

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PROBLEMATIKA ANALÝZY MLÉKA POMOCÍ TECHNIKY ICP-OES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

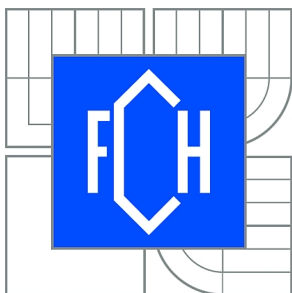
VERONIKA KAŇOVÁ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PROBLEMATIKA ANALÝZY MLÉKA POMOCÍ TECHNIKY ICP-OES

ANALYSIS OF MILK BY ICP-OES TECHNIQUE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

VERONIKA KAŇOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. PAVEL DIVIŠ, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0876/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Veronika Kaňová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Problematika analýzy mléka pomocí techniky ICP-OES

Zadání bakalářské práce:

1. zpracování literární rešerže k zadanému tématu
2. návrh a ověření technik přípravy vzorku k prvkové analýze mléka
3. analýza vybraných vzorků pomocí ICP-OES
4. zpracování a vyhodnocení naměřených dat

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Veronika Kaňová
Student(ka)

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

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

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

Mléko je velice složitý polydisperzní systém. Příprava vzorku mléka je velice důležitým krokem před samotným měřením. V této práci bylo provedeno porovnání čtyř vybraných metod přípravy vzorku: pouhé ředění, ředění vzorku s přidavkem Tritonu X-100, mineralizace na mokré cestě a sonikace. Vybrané prvky byly analyzovány pomocí ICP-OES. Výsledné koncentrace byly porovnány s CRM sušeného mléka. Výsledky práce ukázaly, že nejpřesnější jsou metody přípravy prostého ředění vzorku a mineralizace na mokré cestě. Čtyři různé druhy mléka byly analyzovány pomocí těchto dvou vybraných metod. Metoda prostého ředění vzorku vykazovala větší odchylku měření než mineralizace na mokré cestě, u které však při analýze došlo k větším ztrátám analytu díky tukovým složkám obsažených v mléce.

ABSTRACT

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

Milk is a really complicated polydisperse system. The preparation of samples with milk is very important step before the measurement itself. In the thesis a comparison of four selected methods of sample preparation was made: bare dilution, dilution with addition of Triton X-100, wet ashing and sonication. Selected elements were analysed with the help of ICP-OES. Final concentrations were compared with CRM of dried milk. Data showed that the most accurate are methods of preparation of diluted sample and wet ashing. Four different types of milk were analysed with the help of those two selected methods. The diluted samples showed a bigger anomaly of measuring than the mineralization of wet ashing which came to the loss of analyte because of fat elements contained in milk.

KLÍČOVÁ SLOVA

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

KEYWORDS

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

KAŇOVÁ, V. *Problematika analýzy mléka pomocí techniky ICP-OES*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 37 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

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

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Srdečně bych chtěla poděkovat a vyslovit uznání všem, kteří mi pomáhali při vzniku této bakalářské práce, a to především doc. Ing. Pavlu Divišovi Ph.D. za námět, trpělivé vedení, praktické rady a připomínky v průběhu zpracování bakalářské práce.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Mléko.....	8
2.1.1.	Složení mléka	8
2.2	Analyzované prvky.....	12
2.2.1.	Vápník	12
2.2.2.	Fosfor	13
2.2.3.	Hořčík.....	13
2.2.4.	Sodík	13
2.2.5.	Draslík	14
2.3	Metody prvkové analýzy	14
2.3.1.	Optická emisní spektrometrie s buzením v plazmatu (ICP-OES)	15
2.4	Metody přípravy vzorku	19
2.4.1.	Rozklad vzorku.....	19
2.4.2.	Další metody přípravy vzorku – rychlá analýza	21
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	22
3.1	Vzorek a metoda.....	22
3.1.1.	Typy vzorků.....	22
3.1.2.	Nastavení metody ICP-OES	22
3.1.3.	Vlnové délky	23
3.2	Laboratorní vybavení.....	23
3.2.1.	Chemikálie a vzorky	23
3.2.2.	Používané přístroje.....	23
3.2.3.	Používané pomůcky	24
3.3	Použité pracovní postupy pro analýzu CRM	24
3.3.1.	Ředění vzorku.....	24
3.3.2.	Ředění vzorku s přídavkem Tritonu X-100.....	24
3.3.3.	Příprava vzorku pomocí Lučavky královské a sonikace	24
3.3.4.	Rozklad na mokré cestě	24
3.4	Příprava standardních roztoků (CRM).....	24

3.4.1.	Kalibrace pro vzorky bez úpravy.....	25
3.4.2.	Kalibrace pro vzorky s přidavkem Tritonu X-100	25
3.4.3.	Kalibrace pro vzorky s úpravou pomocí sonikace.....	25
3.4.4.	Kalibrace pro vzorky s úpravou pomocí mokrého rozkladu	25
3.5	Použité pracovní postupy pro vzorky mléka.....	25
3.5.1.	Prosté ředění vzorku	25
3.5.2.	Rozklad na mokré cestě	25
3.6	Příprava standardních roztoků mléčných vzorků	26
3.6.1.	Kalibrace pro vzorky bez úpravy.....	26
3.6.2.	Kalibrace pro vzorky s úpravou vzorků pomocí mokrého rozkladu	26
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	27
4.1	Analýza sušeného mléka (CRM).....	27
4.2	Analýza vzorků kravského mléka	28
4.2.1.	Analýza ředěného vzorku mléka	28
4.2.2.	Analýza vzorků rozkladem na mokré cestě.....	30
5	ZÁVĚR	33
6	LITRATURA	34
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	37

1 ÚVOD

Mléko patří do významné skupiny potravin živočišného původu. Obsahuje v dostatečném množství i v optimálně vyváženém poměru všechny výživné i esenciální látky, které organismus potřebuje pro stavbu a výživu těla. Pro průmyslové zpracování a lidskou výživu se využívá především mléko kravské. Mléko buvolí, kozí nebo ovčí se zpracovává v mnohem menší míře. Jednotlivé složky mléka mají vysokou nutriční hodnotu a jsou v něm obsaženy ve snadno resorbovatelné formě. Mléko je především zdrojem velmi kvalitních proteinů, mléčného tuku a laktózy. Kromě těchto látek také obsahuje anorganické minerální látek, zejména vápník a fosfor, ale také mikroelementy jako je zinek, měď, mangan a železo.

Vysoký obsah bílkovin, sacharidů, vitamínů a dalších složek představuje velice komplikovanou matici. Prvková analýza mléka je z těchto důvodů poměrně komplikovaná. Většina technik pro elementární analýzu mléka vyžaduje mineralizaci na mokré či suché cestě nebo jiné způsoby úprav vzorku. Tyto zmíněné úpravy vzorku jsou složité a časově velice náročné a jsou také spojeny s jistým rizikem kontaminace.

Snaha přímé analýzy vzorku mléka nevedla k uspokojivým výsledkům. Předpokládá se, že nedostatečná přesnost a citlivost je při přímé analýze způsobena díky tukové povaze mléka, velikostí tukových kapiček a nekompletní atomizací mléčného vzorku. Mnohem přesvědčivější výsledky byly získány zředěním mléka nebo rozložením mléčné matrice pomocí minerálních kyselin.

Cílem této práce je proto posouzení a nalezení vhodné, rychlé a nenáročné metody úpravy mléka před jeho samotnou elementární analýzou pomocí optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mléko

Mléko je sekret mléčné žlázy savců, které obsahuje všechny nutričně významné látky potřebné pro výživu mláďat. Ve výživě člověka má význam především jako zdroj vápníku a fosforu [5].

2.1.1. Složení mléka

Mléko představuje velice komplikovaný disperzní systém. Kaseinové molekuly tvoří micelární disperze, lobulární bílkoviny syrovátky koloidní disperze, tuk přítomný ve formě tukových kapek tvoří emulzi, částice lipoproteinů koloidní suspenzi, nízkomolekulární látky (laktosa aj. sacharidy, volné aminokyseliny, minerální látky, vitamíny) tvoří pravý roztok [1]. Procentuální obsah již zmiňovaných složek ukazuje následující Tabulka 1.

