

Stanovení vybraných sacharidů v mléčných systémech

Bc. František Neduchal

Diplomová práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav analýzy a chemie potravin
akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. František Neduchal**
Osobní číslo: **T13582**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Stanovení vybraných sacharidů v mléčných systémech**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizovat možnosti stanovení mono- a oligosacharidů v mléce, mléčných výrobcích a vedlejších produktech při zpracování mléka.
2. Blíže se zaměřit na stanovení těchto sloučenin pomocí HPLC.

II. Praktická část

1. Navrhnout metodiku stanovení mono- a oligosacharidů v mléčných systémech pomocí HPLC s RI detektorem.
2. Optimalizovat navrženou metodiku pro vybrané mléčné systémy.
3. Stanovit vybrané mono- a oligosacharidy v mléčných systémech.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] ZAKHAROVA, A. M., I. L. GRINSHTEIN a L. A. KARTSOVA. Determination of carbohydrates and sweeteners in foods and biologically active additives by high-performance liquid chromatography. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2013, vol. 68, issue 12, s. 1081-1084 [cit. 2014-12-18]. DOI: 10.1134/S1061934813100122.

[2] SHARMA, RAJAN, YUDHISHHIR S RAJPUT, POONAM, GAURAV DOGRA a SUDHIR K TOMAR. Estimation of sugars in milk by HPLC and its application in detection of adulteration of milk with soymilk. *International Journal of Dairy Technology* [online]. 2009, vol. 62, issue 4, s. 514-519 [cit. 2014-08-30]. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2009.00532.x.

[3] BUŇKA, František, Vendula PACHLOVÁ, Leona BUŇKOVÁ a Michaela ČERNÍKOVÁ. *Mlékárenská technologie I. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2013, 258 s. ISBN 978-80-7454-254-1.*

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Zuzana Bubelová, Ph.D.

Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

20. ledna 2016

Termín odevzdání diplomové práce:

29. dubna 2016

Ve Zlíně dne 20. ledna 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



Ing. Jiří Miček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: NEDUCHAL FRANTIŠEK

Obor: TECHNOLOGIE POTRAVIN

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 28.4.2016


.....

²¹ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²² zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

²³ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá problematikou stanovení sacharidů v mléku a tekutých mléčných výrobcích (smetana, mléčné nápoje, kysané mléčné výrobky, bezlaktózové výrobky) a jejich charakteristikou. Přesněji je zaměřena na identifikaci mono- a oligosacharidů analytickou metodou HPLC-RI. Hlavním cílem bylo navržení, optimalizace a validace metodiky. Dalším cílem pak bylo stanovení mono- a oligosacharidů v mléku a tekutých mléčných výrobcích běžně dostupných v tržní síti. Pro přípravu vzorku bylo použito číření Carrezovými činidly. Vlastní chromatografické stanovení sacharidů probíhalo při použití 70% acetonitrilu ve vodě jako mobilní fáze (s průtokem $1,4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$). Navržená metodika se ukázala být vhodná pro stanovení mono- a oligosacharidů v mléce a mléčných výrobcích. Analyzované obsahy se příliš nelišily od údajů uvedených na obalech výrobků.

Klíčová slova: mléko, tekuté mléčné výrobky, laktóza, sacharidy, HPLC-RI

ABSTRACT

This thesis deals with the determination of carbohydrates in milk and liquid dairy products (cream, milk drinks, fermented dairy products, lactose-free dairy products) and their characteristics. Specifically, it is focused on the identification of mono- and oligosaccharides using analytical method HPLC-RI. The main aim of the thesis was to design, optimize and validate methodology. Another goal of this work was to determine the mono- and oligosaccharides in milk and liquid dairy products commonly available in the market network. Carrez clarification agents were used for the sample preparation. 70% acetonitrile in water as the mobile phase (with a flow rate of $1,4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) was used for the chromatographic determination of carbohydrates. The proposed methodology was proven to be suitable for the determination of mono- and oligosaccharides in milk and dairy products. Analyzed contents were not much different from those indicated on the product packaging.

Keywords: milk, liquid dairy products, lactose, carbohydrates, HPLC-RI

Velké poděkování patří především vedoucí práce Ing. Zuzaně Bubelové, Ph.D. za ochotu, trpělivost, cenné rady a připomínky a odborné vedení při zpracování diplomové práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSA

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 MLÉKO A VYBRANÉ MLÉČNÉ SYSTÉMY	12
1.1 MLÉKO	12
1.1.1 Chemické složení mléka	12
1.1.1.1 Bílkoviny	13
1.1.1.2 Lipidy	14
1.1.1.3 Sacharidy	15
1.1.1.4 Ostatní složky mléka	15
1.2 SYROVÁTKA	16
1.2.1 Získávání syrovátky	16
1.2.1.1 Sladké srážení	17
1.2.1.2 Kyselé srážení	17
1.2.2 Úprava a technologické zpracování syrovátky	18
1.2.2.1 Demineralizace syrovátky	18
1.2.2.2 Zahuštění syrovátky	18
1.2.2.3 Krystalizace laktózy	18
1.2.2.4 Sušení syrovátky	19
1.3 SMETANA	19
1.3.1 Získávání smetany	19
1.4 FERMENTOVANÉ MLÉČNÉ VÝROBKY	20
1.4.1 Fermentované mléčné výrobky s mezofilními bakteriemi mléčného kvašení.....	20
1.4.2 Fermentované mléčné výrobky s termofilními bakteriemi mléčného kvašení.....	21
1.5 VÝROBKY SE SNÍŽENÝM OBSAHEM LAKTÓZY A BEZLAKTÓZOVÉ MLÉČNÉ VÝROBKY	22
2 METODY STANOVENÍ MONO- A OLIGOSACHARIDŮ	25
2.1 ČIŘENÍ SACHARIDŮ.....	25
2.1.1 Zásaditý octan olovnatý	25
2.1.2 Neutrální octan olovnatý	26
2.1.3 Kyselina fosfowolframová	26
2.1.4 Čiření podle Carreze	26
2.1.5 Čiření podle Herlese.....	26
2.2 CHEMICKÉ METODY	27
2.2.1 Metody založené na redukčních schopnostech cukrů	27
2.2.1.1 Metoda podle Bertranda.....	27
2.2.1.2 Metoda podle Luffa - Schoorla.....	27
2.2.2 Metody založené na barevných kondenzačních reakcích degradačních produktů	28
2.2.2.1 Metoda podle Duboise	28
2.2.2.2 Metoda podle Somogyiho	28
2.3 FYZIKÁLNÍ METODY	28
2.3.1 Polarimetrie	28

2.3.2	Refraktometrie.....	29
2.3.3	Gravimetrie	29
2.3.4	Denzitometrie	29
3	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	31
3.1	PRINCIP	31
3.2	TECHNICKÉ VYBAVENÍ HPLC	31
3.2.1	Čerpadlo	31
3.2.2	Dávkovací zařízení.....	32
3.2.3	Kolona	32
3.2.4	Detektor.....	33
3.2.4.1	Refraktometrický detektor	34
3.2.4.2	Fotometrický detektor.....	35
II	PRAKTICKÁ ČÁST	36
4	CÍL PRÁCE	37
5	METODIKA	38
5.1	CHEMIKÁLIE.....	38
5.2	POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	38
5.3	ANALYZOVANÉ VZORKY	38
5.4	PŘÍPRAVA VZORKU.....	41
5.5	STANOVENÍ CUKRŮ POMOCÍ HPLC-RI	41
5.5.1	Optimalizace HPLC stanovení.....	42
5.5.2	Validace navržené metodiky	42
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	44
6.1	OPTIMALIZACE A VALIDACE HPLC STANOVENÍ.....	44
6.2	KALIBRAČNÍ KŘIVKY CUKRŮ.....	44
6.3	STANOVENÍ CUKRŮ POMOCÍ HPLC V MLÉCE A TEKUTÝCH MLÉČNÝCH VÝROBCÍCH	48
	ZÁVĚR	53
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	55
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	60
	SEZNAM OBRÁZKŮ	61
	SEZNAM TABULEK.....	62

ÚVOD

Mléko je pro člověka významným zdrojem živin. Má nezastupitelné místo ve výživě člověka. Primárně je určeno k výživě novorozenců, ale své oblibě se dostalo i ve výživě dospělých jedinců. Je důležitým zdrojem tří základních živin, sacharidů, bílkovin a tuků. Dále obsahuje důležité vitaminy a některé minerální látky, z nichž nejvýznamnější roli hraje vápník. V potravinářské technologii je mléko vhodnou surovinou pro výrobu mnoha různých výrobků, ať už mléka samotného, smetany, fermentovaných mléčných výrobků, másla, mnoha druhů sýrů, mražených krémů či výrobků určených pro zvláštní výživu. Vzhledem ke zvyšujícímu se množství lidí, kteří mají problémy s konzumací mléka, z pohledu mléčného cukru, se dostává vyšší poptávky po výrobcích se sníženým obsahem laktózy či bezlaktózových výrobcích.

Stanovení cukrů v mléce a mléčných výrobcích (a samozřejmě i jiných potravinách) je velmi důležité. Mono- a oligosacharidy lze stanovit polarimetricky, refraktometricky, spektrofotometricky, či titračně, nicméně nejvyužívanější metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Pro analýzu cukrů se nejčastěji doplňuje refraktometrickým detektorem.

Rešeršní část diplomové práce se zabývá obecnou charakteristikou mléka a tekutých mléčných výrobků a jejich technologií výroby se zaměřením na mléčný cukr. Dále práce pojednává o možnostech získání a stanovení laktózy chemickými a fyzikálními metodami případně jejich kombinací. Významnou částí je popis procesu fungování vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Dále se práce zaměřuje na využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie při analýze sacharidů resp. cukrů, použití vhodných kolon a volbu vhodného detektoru.

Cílem této diplomové práce bylo navrhnout, optimalizovat a validovat metodiku stanovení cukrů pomocí metody HPLC-RI. Tato metoda pak byla využita pro stanovení mono- a oligosacharidů ve vzorcích mléka a vybraných tekutých mléčných výrobců, které byly získány v tuzemské tržní síti.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MLÉKO A VYBRANÉ MLÉČNÉ SYSTÉMY

Mléko má nezastupitelný význam ve výživě člověka. Mléko je nejdůležitější potravinou ve výživě mláďat savců z důvodu vysokého obsahu látek podporujících imunitu. Celosvětově je známo velké množství druhů mléka. Technologicky je nejvíce využíváno mléko kravské. V menší míře pak mléko buvolí, které je po kravském mléku doménou zemí severní a jižní Ameriky, následuje mléko ovčí a kozí. V České republice je po kravském mléku nemalou měrou zastoupeno i mléko ovčí a kozí. Na trhu se můžeme setkat s mlékem čerstvým, sušeným, zahuštěným, či zakysaným. Nelze opomenout ani mléčné výrobky jako jsou sýry různého typu, smetana, máslo a mražené mléčné výrobky [1, 2]. V této kapitole jsou popsány výrobky, které byly analyzovány v rámci diplomové práce.

1.1 Mléko

Mléko lze definovat jako tekutý sekret produkovaný mléčnými žlázami samic savců. Mléko je bílá až nažloutlá neprůhledná tekutina sladké chuti a vůně. Mléko lze rozdělit na zralé (syrové mléko) a nezralé (mlezivo, starodojné a aberantní mléko) [1, 3, 4, 5].

Dojnice produkuje mlezivo v průběhu laktace 3 – 5 dnů po porodu. Výrazně se od zralého mléka liší svým chemickým složením zejména ve vyšším zastoupení minerálních látek a proučinek. Využívá se výhradně pro výživu mláďat. Za starodojné mléko lze označit mléko před ukončením dojení. Dochází ke snížení obsahu laktózy a kaseinu a ke zvýšení obsahu somatických buněk a syrovátkových bílkovin. Mléka aberantní jsou vylučována při hormonální nemoci dojnice. Nezralá mléka se technologicky nezpracovávají [1, 3].

Zralé mléko je dojnici produkováno po stabilizaci složek mleziva v 5 – 10 dnů po porodu. Mléko lze druhově rozdělit podle obsahu bílkovinných složek na albuminová a kaseinová. Albuminová mléka obsahují méně než 75 % kaseinových bílkovin z celkového obsahu bílkovin. Produkují ho savci s jednoduchým žaludkem. Typickými zástupci albuminových mlék jsou např. kobyly, oslí, mateřské a psí. Kaseinová mléka obsahují více než 75 % kaseinových bílkovin z celkového obsahu bílkovin. Využívají se pro lidskou výživu. Kaseinová mléka produkují přežvýkavci např. skot, ovce, kozy a velbloudi [1, 2, 3].

1.1.1 Chemické složení mléka

Chemické složení kravského mléka (viz Tabulka 1) závisí na mnoha faktorech (plemeno a zdravotní stav dojnice, fáze laktace apod.) [1, 3].

Tabulka 1 Chemické složení kravského mléka [1]

Voda [%]	86 – 88
Dusíkaté látky [%]	3,1 – 3,8
Lipidy [%]	3,5 – 5,5
Sacharidy [%]	4,5 – 5,0
Minerální látky [%]	0,7 – 0,8
Vitaminy, enzymy, hormony atd. [%]	0,2 – 0,5

Z fyzikálně-chemického pohledu jde o polydisperzní systém složený z disperzního prostředí a disperzního podílu. Disperzní podíl je tvořen hrubou disperzí, kterou tvoří tuk, koloidní disperzí tvořenou kaseinovými micelami a některými minerálními látkami (koloidní fosforečnan vápenatý vázaný na kaseinové micely) a pravým roztokem, který tvoří sacharidy a minerální látky [1, 2].

1.1.1.1 Bílkoviny

Mléčné bílkoviny jako biopolymery aminokyselin spoluurčují nutriční hodnotu a fyzikálně-chemické vlastnosti mléka. Z celkového obsahu dusíkatých látek připadá 90 – 95 % celkového dusíku na tzv. čisté bílkoviny a 5 – 10 % na nebílkovinné dusíkaté látky. K nebílkovinným dusíkatým látkám řadíme např. močovinu, amoniak, enzymy, kreatinin, lipoproteiny aj [1, 4, 5].

Čisté bílkoviny lze rozdělit na kaseinové a syrovátkové, což je dáno jejich rozpustností při hodnotě $\text{pH} \approx 4,6$. Kaseinové bílkoviny jsou v kravském mléce průměrně zastoupeny z 80 % celkového obsahu čistých bílkovin. Na sérové bílkoviny připadá 20 % celkového obsahu čistých bílkovin.

Kaseinové bílkoviny jsou fosfoproteiny, které dělíme na čtyři základní frakce: α_{s1} -kasein, α_{s2} -kasein, β -kasein, κ -kasein. Frakce α_{s1} , α_{s2} a β -kasein se sráží v přítomnosti vápenatých iontů. κ -kasein se v přítomnosti vápenatých iontů nesráží [1, 3, 4].

