

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra biologických a biochemických věd

Extraktivní stripping voltametrie na  
pastové elektrodě z práškového skelného  
uhlíku pro analýzu kravského mléka a  
smetany

Bakalářská práce

**AUTOR PRÁCE:** Renata Faltová

**VEDOUCÍ PRÁCE:** prof. Ing. Ivan Švancara, Dr.

2021

University of Pardubice  
Fakulty of chemical technology  
Department of Biological and Biochemical Sciences

Extractive stripping voltammetry at a  
glassy carbon paste electrode for analysis  
of cow's milk and milk cream

Bachelor work

**AUTHOR:** Renata Faltová

**SUPERVISOR:** prof. Ing. Ivan Švancara, Dr.

2021

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Renata Faltová**  
Osobní číslo: **C17156**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Extraktivní stripping voltametrie na pastové elektrodě z práškového skelného uhlíku pro analýzu kravského mléka a smetany**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

1. Z dostupné literatury vypracujte rešerši zaměřenou na obsah lipofilních vitamínů v kravském mléce a smetaně, včetně jejich významu z pohledu nutričních hodnot. V teoretické části dále popište dosavadní referenční analytické metody a jednotlivé kroky přípravy vzorků k analýze nevyjímaje.
2. V úvodu praktické části se pokuste vysvětlit podstatu extraktivní stripping voltametrie na pastových uhlíkových elektrodách. Optimalizujte příslušné experimentální podmínky a poté proveďte analýzu vybraných reálných vzorků. Na základě výsledků z provedených experimentů diskutujte použitelnost extraktivní stripping voltametrie v analýze mléka a smetany.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. Ivan Švancara, Dr.**  
Katedra analytické chemie  
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Milan Sýs, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie  
Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlašuji:

Práci s názvem Extraktivní stripping voltametrie na pastové elektrodě z práškového skelného uhlíku pro analýzu kravského mléka a smetany jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 29. 6 2021

Renata Faltová

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu této bakalářské práce prof. Ing. Ivanu Švancarovi, Dr. a konzultantovi Ing. Milanu Sýsovi, Ph.D. za poskytnutí odborných rad v rámci pravidelných konzultací. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, svým kamarádům a všem ostatním, kteří mě během mého studia podporovali.

Děkuji Vám!

## **NÁZEV**

Extraktivní stripping voltametrie na pastové elektrodě z práškového skelného uhlíku pro analýzu kravského mléka a smetany.

## **ANOTACE**

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda obsažené lipofilní vitamíny mohou posloužit jako biomarkery obsahu mléčného tuku v kravském mléce a smetaně. Pro tento účel byla extraktivní stripping voltametrie (ExSV) na uhlíkové pastové elektrodě vybrána jako vhodná elektrochemická metoda. Za vhodný biomarker byl vybrán *all-trans*-retinol, jenž byl identifikován ve vybraných vzorcích mléka a smetany. Navrženou ExSV lze použít pouze při hodnocení kvality mléka, kdy rozdíly hodnot proudových odezev pro jednotlivé obsahy mléčného tuku (0,5 %, 1,5 % a 3,5 %) byly statisticky významné.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Extraktivní voltametrie, uhlíková pastová elektroda, lipofilní vitamíny, kravské mléko, smetana.

## **TITTLE**

Extractive stripping voltammetry at a glassy carbon paste electrode for analysis of cow's milk and milk cream

## **ANNOTATION**

The aim of this bachelor's thesis was to find out whether the lipophilic vitamins contained can serve as biomarkers of milk fat content in samples of cow's milk and cream. For this purpose, an extractive stripping voltammetry (ExSV) at a carbon paste electrode was chosen as a suitable electrochemical method. *All-trans*-retinol, that was identified in selected milk and cream samples, was selected as a suitable biomarker. The proposed ExSV can be used only in the evaluation of milk quality, when the differences in the values of current responses for individual milk fat contents (0.5%, 1.5% and 3.5%) were statistically significant.

## **KEYWORDS**

Extractive voltammetry, carbon paste electrode, lipophilic vitamins, cow's milk, cream.

# Obsah

Seznam ilustrací a tabulek .....	10
Seznam použitých zkratk .....	11
Úvod.....	13
TEORETICKÁ ČÁST .....	14
1 Mléko.....	14
1.1 Kravské mléko .....	14
1.1.1 Fyzikálně chemické vlastnosti .....	15
1.1.1.1 Viskozita.....	15
1.1.1.2 Bod mrazu .....	15
1.1.1.3 Kyselost mléka .....	15
1.1.1.4 Optické vlastnosti .....	16
1.1.2 Složení kravského mléka .....	16
1.1.2.1 Mléčný tuk.....	16
1.1.2.2 Vitamíny .....	17
1.1.2.3 Minerální látky v mléce.....	19
2 Analýza mléčného tuku .....	21
2.1 Folchova metoda .....	21
2.2 Butyrometrická metoda.....	21
2.3 Metoda Röse-Gottlieba .....	22
2.4 Plynová chromatografie .....	22
2.4.1 Izolace mléčného tuku .....	23
2.4.2 Derivatizace pro plynovou chromatografii mléčného tuku .....	23
2.4.3 Instrumentace pro plynovou chromatografii mléčného tuku.....	24
2.5 Analýza mléčného tuku kapalinovou chromatografií .....	24
2.5.1 Extrakce mléčného tuku pro kapalinovou chromatografii.....	24
2.5.2 Derivatizace pro kapalinovou chromatografii mléčného tuku.....	25
2.5.3 Instrumentace pro kapalinovou chromatografii mléčného tuku .....	25
2.6 Stanovení obsahu lipofilních vitamínů v mléce .....	26
3 Elektrochemické metody v analýze mléka .....	28
3.1 Polarografie v analýze mléka .....	28



3.2	Voltametrická analýza mléka .....	29
3.2.1	Adsorptivní voltametrie .....	31
3.2.2	Extraktivní voltametrie .....	31
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....		33
4	Extraktivní voltametrie kravského mléka a smetany.....	33
4.1	Chemikálie a reagenty .....	33
4.2	Přístrojové vybavení.....	33
4.3	Příprava uhlíkové pastové elektrody ze skelného uhlíku (GCPE).....	33
4.4	Pracovní podmínky extraktivní stripping voltametrie (ExSV) .....	34
4.5	Statistická analýza.....	34
5	Výsledky a diskuse .....	35
5.1	Výběr pastovací kapaliny .....	35
5.2	Obsah pastovací kapaliny.....	35
5.3	Doba extrakce.....	36
5.4	Rychlost míchání.....	37
5.5	Složení detekčního média .....	37
5.6	Nastavení elektrochemické detekce .....	38
5.7	Kvalitativní analýza mléka extraktivní stripping voltametrií.....	39
5.8	Analýza vzorků mléka a smetany .....	40
6	Závěr.....	42
7	Reference.....	43

## Seznam ilustrací a tabulek

<b>Tab.1</b> Obsah vitamínů v kravském mléce.....	17
<b>Tab.2</b> Minerální látky v kravském mléce.....	20
<b>Tab.3</b> Porovnání pastových elektrod ze skelného uhlíku.....	35
<b>Tab.4</b> Vliv obsahu silikonového oleje na odezvu 3,5 % kravského mléka.....	36
<b>Obr.1</b> Vliv doby extrakce na výtěžku lipofilních vitamínů kravského mléka s 3,5 % ( <i>m/m</i> ) tuku, data získaná ze SWV na GCPE, která obsahuje 15 % (w/w) silikonového oleje, $E_{\text{step}} = 5$ mV, $E_{\text{ampl}} = 25$ mV a $f = 20$ Hz.....	37
<b>Obr.2</b> SWV voltamogram naextrahovaného kravského mléka 3,5 % tuku při 400 min <sup>-1</sup> po 10 min na GCPE obsahující 15 % ( <i>m/m</i> ) SO s následnou elektrochemickou detekcí v 0,1 mol·l <sup>-1</sup> BRB pH 4,5 při $E_{\text{step}} = 5$ mV, $E_{\text{ampl}} = 25$ mV, a $f = 50$ Hz (přerušovaná). SWV voltamogram extrahovaného all- <i>trans</i> -retinolu při 400 min <sup>-1</sup> po dobu 5 minut z jeho 500 μmol·l <sup>-1</sup> 60 % etanolického roztoku do GCPE obsahující vždy 20 % ( <i>m/m</i> ) SO s následná elektrochemickou detekcí v 0,1 mol·l <sup>-1</sup> BRB pH 4,5 při $E_{\text{step}} = 1$ mV, $E_{\text{ampl}} = 25$ mV a $f = 25$ Hz (plná čára).....	39
<b>Obr.3</b> Voltamogramy lipofilních vitamínů, součet lipofilních vitamínů (převážně all- <i>trans</i> -retinol a β-karoten), které byly extrahovány z kravského mléka 3,5 % tuku na GCPE obsahující 15 % ( <i>m/m</i> ) SO při otáčkách 300 min <sup>-1</sup> po dobu 10 min. Po opláchnutí redestilovanou vodou byla následně provedena voltametrická detekce v 0,1 mol·l <sup>-1</sup> BRB při pH 4,5, $E_{\text{step}} = 5$ mV, $E_{\text{ampl}} = 25$ mV, a $f = 10$ (a), 20 (b), 30 (c), 40 (d), 50 (e), 60 (f) a 100 Hz (g).....	40
<b>Obr.4</b> Závislost odezvy proudu píku (anodická oxidace přítomných lipofilních vitamínů) na obsahu tuku v mléce a smetaně.....	41

## Seznam použitých zkratek

Ag/AgCl	Chloridostříbrná elektroda
AdSV	Adsorptivní stripping voltametrie
Au-RDE	Zlatá-rotační disková elektroda
BRB	Britton-Robinsonův pufr
CLA	Konjugovaná linolová kyselina
CPE	Uhlíková pastová elektroda
CP Sil 88	Kyanopropyl siloxan
DPP	Diferenciální pulzní polarografie
DCP	Diferenciální cyklická polarografie
DME	Kapající rtuťová elektroda
$E_{\text{ampl}}$	Potenciálová amplituda
ED	Elektrochemická detekce
$E_p$	potenciál píku
$E_{\text{step}}$	Potenciálový krok
ExSV	Extraktivní stripping voltametrie
$f$	Frekvence
GC	Plynová chromatografie
GC FID	Plynová chromatografie s plamenovým detektorem
HCl	Kyselina chlorovodíková
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HMDE	Visící rtuťová kapková elektroda
$I_p$	Výška píku
$k$	Citlivost

LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny
MS	Hmotnostní detekce
MWCNTs	Více stěnné uhlíkové nano-trubice
PLE	Extrakce tlakovou kapalinou
PtE	Platinová elektroda
$R$	Ohmický odpor
RI	Index lomu
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SCE	Nasycená kalomelová elektroda
SPCE	Tištěná uhlíková elektroda
SPGE	Sítotisková grafenová elektroda
SO	Silikonový olej
SWV	Square-wave voltametrie
SWAdSV	Square-wave adsorptivní stripping voltametrie
$t$	Doba trvání
TAG	Triacylglycerol
TMAB	Tetraethylamoniumbromid
UHPLC	Ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie
$\mu$	Průměrná hodnota
$\sigma$	Směrodatná odchylka

## Úvod

Kravské mléko je nezbytná složka stravy lidské populace a výchozí surovina pro výrobu potravin, označovaných jako mléčné produkty. U mléka se stanovují především výživové hodnoty, tím je myšleno celkový obsah bílkovin, sacharidů a tuků. V této bakalářské práci je popsán vývoj jednoduché elektroanalytické metody určené pro stanovení celkového množství mléčného tuku, aniž by bylo nutné použít konvekční extrakci organickými rozpouštědly. Cílem této práce bylo snížení množství reagensů a nákladů, které jsou spojeny hlavně s úpravou vzorků mléka a smetany před vlastní analýzou. Vyloučením organických rozpouštědel se uleví životnímu prostředí a je možné zařadit tuto vyvinutou metodu do tzv. „zelené chemie“.

Teoretická část se zaměřuje na fyzikální a chemické vlastnosti kravského mléka a na obsah vitamínů a minerálů. Dále se zde popisují analytické metody pro stanovení a charakterizaci mléčného tuku (obsah a zastoupení mastných kyselin), který se běžně kontroluje v mlékárenském průmyslu a jeho obsah dán zákonnými normami.

