Zemědělská fakulta
Faculty of Agriculture

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
University of South Bohemia in České Budějovice

VÚM

Certifikovaná metodika QJ1510336 RO1417 CM 35 - název:

Validace a doporučení ke kalibraci nepřímé metody infračervené spektroskopie pro stanovení profilu mastných kyselin mléčného tuku

Certifikovaná uplatněná metodika a technicko-organizační doporučení, opatření a postupy v systému QA/QC (quality assurance/quality control, zajištění a řízení kvality) k řešení referenčně-rutinních systémů analytických laboratoří testace kvality syrového mléka pro zvýšení věrohodnosti výsledků profilu mléčného tuku.

I) Cíl certifikované uplatněné metodiky:

Cílem certifikované metodiky QJ1510336 RO1417 CM 35 je rozšíření spektra vyšetřovacích metod a analytů a zajištění a zvýšení věrohodnosti výsledků a provozní jistoty managementu rutinních laboratoří při kontrole složení mléka pro účely kontroly kvality syrového kravského mléka – podpora možnosti produkce specifických mléčných potravin.

Náplň certifikované uplatněné metodiky:

Náplní certifikované metodiky QJ1510336 RO1417 CM 35 je implementace dosažených výsledků, získaných na základě předchozího výzkumu a vývoje v rámci řešení projektů MZe NAZV KUS QJ1510336 a MZe RO1417 a v rámci koordinační a konzultační metodické činnosti referenční laboratoře pro syrové mléko (VÚM Praha) do prostředí laboratoří kontroly kvality mléka a mléčné užitkovosti dojnic provozovaných Českomoravskou společností chovatelů, a.s.

Zdroj certifikované uplatněné metodiky:

Projekty MZe NAZV KUS QJ1510336 a MZe RO1417.

Zpracovali dne: 8. 9. 2017; Eva Samková[1], Oto Hanuš[2], Jiří Špička[1], Marcela Klimešová[2], Lucie Hasoňová[1], Radoslava Jedelská[2], Jan Trávníček[1], Jaroslav Kopecký[2], Robert Kala[1], Ondřej Elich[2]; [1] Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Katedra potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů; [2] Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

Uplatnění bylo provedeno zavedením všech principů metodiky od 22. 12. 2017.

II) Vlastní popis certifikované metodiky

Validace a doporučení ke kalibraci nepřímé metody infračervené spektroskopie pro stanovení profilu mastných kyselin mléčného tuku

Struktura certifikované metodiky:

1) Úvod a současný stav problematiky 3

Mléčný tuk 3

Kalibrace jiných nepřímých mlékařských analytických metod mimo MIR-FT 4

Vlastní práce pracoviště poslední doby ohledně problému kalibrací a validací nepřímých mlékařských analytických metod, zejména MIR, MIR-FT a NIR-FT 5

Další názory na možné metody kontroly MK mléčného tuku a aplikaci MIR-FT 7

2) Cíl aplikace certifikované metodiky 7

3) Vlastní výzkum a vývoj pro certifikovanou metodiku – validace nepřímé metody stanovení profilu MK mléčného tuku 8

I) Podmínky experimentálních odběrů vzorků mléka 8

II) Analýzy bazénových a individuálních vzorků mléka 8

III) Statistické zpracování získaných dat 10

IV) Výsledky analýz vybraných jakostních ukazatelů mléka a mléčného tuku (posouzení variability) 12

Vybrané parametry jakosti mléka u bazénových a individuálních vzorků mléka 12

Zastoupení MK v mléce a mléčném tuku u bazénových a individuálních vzorků mléka 13

V) Výsledky korelační a regresní analýzy (posouzení metod MIR-FT a GC) 16

Bazénové vzorky mléka 16

Individuální vzorky mléka 17

Srovnání korelačních závislostí s literárními zdroji 19

VI) Závěry ze studia 20

4) Závěr certifikované metodiky 20

5) Použité jiné literární prameny při tvorbě certifikované metodiky 23

6) Použité vlastní výsledky a publikace při návrhu a validaci certifikované metodiky 26

7) Přílohové materiály s podklady pro vývoj certifikované metodiky 33

Nejčastěji použité zkratky: CLA = konjugovaná kyselina linolová; GC = plynová chromatografie; IR = infračervené spektrum; LCFA = mastné kyseliny s dlouhým uhlíkovým řetězcem; MCFA = mastné kyseliny se středně dlouhým uhlíkovým řetězcem; MIR-FT = infračervená spektroskopie celého IR spektra ve středové oblasti s Michelsonovým interferometrem a s Fourierovými transformacemi (FT); MK = mastné kyseliny mléčného tuku; MUFA = mononenasycené mastné kyseliny; NIR-FT = spektroskopie v blízké oblasti IR s Fourierovými transformacemi (FT); PUFA = polynenasycené mastné kyseliny; SCFA = mastné kyseliny s krátkým uhlíkovým řetězcem; TFA = *trans* isomery nenasycených mastných kyselin; UFA = nenasycené mastné kyseliny.

1) Úvod a současný stav problematiky

Mléčný tuk

Mléčný tuk, tvořený převážně triacylglyceroly, tj. estery trojsytného alkoholu glycerolu a na něj navázaných tří mastných kyselin (**MK**), je důležitou složkou mléka. Lipidy se v mléce nacházejí ve formě tukových kapének. Jedná se o emulzi typu olej ve vodě, kde vodní fáze tvoří zhruba 87,5 %. Velikost jednotlivých kapének se pohybuje od méně než 1 mikrometru až do 10 mikrometrů, nejvíce zastoupeny jsou však kapénky o průměru 4 mikrometry (JENSEN, 2002). V jádře tukových kapének jsou převážně nepolární lipidy (triacylglyceroly), povrch je chráněn tenkou membránou se složitou strukturou i složením. Toto jedinečné uspořádání má vliv na nutriční i technologické vlastnosti mléčného tuku. Úlohou membrány je např. přispívat k zajištění stability tukových kapének, chránit je před lipolytickou hydrolýzou či zabraňovat jejich vzájemnému splynutí (SAMKOVÁ et al., 2012).

Mléko obsahuje zhruba 3 až 5 % tuku a jeho množství závisí na několika různých faktorech, mezi které patří například výživa dojnic, management chovu nebo stadium laktace. Mléčný tuk je jednou z nejvýznamnějších složek ovlivňujících technologické zpracování mléka. Výzkum dokládá výrazný vliv zastoupení MK mléčného tuku na technologické vlastnosti mléčných produktů – másla, šlehačky, podmáslí, zmrzliny, jogurtů či sýrů (např. ASHES et al., 1997; RAMASWAMY et al., 2001; GONZALEZ et al., 2003). Vyšší obsah nasycených MK (**SFA**) a hlavního zástupce této skupiny – kyseliny palmitové je navíc výhodný z důvodu nižší citlivosti mléčného tuku k oxidaci v důsledku menšího počtu dvojných vazeb. S oxidací totiž mohou souviset u déle skladovaných produktů i nepříjemné senzorické změny jako je např. žluknutí (CHEN et al., 2004).

Složení mléčného tuku z hlediska MK tedy zajímá nejen technology v mlékárnách, např. pro možnost ovlivnění roztíratelnosti másla, ale také odborníky pro humánní výživu (SAMKOVÁ et al., 2008 a 2012). I když celkově vyšší množství (55 - 75 %) SFA zajišťuje lepší stabilitu mléčného tuku a následně mléčných výrobků (KAYLEGIAN a LINDSAY, 1995), z hlediska výživy je méně akceptovatelné (DOSTÁLOVÁ et al., 2009). Příjem SFA z celkového energetického příjmu by proto měl být pod 10 % (20 g), polyenových MK (**PUFA**) 7 - 10 %. Příjem *trans* isomerů nenasycených MK (**TFA**) by měl být co nejnižší a neměl by překročit 1 % (cca 2,5 g/den).

PRECHT a MOLKENTIN (2000) udávají, že celkový obsah *trans* isomerů v mléčném tuku se pohybuje v rozmezí od 1,71 do 8,70 % s průměrnou hodnotou 4,92 % ze všech MK. Nejčetnějšími *trans* isomery jsou isomery C18:1, a dále pak isomery C18:2, kam patří i isomery konjugované kyseliny linolové (**CLA**). CLA zahrnuje 28 polohových a geometrických isomerů a vzniká biohydrogenací PUFA v bachoru. Proto její převládající isomer *cis*-9, *trans*-11 tvořící 75 až 90 % celkového obsahu CLA se často v literatuře uvádí pod názvem *rumenic acid* (KRAMER et al., 1998; BAUMAN et al., 2006). CLA je svým výskytem v produktech přežvýkavců unikátní a jsou jí přičítány mnohé zdravotně prospěšné účinky (JENSEN, 2002; PARODI, 2004; HAUG et al., 2007). Kromě zastoupení CLA a PUFA tkví pozitivní účinky mléčného tuku také v poměrně vysokém obsahu mononenasycených MK (**MUFA**) v *cis*- konfiguracích (26 - 42 %) a nezanedbatelný je také obsah esenciálních MK linolové a alfa-linolenové. S antimikrobiálními účinky jsou spojovány MK s počtem uhlíků v řetězci od C6 do C12 či monoacylglyceroly těchto MK (HAUG et al., 2007).