Fosfor jako zbytek kyseliny fosforečné je v kaseinech estericky vázán na hydroxylovou skupinu serinu za vzniku fosfoserinu. V těchto úsecích vykazuje molekula proteinu hydrofilní vlastnosti. Kaseiny jsou obsaženy v mléce ve formě micel. Na povrchu micely je orientován κ -kasein, který díky hydrofilní sacharidické složce tvoří ochranný koloid pro ostatní frakce a stabilizuje micelu. Stabilitu micely lze narušit snížením pH na hodnotu izoelektrického bodu kaseinu (pH 4,6) kdy dojde ke srážení micel (tzv. kyselé srážení). K destabilizaci kaseinu dochází i přidávkem enzymu (chymozin) štěpícího strukturu κ -kaseinu. Poté dochází ke koagulaci bílkovin. Zde hovoříme o sladkém srážení. Z pohledu změny teploty jsou kaseiny při běžném technologickém zpracování termostabilní [1, 2].

Sérové bílkoviny jsou tvořeny frakcemi β -laktoglobulin, α -laktalbumin, sérum albumin, imunoglobuliny, proteózo-peptony (štěpy β -kaseinu). V porovnání s kaseiny netvoří micely, nesráží se působením syřidla, při pH 4,6 jsou rozpustné. Jsou poměrně málo termostabilní. β -laktoglobulin denaturuje již při teplotě 70 °C, α -laktalbumin denaturuje při teplotách nad 100 °C. β -laktoglobulin a α -laktalbumin jsou technologicky nejvýznamnější sérové bílkoviny. Imunoglobuliny jsou ve zralém mléce obsaženy v nízké koncentraci (do 3 % celkového proteinu). Ve vyšším množství jsou obsaženy v mlezivu (až 10 %). Slouží jako indikátor onemocnění dojnice. Ve vyšší koncentraci inhibují činnost některých bakterií, proto jsou při technologickém zpracování nežádoucí [2, 3, 4].

1.1.1.2 Lipidy

Lipidy se v kravském mléce vyskytují především ve formě triacylglycerolů (97 – 98 % z celkového množství lipidů mléka). Zbývá 2 – 3 % tvoří diacylglyceroly a monoacylglyceroly, volné mastné kyseliny, fosfolipidy, steroly a vitaminy rozpustné v tucích. V mléčném tuku jsou ve významnějším množství zastoupeny 4 – 18 uhlíkaté mastné kyseliny se sudým počtem uhlíků v řetězci. Z nasycených mastných kyselin převažují myristová, palmitová a stearová. Z nenasycených mastných kyselin stojí za zmínku kyselina olejová. Typické aroma tuku tvoří mastné kyseliny s krátkým řetězcem (do 10 uhlíků v řetězci). Zastoupení mastných kyselin s krátkým řetězcem je v mléčném tuku téměř 10 % [1, 3, 6].

Tuk je v mléce rozptýlen ve formě tukových kuliček. Průměr tukových kuliček se obvykle pohybuje v rozmezí 0,1 – 20 μm . V 1 ml mléka je řádově obsaženo asi 10^{10} tukových kuliček. Tuk je v mléce jemně rozptýlen a zaujímá velký povrch. Výhodou je velmi dobrá stravitelnost. Nevýhodou je přijímání nežádoucích pachů [1, 3, 4, 7].

1.1.1.3 Sacharidy

Nejvíce zastoupeným sacharidem v mléce je disacharid laktóza. Jeho výskyt je omezen výhradně na mléko, proto je také nazýván mléčný cukr. V menším množství lze v mléce detekovat glukózu, galaktózu, fruktózu aj [3, 4].

Z chemického hlediska je laktóza tvořena dvěma monosacharidy, glukózou a galaktózou, za vzniku disacharidu O- β -D-galaktopyranosyl-(1-4)-D-glukopyranózy. V mléce se laktóza vyskytuje ve dvou anomerech jako α -laktóza a β -laktóza. Dodává mléku nasládlou chuť. Sladivost laktózy je asi třetinová oproti sacharóze. Je velmi dobře stravitelná. Spoluurčuje osmotický tlak v mléce [1, 8].

Z technologického hlediska je významným substrátem pro bakterie mléčného kvašení za vzniku kyseliny mléčné. Toho se využívá zejména při výrobě kysaných mléčných výrobků a zrajících sýrů. Člověk dokáže laktózu metabolizovat v tenkém střevě pomocí enzymu laktáza. Při nedostatku tohoto enzymu v tenkém střevě vzniká nesnášenlivost laktózy tzv. intolerance laktózy. Člověk s absencí či malou aktivitou laktázy není schopen štěpit laktózu, čímž vznikají zažívací potíže. Řešením je vyřadit z jídelníčku konzumní mléko a naopak zařadit do svého jídelníčku mléčné výrobky, které obsahují menší množství laktózy (např. sýry a fermentované mléčné výrobky). Na trhu je též dostupný bohatý sortiment bezlaktózových výrobků a výrobků se sníženým obsahem laktózy [1, 6, 9].

1.1.1.4 Ostatní složky mléka

Minerální látky jsou v mléce přítomny ve formě sodných, draselných vápenatých a hořečnatých solí fosforečnanů, citronanů, chloridů, síranů, uhličitanů a hydrogenuhličitanů. Mohou být navázány na jiné složky mléka, např. na bílkoviny a tuky. Zastoupení minerálních látek v mléku je 0,7 – 0,8 %. Spolu s laktózou udržují v mléce osmotický tlak. Slouží primárně k výživě mláďat. Některé minerální látky plní funkci enzymových kofaktorů [1, 3, 9].

V mléce jsou obsaženy vitaminy rozpustné v tuku (A, D, E, K) i vitaminy rozpustné ve vodě (vitaminy skupiny B a vitamin C). Zapojují se do metabolických drah jako koenzymy, prekurzory hormonů a působí jako antioxidanty. Vitaminy jsou zejména určeny k výživě mláďat [3, 6].

Enzymy jsou proteiny, které mohou mít ve své struktuře navázanou nebílkovinnou složku (kofaktor). Lze je označit jako biokatalyzátory biochemických reakcí. V mléce se vyskytu-

je až 100 různých enzymů. Můžeme je dělit podle původu na exogenní a endogenní. Nativní enzymy nalezneme v povrchových vrstvách tukových kuliček (přechází do smetany), jsou asociovány s kaseinovými micelami nebo jsou volně rozptýleny v mléčném séru. Aktivita enzymů závisí především na teplotě a pH mléka. Z pohledu antibakteriálního, organoleptického a nutričního nemá většina enzymů pozitivní účinky. Proto je žádoucí jejich inaktivace během technologických operací při výrobě. Inaktivace probíhá tepelným záhřevem [1, 4, 6].

1.2 Syrovátka

Syrovátka se pro své biologické vlastnosti využívá k výrobě výrobků, které slouží k výživě lidí a hospodářských zvířat. Podle způsobu výroby se dělí na syrovátku získanou sladkým srážením a syrovátku získanou kyselým srážením. Syrovátka slouží k získávání jednotlivých složek (laktóza, bílkoviny). Tyto složky mohou být dále využívány v potravinářství, farmacii, krmivářství apod. [10, 11]. Chemické složení syrovátky je uvedeno v Tabulce 2.

Tabulka 2 Chemické složení syrovátky [11]

Složka	Sladká syrovátka	Kyselá syrovátka	Kaseinová syrovátka
Sušina [%]	6,20	5,70	6,10
Laktóza [%]	4,80	4,60	4,70
Bílkoviny [%]	0,75	0,30	0,50
Tuk [%]	0,05	<0,01	<0,01
Popeloviny [%]	0,60	0,80	0,90
pH	6,10	4,60	4,40

1.2.1 Získávání syrovátky

Syrovátka vzniká jako vedlejší produkt výroby sýrů (sladké srážení), tvarohů a kaseinu (kyselé srážení) [10].

1.2.1.1 Sladké srážení

Podstatou sladkého srážení je aplikace proteolytického enzymu chymozinu (syřidla) do mléka. Chymozin specificky štěpí κ -kasein mezi 105. a 106. aminokyselinou. Sladké srážení probíhá ve dvou stupních. V prvním stupni dojde k rozštěpení struktury κ -kaseinu na dva peptidy, κ -kaseinmakropeptid (hydrofilní) a para- κ -kasein (hydrofobní). Odštěpením κ -kaseinmakropeptidu, který odchází do syrovátky, již není κ -kasein schopen plnit funkci ochranného koloidu. Frakce para- κ -kasein zůstává součástí koagula. Druhým stupněm je koagulace kaseinových micel prostřednictvím vazby vápenatých iontů na fosforetinové zbytky jednotlivých frakcí kaseinu. Poté dochází k tvorbě koagula. První i druhý stupeň probíhá současně a prolíná se [1, 3].

Důležitými faktory, ovlivňujícími srážení, jsou množství syřidla (určuje dobu srážení: obvykle 20 – 40 min), teplota, pH systému a přítomnost vápenatých iontů. Při teplotách pod 15 °C proces srážení neproběhne [1, 10].

1.2.1.2 Kyselé srážení

Podstatou kyselého srážení je snížení pH k izoelektrickému bodu kaseinu. Izelektrický bod je u kaseinu uzančně stanoven na hodnotu pH 4,6. Molekula kaseinu se jeví navenek elektroneutrální a ztrácí hydratační obal. Na povrchu kaseinové micely dochází k vyrovnání nábojů a disociaci fosforečnanu vápenatého. Dochází k destabilizaci soudržnosti micelární struktury. Působením hydrofobních interakcí a elektrostatických sil dojde k vytvoření koagula. Proces kyselého srážení je postupný. Probíhá nejlépe při teplotě nad 20 °C. Nižší teploty srážení výrazně zpomalují. Naopak při teplotách okolo 40 °C může dojít ke vzniku gumovité drobné konzistence [1, 3, 10].

Při výrobě tvarohu dochází ke snižování pH bakteriemi mléčného kvašení. Bakterie mléčného kvašení přeměňují substrát (laktózu) na kyselinu mléčnou, čímž dochází ke snížení pH. Při výrobě měkkých tvarohů se aplikuje i malé množství proteolytického enzymu. Při výrobě kaseinu, kde není kladen důraz na sensorické vlastnosti, lze pH snížit přidáním kyseliny mléčné či jiných kyselin do mléka [1, 10].

Kyselé srážení je v porovnání se sladkým srážením pomalejší. Urychlení procesu kyselého srážení se dá dosáhnout zvýšením teploty srážení [1].

1.2.2 Úprava a technologické zpracování syrovátky

Před technologickým zpracováním syrovátky se téměř vždy provádí její čištění a úprava. Odstraňují se zbytky koagula (sýrařský prach) z důvodu možného ovlivnění dalších technologických operací. Sýrařský prach může ovlivnit i organoleptické vlastnosti výsledného produktu. Používá se kombinace různých technik odstraňování, např. usazování, odstředování, scezování apod. Sirovátka získaná při výrobě sýra obsahuje stopy tuku, které se následně odstraňují na odstředivkách. Pasterace se provádí při teplotě 72 – 78 °C s výdrží 15 – 20 s. Pasterací se sníží počet živých mikroorganismů a dochází k inaktivaci chymozinu [10].

1.2.2.1 Demineralizace syrovátky

Při demineralizaci jsou ze syrovátky odstraněny ionty anorganických sloučenin. Demineralizace se provádí elektrodialýzou, pomocí iontoměničů, membránové techniky a filtrací. Snížení obsahu minerálních látek zejména u kyselé syrovátky docílíme snížením hydroskopie. Po demineralizaci vzniká diluát a koncentrát, kde diluát je demineralizovaná syrovátka (90 – 95 % původního množství) a koncentrát je roztok solí [10].

1.2.2.2 Zahuštění syrovátky

Zahuštění syrovátky probíhá na průmyslových odparech. Zahuštěním dochází ke snížení obsahu vody z původních 93 – 96 % na 50 – 60 % sušiny. Při zahuštění syrovátky na sušinu vyšší než 65 % mohou vypadávat krystalky laktózy již během procesu odpařování. V případě následného sušení se teplota odpařování pohybuje do 75 °C. Při teplotě nad 75 °C denaturují sérové bílkoviny a zvyšují následnou hygroskopicitu syrovátkového prášku. Pro použití syrovátky pro pekařské účely se teplota odpařování pohybuje nad 75 °C [2, 5, 10].

1.2.2.3 Krystalizace laktózy

Krystalizace laktózy se zpravidla provádí jako předstupeň sušení syrovátky. Lze jej využít i k oddělení laktózy ze syrovátky. Krystalizační proces probíhá za teploty 20 – 35 °C po dobu 2 – 24 hodin. Po ochlazení je asi 70 % laktózy ve formě krystalků. Krystalizace probíhá v zahuštěné syrovátce [2, 10].

1.2.2.4 Sušení syrovátky

Proces sušení syrovátky se provádí sušením ve válcových sušárnách nebo sušením ve sprejových sušárnách. Předstupněm sušení bývá zahušťování syrovátky na odparkách, což je z ekonomických důvodů výhodnější [5, 10].

Sušení ve válcových sušárnách je ovlivněno vysokým obsahem laktózy. Při rychlém sušení laktóza nevykrytalizuje a stává se z ní amorfní sklovitá tavenina. Amorfní laktóza zvyšuje lepivost sušené syrovátky. Syrovátka je nanášena na dva proti sobě se otáčející válce, kde dochází k odpaření vody a tvorbě filmu sušené syrovátky. Tenký film sušené syrovátky je odškrabován nožem [5, 12].

Sprejové sušárny jsou nejrozšířenější způsob sušení syrovátky. Laktóza se před sušením nechává zpravidla předkrytalizovat. Sušená syrovátka s částečně vykrytalizovanou laktózou vykazuje nižší hygroskopicitu a lepší rozpustnost v porovnání se sušenou syrovátkou s nevykrytalizovanou laktózou. Zahuštěná syrovátka je rozprašována jemnou mlhovinou do horkého vzduchu. Dochází k odparu vody a sušená syrovátka padá na dno sušárny, odkud je odpravena a chlazena [5, 10, 11].

1.3 Smetana

Podle vyhlášky Ministerstva zemědělství České republiky 77/2003 Sb. v platném znění je smetana tekutý mléčný výrobek s obsahem tuku nejméně 10 % hmotnostních ve formě emulze mléčného tuku v plazmě získaný fyzikální separací z mléka. Dělí se na tekutou, zahuštěnou a sušenou smetanu. Tekutá smetana se dále dělí na smetanu (obsah tuku více než 10 % hmotnostních), smetanu ke šlehání (obsah tuku více než 30 % hmotnostních) a smetanu vysokotučnou (obsah tuku více než 35 % hmotnostních) [13].