V druhé části této bakalářské práce se popisují jednotlivé experimenty použité během vývoje elektroanalytických metod, které spočívaly v extrakci mléčného tuku ze syrového mléka do silikonového oleje použitého v pastové elektrodě ze skelného uhlíku. Důležité kroky vedoucí k optimalizaci navržené elektroanalytické metody jsou detailněji popsány ve výsledcích a diskusi.

V rámci experimentů byl zvolen *all-trans*-retinol za biologický marker obsahu mléčného tuku. Proudové odezvy voltametrické oxidace *all-trans*-retinolu se porovnávaly s deklarovaným obsahem mléčného tuku. Zde bylo zjištěno, že nelze rozeznat mléko s 3,5 % tuku od vzorků smetany. Nicméně navržená voltametrická metoda představuje vhodný analytický nástroj při hodnocení obsahu tuku ve vzorcích mléka. Průměrná doba analýzy nepřekročila 15 minut. Z tohoto důvodu by mohla extraktivní voltametrie posloužit jako rychlá screeningová metoda v hodnocení kvality kravského mléka.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 Mléko

Mléko je jedním z mála potravin konzumovaných bez dalšího zpracování a často se nazývá „dokonalým jídlem“. Je produkováno mléčnou žlázou samic savců, neboť obsahuje klíčové živiny, jako jsou: sacharidy, bílkoviny, tuky, minerály a vitamíny [1,2]. Mléko také obsahuje stopová množství dalších látek, jako jsou pigmenty, enzymy, fosfolipidy a plyny [3]. Obsah sacharidů, bílkovin a tuků v mléce jednoho druhu je vyladěn tak, aby splňoval výživové požadavky konkrétního zvířete [4]. Mléko je emulze s tukovými částicemi neboli globulemi rozptýlenými ve vodném prostředí. Tukové kuličky se nespojují a vytvářejí samostatnou vrstvu, jako je například olej, protože jsou chráněny vrstvou membrány, která udržuje tukové částice oddělené od vodní fáze. Hlavní skupinu mléčných bílkovin představují kaseiny, které se vyskytují jako malé částice nazývané micely [5]. Mléko pochází převážně od krav, dále také ovcí, koz, oslů, koní, buvolů, velbloudů a dalších druhů. Působí také jako rezervoár různorodého společenství mikroorganismů [6]. Zároveň hraje klíčovou roli ve výživě a hydrataci, ale také má zásadní roli při vytváření základní střevní mikroflóry a aktivace imunitního systému u všech novorozenců [2].

### 1.1 Kravské mléko

Kravské mléko je nejvíce studovaným mlékem, jelikož se jedná o nejvíce produkováné a spotřebované mléko na světě [7]. Kravské a mateřské mléko obsahují podobné procento vody, dále relativní množství sacharidů, bílkovin, tuků a vitamínů. Ve skladbě bílkovin a minerálech se ale výrazně liší.

Bílkoviny v mléce lze rozdělit do dvou kategorií na kaseiny a syrovátkové bílkoviny. Mateřské mléko je obsaženo v poměru 40:60, zatímco v kravském mléce je poměr kaseinu k syrovátkovým proteinům 80:20. Vzhledem k tomu, že množství celkových bílkovin v kravském mléce je více než dvojnásobné než u mateřského mléka, obsahuje kravské mléko podstatně více kaseinu než mateřské mléko. Kasein může být obtížně stravitelný. Kojenecká mléka jsou formulována tak, aby obsahovala více syrovátky než kaseinu (poměr syrovátky a kaseinu v těchto mlékách je podobný jako u lidského mléka), a proto se předpokládá, že je pro kojence snadněji stravitelné. Kasein byl spojován s řadou nemocí a alergií, včetně cukrovky 1. typu [8].

### **1.1.1 Fyzikálně chemické vlastnosti**

Fyzikální vlastnosti mléka, do nichž se řadí hustota, viskozita, bod mrazu, rovnováha kyselin a optické vlastnosti, jsou popsány v následujících kapitolách. Tyto vlastnosti bývají často monitorovány, neboť poskytují cenné informace o kvalitě mléka pro další jeho technologické zpracování [9].

#### **1.1.1.1 Viskozita**

Viskozita je definována jako odpor kapaliny proti jejímu proudění. Závisí na teplotě [10]. Nižší teploty zvyšují viskozitu díky zvýšenému objemu kaseinových micel pro teploty vyšší než 65 °C v důsledku denaturace syrovátkových proteinů. Zvýšení nebo snížení pH mléka rovněž způsobuje zvýšení objemové kapacity kaseinových micel. Chlazené syrové mléko a smetana vykazují ne-newtonovské chování, při kterém viskozita závisí na smykové rychlosti. Míchání může způsobit částečnou koalescenci tukových globulí (částečné stloukání), což zvyšuje viskozitu. Tukové kuličky, které prošly studenou aglutinací, mohou být dispergovány v důsledku míchání, která je způsobena snížením viskozity [9].

#### **1.1.1.2 Bod mrazu**

Deprese bodu mrazu (tuhnutí) je koligativní vlastnost, která je určena spíše molaritou rozpuštěných látek než hmotnostním nebo objemovým procentem. V mlékárenském průmyslu se bod tuhnutí mléka používá hlavně ke stanovení přidané vody, ale lze jej také použít ke stanovení obsahu laktózy v mléce dále k odhadu obsahu sušené syrovátky v sušeném odstředěném mléce a ke stanovení vodní aktivity sýrů. Bod tuhnutí mléka je obvykle v rozmezí -0,512 až -0,550 °C s průměrem asi -0,522 °C [9].

#### **1.1.1.3 Kyselost mléka**

Kyselost se obvykle používá k odhadu čerstvosti mléka a ke sledování produkce kyseliny mléčné během fermentace [11]. K měření kyselosti mléka se používá jak titrační kyselost, tak i pH. Mléko při teplotě 25 °C se obvykle pohybuje v relativně úzkém rozmezí 6,5 až 6,7 pH, ale mění se s fází laktace [9,11]. Mlezivo má tendenci pH snižovat a u krav s mastitidou má tendenci se pH zvyšovat [11]. Normální rozmezí pro titrovatelnou kyselost stádového mléka je 13 až 20 mmol·l<sup>-1</sup> a získaná hodnota titrovatelné kyselosti je ovlivněna

rychlostí titrace [9,11]. Vzhledem k velkým inherentním variacím má míra titrované kyselosti malou praktickou hodnotu, kromě měření změn kyselosti (např. během mléčné fermentace). V mléce je mnoho složek, které zajišťují tlumící účinek. Hlavní pufovací skupiny mléka jsou kaseiny a fosfáty [9].

#### **1.1.1.4 Optické vlastnosti**

Optické vlastnosti určují vzhled mléka a mléčných výrobků. Rozptyl světla tukovými kuličkami a kaseinovými micelami způsobuje, že mléko vypadá kalně a neprůhledně. K rozptylu světla dochází, když je vlnová délka světla téměř stejná jako velikost částice. To znamená, že menší částice rozptylují světlo kratších vlnových délek. Odstředěné mléko vypadá mírně modře, protože kaseinové micely rozptylují kratší vlnové délky viditelného světla (modré) více než červené světlo. Karotenoidový prekurzor vitamínu A,  $\beta$ -karoten, obsažený v mléčném tuku, je zodpovědný za „krémovou“ barvu mléka a riboflavin dodává syrovátce zelenkavou barvu. Index lomu (RI) se normálně stanoví při teplotě 20 °C. Index lomu mléka je 1,3440 až 1,3485 a lze jej použít k odhadu celkového obsahu sušiny [9].

#### **1.1.2 Složení kravského mléka**

Složení kravského mléka se může u různých plemen a v různých fázích laktace značně lišit. V prvních několika dnech po narození se vylučuje speciální druh mléka zvaný mlezivo, které je bohaté na tuky a bílkoviny. Mlezivo také obsahuje důležité protilátky proti infekcím, které posilují imunitní systém mladého savce. K přechodu z mleziva na pravé mléko dochází během několika dní po narození. Hlavní složkou je voda. Kravské mléko obsahuje podobné množství vody jako lidské mléko, přibližně 87 %. Voda zředí mléko a umožní jeho vylučování z těla, protože bez vody by bylo nemožné odsát mléko. Hlavním sacharidem v mléce savců je disacharid nazývaný laktóza, ta se ve střevech štěpí pomocí enzymu laktázy na monosacharidy glukózu a galaktózu, kdy glukóza představuje hlavní zdroj energie pro mládě [8].

##### **1.1.2.1 Mléčný tuk**

Mléčný tuk je komplexní kombinace lipidů nazývaných triglyceroly, tedy estery tří mastných kyselin s jednou molekulou glycerolu. V kravském mléce je více než 400 mastných kyselin. Mléko obsahuje nasycené i nenasycené mastné kyseliny. Většina tuků v plnotučném



kravském mléce (přibližně 65 %) je nasyceného typu. Kolem 30 % je mononenasycených a jen 5 % polynenasycených. Polynenasycené tuky zahrnují mastné kyseliny zvané omega-6 a omega-3 mastné kyseliny. Mléko obsahuje omega-6 esenciální mastnou kyselinu linolovou a omega-3 mastnou kyselinu linoleovou, ale pouze v nízkých koncentracích. Tyto kyseliny jsou esenciální [8].

### 1.1.2.2 Vitamíny

Vitamíny jsou organické sloučeniny potřebné v malém množství, které jsou nezbytné pro život a musí být absorbovány z gastrointestinálního traktu. Tyto organické látky se klasifikují na základě své rozpustnosti, a to na vitamíny rozpustné ve vodě a vitamíny rozpustné v tucích [12]. V Tabulce 1 jsou uvedeny průměrné obsahy vitamínů v kravském mléce [13,14].

**Tabulka 1.** Obsah vitamínů v kravském mléce.

Vitamín		Obsah vitamínů (mg.kg <sup>-1</sup> )	Rozpustnost
Označení	Název		
A	Retinoidy a karotenoidy	0,3-1,0	Rozpustné v tucích
D	Kalciferoly	0,001	
E	Tokoferoly	0,2-1,2	
K	Filochinony	0,01-0,03	
B <sub>1</sub>	Thiamine	0,3-0,7	Rozpustné ve vodě
B <sub>2</sub>	Riboflavin	0,2-0,3	
B <sub>6</sub>	Pyridoxin	0,2-2,0	
B <sub>12</sub>	Kobalamin	0,01-0,03	
B <sub>5</sub>	Kyselina Pantothénová	0,4-4,0	
PP	Niacin	0,8-5,0	
C	Kyselina Askorbová	5,0-20	

Z důvodu přirozeně nízkého obsahu vitamínu D v mléce, který je nezbytný pro vstřebatelnost vápníku, se mléko musí uměle obohacovat, tzv. fortifikovat. Dále je nutné zmínit, že během odstředění mléka při výrobě másla (mléčný tuk) dochází k úbytku dalších lipofilních vitamínů, zejména vitamínu A, který se přirozeně vyskytuje jako *all-trans*-retinol nebo jako jeho provitamín beta-karoten. Z tohoto důvodu může mléko obsahovat i syntetické analogy retinolu, jmenovitě retinol acetát a retinol palmitát [15].

Tato fortifikace potravinářských výrobků se praktikuje již více než 80 let a předchází tak avitaminóze vitamínu D, která vede ke křivici. Ke zvýšení obsahu vitamínu D v mléce byly použity různé metody, jako je obohacování krmiva pro zvířata, či přímé přidávání vitamínových koncentrátů, což se ukázalo jako nejspolehlivější a stalo se uznávanou průmyslovou praxí [16].

Dále se vyžaduje přidávání vitamínu A do mléka se sníženým obsahem tuku a bez tuku. Plnotučné mléko obsahuje určitý podíl palmitátu vitamínu A. Hladiny vitamínu A ve sníženém a odtučněném mléce jsou však mnohem nižší, protože palmitát vitamínu A, rozpustný v tucích, se odstraňuje společně s tukem. Mléčné výrobky byly jedním z přístupů k vyřešení nedostatku vitamínu A. Proto by měl být vitamín A přidáván do mléčných výrobků, z nichž byl odstraněn tuk během odstředování tuku [16], kdy získaná smetana se dále zpracovává pro výrobu másla, šlehačky, atd. Jelikož se jedná o vitamíny rozpustné v tucích, nabízí se myšlenka, využít jejich obsah jako vhodný biologický marker obsahu mléčného tuku, což bylo taktéž cílem experimentální části této bakalářské práce.

