pomocí 2 ml směsi hexanu a chloroformu v poměru 4:1. Extrakt obsahující methyl estery byl nastříknut do GC s hmotností detekcí.

### Analýza steroidních látek

Tento postup byl inspirován postupem v následující citaci. [31]   
K mléčnému tuku, který byl získán z postupu číslo 1, bylo přidáno 5 ml 2,5 M NaOH v 50 % ethanolu a takto vzniklý roztok se nechal vařit ve viálce 1 h při 80 až 90 °C. Roztok se nechal vychladnout a byl extrahován 1 ml směsi hexan : ethylacetát (9:1) nebo 1 ml směsi hexan : chloroform (4:1). Roztok se nechal zakoncentrovat na 1 ml. Nakonec byl vzorek analyzován pomocí GC/MS.

### Silanizace steroidních látek

Výsledný zkoncentrovaný extrakt z postupu 3.3.4. byl odpařen až do sucha a k odparku bylo přidáno 0,5 ml pyridinu a 0,5 ml hexamethyldisilazanu. Vzorek byl inkubován 1 hodinu při 90 °C. Nakonec byla provedena analýza pomocí GC/MS.

### Postup souběžného stanovení MK a steroidních látek

Tento postup byl sestaven na základě následujícího citovaného článku. [32]  
Do plastové zkumavky bylo namícháno 2,5 ml mléka, 0,5 ml nasyceného roztoku NaCl, 4 ml ethanolu, 0,35 ml 1 M HCl a 3 ml hexanu. Směs se za občasného promíchání nechala 30 minut reagovat, aby došlo k rozštěpení tukových globulí. Po 30 minutách se směs nechala 4 minuty centrifugovat při 4400 otáček/minutu. Odebrala se horní hexanová fáze pomocí automatické pipety, roztoku bylo asi 2,5 ml. Pro další práci se použilo 2 ml extraktu, ke kterému se přidalo 0,4 ml 2,5 M roztoku NaOH v methanolu. Směs se nechala po dobu 30 minut při 40 °C v blokovém termostatu nebo 1,5 h při laboratorní teplotě. Následně se k roztoku přidalo 5 ml vody a směs se protřepala a nechala se 3x zcentrifugovat, aby došlo k oddělení gelové hmoty, jež se v roztoku vytvořila. Ze směsi byla odebrána horní fáze, a nechala se odpařit do sucha při 70 °C při foukání dusíku. Z předchozího postupu bylo zjištěno, že sililace je vhodná pro zlepšení detekce. Proto byla provedena i s tímto vzorkem. K vysušenému vzorku bylo přidáno 200 μl pyridinu a 200 μl hexamethyldisilazanu, jako katalyzátor bylo použito 5 μl kyseliny trifluoroctové. Roztok se nechal 30 minut při teplotě 90 °C. Nakonec bylo přidáno 600 μl hexanu, aby výsledný objem byl 1 ml a provedla se analýza.

# Výsledky a diskuze

## Headspace SPME analýza látek obsažených ve vůní mléka

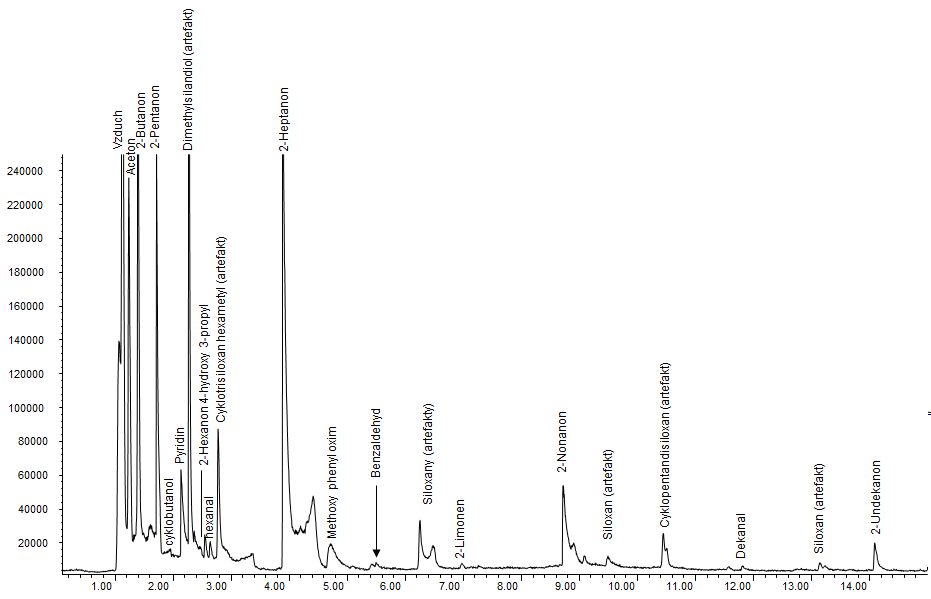
Prvním cílem bylo analyzovat látky, které jsou zodpovědné za vůni mléka. Jedná se o skupinu těkavých látek, jež při ohřevu mohou snadno přecházet do plynného stavu. Kvůli jejich snadnému zplynění se nabízí prekoncentrační metoda SPME v headspace uspořádání. Látky se uvolní z roztoku a přejdou do plynu nad kapalinou, kde se mohou adsorbovat na vlákno SPME.

Pro experimentální práci bylo použito SPME vlákno s kombinovanou extrakční fází obsahující karboxen, divinylbenzen a polydimethylsiloxan. Po hodině adsorpce se vlákno vyjmulo z prostoru nad vzorkem a vložilo se do plynového chromatografu, zvýšenou teplotou se nechaly naadsorbované látky desorbovat a následně analyzovat. Na obrázku č. 16 je možné vidět, že ve výsledném chromatogramu byly obsaženy siloxany, které mohly být do nástřiku zaneseny z SPME vlákna, jde tedy o artefakty. Na začátku je možné vidět vzduch, který se také naadsorboval na vlákno, dále jsou vidět methyl-ketony, nejmenší aceton, přes 2-butonon až k největšímu 2-undekanonu. V mléce byl obsažen i benzaldehyd a dekanal. Objevil se i limonen, který do mléka mohl být zanesen z potravy, kterou daná kráva pásala.

Ketony, obzvláště v poloze 2, jsou typické pro mléko, protože vznikají při počátečních fázích laktace.

Tento proces má negativní energetickou bilanci, reakce vzniku ketonů je katabolická. [33] U krav je tento jev běžný a ketóza se vyskytuje u 90 % krav v období dvou měsíců po porodu. Vrchol tohoto jevu je 2. až 3. týden po porodu telat. [34] Na počátku tvorby mléka se ketony mohou v mléku vyskytovat kvůli záporné energetické bilanci, hladina ketonů však kolísá v závislosti na ročním období. To může být zapříčiněno horší kvalitou krmné směsi, která obsahuje ketotvorné látky. V letním období, kdy se krávy pasou na louce, funguje lépe jejich metabolismus odbourávání tuků i ketonů a výskyt těchto látek v mléce je menší. Množství hladiny ketonů v mléku záleží i na druhu krav. [33]

Tento experiment ukázal, že je možné metodou SPME analyzovat látky, které jsou zodpovědné za vůni, případně další senzorické vlastnosti mléka. Rozbor vůně mléka ukázal, že mléko obsahuje ketony. Plynovou chromatografii lze analyzovat také tukovou frakci mléka.



