



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

NUTRIČNÍ SLOŽENÍ RŮZNÝCH DRUHŮ MLÉKA

NUTRITIONAL COMPOSITION OF DIFFERENT TYPE OF MILK

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Veronika Viznerová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1595/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Veronika Viznerová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Nutriční složení různých druhů mléka

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracování teoretické části práce
2. Validace metody ICP–OES pro stanovení makroprvků v mléce
3. Analýza vzorků mléka pomocí techniky ICP–OES
4. Zpracování naměřených výsledků, diskuse výsledků práce

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

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

Veronika Viznerová
student(ka)

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce bylo porovnání vybraných metod úpravy mléka pro prvkovou analýzu technikou ICP-OES. Pro validaci metody byl použit certifikovaný referenční materiál ERM[®]-BD150, který byl upravován pomocí mineralizace, přidavku činidel a pomocí disperze.

Nejvyšší výtěžnost vápníku při validaci byla stanovena na $90,6 \pm 8,6$ % při přidavku činidla Triton X-100. Při analýze draslíku byla stanovena nejvyšší výtěžnost $89,5 \pm 5,2$ % mokrým rozkladem. Nejvyšší výtěžnost hořčíku byla stanovena na $120,1 \pm 1,1$ % po mikrovlnném rozkladu. Nejvyšší výtěžnost sodíku byla stanovena na $104,4 \pm 4,8$ % pomocí mokrého rozkladu a nejvyšší výtěžnost fosforu byla stanovena na $98,6 \pm 4,5$ % prostým ředěním.

Na základě výsledků validace byly vybrány vhodné metody pro analýzu reálných vzorků mléka (mokrý rozklad, kyselá disperze, přidavek činidla Triton X-100). Pro analýzu byly použity vzorky čerstvého kravského, kozího a ovčího mléka z domácího chovu. V kozím mléce byly stanoveny nejvyšší koncentrace většiny prvků, a to konkrétně vápníku na $1\,733 \pm 126$ mg.kg⁻¹, draslíku na $1\,840 \pm 39$ mg.kg⁻¹, hořčíku na 252 ± 77 mg.kg⁻¹, mědi na $1,41 \pm 0,56$ mg.kg⁻¹, manganu na $0,54 \pm 0,26$ mg.kg⁻¹ a zinku na $7,98 \pm 1,33$ mg.kg⁻¹. V ovčím mléce byly stanoveny nejvyšší koncentrace sodíku na 515 ± 90 mg.kg⁻¹, fosforu na $1\,440 \pm 100$ mg.kg⁻¹ a zinku na $7,98 \pm 1,33$ mg.kg⁻¹. V kravském mléce bylo stanoveno nejvíce železa a to $5,27 \pm 1,59$ mg.kg⁻¹.

Pro analýzu ICP-OES se jeví jako nejlepší metoda úpravy vzorku použití kyselé disperze, jelikož koncentrace naměřených prvků byly nejvyšší. Spolehlivě však byly naměřeny pouze makroprvky a zinek a pro stanovení dalších biogenních prvků by bylo vhodnější zvolit citlivější techniku nebo prekoncentraci analytu ve vzorku.

KLÍČOVÁ SLOVA

ICP-OES, mléko, elementární analýza

ABSTRACT

The aim of this bachelor's thesis was to compare selected methods of milk treatment for elementary analysis using the ICP-OES technique. Certified reference material ERM®-BD150 was used to validate the method, which was treated by mineralization, the addition of reagents and dispersion.

The highest calcium yield during validation was determined to be $90,6 \pm 8,6$ % with the addition of Triton X-100 reagent. In the potassium analysis, the highest yield was determined to be $89,5 \pm 5,2$ % by wet decomposition. The highest yield of magnesium was determined to be $120,1 \pm 1,1$ % after microwave decomposition. Furthermore, the highest yield of sodium was determined to be $104,4 \pm 4,8$ % by wet decomposition and the highest yield of phosphorus was determined to be $98,6 \pm 4,5$ %.

Based on the validation results, suitable methods were selected for the analysis of real milk samples (wet decomposition, acid dispersion, addition of Triton X-100 reagent). Samples of fresh cow's, goat's and sheep's milk from domestic breeding were used for the analysis. The highest concentrations of most elements were determined in goat 's milk, namely calcium to $1\ 733 \pm 126$ mg.kg⁻¹, potassium to $1\ 840 \pm 39$ mg.kg⁻¹, magnesium to 252 ± 77 mg.kg⁻¹, copper to $1,41 \pm 0,56$ mg.kg⁻¹, manganese to $0,54 \pm 0,26$ mg.kg⁻¹ and zinc to $7,98 \pm 1,33$ mg.kg⁻¹. The highest concentrations of sodium in sheep's milk were set at 515 ± 90 mg.kg⁻¹, phosphorus at $1\ 440 \pm 100$ mg.kg⁻¹ and zinc at $7,98 \pm 1,33$ mg.kg⁻¹. The most iron was found in cow's milk, namely $5,27 \pm 1,59$ mg.kg⁻¹.

For ICP-OES analysis, the use of an acid dispersion appears to be the best method of sample preparation, as the concentrations of the measured elements were the highest. However, only macroelements and zinc were measured reliably. For the determination of other biogenic elements, it would be more appropriate to choose a more sensitive technique or preconcentration of the analyte in the sample.

KEY WORDS

ICP-OES, milk, elementary analysis

VIZNEROVÁ, Veronika. *Nutriční složení různých druhů mléka*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124003>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Pavel Diviš.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a uvedla všechny literární a odborné zdroje. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat panu doc. Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D. za odborné vedení práce, dále panu Ing. Jakubovi Křikalovi za cenné rady a připomínky k prováděným experimentům, a především mé rodině a příteli za podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Technologie zpracování mléka.....	9
2.1.1	Produkce mléka	9
2.1.1.1	Mléčná žláza	9
2.1.2	Zpracování mléka	10
2.1.2.1	Kravin	10
2.1.2.2	Dojení.....	11
2.1.2.3	Skladování a převoz mléka	12
2.1.2.4	Zpracování mléka v mlékárně.....	12
2.1.2.5	Odstředění mléka	12
2.1.2.6	Tepelné úpravy.....	13
2.2	Chemické složení mléka.....	13
2.2.1	Základní složení mléka.....	13
2.2.2	Vlastnosti základních složek mléka	14
2.2.2.1	Voda.....	14
2.2.2.2	Bílkoviny.....	14
2.2.2.3	Lipidy	15
2.2.2.4	Sacharidy.....	15
2.2.2.5	Enzymy	15
2.2.2.6	Vitamíny	15
2.2.2.7	Minerální látky.....	18
2.2.3	Nutriční hodnota mléka	20
2.3	Elementární analýza mléka.....	22
2.3.1	Přímá analýza vzorku	22
2.3.2	Rozklad na mokré cestě.....	22
2.3.2.1	Rozklad kyselinou dusičnou	22
2.3.3	Mikrovlnný rozklad.....	23
2.3.4	Rozklad pomocí činidel.....	23
2.3.4.1	Triton X-100	23
2.3.4.2	Tetramethylammonium hydroxid	24
2.3.5	Rozklad na suché cestě.....	24
2.4	Instrumentální metody	24
2.4.1	Atomová absorpční spektrometrie	24
2.4.2	Atomová emisní spektrometrie	25
2.4.3	Atomová fluorescenční spektrometrie	25
2.4.4	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem	26

2.4.4.1	Zmlžovací zařízení.....	27
2.4.4.2	Vznik indukčně vázaného plazmatu	28
2.4.4.3	Optický systém.....	29
2.4.4.4	Detekce	29
2.4.4.5	Interference	30
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
3.1	Laboratorní vybavení.....	31
3.1.1	Chemikálie	31
3.1.2	Pomůcky a přístroje.....	31
3.1.3	Charakteristika materiálu	32
3.1.4	Úprava vzorku k analýze.....	32
3.1.4.1	Stanovení vody v CRM titračně podle Karl-Fishera.....	33
3.1.4.2	Prosté ředění.....	33
3.1.4.3	Příprava kyselé disperze.....	33
3.1.4.4	Přídavek činidla TMAH.....	33
3.1.4.5	Přídavek činidla Triton X-100	33
3.1.4.6	Mokrý rozklad.....	34
3.1.4.7	Mikrovlnný rozklad	34
3.1.4.8	Zpopelnění	34
3.1.5	Příprava standardních roztoků.....	34
3.1.6	Analýza prvků a vyhodnocení dat.....	35
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
4.1	Validace metody pro elementární analýzu	37
4.1.1	Stanovení makroprvků po přípravě disperze.....	37
4.1.2	Stanovení makroprvků při použití činidel.....	38
4.1.3	Mineralizace vzorku	39
4.2	Analýza vzorků mléka	41
4.2.1	Kravske mléko.....	41
4.2.2	Kozí mléko	43
4.2.3	Ovčí mléko	44
4.3	Porovnání jednotlivých druhů mléka.....	46
5	ZÁVĚR.....	47
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	48
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	53

1 ÚVOD

S mlékem se člověk setkává už od narození, kdy je jeho první potravou. Díky svému bohatému obsahu mnoha životu prospěšných látek, se mléko stává součástí jídelníčku i u dospělých jedinců. Mléko jakožto komplexní potravina obsahuje bílkoviny, tuky, sacharidy, enzymy, vitamíny a minerální látky. Do jisté míry je jejich obsah závislý na druhu mléka, zdravotním stavu zvířete, stádiu laktace, ročním období, podnebí, ale také závisí na technologické úpravě a zpracování mléka. Při zpracování mléka je důležité dbát na to, aby veškeré činnosti probíhaly podle určitých pravidel, díky kterým bude dosaženo co nejvyšší kvality finálního produktu. Technologická úprava mléka ovlivňuje jeho složení i sensorické vlastnosti. Jeho úprava je však nutná, protože podle legislativy nelze prodávat mléko syrové.

Tato práce obsahuje srovnání čerstvého kravského, ovčího a kozího mléka z domácího chovu z hlediska obsahu vybraných prvků. Odběr mléka od soukromých farem se stává čím dál více populární a je tedy nutné zajistit kvalitu i u mléka z domácího chovu. Zvířata na soukromých farmách mají obvykle jiné podmínky než zvířata ve velkofarmách, proto lze očekávat větší kvalitu mléka a s tím související rozdíly v obsahu nutrientů. Zároveň však domácí chov představuje větší riziko kontaminace mléka z důvodu pobytu zvířat na pastvě nebo nedostatečné hygieně prostor. V mléce od prvovýrobce se tedy mohou objevit i stopové koncentrace dalších prvků, např. těžkých kovů.

K analýze prvků se používá celá řada spektrofotometrických metod a pro analýzu byla konkrétně zvolena optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Mléko je však velmi komplikovaná matrice a je potřeba ji upravit tak, aby nedošlo k ucpání či poškození přístroje, interferencím během měření a aby bylo dosaženo limitů detekce analytu pro danou analytickou techniku. K tomu se používají různé metody úprav, které dokáží rozložit mléčnou matrici a zajistit tak lepší přístup k analytu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Technologie zpracování mléka

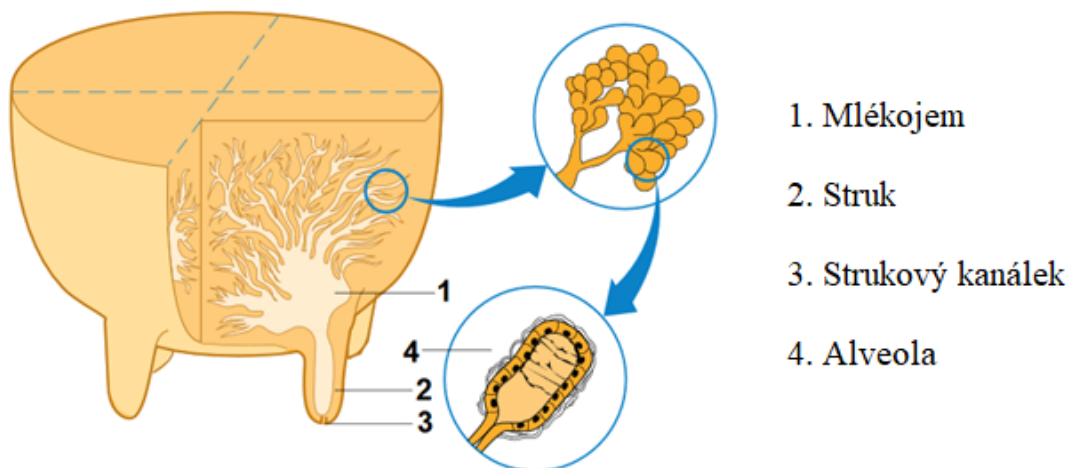
2.1.1 Produkce mléka

Mléko je z biologického hlediska fyziologický produkt mléčné žlázy, který je primární potravou savců již od narození. Je nutné, aby obsahovalo téměř všechny potřebné látky pro výživu, a z toho důvodu ho lze označit jako komplexní potravinu. Mléko poskytuje potřebnou energii a dodává makroživiny i mikroživiny nezbytné k růstu jedince. Kromě výživové funkce zastává také významné funkce fyziologické tím, že napomáhá trávení, obsahuje růstové faktory a hormony a plní obrannou funkci (obsahuje imunoglobuliny a antimikrobiální látky). Je zcela přírodního původu a jeho složení je ovlivněno jednak živočišným druhem, ale také výživou nebo zdravotním stavem zvířete [1, 2, 3, 4, 5].

2.1.1.1 Mléčná žláza

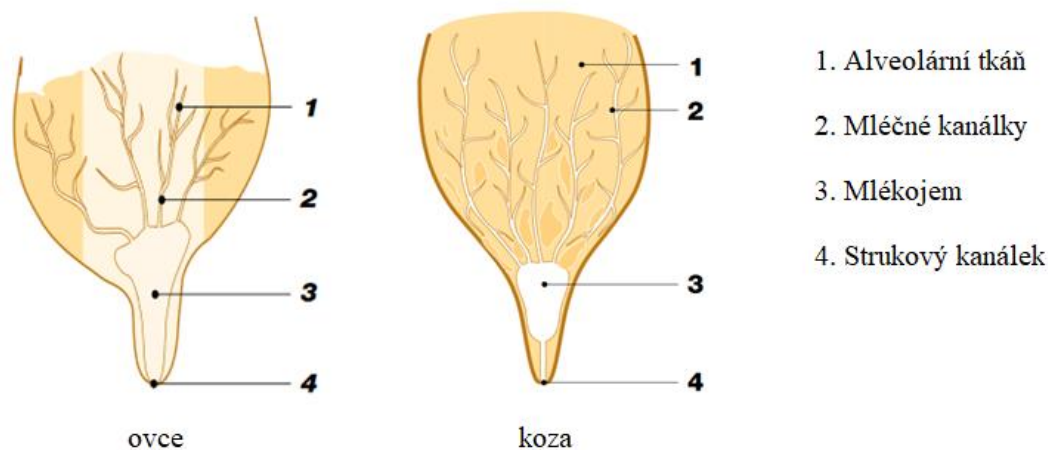
Mléčná žláza se vyskytuje u samic všech savců. Je to párová žláza, která vznikla přeměnou kůže. Vyvinutí této žlázy závisí na několika faktorech jako je např. plemeno, stav jedince, stáří, pohlaví aj. Sekretem mléčné žlázy je mléko, které vzniká pouze v době laktace [6, 7].

Mléčná žláza je složena ze čtyř jednotek: sekreční alveoly a tubuly, vývodné cesty, mlékojem a strukový kanálek (Obr. 1). Povrch vemene je pokryt tenkou kůží, která obsahuje spoustu potních a mazových žláz a také ochlupení. Struk není ochlupený, ani nemá žádné žlásky. Základní část mléčné žlázy je sekreční alveolus, jehož stěnu vytvářejí sekreční buňky. Lalůčky žlázového parenchymu jsou spojeny vazivem ve větší laloky, které jsou na svém povrchu obaleny tukovou tkání. Mléko je z alveol odváděno díky smršťování košíčkovitých buněk na jejich povrchu. Jednotlivé části spojuje vývodní systém zvaný mlékovod. Jedná se o silnější vývody ústící do mlékojemu, který má objem 0,5–3 litry a hromadí se v něm mléko. Tento prostor lze rozdělit na část žlásovou a část strukovou. Celý vývodný systém je zakončen strukem s jedním strukovým kanálkem, ze kterého vytéká mléko [3, 6, 7].



Obrázek 1 Popis mléčné žlázy skotu (upraveno podle [8])

Mléčná žláza skotu je rozdělena na dvě poloviny levou a pravou. Obě poloviny jsou ještě rozděleny na přední a zadní čtvrt'. Každá z těchto čtvrtí je zakončena strukem a má samostatnou žláznatou tkáň. Mléčná žláza ovcí a koz je také rozdělena na dvě poloviny, ale dále se již nedělí. Každá polovina má jednu žláznatou tkáň a jeden vývodný systém. Jelikož mají ovce a kozy slabě vyvinutý svěrač, uzavření strukového kanálku zabezpečuje elastická pojivová tkáň [6].



Obrázek 2 Srovnání mléčné žlázy kozy a ovce (upraveno podle [8])

2.1.2 Zpracování mléka

Nejvíce se technologicky zpracovává mléko kravské. Provozovatelé, kteří vyrábějí nebo svážejí mléko, musí dbát na splnění požadavků stanovených legislativou. Při zpracování mléka je důležité zajistit vhodné podmínky a dbát na hygienu prostor, vybavení, personálu a hygienu během dojení [9].

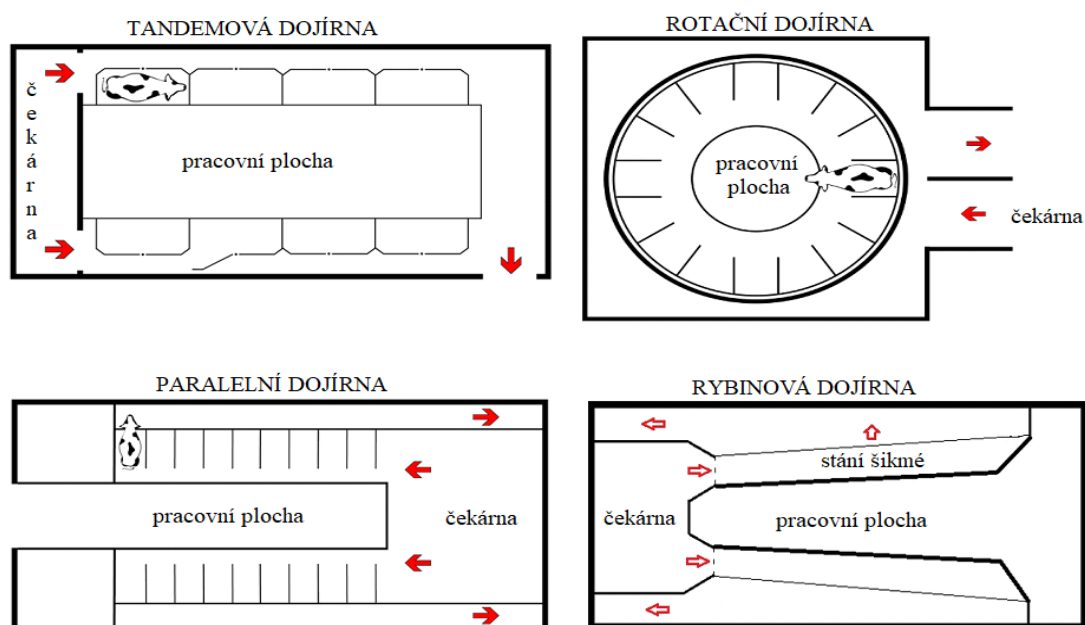
2.1.2.1 Kravín

Celá technologie zpracování mléka začíná v kravíně. Zde jsou krávy umístěny v podstatě celý život, je tedy nutné zajistit podmínky vhodné pro život a zároveň podmínky k co nejlepší produkci mléka. První z těchto podmínek je potrava a příjem tekutin. Dojné krávy ve velkochovech nebývají vypouštěny na pastvu a je tedy potřeba, aby krmivo obsahovalo co nejvíce potřebných a prospěšných látek k životu. Kráva by měla za den zkonsumovat přibližně 60 kg krmiva, které se skládá z nasekané směsi kukuřice, sóji, řepkové pokrutiny, šrotu, pšenice, ječmene a tzv. senáže z trávy nebo vojtěšky. Další podmínkou je zajistit kravám vhodnou podestýlku např. separátem z kejdy, což je odstředěná směs exkrementů s vodou a zbytků krmiva. Podestýlka je pro krávy velmi důležitá, protože produkují nejvíce mléka, když leží [3, 10].