Tabulka 1 Obsah živin v mléce [1]

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

2.1.1.1. Voda

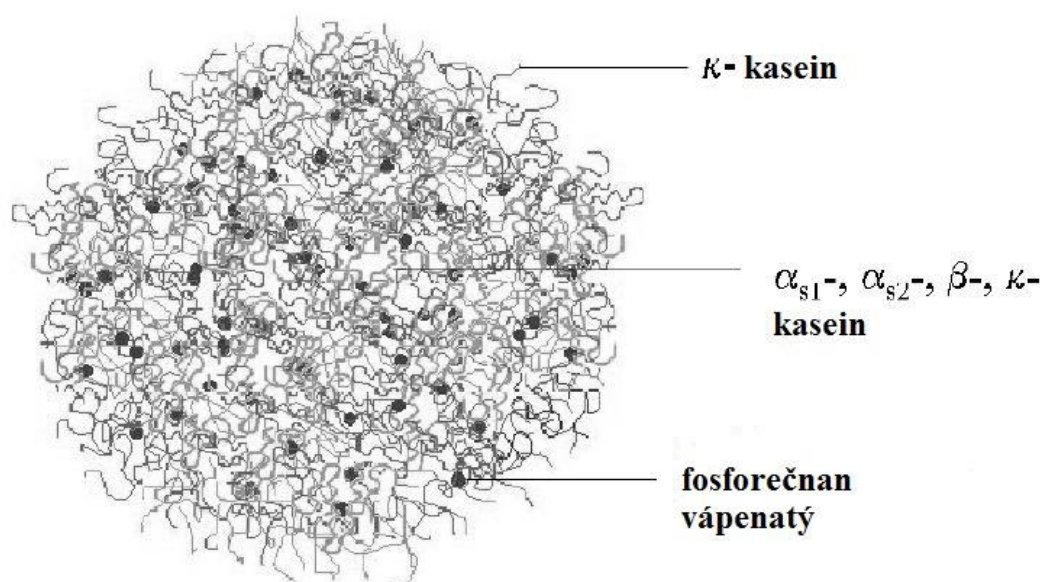
Voda je hlavní a také nezbytnou složkou mléka, jejíž obsah se liší podle druhu. V kravském mléce bývá 87-91 % vody [1], která se vyskytuje jako volná, vázaná na koloidy nebo chemicky vázaná. Většina vody v mléce je formě vody volné [8].

2.1.1.2. Kaseiny

Kasein je fosfoprotein s vysokým obsahem prolinu a nízkým obsahem sirných aminokyselin. Kaseinové molekuly jsou syntetizovány v mléčné žláze a představují směs asi 10-ti různých bílkovin, hlavně α_{S1} , α_{S2} , β , γ a χ kasein, které tvoří 80-90 % bílkovin mléka. Vzájemně se od sebe jednotlivé kaseiny liší primární strukturou, tj. zastoupením aminokyselin [6]. Složení jednotlivých kaseinových proteinů v mléce ukazuje Tabulka 2.

Kasein přítomný v mléce je ve formě komplexu, kaseinových micel, které obsahují kromě bílkovin složky vápníku, fosforu a malé množství hořčíku. Molekuly α_s -, β - a χ -kaseinů nejprve tvoří tzv. submicely obsahující 25–30 molekul. Nepolární části těchto molekul jsou orientovány do středu submicely, kde dochází k hydrofobním interakcím. Polární části molekul kaseinů (fosfoserinové zbytky molekul α_s -kaseinů, β -kaseinů a treoninový zbytek s vázanými oligosacharidy v molekule χ -kaseinu) interagují s vápenatými ionty a vodou. Jednotlivé submicely se vzájemně spojují do micel pomocí fosfátových skupin α_s -kaseinů, β -kaseinů a vápenatých iontů buď přímo, nebo prostřednictvím volných fosfátů a citrátů [5].

Kasein má vysokou výživovou hodnotu. Bílkoviny obsažené v jednom litru mléka pokryjí asi polovinu denní potřeby bílkovin dospělého člověka [2]. Strukturu kaseinových micel ukazuje Obrázek 1.



Obrázek 1 Struktura kaseinové micely

Tabulka 2 Složení kaseinových proteinů kravského mléka [1]

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

2.1.1.3. *Proteiny syrovátky*

Syrovátkové proteiny tvoří přibližně z 50 % globulární protein β -laktoglobulin, který je v mléce přítomen jako dimer a při záhřevu se nevratně denaturuje. Částečně denaturovaný protein reaguje pomocí thiolové skupiny s dalšími mléčnými proteiny za vzniku dimerů spojených disulfidovou vazbou.

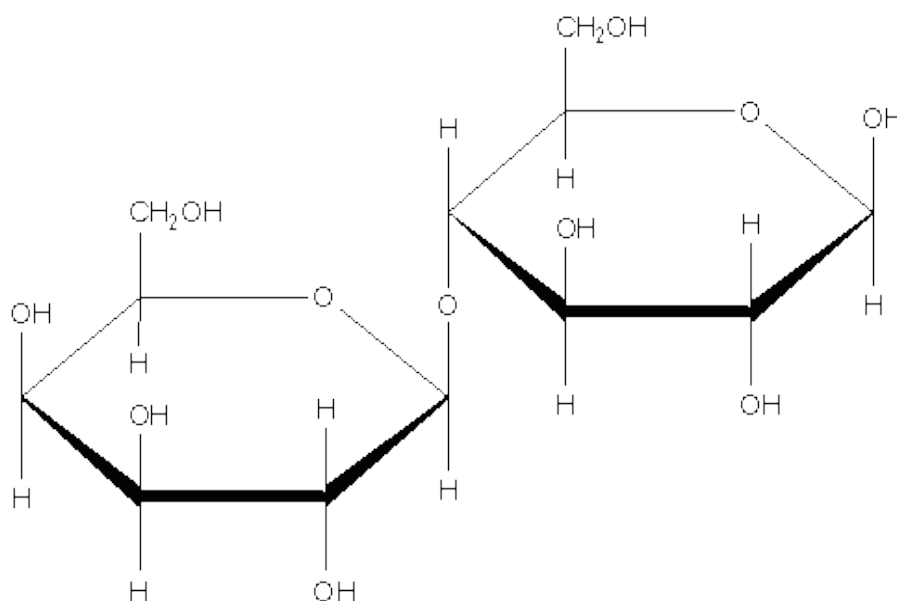
Mezi další hlavní složky kravského mléka patří proteiny jako α -laktoglobulin a krevní sérový albumin, které představují zhruba 20 a 10 % v tomto pořadí. Syrovátka obsahuje i další stopová množství zejména laktotransferinu, serotransferinu a několika enzymů [3].

2.1.1.4. *Sacharidy*

Ze sacharidů obsahuje mléko především laktózu – disacharid složený z glukózy a galaktózy, který ukazuje Obrázek 2. Laktóza má nízkou sladivost a dobrou stravitelnost [6].

Hlavní význam laktózy spočívá v tom, že kyselina mléčná, která vzniká při rozkladu laktózy činností mikroorganismů v intestinálním traktu, zvyšuje resorpci vápníku a také podporuje resorpci vitaminů přijímaných se stravou i resorpci aminokyselin uvolněných při fermentativním odbourání bílkovin.

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



Obrázek 2 Laktóza

2.1.1.5. Tuky

Mléčný tuk je z hlediska výživy důležitou složkou potravy, zejména proto, že je významným zdrojem energie a je lépe stravitelný než jiné tuky. V mléce je tuk přítomen ve formě emulze tukových kuliček jako rozmanitý přirozený lipidový systém [2]. Mléčný tuk obsahuje tri-, di- a monoacylglyceroly, fosfolipidy, steroly a jejich estery, volné mastné kyseliny a v tucích rozpustné vitamíny. Triacylglyceroly tvoří až 98 % lipidů mléka, malé množství lipidů je přítomno ve formě fosfolipidů a sterolů v membráně tukových kuliček. Mléčný tuk má ze všech přirozených tuků nejrozmantější složení a je pro něj typický obsah poměrně vysokého množství mastných kyselin s krátkým řetězcem [8].

2.1.1.6. Vitaminy

Vitaminy jsou organické látky nezbytné pro udržení života organismu, jeho růstu a správného vývoje. Uplatňují se zejména jako katalyzátory různých metabolických dějů v lidském organismu.

Mléko je bohatým zdrojem vitaminů [30], které obsahuje jak hydrofilní, tak lipofilní vitaminy. Z hydrofilních vitaminů se jedná o vitamíny skupiny B jako B5, B2, B6, PP a B12. Zastoupen je i vitamin C a H (biotin), inositol a kyselina listová [6]. Z lipofilních vitaminů mléko obsahuje vitamin A a jeho provitaminy – karoteny. Vitamin D i E se v kravském mléce vyskytují pouze v malých koncentracích.

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

2.1.1.7. Minerální látky

Minerální látky jsou pro lidský organismus velmi důležité, ačkoliv je naše tělo potřebuje jen v malých koncentracích. Jsou nepostradatelné, protože ovlivňují důležité biochemické pochody v našem těle. Mají význam pro růst a tvorbu tkání, aktivují, regulují a kontrolují látkovou výměnu v těle a také se spoluúčastní na vedení nervových vzruchů. Organismus člověka si minerální látky nedovede sám vytvořit a tak je musí dostat spolu s potravou [4].

Mléko i mléčné výrobky jsou bohatým minerálních látek, zejména vápníku. Mléko obsahuje i další minerální látky jako je fosfor, draslík, sodík, chlór nebo hořčík a další látky ve stopových množstvích [2] např. železo, mangan, zinek a měď [6]. Následující Tabulky 3 a 4 ukazují potřebné denní množství minerálních látek a jejich obsah v mléce. O významnosti vybraných prvků je pojednáno v následující kapitole.

Tabulka 3 Potřebné denní množství minerálních látek [23] a jejich koncentrace v mléce [24]

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

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

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

2.2 Analyzované prvky

2.2.1. Vápník

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

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

Denní potřeba vápníku je přibližně 800 mg. Pro vstřebávání je také důležitý poměr vápníku a fosforu, který by měl být 1 : 1,5. Při nedostatku vápníku v těle člověka se vyskytuje osteomalacie a osteoporosa [4].