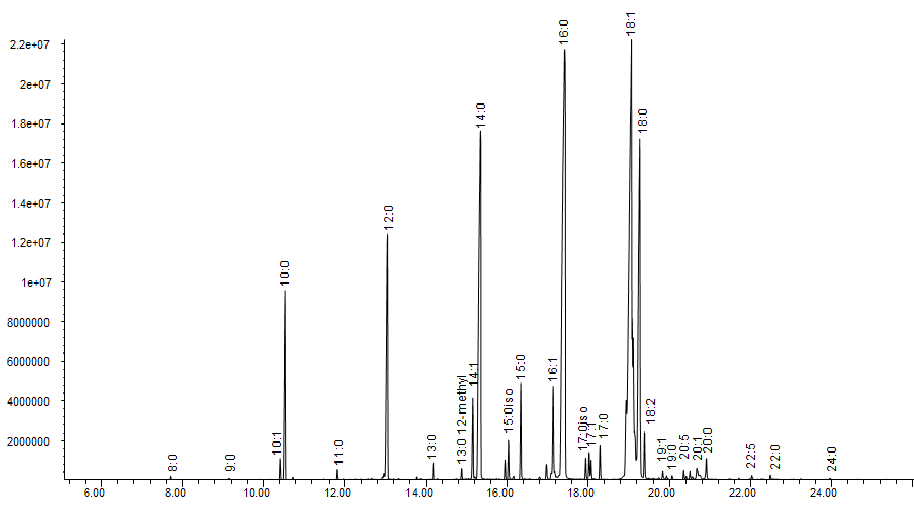
Obrázek č. 16: Chromatogram popisující head space SPME analýzu, TIC

## Analýza mastných kyselin v mléku

Pomocí plynové chromatografie byla dále provedena analýza poskytující informace o zastoupení mastných kyselin v mléce.

Nejdříve se mléko smíchalo s dichlormethanem a ethanolem, aby došlo k rozrušení tukových globulí, a přidala se voda a nasycený roztok NaCl pro podporu extrakce lipidových složek do organického rozpouštědla vysolovacím efektem. Dichlormethanová část byla oddělena od zbytku roztoků a dichlormethan byl odpařen v blokovém termostatu při 70 °C v mírném proudu dusíku. Tuková frakce mléka se znovu rozpustila a byl přidán methanolický roztok hydroxidu sodného, aby byla provedena methanolýza lipidů za vzniku methylesterů mastných kyselin, které mohly být převedeny do organické fáze a mohly být analyzovány. Po takto provedené extrakci byly v chromatogramu vidět methylestery mastných kyselin a další tukové složky jako cholesterol. Jiné steroidní látky nebyly za těchto podmínek detegovány vůbec nebo jen v zanedbatelném množství. Na obrázku č. 17 můžeme vidět zastoupení mastných kyselin. Hlavními mastnými kyselinami jsou šestnáctiuhlíkatá kyselina palmitová, osmnáctiuhlíkatá kyselina stearová a osmnáctiuhlíkatá s jednou dvojnou vazbou kyselina olejová. Pro mléčný tuk jsou typické i liché mastné kyseliny například s 9, 11, 13, 15 atomy uhlíku, a také kratší kyseliny, např. s 8 uhlíky. Tyto složky jsou obsaženy v menších množstvích než hlavní kyseliny. Vznikají v mléce jako degradační produkty mastných kyselin s dlouhými řetězci nebo jsou syntetizovány bakteriemi žijícími v bachoru krávy. [35]

Na obrázku č. 17 nelze vidět steroidní látky, jak je například cholesterol. Do extraktu totiž primárně přejdou mastné kyseliny – je jich velké množství, zatímco cholesterol a jemu podobné látky jsou diskriminovány. V záznamu je vidět rozsáhlé spektrum mastných kyselin. Aby bylo možné vyextrahovat steroidní látky, bude potřeba zařadit další postup, u kterého by došlo k potlačení vlivu mastných kyselin, které jsou v majoritním množství v mléce. Steroidy by mohly do extraktu přejít ve větším množství díky nižšímu obsahu nebo úplné absenci mastných kyselin. Také jejich signál bude lépe viditelný, když v chromatogramu nebudou tak velké signály mastných kyselin. K analýze steroidních látek bude potřeba zařadit extrakci nebo jiný izolační krok, který povede k potlačení vlivu mastných kyselin.

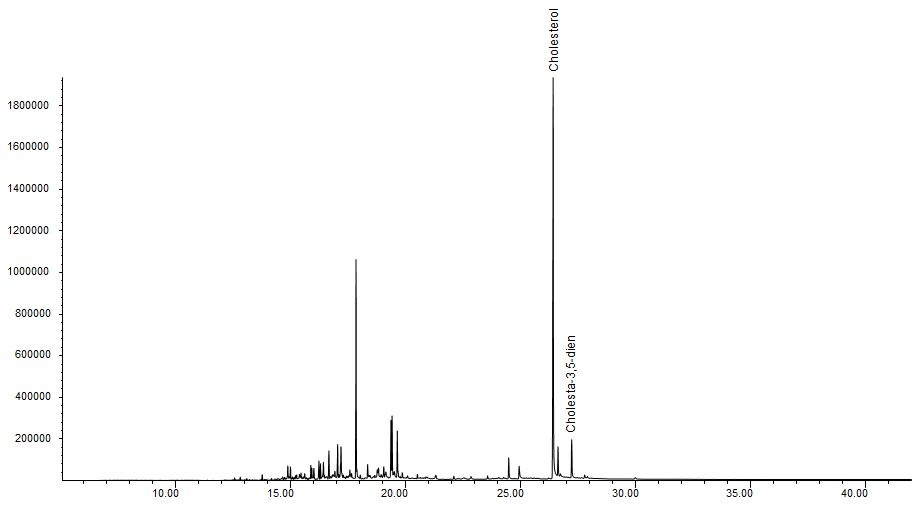


Obrázek č. 17: Záznam chromatogramu z analýzy MK, TIC

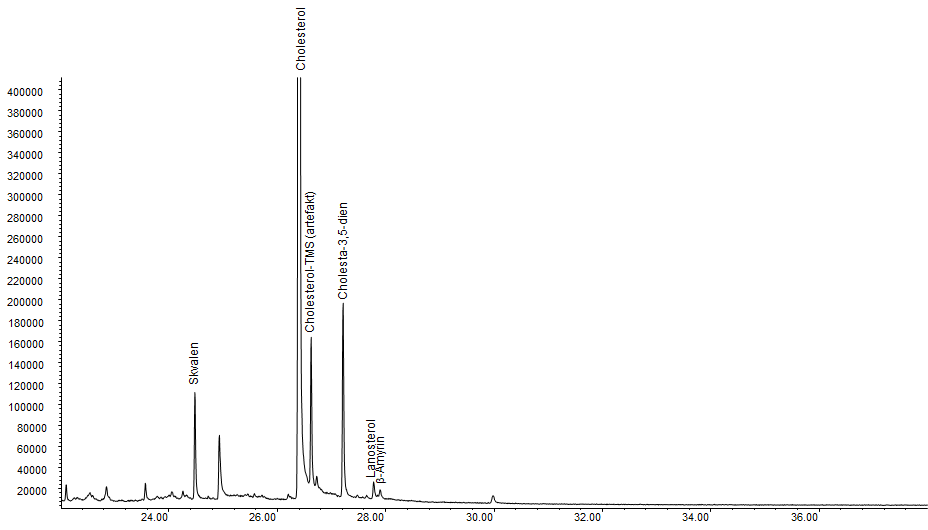
## Analýza steroidních látek v mléku

Bylo potřeba navrhnout postup, ve kterém by došlo k extrakci pouze steroidních látek tím, že se oddělí od mastných kyselin nebo se zamezí přechodu mastných kyselin do extrakčního rozpouštědla. Když se tuky a mastné kyseliny zmýdelní pomocí alkalického hydroxidu, vytvoří se z nich alkalické soli. Nabité formy nebudou přecházet do extrakční fáze a přednostně dojde k extrakci steroidů, protože steroidy jsou neutrální, náboj nemají. V důsledku hydrolýzy došlo k poklesu signálu mastných kyselin, díky tomu bylo možné vzorek více zakoncentrovat nebo dávkovat větší množství a lépe detegovat signál steroidů, jak je vidět na obr. 18 nebo v detailu na obr. 19. Viditelné byly cholesterol, cholesta-3,5-dien, lanosterol, β-amyrin, a skvalen, který je prekurzorem cholesterolových látek. V chromatogramu je vidět i TMS derivát cholesterolu, ten sem mohl být zanesen při nástřiku, a je tedy artefaktem, protože při tomto postupu nebylo použito silanizační činidlo.