V současnosti se profil MK mléčného tuku v praxi nesleduje, přestože jsou známy faktory příznivě působící (JENSEN, 2002; PEŠEK et al., 2006; SAMKOVÁ et al., 2008 a 2012; KALAČ a SAMKOVÁ, 2010; COPPA et al., 2013) na zvýšené zastoupení nenasycených MK (**UFA**). Rutinní sledování profilu MK mléka pro praktické účely (výživy a potravinářství) ve světě i v ČR je zatím v počátcích (SOYEURT, et al., 2006; COPPA et al., 2010; HANUŠ et al., 2015; SAMKOVÁ et

al., 2015). Důvodem je mimo jiné také náročnost analytického stanovení pomocí plynové chromatografie (**GC**). Volba této metody pro analýzu MK v mléčném tuku včetně přípravy vzorku je ovlivněna především většinovým obsahem neutrálních lipidů, výše zmíněných triacylglycerolů. Ekonomicky příliš nákladná, ale i časově nevýhodná GC poskytuje navíc velmi detailní výsledky, což se jeví v daném ohledu (pro praktické účely) jako nadbytečné. Tento zevrubný a dražší pohled je vhodný zejména pro výzkumně-vědecké účely.

Z literatury jsou však známy některé levnější způsoby stanovení MK či způsoby, které by stanovení MK urychlily. Např. REIS et al. (2011) popisují metodu termo-chemolýzy bez nutnosti extrakce mléčného tuku a s využitím pouze jedné kapky mléka. Nejčastěji se však při rutinních analýzách uplatňuje potenciál infračervené (**IR**) spektroskopie ve středové oblasti vlnových délek IR záření nebo v oblasti IR blízké (SOUYERT et al., 2006; COPPA et al., 2010; STEFANOV et al., 2011; FERRAND et al., 2011).

Pro mléko (mléčný tuk) je v dané souvislosti výhodné určení profilu celého IR spektra prostřednictvím Michelsonova interferometru a s následným matematicko-statistickým vyhodnocením signálu Fourierovými transformacemi (**MIR-FT**). Tyto zvyšují analytickou efektivitu výtěžnosti signálu. Metoda MIR-FT je v současnosti využívána v analytice mlékařství pro kontrolu kvality syrového mléka nebo pro stanovení některých minoritních složek mléka (volné MK, močovina, kyselina citrónová, aceton, kyselina beta-hydroxymáselná – BIJGAART VAN DEN, 2006; HERING et al., 2008; HANUŠ et al., 2009; DRIFT VAN DER et al., 2012; ŘÍHA et al., 2013, aj. Je třeba zdůraznit, že věrohodnost výsledků z této rutinní analýzy bude záviset především na kvalitě kalibrací provedených podle výsledků referenční metody.

Kalibrace jiných nepřímých mlékařských analytických metod mimo MIR-FT

V praxi jsou také zkoušeny různé typy kalibrací pro různé analyty a nepřímou metodu analýz mléka **NIR-FT** (v blízké oblasti infračerveného spektra s Fourierovými transformacemi). Jsou tak analyzovány základní majoritní složky mléka jako tuk (i jeho skladba), bílkoviny (čisté a hrubé), laktóza, sušina tukuprostá, sušina, kasein, nebo mléčných potravin (sýry – volné aminokyseliny a proces zrání, jogurty, smetany atd.), popř. falšování mléka příměsí mléka cizího (TSENKOVA et al., 1999, 2000; KUKAČKOVÁ et al., 2000; JANKOVSKÁ a ŠUSTOVÁ, 2003; ŠUSTOVÁ et al., 2007; KAWASAKI et al., 2008; COPPA et al., 2010; GONZALEZ-MARTIN et al., 2011; MLČEK et al., 2011, 2013, 2016; DVOŘÁK et al., 2016).

Tato nepřímá metoda, určená pro řadu různých měřicích modů a využitelná u mnoha druhů potravin, dává obvykle výsledky s mírně méně těsným vztahem (pokud jde o analýzy tekutého mléka, syrového, konzumního), než specializované průtočné mlékařské metody MIR a MIR-FT, např. proto, že místo homogenizace vzorku používá spíše metody spineru obrazu. Nicméně, i tyto výsledky jsou stále velmi dobré pro praktické aplikace.

Mimo jiné je tento postup použit i v tzv. systémech real time analyse (KATZ, 2007; KATZ a PINSKI, 2008; KAMMPHUIS et al., 2008; KAWASAKI et al., 2008; KARP a WOLFE 2010; ISHAY et al., 2011; DURKIN, 2012; ARAZI et al., 2012; KANIYAMATTAM a DE VRIES, 2014; HULOVÁ et al., 2014; HANUŠ et al., 2016 (realizace 2013); PECOVÁ et al., 2017) při nepřetržitém měření složek a vlastností (tuk, bílkoviny, laktóza, počet somatických buněk atd.) protékajícího mléka přímo při dojení, jako informace o kvalitě mléka a zdravotním stavu dojnic.

Vlastní práce pracoviště poslední doby ohledně problému kalibrací a validací nepřímých mlékařských analytických metod, zejména MIR, MIR-FT a NIR-FT

1. *Srovnání věrohodnosti výsledků pro vyšetření složení mléka pomocí alternativních analytických metod v České republice*

Věrohodnost výsledků analýz mléka je významná pro zajištění kvality potravinového řetězce (HANUŠ et al., 2014). Existuje více přímých a nepřímých metod pro měření složení mléka (obsah tuku (F), bílkovin (P), laktózy (L) a sušiny tukuprosté (SNF)). Cílem bylo hodnotit některé referenční a rutinní analytické postupy na bázi výsledků. Přímé referenční metody byly: F, obsah tuku (Röse-Gottliebova metoda); P, obsah hrubých bílkovin (Kjeldahlova metoda); L, laktóza (monohydrát, polarimetrická metoda); SNF, sušina tukuprostá (gravimetrická metoda). F, P, L a SNF byly určeny také různými nepřímými metodami: – MIR (infračervená (IR) technologie s optickými filtry), 7 přístrojů ve 4 laboratořích; – MIR-FT (IR spektroskopie s Fourierovými transformacemi), 10 v 6; – ultrazvuková metoda (UM), 3 v 1; – analýza v modré a červené schránce (BRB), 1 v 1. Bylo použito 10 referenčních vzorků mléka. Byly hodnoceny: koeficient determinace (R^2), korelace (r) a směrodatná odchylka průměru individuálních rozdílů (MDsd, pro n). Všechny korelace (r; pro všechny nepřímé a alternativní metody a všechny složky mléka) byly významné ($P \leq 0{,}001$). Je zřejmé, že metody MIR a MIR-FT (konvenční) vysvětlily podstatně vyšší podíl variability v referenčních vysledcích než metody UM a BRB (alternativní). Všechny průměrné hodnoty r (x mínus 1,64 × sd pro konfidenční interval 95 %) mohou být použity jako standardy pro hodnocení kvality kalibrace (MIR, MIR-FT, UM a BRB): – pro F 0,997, 0,997, 0,99 a 0,995; – pro P 0,986, 0,981, 0,828 a 0,864; – pro L 0,968, 0,871, 0,705 a 0,761; – pro SNF 0,992, 0,993, 0,911 a 0,872. Podobně MDsd (x plus 1,64 × sd): – pro F 0,071, 0,068, 0,132 a 0,101 %; – pro P 0,051, 0,054, 0,202 a 0,14 %; – pro L 0,037, 0,074, 0,113 a 0,11 %; – pro SNF 0,052, 0,068, 0,141 a 0,204 %.

2. *Hodnocení věrohodnosti výsledků mléčných analýz v reálném čase v České republice*

Dobrá věrohodnost výsledků pravidelných analýz složení mléka by mohla zlepšit kontrolu zdravotního stavu dojnic a řízení stáda (HANUŠ et al., 2016). Cílem byla analýza měřicích možností a vlastností RT (real time) systému (AfiLab = AfiMilk (měřicí jednotka NIR (near infrared spectroscopy) a elektrická vodivost (C) mléka konduktometricky) + AfiFarm (kalibrační a interpretační software)) pro analýzy individuálních vzorků mléka (IMSs). V pokuse bylo 2×30 IMSs. Referenční hodnoty (RV) složek a vlastností mléka (tuk (F), bílkoviny (P), laktóza (L), C a počet somatických buněk (SCC)) byly určeny klasickými (přímými i nepřímými: konduktometrie (C); infračervená spektroskopie 1) s filtrovou technologií a 2) s Fourierovými transformacemi (F, P, L); fluoro-opto-elektronické čítání buněk (SCC) ve filmu na rotujícím disku (1) a průtočnou cytometrií (2)) metodami. Metoda AfiLab (alternativní) vykazovala oproti RV méně těsné vztahy než referenční metody navzájem. Tato skutečnost byla očekávána. Tyto vztahy (r) však byly většinou významné: F od 0,597 do 0,738 ($P \leq 0{,}01$ a $\leq 0{,}001$); P od 0,284 do 0,787 ($P > 0{,}05$ a $P \leq 0{,}001$); C 0,773 ($P \leq 0{,}001$). Vztahy (r) nebyly významné ($P > 0{,}05$): L od -0,013 do 0.194; SCC od -0,148 do -0,133. Variabilita RV vysvětlila následující podíly variability výsledků AfiLab: F až 54,4 %; P až 61,9 %; L pouze 3,8 %; C až 59,7 %. Vypovídací schopnost výsledků AfiLab (jejich věrohodnost) pro zvíře se však zvyšuje pravidelností měření (real time aplikace). Hodnoty korelací r (x mínus 1,64 × sd pro interval spolehlivosti (jednostranný) na hladině 95 %) je možné použít pro alternativní metodu při hodnocení kvality kalibrací. Tyto limitní hodnoty jsou F 0,564, P 0,784 a C 0,715 a mohou být významné s dalším zaváděním této pokrokové technologie řízení mléčných stád.