Aktivita vápníku v mléce má významný vliv na koloidní stabilitu kaseinu, ovlivňuje tedy termolabilitu mléka a jeho srážení. Přítomnost vápníku v mléce činí v průměru $1200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, z toho asi 30 % je přítomno v rozpustné formě v mléčném séru především jako hydrogenfosforečnan a citrát. Dalších 10 % z celkového množství vápníku je v disociované formě. Převážná část vápníku je pak v mléce přítomna v nerozpustné formě tzv. koloidního fosforečnanu vápenatého, obsaženého v kaseinových micelách [5].

2.2.2. Fosfor

Fosfor se vyskytuje v těle i ve stravě zejména jako fosforečnan a je nezbytný pro trávení a látkovou přeměnu (fosforylace). Je základním stavebním kamenem mnoha enzymů a podílí se na udržení normálního stavu kostí a zubů. Vstřebávání fosforu podporuje příjem vitamínu D [17]. Denně by člověk měl spotřebovat přibližně 1,0–1,2 g fosforu.

V současné době je obecně příjem fosforu příliš vysoký, což způsobuje problémy s příjmem vápníku. Je to dáno zejména vysokou spotřebou kolových nápojů, mastných výrobků a tavených sýrů [4].

V mléce, přesněji v kaseinech mléka, činí obsah fosforu průměrně 0,85 % ve formě fosfátů. Fosfátové skupiny jsou zodpovědné za mnoho důležitých vlastností kaseinu, obzvláště za jeho schopnost vázat relativně velké množství vápníku. Fosfát, který je esterifikován k proteinu hydroxylovou skupinou serinu, je obecně nazýván jako organický fosfát. S molekulou kaseinu je také spojena část anorganického fosfátu ve formě koloidního kalcium-fosfátu [31].

2.2.3. Hořčík

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

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

Denní spotřeba hořčíku pro člověka činí 300–600 mg. V mléce je Mg přítomen pouze v malém množství. K nadbytku hořčíku dochází většinou jen při předávkování léky či doplňky stravy. Projevuje se nevolností, zvracením, nízkým krevním tlakem [4].

2.2.4. Sodík

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

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

Technologický význam sodíku při zpracování mléka spočívá hlavně v jeho vlivu na koligativní vlastnosti. Tyto vlastnosti nezávisí na rozpustné látce, ale pouze na její koncentraci. Přesněji jsou určeny molární koncentrací, resp. aktivitou rozpustných látek v mléce, přibližně z poloviny koncentrací laktózy a z poloviny rozpustnými solemi. Velice podobný technologický význam má i draslík [5].

2.2.5. Draslík

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

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

2.3 Metody prvkové analýzy

V současnosti se pro prvkovou analýzu využívá zejména spektrometrických metod, které se podle jejich základních principů rozdělují na atomovou emisní, atomovou absorpční a hmotnostní spektrometrii. V případě iontů kovů (Cu, Fe, Zn aj.) se jejich naprostá většina stanovuje především atomovou spektrometrií po mineralizaci. Pro vyšší koncentrace se volí plamenové techniky jako je F-AAS, pro stopové koncentrace se často využívají elektrotermické atomizace (ET-AAS) v grafitové nebo wolframové kyvetě nebo plazmové techniky (ICP-OES nebo ICP-MS). Ke stanovení alkalických kovů (Na, K) a kovů alkalických zemin (Ca, Mg) je nejčastěji používána plamenová fotometrie (FP) a atomová absorpční spektrometrie (F-AAS) [23]. Následující Tabulka 5 ukazuje meze detekce vybraných nepoužívanějších metod prvkové analýzy.

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

Tabulka 5 Meze detekce vybraných spektrometrických metod [29]

Metoda	Mez detekce [mg · l⁻¹]
ICP-MS	0,01–1
ETA-AAS	0,01–2
ICP-OES	2–1000
F-AAS	> 5

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

ICP-OES se stala jednou z nejuniverzálnějších metod prvkové analýzy a dnes umožňuje principálně přímou analýzu kapalných, plynných i pevných vzorků [10]. V praxi se však používá převážně pro roztokovou analýzu [19].

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

2.3.1.1. Princip metody

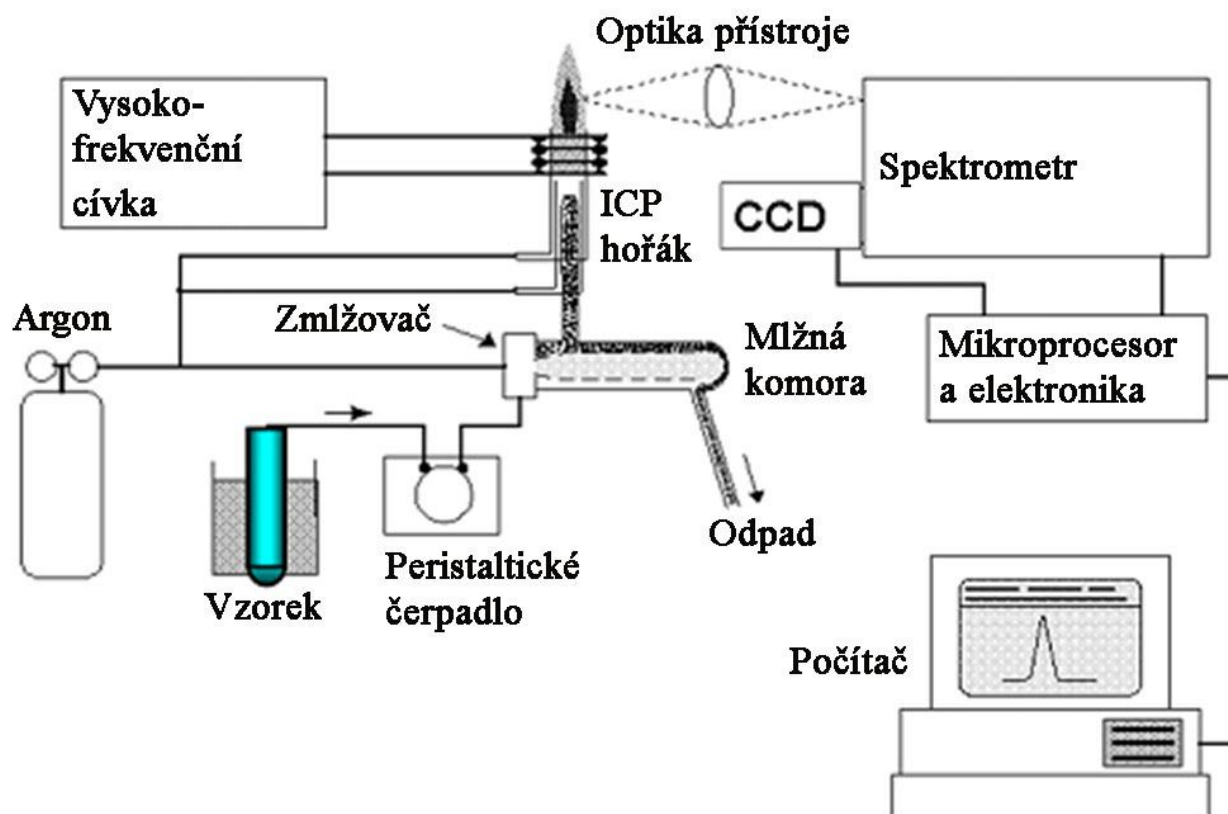
Metoda slouží k určení složení analyzovaného vzorku pomocí záření, které atomy vzorku vysílají. Aby vzorek toto záření vysílal, musí se atomy prvku převést do excitovaného stavu dodáním energie.

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

2.3.1.2. Instrumentace

Přístroj ICP-OES obsahuje budicí zařízení jako zdroj energie a napájecí generátor. Základem budicího zařízení je plazmová hlavice s indukční cívkou [19]. Každý spektrální přístroj má kromě zdroje excitační energie ještě tyto části: vstupní štěrbinu, monochromátor, zaostřovací systém a detektor záření [18]. Schéma přístroje je vidět na Obrázku 3.

Převážnou většinu vzorků pro techniku ICP-OES je třeba před analýzou převést do roztoku. Transport vzorku do plazmatu probíhá obvykle pomocí peristaltické pumpy, která přivádí roztok analytického vzorku do zmlžovače. Vzorek je v tomto zmlžovači zmlžen, čímž se vytvoří aerosol vzorku. Ten se pak vede přes mlžnou komoru, kde dochází k odloučení velkých kapek, do injektorové trubice plazmové hlavice. Vzniklá mlha je proudem argonu vedena do hořáku, ve kterém je za pomoci střídavého vysokofrekvenčního magnetického pole udržováno argonové plazma o teplotě až 10 000 K. Energie v plazmatu je dostatečná k tomu, aby došlo k excitaci elektronů přítomných atomů do vyšších energetických hladin. Tato emise elektro-magnetického záření je zpracována monochromátorem na jednotlivé vlnové délky. Záření o určité vlnové délce je na konci snímáno opticky citlivým detektorem. Na základě odezvy detektoru je výsledný signál zpracován počítačem [20].