V tomto postupu na konci extrakce docházelo ke zgelovatění extraktu a jeho nástřik do plynového chromatografu byl složitý. Ukázalo se, že by bylo dobré upravit metodu tak, aby bylo možné analyzovat mastné kyseliny i steroidní látky vedle sebe v jediné analýze nebo alespoň s jednou přípravou vzorku. Steroidní látky by bylo možno stanovit kvantitativně, a to konktrétně u cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu. Pro stanovení obou skupin čili mastných kyselin a steroidů bylo nutné zařadit další úpravu vzorků, která by převedla mastné kyseliny na nenabité formy (methylestery) a zároveň by zvětšila odezvu signálů u steroidních látek. Byl navržen následující postup, v němž je možné analyzovat obě skupiny látek a zároveň dojde k oddělení složek, které způsobovaly gelovatění na konci postupu.

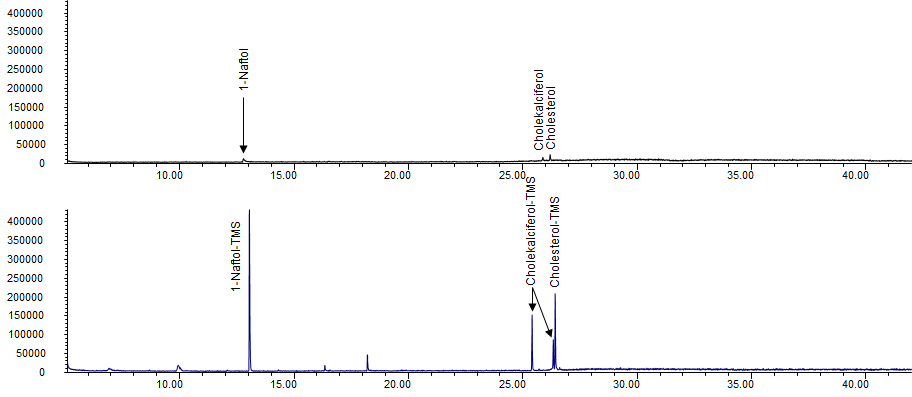


Obrázek č. 18: Úplný chromatogram pro analýzu steroidů, TIC



Obrázek č. 19: Detail chromatogramu ze záznamu steroidů, TIC

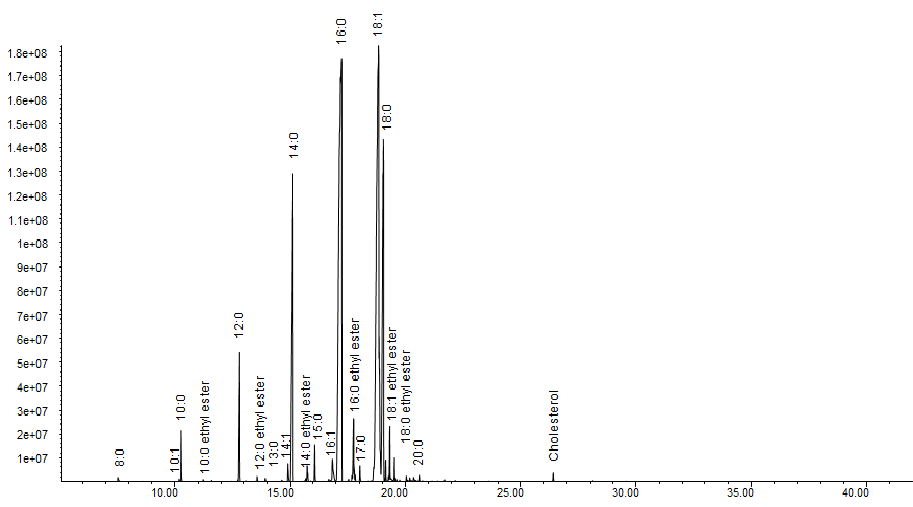
Dále se ověřilo, jestli je v postupu důležitá silanizace. Byl změřen nástřik standardů bez silanizace a s ní. Na obrázku č. 20 je vidět, že po silanizaci dojde k významnému zvětšení signálu, což potvrzuje významnost silanizace při analýze steroidních látek.



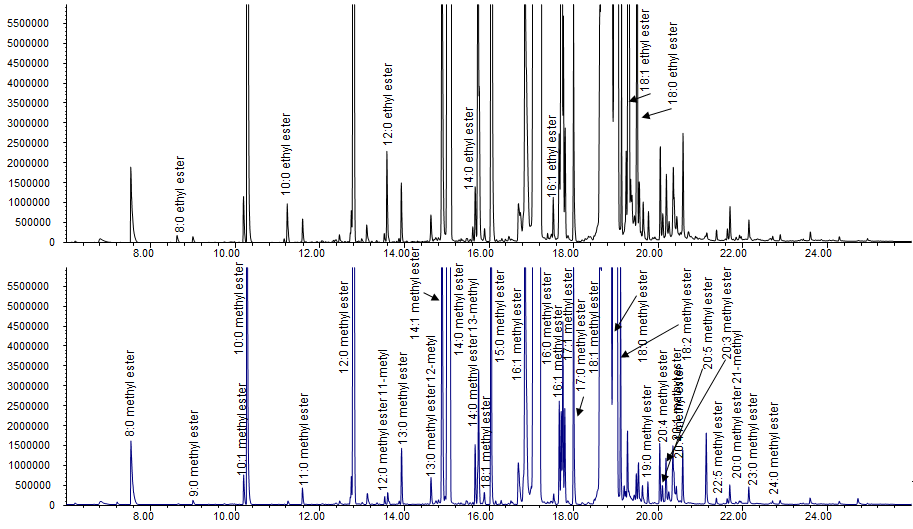
Obrázek č. 20: Porovnání nástřiku standardů před a po silanizaci. TIC