1.3.1 Získávání smetany

Základními kroky při výrobě smetany jsou odstředění mléka, standardizace obsahu tuku, homogenizace a tepelné ošetření.

Odstředění mléka (odsmetaňování) se provádí na odsmetaňovacích odstředivkách. Cílem je získat smetanu a odstředěné mléko s minimálním obsahem tuku. Účinnost odsmetaňování se posuzuje podle tučnosti odstředěného mléka. Po odsmetaňování zůstává tučnost odstředěného mléka obvykle 0,04 – 0,07 % hmotnostních. Tučnost smetany se pohybuje v rozmezí 35 – 45 % hmotnostních [1, 3, 4].

Standardizací obsahu tuku dosáhneme rozdílné tučnosti podle požadované tučnosti konečného produktu. Standardizace probíhá dvěma způsoby. Do standardizačního zařízení se napustí vypočtený objem odstředěného mléka a smetany. Tento způsob je diskontinuální. Kontinuálně se smetana standardizuje pomocí průtokových zařízení, která jsou vybavena měřicími a regulačními prvky. Tyto prvky měří tučnost složek před smícháním a regulují jejich průtok [1, 4].

Homogenizací smetany dosáhneme zmenšení tukových kuliček a zvětšení jejich povrchu. Tím se značně zpomalí rychlost vyvstávání tukových kuliček, což je u většiny výrobků nežádoucím jevem [9, 14].

Tepelné ošetření smetany zahrnuje pasteraci, sterilaci nebo UHT záhřev. Pasterace probíhá za teplot 90 – 100 °C s výdrží několika sekund. Sterilace smetany probíhá ve spotřebitelském obalu, který se steriluje při teplotě 112 – 140 °C s dobou výdrže 20 – 30 min. Sterilace se provádí v autoklávech. Takto se steriluje zejména smetana do kávy. Tepelné ošetření smetany metodou UHT se provádí za teplot 137 – 142 °C s výdrží 1 – 2 s. Po UHT ošetření je smetana asepticky zabalena do obalů [1, 4].

1.4 Fermentované mléčné výrobky

Fermentované mléčné výrobky je označení pro širokou škálu mléčných výrobků, mezi které řadíme jogurtové výrobky, kysaná mléka, kysané podmáslí, kefir, kumys, acidofilní mléka, kysané smetany a další. Národní legislativa definuje kysaný mléčný výrobek jako mléčný výrobek získaný kysáním mléka, smetany, podmáslí nebo jejich směsi za použití mikroorganismů, tepelně neošetřený po kysacím procesu [3, 15].

Fermentované mléčné výrobky můžeme rozdělit podle použitých mlékařských kultur do dvou základních skupin [16]:

1. Fermentované mléčné výrobky s mezofilními bakteriemi mléčného kvašení
2. Fermentované mléčné výrobky s termofilními bakteriemi mléčného kvašení

1.4.1 Fermentované mléčné výrobky s mezofilními bakteriemi mléčného kvašení

Výroba těchto mléčných výrobků probíhá při teplotě optimální pro růst mezofilních čistých mlékařských kultur v rozmezí 10 – 40 °C. Mezofilní kultury obvykle obsahují kmeny *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*.

Široká škála těchto výrobků představuje fermentovaná mléka, kysané podmásli, kysanou smetanu aj [3, 16].

Kysané podmásli se vyrábí z podmásli, jakož to vedlejšího produktu při výrobě másla buď samostatně či s přídavkem mléka.

Pro výrobu kysané smetany se používá smetana. Obvyklá tučnost smetany se pohybuje v rozmezí 10 – 12 % nebo 20 – 30 %. K inokulaci smetany se používají čisté mlékařské kultury *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a aromatické kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* [14, 17].

1.4.2 Fermentované mléčné výrobky s termofilními bakteriemi mléčného kvašení

Nejrozšířenější fermentované mléčné výrobky s termofilními bakteriemi mléčného kvašení (BMK) jsou jogurty a jogurtové výrobky. Jogurt je v národní legislativě definován jako kysaný mléčný výrobek získaný kysáním mléka, smetany, podmásli nebo jejich směsi pomocí mikroorganismů *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*. Jogurtové výrobky mohou obsahovat kromě základní jogurtové kultury i kmeny produkující kyselinu mléčnou a pomáhající dotvářet specifickou chuťovou nebo texturovou charakteristiku výrobku. Musí však být zachován optimální poměr obou základních kmenů jogurtové kultury [13].

Jogurty lze rozdělit podle způsobu fermentace:

- Jogurty s rozmíchaným koagulátem – fermentace v tanku, po promíchání koagulátu a vychlazení naplnění do spotřebitelského balení
- Jogurty s nerozmíchaným koagulátem – fermentace přímo ve spotřebitelském obalu
- Jogurtové nápoje – fermentace v tanku, přídavek přísad po ochlazení na 18 – 20 °C ve vyrovnávacím tanku [14]

Jogurtové nápoje jsou vyráběny téměř analogicky jako jogurty s rozmíchaným koagulátem. Vyznačují se nižší viskozitou a jsou určeny k pití [14, 17].

Pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků lze využít acidofilní a bifidové kultury.

Fermentací mléka bakteriemi *Lactobacillus acidophilus*, či *Bifidobacterium* spp. se získává např. acidofilní mléko. Tyto kultury bývají používány v kombinaci s jinými kmeny BMK. Je to dáno tvorbou metabolitů kyselé a štiplavé chuti u acidofilních kultur a metabolitů octové chuti u bifidových kultur [15, 16].

Další skupina fermentovaných mléčných výrobků se vyrábí s využitím BMK a kvasinkových kultur.

Význačnou část těchto výrobků na trhu zastupují výrobky asijského původu kefir a kefirové mléko, kumys a šubat. Tyto výrobky se vyrábí z mléka kozího, kravského a ovčího. Vyrábí se z tzv. kefirových zrn. Z kvasinek se používají zástupci rodu *Candida*, *Sacharomyces*, *Kluveromyces* a *Torula*. Bakterie mléčného kvašení zastupují rody laktokoků a laktobacilů, *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus kefir* [15, 16, 17].

1.5 Výrobky se sníženým obsahem laktózy a bezlaktózové mléčné výrobky

Průmyslově jsou vyráběny výrobky se sníženým obsahem laktózy a výrobky bezlaktózové. Tyto pojmy jsou zakotveny v tuzemské legislativě. Výrobky se sníženým obsahem laktózy mohou obsahovat max. 1 g laktózy ve 100 g nebo 100 ml potravin ve stavu určeném ke spotřebě. Bezlaktózové výrobky mohou obsahovat max. 10 mg laktózy ve 100 g nebo 100 ml potravin ve stavu určeném ke spotřebě a ve kterých je přítomnost volné galaktózy vyloučena. [18].

Evropská legislativa z pohledu bezlaktózových výrobků a výrobků se sníženým obsahem laktózy uvádí v nařízení EU 609/2013 (článek 42) pravidla týkající se označování a složení potravin, na jejichž základě jsou uváděny informace o nepřítomnosti laktózy či o jejím sníženém obsahu v potravině. Tato pravidla nejsou v současné době na úrovni Unie sjednocena. Pro osoby s nesnášenlivostí laktózy mají ovšem tato označení velký význam. Nařízení (EU) č. 1169/2011 stanoví pravidla pro poskytování informací o látkách, u nichž bylo vědecky prokázáno, že mohou vyvolat alergii nebo nesnášenlivost, aby měli spotřebitelé, jako například osoby s nesnášenlivostí laktózy, možnost informovaného výběru potravin, které jsou pro ně bezpečné. Z důvodu přehlednosti a jednoznačnosti by zavedení pravidel týkajících se používání tvrzení o nepřítomnosti laktózy či o jejím sníženém obsahu v potravinách mělo také být upraveno podle nařízení (EU) č. 1169/2011, s přihlédnutím k vědeckému stanovisku úřadu ze dne 10. září 2010 o prahových hodnotách laktózy při nesnášenlivosti laktózy a galaktosémie [19].

Bezlaktózové výrobky a výrobky se sníženým obsahem laktózy jsou určeny především pro skupiny lidí trpící intolerancí laktózy. Nemožnost štěpit laktózu je dána ztrátou schopnosti syntetizovat enzym laktáza či jeho nízkou aktivitou.

Osoby trpící galaktosémií, dědičnou poruchou metabolismu galaktózy, také “netolerují” laktózu, ale jejich symptomy jsou závažnější a liší se značně od symptomů osob s intolerancí laktózy [20].

Symptomy intolerance laktózy byly popsány u některých osob po příjmu méně než 6 g laktózy. Podle panelu NDA (Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies) naprostá většina osob s poruchou trávení laktózy bude tolerovat až 12 g laktózy jako jednu dávku, při které se symptomy neprojeví nebo budou jen mírné. Vyšší dávky mohou být tolerovány, pokud konzumace potravin s obsahem laktózy se rozdělí do dne. Nelze proto udat přesnou prahovou hodnotu pro příjem laktózy/galaktózy, pod kterou nedochází k vyvolání nežádoucích účinků. Výrobky, z kterých je laktóza částečně odstraněna enzymovou hydrolyzou na glukózu a galaktózu, a není z nich následně odstraněna galaktóza, nejsou vhodné pro pacienty trpící galaktosémií bez ohledu na zbytkový obsah laktózy [20, 21].

Technologický proces výroby mléčných výrobků se sníženým obsahem laktózy či bezlaktózových výrobků se principiálně provádí přidáním enzymu laktáza do pasterovaného mléka, jež štěpí laktózu na dva monosacharidy. V zásadě se jedná o diskontinuální proces. Hydrolyza probíhá při teplotě do 10 °C. Kratší inkubační doby lze dosáhnout při teplotě 37 °C. Proces hydrolyzy se ukončuje při snížení obsahu laktózy na hodnotu 0,1 g ve 100 g. Mléko po hydrolyze vykazuje sensoricky sladší chuť. Vzniklé molekuly monosacharidů glukózy a galaktózy vykazují vyšší sladivost než molekula oligosacharidu laktózy. Během enzymatické degradace laktózy dochází ke vzniku galaktooligosacharidů (GOS) tzv. transgalaktosylaci. Na GOS se přemění 5 – 10 % laktózy. Množství syntetizovaného GOS se odvíjí od množství použitého enzymu. Při výrobě bezlaktózového mléka vysoko- teplotně ošetřeného technologií UHT se mléko po hydrolyze dále tepelně neošetřuje. V takto ošetřeném mléku zůstává enzym laktáza aktivní [22].

Kvůli odstranění negativních vlastností způsobených poměrně vysokým obsahem monosacharidů v enzymaticky hydrolyzovaném mléce byl vyvinut chromatografický proces oddělení laktózy. Tento proces spočívá v oddělení iontové složky (bílkoviny, soli) a neiontové složky (laktóza). Postup je poměrně časově náročný. Odstranění laktózy není úplné, proto se proces doplňuje enzymatickou hydrolyzou [21, 22].

Separaci laktózy mléka lze dosáhnout pomocí metody membránové filtrace. Permeát získaný po ultrafiltraci (UF) odtučněného mléka je podroben nanofiltraci (NF). NF-permeát je koncentrován reverzní osmózou (RO). Retentát z RO je přidán k retentátu z UF. Odstranění laktózy není úplné, proto se proces doplňuje enzymatickou hydrolyzou [22].

U fermentovaných mléčných výrobků dochází k úbytku laktózy kysacím procesem BMK. Laktóza slouží jako substrát BMK a je metabolizována na kyselinu mléčnou a vedlejší metabolické produkty. K využití výroby fermentovaných mléčných výrobků se níženým obsahem laktózy či bezlaktózových výrobků je brána v úvahu kombinace technologie fermentace a enzymatické degradace laktózy. Aktivita laktázy významně klesá pod hodnotou pH 5,7. Rychlost fermentace BMK je ovlivněna řadou faktorů, přičemž degradace laktózy stimuluje růst jogurtové kultury. Tím dochází k rychlejšímu snížení pH. Předmětem vývoje jsou kultury adaptované na mléko – substrát po hydrolýze laktózy [21, 22].

2 METODY STANOVENÍ MONO- A OLIGOSACHARIDŮ

Před samotným stanovením je důležitá úprava vzorku potravin a izolace sacharidů. Nejběžnější izolace sacharidů je prováděna extrakcí. Extrakce je nejjednodušší a jedna ze základních separačních metod. Principem této metody je přechod látek z tuhé či kapalné fáze do jiné kapalné fáze za pomoci extrakčního činidla. Výběr vhodného extrakčního činidla je základem úspěchu celého procesu izolace. Rozpouštědla používaná pro extrakci sacharidů mohou obsahovat vodu, alkohol, chloroform nebo roztoky těchto látek [23, 24, 25, 26].

Voda v deionizovaném stavu je vhodné medium pro izolaci sacharidů. Principem je jejich rozpuštění a přechod do deionizované vody. Izolace je provedena převedením 25 g vzorku do 10 ml vody a jejich následná homogenizace. Extrakce sacharidů probíhá při teplotě do 50 °C po dobu 3 – 5 minut. Po ukončení extrakce se vzorek dále číří čířicími činidly. Přidáním malého množství chloridu rtuťnatého lze předcházet enzymatickým změnám [23, 24, 27].

K izolaci sacharidů lze využít i 80% etanol. Etanol je vhodnější u vzorků, kde může docházet k enzymovým změnám (např. enzymová inverze sacharózy, tvorba redukcujících cukrů). Izolace je prováděna v několika stupních [23, 24, 25].

V této kapitole jsou popsány chemické a fyzikální metody stanovení sacharidů, stanovení cukrů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie je věnována kapitola 3.

2.1 Čiření sacharidů

Roztoky extrakčních činidel a sacharidů nejsou zpravidla vhodné pro přímá stanovení. Vyčištění vzorku je prováděno čířidly. Výběr čířidla je řízen druhem analyzovaného vzorku a následnou použitou metodou stanovení. Čířidla nesmí adsorbovat cukry, což je základním požadavkem jejich použití. Cílem čiření je odstranění opticky aktivních látek, bílkovin a tuků z roztoku, které by mohly ovlivnit samotné stanovení. Po čiření následuje filtrace vzorků [23, 27].

2.1.1 Zásaditý octan olovnatý

Využití zásaditého octanu olovnatého lze nalézt především v cukrovarnické analytice. Velmi dobře odstraňuje bílkoviny a opticky aktivní kyseliny. Využívá se k čiření neutrálních či slabě alkalických šťáv. V kyselém prostředí jeho účinnost klesá. Nevýhodou je jeho ovlivnění polarimetrického stanovení nejvíce ze všech čířidel. V tekuté formě se využívá

v množství do 30 ml na 100 ml čířeného vzorku. V pevné formě do 1,5 g na 100 ml čířeného vzorku [24, 27].