Krávy dávají mléko jen v určitém věku. Malá telata (0–6 měsíců) a jalovice (6 měsíců a víc) mléko ještě nemají. Teprve až po prvním otelení (přibližně ve dvou letech), kdy se z krávy stává tzv. prvotelka, je schopna dávat mléko. V rozmezí 2–5 let se kravám říká dojnice [3, 10].

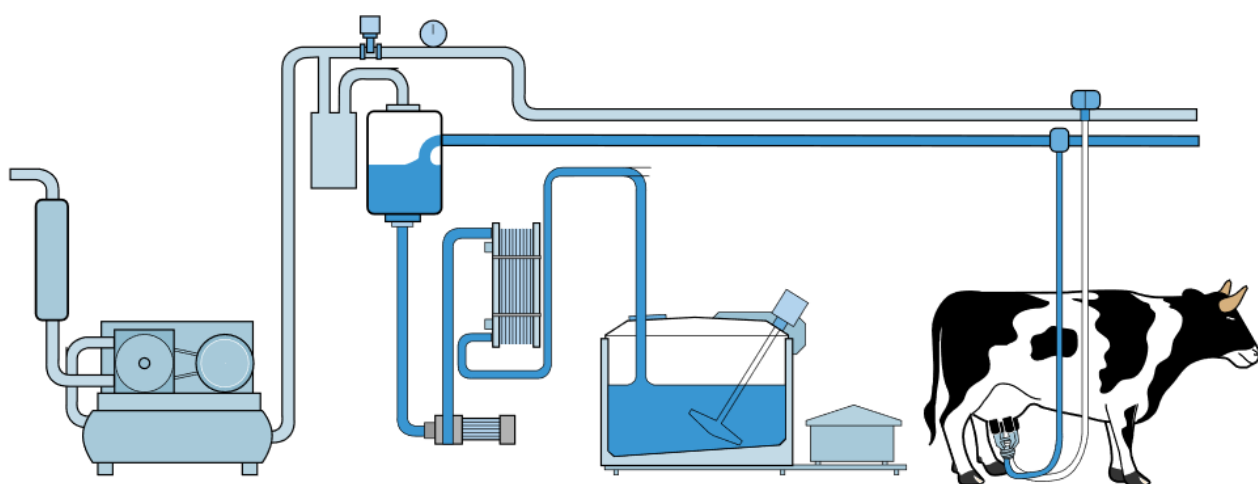
2.1.2.2 Dojení

Samotné dojení probíhá v dojárně. Na farmách se v dnešní době využívá převážně strojního dojení, které umožňuje vysokou produktivitu práce. Existuje několik typů dojíren lišící se technologií i počtem dojících míst, proto je důležité vybrat vhodný typ, který bude mít dostatečnou kapacitu a obslužnost (Obr. 3) [10, 11].



Obrázek 3 Schémata různých typů dojíren (upraveno podle [11])

Jakmile je kráva připravena v dojárně, začíná proces dojení (Obr. 4). Nejprve je nutné důkladně očistit struky a přilehlé části od hnoje a nečistot. Následně je odebrán malý vzorek mléka pro kontrolu kvality. Po jedné až dvou minutách je krávě nasazena dojačka, která nasává mléko. Po podojení přichází na řadu dezinfekce struku, aby se do něj nedostala infekce [3, 9, 10].



Obrázek 4 Schéma dojení a chlazení mléka [8]

2.1.2.3 Skladování a převoz mléka

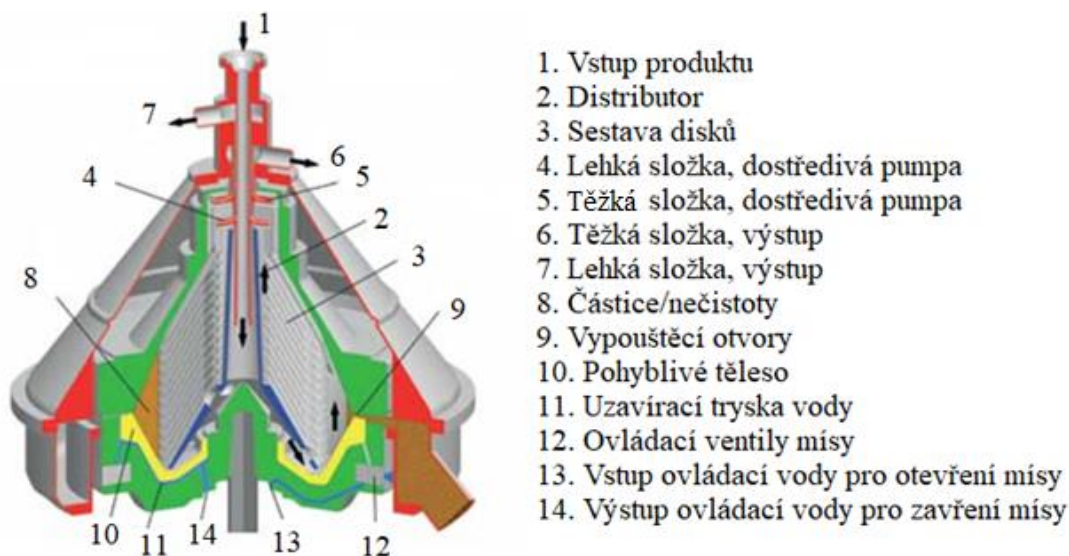
Nadojené mléko je ochlazeno v mléčnici na cca 4 °C, aby nedocházelo k rozvoji mikroorganismů. Mléčnice je místnost oddělená od dojírny. Je vybavena chladícími tanky o objemu až 8 000 litrů, ve kterých se mléko uschovává. Sanitace těchto úschovných tanků je nezbytná a provádí se po každém vyprázdnění. Následně je mléko přemístěno do cisterny o kapacitě až 20 000 litrů, která jej převezde do mlékárny [3, 9, 10].

2.1.2.4 Zpracování mléka v mlékárně

Než je mléko přijato pro další zpracování, odebere se malé množství, které putuje do laboratoře. Zde se kontroluje teplota, tučnost a kyselost mléka, a především jestli mléko nepochází z dojnic, které byly injekčně léčeny antibiotiky na zánět nebo jiné onemocnění. Tento krok je velmi důležitý, protože i malé množství mléka s obsahem antibiotik může zapříčinit nepoužitelnost celého objemu mléka v cisterně. V jedné cisterně se nachází obvykle mléko z více kravínů. Po vstupní kontrole je mléko čerpáno do příjmových tanků. Z těchto tanků se převede na pasterační stanici, kde se provádí mlékárenské ošetření [3, 12, 13].

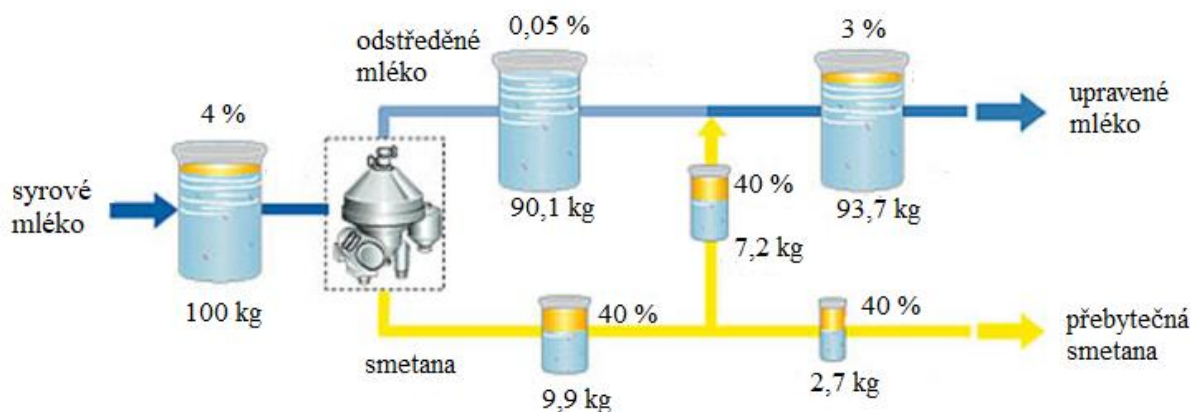
2.1.2.5 Odstředění mléka

Odstředění mléka probíhá na čistících a odsmetaňovacích odstředivkách. V průmyslu se nejčastěji využívají talířovité odstředivky (Obr. 5). Hlavním principem odstřeďování je rozdíl měrné hmotnosti částic v kapalině a spojité fáze emulze. Oddělení tukové složky a odstředěného mléka je spojeno s čištěním a odstraněním menších mechanických nečistot. Vhodná teplota pro odstředění je 40–50 °C [9].



Obrázek 5 Schéma samočisticí talířovité odstředivky (upraveno podle [14])

Po odstředění vzniká smetana s obsahem tuku přibližně 40 % a odstředěné mléko, které obsahuje 0,01–0,05 % tuku. Z těchto dvou složek se na základě úpravy tučnosti vyrábí různé finální produkty (Obr. 6). Např. k výrobě polotučného mléka (1,5 % tuku) se používá určitý poměr mléka odstředěného a mléka surového. Pro výrobu zakysané smetany se používá smetana se surovým mlékem [9, 13, 15].



Obrázek 6 Schéma úpravy tučnosti mléka (upraveno podle [15])

2.1.2.6 Tepelné úpravy

V mlékárně také probíhají různé úpravy mléka. Mléko z hlediska trvanlivosti lze rozdělit na čerstvé a trvanlivé. Jelikož podle dnešní legislativy nelze prodávat nepasterizované mléko, je nutné provést pasterizaci. U čerstvého mléka je na mysli šetrná pasterace, kdy je mléko zahříváno na nejméně 72 °C po dobu 15 minut nebo dlouhodobá pasterace, kdy je mléko zahříváno na nejméně 63 °C po dobu 30 minut. Takto ošetřené mléko je zbaveno mikroorganismů. Dávkuje se do skleněných či plastových lahví a v lednici jej lze uchovat cca tři týdny [9, 12, 13, 16].

Mléko trvanlivé se upravuje metodou UHT. Při této metodě je mléko zahřáto na nejméně 135 °C po dobu cca dvou sekund. Trvanlivé mléko se plní do papírových kartonů, které jsou před plněním máčeny v peroxidové lázni a následně vysušeny kvůli zachování sterilního prostředí. Před plněním mléko podléhá tzv. homogenizaci, aby nedocházelo k usazování částic tuku [3, 12, 13].

2.2 Chemické složení mléka

Z chemického hlediska je mléko polydisperzní systém a skládá se z disperzního prostředí a rozptýlených částic. Podle velikosti molekul chemických látek v mléce rozlišujeme různé druhy disperzí. Kaseinové molekuly tvoří micelární disperzi. Emulzní disperzi tvoří tuk, který je přítomný ve formě tukových kapek a spolu s tukem jsou v mléce přítomny také fosfolipidy, steroly, volné mastné kyseliny a vitamíny rozpustné v tucích. Dále je přítomna koloidní disperze obsahující globulární mléčné bílkoviny, α -laktalbumin, β -laktoglobulin, sérový albumin a enzymy. Molekulární disperze (pravý roztok) je tvořena nízkomolekulárními látkami, jako jsou např. sacharidy, minerální látky, volné aminokyseliny, nebílkovinné dusíkaté látky, soli, plyny a ve vodě rozpustné vitamíny [3, 17, 18].

2.2.1 Základní složení mléka

Složení záleží především na druhu mléka. Mléka lze rozdělit na kaseinová (kozí, ovčí, kravské, velbloudí, dromedářská, sobí, buvolí) a albuminová (mateřská, kobyli a mléko oslic a prasnic). Obecně však lze říct, že mléko obsahuje z větší části vodu a z menší části sušinu. V sušině jsou obsaženy tuky, bílkoviny, sacharidy, minerální látky a vitamíny v různém zastoupení (Tab. 1) [2, 12, 18].

Tabulka 1 Zastoupení jednotlivých složek v různých druzích mléka v % [1]

Mléko	Voda	Sušina	Laktóza	Tuk	Bílkoviny	Popeloviny
Kravné	85,5–89,5	10,5–4,5	3,6–5,5	2,5–6,0	2,9–5,0	0,60–0,90
Kozí	84,8–88,8	11,0–15,0	4,2–4,6	3,8–4,2	3,6–3,8	0,75–0,95
Ovčí	77,8–81,8	18,2–22,2	3,5–4,2	7,2–10,5	5,5–7,0	0,70–1,00

Složení mléka lze ovlivnit několika faktory, které jsou např. zdravotní stav dojnice, stáří, plemeno, dále pak laktační doba, odstavení mláďat či pohyb. Ovlivnění může také nastat díky vnějším vlivům např. počasí, ročnímu období, dojení, chovu a péči, krmení, napájení a uchování [2, 16].

V našich podmínkách se pro lidskou výživu používá nejčastěji mléko kravné. Zabarvení je ovlivněno plemenem krávy, tučností, množstvím sušiny, karotenu, krmením a jinými faktory. Podle ČSN 570529 by mělo mít kravné syrové mléko bílou až lehce nažloutlou barvu a jeho konzistence by měla být stejnorodá bez usazenin, vloček a hrubých nečistot. Chuť a vůně by měly být čistě mléčné bez jiných příchutí a zápachů [3, 18, 19].

2.2.2 Vlastnosti základních složek mléka

2.2.2.1 Voda

Obsah vody v mléce se liší dle druhu, ale přibližně se její obsah pohybuje mezi 87–91 %. Voda je nezbytnou složkou, protože je nositelem celého systému a vyskytuje se v mléce ve třech fázích. Voda volná, která tvoří většinu vody a jsou v ní rozpuštěny látky jako např. glycidy a soli a lze ji z mléka odstranit odpařením nebo zmražením. Voda vázaná na koloidy tvoří jakýsi obal okolo povrchu částic a lze ji proto označit za vodu hydratační. Její obsah v mléce je pouze 3 % a k jejímu odstranění je potřeba provést ohřev při teplotě 102–105 °C. Mléko obsahuje také chemicky vázanou vodu, která je velmi krystalická a váže se na laktózu [2, 12, 16, 18, 20].

2.2.2.2 Bílkoviny

Mléčné bílkoviny jsou tvořeny ze dvou hlavních složek. První z nich jsou kaseiny, které jsou v mléce obsaženy zhruba z 80 %. Druhou složkou jsou sérové (syrovátkové) bílkoviny a tvoří 20 % mléčné bílkoviny. Celkový obsah bílkovin se pohybuje okolo 3,3 % a obě tyto bílkovinné složky se liší vlastnostmi i nutriční hodnotou [3, 12, 16, 20].

Kaseiny jsou v mléce obsaženy ve formě komplexu. Z chemického hlediska se jedná o fosfoprotein, který obsahuje vysoký obsah prolinu a nízký obsah aminokyselin obsahující síru. V mléce se shlukuje do micel s hydrofilní a hydrofobní částí. Hlavními složkami jsou α_1 , α_2 , β a χ kaseiny, které se od sebe liší primární strukturou. Všechny kaseiny jsou schopné vázat vápník [3, 16, 18, 20].

Po vysrážení kaseinu zůstává v mléčném séru asi 0,6 hm. % sérových bílkovin a z celkového obsahu tvoří přibližně 20 %. Denaturují při zahřevu na teplotu 95 °C a řadí se k hydrofilním koloidům. Sérové bílkoviny jsou tvořeny dvěma hlavními složkami, kterými jsou tepelně labilní

syrovátkové bílkoviny (α -globuliny, β -globuliny a imunoglobuliny) a proteózo-peptonovou frakci. Tuto frakci lze definovat jako směs tepelně stálých fosfoglykoproteinů, které jsou rozpustné v kyselinách při pH 4,6 [3, 16, 18].

2.2.2.3 Lipidy

Mléčný tuk je v mléce obsažen ve formě emulze tukových kuliček. Nejvíce zastoupenou složkou v mléce jsou triacylglyceroly, což jsou estery mastných kyselin a glycerolu. Další formou tuku jsou fosfolipidy a steroly přítomné v menším množství, které se nachází v membráně tukových kuliček. Mezi fosfolipidy se řadí fosfatydlcholin nebo sfingomyelin. Nejvíce zastoupeným steroidem je cholesterol, který se z 95 % vyskytuje jako volný a zbytek tvoří jeho estery. Ve stopovém množství jsou v mléčném tuku obsaženy také látky, jako jsou např. ceramidy nebo cerebrosidy. V mléčném tuku jsou obsaženy také vitamíny v něm rozpustné (A, D, E, K) a jejich obsah závisí na druhu, výživě dojníc a stádiu laktace. Lipidy v mléce obsahují také mastné kyseliny v širokém spektru a jejich obsah udává mléku typické aroma [3, 16, 18].

2.2.2.4 Sacharidy

Celkový obsah sacharidů v mléce se pohybuje v rozmezí 4–5 %. Nejvíce zastoupeným sacharidem v mléce je disacharid laktóza, který je složen z monosacharidů glukózy a galaktózy. Laktóza se vyznačuje nízkou sladivostí, ale přesto má stejný energetický obsah jako jiné sacharidy. V mléce je obsažena ve formě alfa a beta a jejich rozdílnost je dána jiným prostorovým uspořádáním vodíků a hydroxylových skupin. Toto uspořádání má vliv na fyzikální vlastnosti laktózy. Ostatní sacharidy jako např. glukóza, fruktóza, galaktóza, glukosamin nebo galaktosamin jsou v mléce obsaženy ve stopovém množství [12, 16, 18].

2.2.2.5 Enzymy

Mléko obsahuje celou řadu enzymů, které dělíme podle původu na nativní a mikrobiální. Nativní enzymy jsou původní enzymy, které se v mléce nacházejí vázané na povrchu tukových kuliček. Pocházejí z krve, ze somatických buněk nebo z cytoplazmy sekrečních buněk mléčné žlázy. Enzymy mikrobiální neboli druhotné pocházejí z mikroorganismů v mléce. Z chemického hlediska lze enzymy rozdělit na oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, izomerázy a ligázy. K nejdůležitějším se řadí oxidoreduktázy a hydrolázy [3, 16].