## Postup souběžného stanovení MK a steroidních látek

Oba předchozí postupy nastíní společný cíl: postup, kde by šlo analyzovat mastné kyseliny a steroidy vedle sebe. V tomto postupu byly jako první rozrušeny tukové globule a vysráženy bílkoviny pomocí nasyceného roztoku NaCl, ethanolu a HCl. Vzniklý roztok se nechal za občasného míchání odstát půl hodinu. Pro extrakci byl použit hexan. Hexanová vrstva se odebrala a k ní se přidal 1 M methanolický roztok NaOH, který měl transesterifikovat mastné kyseliny. Směs se nechala půl hodiny inkubovat při 40 °C za občasného promíchání. Po inkubaci se přidala voda. Látky, které způsobovaly gelovatění se oddělily centrifugací, pro další zpracování se vzala horní hexanová vrstva. Při tomto postupu už nedocházelo v závěru ke gelovatění, protože látky, které toto způsobovaly, byly odděleny ze směsi mléka. Horní vrstva se nechala odpařit. Odparek se nechal nasilanizovat, protože silanizace pomohla zvětšit signály steroidů, jak bylo ukázáno v předešlém postupu. Silanizace neprobíhala s mastnými kyselinami, protože ty už byly chráněné esterifikací a se silanizačním činidlem nereagovaly. S využitím dvou derivatizačních postupů se podařilo analyzovat mastné kyseliny a steroidy vedle sebe. Na obrázku č. 21 je vidět, že když byl použit k rozrušení tukových globulí ethanol, ve výsledném chromatogramu se vyskytovaly vedle převládajících methylesterů i ethylestery, například ethylestrery kyselin s 10, 12, 14, 16, a 18 uhlíky. To mohlo být způsobeno tím, že ethanol v malé míře přešel do hexanové vrstvy. Když se k rozrušení globulí použil methanol, došlo k vyřešení tohoto problému a ethyl estery se už nevyskytovaly. Porovnání obou extrakcí je možné vidět na obrázku č. 22. Tento postup se ukázal vhodný pro stanovení mastných kyselin a steroidů vedle sebe, byl vyřešen i problém s gelovatěním výsledného extraktu.

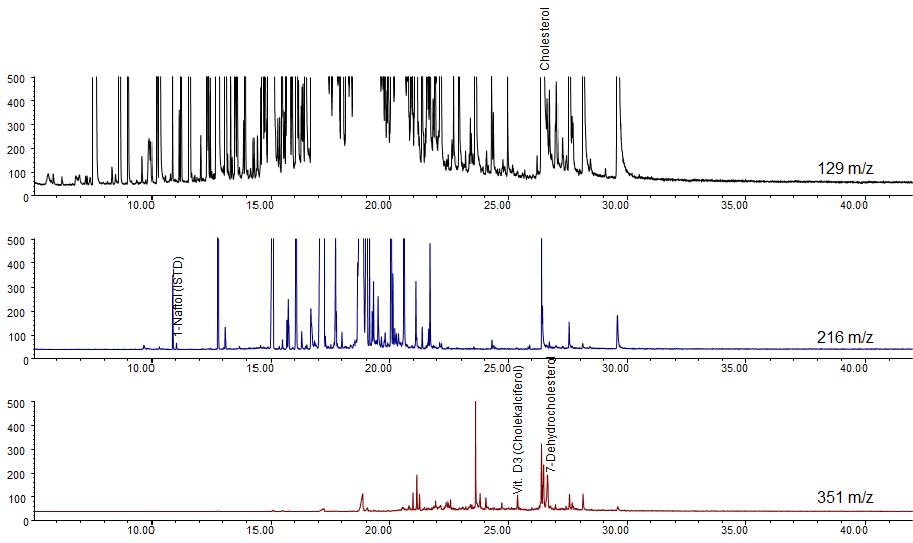


Obrázek č. 21: Chromatogram při rozrušení globulí ethanolem, TIC



Obrázek č. 22: Porovnání estrů MK při extrakci ethanolem (nahoře) a methanolem (dole), TIC

Pro stanovení bylo nutné použít vnitřní standard. Jako první byl použit 1-naftol. Když byl ke vzorku mléka 1-naftol přimíchán, došlo k poklesu jeho signálu ve srovnání se standardem samotného 1-naftolu. Příčinou toho mohl být fakt, že 1-naftol je planární a naftalenové jádro se dobře adsorbuje hlavně na bílkoviny obsažené v mléce, dále na stěny nádobek, ve kterých probíhá extrakce. Na obrázku č. 23 je vidět porovnání záznamu chromatogramu pro různé hodnoty m/z. Na černém, který byl rekonstruován pro hodnotu 129 m/z, lze vidět signál cholesterolu, pro m/z 216 je na obrázku viditelný signál 1-naftolu a pro hodnotu 351 m/z je vidět signál pro vitamin D3 a 7-dehydrocholesterol.



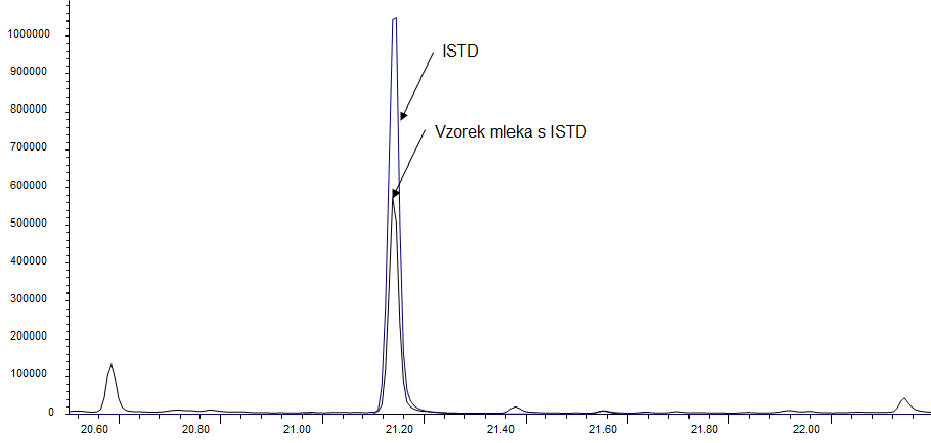
Obrázek č. 23: Analýza mléka, TMS, SIM

Na obrázku č. 24 je patrný pokles signálu 1-naftolu oproti signálu, který byl změřen ve vzorku standardů. Tento pokles je značný a nepřijatelný. Ztráty signálu jsou téměř 99 %.



Obrázek č. 24: Analýza vnitřního standardu a vzorku mléka s přídavkem vnitřního standardu 1-naftolu, TMS, SIM 2016 m/z (1814/3455788)

Kvůli nevhodnosti vnitřního standardu bylo nutné najít jiný, u kterého by pokles signálu ve vzorku oproti signálu v čistém standardu nebyl tak velký. Jako další standard byl použit tetrakosan, ten už byl dostatečně inertní a nedocházelo k tak velké sorpci na bílkoviny. Na obrázku č. 25 je vidět, že k jistému poklesu dochází, ale tento pokles je zapříčiněn ztrátami při extrakcích, protože ne vždy se podaří odebrat celou horní vrstvu. Výtěžek tetrakosanu po extrakci přesahuje 50 %. Na obrázku č. 25 lze tento výtěžek vidět.



Obrázek č. 25: Analýza vnitřního standardu a vzorku mléka s přídavkem vnitřního standardu tetrakosanu, TIC

## Porovnání mléčných produktů s různým obsahem tuku.

Pro stanovení cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu byly použity tři metody kvantifikace: metoda kalibrační křivky, metoda standardního přídavku a metoda vnitřního standardu. Výsledky je možné porovnat na obrázcích č. 26 až 31 a v tabulkách č. 4 a 5. Metoda kalibrační křivky se kvůli ztrátám látek při extrakci ukázala jako nepříliš vhodná. Nejlepší se ukázala metoda standardního přídavku, ale pro její aplikaci je nutné zpracovávat více vzorků s jednotlivými přídavky, a to je časově náročné. Naproti tomu vhodná se ukázala metoda vnitřního standardu, protože dovoluje sériové stanovení v běžné laboratoři. Vnitřní standard koriguje ztráty při extrakci, protože celému procesu také podléhá stejně jako stanovované látky. Byly analyzovány dvě série vzorků.