**Vitamín A** má důležitou roli ve správném vývoji zraku, správném růstu, reprodukci a imunitě, buněčné diferenciaci, při zachování zdravých kostí, pokožky a sliznic [17]. Výsledkem nedostatku vitamínu A je slepota, xeroftalmie (progresivní slepota způsobená vysycháním rohovky oka), keratinizace (akumulace keratinu v tkáních trávicího, dýchacího, močového a pohlavního ústrojí) a konečné vyčerpání a následná smrt [16]. Doporučený denní příjem je 700 až 900 µg na den. Mléko je dobrým zdrojem retinoidů a axeroftolů [17]. Palmitát vitamínu A je forma vitamínu A, který se přirozeně vyskytuje ve zvířecích zdrojích a také se synteticky vyrábí. Plnotučné mléko, máslo, sýr a vejce jsou též důležitými zdroji palmitátu vitamínu A [16].

**Vitamín D** je nezbytný pro vstřebávání vápníku a podílí se na procesu mineralizace potřebném pro růst kostí. Nedostatek vitamínu D způsobuje křivici (měknutí kostí) u dětí a osteomalacii u dospělých. Tento vitamín je významným pomocníkem při prevenci rakoviny prostaty, prsu a kolorektálního karcinomu. Mezi hlavní formy vitamínu D odpovědné za přínosy pro lidské

zdraví patří ergokalciferol a cholekalciferol. Jsou to formy neaktivní, dokud nejsou převedeny na biologicky aktivní formu 1,25-dihydroxyvitamín D<sub>3</sub> v játrech nebo ledvinách. Vitamín D je základním vitamínem, který je vyráběn v okamžiku, když je tělo vystaveno slunečnímu záření [16].

**Vitamín E** a jeho vysoký příjem v potravě je spojen se sníženým rizikem rakoviny a ischemické choroby srdeční. Dále může stimulovat T-buňky a zvyšovat imunitní obranný systém. Mléko se jeví jako potravina upřednostňující vstřebávání a transport vitamínu E z požitého jídla do chylomikronů. Doporučený příjem je 15 mg na den. Vitamín E také zahrnuje tokoferoly a tokotrienoly. V plnotučném mléce se nachází alfa-tokoferol, jenž je hlavní formou vitamínu E [17].

**Vitamín K** představuje enzymový kofaktor a musí být molekulárně aktivovaný, aby mohl dále plnit své funkce. Nejprve je redukován na hydrochinon. Dále vitamín K působí jako kofaktor  $\gamma$ -glutamylkarboxyláz enzymů, které provádějí molekulární přeměnu specifických glutamátových zbytků na  $\gamma$ -karboxyglutamáty v některé proteiny během jejich sekrečního procesu. Tímto procesem je umožněna jejich post-translační aktivace. Tyto proteiny se podílí hlavně na hemostázy krve (koagulační faktory) a vitamín K je také přínosný pro zdraví kostí [8,18,19].

**Vitamíny B** musí být molekulárně aktivovány (až na biotin), aby splnily své funkce. Jsou to enzymové kofaktory, které často fungující jako protetické skupiny, nezbytné pro efektivní buněčný metabolismus mastných kyselin, aminokyselin, sacharidů, výroby energie, hemů a syntéz nukleových kyselin. Rizikové faktory nedostatku vitamínu B jsou například střevní poruchy vedoucí k snížené absorpci vitamínů B, Crohnova choroba (vitamín B<sub>3</sub>), perniciózní anémie (vitamín B<sub>12</sub>) a chronický alkoholismus (vitamíny B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>) [18].

**Vitamín C** (kyselina askorbová) má antioxidační vlastnosti a chová se jako enzymový kofaktor. Podílí se na syntéze kolagenu, angiogenezi, přežití buněk, metabolismu glukózy, homeostáza železa a také podporuje snížení oxidované formy  $\alpha$ -tokoferolu. Spolu s vitamínem K jsou v zažívacím traktu biologicky aktivní a nepotřebují se zaktivovat [18].

### 1.1.2.3 Minerální látky v mléce

Minerály, nalezené v kravském mléce zahrnují: sodík, draslík, vápník, hořčík, fosfor, chloridy, zinek, selen, jod a dále ve velmi nízkých koncentracích i železo a stopová množství

mědi a manganu. Obsah minerálů v kravském mléce (viz. Tabulka 2) je velice nízký a pro lidské tělo je velmi složité absorbovat optimální množství potřebné pro zdraví [8,13,14]. Případné interference ze strany minerálních látek při extraktivním voltametrickém stanovení obsažených lipofilních vitamínů by měli být minimální, neboť se jedná o látky hydrofilní, které se neadsorbují na povrch či neextrahují do elektrodového materiálu pracovní elektrody.

**Tabulka 2.** Minerální látky v kravském mléce.

Prvek	Obsah v mléce ( $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	
	Průměrná hodnota	Interval
Ca	1,21	0,90-1,40
P	0,95	0,70-1,20
K	1,50	1,00-2,00
Na	0,47	0,30-0,70
Cl	1,03	0,80-1,40
Mg	0,12	0,05-0,24
S	0,32	0,20-0,40

## 2 Analýza mléčného tuku

Mléčný tuk patří mezi nejsložitější přírodní tuky a proto i jeho stanovení je velmi náročné. Existuje mnoho metod, kterými jej lze stanovit [20]. Mléčný tuk se vyznačuje důležitostí především v nutričních, fyzikálních a chemických vlastnostech, ale také je závislý na produkci mléka. Patří mezi nejvíce proměnlivé složky kravského mléka. Obsah tuku je velmi rozdílný a přibližně se pohybuje mezi 3,5 % až 4,7 %. Výsledky referenčních metod jsou sice nákladné ale mnohonásobně přesnější než výsledky stanovené pomocí běžných metod, které se v minulosti postupem času vyvíjely [21].

Před zahájením analýzy je nezbytné, aby byl stanoven typ tuků. Také se musí zjistit, jaká je nenasycenost mastných kyselin a o jaký typ tuků se jedná. Například: triacylglyceroly (TAG), cholesterol atd. Dále se zjišťují určité vlastnosti mastných kyselin. Mastné kyseliny se dělí na nenasycené a nasycené mastné kyseliny. Mezi nasycené mastné kyseliny se řadí například kyselina máselná, palmitová, stearová, arachová. Naopak kyselina linoleová, linolová, arachidonová patří mezi nenasycené mastné kyseliny. U *trans*-mastných kyselin, konjugované linolové kyseliny (CLA). Následně je pomocí zvoleného typu vybrána metoda analýzy mléčného tuku. První krok analýzy jakéhokoliv druhu lipidů, obsahující mléčný tuk, je jejich separace od zbytku složek. Všechny lipidy lze oddělit selektivní extrakcí [20].

### 2.1 Folchova metoda

Pomocí této metody je možné analyzovat mastné kyseliny. Jedná se o lipidovou extrakci za použití metanolu, chloroformu a vody, čímž je vytvořen dvoufázový systém. Tato směs rozpouštědel má velkou škálu polarit a to umožňuje extrahovat téměř všechny lipidy, které jsou obsaženy ve stanovovaném vzorku mléka. Následně je tuk filtrován a je získán purifikovaný lipidový extrakt v izolované vrstvě chloroformu. Na podobném principu jako Folchova metoda je založena metoda podle Bligha a Dyera [20,21].

### 2.2 Butyrometrická metoda

Mezi referenční a zároveň funkční metodu patří metoda butyrometrická, která je v analytice rutinně využívána dle normy (ČSN 57 0530). Přidáním kyseliny sírové s amylalkoholem do butyrometru jsou tukové kuličky následně rozpuštěny pomocí třepání. V dalším kroku je tuk oddělen pomocí centrifugy a nakonec na stupnici tukoměru se odečte

hodnota tuku. Hodnota výsledného tuku je udávána v hmotnostních procentech. Butyrometrická metoda je vhodná pro stanovení sušeného, syrového, konzumního mléka, smetany a mléčných výrobků jako je například sýr [21,22].

### **2.3 Metoda Röse-Gottlieba**

Röse-Gottliebova metoda se řadí mezi standartní referenční metodu, která již zcela nahradila výše zmíněnou metodu butyrometrickou. Tato metoda je téměř shodná s Mojonnierovou analytickou metodou, kdy se odděluje tuková frakce od zbytku mléka, dle normy ČSN EN ISO 7208. Obě metody patří mezi gravimetrické metody, kde je na konci stanoven tuk. Vzorek mléka se štěpí pomocí amoniaku a dále je smíchán s etanolem. Potom je provedena extrakce s diethyl-petroletherem. Následně se filtruje rozpouštědlo přes síran sodný a potom se odpaří ve vakuu [20,21,23].

### **2.4 Plynová chromatografie**

Plynová chromatografie (GC) společně s plamenovým ionizačním detektorem (CG-FID) lze zařadit mezi nejrozšířenější instrumentální metodu analýzy a separace mléčného tuku [20]. Plynová chromatografie se používá hlavně pro stanovení triacylglycerolu v mléce dle normy ČSN EN ISO 17678. V poslední době se využívá kombinace GC a hmotnostní spektrometrie (MS), kdy hmotnostní spektrometr slouží jako univerzální detekční systém [20].

Analýza mléčného tuku zahrnuje těchto několik kroků: a) extrakce lipidů, b) frakcionace lipidových tříd (tento krok je využíván pouze pro stanovení jedné nebo více frakcí samostatně, pokud se jedná převážně o mastné kyseliny TAG je tento krok vynechán), c) konverze mastných kyselin na methylestery, d) samotné stanovení mastných kyselin plynovou chromatografií.

Teplota kolony se většinou pohybuje na počátku okolo 40 °C a to přibližně okolo 2 minut. Následně je zvyšována teplota o 10 °C za minutu na teplotu 175 °C, která se potom udržuje přibližně 27 minut. Helium se používá jako nosný plyn v kolonách. Kvalitativní a kvantitativní analýza TAG se provádí srovnáváním chromatogramů (retenčních časů) různých standardů [20,22].

### 2.4.1 Izolace mléčného tuku

Přeměna TAG na volné mastné kyseliny a glycerol probíhá enzymatickou hydrolyzou s pomocí enzymu lipázy. Výběr enzymu a načasování reakce má klíčovou roli především pro požadovanou chuť mléčného tuku. TAG, které obsahují jednu nebo více dvojných vazeb nejsou příliš stabilní než TAG, které žádnou dvojitou vazbu neobsahují. Reakce hydrolyzy jsou prováděny přibližně při teplotě 55 °C [24].

Úplnou extrakcí se dosáhne oddělení lipidů od zbytku složek mléka. Nejpoužívanější extrakce je již zmíněná Folchova metoda. Většina metod využívá různá organická rozpouštědla k extrakci kapalina-kapalina. Nejvíce používaná rozpouštědla jsou metanol, etanol, chloroform, *n*-butanol, 2-butanol, isopropanol, diethylether, *n*-hexan a další. K rozpouštědlům je pak nejčastěji přidávána kyselina chlorovodíková nebo kyselina sírová. Výběr rozpouštědla je ovlivněn rozpustností a délkou mastných kyselin. Extrakce pomocí rozpouštědel jsou nejvíce používány, ale k použití je zapotřebí velký objem rozpouštědel a časová náročnost.

Mezi časově úspornější extrakce patří kapalina-pevná látka. Tato extrakce adsorbuje lipidy na pevný adsorbent a později následuje desorpce za pomoci rozpouštědel. Dále může být tato metoda použita i pro lipidovou frakcionaci pomocí eluce s rozpouštědly s různou polaritou. K této izolaci lipidů jsou využívány kolony, které obsahující filtrační pomůcku Celite 545, neboli SiO<sub>2</sub>. Lipidy jsou často izolovány elucí dichlormethanem a metanolem v poměru 90:10 [20, 25].

### 2.4.2 Derivatizace pro plynovou chromatografii mléčného tuku

Derivatizace mastných kyselin mléka v roztoku před plynovou chromatografií lze provádět rychlou a jednoduchou metodou spolu s ethylchloroformiátem. Mastné kyseliny v mléce jsou velmi rozmanité a některé jsou příliš těkavé, a proto je derivatizace tak složitá.

Metylace může být provedena pomocí kyselé ale i bazické katalýzy. Fluorid boritý má největší zastoupení v metanolu jako katalyzátor. Metylace kyselin má negativní účinek a to, že způsobuje izomerizaci konjugovaných dienů a ty pak interferují analýzu. Ke zmírnění těchto dopadů se používají mírnější podmínky po delší čas a fluorid boritý se může nahradit i kyselinou chlorovodíkovou. Methoxid sodný lze zase použít při bazické katalýze v metanolu. Nicméně při bazické katalýze se převádí pouze acylové skupiny, které jsou v mléčném tuku obsaženy v minimálním množství a způsobují zkreslení konečných výsledků. Největší účinnosti

bývá dosaženo kombinací katalýzy kyselinami a zásadami, kdy se používá NaOCH<sub>3</sub> s následovaným HCl nebo BF<sub>3</sub> nebo diazomethan s následovaným NaOCH<sub>3</sub> [20].