2.2.2.6 Vitamíny

Vitamíny jsou organické nízkomolekulární látky, které si z většiny nedokáže organismus syntetizovat. V mléce se v mléce vyskytují ve dvou formách. Jsou to vitamíny rozpustné v tucích (A, D, E, K) a vitamíny rozpustné ve vodě (C a vitamíny skupiny B). Některé vitamíny se do těla dostávají ve formě provitaminů, což jsou látky, které nemají biologickou aktivitu, ale v organismu se přemění na molekuly vitamínů. Obsah vitamínů je variabilní, přesto mléko obsahuje všechny nezbytné vitamíny, které organismus potřebuje. U většiny z nich je však podíl doporučené denní dávky nedostatečný (Tab. 2). Množství vitamínů závisí na zpracování mléka a je také ovlivněno např. plemenem dojnice, ustájením, zdravotním stavem nebo ročním obdobím [3, 16, 18].

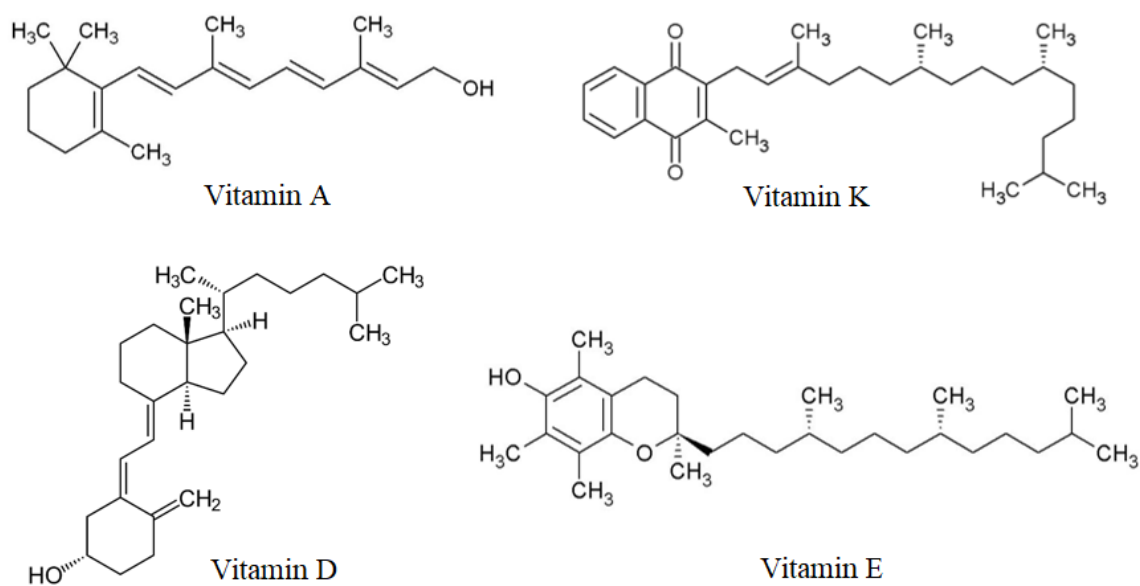
Tabulka 2 Přehled vitamínů v mléce [21, 22]

Vitamíny	Obsah ve sklenici mléka (240 ml)	DDD	% podíl DDD
Vitamin A	112,00 µg	800,0 µg	14,00 %
Vitamin D	3,17 µg	5,0 µg	63,40 %
Vitamin E	0,17 mg	12,0 mg	1,40 %
Vitamin K	0,73 µg	75,0 µg	0,98 %
Vitamin C	0,00 mg	80,0 mg	0,00 %
Thiamin (B₁)	0,11 mg	1,1 mg	11,10 %
Riboflavin (B₂)	0,41 mg	1,4 mg	29,40 %
Pyridoxin (B₆)	0,09 mg	1,4 mg	6,30 %
Kobalamin (B₁₂)	1,10 µg	2,5 µg	44,00 %
Niacin	0,22 mg	16,0 mg	1,40 %
Kyselina pantothenová	0,85 mg	6,0 mg	14,20 %
Biotin	12,00 µg	50,0 µg	24,00 %
Kyselina listová	12,20 µg	200,0 µg	6,10 %

Vitamíny rozpustné v tucích

Vitamíny rozpustné v tucích (Obr. 7) mají nepolární lipofilní charakter, v krvi se přenášejí pomocí lipoproteinů a pro jejich vstřebávání je nutná neporušená resorpce lipidů. Jejich lipofilní charakter umožňuje skladování v tukové tkáni, která zároveň při jejich nepravidelnému příjmu slouží jako úložiště. Při nadbytku se naopak v tukových tkáních kumulují, což zapříčiňuje jejich toxicitu [23].

Obsah vitamínu A v mléce není vysoký, ale je úměrný obsahu tuku v mléce, tudíž se nachází ve větším množství v tučnějších mléčných výrobcích. Mezi další zdroje vitamínu A se řadí např. játra, žloutek, rybí tuk nebo zelená a žlutá zelenina. K jeho funkcím patří stabilizace membrán, integrita kůže a sliznic, podpora imunitních reakcí nebo spermatogeneze. Obsah vitamínu D v mléce je nejvíce ovlivněn slunečním zářením. Tvoří se v krmivu iradiací ergosterolu, který je obsažen v trávě při sušení. Další zdroje tohoto vitamínu jsou vejce, rybí tuk, máslo nebo tresčí játra. Vitamin D přispívá k normálnímu vstřebávání vápníku a fosforu, k udržení optimálního stavu zubů nebo ke správné funkci imunitního systému. Vitamin E vykazuje biologickou aktivitu, zároveň je nejvýznamnějším lipofilním antioxidantem a uplatňuje se také při ochraně lipoproteinů. Kromě mléka se vyskytuje také v rostlinných olejích, arašíděch nebo celozrnných výrobcích. Vitamin K je nezbytný při biosyntéze protrombinu v procesu srážení krve. Syntetizuje se v bacheru přežvýkavců, je citlivý na světlo, avšak během skladování nebo při tepelném zpracování prokazuje stabilitu. Kromě mléka se vyskytuje např. ve vaječném žloutku nebo v listové zelené zelenině [3, 16, 18, 24].



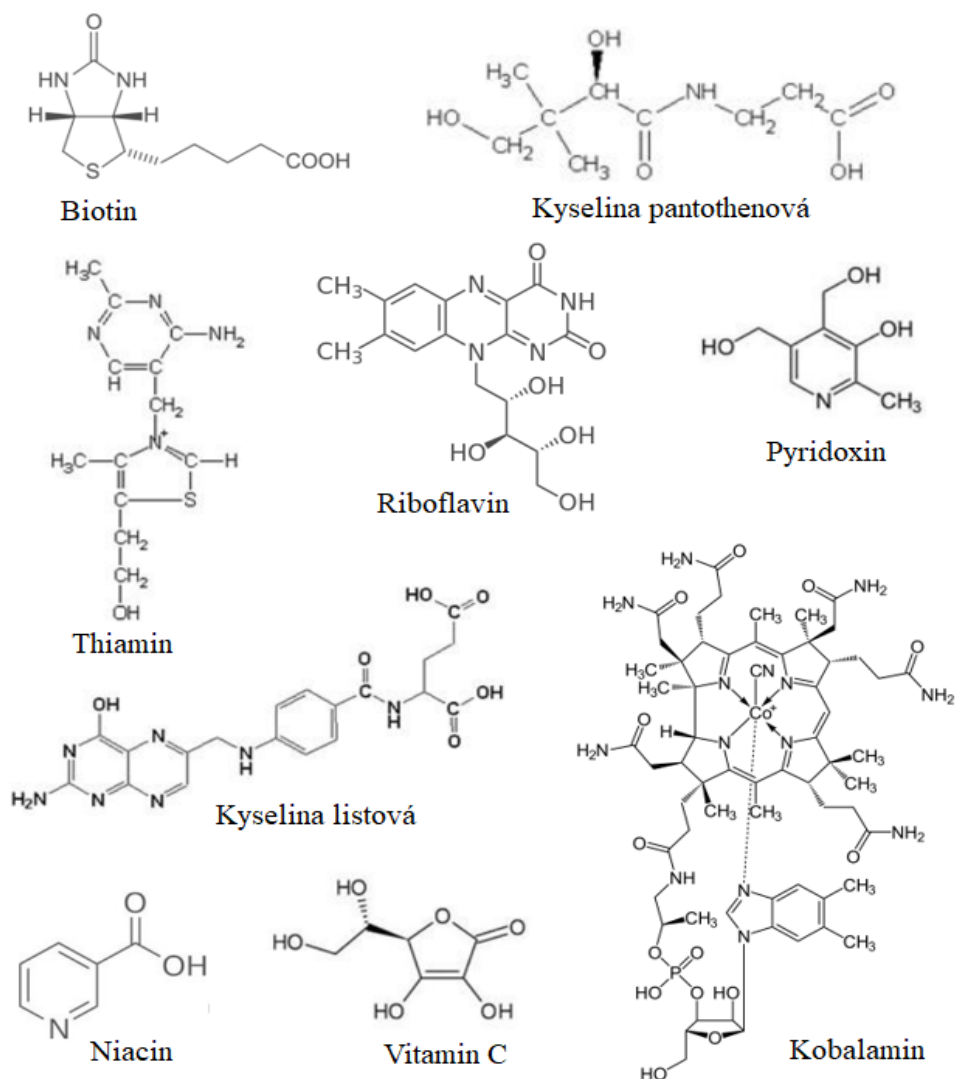
Obrázek 7 Vitamíny rozpustné v tucích (upraveno podle [25])

Vitamíny rozpustné ve vodě

Vitamíny rozpustné ve vodě (Obr. 8) vykazují hydrofilní charakter, přispívají k normálnímu energetickému metabolismu, snadno se vstřebávají a vylučují, avšak z chemického hlediska si nejsou moc podobné. V krvi nepotřebují transportní molekuly a v nadbytku se vyloučí močí, takže zřídla dosáhnou toxické úrovně. Vyskytují se jak v rostlinných, tak živočišných zdrojích, ale při tepelné úpravě dochází ke ztrátám [23, 26].

Thiamin díky svým antineurotickým účinkům zaujímá důležitou funkci ve výživě. Přispívá k normálnímu energetickému metabolismu a ke správné činnosti nervové soustavy a srdce. Vyskytuje se také např. v droždí, celozrnných výrobcích, luštěninách a vnitřnostech. Riboflavin je žluté barvivo, které se v mléce vyskytuje ve volné formě a podílí se na zbarvení mléčného séra. Účastní se řady oxidačně redukčních reakcí a je součástí kofaktorů mnoha enzymů. Přispívá k udržení normálního stavu pokožky a zraku, dále pak přispívá k normálnímu metabolismu železa a energetickému metabolismu. Niacin je společný název pro kyselinu nikotinovou a její nikotinamid. Je obsažen v koenzymech NAD a NADP, které jsou důležitými kofaktory mnoha enzymů a účastní se ve většině redoxních reakcí Krebsova cyklu. Kyselina pantothenová je přírodě velmi rozšířená a vyskytuje se v různých formách. Jejimi hlavními biologickými formami jsou koenzym A a protein ACP, který se uplatňuje při syntéze mastných kyselin a polyketidů. Pyridoxin má ve výživě člověka velmi významnou funkci a při jeho nedostatku mohou nastat vážné zažívací, nervové nebo kožní poruchy. K důležitým zdrojům patří pohanka, vepřové maso, sója a další luštěniny. Biotin je součástí mnoha enzymů katalyzujících přenos CO_2 , je významný v metabolismu sacharidů, aminokyseliny leucinu a mastných kyselin. V mléce je jeho obsah velmi malý, avšak hojně se vyskytuje hlavně v játrech, luštěninách a žlutku. Kyselina listová je vitamín významný v metabolismu homocysteinu, který je rizikovým faktorem vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Při nedostatku v těhotenství může docházet k vývojovým vadám plodu. Kobalamin se vyskytuje pouze v živočišných potravinách, a to v mase, játrech nebo vejcích. Jedná se o velkou a složitou molekulu, v jejímž centru se nachází atom kobaltu. V organismu plní mnoho

významných funkcí např. účastní se při syntéze bílkovin a společně s vitaminem D působí na ukládání vápníku v kostech. Vitamin C je významným antioxidantem a podílí se na hydroxylačných reakcích. Jeho základní biologickou sloučeninou je kyselina L-askorbová. V mléce je jeho množství zanedbatelné, má kolísavý charakter a je citlivý na oxidaci a působení světla [3, 16, 18, 22, 24].



Obrázek 8 Vitamíny rozpustné ve vodě (upraveno podle [8])

2.2.2.7 Minerální látky

Obsah minerálních látek v mléce se pohybuje v rozmezí 0,5–1,0 %. Jejich množství však není konstantní a stejně jakou vitaminů obsah závisí na stádiu laktace, výživě a dalších faktorech. Nejčastěji se minerální látky dělí podle množství, a to na makroprvky (majoritní) a mikroprvky (minoritní). Obě tyto skupiny obsahují dvacet prvků, které jsou považovány za esenciální. Mezi esenciální makroprvky se řadí sodík, draslík, hořčík, vápník, chlor, fosfor. K esenciálním prvků patří také některé mikroprvky (S, Fe, Zn, Mn, Cu, Ni, Co, Mo, Cr, Se, I, F, B a Si). Minerální látky se v mléce vyskytují v několika různých chemických formách. Mohou být součástí organických sloučenin (bílkoviny, tuky, sacharidy a nukleové kyseliny), ale vyskytují se také ve formě anorganických iontů a solí. Obsah solí má vliv na technologické vlastnosti mléka

a svým složením výrazně ovlivňují stabilitu proteinů. Nejvýznamnější roli minerálních látek má rovnováha vápníku a fosforu, jež jsou v mléce zastoupeny v největším množství (Tab. 3). Jelikož jsou hlavními složkami kostí a zubů a podílí se také při různých pochodech látkové výměny, je nezbytný jejich příjem [3, 4, 5, 16, 17].

Tabulka 3 Obsah vybraných prvků ve sklenici mléka [21,22]

	Obsah ve sklenici mléka (240 ml)	DDD	% podíl DDD
Vápník	276,00 mg	800 mg	34,5 %
Fosfor	205,00 mg	700 mg	29,3 %
Hořčík	24,40 mg	375 mg	6,5 %
Draslík	322,00 mg	2 000 mg	16,1 %
Sodík	105,00 mg	1 150 mg	9,1 %
Železo	0,07 mg	14 mg	0,5 %
Zinek	0,90 mg	10 mg	9,0 %
Měď	0,06 mg	1 mg	6,1 %
Mangan	0,01 mg	2 mg	0,3 %

Vápník

Mléko je velmi významným zdrojem vápníku. Ten v těle plní převážně stavební funkci, neboť 99 % vápníku v těle je obsaženo v kostech a je důležité si udržet jejich dobrý stav, protože nedostatek vápníku přináší řadu problémů spojených s lámáním kostí, osteoporózou a celkovou kvalitou života. Zbývající 1 % vápníku se podílí na spoustě životních funkcích organismu např. při srážlivost krve, srdeční a svalové činnosti, produkci hormonů nebo fungování enzymů. Jeho obsah v krvi musí být stálý, protože i nepatrná změna může vyvolat potíže např. tetanii nebo dokonce i zástavu srdce. Vápník je z těla přirozeně vylučován, a pokud je jeho příjem nedostatečný, začne organismus využívat vápník z kostí, aby byla udržena kalcémie a byly zajištěny životní funkce, proto je konzumace vápníku důležitá. Vápník se snadno vstřebává, avšak vstřebávání se s rostoucím věkem snižuje. Vstřebávání podporuje mnoho dalších složek např. laktóza, vitamín D, aminokyseliny lysin, valin a histidin nebo kyselina citrónová. V mléce je vápník obsažen z 30 % ve formě roztoku, z 50 % v koloidní formě a 20 % vápníku je vázáno na kasein. Převážně se nachází ve sloučeninách s kyselinou fosforečnou a kyselinou citrónovou. Celkový obsah vápníku v mléce je přibližně 1 200 mg.l⁻¹ [3, 12, 16, 27].

Fosfor

Fosfor, stejně jako vápník, má velmi významnou roli pro stavbu kostí, zubů, ale taky při různých pochodech látkové výměny. Pro člověka je fosfor důležitý při odbourávání sacharidů, pro dobrou výkonnost nervového systému a také k tvorbě kyseliny adenosintrifosforečné, která slouží k získání energie. Fosfor se v mléce vyskytuje v několika

formách. 20 % se v mléce vyskytuje jako organický fosfát, který se váže na kasein. Zbylých 80 % tvoří anorganický fosfát. 56 % anorganického fosfátu tvoří rozpustný fosfát, který se vyskytuje převážně ve formě volných fosfátových iontů. 44 % se vyskytuje v kaseinu jako kalcium-fosfát. Celkový obsah fosforu v mléce se pohybuje kolem 900 mg.l^{-1} [3, 16, 18].

Hořčík

Hořčík je přítomný v celé řadě biochemických funkcí. Je nezbytný při syntéze nebo hydrolyze ATP a stabilizaci makromolekul DNA. Je také nutný k aktivaci některých enzymů např. fosfotransferáz a transferáz. Mléčná plazma obsahuje 98–100 % veškerého hořčíku a 65 % z tohoto množství tvoří rozpustní forma, zbytek je přítomen v kaseinu v koloidní formě. Celkové množství hořčíku v mléce je kolem 100 mg.l^{-1} [3, 16, 18].

Draslík a sodík

Draslík a sodík se významně podílí na aktivaci některých enzymů. Sodík aktivuje α -amylasu a draslík aktivuje glykolytické enzymy a enzymy dýchacího řetězce. V lidském organismu společně udržují s chloridovým iontem jako proti-iontem acidobazickou rovnováhu a osmotický tlak tekutin vně i uvnitř buněk. V mléce se nacházejí především ve formě solí kyseliny fosforečné a citronové. 95 % draslíku a sodíku je vázáno v mléčném séru jako koloidní roztok solí. Zbylých 5 % je vázáno na kasein. Množství draslíku v mléce se pohybuje kolem 1400 mg.l^{-1} a množství sodíku kolem 500 mg.l^{-1} [3, 16, 18].

Stopové prvky

Stopové prvky jsou v mléce obsaženy převážně v organické formě. V membráně tukových kuliček se nachází železo, mangan, zinek a měď. Železo je z poloviny vázáno na lipidy a z poloviny na bílkoviny, měď, jod, selen a zinek se vážou na mléčné bílkoviny. V mléce je obsažen velký počet stopových prvků, ty mají hlavní význam v aktivaci enzymů [3].