Obrázek 3 Schéma ICP-OES

2.3.1.3. Zmlžovače

Zmlžovače dělíme dle principu na dvě základní skupiny – pneumatické a ultrazvukové.

2.3.1.3.1. Pneumatické zmlžovače

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

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

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

2.3.1.3.2. Ultrazvukové zmlžování

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

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

2.3.1.4. Indukčně vázané plazma (Inductively Coupled plasma – ICP)

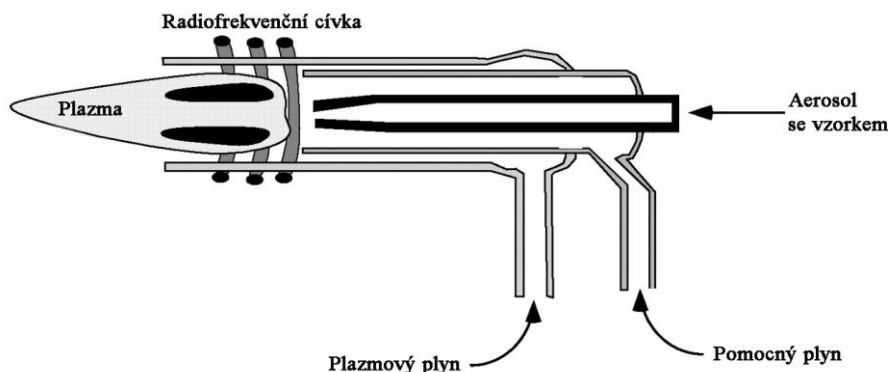
ICP patří mezi novější zdroje buzení optických spekter atomů a iontů. Představuje ionizovaný plyn, složený z plynných iontů, metastabilních atomů argonu a elektronů. Plazma je kvazineutrální a silně elektricky vodivé. Zvláštní význam má argonové plazma za atmosférického tlaku [10].

Plazma vzniká v plazmové hlavici působením vysokofrekvenčního elektromagnetického pole pomocí indukční cívky v prostředí argonu. Plazmová hlavice, v níž hoří plazma, má tři toky plynu: prostřední trubicí prochází aerosol vzorku s nosným plynem (argon, dusík), další trubicí proudí plyn, z něhož vzniká plazma (vnitřní plazmový plyn), a tangenciálně další argon jako chladicí plyn (vnější plazmový plyn). Plazma se zapaluje Teslovým výbojem [7]. Aerosol prochází analytickým kanálem, který je obklopen plazmou o vysoké teplotě. Dochází k vypaření vzorku, atomizaci a ionizaci volných atomů a iontů. Plazmová hlavice je zobrazena na Obrázku 4.

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

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

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



Obrázek 4 Plazmová hlavice

2.3.1.5. Monochromátory

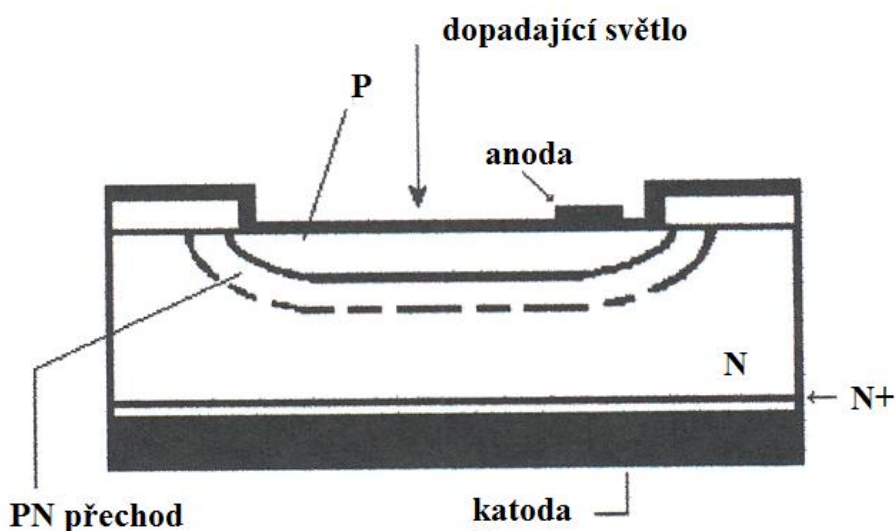
Nároky na kvalitu monochromátoru se u jednotlivých spektrálních metod liší. V metodě OES se vyžaduje vymezení úzkého spektrálního intervalu monochromátorem s vysokou rozlišovací schopností [18]. Monochromátory se skládají z: vstupní štěrby, disperzního prvku (mřížka, hranol), výstupní štěrby a zaostřovací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

Samotné záření je nejdříve filtrováno monochromátorem na fotony o určité vlnové délce, příslušející požadované analytické čáře daného prvku. V případě nedisperzních monochromatických zařízení se z polychromatického zařízení vydělí jen požadovaná oblast bez rozkladu záření na spektrum. Mezi monochromátory patří různé druhy optických filtrů pracujících na principu absorpce, interference, rozptylu, polarizace záření apod. V případě disperzních monochromatizačních zařízení je využito principů umožňujících rozklad záření na prostorově uspořádané spektrum, ze kterého se mechanickým způsobem (štěrbínami) mohou vydělit požadované úzké oblasti umožňující simultánní měření několika monochromatických složek [21]. Pootočením soustavy nebo posuvem výstupní štěrby můžeme tak postupně skenovat celé spektrum a při zvolených vlnových délkách změřit potřebné spektrum sekvenčním způsobem. V současnosti se na spektrální rozklad téměř bez výjimky používají difrakční mřížky, a to buď rovinné, nebo duté [22].

2.3.1.6. Způsob detekce

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

Nejčastější používané detektory fotočlánků jsou fotodiody, jejichž schéma je na Obrázku 5. Asi nejvíce spolehlivé a všestranně použitelné jsou křemíkové fotodiody. Na krystaly křemíku této diody je připojeno vnější napětí. V oblasti *N* je přebytek elektronů a v oblasti *P* přebytek děr. Dopadající záření uvolňuje elektrony uvnitř materiálu polovodiče. Elektrony přechází do *N* vrstvy, díry do *P* vrstvy a vzniká elektrický proud, který se měří.



Obrázek 5 Schéma fotodiody

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

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

2.3.1.7. Interference

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

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

Spektrální interference jsou doposud zásadním problémem ICP-OES, zejména jsou-li ve vzorku přítomny vyšší koncentrace prvků s komplexním emisním spektrem nebo intenzivními emisními čarami. Dochází k částečnému nebo úplnému překryvu emisních linií dvou nebo více čar s blízkými vlnovými délkami. Předpokladem pro minimalizaci spektrálních interferencí jsou disperzní prvky s dostatečným rozlišením [7].

2.4 Metody přípravy vzorku

Většina instrumentálních analytických metod prvkové analýzy vyžaduje, aby byl vzorek v kapalném stavu. Příprava vzorku patří k základním úkonům při analýze. Na jejím provedení záleží celkový úspěch analytického stanovení.

2.4.1. Rozklad vzorku

Rozklad vzorku je pro stanovení prvků v různých materiálech významnou operací. Smyslem těchto destruktivních technik je dosažení vhodnější konzistence, snížení viskozity a zvýšení homogenity. Z chemického hlediska je tato úprava vhodná především k uvolnění analytu z různých vazeb a forem a odstranění složek, které mohou při měření interferovat [15].

2.4.1.1. Rozklad na mokré cestě

Provádí se ve směsi koncentrovaných minerálních látek za zvýšené teploty a při atmosférickém tlaku. Dochází k oxidaci vzorku příslušnými činidly, je rozrušena jeho struktura kyselou hydrolýzou a meziprodukty jsou následně oxidovány. Rozklad probíhá za nižších teplot než u suchého rozkladu, protože maximální teplota je určena bodem varu oxidačních činidel nebo jejich směsí [23]. Čím má vzorek více tuku, tím je rozklad složitější.

Jako oxidačních činidel je nejčastěji využíváno samotné kyseliny dusičné, kyseliny sírové, chloristé nebo jejich reakčních směsí ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$). Pro mléko se používá kyselin v poměru 1 : 1,25, u vysokotučných výrobků musí být použito více kyseliny dusičné [9].

2.4.1.2. Mikrovlnné zpopelnění

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

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

2.4.1.3. Rozklad na suché cestě (zpopelnění)

Klasický rozklad na suché cestě spočívá v oxidaci organické matrice atmosférickým kyslíkem za zvýšené teploty (nejčastěji 450–550 °C) a za atmosférického tlaku [11]. Vzorek se zahřívá tak dlouho, až se organický materiál zcela zmineralizuje. Spálením se má získat bílý popel. Suchý rozklad zpravidla trvá až několik desítek hodin, provádí se v křemenných, skleněných nebo platinových nádobkách a probíhá ve čtyřech fázích: sušení, zuhelnění, zpopelnění a loužení popela [13]. První tři fáze mohou být realizovány v jednom zařízení (elektrická pec) nebo různých zařízení (sušárna, infralampa, topná deska, pec).