3. *Hodnocení věrohodnosti výsledků základního složení mléka v automatickém dojicím systému prostřednictvím nepřímé metody real time analýzy*

Aktuální a pravidelná, nejlépe každodenní, znalost složení a vlastností mléka je významná pro kontrolu zdravotního stavu stáda dojnic, prevenci výskytu jejich produkčních poruch a podporu kvality mléka (PECOVÁ et al., 2017). Proto byla provedena validace věrohodnosti výsledků mlékařských analýz systémem real milk analyses (RTA) v automatickém dojicím systému (AMS). Stanoveny byly obsahy tuku (F), hrubých bílkovin (P), monohydrátu laktózy (L), sušiny tukuprosté (SNF) a počet somatických buněk (SCC). Toto bylo provedeno přímým statistickým srovnáním paralelně měřených výsledků (RTA a relevantní reference – infračervená spektroskopie (MIR; F, P, L, SNF) a průtočná cytometrie (FC; SCC)) ve 30 individuálních vzorcích kravského mléka. Výsledky věrohodnosti RTA v AMS jako koeficienty determinace (R) a korelace (r) výsledků mezi metodami (RTA a reference) byly následující: - r mezi metodami MIR×RTA pro F, P, L a SNF 0,524 ($P<0,01$), 0,744, 0,701 a 0,731 ($P<0,001$); - R vysvětluje 27,5, 55,3, 49,2 a 53,5 % variability RTA variabilitou referenční metody (MIR). Pro SCC to bylo 0,758 ($P<0,001$) a 57,4 % variací v hodnotách RTA je vysvětlitelných variabilitou v FC. Věrohodnost výsledků mlékařských analýz RTA v AMS se ukázala po příslušném porovnání jako vyhovující pro shora uvedené účely.

4. *Porovnání metod používaných při stanovení zastoupení zdravotně významných MK mléčného tuku v bazénových vzorcích mléka dojnic*

Profil MK mléčného tuku je důležitým ukazatelem kvality syrového mléka ve smyslu možností produkce specifických potravin s lepším zdravotně benefitním předpokladem tukové složky pro konzumenty (HANUŠ et al., 2015). Ve 13 chovech holštýnského skotu v Olomouckém kraji bylo odebráno 33 bazénových vzorků mléka za účelem porovnání dvou metod stanovení MK – rutinní/nepřímá (pomocí infračervené spektroskopie – MIR-FT) a referenční/přímá (pomocí plynové chromatografie - GC). Těsnost vztahů mezi oběma metodami je silnější v případě skupiny nasycených (SFA) a nenasycených (UFA) MK ($r = 0,7094$; 0,9389; $p<0,001$), zatímco u skupiny TFA (*trans* isomery nenasycených MK) a PUFA (polynenasycené MK) jsou korelační koeficienty nižší (0,5897; 0,5931; $p<0,001$). 50,3 a 88,2 % variability v hodnotách SFA a UFA podle nepřímé rutinní metody MIR-FT je vysvětlitelných variacemi v analýzách přímé referenční metody GC. Výsledky naznačují, že řadu informací MIR-FT o výskytu MK lze využít pro rutinní stanovení těchto skupin MK a případnou praktickou selekci mléčné suroviny pro specifickou potravinářskou výrobu.

5. *Porovnání metod stanovení MK v mléce*

Způsobů, jak cíleně modifikovat profil MK mléčného tuku pro podporu zdraví spotřebitelů, případně vhodnější technologické vlastnosti mléka (BARLOWSKA et al., 2011), může být více. Mezi nejrychlejší způsoby patří především změna krmné dávky nebo výběr mléčné suroviny od určitých dojnic. Pravidelnému sledování zastoupení MK v mléčném tuku dnes brání poměrně náročná (časově i finančně) referenční metoda analýzy MK pomocí plynové chromatografie (KAYLEGIAN et al., 2009). Určitou nadějí do budoucna by se mohlo stát rutinní stanovení některých MK nebo jejich specifických skupin pomocí infračervené spektroskopie s následným vyhodnocením signálu Fourierovými transformacemi (MIR-FT). Metoda je v současnosti využívána v analytice mlékařství pro kontrolu kvality syrového mléka nebo pro stanovení některých minoritních složek mléka (močovina, kyselina citrónová, volné mastné kyseliny, ketony) – např. HERING et al., 2008. Cílem bylo validační porovnání zastoupení vybraných MK a jejich skupin v individuálních vzorcích mléčného tuku dojnic stanovených referenční a rutinní metodou (SAMKOVÁ et al., 2015). V chovech českého strakatého a holštýnského skotu bylo odebráno celkem 78 individuálních vzorků mléka pro porovnání dvou metod analýzy MK – rutinní (pomocí infračervené spektroskopie – MIR-FT) a referenční (pomocí plynové

chromatografie - GC). Z výsledků vyplývá, že mastné kyseliny C16:0 a C18:1 a skupiny nasycených a nenasycených MK lze stanovovat pomocí MIR-FT s poměrně vysokou mírou věrohodnosti (korelace 0,7543, 0,7607, 0,8424 a 0,9492; $p<0,001$). V případě skupiny polynenasycených MK je validační koeficient korelace nižší (0,2891; $p<0,05$).

Další názory na možné metody kontroly MK mléčného tuku a aplikaci MIR-FT

V uvedených souvislostech COPPA et al. (2013) uvedli, že v případě predikce profilu MK tuku bazénových vzorků kravského mléka na základě informací o faremní praxi (jako složení výživy dojnic a nadmořská výška, zatímco faktory ovlivněné jedincem, jako stadium laktace, plemeno, dojivost a podíl prvotelek ve stádě nebyly významné v mnohých modelech) byly vhodné (koeficient determinace $R^2 > 0,5$) následující modely pro: C16:0; C17:0; SFA; PUFA; MK s lichým počtem uhlíků. Velmi dobré modely (koeficient determinace $R^2 > 0,6$) pak byly pro: *trans*-11 C18:1; *trans*-10 + *trans*-11 C18:1; *cis*-9, *trans*-11 C18:2 (CLA); TFA; C18:3n-3; poměr n-6:n-3; MK s větveným řetězcem. Tyto predikční modely by mohly poskytnout farmářům hodnotný prostředek ke zlepšení nutriční kvality jimi produkovaného mléka.

Dále SOYEURT et al. (2006) konstatovali, pro odhad profilu MK kravského mléčného tuku metodou MIR-FT, že odhadnuté koncentrace byly méně věrohodné, než skutečné v mléce. Pokud vzrostla koncentrace MK v mléce, zvyšovala se také věrohodnost odhadu MIR-FT. Prakticky by mohly být použity kalibrační rovnice pro predikci: C12:0; C14:0; C16:0; C16:1*cis*-9; C18:1; SFA; MUFA. Uvedené by mohlo být použito k monitoringu kvality mléčného tuku a následně ke zlepšování kvality mléka např. specifickou výživou krav nebo k odhadu genetické hodnoty pro jednotlivá zvířata za účelem cílené plemenitby ve stejném smyslu.

2) Cíl aplikace certifikované metodiky

Obecným cílem certifikované metodiky je přispět k rozšíření analytického spektra a zvýšení provozní jistoty referenčních a rutinních mléčných laboratoří při nepřímém, sériovém a simultánním stanovení profilu MK v mléčném tuku a následně také ke zlepšení možností chovatelů a potravinářů při výběru vhodné suroviny pro specifické mléčné výrobky s nutričně výhodnější skladbou tuku. Cílem práce bylo porovnání zastoupení vybraných MK a jejich skupin v bazénových vzorcích mléčného tuku dojnic stanovených referenční (přímou) a rutinní (nepřímou) metodou.

Konkrétním cílem vlastní certifikované metodiky tedy je:

- ověřit možnosti moderní nepřímé infračervené metody MIR-FT ve smyslu její kalibrace ke stanovení profilu MK v mléčném tuku podle výsledků metody referenční;

- vyvinout prakticky použitelnou metodu přípravy (selekce) relevantních validačních standardů;

- popsat a vyhodnotit aspekty kalibrace a věrohodnosti výsledků MK.

3) Vlastní výzkum a vývoj pro certifikovanou metodiku – validace nepřímé metody stanovení profilu MK mléčného tuku

I) Podmínky experimentálních odběrů vzorků mléka

Odběry bazénových a individuálních vzorků mléka

Odběr vzorků mléka byl navržen s cílem postihnout většinu hlavních faktorů (oblast, období, způsob chovu, plemeno, pořadí a stadium laktace), které ovlivňují zastoupení MK v mléce jak v bazénových, tak v individuálních vzorcích mléka.

Bazénové vzorky mléka (n = 60) byly odebrány v 15 chovech v celé ČR, v každém chovu byly provedeny 4 odběry za rok. Chovy zahrnovaly 35 až 530 kusů dojnic a nacházely se v nadmořské výšce od 250 do 350 m. Dojivost v chovech se pohybovala od 7 650 do 11 190 kg mléka za normovanou laktaci. Jednalo se o chovy (n = 14) s volným ustájením zvířat a dojením v dojírně, kterým byla zkrmována směsná krmná dávka (TMR) na bázi konzervované objemné píce a koncentrátů podle dojivosti. Jeden chov (35 dojnic) byl s vazným ustájením a potrubním dojicím zařízením. Podíl objemných krmiv a vlákniny v sušině krmné dávky zde byl vyšší než v ostatních chovech.