### **2.4.3 Instrumentace pro plynovou chromatografii mléčného tuku**

Pro analýzu mastných kyselin jsou nejčastěji používány kapalně fáze kolon a to především polyestery se širokým rozsahem polarit. Výhoda fází s vysokou polaritou je vypořádat se s nenasycenými mastnými kyselinami a oddělení cis a trans izomerů. Nejvíce používané kolony byly ty s délkou 100 metrů a to hlavně typ CP Sil 88 (kyanopropyl siloxan). Nasyčené mastné kyseliny s délkami řetězců od C8 do C20 s atomy uhlíku jsou běžně detekovány. Zmíněné kolony však nejsou vhodné k rozlišení cis a trans izomerů nenasycených mastných kyselin [20].

## **2.5 Analýza mléčného tuku kapalinovou chromatografií**

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je rutinní metoda používaná pro stanovení mléčného tuku. V posledních letech je HPLC využívána více než plynová chromatografie. Především se využívá při analýze TAG lišící se svojí relativní molekulovou hmotností [26]. Níže jsou vypsány jednotlivé kroky nezbytné při analýze mléčného tuku kapalinovou chromatografií.

### **2.5.1 Extrakce mléčného tuku pro kapalinovou chromatografií**

Před extrakcí musí být vzorky mléka zmrazeny a lyofilizovány. Potom jsou vzorky hydrolyzovány pomocí NaOH kolem 30 minut při teplotě 80-85 °C ve zkumavkách, které by měly vzorky chránit před světlem. Poté se vzorky ochladí a okyselí pomocí HCl, aby se snížilo pH na hodnotu 2 [27].

Extrakce lipidů je důležitý krok ke správnému stanovení lipidů a proto je nutné zvolit vhodnou metodu extrakce, aby nedocházelo ke ztrátám některých složek. Pro extrakci lipidů je možné použít metodu Röse-Gottlieba. Tato metoda není příliš využívaná z důvodu ztrát některých fosfolipidů a sfingolipidů a malé výtěžnosti. Již zmíněná Folchova metoda je vhodná pro extrakci polárních lipidů, ale bývá časově náročná s velkou spotřebou rozpouštědla [28].



Za nejvíce účinnou se považuje extrakce tlakovou kapalinou (PLE), kterou lze již považovat za zcela rutinní. Při správné teplotě, tlaku, extrakčních cyklů a správném nastavení času je možné snížit spotřebu rozpouštědla i délku času. Na rozdíl od tradičních extrakcí lze extrakci tlakovou kapalinou plně automatizovat. Kupříkladu je možné provádět tento typ separace na extraktoru Accelerated Solid Extraction ASE-200, kdy pro maximální výtěžek se aplikovala směs rozpouštědel dichlormethanu a metanolu v poměru 2:1, při tlaku 10,3 MPa a teplotě pohybující se v rozmezí od 60 do 100 °C [28].

### **2.5.2 Derivatizace pro kapalinovou chromatografii mléčného tuku**

V porovnání s plynovou chromatografií je u kapalinové chromatografie možné provést sběr frakcí pro další analýzu během analýzy za nižší teploty. Tímto způsobem se tak snižuje riziko izomerizace dvojných vazeb. Tento přístup se hodí, jak pro velké, tak i pro stopové koncentrace mastných kyselin. Metylestery mastných kyselin mají vysokou molární absorpci při nízké vlnové délce >205 nm. Pro derivatizaci se ukázalo výhodnější převádět mastné kyseliny na deriváty o vysoké molární absorpční schopnosti při delších vlnových délkách.

Například je možné derivatizovat mastné kyseliny mléčného tuku 2,4'-dibromacetofenonem v acetonu spolu s triethylaminem po dobu trvání 30 minut při teplotě 40 °C [27]. Další výhoda oproti plynové chromatografii je, že u stanovení mastných kyselin pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí (ED) lze vynechat derivatizační krok [29]. Nicméně, kapalinovou chromatografií není možné separovat izomery a proto plynová chromatografie metylesterů mastných kyselin dominuje. GC se proto považuje za rutinní analytickou metodu.

### **2.5.3 Instrumentace pro kapalinovou chromatografii mléčného tuku**

Z literatury je možné vyrozumět, že separaci mastných kyselin mléčného tuku lze provádět na systémech jak s normální, tak i obrácenou fází. Derivatizované mastné kyseliny mají často jinou polaritu než původní analyty. Navíc je možné kromě zvýšení citlivosti pro spektrofotometrickou detekci zavést také elektroaktivní funkční skupiny pro případnou elektrochemickou detekci [27].

Níže je uveden jeden z příkladů, jak lze analyzovat mléčný tuk kapalinovou chromatografií, kdy je možné použít detektor fotodiodového pole Waters 996 (DAD). Vhodná derivatizační čidla jsou 2,4'-dibromacetofenon a kombinace acetonu a trimethylaminu.

Všechny derivatizované mastné kyseliny se detekovaly při vlnové délce 256 a 234 nm. Samotná separace může probíhat i na dvou nepolárních stacionárních fázích, kupříkladu na C18, kdy jako eluent se používá gradientová eluce směsi acetonitril-voda [27]. U analýzy mléčného tuku převládá gradientová eluce nad izokratickou z důvodu zkrácení doby analýzy, kdy se sníží i spotřeba použitého eluentu. Dále HPLC analýzu TAG je možné provádět i bez derivatizace za použití hmotnostního detektoru s chemickou ionizací za atmosférického tlaku [30].

## 2.6 Stanovení obsahu lipofilních vitamínů v mléce

Mezi hlavní lipofilní vitamíny v mléce, které se nejčastěji stanovují, patří  $\alpha$ -tokoferol, (nejvíce biologicky aktivní forma vitamínu E), all-*trans*-retinol (vitamín A) a jeho provitamíny (karotenoidy), dále cholekalciferol (vitamín D3) a filochinon (vitamín K1). HPLC představuje nejčastěji používanou instrumentální analytickou metodu pro stanovení lipofilních vitamínů v mléce [31,32]. K jejich stanovení byly vyvinuty a zákonem předepisované normy ČSN EN 12823 (vitamín A), ČSN EN 12821 (vitamín D), ČSN EN 12822 (vitamín E) a ČSN EN 14148 (vitamín K).

Stanovení lipofilních vitamínů je velmi složité, neboť tyto nízkomolekulární organické sloučeniny jsou citlivé na teplo a světlo. Na přímém světle snadno dochází k oxidaci a izomerizaci. Z těchto důvodů se s nimi musí manipulovat v tlumeném světle a uchovávají se v dusíkové atmosféře v tmavých skleněných nádobách [33].

Čištění a extrakce vzorku se považují za nejdůležitější body před začátkem samotné analýzy. Tyto kroky jsou potřebné pro analytické parametry, jako jsou selektivita, přesnost a citlivost. Soxhletův extraktor a zahřívání pod zpětným chladičem byly dříve ve velké míře používány. Tyto dvě metody se vyznačují tím, že jsou časově náročné a poměrně nákladné na spotřebu organických rozpouštědel. Výběr metody je závislý na typu matrice. Pro tekuté vzorky, kam je řazeno i mléko, je příprava jednodušší než u tuhých vzorků, kde je potřeba kupříkladu třeba ještě drcení vzorku. Nejdříve je nutné oddělit mléčný tuk od mléka, neboť v mléčném tuku jsou obsaženy lipofilní vitamíny (analyty).

Vlastní analýza mléka je velmi komplikovaná a musí být rozložena do několika kroků. Mléčný tuk je oddělen extrakcí do vhodného organického rozpouštědla či směsi rozpouštědel, tak jak již bylo uvedeno v předchozích kapitolách [34]. Nejprve musí být provedena alkalická hydrolýza mléčného tuku pomocí methanolického roztoku hydroxidu draselného, kdy

antioxidanty jako kyselina askorbová nebo hydrochinon musí být součástí reakční směsi, aby se zabránilo nežádoucí oxidaci lipofilních vitamínů [34,35].

Po uvolnění *all-trans*-retinolu a  $\alpha$ -tokoferolu ze směsi jsou tyto složky extrahovány pomocí LLE metody do *n*-hexanu. LLE je metoda extrakce z kapaliny do kapaliny. Další extrakční činidla vhodná pro metodu LLE mohou být použita například chloroform, diethylether, ethylacetát a dichlormethan. Extrakce z kapaliny do kapaliny je používána zejména pro čištění vitamínů [34,35].

Dále, aby se extrakt zneutralizoval, musí se promýt destilovanou vodou. Poté je na rotační vakuové odparce všechna hexanová část odpařena. Po odpaření je vzorek rozpuštěn v metanolu nebo acetonitrilu, aby mohl být dávkován do HPLC přístroje. Vlastní analýza takto získaného vzorku je nejčastěji prováděna pomocí ultra-vysoce výkonné kapalinové chromatografie (UHPLC) se spektrofotometrickou či hmotnostní detekcí [34,35].

Závěrem lze konstatovat, že analýza složení mléčného tuku, který se skládá především z TAG, převládá plynová chromatografie po následné hydrolýze a následné derivatizaci uvolněných mastných kyselin (methylace či sililace). Pomocí HPLC totiž není možné separovat, tedy rozlišit jejich *cis* a *trans* formy [30].

V analýze mléčného tuku v oblasti obsahu lipofilních vitamínů dominuje HPLC se spektrofotometrickou detekcí nebo hmotnostní detekcí. Jelikož většina lipofilních vitamínů představuje elektroaktivní organické sloučeniny, podléhají oxidačním či redukčním elektrodovým reakcím. Lze též použít i elektrochemickou detekci [36].

### 3 Elektrochemické metody v analýze mléka

Potenciometrická titrace se používá ke stanovení kyselosti surového mléka, přestože v praxi převládá stanovení kyselosti mléka acidobazickou titrací hydroxidem sodným na fenolftalein. Bod ekvivalence je potom indikován pomocí fenolftaleinu změnou barvy mléka do pleťově růžového zbarvení [37]. Elektrochemické metody za průchodu elektrického proudu (polarografie, voltametrie, amperometrie a coulometrie) nenašly v analýze mléka a mléčného tuku široké uplatnění, neboť mléko představuje vysoce složitou matici pro elektrochemickou analýzu. Z chemického hlediska lze mléko považovat za emulzi mléčného tuku ve vodě, ale také za suspenzi proteinů ve vodě [38]. Mezi elektroaktivní složky mléka (potencionální analyty) patří, minerály [39], vitamíny [36], cukry [39] a bílkoviny [38].

Tato bakalářská práce se zaměřuje na voltametrické stanovení mléčného tuku a lipofilních vitamínů v kravském mléce. Lipofilní vitamíny jsou obsaženy pouze v mléčném tuku, a proto by mohly sloužit jako biologické markery. V níže uvedených kapitolách jsou uvedeny některé pokusy o elektrochemickou analýzu mléka.

#### 3.1 Polarografie v analýze mléka

Polarografickou analýzu je možné využít především ke stanovení stopových kovů v mléce. Existuje několik vědeckých prací zabývajících se polarografií mastných kyselin a vitamínů v mléce. Před začátkem stanovení stopových prvků je nutná mineralizace mléka, protože mléko obsahuje velké množství lipidů, které mohou negativně ovlivnit toto stanovení. Nejčastěji se používá suchá digesce spalováním [40,41].

Ke stanovení mastných kyselin se používá jak diferenciální cyklická polarografie (DCP), tak i diferenciální pulzní polarografie (DPP). K analytu s mastnými kyselinami se přidává běžná kyselina, která potvrdí přítomnost mastných kyselin ve vzorku, a která způsobuje nárůst výšky vlny polarografického signálu. Nasycené i nenasycené mastné kyseliny lze stanovit na kapající rtuťové elektrodě (DME). Používaný podpůrný elektrolyt obsahuje většinou alkohol a vodu v poměru 70:30 o koncentraci  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  tetraethylamoniumbromid (TMAB) okolo pH 2-4. Pro oddělení nasycených a nenasycených mastných kyselin se do elektrolytu přidává dvojmocný iont jako je kupříkladu  $\text{Cd}^{2+}$ . Nenasycené mastné kyseliny redukují své dvojnásobné vazby a tím se přemění na nasycené, které mohou tvořit vlny v důsledku ztráty  $e^-$  a  $\text{H}^+$ . Čím více uhlíků v řetězci mastných kyselin, tím je potenciál menší. Hodnota  $E_{1/2}$  se pro nasycené mastné kyseliny

pohybuje okolo -0,46 / -0,48 V až -0,80 / -0,80 V a hodnoty pro nenasycené mastné kyseliny se pohybují okolo -0,30 / -0,32 V -0,64 / -0,66 V [42, 43].