2.1.2 Neutrální octan olovnatý

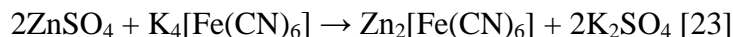
Roztok neutrálního octanu olovnatého je využíván k číření neutrálních vzorků. Méně se hodí k číření kyselých vzorků. Do vzorku je přidáván do ukončení tvorby sraženin. K dokonalému vysrážení balastních látek je přidáván s malým nadbytkem. Možné zakalení vzorku způsobené tvorbou uhličitanu olovnatého se odstraní přidáním 10% hydrogenfosforečnanu sodného. Při tomto způsobu číření dojde k odstranění všech opticky aktivních organických kyselin. Odstranění bílkovin je však nedokonalé [24, 27].

2.1.3 Kyselina fosfowolframová

Využití kyseliny fosfowolframové je zvláště vhodné pro kyselé roztoky. V těchto roztocích velmi dobře odstraňuje bílkoviny i jejich štěpné produkty. Používá se jako 5% vodný roztok v množství do 10 ml na 100 ml roztoku vzorku [23, 27].

2.1.4 Číření podle Carreze

Principem číření podle Carreze je přidání síranu zinečnatého (Carreze I) a hexakynoželeznatanu draselného (Carreze II) do vzorku cukerného roztoku za vzniku objemné sraženiny. Množství 5 ml 30% síranu zinečnatého a 5 ml 15% hexakynoželeznatanu draselného se používá k číření 100 ml vzorku cukerného roztoku. Tento způsob číření velmi dobře odstraňuje bílkoviny, méně slizovité látky. Je vhodný u kyselých vzorků. Neutrální a alkalické vzorky se před použitím této metody musí okyselit zředěnou kyselinou octovou [23, 27, 28, 29].



2.1.5 Číření podle Herlese

K číření se využívá smíchání roztoku dusičnanu olovnatého a hydroxidu sodného za vzniku zásaditého dusičnanu olovnatého. Nejdříve se do vzorku přidá roztok dusičnanu olovnatého a dokonale se rozmíchá. S půl hodinovým odstupem je přidán hydroxid sodný. Tím dojde ke zvýšení čířící schopnosti. Tento způsob nalezne uplatnění k číření slabě kyselých, neutrálních a slabě alkalických roztoků. Silně alkalické roztoky je nutno neutralizovat zředěnou kyselinou octovou na indikátor fenolftalein [23, 27, 29].

2.2 Chemické metody

Při stanovení sacharidů chemickými metodami je využíváno jejich reaktivní funkční skupiny. Tyto skupiny jsou schopny z alkalického prostředí měďnatých solí vyredukovat oxid měďný. Stanovením přebytku mědi či oxidu měďného lze určit množství cukrů. Přebytky mědi se nejčastěji stanovují manganometricky a jodometricky. Fotometricky lze stanovit barevné komplexy mědi či jiných barevných sloučenin. Tyto metody lze použít u redukcí cukrů. Neredukující cukry je třeba hydrolyticky rozštěpit na redukcí nebo je stanovit fyzikálně–chemickými nebo biologickými metodami [23, 28, 30].

2.2.1 Metody založené na redukčních schopnostech cukrů

2.2.1.1 Metoda podle Bertranda

Přidáním Felingova roztoku I (síran měďnatý) a Felingova roztoku II (vinan sodnodraselný a hydroxid sodný) do cukerného vzorku vzniká hydroxid měďnatý, který se v přebytku Felingova roztoku II rozpustí za vzniku Felingova komplexu. Reakce Felingova komplexu s redukcí cukry probíhá za varu po dobu 2 minut. Reakcí vzniká oxid měďný, cukerné kyseliny a regeneruje se vinan sodnodraselný. Oxid měďný v podobě červené sraženiny se promyje a odfiltruje. Sraženina oxidu měďného se rozpustí v síranu železitém, který obsahuje kyselinu sírovou. Dochází k oxidaci mědi na dvoumocné kationty, přičemž se redukuje ekvivalentní množství síranu železitého na síran železnatý. Stanovení dvojmocného železa probíhá v kyselém prostředí manganistanem draselným. Výpočtem se ze spotřeby manganistanu draselného určí obsah mědi, který je úměrný redukcí cukrům [23, 27, 31].

2.2.1.2 Metoda podle Luffa - Schoorla

Metoda Luffa – Schoorla je založena na redukčních schopnostech redukcí sacharidů, kdy redukcí cukry za varu v alkalickém prostředí redukcí měďnatou sůl přidanou z Luffova roztoku na oxid měďný. Přebytek měďné soli je následně stanoven jodometricky. Pro značnou přesnost je metoda používána jako arbitrážní především v cukrovinkářském průmyslu. Metoda je dále využívána pro stanovení cukrů v rostlinných surovinách potravinářského průmyslu.

Cukr je ze vzorku izolován 80% etanolem. Vyčeření se provádí Carrezovým činidlem. Pro stanovení musí být filtrát čirý. Po převedení 25 ml Luffova roztoku a 25 ml vzorku do Erlenmeyerovy baňky jsou roztoky vařeny 10 min. Po rychlém ochlazení se přidají 3 g jodidu

draselného, 20 ml 20% kyseliny sírové a roztok se titruje tiosíranem sodným o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ do slabě žlutého zbarvení. Přidají se 2 ml 3% roztoku škrobu jako indikátoru a roztok se titruje do vymizení modrého zbarvení. Obdobným způsobem je proveden slepý pokus, kde místo cukerného roztoku vzorku je přidána deionizovaná voda. Z tabulky se odečte nebo se interpolací stanoví hmotnost glukózy nebo invertního cukru v mg odpovídající rozdílu mezi oběma titračními spotřebami, vyjádřenými v ml spotřeby tiosíranu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Výsledek se vyjádří v hmotnostních procentech glukózy nebo invertního cukru vztažených na sušinu [23, 27, 32].

2.2.2 Metody založené na barevných kondenzačních reakcích degradačních produktů

2.2.2.1 Metoda podle Duboise

Tato metoda je založena na fyzikálně–chemickém stanovení cukrů spektrofotometricky. Cukry ve vzorku jsou dehydratovány kyselinou sírovou. Přidáním fenolu dochází ke kondenzaci vzniklého furfuralu či 5-hydroxymethylfurfuralu za vzniku barevných kondenzačních produktů. Barevné kondenzační produkty jsou stanoveny spektrofotometricky [28, 32].

2.2.2.2 Metoda podle Somogyiho

Redukující sacharidy vzorku redukují za varu v alkalickém prostředí měďnatou sůl dodanou do vzorku Somogyiho činidlem. Vznikající měďná sůl reaguje s přidáním Nelsonovým činidlem za vzniku barevného modrozeleného komplexu. Koncentrace vzniklých barevných komplexů je zjištěna na základě absorpance při vlnové délce 540 nm proti slepému pokusu [27, 28, 32].

2.3 Fyzikální metody

2.3.1 Polarimetrie

Jedná se o optickou metodu. Principem polarimetrie je schopnost opticky aktivních látek stáčet rovinu polarizovaného světla doleva nebo doprava. Optická aktivita sacharidů je dána přítomností chirálního uhlíku v molekule. Měřítkem optické aktivity je měrná otáčivost. Měrná otáčivost je definována jako úhel, o který se stočí rovina polarizovaného světla při tloušťce vrstvy 1 dm a koncentraci roztoku $1 \text{ kg}\cdot\text{dm}^{-3}$. Zdrojem monochromatického světla jsou sodíkové nebo rtuťové výbojky. Měřicím přístrojem je polarimetr.

Polarimetr sestává z polarizátoru a analyzátoru. V polarizátoru vzniká polarizované světlo, analyzátor měří úhel otočení. Mezi polarizátor a analyzátor se vkládá trubice naplněná měřenou opticky aktivní látkou. Rovnoběžná poloha polarizátoru a analyzátoru vyobrazuje zorné pole úplně světlé. Při zkřížené poloze je zorné pole úplně tmavé. Vložením opticky aktivní látky mezi polarizátor a analyzátor v rovnoběžné poloze, dojde k zatemnění zorného pole. Otáčením analyzátoru, na jehož objímce je vyobrazena úhlová stupnice, se dosáhne původní světlosti zorného pole. Naměřený úhel vykazuje míru optické otáčivosti aktivní látky [23, 33, 34, 35].

2.3.2 Refraktometrie

Podstatou refraktometrických metod je měření indexu lomu paprsku dopadajícího na fázové rozhraní. Index lomu vyjadřuje poměr rychlosti světla ve vakuu k poměru rychlosti světla v materiálu. Index lomu látky lze stanovit měřením úhlu dopadu a úhlu lomu na rozhraní mezi stanovovanou látkou a látkou známého prostředí. Nejvhodnější prostředí je vakuum. V praxi se využívá vzduch. Měření se provádí pomocí refraktometru. Nejběžnější je Abbeův refraktometr. V praxi jsou využívány i ruční a ponorný refraktometr. Metoda nachází uplatnění při detekci cukrů v čistých cukerných roztocích, ke kontrole čistoty chemických látek, stanovení jedné látky ve směsi [23, 33, 34, 35].

2.3.3 Gravimetrie

Obecně je gravimetrie měření hmotnosti látek. Principem gravimetrie u použití měření sacharidů je převedení sacharidů ve vzorku na velmi málo rozpustnou látku pomocí vhodných srážecích činidel. Sraženina je vysušena a následně zvážena.

Metoda gravimetrie je využívána pro stanovení škrobu. Jmenovitě metoda stanovení škrobu podle Raska. Škrob je převeden do roztoku pomocí kyseliny chlorovodíkové a následně vysrážen etanolem. Vzorek je následně vysušen a zvážen. Při stanovení celulózy je provedena její extrakce od doprovodných látek kyselou nebo alkalickou hydrolýzou. Nehydrolyzovatelný vzorek je vysušen a zvážen. Redukující cukry po reakci s měďnými solemi tvoří oxid měďný ve formě červeného prášku (metoda podle Bertranda). Prášek oxidu měďného je po vysušení stanoven gravimetricky [24, 27, 31, 33].

2.3.4 Denzitometrie

Denzitometrie je založena na principu měření hustoty roztoku, kdy se zvyšující se koncentrací sacharidů v roztoku se zvyšuje hustota. Měření se provádí pomocí speciálních husto-

měrů. Stanovení cukrů denzitometricky se využívá v potravinářství při stanovení nápojů a sirupů a také ve vinařské technologii [23, 24, 33].

3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

3.1 Princip

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační metoda, při které dochází k oddělení jednotlivých složek analyzovaného vzorku. Podstatou metody je vnesení vzorku mezi dvě nemísitelné fáze. Vzorek je nanášen na počátek stacionární (nepohyblivé) fáze. V případě kolonové chromatografie je stacionární fáze tvořena kolonou. Součástí kolony jsou drobné částice sorbentu o určité velmi malé granulaci. Složky vzorku jsou nesené mobilní (pohyblivou) fází. Průnik vzorku do uzavřeného systému obstarává dávkovací systém, který v podstatě také plní funkci směšovacího zařízení. Pohyb eluentu je zde zajištěn pomocí vysokotlakého čerpadla. Eluent se pohybuje mezi částicemi sorbentu, na kterých jsou zachytávány molekuly vzorku ve snaze dosáhnout rovnovážné distribuce mezi mobilní a stacionární fází. Pohybem mobilní fáze je ovšem tato rovnováha neustále narušována. Tím dochází k separaci složek vzorku. Rychlost separace jednotlivých složek je dána retenčním faktorem. Látky s nižší hodnotou retenčního faktoru jsou mobilní fází unášeny snáze, projdou snadněji kolonou a jsou dříve u výstupu kolony. V případě velkého rozdílu retenčního faktoru jednotlivých látek, prostupují tyto látky kolonou v tzv. zónách. Mobilní fáze vystupující z kolony vstupuje do detektoru. V detektoru jsou indikovány přítomné separované složky vzorku. Detekované separované složky vzorku jsou zapisovány do chromatogramu. Chromatogram je grafický záznam signálu detektoru v závislosti na čase. Každá detekovaná složka je v grafu zapisována do tzv. píků. Jeden pík má v ideálním případě tvar Gaussovy křivky. Retenční čas je vzdálenost píku od začátku analýzy. V podstatě je to doba, za kterou projde detekovaná látka kolonou [26, 30, 35, 36, 37].

3.2 Technické vybavení HPLC

Mezi základní technické vybavení patří čerpadlo, dávkovač vzorku, kolona, detektor a vyhodnocující zařízení [30, 36, 38].

3.2.1 Čerpadlo

Hlavním úkolem čerpadla je udržovat průtok mobilní fáze v systému za určitého tlaku. Tlak musí být stálý a bezpulzní. Hodnoty tlaku v HPLC se pohybují do 40 MPa. Průtok je v rozsahu mikrolitrů až v desítkách mililitrů za minutu s méně než 1% kolísáním. Materiálem pro zhotovení čerpadla je volena nerezová ocel, plast či keramika. Použitý materiál

nesmí narušovat nebo měnit složení mobilní fáze ani uvolňovat žádné látky. Ventily jsou zhotoveny zpravidla z pryže [35, 36, 37].

V praxi jsou používána izokratická a gradientová čerpadla. Při použití izokratického čerpadla, je mobilní fáze čerpána pouze z jednoho zásobníku. Tato mobilní fáze může být jednosložková či vícesložková předem připravená v určitém poměru jednotlivých látek. Mobilní fáze je během stanovení neměnná. Při použití gradientového čerpadla je mobilní fáze čerpána z více zásobníků. Výhodou je, že se mobilní fáze může v průběhu stanovení měnit. Důležité je ovšem její dokonalé smíchání v průběhu přenosu ze zásobních lahví do přístrojového systému [30, 36, 37, 38].

3.2.2 Dávkovací zařízení

Dávkovací zařízení slouží k nástřiku definovaného množství vzorku do mobilní fáze. Vzorek je možné nadávkovat přímým nástřikem injekční stříkačkou nebo obtokovým dávkovacím kohoutem tzv. dávkovací smyčkou.

Přímý nástřik přináší nevýhody z hlediska těsnosti a udržení konstantního tlaku. Ovládání může být manuální, ale také řízeno automaticky. Byly vyvinuty techniky, kdy dochází k nadávkování vzorku při zastavení toku mobilní fáze (za atmosférického tlaku). Tato metoda se také nazývá stop-flow injection [30, 35, 38, 39].

Dávkování vzorku druhou metodou se sestává z šesticestného dávkovacího kohoutu s dávkovací smyčkou. Tento způsob je zpravidla řízen automaticky [36].