Železo má v organismu různé funkce založené na výskytu prvku. Nejvyšší koncentrace je v krvi, kde je železo vázáno v hemoglobinu a tím se účastní transportu kyslíku. Menší koncentrace je v ledvinách, srdci a kosterním svalstvu, kde je železo vázáno v myoglobinu. Železo je také nositelem účinku prostetické skupiny. Zinek se vyskytuje ve všech organismech a je známo přes 200 metaloenzymů, kde je zinek obsažen a je nezbytný pro jejich katalytickou funkci. Polovina celkového množství zinku v organismu se nachází ve svalové hmotě a třetina v kostech. Ve vysokých koncentracích se nachází především v kůži, vlasech, nehtech, játrech a v mužských orgánech. Dalším významným mikroprvkem je měď, která se váže v oxidázách a jistým způsobem se podílí na tvorbě krve. Měďnaté ionty se nachází, také v aktivních centrech některých enzymů např. cytochrom-*c*-oxidasa, superoxididismutasa, aminoxidasy, hydroxylasy nebo fenoloxidazy. Měď je nezbytná pro biosyntézu některých významných sloučenin a pro efektivní využití železa. Významným prvkem je také mangan, který se považuje za účinnou složku peptidáz a transferáz. V mléce se nejvíce vyskytuje v kaseinu a jeho deficit způsobuje zhoršení tvorby kostní tkáně, zpomalený růst a poruchy reprodukce [3, 18].

2.2.3 Nutriční hodnota mléka

Z nutričního hlediska lze považovat za nejlepší mléko kravské. Je velmi významným zdrojem nutričně důležitých proteinů, mléčného cukru, tuků, vitamínů a minerálních látek. Proteiny v mléce dodávají organismu dostatečné množství esenciálních aminokyselin. Kaseinové bílkoviny obsahují dostatek všech esenciálních aminokyselin, obzvlášť lysinu, naopak oproti

sérovým bílkovinám vykazují nižší biologickou hodnotu, protože obsah aminokyseliny cysteinu a methioninu je nedostatečný. Kasein také značně ovlivňuje růstovou aktivitu a vykazuje u člověka ochrannou funkci pro jaterní buňky. Sérové bílkoviny mají vysoký obsah valinu, leucinu a isoleucinu, což má význam ve stimulaci nových struktur proteinů. Stravitelnost mléčných proteinů je velmi vysoká, dobře se vstřebávají ve střevech, tudíž je konzument může snadno přijímat. Dále mléko obsahuje mléčné imunoglobuliny, které jsou významnými protilátkami a jsou součástí imunitního systému organismů [28, 29, 31].

Mléčné lipidy jsou významným zdrojem vitaminů rozpustných v tucích, esenciálních mastných kyselin a dalších látek. Mléčný tuk je nasycený, což je výhodné z hlediska dětské výživy, protože tvoří energetický zdroj pro organismus, naopak u dospělé populace hrozí riziko zvýšené hladiny cholesterolu v krvi. Mléko je tedy zdrojem cholesterolu, avšak jeho obsah není tak vysoký jako u jiných potravin živočišného původu. Stravitelnost mléčného tuku je ve srovnání s jinými živočišnými a rostlinnými tuky nejlepší, a to díky svým fyzikálním vlastnostem a specifickým složením mastných kyselin [16, 20, 28].

Ze sacharidů je nejdůležitějším disacharid laktóza, složený z galaktózy a glukózy. Z hlediska fyziologie výživy je hlavní význam laktózy ten, že při jejím rozkladu mikroorganismy vzniká kyselina mléčná, která zvyšuje resorpci vápníku, vykazuje antiseptické účinky a současně podporuje resorpci vitaminů a aminokyselin. Laktóza umožňuje také vstřebávání fosforu z mléka do organismu, pomáhá zlepšovat trávení a méně kazí zuby než ostatní cukry (řepný, hroznový) [16, 20, 28].

Mléko obsahuje řadu minerálních látek, z nichž především vápník má mimořádné postavení. Ostatní minerální látky může organismus získávat z jiných rostlinných a živočišných zdrojů, avšak dostačující množství vápníku lze získat pouze z mléka a mléčných výrobků. Mléčné výrobky zajistí 50–75 % celkového příjmu vápníku, proto je důležitá jejich konzumace v dostatečném množství. Například konzumace 1 litru mléka denně pokryje celou doporučenou denní dávku fosforu a vápníku (Tab. 3) [4, 30].

2.3 Elementární analýza mléka

Mléko a mléčné výrobky jsou velmi důležitou potravou obsahující základní prvky, které jsou nezbytné pro metabolické procesy a vývoj člověka. Přibližně 4–6 % lidské hmotnosti tvoří minerální prvky, které je nezbytné přijímat ve stravě. Mají velmi důležitou roli v živých systémech, ať už se jedná o regulaci enzymatických aktivit, regulaci normálního osmotického tlaku, rovnováhu kyselin, či usnadnění membránového transportu a údržbu nervové a svalové soustavy. Jakékoliv zvýšení nebo nedostatek těchto nepostradatelných minerálních prvků může způsobit poruchy v celém fyziologickém systému [32].

Při technologickém zpracování mléka dochází k transformacím, které mohou změnit nutriční kvalitu produktu. Je tedy zapotřebí sledovat změny jak v průběhu úprav, tak ve finálním produktu. Pro analýzu mléka je nezbytné narušit matici, a jelikož se jedná o komplexní systém, je potřeba vybrat vhodnou metodu úpravy vzorku v závislosti na typu prováděné analýzy. Metody rozkladu biologického materiálu se dělí na rozklad na suché cestě, rozklad na mokré cestě a další specifické metody. Mezi metody rozkladu na suché cestě se řadí vysokoteplotní rozklad, kde se využívá např. muflová pec, proud vzduchu nebo kyslíku v zahřáté trubici nebo spalování ve vysokotlaké peci. Existuje také nízkoteplotní suchý rozklad, kde se používá radiofrekvenční nebo mikrovlnná plazma. Při rozkladu na mokré cestě, který probíhá za zvýšeného tlaku či teploty, se používají směsi koncentrovaných minerálních kyselin, peroxid vodíku, popř. jiná činidla [33, 34, 35].

2.3.1 Přímá analýza vzorku

Při přímé analýze nepodléhá vzorek žádnému rozkladu. Vzorek je pouze vhodně naředěn demineralizovanou vodou, popř. vložen do ultrazvukové lázně a přefiltrován přes mikrofiltr, aby nedošlo k zanesení komponent měřícího přístroje pevnými částicemi.

2.3.2 Rozklad na mokré cestě

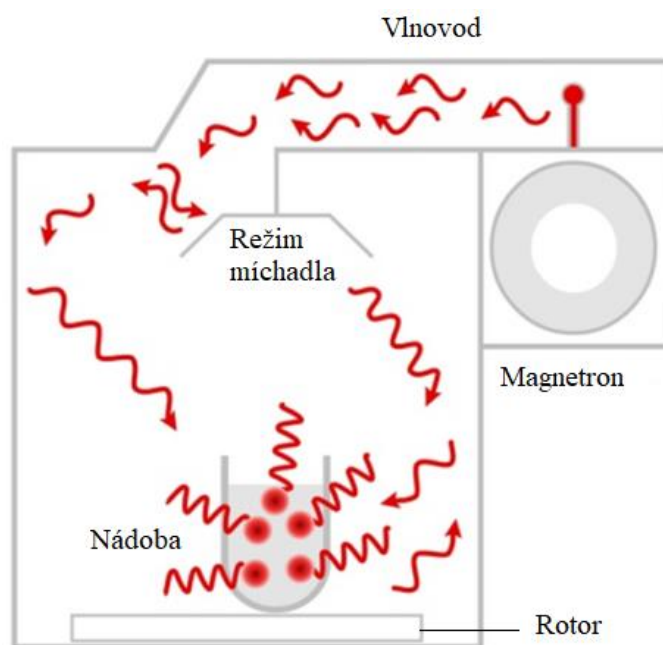
Klasický mokrý rozklad probíhá v přítomnosti koncentrovaných minerálních kyselin při atmosférickém tlaku za zvýšené teploty. V průběhu procesu dochází k oxidaci matrice příslušným činidlem ve dvou krocích. Nejprve dochází k narušení matrice kyselou hydrolyzou a její meziprodukty jsou pak následně oxidovány. Rychlost reakce závisí na teplotě, přičemž maximální teplota je určena bodem varu oxidačních činidel, proto také není potřeba tak vysoké teploty jako u suchého rozkladu. Rozklad může probíhat jak v otevřeném, tak v uzavřeném systému za zvýšeného tlaku a teploty [35].

2.3.2.1 Rozklad kyselinou dusičnou

K rozkladu se používá koncentrovaná kyselina dusičná. Po zahřátí vzorku s kyselinou vzniká žlutě zabarvený roztok a dochází k uvolnění NO a N₂O. Finální roztok je tedy čirý, pokud je bílkovina nebo další komponenty, zcela nebo částečně rozložena. Kyselinu dusičnou lze také použít k prostému ředění za vzniku kyselé disperze. Zde je však zapotřebí rozrušit vzniklé sraženiny v ultrazvukové lázni, kde dochází k destrukci pevných částic [36].

2.3.3 Mikrovlnný rozklad

Při mikrovlnném rozkladu dochází efektem absorpce mikrovlnné energie k zahřívání. Zahřívání činidel a vzorku probíhá mnohem rychleji díky specifickým vlastnostem mikrovlnného záření. Při samotném procesu se primárně nezahřívají stěny nádobek, ale ohřev nastává přímo ve směsi. Mikrovlnná pec (Obr. 9) je vybavena rotorem s reakčními nádobkami a rotace během procesu zajišťuje stejnou dodávku energie do všech nádobek. Ke vzorku se přidává směs kyseliny dusičné a peroxidu vodíku, který zde slouží jako oxidační činidlo. Na základě interakce hmoty a mikrovlnného záření vzniká teplo, které spolu s oxidační směsí rozloží organické látky [35].



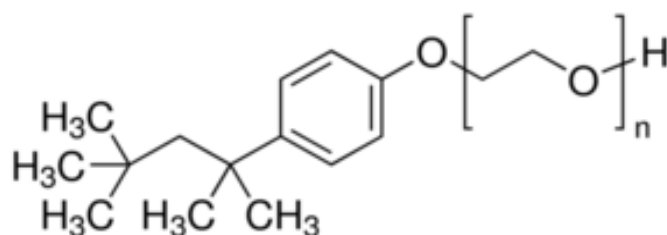
Obrázek 9 Schéma mikrovlnné pece (upraveno podle [37])

2.3.4 Rozklad pomocí činidel

K rozkladu biologických materiálů nebo rozrušení emulze se používají různá alkalická činidla např. tetramethylammonium hydroxid nebo Triton X-100. Tato činidla slouží k rozkladu, popř. rozrušení, mléčné matrice a díky tomu dochází k uvolnění jednotlivých prvků, které jsou vázány hlavně v kaseinových bílkovinách. Jejich použití obvykle nevyžaduje žádné zahřívání, protože se jedná o technologicky jednodušší postup oproti běžným metodám [34].

2.3.4.1 Triton X-100

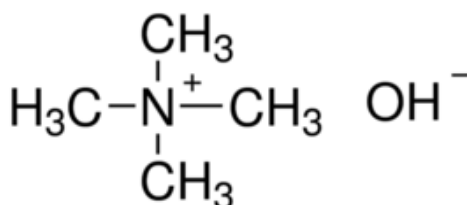
Triton X-100 je běžný neiontový surfaktant, jehož struktura vychází z polyoxyethylenu a obsahuje alkylfenyl hydrofobní skupinu (Obr. 10). Neiontové detergenty mají nenabitě hydrofilní skupiny a jsou považovány za mírné povrchově aktivní látky, protože narušují vazby protein-lipid a lipid-lipid. Nenarušují však interakce mezi proteiny, jelikož je obecně nenedenaturují. Triton X-100 se používá v biochemických aplikacích k izolaci komplexů membránových proteinů, pro lyzi buněk za účelem extrakce proteinů nebo buněčných. Triton X-100 se uvádí jako běžně přidávané činidlo a přidává se v malém množství (cca 1 μ l na 1 mg vzorku) ke vhodně naředěnému vzorku [38, 39, 40].



Obrázek 10 Triton X-100 [38]

2.3.4.2 Tetramethylammonium hydroxid

Tetramethylammonium hydroxid (Obr. 11) je silně alkalické, ve vodě rozpustné činidlo, které dokáže rozložit různé druhy tkání a chemické sloučeniny. Jedná se o bezbarvý až světle žlutý roztok, který je mísitelný s vodou a při pokojové teplotě připomíná zápach aminu. Při použití tohoto činidla se někdy doporučuje zahřívat směs při nízkých teplotách, avšak není to většinou podmínkou. Činidlo se používá v malém množství (cca 0,3 µl na 1 mg vzorku), což umožňuje použít menší ředící objemy. TMAH je také velmi využíván v procesech jako je pyrolyzní plynová chromatografie, termochemolýza, extrakce nebo leptání organických materiálů [34, 41].



Obrázek 11 TMAH [42]

2.3.5 Rozklad na suché cestě

Klasický suchý rozklad se provádí na vzduchu v otevřeném systému za atmosférického tlaku, přičemž dochází k oxidaci organické matrice. Prvním krokem je sušení, ke kterému se používají horkovzdušné sušárny, lyofilizátory nebo topné desky. Dalším krokem je zuhelnění, kde je vzorek vystaven teplotám v rozmezí 200–400 °C. Při tomto kroku je důležité zvolit vhodně teplotně časový režim. Při zpopelnění je vzorek vystaven teplotám v rozmezí 450–550 °C, kdy je cílové teploty dosaženo postupným nárůstem. Posledním krokem je loužení popela, ke kterému se využívají např. kyseliny dusičná a chlorovodíková [35].

2.4 Instrumentální metody

Pro prvkovou analýzu se hojně využívají spektrometrické metody, které se zabývají měřením a vyhodnocováním elektromagnetického záření. Metody se dělí do dvou skupin, přičemž první skupina je založená na výměně energie mezi zkoumanou látkou a zářením. V druhém případě nedochází k výměně energie, ale dochází pouze k ovlivnění vlastností záření, které prochází danou látkou [43].

2.4.1 Atomová absorpční spektrometrie

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) je optická metoda založená na absorpci elektromagnetického záření volnými atomy sledovaného prvku v plynném stavu. Měřený úbytek elektromagnetického záření je dán mírou koncentrace volných atomů prvku, který toto záření absorboval [44, 45].

Jako budící zdroj se nejčastěji v AAS používá plamen, který dosahuje teploty 2 000–3 150 K. Při teplotách přesahujících 2 000 K se volné atomy většiny prvků nachází v základním energetickém stavu a jakmile pohltnou foton, dostanou se na jednu z vyšších energetických hladin. Největší pravděpodobnost mají přechody mezi základním a nejbližším excitovaným stavem, kterým odpovídají rezonanční čáry. Ty jsou pro atomy jednotlivých prvků nejcitlivější, zcela specifické a je jich mnohem méně než emisních, proto je tato metoda jednodušší než emisní metody [44, 45].

2.4.2 Atomová emisní spektrometrie

Atomová emisní spektrometrie (AES) je metoda založená na měření emise elektromagnetického záření volnými atomy látek, které jsou v plynném stavu za použití budícího zdroje např. plamene. Prvky v excitačním zdroji se atomizují a atomy nebo ionty přecházejí do vyššího energetického stavu. Při návratu na nižší energetickou hladinu částice emitují charakteristické čárové spektrum, přičemž intenzita spektrální čáry je úměrná obsahu prvku [44, 46].

Atomový emisní spektrometr je složen z budícího zdroje, optického spektrometru a elektroniky s výpočetním systémem. Budící zdroj dodává potřebnou energii pro vyvolání emise, tím vzorek převádí z pevné fáze nebo roztoku do plynné fáze, kde nastane atomizace a excitace elektronů. Optický spektrometr slouží k rozkladu emitovaného záření na jednotlivé spektrální čáry a zároveň měří jejich intenzitu. Při analýze jsou využívány pouze analytické čáry, což jsou nejintenzivnější čáry spektra analyzovaného prvku, které jsou minimálně ovlivněny jinými prvky [44, 46].

2.4.3 Atomová fluorescenční spektrometrie

Atomová fluorescenční spektrometrie (AFS) je metoda, která sleduje emisi záření plynnými atomy excitovanými absorpcí elektromagnetického záření. Vznikající fluorescenční spektra jsou velmi jednoduchá, a jelikož je excitace čárovým zdrojem selektivní, detekce nevyžaduje sofistikovaný optický systém. Fluorescence je hodnocena na základě velikosti toku fluorescenčního záření, které je vyzařováno všemi směry. Mezi významné charakteristické vlastnosti atomů patří kvantový výtěžek, který se definuje jako podíl fotonů, které jsou reemitovány z celkového počtu absorbovaných fotonů. Vyjadřuje se tedy jako poměr fluorescenčního toku a absorbovaného toku záření. Na rozdíl od AAS se metoda AFS používá méně kvůli větší experimentální náročnosti měření [43, 45].

Tabulka 4 Srovnání spektrálních metod [43, 45, 47]

Metoda	Primární zdroj záření	Atomizátor / budící zdroj	Disperzní prvek	Detektor
AAS	výbojky s dutou katodou (HLC), bezelektrodové výbojky (EDL), laditelný laser	plamenový, elektrotermický (ETA), křemenný	monochromátor (Czerny-Turner, Ebert, Echelle)	fotonásobič s fotodiodou
AFS	výbojky s dutou katodou (HLC), bezelektrodové výbojky (EDL), laditelný laser	plamenový, elektrotermický, indukčně vázané plazma	monochromátor, (Czerny-Turner, Ebert, Echelle)	fotonásobič s fotodiodou
AES	–	plamen, plazma (DCP, MIP, ICP), elektrický výboj (oblouk, lampa), lasery	monochromátor, polychromátor	fotografická deska nebo film, fotoelektrický detektor, diodové pole, fotonásobič

2.4.4 Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) je metoda založená na sledování fotonů, které vznikají přechodem valenčních elektronů z vyšších energetických stavů na nižší v prostředí plazmového výboje. Je tedy měřeno záření vznikající zářivou deexcitací, které je emitováno ionty nebo atomy v excitovaném stavu. V této metodě se sledují čárová spektra atomů prvků, jejichž rozsah se pohybuje v rozmezí od 160 do 700 nm [46, 48].

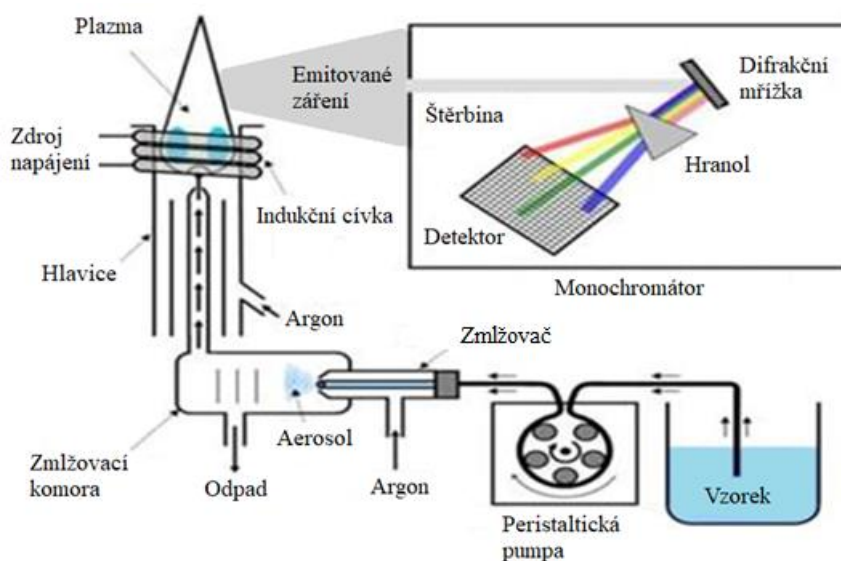
Každý prvek má charakteristické rozdíly energií mezi jednotlivými elektronovými stavy atomu. Přejít atomu z nižší energetické hladiny na vyšší je zapříčiněn přítomností záření o vhodném kmitočtu a energie fotonu musí odpovídat právě tomuto energetickému rozdílu mezi hladinami dle Planckova vztahu (2.1):

$$\Delta E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda}, \quad (2.1)$$

kde h je Planckova konstanta, c je rychlost světla, ΔE je energie a λ je vlnová délka záření. Absorbací fotonu vzniká atom v excitovaném stavu, který může samovolně přecházet do nižšího energetického stavu, přičemž rozdíl energií při vyzáření či pohlcení atomu je stejný a liší se pouze znaménkem [44, 45].