**Kalibrační křivka:**

Obrázek č. 26: Kalibrační křivka pro cholesterol

Obrázek č. 27: Kalibrační křivka pro 7-dehydrocholesterol

**Standardní přídavek:**

Obrázek č. 28: Standardní přídavek cholesterolu pro polotučné mléko (1,5 %)

Obrázek č. 29: Standardní přídavek cholesterolu pro plnotučné mléko (3,5 %)

Obrázek č. 30: Standardní přídavek 7-dehydrocholesterolu pro polotučné mléko (1,5 %)

Obrázek č. 31: Standardní přídavek 7-dehydrocholesterolu pro plnotučné mléko (3,5 %)

**Vnitřní standard:**

Tabulka č. 4: Podíly ploch k vnitřnímu standardu, odezvový faktor

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Cholekalciferol | Cholesterol | 7-Dehydrocholesterol |
| měření | Podíly ploch k vnitřnímu standardu | | |
| 1 | 9,592 | 8,403 | 34,113 |
| 2 | 8,894 | 7,414 | 31,125 |
| 3 | 10,288 | 7,303 | 33,580 |
| 4 | 8,804 | 6,810 | 30,632 |
| 5 | 8,266 | 7,156 | 30,033 |
| 6 | 8,095 | 7,071 | 30,511 |
| Průměr (odezvový faktor) | 8,990 | 7,360 | 31,666 |
| Směrodatná odchylka | 0,755 | 0,503 | 1,582 |
| Relativní chyba | 8,393 | 6,841 | 4,996 |

Tabulka č. 5: Porovnání koncentrací všech 3 metod

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| koncentrace | ug/ml |  |  |  |  |  |
|  | kalibrační křivka | vnitřní standard | standardní přídavek | kalibrační křivka | vnitřní standard | standardní přídavek |
| vzorek | Cholesterol | | | 7-dehydrocholesterol | | |
| Analýza 1 |  |  |  |  |  |  |
| 1,5 | 59,37 | 139,40 | 79,08 | 0,11 | 0,37 | 0,23 |
| 3,5 | 71,70 | 266,09 | 296,11 | 0,20 | 0,95 | 0,68 |
| 10 | 114,88 | 615,52 | 434,59 | 0,58 | 3,31 | 1,85 |
| 12 | 54,98 | 167,87 | 195,28 | 0,32 | 1,40 | 0,96 |
| Analýza 2 |  |  |  |  |  |  |
| vzorky | Cholesterol | | | 7-dehydrocholesterol | | |
| 1,5 krab | 33,72 | 104,88 | 51,11 | 0,04 | 0,36 | 0,11 |
| 1,5 plast | 92,14 | 164,01 | 146,37 | 0,16 | 0,34 | 0,43 |
| 3 krab | 61,76 | 248,18 | 350,31 | 0,15 | 0,81 | 0,76 |
| 4 plast | 70,11 | 278,61 | 286,86 | 0,18 | 0,90 | 0,74 |
| kefir 1,1 | 52,92 | 106,29 | 79,87 | 0,12 | 0,38 | 0,41 |
| jogurt | 66,06 | 176,93 | 220,76 | 0,15 | 0,54 | 0,44 |

Z výsledků uvedených v tabulce č. 5 vyplývá, že metoda kalibrační křivky není pro stanovení cholesterolu a 7-dehydrocholesterolu vhodná, kvůli ztrátám analytu při extrakčních krocích. Metoda standardního přídavku se ukázala jako nejlepší pro stanovení těchto dvou látek, ale její nevýhoda spočívá v úpravě a analýze nejméně dvou vzorků. Při větším množství vzorků může být tato metoda poněkud zdlouhavá. Třetí použitá metoda, metoda vnitřního standardu dobře koriguje ztráty při extrakcích, protože vnitřní standard je přítomný ve vzorcích a upravuje se společně se vzorky mléka. Také stačí pouze jedna úprava vzorků pro jeden vzorek. Jen analýza jednoho vzorku probíhá dvakrát pro stanovení steroidů a zastoupení mastných kyselin. V prvním případě se využívá dávkovacího pulzu a monitorování selektivních iontů, ve druhém případě se dávkuje s děličem toku při záznamu celkového iontového proudu. Metody vnitřního standardu a standardního přídavku poskytují podobné výsledky a obě jsou vhodné pro dané stanovení. Z výše zmíněných důvodů se pro rutinní stanovení nejvíce hodí metoda vnitřního standardu kvůli nutnosti úpravy menšího počtu vzorků.

Analýza mastných kyselin byla testována s plnotučným mlékem (3,5 %). K stanovení byly použity vzorky bez zředění, s ředěním a nástřik s děličem toku (splitem). U neředěného vzorku docházelo u hlavních složek mléka k nedostatečné separaci nebo k přehlcení detektoru, a tím i ke zkreslení signálu. Při naředění se tento problém vyřešil. Porovnání lze vidět v tabulce č. 6. Nástřik s děličem toku ukázal, že touto cestou můžeme analýzu zrychlit, odpadá nutnost vzorek ředit.

Jak již bylo řečeno, mléko obsahuje různé mastné kyseliny, a tak bylo předmětem dalšího zájmu porovnat složení tukové složky v různých mléčných produktech. Pro první sérii analýz byly použity tyto produkty: polotučné mléko s 1,5 % tuku, plnotučné mléko s 3,5 % tuku, smetánka do kávy s 10 % tuku a smetana na vaření s 12 % tuku. Pro druhou sérii analýz byly použity další mléčné produkty, jejich seznam je uveden v tabulce č. 3. Porovnání je možné vidět v tabulce č. 7 a 8. Jak je zřejmé, obsah mastných kyselin se liší. Ve vzorcích mléka polotučného a plnotučného, z první série analýz, jsou podíly minoritních mastných kyselin větší než u tučnějších produktů. Největší podíl kyseliny dodekanové (1,663 %) mělo mezi minoritními kyselinami polotučné mléko. U tučnějších produktů, tedy u smetánky do kávy a smetany na vaření, je obsah hlavních mastných kyselin o něco větší. U smetánky byl největší obsah kyseliny palmitové - konkrétně 51,865 %. U smetany na vaření s 12 % tuku bylo ze všech vzorků nejvíce kyseliny stearové 9,020 % a olejové 31,581 %. Ve všech vzorcích byly obsaženy všechny mastné kyseliny, které byly v mléce detegovány.

Tabulka č. 6: Procentuální zastoupení mastných kyselin ve zkoumaných vzorcích. Nástřik plnotučného mléka (nezředěné a zředěné).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Mléko 3,5 % | | | |
|  | ne zřed. | zřed. | split |
| MK | % | % | % |
| 8:0 | 0,138 | 0,002 | 0,056 |
| 9:0 | 0,007 | 0,002 | 0,006 |
| 10:1 | 0,037 | 0,032 | 0,047 |
| 10:0 | 0,657 | 0,501 | 0,618 |
| 11:0 | 0,02 | 0,019 | 0,022 |
| 12:0 | 2,485 | 1,194 | 1,443 |
| 12:0 iso | 0,008 | 0,008 | 0,006 |
| 13:0 | 0,066 | 0,053 | 0,052 |
| 13:0 iso | 0,035 | 0,038 | 0,034 |
| 14:1 | 0,449 | 0,439 | 0,4 |
| 14:0 | 10,055 | 8,304 | 8,627 |
| 14:0 iso | 0,067 | 0,097 | 0,075 |
| 15:1 | 0,018 | 0,031 | 0,015 |
| 15:0 | 0,613 | 0,635 | 0,608 |
| 16:1 | 0,922 | 1,143 | 1,029 |
| 16:0 | 35,293 | 49,5 | 49,048 |
| 16:0 iso | 0,113 | 0,724 | 0,134 |
| 17:1 | 0,107 | 0,013 | 0,132 |
| 17:0 | 0,302 | 0,337 | 0,283 |
| 18:1 | 35,482 | 28,594 | 28,334 |
| 18:0 | 12,386 | 8,032 | 8,329 |
| 18:2 | 0,298 | 0,151 | 0,048 |
| 19:0 | 0,027 | 0,025 | 0,059 |
| 20:4 | 0,071 | 0,015 | 0,019 |
| 20:5 | 0,026 | 0,019 | 0,047 |
| 20:3 | 0,061 |  | 0,079 |
| 20:1 | 0,129 | 0,022 | 0,022 |
| 20:0 | 0,064 | 0,056 | 0,058 |
| 22:5 | 0,008 | 0,003 | 0,008 |
| 20:0 iso | 0,026 | 0,004 | 0,014 |
| 23:0 | 0,024 | 0,005 | 0,018 |
| 24:0 | 0,007 | 0,001 | 0,007 |