3.2.3 Kolona

Konstrukce kolon je nejčastěji tvořena nerezovou ocelí ve tvaru kapiláry. Méně používanými materiály jsou tvrzené sklo a měď. Kolony jsou vyrobeny o různých rozměrech. Délka kolony se pohybuje v rozmezí 5 – 50 cm s vnitřním průměrem 1 – 5 mm. Vnitřní prostor kolony tvoří pórovitá náplň (sorbent) o průměrech pórů 3 – 10 μm . Kratší kolony jsou zpravidla plněny sorbenty o menším průměru pórů. Různé náplně kolon jsou využívány pro stanovení různých analytů. V praxi jsou využity krátké předkolony, které chrání kolony před nečistotami a nerozpustnými látkami. Umístěny jsou před hlavní separační kolonu [30, 35, 36, 39].

Při chromatografické separaci cukrů se využívá dělení na katexech, kde makromolekulární matrici tvoří polystyren, celulóza, dextran aj. Součástí makromolekulární matrice jsou pevně vázány funkční skupiny, především skupiny kovů např. kationty vápníku, olova,

stříbra a sodíku. Cukry jsou eluovány s klesající molární hmotností. Oligosacharidy jsou eluovány jako první, dále pak disacharidy, monosacharidy a nakonec alditoly. Eluční pořadí v příslušné skupině cukrů závisí na konformaci hydroxylové skupiny molekuly cukru a protiiontem vázaným na katexu [28, 36].

Separace cukrů na anexech probíhá na principu ionizace cukrů z důvodu disociace hydroxylových skupin v silně alkalickém prostředí. Cukry jsou separovány na silném anexu. Mobilní fáze je zpravidla vodný roztok hydroxidu sodného. Cukry jsou eluovány se zvyšující se molární hmotností, alditoly, mono- a disacharidy a nakonec oligosacharidy [28, 35, 40].

Významnou náplní kolony při separaci cukrů je silikagel s vázanou aminopropylovou fází. Při použití této náplně je jako mobilní fáze použit roztok acetonitrilu s vodou. Eluce je dána adsorbací, která je způsobena tvorbou vodíkových můstků mezi hydroxylovými skupinami cukrů a aminovými skupinami silikagelu. Zvýšením obsahu vody mobilní fáze se zkracují eluční časy cukrů. Výhodu vysoké separační schopnosti oponuje krátká životnost kolony. Podobně lze cukry separovat na silikagelu s diolovými a polyolovými skupinami [28, 36].

3.2.4 Detektor

Nedílnou součástí technického vybavení HPLC je detektor. Jeho úlohou je detekovat a pomocí počítačového programu vyhodnotit kvantitativní hodnoty zkoumaného vzorku. Postavení detektoru je zpravidla na konci celé kolony [23, 30, 36].

Hmotnostní detektory reagují na hmotnostní změnu složky v eluentu. Koncentrační detektory lze dělit na selektivní (signál je úměrný koncentraci detekované látky) a univerzální nesespecifické, kde odezva je úměrná specifické celkové vlastnosti eluátu. Jiné rozdělení lze definovat jako destrukční (dochází k nevratné změně detekované látky) a nedestrukční [30]. Hlavní typy detektorů jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3 Rozdělení HPLC detektorů [30]

Detektory univerzální	Detektory specifické vlastnosti vzorku	Změna mobilní fáze	Spojené techniky
<ul style="list-style-type: none"> • refraktometrický • aerosolový detektor nabitých částic • odpařovací detektor rozptylu světla 	<ul style="list-style-type: none"> • Ultrafialová-viditelná spektrometrie • fluorescenční • elektrochemický • radioaktivní • vodivostní • chemiluminiscenční-dusíkový 	<ul style="list-style-type: none"> • aerosolový detektor nabitých částic • hmotnostní spektrometrie • odpařovací detektor rozptylu světla 	<ul style="list-style-type: none"> • hmotnostní spektrometrie • infračervený • nukleární magnetická rezonance

Nejběžnějšími detektory používanými pro stanovení sacharidů jsou refraktometrický a fotometrický [23, 28, 36].

3.2.4.1 Refraktometrický detektor

Principem refraktometrické detekce je měření indexu lomu rozpuštěné látky eluentu oproti mobilní fázi. Odezva detekce je úměrná rozdílu indexu lomu mobilní fáze v referenční cele a indexu lomu eluátu v měrné cele vycházející z kolony. Měrná jednotka odezvy je dána nastavením detektoru, přičemž je vždy úměrná koncentraci analytu. Důležitým faktorem přesnosti analýzy je dodržení konstantní teploty během celého měření. Není možné použití gradientové eluce, při které dochází ke změnám indexu lomu mobilní fáze. Významné je odstranění plynů z mobilní fáze a ze vzorků. Plynů mohou ovlivnit nebo zcela znemožnit detekci. Důležité je udržení konstantního průtoku mobilní fáze bez pulsů [26, 30, 36, 38, 41].

Výhodou použití refraktometrické detekce je univerzálnost. Není nutností přítomnost chromoforních a fluorescenčních skupin ve vzorku. Nevýhodou je nízká citlivost. Detekční limit cukrů osciluje okolo 5 μg [38, 41].

Konstrukčně můžeme rozdělit refraktometrický detektor na reflexní (Fenselův) a deflexní (výhylkový).

Reflexní refraktometr je konstruován na základě Fenselova zákona. Pro měření je využíváno fázové rozhraní sklo-kapalina. Paprsky záření odražené od fázového rozhraní skleněného hranolu a kapaliny dopadají na dva fotoelektrické články. Rozdíl v toku záření z měrné a referenční cely je mírou koncentrace složek [30].

Deflexní refraktometr pracuje na principu paprsku vycházejícího ze zdroje, který se odrazí od polopropustného zrcadla ve směru měřicí cely, kde prochází měrnou a referenční celou k zrcadlu. Od zrcadla se odráží zpět k planoparalelní destičce, k zrcadlovému hranolu, od něhož se odrazí na dvojici spárovaných fotoelektrických čidel. Změna indexu lomu je dána vychýlením paprsku dopadajícího na zrcadlový hranol. Tím na fotoelektrická čidla dopadá různý světelný tok. Světelný tok, je převáděn na elektrický signál, jenž je zaznamenáván. Vztah mezi koncentrací látky a intenzitou signálu bývá lineární [30].

3.2.4.2 Fotometrický detektor

Měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony. Řadí se mezi nejběžnější detektor používaný v HPLC. Je založen na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek UV a VIS. Jednodušší detektory měří při konstantní vlnové délce nejčastěji v UV oblasti 253,7 nm. Jako zdroje záření využívají rtuťovou výbojku. Výkonnější detektory umožňují nastavení vlnové délky pomocí monochromátoru nebo měření ve více (dvou až čtyřech) vlnových délkách současně. Nevýhodou je nižší citlivost detektoru v porovnání s detektory s fixní vlnovou délkou. Nejvyspělejší fotometrické detektory pracují na principu diodového pole, jež snímá celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace s uložením záznamu. Tento typ detektoru se vyznačuje vysokou citlivostí, ale nízkou selektivitou [30, 36, 42].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo:

- navrhnout, optimalizovat a validovat metodiku stanovení vybraných mono- a oligosacharidů pomocí HPLC-RI
- stanovit obsahy mono- a oligosacharidů v tekutých mléčných výrobcích (mléko, smetana, mléčné nápoje, kysané mléčné výrobky bezlaktózové výrobky) dostupných v běžné tržní síti.

5 METODIKA

5.1 Chemikálie

Ultra čistá voda pro HPLC (přečištěná systémem Aqua MaxTM Ultra 370 Series; Young Lin)

Carrez I (30% ZnSO₄; Penta)

Carrez II (15% K₄[Fe(CN)₆]; Penta)

Acetonitril pro HPLC (≥ 99,9 %; Sigma-Aldrich)

5.2 Pomůcky a přístroje

Přístrojové vybavení pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii:

- kapalinový chromatograf Shimadzu LC-20AD Prominence
- kvartérní pumpa
- pětikanálový degaser DGU-20A_{5R}
- autosampler SIL-20AC_{HT}
- diferenciální refraktometrický detektor RID-20A (vše Shimadzu)
- kolona Agilent Zorbax NH₂ (4,6 x 250 mm x 5 μm)
- předkolonový cartridge filtr 0,2 μm (Optimize Technologies)

Standardy fruktózy, glukózy, galaktózy, sacharózy, maltózy a laktózy (Sigma-Aldrich)

Filtrační papír KA 4 (Papírna Pernštejn Keseg & Rathouzský)

Stříkačkové filtry 0,22 μm (Cronus)

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

5.3 Analyzované vzorky

Analyzované vzorky zahrnovaly mléko a tekuté mléčné výrobky zakoupené v tuzemské tržní síti. Pro analýzu sacharidů metodou HPLC-RI byly zvoleny tyto skupiny výrobků: mléko o různé tučnosti tepelně ošetřené metodou UHT, čerstvé mléko, smetana, ochucené mléčné nápoje, bezlaktózové mléko a tekuté bezlaktózové výrobky, tekuté kysané mléčné výrobky. Seznam použitých vzorků včetně obsahu cukrů, který byl deklarován na obalu, je uveden v tabulce 4 – 8.

Tabulka 4 Vzorky mléka

Název	Celkový obsah cukrů [%]
Selské mléko (plnotučné mléko bez standardizace obsahu tuku) – Olma	4,6
Jihočeské mléko polotučné – Madeta	4,8
Trvanlivé mléko odstředěné – Pilos (Pragolaktos)	4,9
Trvanlivé mléko polotučné – Meggle	4,9
Trvanlivé mléko plnotučné – Meggle	4,8
Trvanlivé kozí mléko (bez standardizace obsahu tuku) – Bettine	4,3

Tabulka 5 Vzorky bezlaktózových výrobků

Název	Celkový obsah cukrů [%]
Trvanlivé bezlaktózové mléko polotučné – Meggle	4,9
MinusL Bourbon Vanillemilch – Mléko vanilkové bez laktózy – Omira	8,2
MinusL Kaffeesahne – Smetana do kávy bez laktózy – Omira	4,3
MinusL Schlagsahne – Smetana ke šlehání bez laktózy – Omira	3,2

Výrobce deklaroval na obalu přidanou sacharózu u výrobku MinusL Bourbon Vanillemilch – Mléko vanilkové bez laktózy. U všech výrobků je na obalu uvedena přítomnost enzymu laktáza, která byla přidána za účelem hydrolýzy laktózy na glukózu a galaktózu. Trvanlivé bezlaktózové mléko polotučné – Meggle udává na obalu obsah laktózy max. 0,01 %. U tří výrobků společnosti minusL je udán na obalu obsah laktózy max. 0,1 %.

Tabulka 6 Vzorky smetany

Název	Celkový obsah cukrů [%]
Smetana 12 % – Kunín	4,2
Smetana ke šlehání 31 % – Kunín	2,9
Šlehačka de luxe 40 % – Kunín	2,3
Pařížská šlehačka 27 % – Kunín	14,2

Výrobce deklaroval na obalu přidanou sacharózu v množství (10,6 %) u výrobku Pařížská šlehačka 27 %.

Tabulka 7 Vzorky kysaných mléčných výrobků

Název	Celkový obsah cukrů [%]
Jihočeské kysané podmásli – Madeta	4,5
Acidofilní mléko plnotučné – Mlékárna Valašské Meziříčí	3,9
Kefírové mléko – Moravia Lacto	4,1
Activia mango/broskev – jogurtový nápoj s bifidokulturou – Danone	11,0
Olmíci jahodovo-malinoví – kysaný nápoj s medem a ovocem – Olma	12,0
Activia bílá – jogurtový nápoj s bifidokulturou – Danone	3,9
Acidofilní mléko malinové – Kunín	9,9
Jihočeský zákys banán – Madeta	11,0
Milbona L. Casei – jogurtový mléčný nápoj s vanilkovou příchutí – Molkerei Gropper	13,0
Kefírové mléko jahodové – Kunín	10,1
Ayran nápoj s mlékem – Lightfood	1,4

Výrobce deklaroval na obalu přidanou sacharózu u všech ochucených kysaných mléčných výrobků. Glukóza byla přidána do výrobku Milbona L. Casei - jogurtový mléčný nápoj s vanilkovou příchutí. Glukózo-fruktózový sirup byl přidán do výrobku Kefirové mléko jahodové.

Tabulka 8 Vzorky mléčných nápojů

Název	Celkový obsah cukrů [%]
Müllermilch – mléčný nápoj s jahodovou příchutí – Müller	11,6
Kravík – trvanlivé ochucené polotučné mléko s vanilkovou příchutí – Mlékárna Hlinsko	11,5
Iced Coffee Pilos – mléčný nápoj z polotučného mléka s rozpustnou kávou – Lidl Stiftung	9,6
Milk Drink Chocolate Pilos – mléčný nápoj z polotučného mléka s čokoládovou příchutí – AF Deutschland	8,9

Výrobce deklaroval na obalu přidanou sacharózu u všech výrobků mléčných nápojů. Glukóza byla přidána do výrobků Müllermilch a Kravík.

5.4 Příprava vzorku

Z každého vzorku bylo odpipetováno 25 ml a převedeno do 50 ml odměrné baňky. Pro čiření byla zvolena Carrezova činidla, která patří u mléčných výrobků k nejpoužívanějším. Do každé odměrné baňky bylo přidáno 2,5 ml Carreze I a 2,5 ml Carreze II a obsah byl opatrně promíchán. Odměrná baňka byla doplněna po rysku ultra čistou deionizovanou vodou a důkladně promíchána. Obsah odměrné baňky byl přefiltrován přes filtrační papír KA 4. Před samotným stanovením byl filtrát ještě přefiltrován pomocí stříkačkových filtrů o porozitě 0,22 μm . Každý vzorek byl takto připraven 3x [44, 45].

5.5 Stanovení cukrů pomocí HPLC-RI

Samotné stanovení sacharidů bylo prováděno za stejných podmínek u všech vzorků pomocí kapalinového chromatografu s refraktometrickým detektorem. Jako mobilní fáze byl využit roztok acetonitril ve vodě v poměru 70:30. Složení mobilní fáze zůstalo po celou dobu analýzy konstantní, jednalo se o izokratickou eluci, protože refraktometrická detekce gradientovou eluci neumožňuje. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1,4 ml.min⁻¹. Délka

analýzy jednoho vzorku trvala 12 min. Každý z připravených vzorků byl analyzován 2x ($n = 6$). Množství cukrů ve vzorcích bylo zjištěno z kalibračních přímek, které byly pro všech 6 mono- a oligosacharidů sestrojeny. Byly využity koncentrace 0,1; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18 a 20 g.l^{-1} . Každý bod kalibračních křivek byl proměřen 3x. Z regresních rovnic byl vypočítán obsah sacharidů v g.100 ml^{-1} vzorku (tj. v %).

Před vlastním stanovením bylo potřeba navrženou metodiku optimalizovat a validovat (viz kapitoly 5.5.1 a 5.5.2).