Optický emisní spektrometr se skládá z několika částí (Obr. 12). Kapalný vzorek je pomocí automatického dávkovače, který je poháněn peristaltickou pumpou, dopraven do zmlžovací komory. Je třeba podotknout, že než se vzorek dostane do zmlžovače, překonává dlouhou transportní dráhu a také může docházet ke kontaminaci a následnému zkreslení měření kvůli vysokému provozu a střídání vzorků. Jakmile se vzorek dostane do koncentrického pneumatického zmlžovače, dochází díky proudu argonu k trhání kapaliny na aerosol. Následně

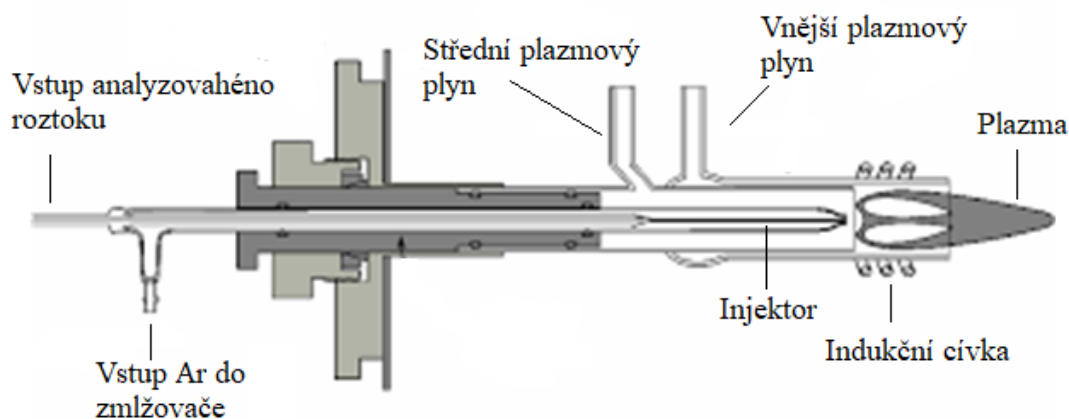
je vzorek unášen proudem pracovního plynu do plazmatu, které je generováno v proudu argonu. Zde je matrice při teplotě až 10 000 K odpařena a dochází k atomizaci, popř. ionizaci, a excitaci elektronů v atomech do energeticky vyšších hladin. Atomy v excitovaném stavu jsou však nestabilní a dochází proto k deexcitaci na nižší energetickou hladinu a zároveň je emitováno záření ve formě fotonu o určité vlnové délce odpovídající Planckově rovnici (2.1). Záření je následně vedeno do optické části přístroje, kde je monochromátor, který selektuje záření o různých vlnových délkách a jednotlivé fotony dopadají na detektor, kde jsou převedeny na měřitelný elektrický signál. Intenzita tohoto signálu je přímo úměrná koncentraci stanovovaného prvku v roztoku [43, 49, 50, 51].



Obrázek 12 Schéma ICP-OES (upraveno podle [49])

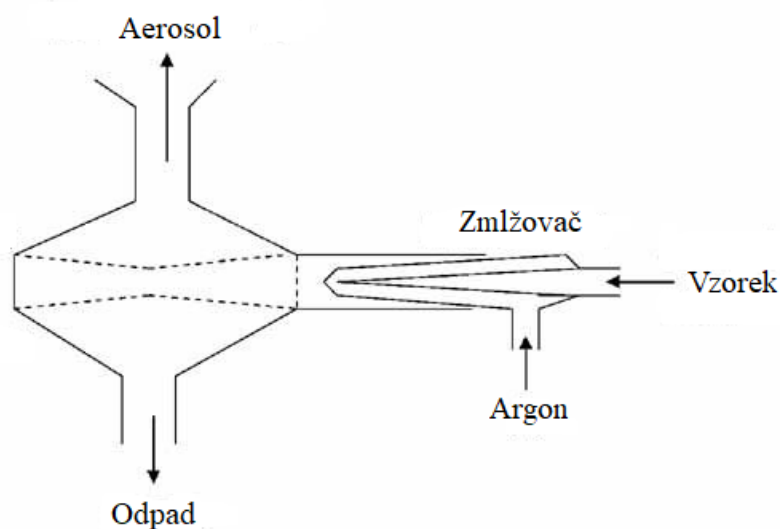
2.4.4.1 Zmlžovací zařízení

Zmlžovače jsou nejčastěji používanými zařízeními pro úpravu kapalného vzorku na aerosol. Při zmlžování se využívá několik druhů pneumatických zmlžovačů (Obr. 13), u kterých je účinnost závislá na průtoku nosného plynu. Mezi pneumatické zmlžovače se řadí kapilární zmlžovače se sacím účinkem (např. koncentrický zmlžovač typu Meinhard) nebo bez sacího účinku (např. pravoúhlý zmlžovač typu Kniseley). Dalším pneumatickým zmlžovačem je zmlžovač na Babingtonově principu (žlábkový, sítkový, fritový), který umožňuje zmlžovat vzorky s vysokým obsahem solí, ale také suspenze nebo pevné vzorky ve formě prášku. Existují také zmlžovače, u kterých zmlžování není závislé na průtoku nosného plynu např. vysokotlaká tryska, hydraulický vysokotlaký, tepelný (termosprej) nebo ultrazvukový zmlžovač [43, 50, 52].



Obrázek 13 Schéma přímého napojení zmlžovače na plazmovou hlavici (upraveno podle [53])

Pneumatické zmlžovače využívají vysokorychlostní plynové toky k vytvoření aerosolu. Ten vzniká tak, že do koncentrického zmlžovače je přiveden vzorek, který je proudem argonu trhán na malé kapičky za vzniku aerosolu. Pro vstřikování do plazmatu jsou vhodné kapičky o velikosti pouze do 10 μm . Mezi zmlžovačem a hořákem je tedy mlžná komora, ve které dochází k úpravě aerosolu. Dochází k oddělení malých částic aerosolu od velkých na základě působení odstředivé a gravitační síly. Existuje několik typů mlžných komor např. cyklonová komora, kónická komora s kulovitým impaktorem nebo komora dle Scotta. V současné době se využívá zejména cyklonová komora (Obr. 14), jelikož zajišťuje větší účinnost přenosu vzorku a má kratší dobu promývání. Aerosol s vhodnou velikostí částic putuje do plazmové hlavice a zbytek je odváděn do odpadu [43, 50, 52].

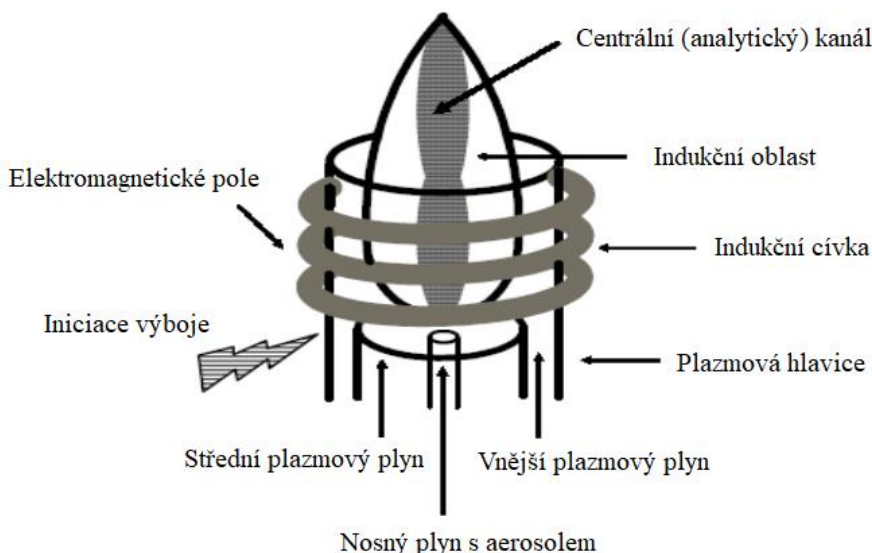


Obrázek 14 Cyklonová mlžná komora (upraveno podle [54])

2.4.4.2 Vznik indukčně vázaného plazmatu

Plazma je ionizovaný, makroskopicky neutrální plyn, který vzniká ionizací atomů plynů např. argonu. Volné elektrony a ionty vykazují v plazmatu kolektivní chování, což znamená, že nabitě částice ovlivňují chování dalších nabitých částic. Kinetická energie je volným elektronům ICP výboje (Obr. 15) dodávána pomocí elektromagnetického pole indukční cívky a výboj ICP je iniciován ionizací jiskrovým výbojem. Cívka obklopuje vrchní část hořáku, je

připojena k vysokofrekvenčnímu generátoru, má obvykle tři závity a je chlazena vodou. Elektrony jsou vzniklým elektromagnetickým polem urychleny a svou energii předávají atomům plynu (argon) a tím dochází k lavinovité ionizaci plynu. Plazmová hlavice izoluje plazma od indukční cívky a usměrňuje tok vnějšího plazmového plynu, který je zdrojem plazmového výboje. Střední plazmový plyn slouží k izolaci plazmatu od prostředního kanálu. Nosný plyn (argon) vnáší aerosol vzorku do plazmového budícího zdroje [43, 49, 55, 56].



Obrázek 15 Výboj ICP (upraveno podle [55])

2.4.4.3 Optický systém

Optický systém je součástí spektrometru, který slouží k separaci záření na základě vlnových délek. Do spektrometru přichází polychromatický paprsek, který vychází z excitovaného vzorku ve zdroji. Paprsek vstupuje štěrbinou optické části přístroje a pomocí disperzního prvku je rozložen na monochromatické paprsky, které jsou dále fokusovány na detektor [43, 49].

Jako disperzní prvek slouží hranol nebo mřížka. Hranolové přístroje lépe rozlišují blízké čáry v oblasti kratších vlnových délek, tudíž se využívají pro sledování čárových spekter v UV oblasti pod 400 nm. Naopak přístroje s optickou mřížkou lze využít pro široké rozmezí vlnových délek UV, viditelné i blízké infračervené oblasti, protože disperze není závislá na vlnové délce. Rozlišovací schopnost přístroje je závislá na rozlišovací schopnosti disperzního prvku a jejím úkolem je rozpoznat vlnové délky dvou čar. Pro analýzu na OES je vyžadována vysoká rozlišovací schopnost [43].

2.4.4.4 Detekce

K detekci záření lze použít fotoelektrickou detekci nebo fotografickou, která se však v dnešní době téměř nevyužívá. Fotoelektrická detekce je založena na převodu energie optického záření na elektrickou energii. OES s fotoelektrickou detekcí mají buď sekvenční, nebo simultánní uspořádání. Sekvenční uspořádání obsahuje otočný monochromátor s jedním nebo dvěma fotonásobiči. Simultánní uspořádání využívá pevných mřížkových monochromátorů, kde jsou pevně umístěny výstupní štěrbinové jednotlivých spektrálních čar a fotonásobič. Lze tedy měřit více vybraných spektrálních čar najednou [43, 45].

2.4.4.5 Interference

Metoda ICP-OES je zatížena četnými interferencemi, které jsou velmi podstatné, protože je registrováno velké množství čar. Interference mohou být spektrálního původu, nebo důsledkem vysoké koncentrace prvků nebo složek matrice. Spektrální interference bývají vyvolány jinými čarami nebo posunem intenzity pozadí a lze je eliminovat např. nalezením jiné analytické čáry prvku nebo použitím korelačních faktorů, které jsou získány experimentálně. Dále to mohou být nespektrální interference, které jsou vyvolané rozdíly ve viskozitě a povrchovém napětí kalibračních roztoků a vzorku. Fyzikální interference lze minimalizovat různými metodami např. zředěním vzorku, úpravou matrice nebo použitím vnitřních standardů [43, 57].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Laboratorní vybavení

3.1.1 Chemikálie

Tabulka 5 Přehled používaných chemikálií

Chemikálie	Výrobce	Vzorec	CAS
TMAH	SIGMA-ALDRICH	$C_4N_{13}NO$	75-59-2
Triton X-100	SIGMA-ALDRICH	$C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$	9002-93-1
Kyseliny dusičná	ANALYTIKA, spol. s.r.o.	HNO_3	7697-37-2
Peroxid vodíku	VWR International	H_2O_2	7722-84-1
CRM (sušené odstředěné mléko)	European Reference Materials		
Standardní roztoky prvků	ANALYTIKA, spol. s.r.o.		

3.1.2 Pomůcky a přístroje

- Laboratorní sklo
- Mikropipeta FINNPIPETTE, ThermoScientific
- Analytické laboratorní váhy SATORIUS, Entris
- Filtrační papír VWR, pórovitost 12–15 μm
- Nylonový mikrofiltr Agilent, pórovitost 0,45 μm
- Optický emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem Ultima 2, HORIBA Scientific (Tab. 6)
- Vodní lázeň
- Ultrazvuková lázeň KRAINTEK, K5
- Mikrovlnná pec Milestone MLS 1200 mega

Tabulka 6 *Technické specifikace ICP-OES [58]*

Generátor:	rádiová frekvence 40,68 MHz
Chladicí systém:	typ GenCo pro chlazení generátoru a cívky
Odsávání:	přímé odsávání napojené na plazmovou komoru
Plazma:	plně demontovatelný hořák, průměr injektoru 3 mm, průtok plazmového plynu 12 l.min ⁻¹ , průtok nosného plynu 0,2 l.min ⁻¹
Čerpadlo:	tříkanálová peristaltická pumpa
Mlžná komora:	cyklónová, koncentrický skleněný zmlžovač
Optický systém	ohnisková vzdálenost 1 m, termoregulovatelný, rozlišené optické mřížky 2 400 g.mm ⁻¹ , optické rozlišení pro 460–320 nm < 5 pm a pro 320–800 nm < 10 pm
Vlnová délka	160–800 nm
Detekce:	Dual PMT s HDD [®] systémem

3.1.3 Charakteristika materiálu

Jako analyzovaný materiál bylo použito čerstvé ovčí, kravské a kozí mléko z domácího chovu (Tab. 7). Jako CRM pro validaci bylo použito sušené odstředěné mléko ERM[®]-BD150.

Tabulka 7 *Informace o analyzovaném materiálu*

Mléko	Místo chovu	Datum podojení	Datum analýzy
Kravské	Třebětice, Zlínský kraj	25. 5. 2020	26. 5. 2020
Kozí	Tučapy, Zlínský kraj	25. 5. 2020	26. 5. 2020
Ovčí	Trnava, Zlínský kraj	24. 5. 2020	26. 5. 2020

3.1.4 Úprava vzorku k analýze

Před analýzou byl vzorek upraven různými metodami, aby bylo dosaženo co nejlepších výsledků. Upravován byl jak CRM pro validaci metody, tak reálné vzorky mléka. Pro validaci metody bylo vždy odváženo 20 mg CRM s přesností na 4 desetinná místa a pro přípravu pracovních roztoků byly použity odměrné baňky o objemu 50 ml. Pro analýzu reálného vzorku byl vždy odpipetován 1 ml mléka, zvážen s přesností na 4 desetinná místa a pro přípravu roztoků byly použity odměrné baňky o objemu 25 ml.

3.1.4.1 Stanovení vody v CRM titračně podle Karl-Fishera

U CRM bylo potřeba stanovit obsah vody, protože obsah prvků ve vzorku je vztažen na sušinu a vlhkost materiálů může ovlivnit měření. Obsah vody byl stanoven titračně metodou podle Karl-Fishera. Do suché, prázdné a zvážené nádoby bylo odpipetováno 20 ml bezvodého methanolu a následně byla nádoba zvážena a hmotnost zaznamenána. Do další nádoby bylo naváženo 0,5 g CRM s přesností na 4 desetinná místa, bylo přidáno 20 ml bezvodého methanolu a nádobka byla zvážena a hmotnost zaznamenána. Takto připravený vzorek byl ponechán v ultrazvukové lázni 15 minut při teplotě 50 °C. Po vychladnutí bylo injekční stříkačkou odebráno 5 ml vzorku a přefiltrováno přes stříkačkový filtr do suchých vialek. K samotné titraci byly použity stříkačky s jehlou. Do titrační cely přístroje bylo nadávkováno množství standardu vody o přesné hmotnosti. Tato hmotnost byla vložena pomocí klávesnice do přístroje a potvrzením nastavených hodnot byla zahájena titrace. Po ukončení titrace byl zobrazen obsah vody na klávesnici v %. Stejným způsobem byl proměřen vzorek CRM. Na základě získaných hmotností a obsahu vody z přístroje byl vypočítán obsah vody ve vzorku dle vzorce (3.1).

$$w_{H_2O} = \frac{(w_{H_2O_{ex}} - w_{H_2O_{bl}}) \cdot (m_{b+vz+OH} - m_b)}{(m_{b+vz} - m_b)} \quad (3.1)$$

3.1.4.2 Prosté ředění

Při prostém ředění vzorku bylo navážené množství CRM kvantitativně převedeno do daného objemu a doplněno po rysku destilovanou vodou. Takto vzniklý roztok byl ponořen na 5–10 minut do ultrazvukové lázně, aby byly zhomogenizovány nežádoucí částice. Vzorek byl před analýzou přefiltrován pomocí mikrofiltru a injekční stříkačky.

3.1.4.3 Příprava kyselé disperze

Pro přípravu kyselé disperze byla použita kyselina dusičná o koncentraci 1 mol.l⁻¹. Výpočtem bylo zjištěno, že na přípravu 250 ml 1M HNO₃, je zapotřebí 16,8 ml 67% HNO₃. Do kádinky s destilovanou vodou bylo postupně přidáváno odměřené množství kyseliny a takto vzniklý roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky na 250 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku. Takto připraveným roztokem byl kvantitativně převeden CRM do daného objemu a doplněn 1M HNO₃ po rysku. V případě reálného vzorku bylo odpipetované množství mléka převedeno 1M HNO₃ do daného objemu a doplněno 1M HNO₃ po rysku. Před analýzou byl roztok zfiltrován přes papírový filtr a následně přes mikrofiltr.

3.1.4.4 Přídavek činidla TMAH

Do zkumavky bylo kvantitativně převedeno odvážené množství CRM do 1 ml vody. K této směsi bylo přidáno činidlo (na 1 mg vzorku 0,3 μl činidla) a obsah zkumavky byl zahříván 40 minut ve vodní lázni při 60 °C. Roztok ve zkumavce byl po zahřátí kvantitativně převeden do daného objemu a doplněn destilovanou vodou po rysku.