Individuální vzorky mléka byly odebrány v šesti chovech v rámci pravidelné kontroly užitkovosti prováděné plemenářskými organizacemi, přičemž ve třech chovech byl chován holštýnský skot (n = 173), ve třech chovech český strakatý skot (n = 172) – Tabulka 1.

Tabulka 1: Distribuce individuálních vzorků mléka během roku a v rámci jednotlivých chovů

Chov	**Plemeno***	**Měsíc**					**Celkem**
		1	2	3	9	10	
1	CF		39		51		90
2	H	22					22
3	H		30				30
4	CF			30			30
5	H					121	121
6	CF					52	52

* CF = český strakatý skot; H = holštýnský skot;

Získané vzorky byly rozděleny na dvě části a při teplotě 5 °C dopraveny z místa odběru do laboratoře. První část byla použita pro stanovení vybraných parametrů jakosti mléka a pro nepřímé (rutinní) stanovení MK (MIR-FT), druhá část byla využita pro stanovení MK přímou (referenční) metodou plynové chromatografie (GC). U vzorků nebylo použito konzervační činidlo a vzorky pro GC byly před analýzou zamraženy.

II) Analýzy bazénových a individuálních vzorků mléka

Analýzy MIR-FT

Analýzy chemického složení a MK rutinní metodou byly provedeny v laboratoři pro rozbor mléka v Buštěhradě (Českomoravská společnost chovatelů a.s.) na pravidelně kalibrovaném a kontrolovaném zařízení CombiFoss FT+ (MilkoScan FT+ 76150, Fossomatic FC 79910), 500

vzorků/hod. (Foss Analytical A/S, Denmark). Jedná se o metodu infračervené spektroskopie ve středové oblasti infračerveného záření (IR) s aplikací Michelsonova interferometru při měření a Fourierovy transformace (FT) při vyhodnocení získaného signálu.

Vzorky mléka byly před vlastní analýzou zahřáty na 40 °C a důkladně, ale šetrně promíchány. Obsahy tuku, bílkovin, laktózy, tukuprosté sušiny, močoviny, kyseliny citrónové, kyseliny beta-hydroxymáselné a acetonu, počtu somatických buněk byly stanoveny dle ČSN 57 0530, ČSN EN ISO 13366–1 (57 0531), ČSN EN ISO 13366–2 (57 0531), ČSN ISO 8196-1 (570536), ČSN ISO 8196-2 (570536), ČSN ISO 8196-3 (570536) A ČSN EN ISO/IEC 17025.

Analýzy GC

Analýzy MK referenční metodou byly provedeny na Katedře aplikované chemie Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Vzorky mléka pro analýzy byly nejdříve lyofilizovány a po extrakci tuku petroletherem převedeny na methylestery MK.

Lyofilizace materiálů

Vzorek mléka (30 ml) byl umístěn do 150 ml kádinky a zmražen při teplotě -18 °C. Následovala lyofilizace po dobu 48 hodin při teplotě -46°C a tlaku 0,07 mbar. Pro lyofilizaci byl použit přístroj Alpha 1-4 LD (Christ, Německo). Lyofilizovaný materiál byl převeden do plastových vzorkovnic a uchováván při -18°C do vlastní analýzy.

Extrakce tuku

Ke vzorku 0,15 g lyofilizovaného mléka ve vialce objemu 8 ml bylo přidáno 3 ml petroletheru. Vialky byly umístěny při laboratorní teplotě do třepačky na tři hodiny. Po sedimentaci byl petroletherový extrakt přímo použit k derivatizaci.

5 g lyofilizovaného krmiva bylo extrahováno 10 ml petroletheru 24 hodiny při laboratorní teplotě za stálého třepání ve vialce objemu 40 ml. Extrahovaná směs byla po usazení filtrována přes papírový filtr za sníženého tlaku, zbytek byl propláchnut 5 ml petroletheru a opět zfiltrován, filtráty byly dále zpracovávány společně. Z filtrátu byl při teplotě 60 °C odpařen petrolether v ochranné dusíkové atmosféře, ze zbylého tuku bylo odváženo cca 5 mg, rozpuštěno v 1 ml petroletheru a tento roztok byl použit k derivatizaci.

Derivatizace MK

MK byly převedeny na methylestery reesterifikací petroletherového extraktu tuku methanolovým roztokem hydroxidu draselného. K 1 ml petroletherového extraktu krmiva nebo mléka bylo přidáno 200 µl roztoku KOH v methanolu (2 mol/l) a směs byla zahřívána 2 minuty ve vodní lázni o teplotě 60 °C. Do vychlazené směsi se přidalo 400 µl HCl v methanolu (1 mol/l) k neutralizaci KOH a 1 ml petroletheru. K analýze plynovou chromatografií byl odebírán 1 µl petroletherového roztoku.

Stanovení MK

Stanovení MK bylo provedeno na přístroji Varian 3800 dle předepsaných parametrů (Tabulka 2). Kvantifikace zastoupení MK v mléčném tuku byla určena z poměru ploch píků jednotlivých methylesterů MK k celkové ploše jejich píků. Korekce na odezvu detektoru a diskriminaci při nástřiku byla provedena pomocí kvantitativních standardů. Identifikace jednotlivých methylesterů MK byla provedena pomocí kvalitativních standardů fy Supelco (USA) a hmotnostního detektoru 4000 MS fy Varian v režimu chemické i elektronové ionizace.

Tabulka 2: Parametry chromatografické analýzy

Parametr	**Hodnota**
Kolona	SelectFAME (Varian), 60 m/0,25mm
Detektor	FID (plamenově ionizační)
Teplota: - kolona	55 °C – 5 min, 40 °C /min –170 °C, 2 °C /min – 196 °C, 10 °C /min – 210°C – 8 min
- injektor	250 ^{o}C
- detektor	250 ^{o}C
Nosný plyn	helium
Průtok helia	1,8 ml/min
Nástřik	1µl, split 10

III) Statistické zpracování získaných dat

MIR-FT

Rutinní metodou byly určeny 3 MK a 8 skupin MK (Tabulka 3).

Tabulka 3: Mastné kyseliny (MK) a skupiny MK určené rutinní metodou MIR-FT pomocí zařízení CombiFoss FT+ (MilkoScan FT+ 76150, Fossomatic FC 79910), přesnost (PresM) a opakovatelnost (OpakM) jejich stanovení

Specifikace MK		**MK (g/100 g mléka)**		**MK (g/100 g všech MK)**	
		PresM	OpakM	PresM	OpakM
dle nasycenosti					
C16:0	palmitová	0,11	0,01	2,4	0,2
C18:0	stearová	0,07	0,00	1,5	0,1
C18:1	celkový obsah C18:1	0,09	0,02	1,9	0,4
SFA	nasycené	0,10	0,02	1,9	0,4
UFA*	nenasycené				
MUFA	mononenasycené	0,17	0,02	2,0	0,5
PUFA	polynenasycené	0,05	0,01	0,8	0,1
TFA	*trans* isomery nenasycených MK	0,00	0,00	0,1	0,0
dle počtu uhlíků					
SCFA	MK s krátkým uhlíkovým řetězcem; C4-C10	0,01	0,02	0,2	0,1
MCFA	MK se středním uhlíkovým řetězcem; C12-C16	0,04	0,02	1,0	0,4
LCFA	MK s dlouhým uhlíkovým řetězcem; C18 a více	0,07	0,02	1,6	0,4

UFA* = hodnota je počítaná dle vzorce: (100 % - % SFA)

Zdroj: FOSS, APPLICATION NOTE 64

Obsahy těchto MK a skupin byly stanoveny v g/100 g mléka a přepočítány na hodnoty odpovídající vyjádření referenční metody, tedy GC (g/100 g všech MK) v programu Microsoft Excel podle vzorce (FOSS, APPLICATION NOTE 64):

(MK*n* * 100)/(T*n* * 0,95), kde

MK*n* je hodnota MK (skupiny MK) příslušného vzorku mléka vyjádřená v g/100 g mléka,

T*n* je hodnota obsahu tuku v daném vzorku v g/100 g mléka a

0,95 je koeficient přepočtu obsahu tuku na MK (IDF BULLETIN, 2010).

GC

Ze vzorků mléka pro stanovení MK plynovou chromatografií bylo určeno 56 MK, po jejichž identifikaci byly v programu Microsoft Excel vypočítány základní skupiny MK (vyjádřené v g/100 g všech MK) za účelem vyhodnocení přesnosti rutinní analýzy (Tabulka 4).

Pro statistické výpočty byla zvolena nabídka programu Statistica 12.0 (StatSoft 2013). Pro vyhodnocení závislostí kvantitativních proměnných byla použita korelační a regresní analýza. Model lineární regrese byl k danému účelu validace kalibrace nepřímého stanovení MK v mléce (MIR-FT) zvolen v souladu s relevantními definicemi ICAR, kdy tento je prakticky univerzálním modelem kalibrací a validací nepřímých rutinních mlékařských analýz (Příloha 1: Lineární model kalibrace, způsob života v mlékařství; BAUMGARTNER, 2006). Významnost těsnosti závislosti vyjádřené korelačními koeficienty (r_{xy}) je značena následujícím způsobem: $^{+}$ (P<0,05); $^{++}$ (P<0,01); $^{+++}$ (P<0,001).