Mastné kyseliny mohou být kromě přímé redukce i absorbovány na povrch DME. Nenasycené mastné kyseliny interagují s těžkými kovy, a to v závislosti na jejich koncentraci a na koncentraci mastných kyselin. Mastné kyseliny se silně absorbují přibližně od 0 až -1,2 V proti nasycené kalomelové elektrodě (SCE) a to nejprve od negativnějších hodnot a poté k pozitivním hodnotám potenciálu. Elektrolyt pro stanovení se skládá z mastných kyselin, NaCl a NaHCO<sub>3</sub> [44].

### 3.2 Voltametrická analýza mléka

Pomocí voltametrické analýzy lze stanovit lipofilní vitamíny, toxické a esenciální kovy, kontaminanty (rezidua antibiotik a pesticidů), či legislativou zakázané látky, které mléko může obsahovat. Po procesu mineralizace mléka je možné uskutečnit stanovení kovů obsažených v mléce, jako jsou například Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> a Co<sup>2+</sup>. K tomuto účelu se používá visící rtuťová kapková elektroda (HMDE). Pro stanovení Hg<sup>2+</sup> a As<sup>3+</sup> se používá zlatá-rotací disková elektroda (Au-RDE). Systém se obvykle skládá ze tří elektrod. To zahrnuje referenční elektrodu Ag/AgCl spolu s nasyceným roztokem KCl, dále platinový drát, který slouží jako pomocná elektroda a HMDE a Au-RDE jako pracovní elektroda. Nicméně nejprve je stejně nezbytné provést extrakci mléka stejně jako u kapalinové chromatografie [45].

Voltametrické metody lze rozdělit na přímé a stripping. U lipofilních vitamínů přímou voltametrií se stanovují vitamíny v čistých organických rozpouštědlech jako je například acetonitril, *N,N*-dimethylformamid, dimethylsulfoxid, tetrahydrofuran a dichlormethan. Nejčastěji jsou použity roztoky v kombinaci voda a acetonitril anebo voda a etanol. Důležité je, aby rozpustný elektrolyt obsahoval třeba chloristan lithný nebo tetraalkylamonné soli, aby se zlepšila vodivost elektrolytu. Měření v organických elektrolytech je značně složité a komplikuje přípravu vzorku pro následnou analýzu. Přímá voltametrie má další dvě nevýhody, a to nízkou citlivost a možné interference způsobené doprovodnými látkami vzorku. Umožňuje detekovat vitamíny v řádech μmol·l<sup>-1</sup> [46].

TAG mléčného tuku mají tendenci k hydrolýze. Produktem hydrolýzy jsou volné mastné kyseliny, které se dají stanovit voltametricky na modifikovaných uhlíkových elektrodách. Příkladem je tištěná uhlíková elektroda (Screen-printed carbon electrode; SPCE)

pokrytá elektrokatalyzátorem kobalt-ftalocyanin. Příprava vzorku mléka se shoduje s přípravou pro stanovení pomocí HPLC [47], tak aby byly zaručeny pracovní podmínky dané legislativou.

Všechny lipofilní vitamíny jsou elektroaktivní a to znamená, že u nich dochází k přenosu elektronů díky procesům zvaných oxidace a redukce. Vitamín A se vyskytuje ve formách nenasycených organických sloučenin například retinol, retinal a kyselina retinová a provitamin  $\beta$ -karoten. Veškeré tyto formy vitamínu A se vyskytují v přírodě jako *all-trans* formy (konjugovaný systém dvojných vazeb). Vitamín A se skladuje v alkoholické formě jako retinol a ten lze převést na aktivní retinal. Oxidovaná forma retinalu se přemění na kyselinu retinovou, která je nevratně přeměněná. Přítomnost některých radikálů jako například u retinolu způsobuje polymerační reakce. Tato reakce tvoří u retinolu barevné produkty, které je možné obdržet na platinové elektrodě (PtE) během cyklické voltametrie [36,46]. Retinyl palmitát je syntetický ester *all-trans* retinolu vitamínu A, který se používá k fortifikaci mléka, kdy pro jeho stanovení lze použít pastovou elektrodu ze skelného uhlíku (GCPE). Mezi další estery *all-trans* retinolu patří ještě třeba retinyl acetát [46,47].

Cholekalciferol (vitamín D3) nelze stanovit pomocí adsorptivní voltametrie, protože není dostatečně citlivá [47]. Voltametrické hodnoty se shodují pro vitamín D2 i pro vitamín D3. Vitamín D3 i vitamín D2 se oxidují při hodnotách 1,4 až 1,5 V na uhlíkové elektrodě, kdy u oxidačního procesu dochází k přenosu dvou elektronů. Vitamín D nevykazuje žádnou redukční vlnu. Stanovení se provádí v rozpouštědlech  $\text{CH}_3\text{CN}$  a  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Vitamíny jako jsou *all-trans*-retinol, cholekalciferol,  $\alpha$ -tokoferol a fylochinon se stanovují jako součet všech aktivních forem [36]. Koncentrace vitamínu D3 v kravském mléce se pohybuje okolo  $0,13\text{--}1,0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a tvoří se především z provitamínu 7- dehydrocholesterolu za pomoci působením UV záření [48].

Vitamín K se vyskytuje především ve formách vitamínu K1 (fylochinon) a K2 (menachinon). Redukce vitamínu K probíhá se dvěma elektrony a dvěma protony za vzniku odpovídajícího fylohydrochinonu. Nejprve se vitamín K redukuje na polochinonový radikální aniont a potom se dále redukuje na dianion [36,46]. Vitamín K1 i vitamín K2 lze stanovit v roztoku etanolu a fosfátu o pH 3 v poměru 60:40 na sítotiskové grafenové elektrodě (SPGE) proti Ag/AgCl. Hodnota potenciálu oxidační reakce se pohybuje okolo 1,0 až 0,2 V [49].

Současné stanovení vitamínu K s dalším vitamínem rozpustným v tucích je díky reverzibilnímu elektrochemickému chování vitamínu K zcela možné. Na povrchu pevné látky pracovní elektrody se mohou lipofilní vitamíny ze vzorku akumulovat a po aplikaci potenciálu

depozice po určité době se mohou anodicky oxidovat. Další možnost jejich anodické oxidace je extrahovat se do vhodného pojiva uhlíkové pasty z optima vodně-organické směsi [46].

### 3.2.1 Adsorptivní voltametrie

Adsorptivní stripping voltametrie (AdSV) slouží ke stanovení lipofilních vitamínů, které se ochotně adsorbují na pevné uhlíkové materiály (grafit, skelný uhlík, nanotrubičky a grafen) [50]. Dalším příkladem zvláštního uhlíkového materiálu je borem-dopovaný diamant. Výhodou pracovních elektrod z tohoto materiálu představuje snížení paměťového efektu při přímých voltametrických krocích, hlavně pokud je měření prováděno ve vodně-organických směsích [46].

Principiálně se na povrchu elektrody uskutečňuje mezifázová akumulace analytu. To je důležitý akumulační krok, kdy dojde k nárůstu obsahu na povrchu elektrody před následným stanovením, který u přímé voltametrie schází. Existence vícevrstevné absorpce na povrchu elektrody způsobuje, že analytické metody mají více lineárních rozsahů. Katodický „*in-situ*“ square-wave adsorptivní stripping voltametrie (SWAdSV) vitamínu K1 a vitamínu K3 na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) poskytuje reprodukovatelné výsledky s velmi nízkými limity detekce. S pomocí nemodifikované GCE a GCE s modifikovaným tenkým filmem poly/alizarinové červeně s vícestěnnými uhlíkovými nano-trubicemi (MWCNTs) lze dosáhnout obdobných výsledků jako na rtuti. Nicméně u některých případech AdSV má nízkou opakovatelnost stanovení a směrodatná odchylka nabývá hodnot až 14 %. Typickým příkladem je stanovení vitamínu D3, a proto i přes svoji vysokou citlivost AdSV není vhodná pro klinickou analýzu [46,51].

### 3.2.2 Extraktivní voltametrie

Extraktivní stripovací voltametrie (ExSV) se používá ke stanovení nepolárních biologicky aktivních látek, jako jsou například aminokyseliny po enzymatické přeměně, lipofilní vitamíny, hormony, pesticidy a především farmaka [50]. Spolehlivost této metody závisí na výběru vhodného uhlíkového prášku, především na tvaru a velikosti uhlíkových částic, tedy na homogenitě vzniklé uhlíkové pasty.

Citlivost ExSV závisí pak na množství a viskozitě použité pastovací kapaliny a samozřejmě na pracovních podmínkách akumulace (extrakce) a elektrochemické detekce. ExSV se považuje

v porovnání s těmi ostatními za nejcitlivější voltametriickou metodu, protože může detekovat analyty až do výše  $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . V ExSV se nejčastěji používá uhlíková pastová elektroda z běžného grafitového prášku (CPE) nebo jakákoliv pevná elektroda, která je pokryta membránou, či dokonce tenkou vrstvou oleje [46,50].

Rozdíl mezi klasickou a extraktivní voltametrií spočívá v tom, že se tuk obsahující sledované analyty extrahuje přímo do pastové uhlíkové elektrody (CPE). Akumulační proces většinou probíhá jak na povrchu elektrody, tak i v jeho vnitřku. Samotná extrakce se provádí mimo detekční roztok („*ex-situ*“ akumulace), kdy se osvědčily GCPEs, které jsou stabilní i ve vodně-organických směsích [50].

Jelikož se jedná o extrakci kapalina-kapalina (vodně-organická fáze a pastovací kapalina GCPE) je obsah neextrahovaného analytu řízen extrakční rovnovážnou konstantou. ExSV je velmi výhodná pro svoji vysokou selektivitu, a proto je přinejmenším stejně dobrá jako například HPLC s hmotnostní detekcí (MS). Nevýhoda této metody spočívá v příliš širokých voltamogramech způsobených pomalou kinetikou elektrodových reakcí, kdy dochází k přeměně analytu na mezifázovém rozhraní. Z tohoto důvodu není možné rozpoznat formy jednotlivých vitamínů [46,50].



# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4 Extraktivní voltametrie kravského mléka a smetany

Tato experimentální část popisuje veškeré potřebné laboratorní podmínky nezbytné při extraktivní voltametii kravského mléka a smetany. Níže jsou vypsány veškeré chemikálie a přístrojové vybavení, které byly použity během experimentů. Dále jsou uvedeny parametry square-wave voltametrie (SWV), jež byly použity při elektrochemické detekci. Statistická analýza spočívala pouze ve výpočtu průměrných hodnot ( $\mu$ ) a dvojnásobku příslušných směrodatných odchylek ( $\sigma$ ).

### 4.1 Chemikálie a reagensy

All-*trans*-retinol ( $\geq 95$  %) a etanol ( $\geq 99,5$  %) se pořídily ze společnosti Sigma-Aldrich (Praha, Česká Republika). Univerzální Britton-Robinsonův pufr (BRB) o koncentraci  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  byl připraven smícháním vhodného množství kyseliny borité, ledové kyseliny octové, 85 % kyseliny fosforečné a hydroxidu sodného, vše od společnosti Lach-Ner s.r.o (Neratovice, Česká Republika). Tento BRB se připravil za použití redestilované vody (minimální elektrický odpor  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ), pořízené z Milli-Q<sup>®</sup> od společnosti Merck Millipore (Burlington, USA).

### 4.2 Přístrojové vybavení

Voltametrická detekce nahromaděných tukových částic obsahující elektroaktivní látky do pastovací kapaliny byla provedena „*ex-situ*“ přímo ze vrorku. Elektrochemická detekce se uskutečnila v konvenčním uspořádání tří elektrod skládajícího se vždy z GCPE (pracovní), chloridostříbrné elektrody (referentní) s  $3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  KCl jako solný můstek a platinového plíšku (pomocná elektroda). Tyto elektrody byly připojeny pomocí elektrických kabelů k potenciostatu Autolab PGSTAT101 ovládaným softwarem Nova (verze 1.11.0), obojí od společnosti Metrohm (Praha, Česká republika).