3.1.4.5 Přídavek činidla Triton X-100

Do objemu byla kvantitativně převedena navážka CRM. Následně bylo přidáno 20 μl činidla (na 1 mg vzorku 1 μl činidla) a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Takto připravený vzorek byl ještě před analýzou zfiltrován přes mikrofiltr. Při přípravě reálného

vzorku bylo množství mléka kvantitativně převedeno destilovanou vodou do daného objemu, následně bylo přidáno činidlo a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Před analýzou byl roztok zfiltrován přes papírový filtr a následně přes mikrofiltr.

3.1.4.6 Mokrý rozklad

Do odměrné baňky byl odvážen CRM a bylo přidáno 10 ml koncentrované kyseliny dusičné. Obsah odměrné baňky byl následně 30 minut zahříván ve vodní lázni při 100 °C. Po vychladnutí byl obsah odměrné baňky doplněn destilovanou vodou po rysku. V případě reálného vzorku bylo odměřené množství mléka odpipetováno do odměrné baňky o objemu 25 ml a bylo přidáno 10 ml koncentrované kyseliny dusičné. Roztok byl zahříván 30 minut ve vodní lázni při 100 °C a po ochlazení byla baňka s roztokem doplněna destilovanou vodou po rysku. Před analýzou byl vzorek přefiltrován přes papírový filtr a následně přes mikrofiltr.

3.1.4.7 Mikrovlnný rozklad

Do nádobek určených pro mikrovlnný rozklad byl navážen CRM a bylo přidáno 6 ml koncentrované HNO₃ a 2 ml H₂O₂. Připravené vzorky byly rozloženy za podmínek uvedených v tabulce 8. Po ukončení rozkladného programu a vychladnutí nádobek byl jejich obsah kvantitativně převeden destilovanou vodou do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku.

Tabulka 8 Nastavení rozkladného programu

Krok	Čas [min]	Příkon [W]
1	1	250
2	1	0
3	5	250
4	5	400
5	5	650

3.1.4.8 Zpopelnění

Navážka CRM byla spálena v elektrické peci při 500 °C po dobu 2 hodin. Vzniklý bílý popel byl kvantitativně převeden 1M HNO₃ do daného objemu a doplněn destilovanou vodou po rysku.

3.1.5 Příprava standardních roztoků

Před experimentálním měřením byla vytvořena řada kalibračních roztoků ze standardních roztoků s vlastnostmi uvedenými v tabulce 9. Výpočtem bylo zjištěno, že pro přípravu 25 ml zásobního roztoku o koncentraci 100 mg.l⁻¹ je potřeba 2,5 ml standardního roztoku o koncentraci 1 g.l⁻¹. Kalibrační roztoky o nižších koncentracích byly připraveny rozředěním zásobního roztoku.

Tabulka 9 Informace o kalibračních roztocích

Prvek	Kalibrační rozmezí [g.l ⁻¹]	Koncentrace standardu [g.l ⁻¹]	Odchylka [g.l ⁻¹]
Na, K, Ca	10–100	10	0,02
Mg, P	10–100	1	0,002
Mn, F, Zn, Cu	1–10	1	0,002

3.1.6 Analýza prvků a vyhodnocení dat

Analyzované prvky byly měřeny na přístroji ICP-OES při daných vlnových délkách (Tab. 10). Výsledky měření byly zpracovány v programu MS Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA). Nejistoty měření byly určeny na základě konfidenčního intervalu na hladině spolehlivosti 95 %.

Tabulka 10 Přehled vlnových délek měřených prvků

Prvek	Vlnová délka [nm]
Ca	393,366 / 422,673
K	766,490
Mg	285,213
Na	588,995
P	213,620 / 214,914
Cu	327,396
Fe	259,940
Mn	257,610
Zn	206,191

Před každým měřením byla provedena optimalizace přístroje, která probíhala při speciálně nastavených parametrech přístroje (Tab. 11). Naměřená hodnota koncentrace byla vztažena na navážku přepočtem dle (3.2).

$$c_m = \frac{c \cdot V}{m}, \quad (3.2)$$

kde c_m je koncentrace prvku ve vzorku, c je koncentrace prvku v roztoku, V je objem vzorku a m je hmotnost navážky.

Tabulka 11 *Pracovní parametry přístroje*

Průtoky plynu:	stínící plyn 0,78 l.min ⁻¹ plazmový plyn 14,10 l.min ⁻¹ pomocný plyn 0,27 l.min ⁻¹
Příkon generátoru:	makroprvky 1 200W, 1 000W mikroprvky 1 300W
Průtok plynu na zmlžovači:	0,83 l.min ⁻¹
Tlak plynu na zmlžovači:	3,01 bar
Integrační čas:	0,5 s
Počet opakování měření jednoho vzorku:	5

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Validace metody pro elementární analýzu

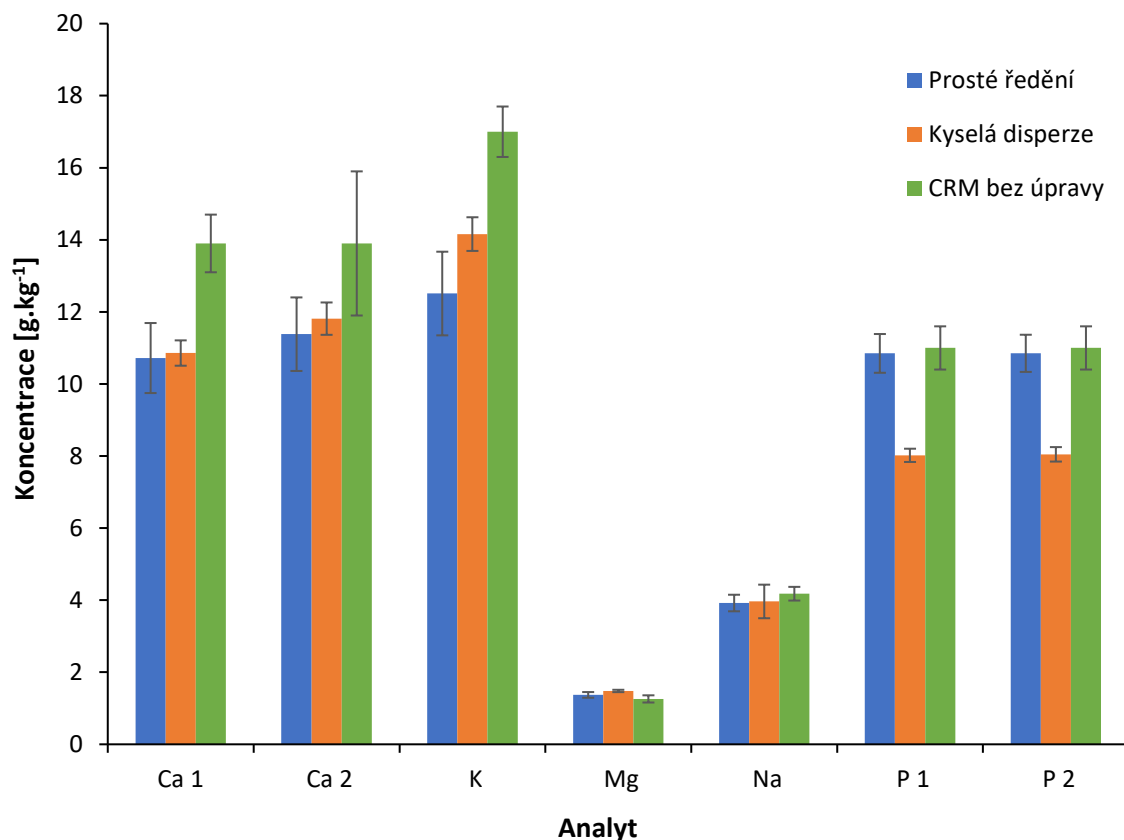
Validace metody byla provedena na certifikovaném referenčním materiálu ERM[®]-BD150. Pomocí výše uvedených metod byl materiál upravován tak, aby výtěžnosti jednotlivých metod úpravy vzorku odpovídaly deklarovaným průměrným hodnotám v CRM (Tab. 12). Nejistota CRM je rozšířena o faktor pokrytí $k = 2$ odpovídající úrovni spolehlivosti asi 95 %.

Tabulka 12 Prvkové zastoupení v CRM

Makroprvky	Koncentrace [g.kg ⁻¹]
Ca	13,90 ± 0,80
K	17,00 ± 0,70
Mg	1,26 ± 0,10
Na	4,18 ± 0,19
P	11,00 ± 0,60

4.1.1 Stanovení makroprvků po přípravě disperze

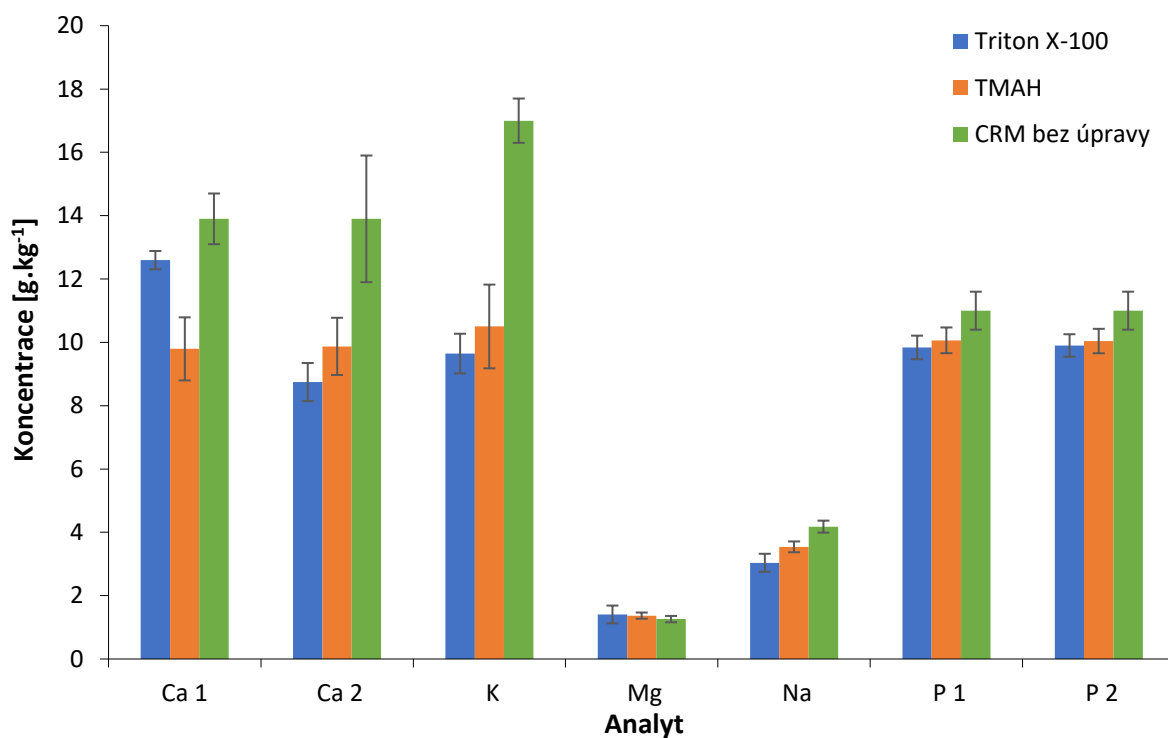
Vzorky byly měřeny za různých podmínek nastavení pracovního přístroje (příkon generátoru 1 000W a 1 200W). Některé prvky byly měřeny při různých vlnových délkách, konkrétně vápník (Ca 1 = 393,366 nm; Ca 2 = 422,673 nm) a fosfor (P 1 = 213,620 nm; P 2 = 214,914 nm), protože výtěžnosti při měření s původními vlnovými délkami nekorespondovaly s hodnotou uváděnou v CRM, musely být zvoleny sekundární vlnové délky. Z výsledků a grafu (Obr. 16) vyplývá, že změna pracovního nastavení přístroje ICP-OES se v naměřených hodnotách výrazně neprojevila. Naopak při odlišné úpravě vzorku lze pozorovat výraznější rozdíly, a to zejména při stanovení draslíku a fosforu. Zatímco při stanovení draslíku vykazuje lepší výsledky úprava pomocí kyselé disperze, u fosforu vyšší koncentraci prvků jednoznačně vykazuje prosté ředění, protože nedošlo k vysrážení proteinu, ve kterém je fosfor vázaný [59]. Z rozptylu chybových úseček u většiny prvků (kromě Ca a K) je patrná přesnost měření, ale výsledky CRM (kromě Mg a Na) přesto nekorelují s hodnotami CRM. Stanovená koncentrace vápníku a draslíku je mnohem nižší než koncentrace CRM uváděná výrobcem (Tab. 12). To je způsobeno tím, že prvky jsou vázány na velké molekuly v mléce, které mohly být odseparovány v mlžné komoře. Pro vápník, hořčík, sodík a draslík se jeví jako lepší metoda úpravy kyselá disperze, protože kyselina uvolní i prvky vázané na proteiny v mléce [59].



Obrázek 16 Srovnání výsledků prostého ředění a kyselé disperze při příkonu 1 000W

4.1.2 Stanovení makroprvků při použití činidel

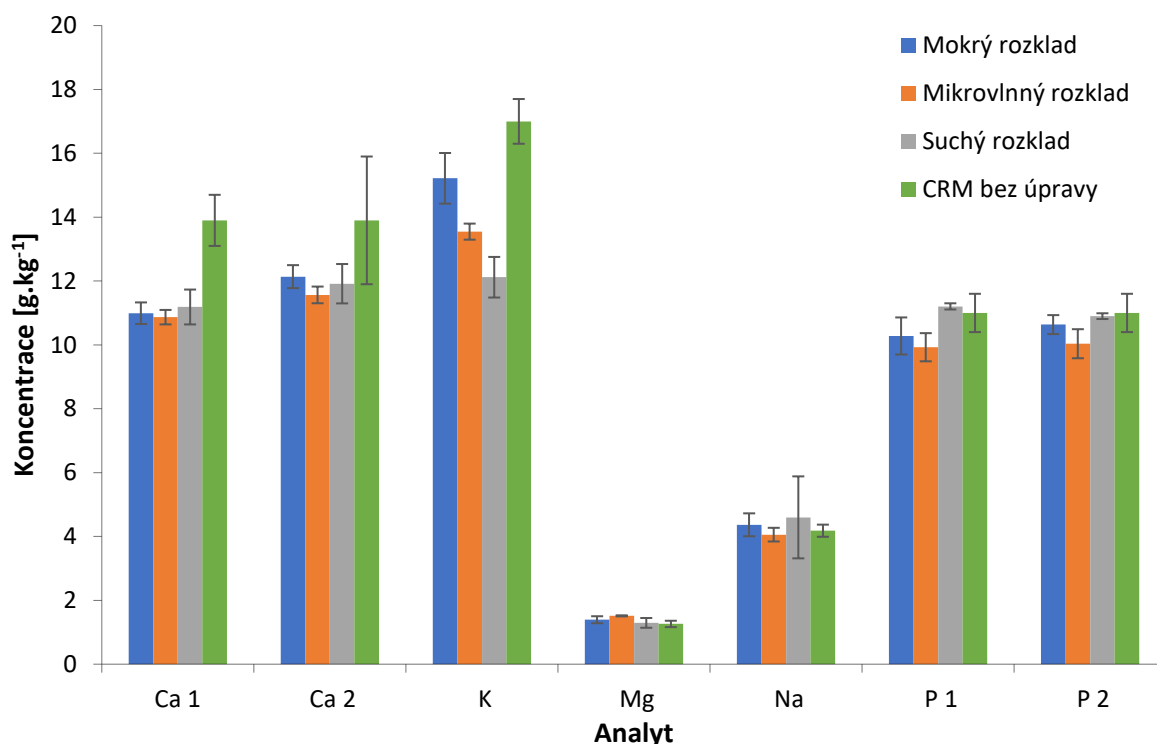
Z výsledků (Tab. 13) je patrné, že v případě měření vápníku při vlnové délce 393,366 nm (Ca 1) byla zaznamenána mnohem vyšší výtěžnost při použití činidla Triton X-100. Naopak u fosforu a draslíku jsou výsledky příznivější při použití činidla TMAH. V grafu (Obr. 17) jsou srovnány koncentrace prvků a je patrné, že kromě koncentrace vápníku a draslíku, nejsou rozdíly koncentrací ostatních prvků statisticky významné na základě rozptylu chybových úseček a lze tedy pro měření těchto prvků použít obě metody úpravy vzorku. Z hlediska časové náročnosti úpravy vzorku je výhodnější použití činidla Triton X-100, protože při použití činidla TMAH je potřeba vzorek 30 minut zahřívat. U analýzy hořčíku a sodíku pomocí činidel jsou výsledky srovnatelné s výsledky získanými analýzou obou disperzí. Při analýze fosforu pomocí činidel jsou výsledky srovnatelné pouze s prostým ředěním, neboť u kyselé disperze byla výtěžnost fosforu výrazně nižší. U draslíku je zaznamenána vyšší výtěžnost při analýze kyselé disperze.



Obrázek 17 Srovnání výsledků při použití činidel při příkonu 1 000W

4.1.3 Mineralizace vzorku

Z výsledků (Tab. 13) a grafu (Obr. 18) je patrné, že nejefektivnější metodou pro analýzu draslíku, sodíku a vápníku měřeného při vlnové délce 422,673 nm (Ca 2) je mokřý rozklad, protože při této metodě bylo dosaženo nejlepšího výtěžku. I přesto byla dosažená výtěžnost relativně nízká, pohybovala se v rozmezí 79–87 %. Naopak výtěžnost draslíku při použití mokřého rozkladu byla nejvyšší ze všech metod (87,5 %). Použitý způsob mineralizace výrazně neovlivňoval výtěžnost hořčíku. Mineralizace na suché cestě poskytovala dobré výtěžnosti pro všechny prvky kromě vápníku a draslíku, podobně jako mikrovlnný rozklad je i mineralizace na suché cestě časově náročná. Rozdíly výtěžnosti mezi metodami mineralizace vzorku u vápníku, sodíku a hořčíku jsou statisticky nevýznamné, což lze usoudit na základě velikosti chybových úseček.