5.5.1 Optimalizace HPLC stanovení

Pro optimalizaci metody byly využity vzorky standardů monosacharidů glukózy, fruktózy, galaktózy a disacharidů laktózy, sacharózy a maltózy. Byly testovány mobilní fáze acetonitril ve vodě v poměru 80:20, 70:30 a 60:40. Zkoumána byla izokratické eluce při rychlostech průtoku mobilní fáze 1,0 ml.min^{-1} , 1,2 ml.min^{-1} , 1,4 ml.min^{-1} , 1,6 ml.min^{-1} , 1,8 ml.min^{-1} a 2,0 ml.min^{-1} .

5.5.2 Validace navržené metodiky

Procesem validace se zjišťují pracovní charakteristiky analytických metod. Jde o proces potvrzení přezkoušením a poskytnutí objektivního důkazu, že jsou jednotlivé požadavky na specifické zamýšlené použití splněny. Rozsah a správnost hodnot, získaných z validovaných charakteristik musí odpovídat požadavkům pro zamýšlené použití [43, 44, 45].

Součástí této diplomové práce byly validovány charakteristiky odpovídající požadavkům zamýšleného použití HPLC-RI. Důležité pracovní charakteristiky této metody jsou linearita, přesnost, opakovatelnost a mez stanovitelnosti.

Linearita je chápána jako přímková závislost dvou náhodných proměnných. Je ověřována pomocí kalibračních přímek. Kalibrační přímky stanovené pro jednotlivé měřené sacharidy slouží k výpočtu obsahu jednotlivých sacharidů ve vzorcích. Dvěma náhodnými proměnnými jsou analytický signál (odezva analytu) a koncentrace analytu. Jejich těsnost vzájemné závislosti charakterizuje korelační koeficient. Korelační koeficient nabývá v případě lineární závislosti hodnotu +1. Čím více se korelační koeficient blíží této hodnotě, tím je závislost obou proměnných těsnější.

Přesnost metody je definována jako údaj o míře těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek za předem definovaných podmínek. Míra přesnosti se vyjadřuje jako směrodatná odchylka výsledků zkoušek. Vzhledem k tomu, že směrodatná odchylka je

náhodná veličina, nemůže být pokládána za obecně platnou charakteristiku dané analytické metody. Směrodatná odchylka musí být proto počítána z dostatečně velkého počtu vzorků téhož materiálu, nesmí se určovat z jedné ověřovací série.

Opakovatelnost je těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti. Navzájem nezávislé výsledky zkoušek se získají opakovaným použitím téže zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týmž pracovníkem za použití týchž přístrojů a zařízení, během krátkého časového rozmezí.

Mez stanovitelnosti metody (LOQ) je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno jako exaktní hodnota se stanovenou přesností [30, 46].

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

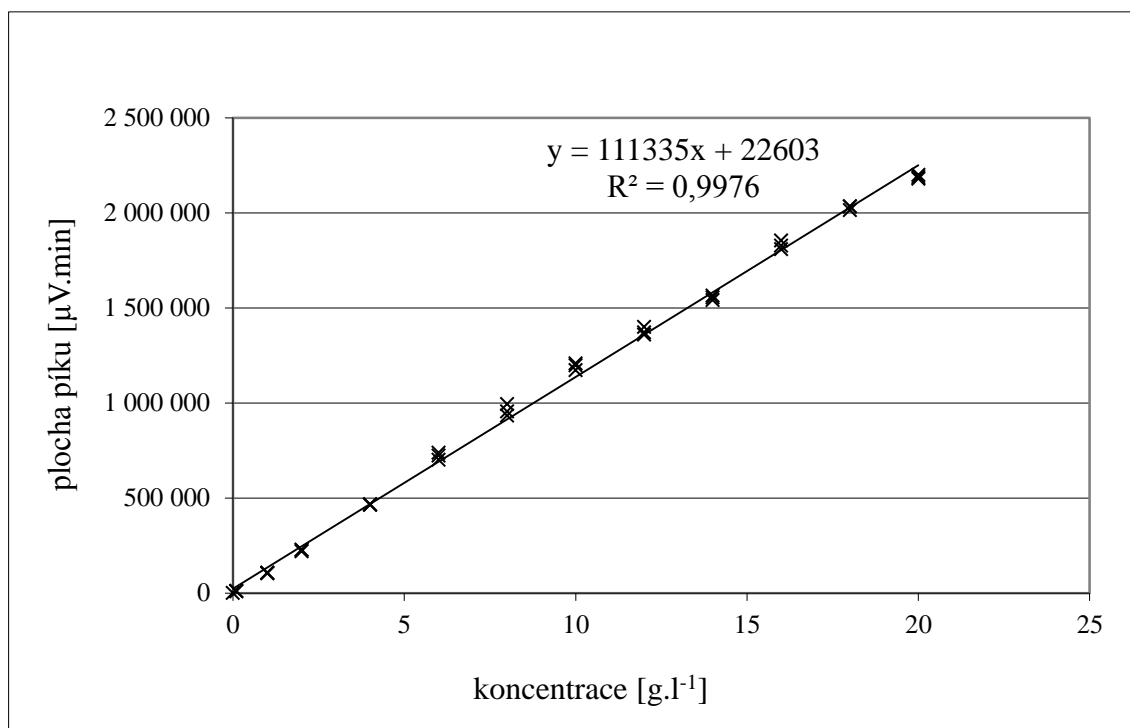
6.1 Optimalizace a validace HPLC stanovení

Jako nejvhodnější mobilní fáze, které umožnila nejdokonalejší separaci všech analytů, byla zvolena směs acetonitrilu s vodou v poměru 70:30. Příliš nízký průtok mobilní fáze ($1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) měl za následek široké, v případě laktózy až chvostující píky. Naopak vysoký průtok mobilní fáze ($2,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) neumožnil dokonalou separaci fruktózy, glukózy a galaktózy. Jako nejúčinnější byl zvolen průtok $1,4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

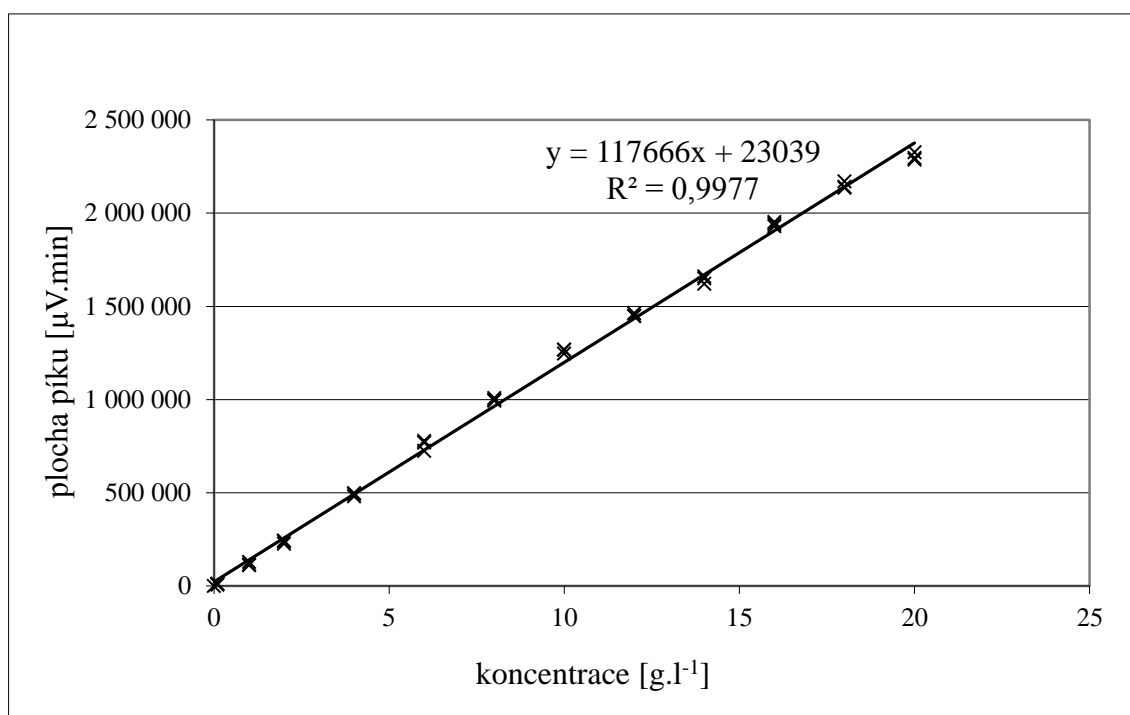
K validačním parametrům, které byly zjišťovány, patřila přesnost, opakovatelnost, linearita a mez stanovitelnosti. Míra přesnosti byla vyjádřena jako směrodatná odchylka, resp. variační koeficient. Variační koeficienty všech stanovení se pohybovaly pod 6 %. Podobně byla vyjádřena i opakovatelnost metody. Variační koeficienty zjištěné z 20 analýz téhož vzorku (4 analýzy denně po dobu 5 dnů) nepřesáhly 7 %. Linearita byla ověřována pomocí kalibračních přímek, které vyjadřují závislost mezi plochou píku a koncentrací analytu. Linearita byla prokázána pro všechny standardy v testovaném rozpětí koncentrací – tj. od $0,1$ do $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Korelační koeficienty, charakterizující těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných, přesáhly pro všechny standardy hodnotu 0,99 (viz kapitola 6.2). Mez stanovitelnosti byla pro všechny cukry totožná s nejnižší koncentrací v kalibrační křivce – tj. s hodnotou $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

6.2 Kalibrační křivky cukrů

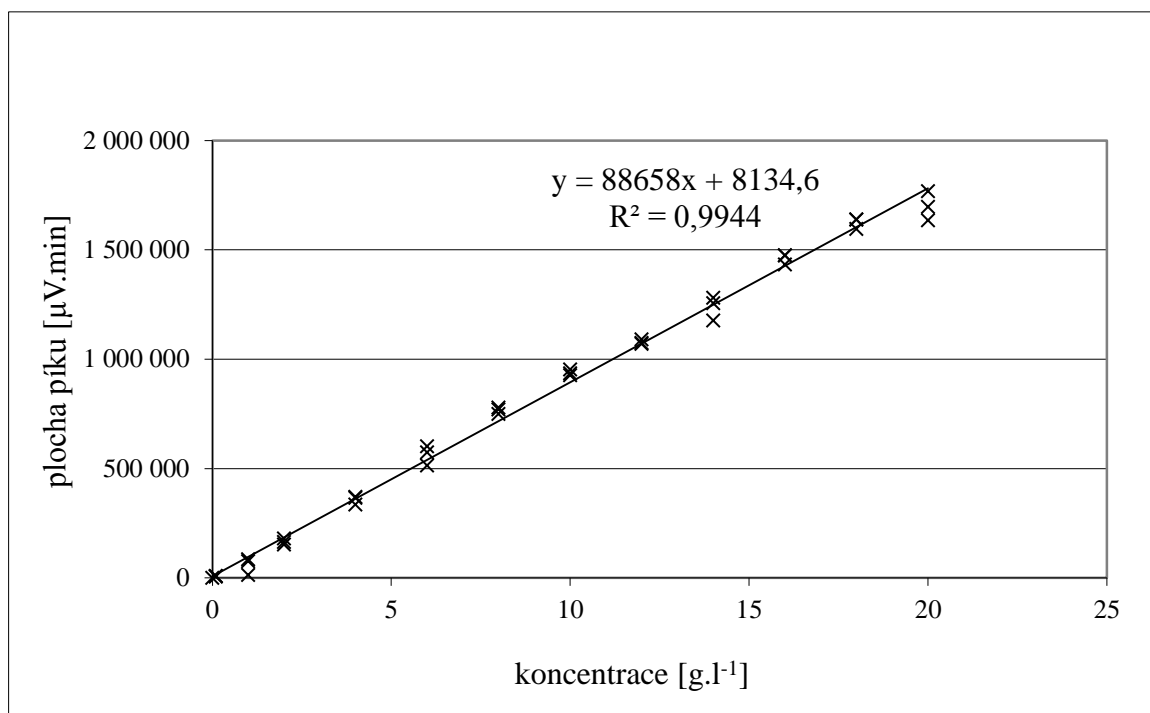
Kalibrační řady byly sestrojeny pro glukózu, fruktózu, galaktózu, sacharózu, laktózu a maltózu ze zásobních roztoků standardů o koncentraci $100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Zásobní roztoky standardů byly pro sestrojení kalibračních křivek zředěny na koncentraci $0,1 - 20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Každý bod kalibrační přímky byl pro měření 3x. Jednotlivé kalibrační křivky i s rovnicí regrese a korelačním koeficientem jsou zobrazeny na obrázku 1 – 6.



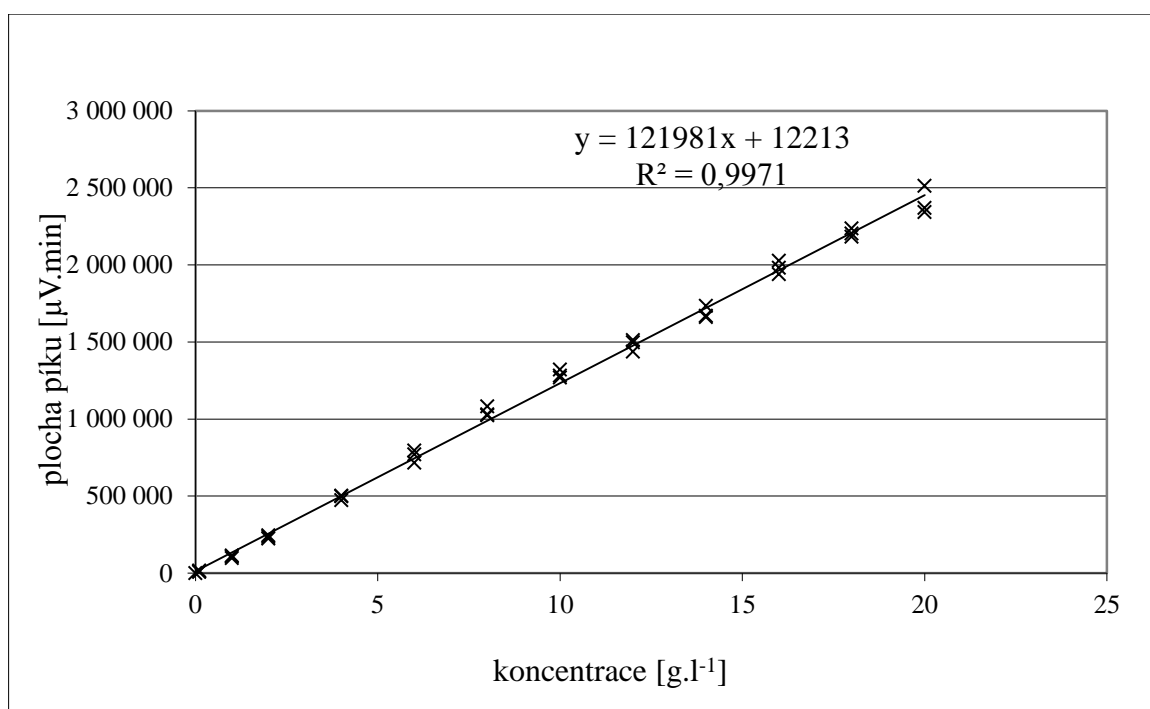
Obrázek 1 Kalibrační přímka pro fruktózu