### 4.3 Příprava uhlíkové pastové elektrody ze skelného uhlíku (GCPE)

Příprava uhlíkové pastové elektrody ze skelného uhlíku typu Sigradur G (velikost částic  $5\text{-}20 \mu\text{m}$ , HTW Maintingen, Německo) a jedné náhodně vybrané pastové kapaliny se prováděla smícháním těchto komponentů v keramické třecí misce po dobu 15 minut, dokud se nevytvořila

homogenní uhlíková pasta. Výsledná pasta ze skelného uhlíku byla vtlačena do dutiny pístového držáku z Teflonu o průměru 3 mm. Výška sloupce pasty se doporučuje 2 cm, kvůli obtížnému vytlačování pasty. Z důvodu tzv. autohomogenizace byla vytvořená GCPE ponechána minimálně den volně za laboratorních podmínek. Až poté mohla být použita pro vlastní experimenty.

#### **4.4 Pracovní podmínky extraktivní stripping voltametrie (ExSV)**

Vzorky mléka a smetany od společnosti Kunín (Česká republika) se zakoupily v běžném obchodě. Vzorky mléka obsahovaly 0,5 % 1,0 % a 3,5 % tuku a smetany 10 % 30 % a 40 % tuku. Všechny vzorky byly ihned po otevření napipetovány (10 ml) do extrakční nádoby s kulatým dnem, z důvodu kontinuálního míchání během extrakce při 400 rpm. Poté se GCPE s nahromaděnými lipofilními látkami opláchla redestilovanou vodou a společně s ostatními elektrodami byla vložena do detekčního média. Samotná elektrochemická detekce se uskutečnila pomocí SWV v 0,1 mol·l<sup>-1</sup> BRB (pH 4,5) při potenciálovém rozsahu od 0 do +1,4 V, potenciálovém kroku ( $E_{\text{step}}$ ) 5 mV, potenciálu amplitudy ( $E_{\text{ampl}}$ ) 25 mV a frekvenci ( $f$ ) 10 Hz.

#### **4.5 Statistická analýza**

Každé měření bylo opakováno minimálně pětkrát ( $N=5$ ). Veškeré hodnoty uvedené v následujících grafech a tabulkách jsou prezentovány jako intervaly spolehlivosti pro 95 % pravděpodobnost, kdy se použily průměrné hodnoty ( $\mu$ ) a dvojnásobek směrodatné odchylky ( $\sigma$ ) pro 95,45 % pravděpodobnost.

## 5 Výsledky a diskuse

V této kapitole naleznete veškeré výsledky, kterých bylo dosaženo během laboratorních měření. Tyto výsledky byly kriticky vyhodnoceny a v závěrečné diskusi byly podrobně rozepsány. Optimalizace spočívala ve výběru vhodné pastovací kapaliny, obsahu pastovací kapaliny, doby extrakce, rychlosti míchání, složení detekčního média a vhodné nastavení elektrochemické detekce.

### 5.1 Výběr pastovací kapaliny

Řada pěti GCPEs obsahující vždy 20 % (*m/m*) podíl pastovací kapaliny a lišící se jejím typem byly zkoumány pomocí SWV kravského mléka (3,5 % tuku), aby se vybrala ta optimální GCPE. Za tímto účelem byl vybrán ataktický polypropylen, parafínový olej, parafínový vosk, silikonový olej a vazelína. U těchto elektrod se vždy proměřoval ohmický odpor (*R*).

Jak vyplývá z naměřených dat v Tabulce 3, nejvyšší výtěžky byly pořízeny pro GCPE s parafínovým olejem. Nicméně pro nízkou opakovatelnost extrakce (43,36 % RSD) byl upřednostněn silikonový olej (17,54 % RSD), který byl vybrán jako optimální pro následující měření.

**Tabulka 3.** Porovnání pastových elektrod ze skelného uhlíku.

Pastová kapalina	<i>R</i> ( $\Omega$ )	<i>E<sub>p</sub></i> (V)	<i>I<sub>p</sub></i> ( $\mu$ A)
Ataktický Polypropylen	10.5 $\pm$ 0.8	0.831	0.075
Parafínový olej	7.1 $\pm$ 0.2	0.851	3.69 $\pm$ 1.6
Parafínový vosk	4.7 $\pm$ 0.3	0.836	0.24 $\pm$ 0.1
Silikonový olej (8000 cSt)	8.0 $\pm$ 0.2	0.844	1.14 $\pm$ 0.2
Vazelína	17.4 $\pm$ 1.0	0.829	0.013

Poznámka: Hodnoty ohmického odporu (*R*), potenciálu píku (*E<sub>p</sub>*) a výška píku (*I<sub>p</sub>*) jsou uvedeny jako  $\mu \pm 2\sigma$  pro 95% pravděpodobnost z pěti opakovaných měření.

### 5.2 Obsah pastovací kapaliny

Obsah pastovací kapaliny ovlivňuje vzájemný poměr prášku ze skelného uhlíku a pastovací kapaliny. Uhlíkové částice jsou v kontaktu až do té doby, než pastovací kapalina překročí 30 % (*m/m*). GCPE s obsahem 5 % (*m/m*) silikonového oleje poskytovala nejvyšší

proudovou odezvu, současně ale i s proudem pozadí výrazně narostl. Za optimální obsah se vybral 15 % (*m/m*) SO, a to z důvodu vysoké reprodukovatelnosti, jak je znázorněno v Tabulce 4. Lze se domnívat, že dramatický nárůst v pozadí je způsoben nespecifickou absorpcí mléčného tuku na povrchu elektrody, ke kterému dochází současně při extrakci.

**Tabulka 4.** Vliv obsahu silikonového oleje na odezvu 3,5 % kravského mléka.

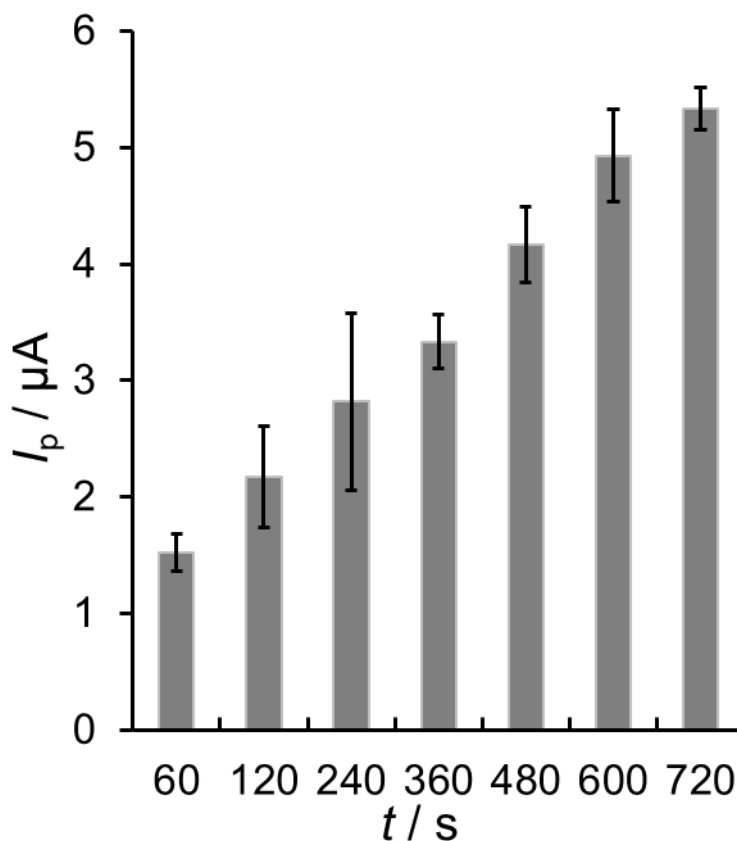
Obsah (%)	$R$ ( $\Omega$ )	$I_p$ ( $\mu\text{A}$ )	$I_b$ ( $\mu\text{A}$ )
5	$6.7 \pm 0.2$	$10.0 \pm 0.3$	$66.4 \pm 3.50$
10	$7.0 \pm 0.3$	$4.7 \pm 0.3$	$8.9 \pm 0.90$
15	$4.8 \pm 0.2$	$5.1 \pm 0.3$	$4.4 \pm 0.50$
20	$8.0 \pm 0.2$	$1.1 \pm 0.2$	$0.9 \pm 0.02$
25	$6.0 \pm 0.1$	$0.9 \pm 0.1$	$0.7 \pm 0.02$

Poznámky: Hodnoty ohmického odporu ( $R$ ), výšky píku ( $I_p$ ), pozadí ( $I_b$ ) jsou uvedeny jako  $\mu \pm 2\sigma$  pro 95 % pravděpodobnost z pěti opakovaných měření

### 5.3 Doba extrakce

Extrakce je rovnovážná metoda, která slouží k oddělení látek (analyty) ze směsi (vzorek). Oddělení většinou probíhá na základě různé rozpustnosti látek a jejich množství. Na základě této definice lze považovat extrakci mléčného tuku do pastovací kapaliny jako extrakci z vodné do organické fáze, systém kapalina-kapalina.

Pro dosažení rovnováhy, nejvyššího extrakčního výtěžku, je zapotřebí určit trvání ( $t$ ). Na Obrázku 1 jsou uvedeny proudové odezvy ( $I_p$ ) naextrahovaného mléčného tuku z 3,5 % kravského mléka po různou dobu akumulace. Extrakční rovnováha nastala po 600 s, jelikož po delším časovém úseku nebyl zjištěn statisticky významnější nárůst proudové odezvy.



**Obrázek 1** Vliv doby extrakce na výtěžku lipofilních vitamínů kravského mléka s 3,5 % (*m/m*) tuku, data získaná ze SWV na GCPE, která obsahuje 15 % (w/w) silikonového oleje,  $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$  a  $f = 20 \text{ Hz}$ .

#### 5.4 Rychlost míchání

Rychlost míchání ovlivňuje transport tukových částic k povrchu GCPE, které obsahují rozpuštěné lipofilní vitamíny. Společně s tukovými částicemi se tedy tyto vitamíny extrahují do silikonového oleje (SO). Rychlost otáček magnetického míchadla vyšší než  $300 \text{ min}^{-1}$  nemělo žádný významný vliv na zvýšení konečné proudové odezvy, a proto hodnota  $300 \text{ min}^{-1}$  se může považovat za optimální pro následující experimenty.

#### 5.5 Složení detekčního média

Kromě pracovních podmínek extrakce mléčného tuku, tak i složení detekčního média a parametry zvolené pulzní voltametrické techniky, mohou zásadně ovlivnit citlivost finální ExSV elektroaktivních látek přítomných v mléce či smetaně. V praxi představuje BRB o

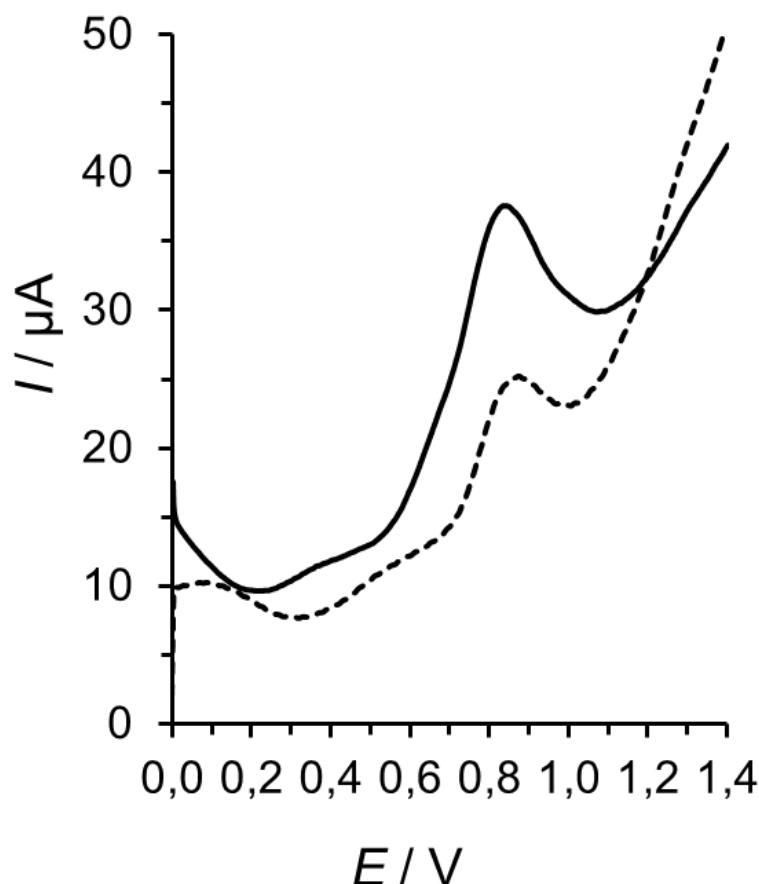
koncentraci  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  nejpoužívanější detekční médium, protože pouhým přidáním vodného roztoku hydroxidu sodného lze zvolit požadované pH detekčního média, aniž by došlo ke změně chemického složení. Nejcitlivější proudová odezva naextrahovaných lipofilních látek byla zjištěna pro BRB o pH 4,5. Tento pufr se může nahradit octanovým pufrem, z důvodu jeho jednoduššího složení.