Obrázek 18 Srovnání výsledků mineralizace vzorku

Tabulka 13 Přehled výtěžnosti makroprvků CRM při různé úpravě vzorku [%]

Analyt	Prosté ředění	Kyselá disperze	Triton	TMAH	Mokry rozklad	MW rozklad
Ca 393,366/ 422,673	77,1 ± 8,6/	78,1 ± 3,2/	90,6 ± 2,3/	70,5 ± 10,2/	79,1 ± 3,1/	78,2 ± 2,1/
	81,9 ± 8,5	85,0 ± 3,8	62,9 ± 6,9	71,0 ± 9,2	87,3 ± 3,0	83,2 ± 2,3
K	73,6 ± 8,8	83,3 ± 3,3	56,7 ± 6,5	61,8 ± 12,6	89,5 ± 5,2	79,7 ± 1,9
Mg	108,9 ± 5,5	117,5 ± 2,2	111,7 ± 20,0	108,8 ± 4,1	110,5 ± 7,8	120,1 ± 1,1
Na	93,8 ± 5,6	94,9 ± 11,8	72,7 ± 9,4	84,7 ± 4,8	104,4 ± 8,2	97,1 ± 1,1
P 213,620/ 214,914	98,6 ± 4,7/	72,9 ± 2,3/	89,5 ± 3,8/	91,5 ± 4,0/	93,4 ± 5,7/	90,2 ± 4,4/
	98,6 ± 4,5	73,2 ± 2,5	90,0 ± 3,6	91,3 ± 3,9	96,7 ± 2,8	91,2 ± 4,5

Na základě výsledků naměřených při použití referenčního materiálu a zvažení časové náročnosti byly vybrány 3 metody pro přípravu vzorků mléka před analýzou pomocí ICP-OES. Mezi vybrané metody patřil mokry rozklad, přidavek činidla Triton X-100 a příprava kyselé disperze. Nejlepší výtěžnost vápníku byla zaznamenána při použití činidla Triton X-100. Nejvyšší výtěžnost draslíku a sodíku byla zaznamenána při mokrém rozkladu. Při analýze hořčíku bylo vždy dosaženo více jak 100 % výtěžnosti, takže pro jeho analýzu jsou vhodné všechny metody. Při analýze fosforu vykazovalo nejvyšší výtěžnost prosté ředění, ale u ostatních analytů nebyly dosaženy dostatečné hodnoty výtěžnosti, tudíž nebyla tato metoda zvolena.

4.2 Analýza vzorků mléka

Minerální prvky se v mléce vyskytují jako anorganické ionty a soli. Chemická forma minerálních prvků je důležitá, protože určuje jejich absorpci ve střevě a jejich biologické využití. Minerální složení mléka není konstantní, protože závisí na fázi laktace, nutričním stavu zvířete a okolních a genetických faktorech. Mléko a mléčné výrobky jsou důležitým zdrojem minerálních látek a v evropských zemích představují 10–20 % denního příjmu potravy [59]. Vybranými metodami úpravy vzorku byly proměřeny vybrané makroprvky a mikroprvky v mléce.

Tabulka 14 Koncentrace prvků v mléce [59]

Makroprvky	Koncentrace prvků v mléce [mg.kg ⁻¹]		
	Kravské	Kozí	Ovčí
Ca	1 070–1 330	1 060–920	1 360–2 000
K	1 440–1 780	1 350–2 350	1 740–1 900
Mg	90–160	100–210	80–190
Na	400–580	340–500	290–310
P	630–1 020	920–1 480	80–1 450

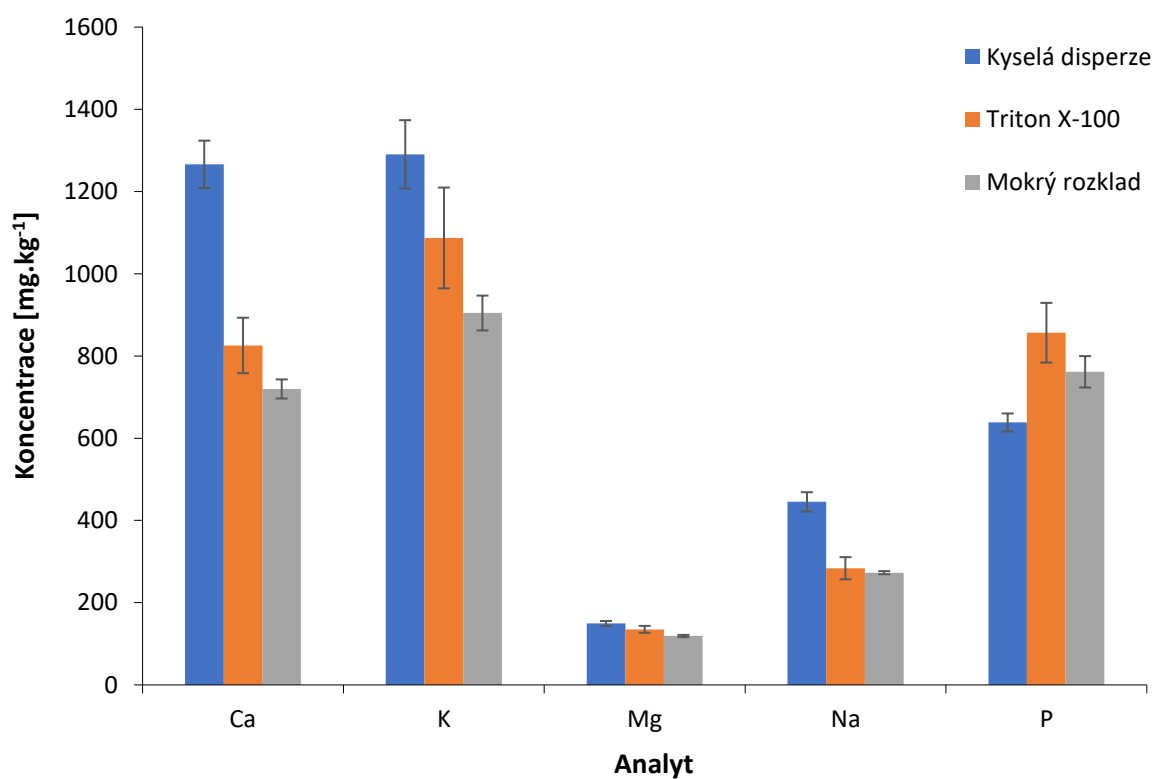
Mikroprvky	Koncentrace prvků v mléce [μg.kg ⁻¹]		
	Kravské	Kozí	Ovčí
Cu	2–30	11	11–88
Fe	30–70	36–75	60–100
Mn	1,3–4,0	5,5	5,3
Zn	242	415	74–145

4.2.1 Kravské mléko

V tabulce 15 je uveden přehled naměřených koncentrací prvků v čerstvém kravském mléce, které bylo upravováno vybranými metodami. Z výsledků je patrné, že pro analýzu byla nejvhodnější úprava pomocí kyselé disperze, protože výsledky odpovídají hodnotám, které jsou udávány v literatuře v tabulce 14. Po úpravě vzorku kyselou disperzí byl obsah vápníku stanoven na $1\,266 \pm 58$ mg.kg⁻¹. Úpravou pomocí přidavku činidla Triton X-100 a mokrého rozkladu byla stanovena mnohem nižší koncentrace vápníku, což je v rozporu s předchozí analýzou CRM, protože při validaci se mokrá rozklad jevil jako nejlepší metoda. Podle literatury (Tab. 14) se obsah vápníku pohybuje v rozmezí 1 070–1 330 mg.kg⁻¹, což splňuje pouze úprava vzorku pomocí kyselé disperze [59]. Obsah draslíku se nepodařilo stanovit v rozmezí podle tabulky 14 ani jednou metodou, nejvíce se však přibližuje hodnota koncentrace $1\,291 \pm 83$ mg.kg⁻¹ při úpravě pomocí kyselé disperze. Optimální množství hořčičku a fosforu bylo stanoveno při úpravě vzorku všemi třemi metodami. Množství sodíku bylo opět dosaženo pouze při úpravě pomocí kyselé disperze. Co se týká koncentrací mikroprvků, tak jejich koncentrace v mléce jsou velmi malé.

Tabulka 15 Přehled koncentrací prvků v kravském mléce

Prvek	Koncentrace [mg.kg ⁻¹]		
	Kyselá disperze	Triton X-100	Mokrý rozklad
Ca	1 266 ± 58	826 ± 67	720 ± 23
K	1 291 ± 83	1 087 ± 123	905 ± 42
Mg	149 ± 6	135 ± 8	119 ± 3
Na	455 ± 23	284 ± 27	273 ± 4
P	638 ± 22	857 ± 73	762 ± 38
Cu	0,73 ± 0,11	0,09 ± 0,89	0,31 ± 0,07
Fe	5,27 ± 1,59	2,01 ± 0,97	1,00 ± 0,41
Mn	0,28 ± 0,04	0,11 ± 0,03	0,16 ± 0,01
Zn	5,97 ± 3,08	1,48 ± 0,79	3,08 ± 0,10



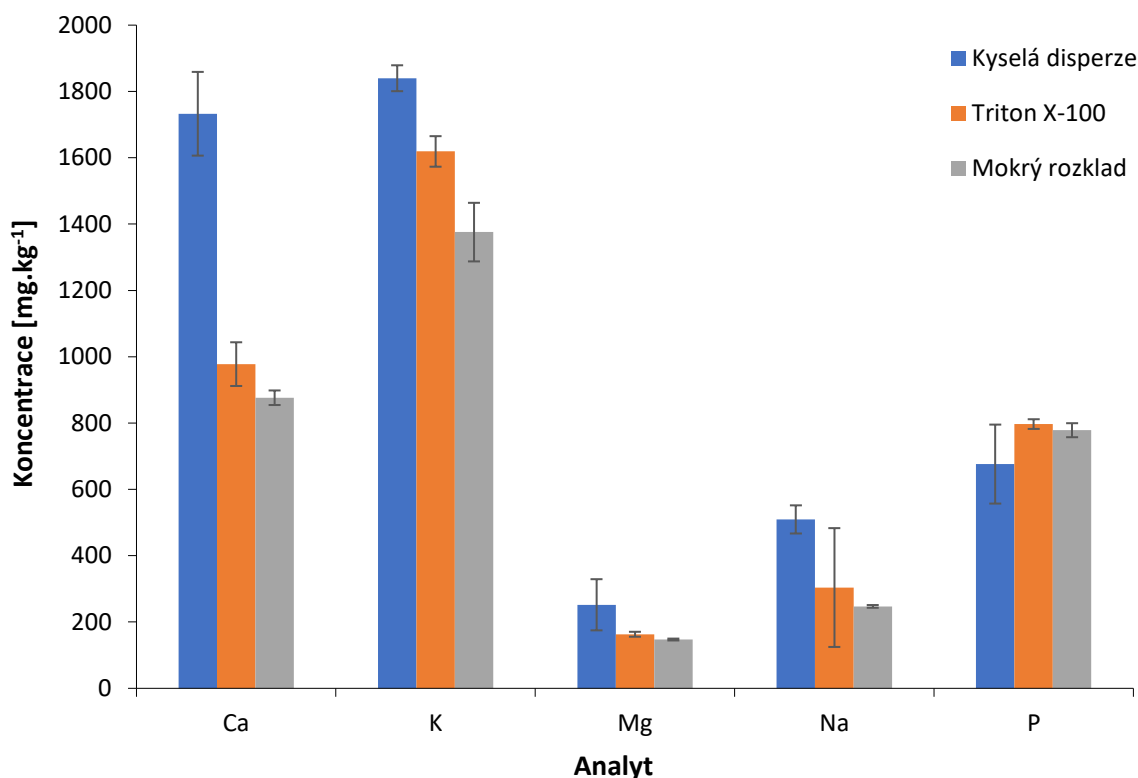
Obrázek 19 Porovnání výsledků makroprvků analýzy kravského mléka

4.2.2 Kozí mléko

Z výsledků měření (Tab. 16) a porovnání s literaturou je patrné, že pro analýzu kozího mléka byla nejlepší metoda pomocí kyselé disperze (Obr. 20). Při analýze vápníku bylo dosaženo optimálních hodnot pouze u kyselé disperze, kde byla koncentrace stanovena na $1\,733 \pm 126 \text{ mg.kg}^{-1}$. Při analýze draslíku a hořčíku bylo dosaženo optimálních hodnot při všech úpravách vzorku ve srovnání s literaturou [59]. Analýza sodíku vykazuje nelepší výsledky při použití kyselé disperze, kde byla jeho koncentrace stanovena na $509 \pm 43 \text{ mg.kg}^{-1}$. Naopak při analýze fosforu byly dosaženy lepší výsledky při použití činidla a při mokřím rozkladu, avšak výsledky se ani u jedné metody nepřiblížily hodnotám uváděných v literatuře. Co se týká analýzy mikroprvků, tak mezi výsledky jednotlivých metod jsou velké rozdíly a některé výsledky jsou zatíženy statisticky významnou chybou. Při analýze mědi za pomoci přidavku činidla se nepodařilo zachytit žádnou koncentraci prvku ve vzorku, neboť se zřejmě nachází pod limitem detekce metody a nešlo znatelně rozlišit analytický signál od šumu pozadí.

Tabulka 16 Přehled koncentrací prvků v kozím mléce

Prvek	Koncentrace [mg.kg^{-1}]		
	Kyselá disperze	Triton X-100	Mokrý rozklad
Ca	$1\,733 \pm 126$	998 ± 66	876 ± 22
K	$1\,840 \pm 39$	$1\,619 \pm 46$	$1\,376 \pm 88$
Mg	252 ± 77	163 ± 7	147 ± 3
Na	509 ± 43	304 ± 179	247 ± 4
P	$676,22 \pm 33$	797 ± 15	778 ± 21
Cu	$1,41 \pm 0,56$	–	$0,29 \pm 0,16$
Fe	$2,66 \pm 0,46$	$1,53 \pm 0,19$	$0,28 \pm 0,04$
Mn	$0,54 \pm 0,26$	$0,09 \pm 0,000\,9$	$0,15 \pm 0,03$
Zn	$3,65 \pm 0,56$	$0,22 \pm 0,29$	$1,91 \pm 0,26$



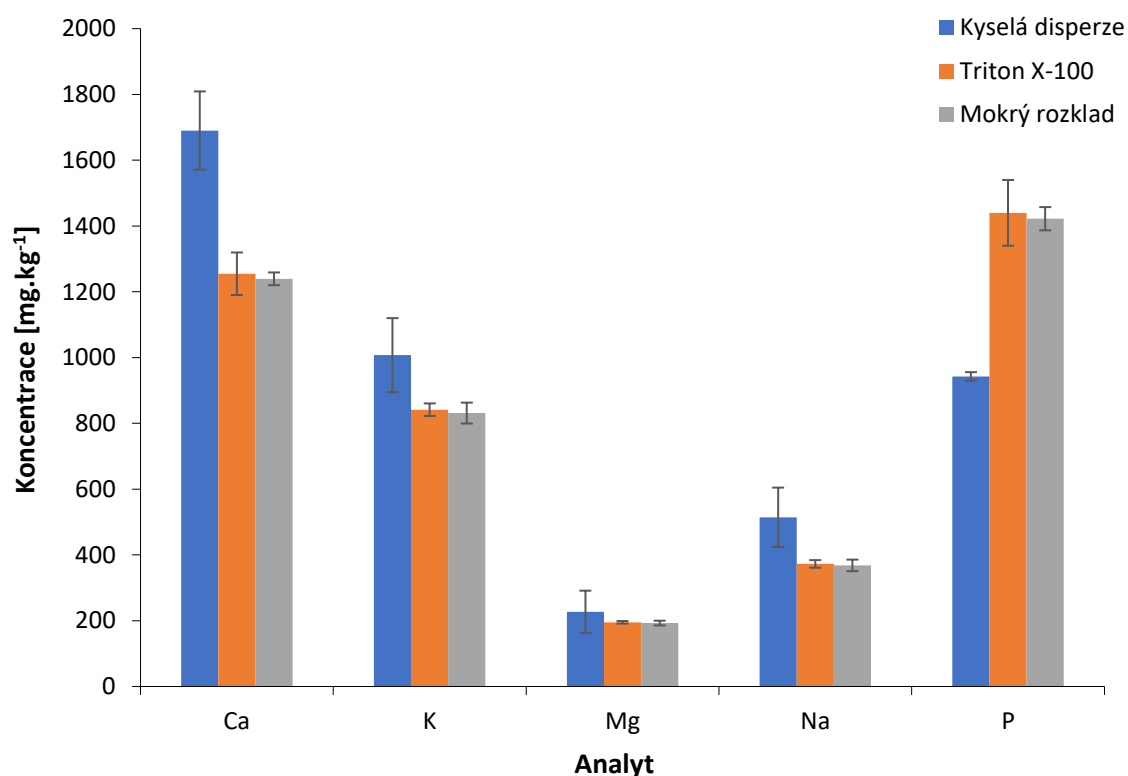
Obrázek 20 Porovnání výsledků analýzy makroprvků koziho mléka

4.2.3 Ovčí mléko

V tabulce 17 se nachází přehled koncentrací prvků v ovčím mléce. Z výsledků je patrné, že za nejlepší metodu úpravy vzorku lze považovat kyselou disperze, kdy koncentrace vápníku, draslíku, hořčíku a sodíku vykazuje neoptimálnější hodnoty ve srovnání s hodnotami v tabulce 14. Avšak koncentrace draslíku nedosahuje ani v jednom případě úpravy vzorku na hodnoty udávané v literatuře [59]. Naopak koncentrace fosforu je výrazně vyšší při úpravě pomocí činidla a mokrého rozkladu. Naměřené koncentrace makroprvků při úpravě vzorku pomocí mokrého rozkladu a přidavku činidla jsou velmi podobné a na základě rozptylu měření je patrná přesnost měření (Obr. 21). Koncentrace mikroprvků byly naměřeny v nízkých hodnotách, což bylo opět ovlivněno úpravou a naředěním vzorku.

Tabulka 17 Přehled koncentrací prvků v ovčím mléce

Prvek	Koncentrace [mg.kg ⁻¹]		
	Kyselá disperze	Triton X-100	Mokrý rozklad
Ca	1 680 ± 119	1 255 ± 65	1 239 ± 19
K	1 007 ± 113	842 ± 19	831 ± 32
Mg	2267 ± 65	195 ± 4	193 ± 7
Na	515 ± 90	373 ± 12	368 ± 18
P	943 ± 13	1 440 ± 100	1 422 ± 35
Cu	0,57 ± 0,16	0,047 ± 0,03	0,46 ± 0,27
Fe	1,46 ± 0,45	1,59 ± 0,09	0,56 ± 0,23
Mn	0,30 ± 0,19	0,11 ± 0,03	0,17 ± 0,03
Zn	7,98 ± 1,33	5,07 ± 0,83	7,44 ± 0,32



Obrázek 21 Porovnání výsledků analýzy makroprvků ovčího mléka

4.3 Porovnání jednotlivých druhů mléka

V tabulce 18 jsou porovnány koncentrace prvků v kravském, kozím a ovčím mléce upraveném pomocí kyselé disperze. Koncentrace prvků získané pomocí této metody vykazovaly nejlepší výsledky u všech druhů mléka. Nejvyšší koncentrace vápníku, draslíku, hořčíku, mědi a manganu obsahuje mléko kozí. Nejvyšší koncentraci sodíku, fosforu a zinku obsahuje mléko ovčí a nejvyšší koncentraci železa obsahuje mléko kravské.

Tabulka 18 Srovnání koncentrací prvků v různých druzích mléka

Prvek	Koncentrace [mg.kg ⁻¹]		
	Kravské	Kozí	Ovčí
Ca	1 266 ± 58	1 733 ± 126	1 680 ± 119
K	1 291 ± 83	1 840 ± 39	1 007 ± 113
Mg	149 ± 6	252 ± 77	227 ± 65
Na	455 ± 23	509 ± 43	515 ± 90
P	638 ± 22	676 ± 33	943 ± 13
Cu	0,73 ± 0,11	1,41 ± 0,56	0,57 ± 0,16
Fe	5,27 ± 1,59	2,66 ± 0,46	1,46 ± 0,45
Mn	0,28 ± 0,04	0,54 ± 0,26	0,30 ± 0,19
Zn	5,97 ± 3,08	3,65 ± 0,56	7,98 ± 1,33

Nejvíce konzumovaným mlékem je mléko kravské, avšak z nutričního hlediska se jeví jako nejvhodnější mléko kozí, protože podle výsledků obsahuje mnohem vyšší koncentrace jak makroprvků, tak mikroprvků. Následuje mléko ovčí, které podle výsledku obsahuje významné množství fosforu a zinku. V kravském mléce je obsaženo nejméně prvků, ale za to obsahuje významné množství železa.