Tabulka 4: Třídění mastných kyselin určených plynovou chromatografií do jednotlivých skupin

Skupiny	Mastné kyseliny (MK) zařazené do skupiny	Počet
dle nasycenosti		
SFA (1)	C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0	11
SFA (2)	C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0	13
SFA (3)	C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C21:0, C22:0, C23:0, C24:0	17
SFA (4)	C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C21:0, C22:0, C23:0, C24:0, *iso*-C13:0, *anteiso*-C13:0, *iso*-C14:0, *anteiso*-C15:0, *iso*-C16:0, *iso*-C17:0, *anteiso*-C17:0	24
UFA	MUFA (1) + PUFA (1)	29
z toho: MUFA (1)	C10:1, C12:1, C15:1, C16:1, C16:1, C16:1n7 (*cis*-9), C16:1, C17:1n7 (*cis*-10), C18:1 (*trans*), C18:1n7 (*trans*-11), C18:1n9 (*cis*-9), C18:1n7 (*cis*-11), C18:1, C18:1, C19:1, C19:1, C20:1n9 (*cis*-11), C20:1n7 (*cis*-13), C23:1	19
MUFA (2)	C16:1n7 (*cis*-9), C16:1, C17:1n7 (*cis*-10), C18:1n9 (*cis*-9), C18:1n7 (*cis*-11), C18:1, C18:1, C20:1n9 (*cis*-11), C20:1n7 (*cis*-13)	9
PUFA (1)	C18:2, C18:2n-6 (*cis*-9, *cis*-12), C18:3, C18:3n-3 (all *cis*-9, 12, 15), C18:2 (*cis*-9, *trans*-11; CLA), C20:3n-6 (all *cis*-8, 11, 14), C20:4n-6 (all *cis*-5, 8, 11, 14), C20:4n-3 (all *cis*-8, 11, 14, 17), C20:5n-3 (all *cis*-5, 8, 11, 14, 17; EPA), C22:5n-3 (all *cis*-7, 10, 13, 16, 19)	10
PUFA (2)	C18:2, C18:2n-6 (*cis*-9, *cis*-12), C18:3, C18:3n-3 (all *cis*-9, 12, 15), C20:3n-6 (all *cis*-8, 11, 14), C20:4n-6 (all *cis*-5, 8, 11, 14), C20:4n-3 (all *cis*-8, 11, 14, 17), C20:5n-3 (all *cis*-5, 8, 11, 14, 17; EPA), C22:5n-3 (all *cis*-7, 10, 13, 16, 19)	9
TFA	C18:1 (*trans*), C18:1n7 (*trans*-11), C18:2 (*cis*-9, *trans*-11; CLA)	3

pokračování Tabulky 4

Skupiny	Mastné kyseliny (MK) zařazené do skupiny	Počet
dle počtu uhlíků		
SCFA (1)	C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C10:1, C11:0, C12:0, C12:1, C12:1 + *iso*-C13:0, *anteiso*-C13:0, C13:0	11
SCFA (2)	C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C10:1, C11:0	6
MCFA (1)	*iso*-C14:0, C14:0, C14:1n5 (*cis*-9) + *iso*-C15:0, *anteiso*-C15:0, C15:0, C15:1, *iso*-C16:0, C16:0, C16:1, C16:1, C16:1n7 (*cis*-9), *iso*-C17:0, C16:1, *anteiso*-C17:0, C17:0, C17:1n7 (*cis*-10)	16
MCFA (2)	C12:0, C12:1, C12:1 + *iso*-C13:0, *anteiso*-C13:0, C13:0, *iso*-C14:0, C14:0, C14:1n5 (*cis*-9) + *iso*-C15:0, *anteiso*-C15:0, C15:0, C15:1, *iso*-C16:0, C16:0, C16:1, C16:1, C16:1n7 (*cis*-9), *iso*-C17:0, C16:1, *anteiso*-C17:0, C17:0, C17:1n7 (*cis*-10)	21
LCFA (1)	C18:0, C18:1 (*trans*), C18:1n7 (*trans*-11), C18:1n9 (*cis*-9), C18:1n7 (*cis*-11), C18:1, C18:1, C18:1 + C18:2, C18:2, C18:2n-6 (*cis*-9, *cis*-12), C19:1, C18:3, C18:3n-3 (all *cis*-9, 12, 15), C20:0, C18:2 (*cis*-9, *trans*-11; CLA), C20:1n9 (*cis*-11), C20:1n7 (*cis*-13), C18:2 + C20:1, C21:0, C19:1, C20:3n-6 (all *cis*-8, 11, 14), C20:4n-6 (all *cis*-5, 8, 11, 14), C22:0, C20:4n-3 (all *cis*-8, 11, 14, 17), C20:5n-3 (all *cis*-5, 8, 11, 14, 17; EPA), C23:0, C23:1, C24:0, C22:5n-3 (all *cis*-7, 10, 13, 16, 19)	29

SFA = nasycené MK; (1) sudé, (2) sudé + C15:0 a C17:0; (3) všechny sudé a liché; (4) všechny sudé a liché + rozvětvené MK; UFA = nenasycené MK; MUFA = mononenasycené MK; (1) všechny isomery; (2) *cis* isomery; PUFA = polynenasycené MK; (1) včetně CLA (C18:2 *cis*-9, *trans*-11); (2) bez CLA; TFA = *trans* isomery nenasycených MK; SCFA = MK s krátkým uhlíkovým řetězcem; MCFA = MK se středním uhlíkovým řetězcem; LCFA = MK s dlouhým uhlíkovým řetězcem; EPA = kyselina eikosapentaenová;

Pozn.: kyseliny označené červeně (Cx:y) jsou přesně neidentifikované polohové isomery;
kyselina označená zeleně (C18:1t) je směs polohových *trans* isomerů;

IV) Výsledky analýz vybraných jakostních ukazatelů mléka a mléčného tuku (posouzení variability)

Vybrané parametry jakosti mléka u bazénových a individuálních vzorků mléka

Účelem stanovení vybraných parametrů jakosti mléka, především základního chemického složení u bazénových, ale zejména u individuálních vzorků bylo zajistit odpovídající široké spektrum hodnot sledovaných ukazatelů, a zároveň tak zajistit i širokou variabilitu v hodnotách MK, neboť složení (zejména obsah tuku) do značné míry ovlivňuje i zastoupení MK (SAMKOVÁ et al., 2012). Z toho důvodu bylo odebráno (podrobná specifikace je uvedena v kapitole *I) Podmínky experimentálních odběrů vzorků mléka*) celkem 60 bazénových a 345 individuálních vzorků mléka v různých chovech, od dvou nejčastěji dojených plemen v ČR, tedy českého strakatého a holštýnského skotu.

Základní statistické charakteristiky uvedené v Tabulce 5 vypovídají o velmi dobře vyváženém souboru s optimální variabilitou jednotlivých ukazatelů. Tato variabilita je daná jednak rozpětím (rozsahem) minimálních a maximálních hodnot, jednak hodnotou variačního koeficientu v % (RSD). Tyto hodnoty dávaly záruku obdržení odpovídajících parametrů při regresní a korelační analýze.

Tabulka 5: Základní statistické charakteristiky pro vybrané ukazatele jakosti mléka; bazénové (n = 60) vs. individuální (n = 345) vzorky mléka

	Bazénové vzorky mléka					**Individuální vzorky mléka**				
	$\overline{x}$	Min.	Max.	SD	RSD	$\overline{x}$	Min.	Max.	SD	RSD
T	3,90	2,57	5,15	0,44	11,3	4,34	2,13	7,88	0,92	21,2
B	3,34	3,01	3,62	0,15	4,6	3,44	2,16	4,92	0,39	11,4
L	4,95	4,74	5,03	0,06	1,3	5,04	3,42	5,52	0,26	5,2
TPS	8,92	8,49	9,24	0,18	2,0	9,10	5,79	10,48	0,48	5,3
Moč.	27,09	18,80	37,60	4,27	15,8	23,96	10,20	85,30	6,82	28,5
KC	0,180	0,164	0,200	0,009	4,9	0,190	0,117	0,261	0,023	12,3
BHB	0,007	0,000	0,050	0,014	198,2	0,028	0,000	0,500	0,038	138,7
AC	0,052	0,000	0,130	0,036	68,9	0,094	0,000	0,610	0,072	77,1
PSB	246 /224	88	531	108	43,8	182 /77	6	6463	454	248,9

SD = směrodatná odchylka; RSD = variační koeficient v %; (směrodatná odchylka/$\overline{x}$) *100;

T = tuk; B = bílkoviny; L = laktóza; TPS = tukuprostá sušina (g/100 g); Moč. = močovina (mg/100 ml); KC = kyselina citronová (%); BHB = kyselina beta-hydroxymáselná (mmol/l); AC = aceton (mmol/l); PSB = počet somatických buněk (tis. v 1 ml), hodnota za lomítkem je geometrický průměr;

V porovnání s bazénovými vzorky byla pochopitelně u všech vybraných ukazatelů jakosti mléka zjištěna vyšší variabilita u individuálních vzorků. S výjimkou kyselin citrónové a beta-hydroxymáselné a počtu somatických buněk, kde hodnoty variačních koeficientů přesahovaly vesměs 50 %, byly variační koeficienty v hodnotách odpovídajících danému parametru (např. HANUŠ et al., 2008, 2009, 2014). U bazénových, resp. individuálních vzorků byly nejnižší variační koeficienty zjištěny pro laktózu (1,3 %, resp. 5,2 %) a nejvyšší pro močovinu (15,8 %, resp. 28,5 %). Také variabilita pro základní chemické složení (tuk, bílkoviny, laktózu) odpovídá výše uvedeným literárním pramenům, které uvádějí nejvyšší variabilitu pro obsah tuku a nejnižší pro obsah laktózy. Ve sledovaném souboru byl variační koeficient pro obsah tuku 11,3 % (s rozpětím minimálních a maximálních hodnot 2,57 - 5,15 %) u bazénových vzorků mléka a 21,2 % (2,13 - 7,88 %) u individuálních vzorků mléka. Tradičně nízká variabilita byla zjištěna i pro obsah bílkovin: u bazénových vzorků mléka 4,6 % (3,01 - 3,62 %), u individuálních vzorků mléka 11,4 % (2,16 - 4,92 %).