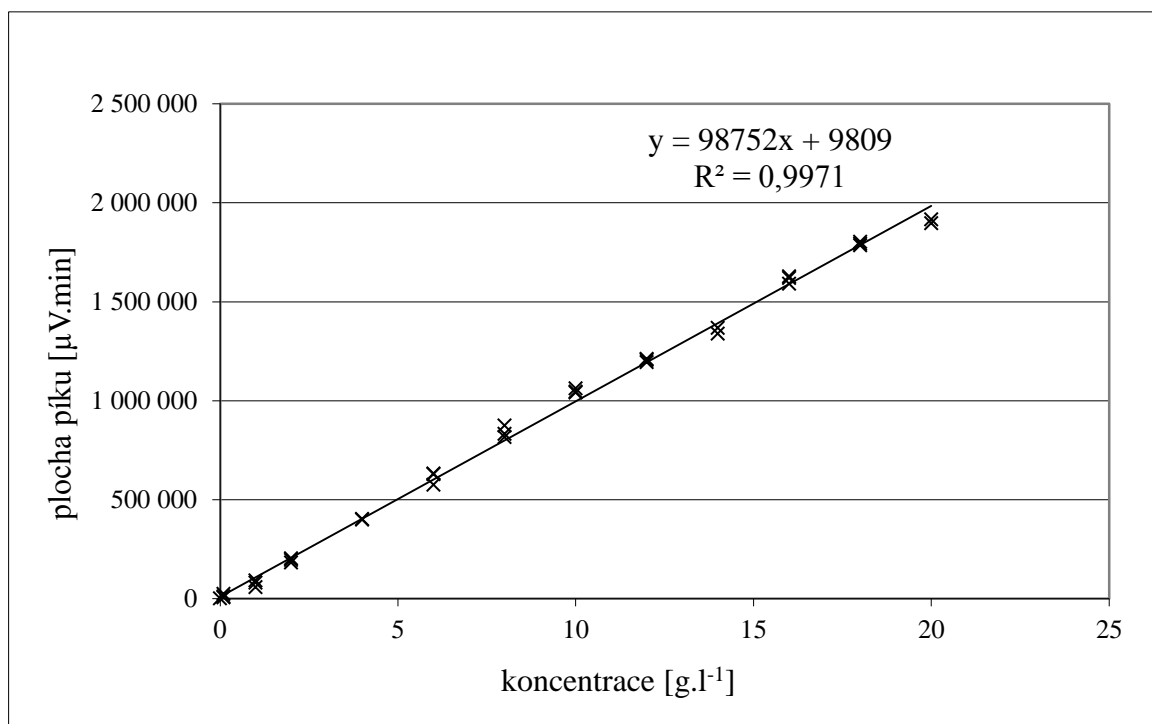
Obrázek 2 Kalibrační přímka pro glukózu



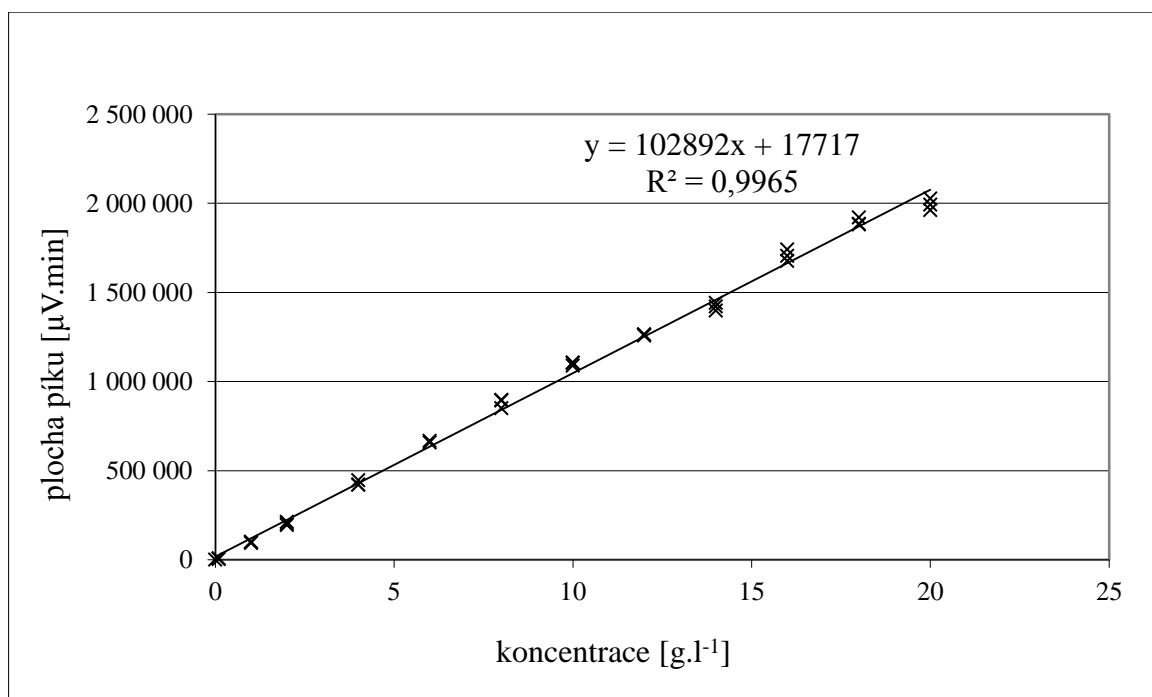
Obrázek 3 Kalibrační přímka pro galaktózu



Obrázek 4 Kalibrační přímka pro sacharózu



Obrázek 5 Kalibrační přímka pro maltózu



Obrázek 6 Kalibrační přímka pro laktózu

6.3 Stanovení cukrů pomocí HPLC v mléce a tekutých mléčných výrobcích

V této kapitole jsou uvedeny výsledky stanovení obsahu cukrů ve vzorcích mléka a tekutých mléčných výrobcích, které byly vybrány pro účely tohoto experimentu. Všechny vzorky pro analýzu byly zakoupeny v tuzemské tržní síti. Jednotlivé rozdělení mléka a tekutých mléčných výrobcích jsou pro přehlednost experimentu rozděleny totožně jako v kapitole 5. 3.

V tabulkách 9 – 13 jsou uvedeny analyzované obsahy jednotlivých sacharidů (průměr \pm směrodatná odchylka) a odchylky od údajů uvedených na obalu vzorků. Protože byly na obalech většiny analyzovaných vzorků uvedeny jen celkové obsahy cukrů, jsou v případě zastoupení více sacharidů ve vzorku uvedeny odchylky od součtu všech analyzovaných cukrů (není-li uvedeno jinak).

Tabulka 9 Analyzovaný obsah cukrů ve vzorcích mléka

Název	Laktóza [%]	Odchylka
Selské mléko Olma	4,56 \pm 0,14	-0,04
Polotučné mléko Madeta	4,74 \pm 0,16	-0,06
Odstředěné mléko Pilos	5,02 \pm 0,15	0,12
Polotučné mléko Meggle	5,14 \pm 0,08	0,24
Plnotučné mléko Meggle	4,89 \pm 0,07	0,09
Kozí mléko Bettine	4,45 \pm 0,12	0,15

Analyzované vzorky kravského mléka obsahovaly 4,56 – 5,14 % celkového obsahu cukrů, vyjádřeného jako laktóza. Tyto hodnoty jsou brány jako běžný rozptyl obsahu laktózy v kravském mléce [1, 3]. Rozptyl můžeme předpokládat rozdílným druhovým zastoupením dojníc, jejich potravou či záměrným standardizováním laktózy výrobcem. Tyto skutečnosti však nebyly předmětem tohoto experimentu. Obsah laktózy 4,45 % v analyzovaném vzorku kozího mléka je brán jako běžné množství laktózy v kozím mléce [1].

V porovnání námi stanovených hodnot laktózy s informacemi uvedenými na obalech výrobků lze říci, že námi stanovené hodnoty odpovídají hodnotám uvedených na obalu výrobků. Odchylna našeho měření se pohybovala od -0,06 do 0,24.

Tabulka 10 Analyzovaný obsah cukrů ve vzorcích se sníženým obsahem laktózy a bezlaktózových výrobcích

Název	Glukóza [%]	Galaktóza [%]	Sacharóza [%]	Odchylna
Trvanlivé bezlaktózové mléko polotučné – Meggle	2,50 ± 0,06	2,20 ± 0,07	–	-0,20
MinusL Mléko vanilkové bez laktózy – Omira	2,66 ± 0,07	1,88 ± 0,05	3,41 ± 0,06	-0,25
MinusL Smetana do kávy bez laktózy – Omira	2,34 ± 0,06	1,84 ± 0,04	–	-0,12
MinusL Smetana ke šlehání bez laktózy – Omira	2,04 ± 0,05	1,29 ± 0,03	–	0,13

Ani v jednom z bezlaktózových výrobků nebyla detekována laktóza. Z tohoto důvodu není v Tabulce 10 laktóza uvedena. S ohledem na mez stanovitelnosti použité metody (0,01 %) lze konstatovat, že obsah laktózy byl nižší než 0,01 %. Toto zjištění odpovídá údajům uvedeným na obalu bezlaktózového mléka Meggle (výrobce deklaruje množství laktózy pod 0,01 %). V případě ostatních výrobků značky minusL je na obalu uvedeno množství laktózy méně než 0,1 % a i tento údaj tedy odpovídá našim analýzám.

U výrobku minusL Mléko vanilkové bez laktózy výrobce uvedl na obalu přítomnost sacharózy, která byla stanovena. Vzhledem ke skutečnosti přítomnosti enzymu laktáza, kterou uvedli na obalu všichni výrobci, byla předpokládána přítomnost glukózy a galaktózy, tedy produktů enzymatického štěpení laktózy [20, 21, 22].

Z pohledu tuzemské legislativy lze zařadit výrobky minusL do skupiny výrobků se sníženým obsahem laktózy (výrobce deklaruje množství laktózy pod 0,1 % u všech tří výrobků). Obsah laktózy u výrobku trvanlivé bezlaktózové mléko polotučné splňuje požadavek tuzemské legislativy pro bezlaktózové výrobky (obsah laktózy pod 0,01 %), nicméně nespĺňuje požadavek na nepřítomnost volné glukózy. Podle této skutečnosti by měl být tento výrobek brán jako výrobek se sníženým obsahem laktózy, neboť stanovením byla zjištěna přítomnost galaktózy 2,50 %. Žádný z analyzovaných výrobků tedy na obalu nebyl označen správně [18].

Tabulka 11 Analyzovaný obsah cukrů ve vzorcích smetany

Název	Laktóza [%]	Sacharóza [%]	Odchylka
Smetana 12 %	4,39 ± 0,12	–	0,19
Smetana ke šlehání 31 %	3,15 ± 0,09	–	0,25
Šlehačka de luxe 40 %	2,49 ± 0,07	–	0,19
Pařížská šlehačka 27 %	3,09 ± 0,08	10,76 ± 0,18	-0,35

Výsledky analýzy vzorků smetan ukazují na téměř shodné výsledky obsahu cukrů stanovené metodou HPLC-RI, jako jsou uvedeny výrobcem na obalu. U vzorku Pařížská šlehačka s obsahem tuku 27 % výrobce na obalu uvedl, že obsah přidané sacharózy je 10,6 %. Námi analyzovaná hodnota se tedy liší jen o 0,16 %. Odchylka -0,35 je od celkového obsahu analyzovaných cukrů, tedy součtu laktózy a sacharózy.

Tabulka 12 Analyzovaný obsah cukrů ve vzorcích mléčných nápojů

Název	Laktóza [%]	Sacharóza [%]	Glukóza [%]	Odchylka
Müllermilch jahodový	5,26 ± 0,14	3,91 ± 0,07	2,50 ± 0,03	0,07
Kravík vanilkový	5,04 ± 0,12	2,56 ± 0,04	4,00 ± 0,08	0,10
Iced Coffee	4,74 ± 0,10	4,49 ± 0,09	–	-0,37
Milk Drink Chocolate	5,02 ± 0,13	4,17 ± 0,08	–	0,29

Všechny vybrané mléčné nápoje pro analýzu cukrů měly na obalu uvedenou přítomnost sacharózy. Mléčné nápoje Müllermilch jahodový a Kravík vanilkový uváděly na obalu přítomnost také glukózy. Výrobci těchto výrobků však nedefinovali jejich konkrétní množství. U těchto výrobků bylo uvedeno pouze množství celkových cukrů.

Součet námi stanovených cukrů u jednotlivých výrobků udává námi stanovené celkové množství cukrů ve výrobcích. Vzhledem k neuvedení jednotlivých množství sacharidů, které výrobci uvedli na obalech jako přítomné, je odchylka vypočítána od celkového množství sacharidů obsažených v jednotlivých výrobcích. Kromě laktózy byla ve všech

výrobciích analyzována i sacharóza a u dvou nápojů glukóza, což odpovídá složení těchto výrobků.

Tabulka 13 Analyzovaný obsah cukrů ve vzorcích mléčných výrobků

Název	Laktóza [%]	Sacharóza [%]	Glukóza [%]	Fruktóza [%]	Odchylka
Jogurtový nápoj vanilkový	2,73 ± 0,08	10,36 ± 0,27	0,22 ± 0,00	–	0,31
Kysaný nápoj s medem a ovocem	2,63 ± 0,07	5,17 ± 0,15	1,96 ± 0,05	1,90 ± 0,04	-0,34
Jogurtový nápoj	3,72 ± 0,09	–	–	–	-0,18
Jogurtový nápoj mango/broskev	2,84 ± 0,08	7,78 ± 0,21	–	0,30 ± 0,01	-0,08
Kysané podmásli	4,56 ± 0,12	–	–	–	0,06
Acidofilní mléko plnotučné	3,76 ± 0,11	–	–	–	-0,14
Acidofilní mléko malinové	2,89 ± 0,08	5,44 ± 0,16	–	1,36 ± 0,03	-0,21
Zákys banánový	3,41 ± 0,09	7,15 ± 0,20	–	0,15 ± 0,00	-0,29
Kefirové mléko	3,98 ± 0,11	–	–	–	-0,12
Kefirové mléko jahodové	3,13 ± 0,08	5,33 ± 0,15	0,84 ± 0,02	0,55 ± 0,01	-0,25
Ayran nápoj	1,36 ± 0,02	–	–	–	-0,04

Deklarované přísady sacharózy, glukózy, příp. glukózo-fruktózového sirupu do ochucených výrobků odpovídají analyzovaných hodnotám. Výrobci ochucených výrobků neuvádějí množství jednotlivých přidaných cukrů. Z toho důvodu lze porovnat pouze celkový obsah cukrů stanovení od obsahu cukrů uvedeného výrobcem. Odchylka udává rozdíl mezi celkovým stanoveným obsahem cukrů a uvedeným obsahem cukrů na obalu od výrobce. Obsah medu v kysaném nápoji Olmici byl potvrzen přítomností glukózy a fruktózy. Fruktóza analyzovaná ve všech ovocných výrobcích pochází nejen z medu či glukózo-fruktózového sirupu, ale i z přidané ovocné složky. U kysaných mléčných výrobků lze důvodně předpokládat nižší hodnotu přítomných cukrů z důvodu přítomnosti žádoucí mikroflóry, která přeměňuje laktózu na metabolické produkty (zejména kyselinu mléčnou) a dává tak výrobkům specifické charakteristické vlastnosti [14, 16].