Během výběru vhodného pH se zjistil lineární vztah mezi potenciálem píku a hodnotami pH. Tuto závislost lze charakterizovat rovnicí lineární regrese ( $E_p$ ) =  $-0,0558 \text{ pH} + 1,0891$  ( $R^2 = 0,9978$ ). Potenciál píku byl posunut na zápornější hodnoty se zvýšeným pH. Tento jev pravděpodobně nastává v důsledku snížení energetické bariéry a snadnější deprotonace přítomných lipofilních vitamínů. Hodnota směrnice ( $k$ ) byla spočtena 0,0558, což naznačuje přechod elektronů společně s protony v poměru 1:1.

## 5.6 Nastavení elektrochemické detekce

Za vhodnou elektrochemickou techniku byla zvolena SWV. Mezi hlavní parametry, které ovlivňují kinetiku elektrochemické reakce (anodická oxidace lipofilních látek), tedy proudovou výtěžnost, patří potenciál amplitudy ( $E_{\text{ampl}}$ ) a frekvence ( $f$ ). Optimalizace těchto parametrů probíhala za konstantního potenciálového kroku ( $E_{\text{step}}$ ) 5 mV.

Naextrahované lipofilní vitamíny vykazovaly jeden široký anodický pík, který se zvyšoval s amplitudou potenciálu, dokud se nedosáhlo hodnoty 25 mV, a proto hodnota 25 mV byla stanovena jako optimální. Výška tohoto anodického píku rostla s vyšší frekvencí, jak je patrné z Obrázku 2. Optimální frekvence byla stanovena na 50 Hz, kvůli stále se zvyšujícímu proudovému pozadí.

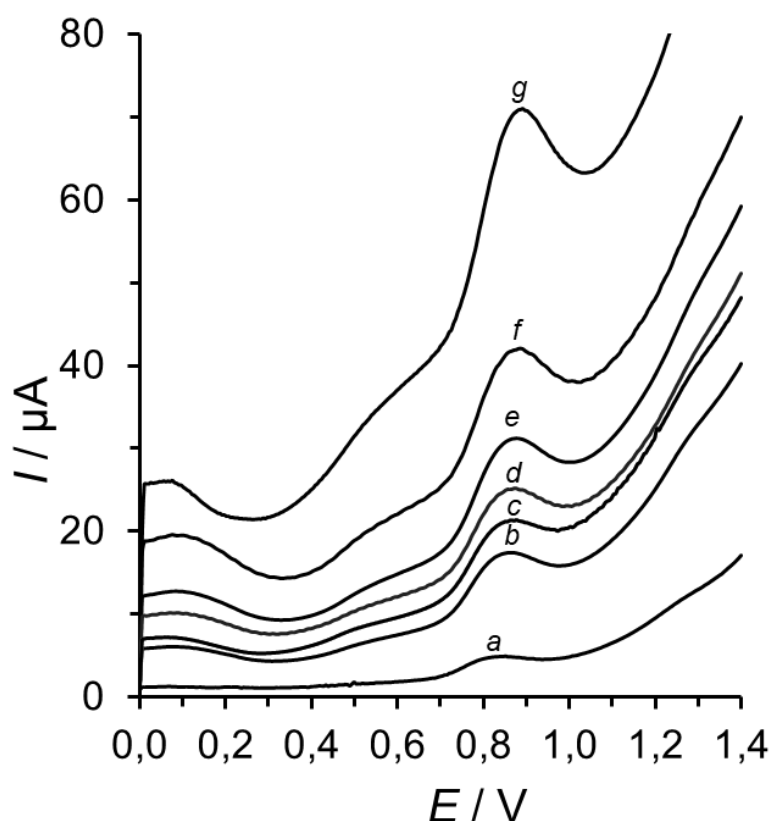


**Obrázek 2** SWV voltamogram naextrahovaného kravského mléka 3,5 % tuku při  $400 \text{ min}^{-1}$  po 10 min na GCPE obsahující 15 % (*m/m*) SO s následnou elektrochemickou detekcí v  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  BRB pH 4,5 při  $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$ , a  $f = 50 \text{ Hz}$  (přerušovaná). SWV voltamogram extrahovaného all-*trans*-retinolu při  $400 \text{ min}^{-1}$  po dobu 5 minut z jeho  $500 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  60 % etanolického roztoku do GCPE obsahující vždy 20 % (*m/m*) SO s následná elektrochemickou detekcí v  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  BRB pH 4,5 při  $E_{\text{step}} = 1 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$  a  $f = 25 \text{ Hz}$  (plná čára).

## 5.7 Kvalitativní analýza mléka extraktivní stripping voltametrií

Lipofilní vitamíny se převážně vyskytují v mléčném tuku z důvodu své nepolarity. Cholekalciferol (vitamín D3) a fylochinon (vitamín K1) jsou přítomné v mléce jen v minimálním množství ( $0,1 \text{ }\mu\text{g}$  ve 100 ml) na rozdíl od  $\alpha$ -tokoferolu (vitamín E) společně s retinolem a s jeho provitamíny (karotenoidy), jejichž obsah se pohybuje až okolo  $100 \text{ }\mu\text{g}$  na 100 ml mléka [52]. Veškeré analyzované vzorky mléka a smetany poskytovaly vždy pouze jeden široký oxidační pík ( $0,689$  do  $1,022 \text{ V}$ ) při maximu  $0,886 \text{ V}$  za zvolených optimálních podmínek.

Na základě výše uvedených skutečností z literatury byl obdobně analyzován ExSV standartní roztok *all-trans*-retinolu, jehož oxidaci docházelo při +0,852V. Rovněž bylo zjištěno (viz. Obrázek 3), že *all-trans*-retinol též poskytuje obdobně široký pík jako vzorky mléka či smetany (0,447 do 1,068 V). Zde je nutné uvést, že provitamíny vitamínu A mají podobné elektrochemické chování, tudíž jejich oxidace nastává při stejných hodnotách potenciálu. Z tohoto důvodu není pomocí ExSV možné rozlišit jednotlivé formy vitamínu A. Přesto celkový obsah vitamínu A byl dále použit jako biologický marker obsahu tuku ve vzorcích mléka a smetany.



**Obrázek 3** Voltamogramy lipofilních vitamínů, součet lipofilních vitamínů (převážně *all-trans*-retinol a  $\beta$ -karoten), které byly extrahovány z kravského mléka 3,5 % tuku na GCPE obsahující 15 % (*m/m*) SO při otáčkách  $300 \text{ min}^{-1}$  po dobu 10 min. Po opláchnutí redestilovanou vodou byla následně provedena voltametrická detekce v  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  BRB při pH 4,5,  $E_{\text{step}} = 5 \text{ mV}$ ,  $E_{\text{ampl}} = 25 \text{ mV}$ , a  $f = 10$  (a), 20 (b), 30 (c), 40 (d), 50 (e), 60 (f) a 100 Hz (g).

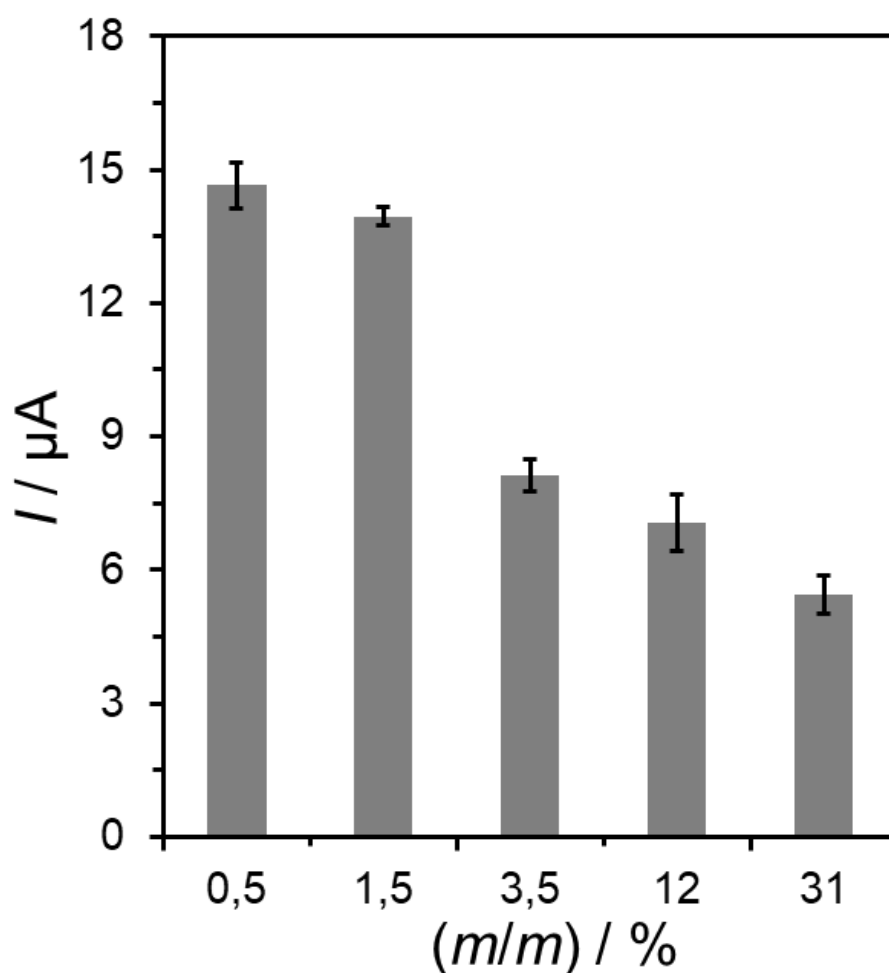
## 5.8 Analýza vzorků mléka a smetany

Z prováděného experimentu bylo zjištěno, že vzorek smetany obsahující 40 % tuku nemohl být analyzován z důvodu vysoké viskozity. Smetana přilnula na povrch GCPE, a tudíž nemohl



být její povrch opláchnut redestilovanou vodou. Na Obrázku 4 je graf zobrazující závislost anodického píku na množství mléčného tuku ve vzorcích mléka a smetany. V této bakalářské práci nebyla použita žádná referenční analytická metoda pro obsah mléčného tuku. Graf zobrazuje pouze hodnoty obsahu tuku garantované výrobcem.

S litováním je nutné konstatovat, že nelze rozeznat mléko o 3,5 % obsahu tuku od vzorků smetany. Bohužel nebyla zjištěna lineární závislost mezi proudovým výtěžkem oxidace forem vitamínu A a obsahem mléčného tuku. Z důvodu vysokého obsahu mléčného tuku ve smetaně, poskytovaly vzorky mléka vyšší proudové odezvy, protože lipofilní vitamíny jsou rovnovážně rozděleny během extrakce mezi mléčným tukem a mezi pastovací kapalinou, jejíž objem je několikanásobně nižší než objem tuku ve vzorcích smetany.



**Obrázek 4** Závislost odezvy proudu píku (anodická oxidace přítomných lipofilních vitamínů) na obsahu tuku v mléce a smetaně.

## 6 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda lze pomocí navržené ExSV na GCPE stanovit a rozpoznat jednotlivé formy lipofilních vitamínů v mléce a smetaně, tak aby mohly sloužit jako biologické markery obsahu tuku a též jako kritéria kvality těchto mléčných výrobků. Ze získaných experimentálních dat vyplývá, že pomocí ExSV nebylo možné rozpoznat jednotlivé formy vitamínů, které jsou obsaženy v mléčném tuku, protože metoda není dostatečně selektivní pro malý počet anodických signálů a jejich velkou šířku.