Tabulka č. 7: Porovnání mléčných výrobků první série.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Analýza 1 | | | | | |
|  | 1,50% | 3,50% | 10% | 12% |
| MK | % | % | % | % |
| 8:0 | 0,139 | 0,056 | 0,043 | 0,035 |
| 9:0 | 0,005 | 0,006 | 0,003 | 0,003 |
| 10:1 | 0,062 | 0,047 | 0,039 | 0,034 |
| 10:0 | 0,83 | 0,618 | 0,494 | 0,444 |
| 11:0 | 0,023 | 0,022 | 0,01 | 0,014 |
| 12:0 | 1,663 | 1,443 | 1,525 | 1,195 |
| 12:0 iso | 0,008 | 0,006 | 0,004 | 0,005 |
| 13:0 | 0,045 | 0,052 | 0,022 | 0,03 |
| 13:0 iso | 0,046 | 0,034 | 0,019 | 0,024 |
| 14:1 | 0,573 | 0,4 | 0,352 | 0,27 |
| 14:0 | 9,101 | 8,627 | 9,245 | 7,921 |
| 14:0 iso | 0,109 | 0,075 | 0,055 | 0,054 |
| 15:1 | 0,031 | 0,015 | 0,009 | 0,012 |
| 15:0 | 0,772 | 0,608 | 0,362 | 0,436 |
| 16:1 | 1,12 | 1,029 | 0,63 | 0,702 |
| 16:0 | 47,914 | 49,048 | 51,865 | 47,553 |
| 16:0 iso | 0,178 | 0,134 | 0,08 | 0,093 |
| 17:1 | 0,251 | 0,132 | 0,109 | 0,141 |
| 17:0 | 0,374 | 0,283 | 0,14 | 0,186 |
| 18:1 | 27,529 | 28,334 | 25,814 | 31,581 |
| 18:0 | 8,688 | 8,329 | 8,838 | 9,02 |
| 18:2 | 0,063 | 0,048 | 0,15 | 0,031 |
| 19:0 | 0,062 | 0,059 | 0,01 | 0,036 |
| 20:4 | 0,027 | 0,019 | 0,016 | 0,014 |
| 20:5 | 0,048 | 0,047 | 0,023 | 0,032 |
| 20:3 | 0,01 | 0,079 | 0,012 | 0,012 |
| 20:1 | 0,102 | 0,022 | 0,044 | 0,06 |
| 20:0 | 0,032 | 0,058 | 0,047 | 0,015 |
| 22:5 | 0,156 | 0,008 | 0,006 | 0,013 |
| 20:0 iso | 0,011 | 0,014 | 0,02 | 0,006 |
| 23:0 | 0,02 | 0,018 | 0,011 | 0,013 |
| 24:0 | 0,006 | 0,007 | 0,004 | 0,006 |

Tabulka č. 8: Porovnání dalších mléčných výrobků série 2

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Analýza 2 | | | | | | | | |
|  | 1,5 krab | 1,5 plast | 3 krab | 4 plast | 1,1 kefír | jogurt | 16 zakys. |
| MK | % | % | % | % | % | % | % |
| 8:0 | 0,009 | 0,002 | 0,001 | 0,001 | 0,395 | 0,034 | 0,000 |
| 9:0 | 0,004 | 0,002 | 0,000 | 0,001 | 0,002 | 0,003 | 0,000 |
| 10:1 | 0,007 | 0,016 | 0,012 | 0,001 | 0,015 | 0,029 | 0,011 |
| 10:0 | 0,104 | 0,282 | 0,238 | 0,065 | 0,192 | 0,483 | 0,158 |
| 11:0 | 0,005 | 0,011 | 0,012 | 0,001 | 0,004 | 0,015 | 0,007 |
| 12:0 | 1,461 | 1,545 | 1,242 | 0,835 | 1,381 | 1,276 | 0,772 |
| 12:0 iso | 0,005 | 0,022 | 0,009 | 0,006 | 0,014 | 0,009 | 0,004 |
| 13:0 | 0,083 | 0,056 | 0,045 | 0,033 | 0,070 | 0,044 | 0,022 |
| 13:0 iso | 0,086 | 0,060 | 0,051 | 0,036 | 0,062 | 0,041 | 0,024 |
| 14:1 | 0,790 | 0,620 | 0,410 | 0,332 | 0,589 | 0,433 | 0,198 |
| 14:0 | 8,960 | 7,513 | 7,314 | 5,875 | 8,041 | 6,901 | 7,782 |
| 14:0 iso | 0,170 | 0,135 | 0,232 | 0,083 | 0,147 | 0,086 | 0,048 |
| 15:1 | 0,438 | 0,036 | 0,021 | 0,192 | 0,407 | 0,200 | 0,092 |
| 15:0 | 1,142 | 0,840 | 0,577 | 0,460 | 1,022 | 0,533 | 0,247 |
| 16:1 | 1,716 | 1,144 | 0,847 | 0,722 | 1,201 | 0,794 | 0,390 |
| 16:0 | 46,620 | 50,936 | 48,755 | 51,379 | 47,111 | 52,485 | 50,144 |
| 16:0 iso | 0,275 | 0,310 | 0,211 | 0,133 | 0,382 | 0,133 | 0,059 |
| 17:1 | 0,366 | 0,144 | 0,103 | 0,174 | 0,471 | 0,181 | 0,044 |
| 17:0 | 0,516 | 1,093 | 0,266 | 0,212 | 1,565 | 0,224 | 0,108 |
| 18:1 | 27,234 | 1,510 | 30,356 | 1,392 | 2,110 | 1,305 | 29,930 |
| 18:0 | 9,045 | 25,302 | 1,248 | 30,362 | 24,656 | 27,533 | 0,695 |
| 18:2 | 0,084 | 7,452 | 7,535 | 7,250 | 8,852 | 6,794 | 9,064 |
| 19:0 | 0,100 | 0,356 | 0,036 | 0,026 | 0,472 | 0,028 | 0,011 |
| 20:4 | 0,087 | 0,094 | 0,063 | 0,069 | 0,122 | 0,069 | 0,033 |
| 20:5 | 0,012 | 0,044 | 0,051 | 0,024 | 0,120 | 0,027 | 0,011 |
| 20:3 |  | 0,094 | 0,028 | 0,055 | 0,208 | 0,060 | 0,023 |
| 20:1 | 0,180 | 0,126 | 0,131 | 0,120 | 0,065 | 0,131 | 0,041 |
| 20:0 | 0,050 | 0,156 | 0,114 | 0,087 | 0,183 | 0,090 | 0,033 |
| 22:5 | 0,403 | 0,016 | 0,016 | 0,008 | 0,015 | 0,012 | 0,006 |
| 20:0 iso | 0,004 | 0,037 | 0,038 | 0,034 | 0,047 | 0,029 | 0,021 |
| 23:0 | 0,026 | 0,041 | 0,030 | 0,023 | 0,054 | 0,014 | 0,015 |
| 24:0 | 0,020 | 0,005 | 0,007 | 0,008 | 0,025 | 0,004 | 0,005 |

Z tabulky č. 8 lze opět vidět, že procentuální zastoupení minoritních mastných kyselin je větší u méně tučných výrobků. U tučnějších výrobků, je zase více hlavních kyselin.