Tekuté výrobky se nejdříve odpaří a vysuší. Zuhelnění se pak nejčastěji provádí na topné desce nebo přímo v elektrické peci. Po ochlazení se používají zředěné minerální látky (kyselina dusičná). Obsah misky se zahřeje na vroucí lázni, tím se zvýší účinnost loužení a zfiltruje se. Filtrační papír se zbytkem analytu se vloží do původní misky a opět se vysuší, spálí a vyžihá. Druhý podíl popela se opět vylouží zředěnou minerální kyselinou, zfiltruje a smíchá s prvním filtrátem. Podle potřeby lze spojené filtráty odpařit na menší objem, poté jsou využity k vlastnímu stanovení prvků [14,15].

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

2.4.2. Další metody přípravy vzorku – rychlá analýza

Tato práce se zabývá metodami přípravy vzorků mléka k prvkové analýze a je zaměřena na časově nenáročnou, jednoduchou, ale přitom účinnou přípravu vzorku před vlastním měřením.

Přímá analýza vzorku mléka spočívá v tom, že je vzorek přímo dávkován do optického emisního spektrometru bez předchozí mineralizace nebo bez jakékoli jiné úpravy. Mléko je pouze vhodně naředěno, a to tak, aby se koncentrace tukových složek snížila na takové množství, které výrazně neovlivní výsledky analýzy.

Další alternativou přípravy vzorku je úprava vzorku pomocí *povrchově aktivních látek*, jako je například Triton X-100. Malý přídavek Tritonu X-100 k vhodně naředěnému vzorku slouží k uvolnění membrány obalující mléčný tuk [26].

Složitou matici mléka je možno rozrušit za použití minerálních kyselin (kyselina dusičná) nebo jejich směsí (lučavka královská). Vystavením mléka působením kyseliny dochází k vysrážení kaseinu (mléčné bílkoviny) a k oddělení syrovátky (tj. žlutá tekutina bez vysráženého kaseinu) [28]. Pro rozrušení vzniklých sraženin se vzorek mléka nechá působit v ultrazvukové lázni. Tento způsob rozrušování se nazývá *sonikace*, což je proces při kterém dochází k destrukci buněčných stěn pomocí ultrazvukových vln. Po sonikaci vzniká čirý vzorek vhodný k analýze [27].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Vzorek a metoda

Cílem experimentální části je ověření metod pro přípravu vzorku mléka k následné elementární analýze pomocí ICP-OES. Při přípravě vzorku pro chemický rozbor nesmí mléko vykazovat stlučený nebo volný tuk a vysrážené bílkoviny. Jejich výskyt dává rozboru charakter pouze orientační, neboť snižuje přesnost získaných výsledků [9].

Vzorky byly připraveny několika různými způsoby. Z literatury byly vybrány následující postupy přípravy vzorku: prosté ředění, rozklad na mokré cestě, ředění s přídavkem Tritonu X-100 a sonikace.

Jednotlivé připravené vzorky mléka byly následně vyhodnoceny pomocí optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES).

3.1.1. Typy vzorků

K experimentu byly použity celkem čtyři různé druhy mléka. Mléko odstředěné, s nejnižším obsahem tuku, a to méně než 0,5 %, dále bylo k analýze použito mléko polotučné s obsahem tuku 1,5 %, mléko plnotučné a mléko čerstvé obsahující více než 3,5 % tuku.

3.1.2. Nastavení metody ICP-OES

Před samotnou analýzou byly nastaveny základní parametry metody a byl zvolen zmlžovač typu „Burgener“, z důvodu menší pravděpodobnosti ucpaní kapiláry zmlžovače tukovými či jinými částicemi obsažených ve vzorku mléka. Během analýzy bylo používáno ruční dávkování vzorků. Přehled těchto základních nastavení přístroje ukazuje následující Tabulka 6.

Tabulka 6 Nastavení přístroje ICP-OES

Přístroj	Optický emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem, model Ultima 2, HORIBA Scientific Ltd.
Průtok argonu [$\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$]	14,0 (plazmový plyn) 0,2 (pomocný plyn pro stanovení Mg a P) 0,8 (pomocný plyn pro stanovení Ca, Na a K)
Zmlžovač	Typ „Burgener“
Mlžná komora	Cyklonová
Rychlost otáček peristaltického čerpadla [rpm]	20
Tlak na zmlžovači [bar]	3
Výkon generátoru [W]	1200

3.1.3. Vlnové délky

Hodnoty vybraných vlnových délek pro jednotlivé prvky jsou znázorněny v Tabulce 7. Tyto vlnové délky byly získány z normy ČSN EN ISO 11885 zabývající se stanovením prvků pomocí ICP-OES [33].

Tabulka 7 Vybrané vlnové délky prvků

Prvek	Vlnová délka
	[nm]
Ca	422,673
Na	588,900
K	766,490
Mg	285,213
P	213,618

3.2 Laboratorní vybavení

3.2.1. Chemikálie a vzorky

- Ultračistá neionizovaná voda vyrobena ELGA PureLab Classic; Veolia Water Systems LTD., UK
- HNO_3 – Kyselina dusičná 67%, p.a.+; Analytika Praha spol. s.r.o., ČR
- HCl – Kyselina chlorovodíková 37%, p.a.+; Analytika Praha spol. s.r.o., ČR
- Triton X-100; Sigma-Aldrich Praha spol. s.r.o., ČR
- Kalibrační roztoky ASTASOL, koncentrace $1,000 \pm 0,002 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$; Analytika Praha spol. s.r.o., ČR
- CRM – Certifikovaný referenční materiál, Skimmed milk powder ERM-BD 150
- Mléko odstředěné trvanlivé, BASIC 0,5 %
- Mléko polotučné trvanlivé, MADETA 1,5 %
- Mléko plnotučné trvanlivé, MADETA 3,5 %
- Mléko čerstvé, Mléčný automat

3.2.2. Používané přístroje

- Optický emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem, model Ultima 2; HORIBA Scientific Ltd., FR
- Analytické váhy AND HA-202M; A&D Company, JAP
- Reciproční třepačka GFL 3006
- Topná deska ETA 2107
- Ultrazvuková lázeň – Ultrasonic Compact cleaner PSO 3000A; PowerSonic s.r.o.

3.2.3. Používané pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Automatické pipety a mikropipety
- Plastové zkumavky, 10 ml

3.3 Použité pracovní postupy pro analýzu CRM

Nejprve byly připraveny a vyhodnoceny vzorky certifikovaného sušeného mléka, které následně sloužily k porovnání přesnosti vybraných metod.

3.3.1. Ředění vzorku

Přibližně 0,1 g vzorku CRM sušeného mléka bylo převedeno do odměrné baňky na 50 ml a zváženo s přesností na čtyři desetinná místa. Odměrná baňka byla následně doplněna po rysku destilovanou vodou a řádně promíchána až do úplného rozpuštění mléka.

3.3.2. Ředění vzorku s přídavkem Tritonu X-100

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

3.3.3. Příprava vzorku pomocí Lučavky královské a sonikace

Množství 0,1 g CRM sušeného mléka bylo zváženo na čtyři desetinná místa v 50 ml odměrné baňce. Odměrná baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou a řádně promíchána. Z takto připraveného roztoku byly odebrány 2 ml do umělé zkumavky, ke kterým bylo přidáno 5 ml předem připravené Lučavky Královské (poměr kyseliny chlorovodíkové a kyseliny dusičné – 3 : 1). Obsah zkumavky byl řádně protřepán na třepačce a poté se nechal sonikovat v ultrazvukové lázni 10 minut. Obsah zkumavky byl kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn po rysku destilovanou vodou. Nakonec se odměrná baňka se vzorkem opět nechala působit v ultrazvukové lázni po dobu nejméně 20 minut.

3.3.4. Rozklad na mokré cestě

Množství 0,1 g CRM sušeného mléka bylo zváženo na čtyři desetinná místa v 50 ml odměrné baňce. Odměrná baňka byla následně doplněna po rysku destilovanou vodou a řádně promíchána. Z takto připraveného vzorku byly odebrány 2 ml do Erlenmeyerovy baňky, do které bylo následně přidáno 5 ml koncentrované kyseliny dusičné. Směs byla následně zahřívána na topné desce do vzniku čirého roztoku. Po ochlazení byl vzorek kvantitativně převeden do odměrné baňky na 50 ml a destilovanou vodou doplněn po značku.

3.4 Příprava standardních roztoků (CRM)

Pro každou metodu byly zvlášť připraveny standardní roztoky o koncentracích 0, 20 a 40 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Pro metody přípravy vzorku pouhým ředěním a ředěním s přídavkem Tritonu X-100, byly kalibrační roztoky vytvořeny s použitím metody standardního přídavku, aby se mohl zanedbat vliv matrice vzorku.

3.4.1. Kalibrace pro vzorky bez úpravy

Byly připraveny tři 25 ml odměrné baňky s 0,05 g vzorku sušeného mléka. První odměrná baňka, která sloužila jako *blank*, byla doplněna po rysku destilovanou vodou ($0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). Do druhé odměrné baňky bylo napipetováno 500 μl ($20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) a do třetí 1 ml ($40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) z každého kalibračního roztoku (Ca, Na, K, P a Mg). Obě odměrné baňky byly poté doplněny po rysku destilovanou vodou a promíchány.