Možnost použití ExSV pro semi-kvantitativní stanovení obsahu mléčného tuku byla shledána za minimální, protože statisticky není možné rozpoznat mléko s 3,5 % obsahem mléčného tuku od vzorků smetany mající 12 % a 30 % mléčného tuku. Z tohoto důvodu se dospělo k závěru, že navržená extraktivní metoda nemůže být univerzálně použita jako screeningová metoda obsahu mléčného tuku v mlékárenském průmyslu. Navrženou ExSV lze použít pouze při hodnocení kvality mléka, kdy rozdíly hodnot proudových odezev pro jednotlivé obsahy mléčného tuku (0,5 %, 1,5 % a 3,5 %) byly statisticky významné.

## 7 Reference

- [1] Kailasapathy, K. (2008) Chemical composition, physical and functional properties of milk and milk ingredients (Chapter 4). Penrith, Australia: John Wiley. 77.
- [2] Foroutan, A., Guo, A. C., Vazquez-Fresno, R., Lipfert, M., Zhang, L. Zheng, J., Badran, H., Budinski, Z., Mandal, R., Ametaj, B. N., Wishart, D. S. (2019) Chemical composition of commercial cow's milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **67**(17), 4897–4914.
- [3] Svensson, C. (2020) The chemistry of milk. Dairy processing handbook (Chapter 2). Tetra Pak. Dostupné z: <https://dairyprocessinghandbook.tetrapak.com/chapter/chemistry-milk> [cit. 2020-10-12].
- [4] Butler, J. (2014) The composition of cow's milk. Bristol, United Kingdom: Viva! Health. 12–17.
- [5] Hill, R. A. Cheese making technology (The dairy education ebook series), Guelph, Canada: University of Guelph. Dostupné z: <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book/export/html/2011> [cit. 2020-10-12].
- [6] O'Sullivan, O., Cotter, P. D. (2017) Microbiota of raw milk and raw milk cheeses (Chapter 12), Cheese, Amsterdam, Netherlands, Elsevier Ltd. 201–316.
- [7] Bonfim da Silva, V., Pereira da Costa, M. (2019) Influence of processing on rheological and textural characteristics of goat and sheep milk beverages and methods of analysis. *Processing and sustainability of beverages*. Amsterdam, Netherlands, Elsevier Ltd. 373–412.
- [8] Butler, J. (2014). A comparison between human milk and cow's milk. Bristol, United Kingdom: Viva! Health. 15–17. Dostupné z: <https://cdn.viva.org.uk/wp-content/uploads/2020/03/White-Lies-report-2014.pdf> [cit. 2020-10-12].
- [9] Goff, H. D. Physical Properties of Milk. (The dairy education ebook series). Guelph, Canada: University of Guelph. Dostupné z: <https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/physical-properties-milk> [cit. 2020-11-04].
- [10] Hlaváč, P., Božíková, M. (2011) Effect of temperature on milk rheological and thermophysical properties. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, **15**(1), 17–22.
- [11] Sherbon, J. W. (1988) Physical properties of milk. In: Wong, N.P., Jenness, R., Keeney, M., Marth, E. H. (eds) *Fundamentals of dairy chemistry*. Springer, Boston, USA, Springer. 409–460.

- [12] Weiss, B. (2019) Update on vitamin nutrition of dairy cows. Dostupné z: <https://dairy-cattle.extension.org/update-on-vitamin-nutrition-of-dairy-cows/> [cit. 2020-10-28].
- [13] Steigerová, B. (2005) Mléko ano či ne. Bakalářská práce. Fakulta sportovních studií, Masarykova Univerzita, Brno.
- [14] Gajdůšek, S. (2003) Laktologie. Brno, Czech Republic: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003. 78.
- [15] Jashari, G., Frühbauerová, M., Sýs, M., Červenka, L. (2020) Extractive stripping voltammetry at a glassy carbon paste electrode for analysis of cow's milk and cream. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, **14**, 202–207.
- [16] Yeh, B. E., Barbano, D. M., Drake, M. A. (2017) Vitamin fortification of fluid milk. *Journal of Food Science*, **82**(4), 856–864.
- [17] Haug, A., Hostmark, A. T., Harstad, O. M. (2007) Bovine milk in human nutrition- a review. *Lipids in Health and Disease*, **6**, 1–16.
- [18] Graulet, B. (2014) Ruminant milk: A source of vitamins in human nutrition. *Animal Frontiers*, **4**(2) 24–30.
- [19] Dinicolantonio, J., Bhutani, J., O'Keefe, J. H. (2015) The health benefits of vitamin K. *Open Heart*, **2**(1), 1–7.
- [20] Amores, G., Virto, M. (2019) Total and free fatty acids analysis in milk and dairy fat. *Separations*, **6**(14), 1–22.
- [21] Kala, R., Samková, E., Pecová, L., Hanuš, O., Sekmokas, K., Riaukienė, D. (2018) An overview of determination of milk fat: development, quality control measures, and application. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, **66**(4), 1055–1064.
- [22] Gutiérrez, R., Vega, S., Díaz, G., Sánchez, J., Coronado, M., Ramírez A., Pérez, J., González, M., Schettino, B. (2009) Detection of non-milk fat in milk fat by gas chromatography and linear discriminant analysis. *Journal of Dairy Science*, **92**(5), 1846–1855.
- [23] Avalli, A., Contarini, G. (2005) Determination of phosphor-lipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD. *Journal of Chromatography A*, **1071**(1-2), 185–190.
- [24] Omar, K. A., Gounga, M. E., Liu, R., Mwinyi, W., Abuubakar, W.A., Ramadhan, H., Sheha, K.A., Wang, X. (2017) Triacylglycerol composition, melting and crystallization profiles of lipase catalysed anhydrous milk fats hydrolysed. *International Journal of Food Properties*, **20**(2), 1230–1245.

- [25] Bezpečnostní list podle nařízení (ES) č.1907/2006 (REACH), upraveno 2015/830/EU [online] Dostupné z: <https://www.carlroth.com/medias/SDB-0011-CZ-CS.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oOGQvaDdhLzg5OTk0O bGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0cy9oOGQvaDdhLzg5OTk0O DkwMTE3NDIucGRmfDhkODBmNDg0MjczNDc2YTAwM2M5ZDJIMWE3YTAzMTc 3NGZIMWQ2ZTU2YzUxOGQ1NmM4NDVIMTJINTAwMTM5N2M> [cit. 2021-04-08].
- [26] Frede, E., Thiele, H. (1987) Analysis of milkfat by HPLC. *J Am Oil Chem Soc*, **64**(4), 521–528.
- [27] Czauderna, M., Kowalczyk, J., Niedzwiedzka, K.M., W<sup>^</sup>sowska, I. (2002) A highly efficient method for derivatization of fatty acids for high performance liquid chromatography. *Journal of Animal and Feed Sciences*, **11**(3), 517–526.
- [28] Castro-Gómez, M.P., Rodriguez-Alcalá, L.M., Calvo, M.V., Romero, J., Mendiola, J.A., Ibañez, E., Fontecha, J. (2014) Total milk fat extraction and quantification of polar and neutral lipids of cow, goat, and ewe milk by using a pressurized liquid system and chromatographic techniques. *Journal of Dairy Science*, **97**(11), 6719–6728.
- [29] Lima, E.S., Abdalla, D.S.P. (2002) High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples. *Analytica Chimica Acta*, **465**, 81–91.
- [30] Gastaldi, D., Medana, C., Giancotti, V., Aigotti, R., Bello, F. D., Baiocchi, C. (2011) HPLC-APCI analysis of triacylglycerols in milk fat from different sources. *European journal of lipid science technology*, **113**, 197–207.
- [31] Escriva, A., Esteve, M.J., Farre, R., Frigola, A. (2002) Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **947**(2), 313–318.
- [32] Gomis, D.B., Fernández, M.P., Gutiérrez Alvarez, M.D. (2000) Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in milk by microcolumn liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **891**(1), 109–114.
- [33] Bui M.H. (2000) Encyclopedia of separation science: vitamins / liquid chromatography. Academic Press, 4444.
- [34] Zhang, Y., Zhou, W., Yan J., Liu, M., Zhou, Y., Shen, X., Ma, Y., Feng, X., Yang, J., Li, G. (2018) A review of the extraction and determination methods of thirteen essential vitamins to the human body: An update from 2010. *Molecules*, **1484**(23), 1–25.
- [35] Stanovení lipofilních vitamínů v mléce metodou UHPLC [online] Dostupné z: [https://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2012/01/KA\\_2340\\_4\\_8up\\_vitaminy.pdf](https://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2012/01/KA_2340_4_8up_vitaminy.pdf) [cit. 2021-03-03].

- [36] Lovander, M.D., Lyon, J.D., Parr IV, D.L., Wang, J., Parke, B., Leddy J. (2018) Critical Review—Electrochemical properties of 13 vitamins: A critical review and assessment. *Journal of The Electrochemical Society*, **165** (2), 18–49.
- [37] Salvatore, D., Antonietta, B.M., Ugo, P. (1992) Voltammetric Determination of the Titrable Acidity of Milk Using a Platinum Microelectrode, *Electroanalysis. Natural Sciences*, **4**(1), 93–96.
- [38] Surucu, O., Abaci, S. (2019) Electrochemical determination of  $\beta$ -lactoglobulin in whey proteins. *Journal of Food Measurement and Characterization*, **14**(1), 11–19.
- [39] Shahbazi, Y., Ahmadi, F., Fakhari, F. (2016) Voltammetric determination of Pb, Cd, Zn, Cu and Se in milk and dairy products collected from Iran: An emphasis on permissible limits and risk assessment of exposure to heavy metals. *Food Chemistry*, **192**, 1060–1067.
- [40] Moreno-Torres, R., Navarro, M., Ruóz-López M.D., Reyes, A., López, C. (2000) A Mineralization Procedure for Determining Magnesium in Milk. *LWT-Food Science and Technology*, **33**(5), 397–400.
- [41] Coleman, R.D., Thompson, J.B., Branlm, I. (1948) Trace Metal Determination in Fats. *Analytical Chemistry*, **20**(4), 365–368.
- [42] Edwin, J., Yu, K., Yu, M. (1967) Polarography of Conjugated Unsaturated Lipids. *Lipids*, **2**(5), 411–418.
- [43] Vaidya, N., Choure, R., Banerjee A.K., Pitre, K.S. (2010) Polarographic Analysis of Fatty Acids Obtained from the Seed of *Persea americana*. *Asian Journal of Chemistry*, **22**(7), 5499–5503.
- [44] Krznaric, D., Cosovic, B., Kozarac, Z. (1983) The adsorption and interaction of long-chain fatty acids and heavy metals at the mercury electrode/ sodium chloride solution interface. *Marine Chemistry*, **14**, 17–29.
- [45] Khan, I., Pandit, U.J., Wankar, S., Limaye, S.N. (2017) Centrifugation assisted digestion for simultaneous voltammetric determination of ultra trace metal ions in water and milk samples. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, **7**, 64–72.
- [46] Sýs, M. Metelka R., Vytřas, K. (2018) Voltammetric determination of fat-soluble vitamins (Chapter 4). In *Food safety and healthy living*. 1. vyd. Brasov: Transilvania University Press, 15s.
- [47] Sýs, M., Žabčíková, S., Červenka, L., Vytřas, K. (2017). Comparison of adsorptive with extractive stripping voltammetry in electrochemical determination of retinol. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences* **11**(1), 96–103.

- [48] Mandrioli, M., Boselli, E., Fiori, F., Rodriguez-Estrada, M. T. (2020) Vitamin D3 in high-quality cow milk: An Italian case study. *Foods*, **548**(9), 1–9.
- [49] Jesadabundit, W., Chaiyo, S., Siangproh, W., Chailapakul, O. (2020) Simple and cost-effective electrochemical approach for monitoring of vitamin K in green vegetables. *Chemelektrochem*, **7**, 155–162.
- [50] Sýs, M., Farag, A.S., Švancara, I. (2019) Extractive stripping voltammetry at carbon paste electrodes for determination of biologically active organic compounds. *Monatshefte für Chemie*, **150**, 373–386.
- [51] Smart, A., Crew, A., Doran, O., Hart, J. P. (2020) Studies towards the development of a novel, screen-printed carbon-based, biosensor for the measurement of polyunsaturated fatty acids. *Applied sciences*, **7779** (10), 1–13.
- [52] Žabčíková, S., Mikysek, T., Červenka, L., Sýs, M. (2018) Electrochemical study and determination of all-*trans*-retinol at carbon paste electrode modified by a surfactant. *Food Technology and Biotechnology*, **56**(3), 337–343.