5 ZÁVĚR

V této práci bylo diskutováno prvkové složení různých druhů mléka. Mléko obsahuje velké množství esenciálních prvků, které je nutné přijímat v potravě. Při nedostatku těchto látek mohou nastávat problémy v lidském organismu. Je tedy nezbytné nezanevřít na konzumaci mléka i v dospělém věku, ačkoliv je mléko určeno primárně ke krmení mláďat savců. Cílem práce byla analýza mléka od prvovýrobce.

Cílem experimentální části této práce bylo provést validaci metody pro analýzu mléka a následně analyzovat kravské, kozí a ovčí mléko a porovnat tato mléka mezi sebou z hlediska obsahu prvků. Pro validaci bylo zvoleno sušené odstředěné mléko ERM[®]-BD150, které bylo upravováno pomocí disperze, mineralizací a přidavkem činidel. Z disperzí byla použita kyselá disperze a prosté ředění, přičemž lepší výtěžnosti většiny prvků vykazovala kyselá disperze. Z mineralizačních metod byl použit mokrý, suchý a mikrovlnný rozklad a u většiny prvků byla stanovena velmi podobná výtěžnost u všech tří metod. Avšak z hlediska časové náročnosti procesu přípravy vzorku byl pro analýzu mléka zvolen mokrý rozklad. Při analýze vzorků po přidání činidel TMAH a Triton X-100 byly výtěžnosti většiny prvků vcelku srovnatelné, avšak při analýze vápníku byly výsledky jednoznačně nejlepší po přidání činidla Triton X-100 a to ze všech použitých metod. Pro další analýzu byl tedy zvolen Triton X-100 a to i díky časové nenáročnosti přípravy vzorku. Výsledky validace jsou shrnuty v tabulce 13.

Pro úpravu reálného vzorku mléka byly tedy zvoleny metody úpravy vzorku pomocí kyselé disperze, mokrého rozkladu a přidavku činidla Triton X-100. Největší podíl prvků byl většinou naměřen v mléce po úpravě pomocí kyselé disperze a na základě výsledků této metody byly srovnány všechny tři druhy mléka. Po srovnání všech druhů mléka v tabulce 18 je patrné, že nejvíce biogenních prvků je obsaženo v mléce kozím, avšak v porovnání s literaturou by mělo nejvíce prvků obsahovat mléko ovčí. To může být ovlivněno tím, že každý druh mléka byl odebrán od jiného prvovýrobce, takže zvířata měla odlišný způsob života např. potravu, ustájení, podnebí a hygienu. Velkou roli mohlo hrát také stáří nebo stádium laktace, protože konkrétně ovce byla při odebírání vzorku v konečném stádiu laktace.

Výsledky této práce ukázaly, že prvková analýza mléka pomocí ICP-OES není jednoduchou disciplínou a při analýze se může vyskytnout celá řada problémů. Pro zdokonalení výsledků a ověření by bylo potřeba provést další optimalizaci metody a konkrétně u analýzy mikroprvků by bylo vhodnější použít citlivější instrumentální techniku.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Mléčná užitkovost. *Zootechnika* [online]. 2009 [cit. 2020-06-25]. Dostupné z: <https://www.zootechnika.cz/clanky/zaklady-chovatelstvi/obecna-zootechnika/zootechnika/mlecna-uzitkovost-hz.html>
- [2] TOMS, Vojtěch. *Zpracování mléka na farmě* [online]. [cit. 2020-06-25]. Dostupné z: http://www.smacr.cz/data/public/seminare/vzdelavaci_material_Toms.pdf
- [3] NAVRÁTILOVÁ, Pavlína, Michaela KRÁLOVÁ, Bohumíra JANŠTOVÁ, Hana PŘIDALOVÁ, Šárka CUPÁKOVÁ a Lenka VORLOVÁ. *Hygiena produkce mléka*. 1. 2012. ISBN ISBN 978-80-7305-625-4.
- [4] Mléko. *Bezpečnost potravin* [online]. 2013 [cit. 2020-01-25]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76818.aspx>
- [5] VACOVÁ, T.: *Mlieko a mliečné prípravky vo výžive*. 1. vydání, Bratislava: Alfa, vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatury, 1986. ISBN 63-033-86.
- [6] Anatomie mléčné žlázy. *Zootechnika* [online]. 2016 [cit. 2020-05-19]. Dostupné z: <https://www.agropress.cz/mlecna-zlaza-anatomie/>
- [7] Mléčná žláza. *Zootechnika* [online]. 2013 [cit. 2020-07-19]. Dostupné z: <https://www.zootechnika.cz/clanky/zaklady-chovatelstvi/obecna-zootechnika/zootechnika/mlecna-zlaza.html>
- [8] BYLUND, Gösta. *Dairy processing handbook* [online]. Švédsko: Tetra Pak Processing Systems AB [cit. 2020-04-20]. Dostupné z: https://diaspereira.weebly.com/uploads/5/6/3/9/5639534/dairy_handbook.pdf
- [9] JANŠTOVÁ, Bohumíra, Lenka VORLOVÁ, Pavlína NAVRÁTILOVÁ, Michaela KRÁLOVÁ, Lenka NECIDOVÁ a Eva MAŘICOVÁ. *Technologie mléka a mléčných výrobků* [online]. 1. Brno, 2012 [cit. 2019-12-18]. ISBN ISBN 978-80-7305-637-7. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/Janstova-skripta-web.pdf>
- [10] *Mléko a mléčné výrobky - kravín* [online]. 2014 [cit. 2019-12-15]. Dostupné z: <https://www.televizeznam.cz/video/jidlo-s-r-o/mleko-a-mlecne-vyroby-1-kravin-235972>
- [11] Druhy dojení. *Agropress* [online]. 2017 [cit. 2020-07-26]. Dostupné z: <https://www.agropress.cz/dojeni-na-stani-a-v-dojirne/>
- [12] KOPÁČEK, Jiří. *Jak poznáme kvalitu? Mléko a mléčné výrobky* [online]. 2014, 2-7 [cit. 2020-06-25]. Dostupné z: https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/publikace/2014_SCS_Mleko_web.pdf
- [13] *Mléko a mléčné výrobky - zpracování v mlékárně* [online]. 2014 [cit. 2019-12-15]. Dostupné z: <https://www.televizeznam.cz/video/jidlo-s-r-o/mleko-a-mlecne-vyroby-2-zpracovani-v-mlekarne-235987>
- [14] *Odstředivky v mlékárenském průmyslu* [online]. 2015 [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: https://www.spxflow.com/assets/pdf/SS_Separation_Dairy_101_03_04_2015_CZ.pdf
- [15] *Základní ošetření v mlékárně* [online]. Praha [cit. 2020-07-19]. Dostupné z: <http://umtk.vscht.cz/ESO/EM/4/42.htm>

- [16] ČERNÁ, M. a kol.: *Nutriční hodnota mléka a mléčných výrobků*. 1. vydání, Praha: Středisko technických informací potravinářského průmyslu v Praze 2, 1979. ISBN 641.1:637.1/3.
- [17] *Mléko - diagram* [online]. [cit. 2019-12-5]. Dostupné z: <https://coggle.it/diagram/WkInCUihWQABfKt/t/ml%C3%A9ko>
- [18] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin I*. 3. Tábor: Osis, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [19] PEŠEK, SAMKOVÁ. *Senzorické vlastnosti mléka* [online]. [cit. 2020-06-25]. Dostupné z: http://www.agris.cz/Content/files/main_files/74/152785/13_02.pdf
- [20] KOPŘIVA, Vladimír. *Mléko a mlezivo – hlavní rozdíly a nutriční význam mléka ve výživě* [online]. 2011 [cit. 2020-06-25]. Dostupné z: https://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/VY_04_07.pdf
- [21] *U. S. Department Of Agriculture: FoodData Central* [online]. 2020 [cit. 2020-05-27]. Dostupné z: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/781084/nutrients>
- [22] Vláda ČR. Vyhláška o označování výživové hodnoty potravin č. 450/2004 Sb. Sbíрка zákonů. 1. 10. 2009. [online]. [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2009-330/zneni-20091001>
- [23] LAVRÍKOVÁ, Petra, Josef FONTANA a Jan TRNKA. *Funkce buněk a lidského těla: Vitaminy a výživa* [online]. [cit. 2020-04-27]. Dostupné z: <http://fbt.cz/skripta/ix-travici-soustava/7-vitaminy-a-vyziva/>
- [24] ŠPINLEROVÁ, Monika. Vitaminy rozpustné v tucích. *Masarykova Univerzita* [online]. 2015 [cit. 2020-04-27]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1411/podzim2015/BKUV011/Vitaminy_rozpustne_v_tucich_prezentace.pdf
- [25] HOLUBOVÁ, Ivana. *Vitaminy* [online]. 2013 [cit. 2020-07-27]. Dostupné z: <https://slideplayer.cz/slide/2894936/>
- [26] ROHLÍČKOVÁ, Vladěna. *MUNI: Vitaminy rozpustné ve vodě* [online]. 2015 [cit. 2020-04-15]. Dostupné z: ŠPINLEROVÁ, Monika. Vitaminy rozpustné v tucích. *Masarykova Univerzita* [online]. 2015 [cit. 2020-07-27]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1411/podzim2015/BKUV011/Vitaminy_rozpustne_v_tucich_prezentace.pdf
- [27] KUNOVÁ, Václava. *Vápník* [online]. 2017 [cit. 2020-07-19]. Dostupné z: <https://www.vyzivaspol.cz/vapnik-kalcium-calcium/>
- [28] Nutriční význam mléka. *Celostní medicína* [online]. 2017 [cit. 2020-05-26]. Dostupné z: <https://www.celostnimedicina.cz/nutricni-vyznam-mleka.htm>
- [29] TUREK, Bohumil. *Zdraví a zdravotnictví: Mléko ve výživě člověka* [online]. 2003 [cit. 2020-05-26]. Dostupné z: <http://www.zdrav.cz/modules.php?op=modload&name=News&file=article&sid=4072>
- [30] KOPÁČEK, Jiří. *Bezpečnost potravin: Význam mléka ve výživě* [online]. 2009 [cit. 2020-05-27]. Dostupné z: https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/File/Kvasnickova/Kopacek_vyziva.pdf
- [31] VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin II*. 2. vydání, Tábor, Osis. 2002. ISBN: 80-86659-01-1.

- [32] NAEEM KHAN, JI YEON CHOI, EUN YEONG NHO, IN MIN HWANG, GIRUM HABTE, MURAD ALI KHAN, KYUNG SU PARK a KYONG SU KIM. *Determination of Mineral Elements in Milk Products by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry. Analytical Letters* [online]. 2014, 47(1), 1606-1613 [cit. 2020-06-27]. DOI: 10.1080/00032719.2013.878842. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00032719.2013.878842?scroll=top&needAccess=true>
- [33] CAVA-MONTESINOS, Patricia, M. Luisa CERVERA, Augustín PASTOR a Miguel DE LA GUARDIA. Room temperature acid sonication ICP-MS multielemental analysis of milk. *Analytica Chimica Acta*. 2004, 111-123. DOI: 10.1016/j.aca.2004.09.093.
- [34] S. RIBERIO, Anderson, Aloisia L. MORETTO, Marco A. Z. ARRUDA a Solagne CADORE. Analysis of Powdered Coffee and Milk by ICP OES after Sample Treatment with Tetramethylammonium Hydroxide. *Microchimica Acta*. 2003, 141, 149-155. DOI: 10.1007/s00604-002-0935-3.
- [35] MADER, Pavel a Eva ČURDOVÁ. Metody rozkladu biologických materiálu pro stanovení stopových prvků. *Chemické listy* [online]. 1997, 1997, 91, 227-236 [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/1997_04_227-236.pdf
- [36] VELEMÍNSKÝ, Miloš. *Kojenecká výživa* [online]. 2015 [cit. 2020-06-15]. Dostupné z: <http://www.veleminsky.cz/clanky/kojenecka-vyziva/27>
- [37] Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online]. 2003, 14(2) [cit. 2020-07-20]. ISSN 1678-4790. Dostupné z: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532003000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=en
- [38] Triton X-100. In: *Sigmaaldrich* [online]. 2020 [cit. 2020-07-27]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/x100?lang=en&ion=CZ>
- [39] MURCIA, M. A., A. VERA, M. MARTÍNEZ-TOMÉ a A. MUNOZ. Fast Determination of the Ca, Mg, K, Na and Zn Contents in Milk and Nondairy Imitation Milk Using ICP-AES without Mineralization Stage. *Academic Press*. 1999, 32(3), 175-179. DOI: 0023-6438/99/0300175.
- [40] JOHNSON, Mary. Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More. *Materials and Methods* [online]. 2013, 2013, 163(3) [cit. 2020-06-5]. DOI: <dx.doi.org/10.13070/mm.en.3.163>. Dostupné z: <https://www.labome.com/method/Detergents-Triton-X-100-Tween-20-and-More.html>
- [41] CHUN-CHI, Lin, Yang CHEN-CHANG, Ger JIIN, Deng JIU-FANG a Hung DONG-ZONG. Tetramethylammonium hydroxide poisoning. *Clinical Toxicology* [online]. 2010, 2020, 48(3), 213-217 [cit. 2020-06-06]. DOI: 10.3109/15563651003627777. ISSN 1556-9519. Dostupné z: http://www.smfl.rit.edu/pdf/safety/TMAH_%20poisoning.pdf
- [42] Tetramethylammonium hydroxide solution. In: *Sigmaaldrich* [online]. 2020 [cit. 2020-07-27]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/331635?lang=en&ion=CZ>
- [43] NĚMCOVÁ, Irena, Petr RYCHLOVSKÝ a Ludmila ČERMÁKOVÁ. *Spektrometrické analytické metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1997-1998, 2 sv. ISBN 80-718-4365-2

- [44] KOMÍNKOVÁ, Jana a Oto MESTEK. Atomová absorpční spektrometrie. *VŠCHT Praha* [online]. 1997 [cit. 2020-05-13]. Dostupné z: <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/AAS.pdf?redirected>
- [45] KLOUDA, P.: *Moderní analytické metody*. 3. vydání, Ostrava, Pavel Klouda – nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.
- [46] KOMÍNKOVÁ, Jana a Oto MESTEK. Atomová absorpční spektrometrie. *VŠCHT Praha* [online]. 1997 [cit. 2020-05-13]. Dostupné z: <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/AAS.pdf?redirected>
- [47] Atomová spektrometrie. *Univerzita Pardubice* [online]. [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/instrumentalni-met-anal/atomova-spektrometrie.pdf>
- [48] Optická emisní spektrometrie. *Univerzita Pardubice* [online]. [cit. 2020-06-27]. Dostupné z: <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/instrumentalni-met-anal/opticka-emisni-spektrometrie.pdf>
- [49] Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. *Masarykova Univerzita* [online]. [cit. 2020-06-15]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1431/jaro2005/C6300/ICP4.pdf?lang=en>
- [50] HOU, Xiandeng a Bradley T. JONES. *Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry* [online]. 2000 [cit. 2020-06-15]. Dostupné z: http://www.unil.ch/idyst/files/live/sites/idyst/files/shared/Labos/Hou%26Jones_2000.pdf
- [51] Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. *Masarykova Univerzita* [online]. [cit. 2020-06-15]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1431/jaro2005/C6300/ICP4.pdf?lang=en>
- [52] KANICKÝ, Viktor. Zavádění vzorku do výboje ICP. *Masarykova Univerzita* [online]. 2009 [cit. 2020-07-07]. Dostupné z: <https://citace.lib.vutbr.cz/dokument/3GEfkAyVon6Q6wkp>
- [53] GOITOM, Daniel. *Fundamental Studies on Direct Injection Nebulisers for Sample Introduction in ICP Spectrometry* [online]. 1. Kanada, 2006 [cit. 2020-07-15]. ISBN 91-7264-012-X. Dostupné z: <https://citace.lib.vutbr.cz/dokument/uG5pb5zfR8rWLTb6>
- [54] BEAUCHEMIN, Diane. *Environmental analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry* [online]. 2009, (29), 560-592 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1002/mas.20257. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/mas.20257>
- [55] Atomová emisní spektroskopie s indukčně vázanou plazmou AES-ICP. *Univerzita J. E. Purkyně* [online]. [cit. 2020-07-08]. Dostupné z: https://chemistry.ujep.cz/userfiles/files/IM_P%c5%9805_AES-ICP_z.pdf
- [56] Co je to plazma? *Ústav fyziky atmosféry* [online]. [cit. 2020-07-12]. Dostupné z: <http://www.ufa.cas.cz/html/climaero/topics/iono/definice.html>

- [57] *Český lékopis* [online]. 1. Praha: Grada Publishing, 2017 [cit. 2020-07-27]. ISBN 978-80-271-0500-7. Dostupné z:
<https://books.google.cz/books?id=in1iDwAAQBAJ&pg=PA167&lpg=PA167&dq=spektr%C3%A1ln%C3%AD+interference&source=bl&ots=H8SQQIwDNH&sig=ACfU3U3IShm8bA1Xe7K1VYduROrdSTRHCg&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwiB36uVzcDqAhXdZxUIHbEwDHoQ6AEwCHoECAoQAQ#v=onepage&q=spektr%C3%A1ln%C3%AD%20interference&f=false>
- [58] HORIBA, Scientific. *ULTIMA 2: The Ultimate in ICP-OES* [online]. [cit. 2020-07-15]. Dostupné z: <https://pdf.directindustry.com/pdf/horiba-scientific/ultima-2/25366-401301.html>
- [59] ZAMBERLIN, Šimun, Neven ANTUNAC, Jasmina HAVRANEK a Dubravka SAMARŽIJA. Mineral elements in milk and dairy products. *Mljekarstvo* [online]. Chorvatsko, 2012, 62(2), 111-125 [cit. 2020-07-24]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/0000/4288a2daf6c882b1ecc3b6a6fbf35fd94a60.pdf>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS	Atomová absorpční spektrometrie (<i>Atomic Absorption Spectroscopy</i>)
ACP	Protein přenášející acyly (<i>Acyl carrier protein</i>)
AES	Atomová emisní spektrometrie (<i>Atomic Emission Spectroscopy</i>)
AFS	Atomová fluorescenční spektrometrie (<i>Atomic Fluorescence Spectroscopy</i>)
ATP	Adenosintrifosfát
CRM	Certifikovaný referenční materiál
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
HDD	Vysoká dynamická detekce (<i>High dynamic detection</i>)
ICP	Indukčně vázané plazma (<i>Inductively coupled plasma</i>)
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>)
NAD	Nikotinamid adenin dinukleotid
NADP	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
OES	Optická emisní spektrometrie (<i>Optical Emission Spectroscopy</i>)
PMT	Fotonásobič (<i>Photomultiplier</i>)
TMAH	Tetramethylammonium hydroxid
UHT	Ultra vysoká teplota (<i>Ultra-high temperature</i>)
UV	Ultrafialové záření (<i>Ultraviolet Light</i>)