Jde o kyseliny: palmitovou (16:0), stearovou (18:0), olejovou (18:1). Nejvíce kyseliny palmitové je u selského mléka s 4 % tuku (51,379 %), bílého jogurtu (52,485 %) a zakysané smetany s 16 % tuku (50,14 %). Obsah kyseliny stearové byl největší u selského mléka (30,36 %). Plnotučné mléko Madeta mělo největší obsah kyseliny olejové (30,356 %). Největší zastoupení sedmnáctiuhlíkaté kyseliny margarinové bylo v kefíru (1,565 %). Kyselina linoleová byla v těchto vzorcích také obsažena ve významném množství, nejvíce u kefíru (8,852 %) a zakysané smetany (9,06 %).

# Závěr

Má diplomová práce se zabývala možnostmi analýzy mléka pomocí plynové chromatografie. Na počátku byla vyzkoušena možnost analýzy látek zodpovědných za vůni mléka. Tyto látky se podařilo získat z mléka pomocí headspace SPME extrakce a následně je analyzovat plynovou chromatografií.

Další cíl byl stanovit v mléce mastné kyseliny. Jednoduchou extrakcí, transesterifikací a analýzou plynovou chromatografií byl získán profil mastných kyselin v mléku. Bylo porovnáno jedenáct mléčných produktů. Mezi nimi byly zastoupeny převážně mléka, ale i smetany a bílý jogurt. U všech produktů byly obsaženy hlavní mastné kyseliny: kyselina palmitová, olejová, stearová. Z ostatních mastných kyselin byl v polotučných mlécích nejvyšší podíl kyseliny palmitolejové (16:1). V polotučných a plnotučných mlécích bylo větší zastoupení minoritních kyselin než u smetan. Ze všech vybraných produktů měly největší relativní zastoupení kyseliny palmitové (16:0) smetánka do kávy, 51,865 % a jogurt (52,485 %). U smetany na vaření byl potom největší obsah kyseliny olejové (31,581 %). Nejvíce byla zastoupená kyselina stearová u selského mléka (30,36 %). U kefíru bylo významné množství 17:0 oproti ostatním vzorkům (1,565 %).

V závěru byla provedena analýza steroidních látek. Ty byly viděny v chromatogramu po odstranění mastných kyselin jejich hydrolýzou a vznikem jejich sodných solí. Dalším krokem bylo navržení metody pro současné stanovení mastných kyselin a steroidních látek. Toho bylo dosaženo dvoukrokovou derivatizací. Nejprve se vytvořily methylestery mastných kyselin a poté trimethylsilyl deriváty steroidů. Pro kvantifikaci cholesterolu a 7- dehydrocholesterolu byla zvolena metoda vnitřního standardu. Tato metoda koriguje ztráty v průběhu extrakce a je dostatečně rychlá pro sériovou aplikaci v laboratoři. Metoda standardního přídavku se jevila jako nejlepší, ale je časově náročná kvůli úpravě více vzorků a metoda kalibrační křivky trpěla velkou chybou vlivem matricových efektů a ztrát při extrakci. Metoda vnitřního standardu klade menší požadavky na počet prováděných analýz. K celkové analýze tukové části jsou pouze nutné dvě analýzy, jedna pro steroidní látky a druhá pro mastné kyseliny. Metody vnitřního standardu a standardního přídavku poskytují srovnatelné výsledky. Pro rutinní stanovení se lépe hodí metoda vnitřního standardu kvůli menšího počtu zpracovávaných vzorků, a tedy i kratší časové náročnosti.