Zastoupení MK v mléce a mléčném tuku u bazénových a individuálních vzorků mléka

Variabilita v jednotlivých ukazatelích jakosti mléka byla tedy předpokladem i pro zajištění velkého rozpětí v zastoupení MK a jejich skupin. Vyšší hodnoty variačních koeficientů byly zjištěny spíše u nenasycených MK, a to prakticky u obou metod stanovení (Tabulka 6).

U bazénových vzorků mléka byla nejvyšší variabilita zjištěna pro skupiny PUFA a TFA. V případě vyjádření zastoupení MK v jednotkách g/100 g všech MK byly zjištěny variační koeficienty 46,1 a 28,2 % (při stanovení pomocí MIR-FT) a 19,9 (resp. 21,3 %) a 26,4 % (při stanovení pomocí GC). Stanovení pomocí MIR-FT ukázalo i vysokou variabilitu pro C18:1 (26,6 %), a to i při vyjádření v jednotkách g/100 g mléka (25,2 %), zatímco při stanovení pomocí GC byla variabilita poměrně nízká (9,0 %). Tento rozdíl ve variabilitě mezi MIR-FT a GC mohl být způsoben skutečností, že pomocí GC byl stanoven přímo isomer C18:1n9 (*cis*-9), zatímco u MIR-FT tato přesná specifikace bohužel není možná a zahrnuje podle výrobce celkový obsah C18:1 (FOSS, APPLICATION NOTE 64).

V každém případě C18:1 je nejbohatěji zastoupenou skupinou MK z MUFA. Kyselina olejová (*cis*-9 isomer C18:1n9) je v mléčném tuku zastoupena zhruba 20 až 30 % a z C18:1 tvoří nejvyšší podíl (více než 80 %). Při stanovení pomocí GC bývá tedy získávána velmi různorodá směs isomerů, ať už jde o isomery *cis* nebo *trans*. Ve sledované práci bylo těchto isomerů stanoveno celkem 6 (viz kapitola *III) Statistické zpracování získaných dat*, Tabulka 4). Z literatury je rovněž známo, že variabilita obsahů těchto isomerů je velmi vysoká v závislosti na individualitě, krmné dávce či sezóně. Např. průměrné hodnoty celkového množství *trans*-isomerů kyseliny olejové se pohybují od 2,31 do 7,48 % z celkového obsahu všech MK (PRECHT a MOLKENTIN, 2000; SELBERG et al., 2004). V rámci *trans*-isomerů kyseliny olejové je pak dominantním isomerem C18:1 *trans*-11, tj. kyselina vakcenová (TVA). Tato kyselina představuje 24,5 až 55,1 % z celkového obsahu *trans*-C18:1 (PARODI, 2004; PIPEROVÁ et al., 2004). V mléčném tuku se rovněž nacházejí *trans*-isomery C14:1, C16:1 a C17:1 a isomery PUFA. Z těch jsou bezesporu nejvýznamnější isomery CLA.

Ve sledované práci byly v případě GC identifikovány pouze tyto *trans*-isomery: C18:1t (směs více polohových *trans* isomerů), C18:1n7 *trans*-11 (TVA) a C18:2 *cis*-9, *trans*-11 (CLA). U bazénových vzorků mléka byla průměrná hodnota TFA vyjádřená v jednotkách g/100 g všech MK 2,5 % (MIR-FT), resp. 2,2 % (GC). U individuálních vzorků mléka pak byly průměrné hodnoty TFA 2,7 % (MIR-FT), resp. 2,3 % (GC). I zde byla zjištěna v porovnání s ostatními MK a jejich skupinami vyšší variabilita: 25,0 % (MIR-FT) a 20,8 % (GC). Průměrné hodnoty TFA odpovídají literárním pramenům (viz výše) a jejich nižší hodnota byla způsobena především skutečností, že ani v jednom ze sledovaných chovů nebyla využívaná pastva, a dojnice nebyly přikrmované čerstvou pící či tukovými doplňky. Těmito způsoby lze totiž dosáhnout významného zvýšení zastoupení této skupiny (KAY a THOMSON et al., 2003; COUVREUR et al., 2006).

Tabulka 6: Základní statistické charakteristiky pro vybrané mastné kyseliny (MK) a jejich skupiny stanovené plynovou chromatografií (GC) a infračervenou spektroskopií (MIR-FT) včetně přepočtu na shodné jednotky s GC; bazénové (n=60) *vs.* individuální (n=345) vzorky mléka

	Bazénové vzorky mléka					**Individuální vzorky mléka**				
	$\bar{x}$	Min.	Max.	SD	RSD	$\bar{x}$	Min.	Max.	SD	RSD
MIR-FT; g/100 g mléka										
C16:0	1,37	0,91	1,91	0,21	15,1	1,50	0,70	2,78	0,32	21,0
C18:0	0,47	0,32	0,61	0,06	12,7	0,55	0,16	1,20	0,14	25,1
C18:1	0,91	0,42	1,44	0,23	25,2	1,17	0,53	2,49	0,27	23,3
SFA	2,62	1,76	3,58	0,38	14,4	2,87	1,37	5,63	0,64	22,5
UFA, z toho:	1,05	0,73	1,47	0,13	12,3	0,95	0,49	2,90	0,36	37,4
MUFA	1,11	0,71	1,58	0,18	16,4	1,34	0,72	2,61	0,28	21,2
PUFA	0,24	0,08	0,36	0,10	43,6	0,33	0,16	0,42	0,04	11,2
TFA	0,09	0,03	0,13	0,02	25,1	0,11	0,01	0,18	0,02	21,8
SCFA	0,37	0,22	0,56	0,07	20,2	0,43	0,14	0,95	0,13	31,7
MCFA	1,62	0,93	2,75	0,34	21,0	1,82	0,54	4,18	0,59	32,1
LCFA	1,28	0,86	2,45	0,25	19,6	1,48	0,61	3,38	0,41	28,1

pokračování Tabulky 6

	Bazénové vzorky mléka					Individuální vzorky mléka				
	$\bar{x}$	Min.	Max.	SD	RSD	$\bar{x}$	Min.	Max.	SD	RSD
MIR-FT; g/100 g všech MK *										
C16:0	37,0	32,0	44,8	2,8	7,5	36,5	26,3	44,9	3,1	8,5
C18:0	12,8	8,4	17,8	1,6	12,7	13,4	7,9	19,7	1,8	13,4
C18:1	24,8	11,4	35,0	6,6	26,6	28,6	18,9	42,3	3,8	13,3
SFA	70,6	62,2	79,1	4,1	5,8	69,5	56,2	79,8	3,6	5,2
UFA, z toho:	28,4	23,0	35,4	2,6	9,2	27,8	19,6	44,8	4,8	17,3
MUFA	30,2	20,4	40,1	5,2	17,4	32,7	22,8	45,1	3,7	11,2
PUFA	6,6	2,2	10,7	3,0	46,1	8,1	5,2	12,1	1,2	15,1
TFA	2,5	0,7	3,6	0,7	28,2	2,7	0,3	4,7	0,7	25,0
SCFA	10,0	7,1	12,8	1,3	12,8	10,1	5,7	13,5	1,4	14,1
MCFA	43,6	36,4	56,4	5,6	12,8	43,5	19,0	91,9	7,3	16,7
LCFA	34,6	23,9	53,9	5,7	16,5	35,7	26,0	55,5	5,1	14,4
GC; g/100 g všech MK										
C16:0	33,7	28,5	45,6	3,0	8,9	32,2	24,6	43,2	3,1	9,6
C18:0	8,9	5,1	11,8	1,1	12,0	9,3	4,5	17,5	1,9	20,6
C18:1n9 (*cis*-9)	19,5	15,2	23,7	1,7	9,0	19,2	12,1	32,8	3,3	17,0
SFA (1)	65,1	58,5	72,1	2,6	4,0	66,1	52,5	74,9	3,7	5,6
SFA (2)	66,9	60,1	73,8	2,7	4,0	67,8	54,1	76,8	3,8	5,6
SFA (3)	67,1	60,3	73,9	2,7	4,0	68,1	54,1	77,2	3,9	5,7
SFA (4)	70,1	62,8	76,9	2,9	4,1	71,0	56,1	79,9	4,0	5,6
UFA, z toho:	29,5	22,8	36,7	2,8	9,6	28,7	19,8	43,6	3,9	13,8
MUFA (1)	26,0	20,6	31,3	2,3	8,8	25,4	17,2	40,3	3,7	14,6
MUFA (2)	23,4	18,7	28,0	1,9	8,3	22,7	15,1	37,9	3,6	15,8
PUFA (1)	3,5	2,0	5,4	0,7	19,9	3,4	2,1	4,7	0,5	14,4
PUFA (2)	3,1	1,7	4,8	0,6	21,3	2,9	1,8	4,3	0,5	16,0
TFA	2,2	1,0	4,5	0,6	26,4	2,3	1,3	4,3	0,5	20,8
SCFA (1)	11,6	9,6	13,8	1,0	8,3	13,2	5,3	19,9	2,1	16,2
SCFA (2)	7,8	6,5	8,9	0,6	7,2	9,0	4,4	13,3	1,4	15,7
MCFA (1)	52,0	45,0	65,0	3,5	6,6	50,8	36,9	62,1	4,2	8,3
MCFA (2)	55,9	47,7	68,5	3,5	6,2	55,0	38,0	65,6	4,8	8,6
LCFA (1)	36,4	24,6	44,7	3,5	9,5	36,0	25,1	57,6	5,3	14,6