3.4.2. Kalibrace pro vzorky s přidavkem Tritonu X-100

Kalibrační roztoky byly připraveny stejným způsobem jako v předchozím případě. S tím rozdílem, že ke všem vzorkům v 25 ml odměrných baňkách bylo přidáno množství 100 μl Tritonu X-100. Poté byly všechny vzorky doplněny destilovanou vodou po rysku a promíchány.

3.4.3. Kalibrace pro vzorky s úpravou pomocí sonikace

Do dvou připravených odměrných baněk na 25 ml bylo napipetováno 500 μl ($20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) a do třetí 1 ml ($40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) každého kalibračního roztoku (Ca, Na, K, P a Mg). Následně byly baňky doplněny po rysku destilovanou vodou a promíchány. Jako *blank* byla použita čistá destilovaná voda.

3.4.4. Kalibrace pro vzorky s úpravou pomocí mokrého rozkladu

Do třech připravených odměrných baněk bylo nepipetováno 1,25 ml koncentrované kyseliny dusičné. Jedna z 25 ml odměrných baněk byla doplněna po rysku destilovanou vodou a sloužila jako *blank*. Do druhé odměrné baňky bylo nepipetováno 500 μl ($20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) a do třetí po 1 ml ($40 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) z každého kalibračního roztoku (Ca, Na, K, P a Mg). Zbylé odměrné baňky byly nakonec doplněny destilovanou vodou po značku a promíchány.

3.5 Použité pracovní postupy pro vzorky mléka

Byly vybrány dvě metody přípravy vzorku, které nejvíce vyhovovaly požadavkům prvkové analýzy mléka. Učinilo se tak z výsledných hodnot získaných při analýze CRM sušeného mléka. Tyto hodnoty jsou uvedeny v následující kapitole 4, v Tabulce 8.

3.5.1. Prosté ředění vzorku

Přibližně 1 ml vzorku odstředěného, polotučného, plnotučného a čerstvého mléka bylo převedeno do odměrných baněk na 100 ml a zváženo s přesností na čtyři desetinná místa. Všechny odměrné baňky byly následně doplněny po rysku destilovanou vodou a řádně promíchány.

3.5.2. Rozklad na mokré cestě

Objem 2 ml všech zakoupených vzorků mléka byl zvážen na čtyři desetinná místa. Ke 2 ml vzorku v Erlenmeyerově baňce, bylo přidáno 5 ml koncentrované kyseliny dusičné. Směs byla následně zahřívána na topné desce do vzniku čirého roztoku. Po ochlazení byl vzorek kvantitativně převeden do odměrné baňky na 100 ml a destilovanou vodou doplněn po značku a promíchán.

3.6 Příprava standardních roztoků mléčných vzorků

Celkem byly připraveny standardní roztoky pro dvě kalibrační křivky o koncentracích 0, 20 a 40 mg · l⁻¹. Pro kalibrační roztoky pro vzorky bez úpravy byla opět použita metoda standardního přidavku.

3.6.1. Kalibrace pro vzorky bez úpravy

Byly připraveny tři 25 ml odměrné baňky s 0,250 µl vzorku polotučného mléka. První odměrná baňka, sloužící jako *blank*, byla doplněna po rysku destilovanou vodou. Do druhé odměrné baňky bylo napipetováno 0,5 ml (20 mg · l⁻¹) a do třetí po 1 ml (40 mg · l⁻¹) z každého kalibračního roztoku (Ca, Na, K, P a Mg). Odměrné baňky byly následně doplněny destilovanou vodou po rysku a promíchány.

3.6.2. Kalibrace pro vzorky s úpravou vzorků pomocí mokrého rozkladu

Do třech připravených odměrných baněk bylo pipetováno 1,25 ml koncentrované kyseliny dusičné. Jedna z těchto odměrných baněk byla doplněna po rysku a sloužila jako *blank*. Do druhé odměrné baňky bylo napipetováno 0,5 ml (20 mg · l⁻¹) a do třetí 1 ml (40 mg · l⁻¹) každého kalibračního roztoku (Ca, Na, K, P a Mg). Odměrné baňky byly následně doplněny destilovanou vodou po rysku a promíchány.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Analýza sušeného mléka (CRM)

Ověření správnosti laboratorních postupů a výsledků se provádí pomocí certifikovaných referenčních materiálů. CRM lze obecně označit za vzorky se známým obsahem stanovovaných složek. Pro tuto analýzu byl použit vzorek odstředěného sušeného mléka (Skimmed milk powder ERM-BD 150). Výsledky analýz porovnané s tímto certifikovaným referenčním materiálem je možno vidět v Tabulce 8.

Tabulka 8 Výsledné hodnoty

Minerální prvek	Bez úpravy	Triton X-100	Kyselina dusičná	CRM
	[g · kg ⁻¹]	[g · kg ⁻¹]	[g · kg ⁻¹]	[g · kg ⁻¹]
Ca	15,74 ± 1,15	15,20 ± 2,11	12,22 ± 1,25	13,90 ± 0,80
K	14,40 ± 3,46	12,83 ± 4,61	14,34 ± 0,67	17,00 ± 0,70
Na	3,41 ± 0,54	2,71 ± 1,03	3,97 ± 0,28	4,18 ± 0,19
Mg	1,40 ± 0,21	1,31 ± 0,33	1,16 ± 0,15	1,26 ± 0,10
P	13,32 ± 0,83	10,82 ± 0,99	9,70 ± 0,55	11,00 ± 0,60

Metoda přípravy vzorku pomocí rozkladu mléčné matrice minerální kyselinou byla vyhodnocena jako metoda nejvhodnější, jelikož se její výsledky nejvíce přibližují k daným certifikovaným hodnotám. Druhá metoda, která nejlépe vyhovovala požadavkům hodnot certifikovaného materiálu, je metoda bez úpravy vzorku, s pouhým ředěním. K vyhodnocení vzorků mléka proto bylo využito pouze těchto dvou metod.

Metoda přípravy zředěného vzorku s přidavkem Tritonu X-100 se u některých prvků (Mg, P) jevila jako vhodná, s dostatečnou výtěžností. Avšak prvky jako sodík a draslík vykazovaly výtěžnost nižší. Z těchto důvodů nebyla pro další analýzu vzorků tato metoda dále použita.

Vzorky upravené přidavkem lučavky královské s využitím sonikace nebyly vůbec analyzovány. Při styku minerálních kyselin s mlékem se totiž vysrážené bílkoviny nepodařilo při sonikaci úplně rozložit. Vzorek tak byl zakalený drobnými sedimentujícími částicemi, což je v rozporu s vybranou literaturou. V této literatuře bylo postupováno stejným způsobem – vzorek byl rozložen pomocí lučavky královské a následně sonikován v ultrazvukové vodní lázni za vzniku čirého roztoku [27]. Při analýze složitých matric s vyšším obsahem solí, je důležité pracovat se vzorky, ve kterých nejsou zbytky nerozpuštěných suspendovaných částic, jinak se po nadávkování vzorku do spektrometru, může zmlžovač snadno mechanicky ucpat.

4.2 Analýza vzorků kravského mléka

Vzorky odstředěného, polotučného, plnotučného a čerstvého mléka byly použity pro elementární analýzu a připraveny pomocí dvou vybraných metod: pouhé ředění vzorku a rozklad na mokré cestě s použitím kyseliny dusičné a zvýšené teploty. Výsledky analýz podrobněji popisují následující kapitoly.

4.2.1. Analýza ředěného vzorku mléka

Veškeré jednotlivé vzorky mléka, naředěné v poměru 1:100, byly přímo analyzovány pomocí metody ICP-OES a získané výsledky byly následně vyhodnoceny. Výsledné koncentrace analyzovaných makrelementů jsou shrnuty v Tabulce 9 a následně níže popsány.

Tabulka 9 Výsledné hodnoty obsahu minerálních látek bez úpravy mléka

Minerální prvek	Mléko			
	odstředěné	polotučné	plnotučné	čerstvé
	[mg · kg ⁻¹]	[mg · kg ⁻¹]	[mg · kg ⁻¹]	[mg · kg ⁻¹]
Ca	1065 ± 44	1077 ± 45	1015 ± 39	1054 ± 51
Na	467 ± 15	438 ± 13	443 ± 10	424 ± 18
K	1005 ± 88	977 ± 78	960 ± 79	958 ± 81
Mg	187 ± 4	180 ± 9	179 ± 8	184 ± 5
P	664 ± 32	641 ± 38	613 ± 35	691 ± 34

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

Vázané minerální látky vykazují tedy větší hmotnost a mohou tak v roztoku vzorku sedimentovat a udržovat se tak v jeho spodní části. Díky jejich velikosti a hmotnosti se také mohou při zmlžování odstranit v mlžné komoře se zbytkem větších kapiček, které odchází odpadem ven. Může tak docházet k nežádoucím ztrátám analytu a tedy k ovlivnění výsledků experimentu.

Obsah minerálních látek v mléce také není konstantní a je ovlivněn řadou různých faktorů, jako laktanční období, výživa, faktory genetické a faktory vnějšího prostředí [2].