# Citace:

1. WARE, Megan, NEWMAN, Tim, ed. Medical News Today. *Medical News Today* [online]. 14.2.2017 [cit. 2019-02-23]. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/273451.php>
2. LU, BING, JEFFREY B. DRIBAN, Timothy MCALINDON a Charles B. EATON. Milk Consumption and Progression of Medial Tibiofemoral Knee Osteoarthritis: Data From the Osteoarthritis Initiative. American college of rheumatology [online]. 2014, 66(6), 802–809 [cit. 2019-03-06]. DOI: 10.1002/acr.22297. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/acr.22297>
3. , Ministerstvo zemědělství. *Milk Processing Guide Series* [online]. 2. Keňa: FAO/TCP/KEN/6611 Project, 2016 [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: <http://www.fao.org/ag/AGAinfo/resources/documents/MPGuide/mpguide2.htm>
4. Dry Butyrometr mléka Teichert s příslušenstvím. In: *BDL.cz* [online]. Turnov Česká Republika [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: <http://www.bdl.cz/laboratorni-pristroje-3k/analyza-potravin-a-enviromentalni-analyza-22k/analyza-vzorku-149k/analyzatory-mleka-453k/dry-butyrometr-mleka-teichert-s-prislusenstvim-1520p>
5. EBNER, PAUL, MOHAMMAD ALAM GHORYAR, SHOAIB AHMAD SHAKHES a AHMAD ZIA GHANIZADAH. *MILK QUALITY AND SAFETY TESTING MANUAL* [online]. Herat University [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: <https://ag.purdue.edu/ansc/Documents/Ebner_MilkQualityManual.pdf>. Herat University
6. YÜKSEL, Zerrin a Yaşar Kemal ERDEM. DETECTION OF THE MILK PROTEINS BY RP-HPLC. *GIDA* [online]. 2009, **20**(3) [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/237273598_Detection_of_the_milk_proteins_by_RP-HPLC>
7. POCHET, Sylvie, D LEFIER, R GRAPPIN a . Determination of Fat, Protein, and Lactose in Raw Milk by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and by Analysis with a Conventional Filter-Based Milk Analyzer. *Journal of AOAC International* [online]. 1996, **79**(3), 711-7 [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/14565101_Determination_of_Fat_Protein_and_Lactose_in_Raw_Milk_by_Fourier_Transform_Infrared_Spectroscopy_and_by_Analysis_with_a_Conventional_Filter-Based_Milk_Analyzer>
8. JIA, Wei, Han WANG, Lin SHI, Feng ZHANG, Cheng FAN, Xuefeng CHEN, James CHANG a Xiaogang CHU. High-throughput foodomics strategy for screening flavor components in dairy products using multiple mass spectrometry. *Food Chemistry*[online]. 2019, **279**(1), 1-11 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.12.005. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461832096X?via%3Dihub>
9. ZEBARI, Hawar M., S. Mark RUTTER a Emma C.L. BLEACH. Fatty acid profile of milk for determining reproductive status in lactating Holstein Friesian cows. *Animal Reproduction Science* [online]. 2019, **202**, 26-34 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2019.01.004. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843201830705X?via%3Dihub>
10. CORREDDU, F., M. CELLESI, J. SERDINO, M. G. MANCA, M. CONTU, C. DIMAURO, I. IBBA a N. P. P. MACCIOTTA. Genetic parameters of milk fatty acid profile in sheep: comparison between gas chromatographic measurements and Fourier-transform IR spectroscopy predictions. *The Animal Consortium* [online]. 2018, **13**(3), 469–476 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1017/S1751731118001659. Dostupné z: <https://www.cambridge.org/core/journals/animal/article/genetic-parameters-of-milk-fatty-acid-profile-in-sheep-comparison-between-gas-chromatographic-measurements-and-fouriertransform-ir-spectroscopy-predictions/A78E2EF2F3940E89E83284054851BA90>
11. YAZDANFAR, Najmeh, Mojtaba SHAMSIPUR a Mahnaz GHAMBARIAN. Simultaneous extraction of 32 polychlorinated biphenyls by using magnetic carbon nanocomposite based dispersive microextraction, subsequent dispersive liquid-liquid microextraction with two miscible stripping solvents, and quantitation by GC-μECD. *Microchimica Acta* [online]. 2019, **186**(178) [cit. 2019-03-21]. DOI: https://doi.org/10.1007/s00604-019-3235-x. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00604-019-3235-x>
12. STAUFFER, Eric, Julia A. DOLAN a Reta NEWMAN. CHAPTER 8 - Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. *Fire Debris Analysis* [online]. 2008, , 235-293 [cit. 2019-03-16]. DOI: 10.1016/B978-012663971-1.50012-9. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780126639711500129>
13. VÁVROVÁ, Jaroslava. v: *Datový standard MZ ČR* [online]. 2006 [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/AJAOF.htm>
14. Processing and Impact on Antioxidants in Beverages. *Fire Debris Analysis* [online]. Fire Debris Analysis: science direct, 2014 [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/gas-chromatography>
15. *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages* [online]. Shefield Hallam university [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: [https://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschrm.htm#](https://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschrm.htm)
16. BURYAN, Petr. *Plynově chromatografická separace dusíkatých látek* [online]. In: . Praha: všcht, 2007 [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: <https://slideplayer.cz/slide/3648503/>
17. BERKA, Karel. Seriál o detektivní chemii – Chemické nástroje detektivů. In: *KSICHT* [online]. Praha: Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: <http://ksicht.natur.cuni.cz/serialy/detektivni-chemie/2>
18. ROCHA, Sílvia, Vítor RAMALHEIRA, António BARROS, Ivonne DELGADILLO a Manuel A. COIMBRA. Headspace Solid Phase Microextraction (SPME) Analysis of Flavor Compounds in Wines. Effect of the Matrix Volatile Composition in the Relative Response Factors in a Wine Model. *J. Agric. Food Chem* [online]. Portugálie, 200n. l., **49**(11), 5142−5151 [cit. 2019-03-16]. DOI: 10.1021/jf010566m. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/ff69/3b9f878a7ac18054ee96ed7a3f227b2543f5.pdf>
19. *SPME for GC Analysis* [online]. In: , Merck a Darmstadt. Německo, 2018 [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/spme-gc-brochure.pdf>
20. CHARVÁTOVÁ, Michaela. *Multimediální pomůcka pro předmět Chemie potravních řetězců* [online]. In: . [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: <https://fvhe.vfu.cz/static/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvozp/metoda-spme/index.html>
21. Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions. In: *Bulletin 923* [online]. U.S.: Sigma-Aldrich [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4547.pdf>
22. *SPME (Solid phase microextraction)* [online]. In: . MŠMT, 2011 [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: <https://fvhe.vfu.cz/files/teorie_spme.pdf>
23. SPME (Solid Phase Micro Extraction). In: *LABICOM* [online]. Olomouc, Česká republika: LABICOM, 2019 [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: <https://www.labicom.cz/produkty/spotrebni-material/priprava-vzorku-prislusenstvi/spme>
24. CERQUEIRA, Nuno M. F. S. A., Eduardo F. OLIVEIRA, Diana S GESTO, Diogo SANTOS-MARTINS, Cátia MOREIRA, Hari N. MOORTHY, Maria J. RAMOS a P. A. FERNANDES. Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry* [online]. Portugalsko, 2016, 7.9.2016, **55**(39), 5483-5506 [cit. 2019-03-16]. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00342. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biochem.6b00342>
25. Endocytosis and Exocytosis. *Lumen* [online]. [cit. 2019-03-16]. Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/wmopen-biology1/chapter/endocytosis-and-exocytosis/>
26. Centrifuge 5702/ 5702 R/5702 RH. *Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o.* [online]. Česká republika, 2019 [cit. 2019-03-21]. Dostupné z: <https://online-shop.eppendorf.cz/CZ-cs/Centrifugace-44533/Centrifugy-44534/Centrifuge-5702-5702R-5702RH-PF-240992.html>
27. Termostat blokový SBH 130D/3 STUART. *MERCI, s.r.o* [online]. Brno, 2015 [cit. 2019-03-21]. Dostupné z: <http://www.mercishop.cz/zbozi/z1500000000056-termostat-blokovy-sbh-130d3-stuart/>
28. 7890B GC System. *Agilent Technologies, Inc.* [online]. USA, 2019 [cit. 2019-03-21]. Dostupné z: <https://www.agilent.com/en/products/gas-chromatography/gc-systems/7890b-gc-system>
29. ZB-5HT. *Phenomenex Inc.* [online]. 2019 [cit. 2019-03-21]. Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/Products/GCDetail/Zebron/ZB-5HT>
30. SADEGHI, Naficeh, Akram ROSTAMI, Alale TAGHAVIANPOUR, Sourena JAFARI‐SEMNANI, PARISA TORABI, ZEINAB POURJABAR a Mannan HAJIMAHMOODI. Study on sterol fraction of commercial brands of milk,yoghurt and butter sold in Iranian market andchemometric data analysis. *International Journal of Dairy Technology* [online]. 2018, **71**(3), 647-653 [cit. 2019-03-21]. DOI: 10.1111/1471-0307.12511. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1471-0307.12511>
31. BERTOLÍN, J.R., M. JOY, P.J. RUFINO-MOYA, S. LOBÓN a M. BLANCO. Simultaneous determination of carotenoids, tocopherols, retinol andcholesterol in ovine lyophilised samples of milk, meat, and liver and inunprocessed/raw samples of fat. *Food Chemistry* [online]. 2018, **257**(15), 182-188 [cit. 2019-03-21]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618303844?via%3Dihub>
32. GRACE, MARGARET L. a RICHARD A. BERNHARD. Measuring Vitamins A and D in Milk. *Journal of Dairy Science* [online]. 1984, **67**(8), 1648 [cit. 2019-04-06]. DOI: https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81487-3. Dostupné z: <https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(84)81487-3/pdf>
33. HANUŠ, O., V. GENČUROVÁ, M. VYLETĚLOVÁ a I. MANGA. STANOVENÍ A INTERPRETACE KONCENTRACE KETONŮ V MLÉCE. *MLÉKAŘSKÉ LISTY* [online]. 2009, **119**, 22-24 [cit. 2019-03-21]. Dostupné z: <http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2010/119_s._22-25.pdf>
34. GEISHAUSER, T., K. LESLIE, J. TENHAG a A. BASHIRI. Evaluation of Eight Cow-Side Ketone Tests in Milk for Detection of Subclinical Ketosis in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* [online]. 2000, **83**(2), 296-299 [cit. 2019-03-21]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030200748776?via%3Dihub>
35. KOUBOVÁ, Ing. Jana. *Faktory ovlivňující složení mléčného tuku a zdravotní nezávadnost mléka* [online]. Česká Republika, 2016 [cit. 2019-03-21]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/iixhpc/DSP_Koubov.pdf>. DISERTAČNÍ PRÁCE. JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH. Vedoucí práce Doc. Ing. Martin Kváč, Ph.D.