* zastoupení MK (g/100 g všech MK) = [(obsah MK; g/100 g mléka) * 100/(obsah tuku; g/100 g mléka) * 0,95];

SD = směrodatná odchylka; RSD = variační koeficient v % = [(směrodatná odchylka/$\bar{x}$) * 100]; SFA = nasycené MK; UFA = nenasycené MK; MUFA = mononenasycené MK; PUFA = polynenasycené MK; TFA = *trans* isomery nenasycených MK; SCFA = MK s krátkým uhlíkovým řetězcem; MCFA = MK se středním uhlíkovým řetězcem; LCFA = MK s dlouhým uhlíkovým řetězcem; přesné specifikace skupin s ohledem na zastoupení jednotlivých MK (1) až (4) jsou uvedené v Tabulce 4, pro individuální vzorky jsou TFA (n = 344), UFA (n = 121).

Sledování dvou významných skupin MK (SFA *vs.* UFA) ukázalo, že variabilita je, zcela v souladu s literaturou (PEŠEK et al., 2006), vyšší u skupiny UFA než u skupiny SFA, a to jak u bazénových, tak u individuálních vzorků mléka. U bazénových vzorků mléka (a v případě vyjádření zastoupení MK v jednotkách g/100 g všech MK) byly zjištěny variační koeficienty pro skupiny SFA (resp. SFA (4)) a UFA 5,8 a 9,2 % (při stanovení pomocí MIR-FT) a 4,1 a 9,6 % (při stanovení pomocí GC). U individuálních vzorků mléka byly variační koeficienty 5,2 a 17,3

% (při stanovení pomocí MIR-FT) a 5,6 a 13,8 % (při stanovení pomocí GC). Průměrné hodnoty SFA a UFA u bazénových vzorků činily 70,6 a 28,4 % (MIR-FT) a 70,1 a 29,5 % (GC). U individuálních vzorků mléka pak byly průměrné hodnoty 69,5 a 27,8 % (MIR-FT) a 71,0 a 28,7 % (GC). Na uvedených hodnotách je zajímavá vyrovnanost, a to jak mezi oběma metodami stanovení, tak mezi bazénovými a individuálními vzorky mléka.

Průměrná zastoupení těchto dvou skupin odpovídají literárním zdrojům (Tabulka 7), i když u SFA se jedná spíše o hodnoty na horní hranici udávaných rozpětí. Tento fakt mohl být způsoben (podobně jako bylo popsáno výše u TFA) skutečností, že v chovech, kde byly vzorky mléka (bazénové i individuální) odebírány, byla aplikována pouze směsná krmná dávka (TMR), a nebyla využívána pastva dojnic.

Tabulka 7: Zastoupení nasycených (SFA), mononenasycených (MUFA) a polynenasycených (PUFA) mastných kyselin (MK) mléčného tuku (g/100 g všech MK)

Skupiny MK	PIVA et al. (1993)	VELÍŠEK (1999)	ELLIS et al. (2006)	JENKINS a MCGUIRE (2006)
SFA	61,0 - 71,7	53 - 72	67,3 - 68,1	64,9
MUFA	27,4 - 37,7	26 - 42	26,2 - 27,6	28,3
PUFA		2 - 6	3,3 - 3,9	6,8

Zdroj: SAMKOVÁ et al., 2008

O tom svědčí i vyšší zastoupení kyseliny palmitové – C16:0: 33,7 % (28,5-45,6%) u bazénových vzorků a 32,2 % (24,6-43,2 %) u individuálních vzorků mléka (GC), a rovněž nižší zastoupení kyseliny olejové – C18:1n9 (*cis*-9): 19,2 % (12,1-32,8%) u bazénových vzorků (GC) a 32,2 % (24,6-43,2 %) u individuálních vzorků mléka (GC). Tyto dvě mastné kyseliny jsou v mléčném tuku nejbohatěji zastoupené (JENSEN, 2002; BARLOWSKA et al., 2011 aj.) a spolu s kyselinou stearovou – C18:0 velkou měrou rozhodují o technologických parametrech mléčného tuku. Zatímco vyšší obsahy kyselin palmitové a stearové přispívají k větší tvrdosti másla, při vyšším zastoupení kyseliny olejové se stává máslo jemnější, měkčí, a tudíž snadněji roztíratelné. O této vlastnosti se rozhoduje na základě odlišných teplot tání jednotlivých MK (SAMKOVÁ et al., 2012). Zvýšené množství UFA, zejména kyseliny olejové s teplotou tání 16 °C je typické v mléce pasených zvířat či v důsledku přikrmování zelené píce a zajišťuje lepší roztíratelnost másla. Naopak zvýšený obsah SFA, tedy kyselin palmitové (teplota tání 62,7 °C) a stearové (69,6 °C) roztíratelnost másla zhoršuje.

V) Výsledky korelační a regresní analýzy (posouzení metod MIR-FT a GC)

Bazénové vzorky mléka

Pro většinu MK i jejich skupin tříděných dle počtu dvojných vazeb (tj. dle nasycenosti) byly zjištěny velmi těsné závislosti (P<0,001). S výjimkou UFA byla zastoupení v g/100 g všech MK zjištěná metodou MIR-FT vždy nadhodnocená. Nejvyšší rozdíly (vyjádřené procentuálně) mezi oběma metodami byly zejména v případě PUFA (1), resp. PUFA (2). V prvním případě, kdy byla ve skupině PUFA zahrnuta i CLA činil rozdíl +47,0 %, ve druhém případě dokonce +53,0 %. Z hlediska literatury je však přiměřenější hodnota PUFA zjištěná pomocí GC (3,5 %, resp. 3,1 %) než hodnota PUFA zjištěna MIR-FT (6,6 %). Korelační koeficienty (r_{xy}) byly nicméně poměrně vysoké a statisticky vysoce významné (0,6278; resp. 0,6406; P<0,001), což potvrzuje možnost využití metody MIR-FT, ovšem s přihlédnutím k přepočtům daným regresními rovnice.

Nejnižší hodnoty korelačních koeficientů byly zjištěny u C18:1 (0,4993) a skupin MUFA (1), resp. MUFA (2) (0,5943; resp. 0,5153) a TFA (0,5706). Také v případě MUFA se jednalo o značně nadhodnocené zastoupení (30,2 %), které bylo zjištěné pomocí MIR-FT. V případě MUFA (1), kde byly zahrnuty všechny identifikované isomery MUFA, bylo zastoupení 26,0 %, tj. o +13,9 % vyšší, v případě MUFA (2), kde byly zahrnuty pouze identifikované *cis* isomery MUFA, bylo zastoupení 23,4 %, tj. o +22,5 % vyšší. Přesto se ve všech zmíněných případech jednalo o statisticky vysoce významné závislosti (P<0,001).

Velmi shodné údaje a vyšší těsnosti vztahů byly naopak zjištěny u kyseliny palmitové (0,7517; P<0,001), skupin SFA (3) (0,7169; P<0,001) a UFA (0,9232; P<0,001), i když, jak je patrné z průměrných hodnot, metodou MIR-FT byla stanovena hodnota SFA poněkud vyšší (70,6 %) a hodnota UFA mírně nižší (28,4 %) než tomu bylo při stanovení referenční metodou GC (67,1 a 29,5 %). Z hodnot koeficientu determinace (R^2) vyplývá, že tedy 51,4 a 85,2 % variability v hodnotách SFA a UFA podle MIR-FT jsou vysvětlitelné variacemi v analýzách GC.

Pro MK nasycené byly vypočítané také modelové závislosti, kdy byly vytvořeny různé skupiny: SFA (1) = do skupiny byly zařazeny pouze MK se sudým počtem uhlíků, SFA (2) = do skupiny byly zahrnuty MK se sudým počtem uhlíků včetně dvou nejvýznamnějších MK s lichým počtem uhlíků (C15:0 a C17:0) a nakonec skupina SFA (4), která byla součtem všech MK se sudým a lichým počtem uhlíků a MK s rozvětveným řetězcem. Tato modelová analýza ukázala, že nejtěsnější výsledky (0,7688; P<0,001) poskytla skupina SFA (4).

Méně těsné závislosti byly zjištěny v případě skupin MK tříděných dle počtu uhlíků – SCFA (1) a SCFA (2): 0,3308; P<0,05 a 0,3795; P<0,01 a MCFA (1) a MCFA (2): 0,3727 a 0,3694; shodně P<0,01. U skupiny LCFA byla korelace statisticky vysoce významná a mírně vyšší (0,4935; P<0,001) a zastoupení této skupiny zjištěné metodami MIR-FT a GC se výrazně nelišilo: 34,6 % (MIR-FT) a 36,4 % (GC).