4.2.1.1. Vápník

Prvková analýza ukázala, že vápník má v mléce u všech vzorků největší zastoupení. Koncentrace vápníku u odstředěného mléka byla $1065 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, polotučného mléka $1077 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a u plnotučného $1015 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Koncentrace vápníku u čerstvého mléka byla $1054 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. V literatuře se udává obsah vápníku v rozmezí $1070\text{--}1330 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [24]. Naměřené koncentrace vápníku v mléce v této bakalářské práci se pohybují v dolní hranici tohoto intervalu.

Většina vápníku obsaženého v mléce je přítomno v mléčné plazmě (až 99 %). Jak již bylo řečeno, vápník je přibližně z 30 % rozpuštěný v mléčném séru a jeho zbytek je vázán v micelách kaseinu převážně ve sloučeninách s kyselinou fosforečnou. Volný vápník v rozpustné fázi tvoří pouze 10 % z celkového obsahu a větší část rozpustného vápníku představuje citrát vápenatý [12]. Množství tuku v mléce by na obsah vápníku nemělo mít vliv, neboť vápník není na tukovou složku vázán ve větším množství. Koncentrace vápníku jsou mírně zvýšené v kolostru (tzv. prvotní mléko savců) a ke konci laktace [12].

Jak již bylo zmíněno v úvodu této kapitoly, je možné, že výsledné koncentrace vápníku jsou mírně podhodnoceny díky ztrátám při zavádění vzorku do plazmatu. Tento problém by pravděpodobně bylo možné odstranit použitím jiného způsobu rozkladu vzorku, např. mikrovlnného rozkladu, nebo rozkladu na suché cestě, kdy by došlo ke kompletnímu odstranění matrice vzorku.

4.2.1.2. Sodík

Koncentrace sodíku uváděné v literatuře se pohybují v rozmezí $400\text{--}580 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. V odstředěném mléce byla koncentrace sodíku $467 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, v mléce polotučném $438 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, plnotučném $443 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a v čerstvém mléce $424 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Tyto naměřené koncentrace souhlasí s literaturou [24].

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

4.2.1.3. Draslík

Mléko je bohatým zdrojem draslíku. Literatura udává obsah draslíku v mléce v rozmezí $1440\text{--}1780 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [24]. Výsledné koncentrace draslíku v analyzovaném mléce v této bakalářské práci jsou v porovnání s literaturou nižší. V kravském mléce bylo naměřeno $1005 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ draslíku, v mléce polotučném a plnotučném 977, resp. $960 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a v mléce čerstvém $958 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

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

4.2.1.4. Hořčík

Naměřené koncentrace hořčíku byly u odstředěného mléka $187 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, u polotučného mléka $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, u plnotučného mléka $179 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. U mléka čerstvého bylo neměřeno $184 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Koncentrace hořčíku v kravském mléce jsou v literatuře uváděny v rozmezí od 90 až do $160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [24].

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

4.2.1.5. Fosfor

Literatura udává koncentraci fosforu v mléce v rozmezí hodnot $630\text{--}1020 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, což odpovídá neměřeným hodnotám [24]. Koncentrace fosforu v odstředěném mléce byla $664 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. V dalším vzorku polotučného mléka byla naměřena koncentrace $641 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, v mléce plnotučném $613 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a v mléce čerstvém $691 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Přibližně polovina z celkového množství fosforu (cca 56 %) se vyskytuje ve formě volných fosfátových iontů. Z celkového množství fosforu, které se v mléce nachází, se 20 % vyskytuje jako organický fosfát vázaný na molekuly kaseinu a zbývající část tvoří anorganický fosfát, v kaseinu přítomný jako kalcium-fosfát. Během laktace se u fosforu nedějí žádné významnější změny jako to je u jiných prvků [12].

4.2.2. Analýza vzorků rozkladem na mokré cestě

Výsledky analýzy po rozložení mléčné matrice pomocí koncentrované kyseliny dusičné zobrazuje Tabulka 10.

Při přípravě vzorků mléka nastaly jisté komplikace, kdy po rozložení matrice koncentrovanou kyselinou dusičnou za zvýšené teploty, a po převedení vzorků do odměrných baněk došlo k vytvoření emulze. Ve vzorku byly patrné tukové částice.

Při analýze certifikovaného vzorku se metoda rozkladu na mokré cestě ukázala být jako nejvhodnější. Důvodem, proč u referenčního materiálu nedošlo ke vzniku emulze, může být to, že certifikované sušené mléko mohlo být zcela odtučněné.

Z výsledků je patrné, že u většiny prvků s rostoucím obsahem tuku v mléce celkově klesají hodnoty stanovených koncentrací prvku. To potvrzuje fakt, že mléko či jiná složitá matrice, která obsahuje větší množství tuku, způsobuje při analýze problémy. Nejuspokojivější výsledky byly získány u mléka odstředěného.

Tabulka 10 Výsledné hodnoty obsahu minerálních látek pomocí rozkladu kyselinou

Minerální prvek	Mléko			
	odstředěné [mg · kg ⁻¹]	polotučné [mg · kg ⁻¹]	plnotučné [mg · kg ⁻¹]	čerstvé [mg · kg ⁻¹]
Ca	755 ± 31	321 ± 14	307 ± 15	288 ± 12
Na	324 ± 9	375 ± 5	384 ± 8	337 ± 5
K	988 ± 12	957 ± 11	1060 ± 15	842 ± 18
Mg	71,2 ± 0,9	30,7 ± 0,5	30,7 ± 0,6	28,0 ± 0,8
P	639 ± 28	280 ± 16	280 ± 23	241 ± 21

4.2.2.1. Odstředěné mléko

Odstředěné mléko má ze všech stanovovaných vzorků nejnižší obsah tuku, a to nižší než 0,5 %. Výsledky analýz se tak nejvíce přibližují k hodnotám získaným z předchozí analýzy zředěného mléka. Koncentrace prvků v mléce naměřené po různém zpracování vzorku jsou uvedeny v Tabulce 11.

Čím je ve vzorku větší obsah tukových složek, tím je rozklad obtížnější. Metoda mokrého rozkladu je tedy vhodnější pro vzorky s nižším nebo žádným obsahem tuku. Pro vzorky s vyšším obsahem tuku je možno vyzkoušet jiné minerální kyseliny nebo jejich směsi. Stejně jako koncentrovaná HNO₃, tak také například její směs (HNO₃ + H₂O₂) nebo koncentrovaná kyselina sírová se využívají k rozkladu organických materiálů [32]. Pokud nepostačuje mineralizace na mokré cestě, lze využít mineralizace na suché cestě, která je však mnohem náročnější.

Tabulka 11 Porovnání výsledků analýz odstředěného rozloženého vzorku (1) a zředěného mléka (2)

Minerální prvek	Mléko	
	odstředěné 1 [mg · kg ⁻¹]	odstředěné 2 [mg · kg ⁻¹]
Ca	755 ± 31	1065 ± 44,5
Na	324 ± 9	467 ± 15
K	988 ± 12	1005 ± 88
Mg	71,2 ± 0,9	187 ± 4
P	639 ± 28	664 ± 32

4.2.2.2. *Mléko polotučné, plnotučné a čerstvé*

U vzorků s vyššími obsahy tuku se po rozkladu ve vzorku vyskytovalo větší množství tukových částic a vzorek byl mírně zakalený. Po částečném odebrání tukových částic mikropipetou se vzorky nechaly sonikovat v ultrazvukové vodní lázni. Sonikace však nebyla zcela účinná. Přítomnost tukových a koloidních částic ovlivnila naměřené výsledky.

Koncentrace prvků v polotučném, plnotučném a čerstvém mléce jsou kromě vápníku a fosforu porovnatelné s koncentracemi naměřenými v odstředěném mléce. Jak již bylo v této práci zmíněno, právě vápník a fosfor je zatížen největšími ztrátami při zavádění vzorků do plazmatu, díky faktu, že jsou tyto prvky vázány v micelách kaseinu.

5 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo zpracování literární rešerše k problematice prvkové analýzy mléka, zhodnocení různých metod přípravy vzorku mléka pro prvkovou analýzu a analýza různých druhů mléka pomocí techniky ICP-OES. V této části byly stručně popsány vlastnosti a složení mléka. Teoretická část se zabývá všemi analyzovanými prvky, jejich vlastnostmi a způsoby jejich analýzy. V této bakalářské práci byly také navrženy a ověřeny tyto metody příprav vzorků: prosté ředění mléka, ředění s přidavkem Tritonu X-100, mineralizace na mokré cestě a sonikace. Podle těchto metod byl analyzován certifikovaný referenční materiál (CRM) odstředěného sušeného mléka.

K elementární analýze byly zakoupeny vzorky odstředěného mléka, polotučného mléka, plnotučného mléka a mléka čerstvého. Tyto vzorky byly upraveny pomocí nejlépe vyhovujících metod příprav vybraných z předchozí analýzy. Byly to metody: prosté ředění vzorku a mineralizace na mokré cestě.