Odchytky mezi analyzovanými obsahy mono- a oligosacharidů a mezi uvedenými údaji na obalech se pohybovaly v rozmezí $|0,04 - 0,37|$ %. Navrženou metodiku tedy lze z tohoto pohledu považovat za vhodnou pro stanovení cukrů v tomto typu výrobku.

ZÁVĚR

Současná společnost lidské populace se potýká se zvyšujícími zdravotními problémy v souvislosti s konzumací potravin obsahujících laktózu. Mnoha výzkumy jsou zjišťovány mechanismy vzniku těchto zdravotních problémů, jakož i množství laktózy, které je člověk schopen přijmout v případě, že se již potýká se zdravotními problémy spojenými s laktózou. Ruku v ruce s těmito výzkumy jde navržení nových, či optimalizace již známých metod detekce nejen laktózy, ale i celkového obsahu cukrů. Metoda HPLC-RI je v praxi velmi využívána pro analýzu cukrů v potravinách.

Hlavním cílem diplomové práce bylo navrhnout, optimalizovat a validovat metodu stanovení mono- a oligosacharidů pomocí HPLC-RI. Následným cílem bylo stanovit mono- a oligosacharidy v mléku a vybraných tekutých mléčných výrobcích touto metodou.

Pro optimalizaci metody byly využity vzorky standardů monosacharidů glukózy, fruktózy, galaktózy a disacharidů laktózy, sacharózy a maltózy o koncentraci $0,1 - 20 \text{ g.l}^{-1}$. Maltóza nebyla v této práci dále analyzována, protože se v běžně dostupných mléčných výrobcích nevyskytuje. Standard maltózy byl zvolen pouze pro úplnost optimalizace. Jako mobilní fáze byla využita směs acetonitrilu s vodou. Zkoušeny byly poměry 60:40, 70:30, 80:20. Předmětem optimalizace byla i rychlost průtoku mobilní fáze v rozmezí od $1,0$ do $2,0 \text{ ml.min}^{-1}$. Nejvhodnější poměr mobilní fáze byl zvolen 70:30, který umožnil nejdokonalejší separaci cukrů při rychlosti průtoku $1,4 \text{ ml.min}^{-1}$. Navržená metodika byla následně validována z pohledu přesnosti, opakovatelnosti, linearity a byla též zjištěna mez stanovitelnosti ($0,1 \text{ g.l}^{-1}$).

Mléko a tekuté mléčné výrobky, které sloužily pro analýzu cukrů pomocí HPLC-RI, byly zakoupeny v tuzemské tržní síti. Byly analyzovány vzorky čerstvého i trvanlivého mléka o různé tučnosti (celkem 6 vzorků), smetany (4 vzorky), ochucených mléčných nápojů (4 vzorky), tekutých kysaných mléčných výrobků (11 vzorků) a bezlaktózových výrobků (4 vzorky). Před vlastním stanovením byly vzorky podrobeny čiření pomocí Carrezových činidel pro odstranění bílkovin, které by rušily stanovení. Stanovené obsahy cukrů metodou HPLC-RI u jednotlivých výrobků se v porovnání s údaji na obalu ve většině analyzovaných vzorků mnoho nelišily (odchyly se pohybovaly max. do $|0,37| \%$).

U většiny vzorků byl na obalu uveden pouze celkový obsah cukrů, proto nebylo možné porovnat jednotlivé analyzované cukry. Výjimkou byla Pařížská šlehačka, u které výrobce uvedl na obalu obsah přidané sacharózy $10,6 \%$. Námi analyzovaná hodnota

(10,76 % \pm 0,18) se tedy lišila jen o 0,16 %. Podobně byla detekována např. glukóza a fruktóza ve výrobcích, které ve složení obsahovaly glukózo-fruktózový sirup či med, a též sacharóza ve slazených mléčných výrobcích.

Vzhledem k výsledkům stanovení cukrů u jednotlivých analyzovaných vzorků a jejich porovnání s hodnotami uvedenými na obalu lze říci, že se podařilo navrženou metodu HPLC-RI optimalizovat a validovat a lze ji využít pro stanovení cukrů v mléce a mléčných výrobcích. Tato práce může sloužit jako hodnotný zdroj informací pro další výzkum stanovení sacharidů pomocí metody HPLC-RI v jiných potravinách.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BUŇKA, František, Vendula PACHLOVÁ a Michaela ČERNÍKOVÁ. *Mlékárenská technologie I*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2013. ISBN 978-80-7454-254-1.
- [2] VARNAM, Alan H. a Jane P. SUTHERLAND. *Milk and milk products: technology, chemistry and microbiology*. Gaithersburg, Md: Aspen Publishers, 2001. ISBN 08-342-1955-7.
- [3] HRABĚ, Jan, Pavel BŘEZINA a Pavel VALÁŠEK. *Technologie výroby potravin živočišného původu: bakalářský směr*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2006. ISBN 80-731-8405-2.
- [4] LUKÁŠOVÁ, Jindra. *Hygiena a technologie produkce mléka*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 1999. ISBN 80-851-1453-4.
- [5] FORMAN, Ladislav. *Mlékárenská technologie II*. Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1996. ISBN 80-708-0250-2.
- [6] GAJDŮŠEK, Stanislav, Pavel BŘEZINA a Pavel VALÁŠEK. *Laktologie: bakalářský směr*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. ISBN 80-715-7657-3.
- [7] FOX, Patrik F. a Paul L. H. MSWEENEY. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Germany: Thomson Science, 1998. ISBN 0-412-72000-0.
- [8] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 1. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902-3914-5.
- [9] ŠUSTOVÁ, Květoslava a Vladimír SÝKORA. *Mlékárenské technologie*. Vyd. 1. Brno: Mendelova univerzita, 2013. ISBN 978-80-7375-704-5.
- [10] SUKOVÁ, Irena. *Syrovátka v potravinářství*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2006. ISBN 80-727-1173-3.
- [11] KLEIBEUKER, J. Whey in animal nutrition, A valuable ingredient. [online], European Whey Products Association [online], Belgie, 2006 [citováno 2016-12-11]. Dostupné na: <http://ewpa.euromilk.org/publications.html>
- [12] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2012. ISBN 978-80-7418-145-0.

- [13] Česká republika. *Vyhláška ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje, v platném znění*. Ministerstvo zemědělství 6. března 2003.
- [14] GAJDUŠEK, Stanislav. *Mlékařství II*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1998. ISBN 80-715-7342-6.
- [15] KOPÁČEK, Jiří. *Mléko a mléčné výrobky: jak poznáme kvalitu?*. 1. vyd. Praha: Sdružení českých spotřebitelů, 2014. ISBN 978-80-87719-18-3.
- [16] JANŠTOVÁ, Bohumíra. *Technologie mléka a mléčných výrobků*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012. ISBN 978-80-7305-635-3.
- [17] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-708-0510-2.
- [18] Česká republika. *Vyhláška ministerstva zdravotnictví č. 54/2004 Sb., o potravinách určených pro zvláštní výživu a o způsobu jejich použití, v platném znění*. Ministerstvo zdravotnictví 30. ledna 2004.
- [19] *Narižení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 609/2013 o potravinách určených pro kojence a malé děti, potravinách pro zvláštní lékařské účely a náhradě celodenní stravy pro regulaci hmotnosti, v platném znění*. Evropský parlament a Rada (EU) 12. června 2013.
- [20] Tolerovaný příjem laktózy při její nesnášenlivosti. *Internetový portál bezpečnosti potravin* [online]. 2010 [cit. 2016-02-16]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz>
- [21] BOOTHROYD, Peter a Xuân Nam PHAM. *Socioeconomic renovation in Viet Nam: the origin, evolution, and impact of doi moi*. *EFSA Journal* [online]. 2010, [cit. 2016-02-22]. DOI: doi:10.2903/j.efsa.2010.1777. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu>
- [22] Snižování a odstraňování laktózy z mléka a výrobků. *Agronavigátor* [online]. Praha, 2011 [cit. 2016-03-27]. Dostupné z: www.agronavigator.cz
- [23] HÁLKOVÁ, Jana, Jana RIEGLOVÁ a Marie RUMÍŠKOVÁ. *Kvitatativní chemická analýza*. 2. Vyd. Újezd u Brna: I. Straka, 2001. ISBN 80-864-9401-2.
- [24] KUBÁŇ, Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-036-7.

- [25] RAESSLER, Michael. *Sample preparation and current applications of liquid chromatography for the determination of non-structural carbohydrates in plants. Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2011, 30(11), 1833-1843 [cit. 2016-03-20]. ISSN 0165-9936. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com>
- [26] SANZ, M. L. a I. MARTÍNEZ-CASTRO. Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, 1153(1-2), 74-89 [cit. 2016-03-20]. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.01.028. ISSN 0021-9673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307000519>
- [27] DAVÍDEK, Jiří. *Laboratorní příručka analýzy potravin: Příručka pro vys. školy chemicko-technologické*. 2. Vyd. Praha: SNTL, 1981.
- [28] ČOPÍKOVÁ, Jana. *Chemie a analytika sacharidů*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1997. ISBN 80-708-0306-1.
- [29] DAVÍDEK, Jiří a Jan VELÍŠEK. *Analýza potravin*. 2. Vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1992. ISBN 80-708-0163-8.
- [30] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [31] BALÍK, Josef. *Vinařství: návody do laboratorních cvičení*. Vyd. 3., nezměn. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004. ISBN 80-715-7933-5.
- [32] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-586-2.
- [33] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem: návody do laboratorních cvičení*. 1. Vyd. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0553-8.
- [34] VORLOVÁ, Lenka, Michaela KRÁLOVÁ, Ivana BORKOVCOVÁ a Romana KOSTRHOUNOVÁ. *Chemie potravin a chemické laboratorní metody Obecné kapitoly*. Vyd. 1. Brno: VFU Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-687-2.
- [35] KRÍŽEK, Martin a Jan ŠÍMA. *Analytická chemie*. 1. Vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2015. ISBN 978-80-7394-486-5.

- [36] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. Vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [37] FARKOVÁ, Marta. *Instrumentální analytická chemie - praktikum*. Vyd. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2011. ISBN 978-80-210-5534-6.
- [38] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické*. 1. Vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-030-0569-8.
- [39] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. 1. Vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [40] LEE, Yung-Cheng. *Carbohydrate analyses with high-performance anion-exchange chromatography*. *Journal of Chromatography A* [online]. 1996, 720(1-2), 137-149 [cit. 2016-02-25]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com>
- [41] MOLDOVEANU, Serban C. a Victor DAVID. *Essentials in modern HPLC separations*. Waltham, MA: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-385013-3.
- [42] LV, You, Xingbin YANG, Yan ZHAO, Yun RUAN, Ying YANG a Zhezhi WANG. *Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from Gynostemma pentaphyllum by HPLC with indirect UV detection*. *Food Chemistry* [online]. 2009, 112(3), 742-746 [cit. 2016-02-25]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com>
- [43] ZAKHAROVA, A. M., I. L. GRINSHTEIN a L. A. KARTSOVA. *Determination of carbohydrates and sweeteners in foods and biologically active additives by high-performance liquid chromatography*. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2013, 68(12), 1081-1084 [cit. 2016-03-27]. ISSN 1061-9348. Dostupné z: <http://link.springer.com>
- [44] SHARMA, RAJAN, YUDHISHTHIR S RAJPUT, POONAM, GAURAV DOGRA a SUDHIR K TOMAR. Estimation of sugars in milk by HPLC and its application in detection of adulteration of milk with soymilk. *International Journal of Dairy Technology* [online]. 2009, 62(4), 514-519 [cit. 2016-03-27]. ISSN 1364-727x.

- [45] CHÁVEZ-SERVÍN, Jorge L., Ana I. CASTELLOTE a M.Carmen LÓPEZ-SABATER. *Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. Journal of Chromatography A* [online]. 2004, 1043(2), 211-215 [cit. 2016-03-27]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com>
- [46] DOUŠA, Michal. *Česká chromatografická škola – HPLC 2015* [online]. [cit. 2016-01-18]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BMK	Bakterie mléčného kvašení
GOS	Galaktooligosacharidy
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
LOQ	Mez stanovitelnosti
NDA	Panel pro dietetické výrobky, výživu a alergie
NF	Nanofiltrace
RI	Refraktometrický detektor
RO	Reverzní osmóza
UHT	Vysokoteplotní záhřev
UV	Ultrafialová oblast spektra
VIS	Viditelná oblast spektra

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Kalibrační přímka pro fruktózu	45
Obrázek 2 Kalibrační přímka pro glukózu	45
Obrázek 3 Kalibrační přímka pro galaktózu	46
Obrázek 4 Kalibrační přímka pro sacharózu	46
Obrázek 5 Kalibrační přímka pro maltózu	47
Obrázek 6 Kalibrační přímka pro laktózu.....	47

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Chemické složení kravského mléka [1]	13
Tabulka 2 Chemické složení syrovátky [11]	16
Tabulka 3 Rozdělení HPLC detektorů [30]	34
Tabulka 4 Vzorky mléka.....	39
Tabulka 5 Vzorky bezlaktózových výrobků	39
Tabulka 6 Vzorky smetany	40
Tabulka 7 Vzorky kysaných mléčných výrobků	40
Tabulka 8 Vzorky mléčných nápojů	41
Tabulka 9 Analyzovaný obsah cukrů ve vzorcích mléka	48
Tabulka 10 Analyzovaný obsah cukrů ve vzorcích se sníženým obsahem laktózy a bezlaktózových výrobcích	49
Tabulka 11 Analyzovaný obsah cukrů ve vzorcích smetany.....	50
Tabulka 12 Analyzovaný obsah cukrů ve vzorcích mléčných nápojů.....	50
Tabulka 13 Analyzovaný obsah cukrů ve vzorcích mléčných výrobků	51