Stanovované prvky v mléce (Ca, Na, K, Mg a P) se řadí mezi makroelementy, tudíž mají v mléce vysoké zastoupení. Mohlo být tedy zvoleno i větší ředění vzorku, a to poměr 1 : 100. Během mokrého rozkladu koncentrovanou kyselinou dusičnou, vznik zákalu a tukové emulze velice zkomplikoval analýzu mléka. Tato metoda přípravy vzorku byla vybrána po jejím ověření v rámci analýzy certifikovaného referenčního materiálu. Nepředpokládalo se však, že mléčné tukové složky nebudou důkladně rozloženy a budou tvořit, po přidání vody k roztoku, opět emulzi. Tvorba emulze ve vzorku způsobila podhodnocení naměřených koncentrací prvků, díky ztrátám analytu při jeho vnášení do indukčně vázané plazmy.

Shrnutím všech poznatků z provedeného experimentu byla jako nejjednodušší, nejrychlejší a nejspolehlivější metoda přípravy vzorku stanovena metoda pouhého ředění. Tato metoda je ale vhodná pouze pro analýzu prvků, které jsou v roztoku obsaženy v dostatečné koncentraci – tedy makroelementů. Příliš malé koncentrace prvků tak v důsledku velkého ředění nemusí být vůbec detekovány.

Pro získání lepších výsledků a také pro širší náhled do problematiky analýzy mléka je možné odzkoušet ještě další postupy nebo přípravy vzorku jako je rozklad na suché cestě (zpopelnění) nebo mikrovlnný rozklad. Tyto metody přípravy vzorku mohou být předmětem zkoumání v další závěrečné práci.

6 LITRATURA

- [1] VELÍŠEK, Jan, Sylva ŠMÍDOVÁ a Michal VOLDŘICH. *Chemie potravin: školní stravování, výživové normy (spotřební koš), dietní stravování ve školní jídelně, zásady správné výživy, výživa dětí, dospívajících, sportujících dětí a adolescentů, seniorů*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, 623 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-86659-17-6.
- [2] VACOVÁ, Terézia. *Mlieko a mliečné prípravky vo výžive*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1986, 216 s.
- [3] FOX, P. a P. MCSWEENEY. *Dairy chemistry and biochemistry*. 1st ed. New York: Blackie Academic, 1998. 478 p. ISBN 04-127-2000-0.
- [4] PÁNEK, Jan. *Základy výživy a výživová politika*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002, 219 s. ISBN 80-708-0468-8.
- [5] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2009, 536 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-051-4.
- [6] KOPŘIVA, V.: *Mléko a mlezivo – hlavní rozdíly a nutriční význam mléka ve výživě* [online]. [cit 25. 2. 2015].
Dostupné z: http://cit.vfu.cz/ivbp/wpcontent/uploads/2011/07/VY_04_07.pdf
- [7] ČERNOHORSKÝ, Tomáš, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. *Atomová spektroskopie: technologie potravin*. 1. vyd. Pardubice: Univerzita Pardubice, 1997, 218 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 80-719-4114-X.
- [8] ČERNÁ, Marie a kol. *Nutriční hodnota mléka a mléčných výrobků*. 1. vyd., Praha: VÚPP, 1979, 141 s.
- [9] ČERNÁ, Eva, MERGL, Miloš. *Laboratorní kontrolní metody v mlékařství*. 1. vyd., Praha: STL, 1971, 263 s.
- [10] SOMMER, L. *Analytická spektrometrie I*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986, 173 s.
- [11] TANG, Jun, Ying YING, Xiao-Dong PAN, Wei JIANG a Ping-Gu WU. Elements analysis of infant milk formula by ICP-OES: a comparison of pretreatment methods. *Accreditation and Quality Assurance*. 2014, vol. 19, issue 2, s. 99-103. DOI: 10.1007/s00769-014-1039-6.
Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00769-014-1039-6>.
- [12] NAVRÁTILOVÁ, P. *Hygienu produkce mléka*. Brno: Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, 2012. 129 s. ISBN: 978-80-7305-625-4.
- [13] RUPRICH, J.: *Monitoring zdravotního stavu obyvatelstva*, [on-line]. 2002, [cit. 3. 5. 2015]. Státní zdravotní ústav Praha.
Dostupné z: <http://www.chpr.szu.cz/monitor/tds05c/CHEMON/anorg/PB.pdf>

- [14] HÁLKOVÁ J., RUMÍŠKOVÁ M., RIEGLOVÁ J.: *Analýza potravin*, Straka I., Vydavatel odborných publikací, Újezd u Brna, 2001, ISBN 80-86494-02-0.
- [15] MADER P., ČURDOVÁ E.: *Metody rozkladu biologických materiálů pro stanovení stopových prvků*, Chem. listy 91, str. 227–236, [cit.10.4.2008]. ISSN 1213-7103. Dostupné na www: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_04_227-236.pdf
- [16] PETROVÁ, Jana, Sylva ŠMÍDOVÁ a Michal VOLDŘICH. *Základy výživy pro stravovací provozy: školní stravování, výživové normy (spotřební koš), dietní stravování ve školní jídelně, zásady správné výživy, výživa dětí, dospívajících, sportujících dětí a adolescentů, seniorů*. 1. vyd. Plzeň: Jidelny.cz, 2014, 307 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-905557-0-9.
- [17] PÁNEK, Jan. *Základy výživy a výživová politika*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002, 219 s. ISBN 80-708-0468-8.
- [18] STUŽKA, Václav. *Analytická atomová optická spektrometrie*. 2. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2000, 81 s. ISBN 80-244-0206-8.
- [19] KLOUDA, Pavel, Sylva ŠMÍDOVÁ a Michal VOLDŘICH. *Moderní analytické metody: školní stravování, výživové normy (spotřební koš), dietní stravování ve školní jídelně, zásady správné výživy, výživa dětí, dospívajících, sportujících dětí a adolescentů, seniorů*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 80-863-6907-2.
- [20] HOLZBECHER, Zaviš a Jaroslav CHURAČEK. *Analytická chemie*. Vyd. 1. Praha: SNTL, 1987.
- [21] OTRUBA, Editor Vítězslav. *6. kurz ICP spektrometrie: Brno 24.-26. května 2011*. Brno: Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, 2011. ISBN 978-809-0453-913.
- [22] THOMAS, Robert. *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2008, 347 p. Practical spectroscopy, v. 33. ISBN 14-200-6786-9.
- [23] KUBÁŇ, Vlastimil a Petr KUBÁŇ. *Analýza potravin: a tutorial for beginners*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007, 202 s. ISBN 978-80-7375-036-7.
- [24] ZAMBERLIN, Šimun. *Mineral elements in milk and dairy products*, Mljekarstvo. Zagreb: University of Zagreb, 2012. ISSN 0026-704X.
- [25] BARKER, Allen V a D PILBEAM. *Handbook of plant nutrition*. Boca Raton, FL: CRC/Taylor, 2007. ISBN 978-082-4759-049.
- [26] MURCIA, M. Antonia, Ana VERA, Magdalena MARTINEZ-TOME, Antonio MUNOZ, Manuel HERNANDEZ-CORDOBA a Roque ORTIZ-GONZALEZ. *Fast Determination of the Ca, Mg, K, Na and Zn Contents in Milk and Nondairy Imitation Milk Using ICP-AES without Mineralization Stage*. LWT - Food Science and Technology. 1999, vol. 32, issue 3, s. 175-179. DOI: 10.1006/fstl.1998.0524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643898905242>.

- [27] CAVA-MONTESINOS, Patricia, M. Luisa CERVERA, Agustín PASTOR, Miguel DE LA GUARDIA, Manuel HERNANDEZ-CORDOBA a Roque ORTIZ-GONZALEZ. *Room temperature acid sonication ICP-MS multielemental analysis of milk*. Analytica Chimica Acta. 2005, vol. 531, issue 1, s. 111-123. DOI: 10.1016/j.aca.2004.09.093. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267004012711>.
- [28] VELEMÍNSKÝ, M. *Výživa kojenců* [online]. [cit.10.3.2015]. Dostupné na: <http://www.veleminsky.cz/vyziva/kojencka-vyziva.htm>
- [29] KOMÁREK, J. *Atomová absorpční spektrometrie: treaties and international agreements registered or filed and recorded with the Secretariat of the United Nations*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000, 85 s. ISBN 80-210-2500-X.
- [30] BALCAR, J. *Výroba sušených a zahuštěných mléčných výrobků*. Praha: SNTL, 1978. 1. vyd. 326 s.
- [31] FOX, P. a P MCSWEENEY. *Dairy chemistry and biochemistry*. 1st ed. New York: Blackie Academic, 1998, xiv, 478 p. ISBN 04-127-2000-0.
- [32] BARTOŠ, M. *Analytická chemie I*. Pardubice: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, katedra analytické chemie, 2004. Dostupné také z: <http://meloun.upce.cz/docs/analchem1/skripta.pdf>
- [33] ČSN EN 11885: 2009. *Jakost vod – Stanovení vybraných prvků optickou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES)*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2009. 28 s.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAS	Atomová absorpční spektrometrie
F-AAS	Plamenová atomová absorpční spektrometrie
ET-AAS	Elektrotermická atomová absorpční spektrometrie
AES	Atomová emisní spektrometrie
OES	Optická emisní spektrometrie
AFS	Atomová fluorescenční spektrometrie
FP	Plamenová fotometrie
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP	<i>Inductively Coupled Plasma</i>
DA	<i>Diode Array</i>
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
CRM	Certifikovaný referenční materiál