Grafická znázornění vybraných závislostí jsou uvedena v příloze této certifikované metodiky (Příloha 2: Regresní analýza; zde se jedná o vybrané grafy regresních vztahů mezi výsledky stanovení MK metodami MIR-FT (x) a GC (y)).

Individuální vzorky mléka

Ve většině případů byly korelační koeficienty mezi metodami MIR-FT a GC pro individuální vzorky mléka vyšší než pro bazénové vzorky mléka. Výjimky potvrzující pravidlo tvořily skupiny PUFA (1), PUFA (2), TFA, MCFA (1) a MCFA (2), kde byly korelační koeficienty nižší.

Průměrná zastoupení MK a jejich skupin zjištěná oběma metodami (MIR-FT a GC) se lišila zejména u PUFA (1) a PUFA (2), kde byly stanoveny i nízké, přesto statisticky vysoce významné korelační koeficienty (0,3314 a 0,2905; shodně P<0,001). Průměrné zastoupení PUFA zjištěné MIR-FT bylo 8,1 %, což byla hodnota o +58,0 % vyšší než zastoupení PUFA (1) a o +64,2 % vyšší než PUFA (2).

Nejnižší korelační koeficienty byly zjištěny u skupiny TFA (0,1690; P<0,01). Zastoupení TFA stanovené MIR-FT činilo 2,7 %, zastoupení zjištěné GC bylo 2,3 %.

Velmi shodné údaje (podobně jako u bazénových vzorků mléka) byly naopak zjištěny u skupin SFA (1 - 4) (od 0,8519 do 0,8592; P<0,001) a UFA (0,9284; P<0,001). Obě tyto skupiny by bylo možné stanovovat pomocí MIR-FT s vyšší mírou věrohodnosti. To znamená (jak vyplývá z R^2), že více jak 70 % variability v hodnotách SFA (1 - 4) a 86,2 % variability v hodnotách UFA podle nepřímé metody MIR-FT je vysvětlitelných variacemi v analýzách přímé metody GC. Uvedené lze označit za dobrou schopnost analytické výpovědi nepřímé metody, resp. její zcela akceptovatelnou věrohodnost výsledků k praktické interpretaci.

Tabulka 8: Vzájemné vztahy mezi zastoupením mastných kyselin (MK) a jejich skupin určených přímo plynovou chromatografií (GC) a nepřímo infračervenou spektroskopií (MIR-FT); bazénové (n = 60) *vs.* individuální (n = 345; pro TFA n = 344, UFA n = 121) vzorky mléka

	Bazénové vzorky mléka							**Individuální vzorky mléka**						
	g/100 g všech MK			%	Korelační analýza			g/100 g všech MK			%	Korelační analýza		
	MIR-FT	GC	rozdíl abs.	rozdíl rel.	r_{xy}	*P*	R^2	MIR-FT	GC	rozdíl abs.	rozdíl rel.	r_{xy}	*P*	R^2
C16:0	37,0	33,7	+3,3	+8,9	0,7517	$^{+++}$	56,5	36,5	32,2	+4,3	+11,8	0,6915	$^{+++}$	47,8
C18:0	12,8	8,9	+3,9	+30,5	0,5459	$^{+++}$	29,8	13,4	9,3	+4,1	+30,6	0,6718	$^{+++}$	45,1
C18:1*	24,8	19,5	+5,3	+21,4	0,4993	$^{+++}$	24,9	28,6	19,2	+9,4	+32,9	0,7813	$^{+++}$	61,1
SFA (1)	70,6	65,1	+5,5	+7,8	0,7328	$^{+++}$	53,7	69,5	66,1	+3,4	+4,9	0,8519	$^{+++}$	72,6
SFA (2)		66,9	+3,7	+5,2	0,7207	$^{+++}$	51,9		67,8	+1,7	+2,4	0,8565	$^{+++}$	73,4
SFA (3)		67,1	+3,5	+5,0	0,7169	$^{+++}$	51,4		68,1	+1,4	+2,0	0,8592	$^{+++}$	73,8
SFA (4)		70,1	+0,5	+0,7	0,7688	$^{+++}$	59,1		71,0	-1,5	-2,2	0,8523	$^{+++}$	72,6
UFA, z toho:	28,4	29,5	-1,1	-3,9	0,9232	$^{+++}$	85,2	27,8	28,7	-0,9	-3,2	0,9284	$^{+++}$	86,2
MUFA (1)	30,2	26,0	+4,2	+13,9	0,5943	$^{+++}$	35,3	32,7	25,4	+7,3	+22,3	0,7580	$^{+++}$	57,5
MUFA (2)		23,4	+6,8	+22,5	0,5153	$^{+++}$	26,6		22,7	+10	+30,6	0,7472	$^{+++}$	55,8
PUFA (1)	6,6	3,5	+3,1	+47,0	0,6278	$^{+++}$	39,4	8,1	3,4	+4,7	+58,0	0,3314	$^{+++}$	11,0
PUFA (2)		3,1	+3,5	+53,0	0,6406	$^{+++}$	41,0		2,9	+5,2	+64,2	0,2905	$^{+++}$	8,4
TFA	2,5	2,2	+0,3	+12,0	0,5706	$^{+++}$	32,6	2,7	2,3	+0,4	+14,8	0,1690	0,002	2,9
SCFA (1)	10	11,6	-1,6	-16,0	0,3308	0,01	10,9	10,1	13,2	-3,1	-30,7	0,5645	$^{+++}$	31,9
SCFA (2)		7,8	+2,2	+22,0	0,3795	0,003	14,4		9,0	+1,1	+10,9	0,6108	$^{+++}$	37,3
MCFA (1)	43,6	52,0	-8,4	-19,3	0,3727	0,003	13,9	43,5	50,8	-7,3	-16,8	0,2277	$^{+++}$	5,2
MCFA (2)		55,9	-12,3	-28,2	0,3694	0,004	13,6		55,0	-11,5	-26,4	0,2572	$^{+++}$	6,6
LCFA (1)	34,6	36,4	-1,8	-5,2	0,4935	$^{+++}$	24,4	35,7	36,0	-0,3	-0,8	0,8440	$^{+++}$	71,2

* pro GC C18:1n9 (*cis*-9); r_{xy} = korelační koeficient; *P* = hladina významnosti; $^{+++}$ = *P*<0,001; R^2 = (r_{xy}^2) * 100;

SFA = nasycené MK; UFA = nenasycené MK; MUFA = mononenasycené MK; PUFA = polynenasycené MK; TFA = *trans* isomery nenasycených MK; SCFA = MK s krátkým uhlíkovým řetězcem; MCFA = MK se středním uhlíkovým řetězcem; LCFA = MK s dlouhým uhlíkovým řetězcem; přesné specifikace skupin s ohledem na zastoupení jednotlivých MK (1) až (4) jsou uvedené v Tabulce 4, pro individuální vzorky jsou TFA (n = 344), UFA (n = 121).

Podobně jako u bazénových vzorků mléka, i u individuálních vzorků mléka byly zjištěny nižší korelační závislosti u skupin MK tříděných dle počtu uhlíků. Jednalo se především o skupiny MCFA (1) a MCFA (2), kde byly zjištěny korelační koeficienty 0,2277 (P<0,001) a 0,2572 (P<0,001). Velký rozdíl (oproti bazénovým vzorkům mléka) byl zjištěn u skupiny LCFA, kde byl překvapivě vysoký korelační koeficient (0,8440; P<0,001).

Z uvedených skutečností se jeví jako optimální využít MIR-FT pro MK, které jsou v mléčném tuku bohatěji zastoupené, zejména C16:0 a dále pro skupiny MK tříděných podle nasycenosti (počtu dvojných vazeb). Nejlepší výsledky pak poskytují skupiny SFA a UFA.

Grafická znázornění vybraných závislostí jsou uvedena v příloze této certifikované metodiky (Příloha 2: Regresní analýza; zde se jedná o vybrané grafy regresních vztahů mezi výsledky stanovení MK metodami MIR-FT (x) a GC (y)).

Srovnání korelačních závislostí s literárními zdroji

Pokud jde o výše zjištěné výsledky, je zajímavé je porovnat s dostupnými literárními zdroji (Tabulka 9), které povětšinou uvádějí těsnější závislosti (COPPA et al., 2010; MAURICE-VAN EIJNDHOVEN et al., 2013; FERRAND-CAMELS et al., 2014 aj.). Na druhé straně i u těchto prací je patrná tendence nižších hodnot R^2 pro skupiny PUFA či TFA. WOJCIECHOWSKI a BARBANO (2016) uvádějí, že dle metody MIR je stanovení MK podle délky uhlíkového řetězce méně těsné (0,78) než podle nasycenosti MK (0,90), což potvrzují i hodnoty zjištěné v této metodice.

Tabulka 9: Porovnání vybraných vztahů (vyjádřených koeficientem determinace $\mathbf{R^2}$) mezi mastnými kyselinami (MK) a jejich skupinami stanovenými rutinní a referenční metodou zjištěných v této práci (CM35) a v publikacích vybraných autorů

	CM35	**Zdroj***			
		S2006	**C2010**	**M2013**	**F2014**
C16:0	0,48-0,57	0,89	0,86	0,93	0,88
C18:0	0,30-0,45	0,14	-	0,72	0,75
C18:1	0,25-0,61	0,70	0,86	-	0,96
C18:2n6 (*cis*-9, *cis*-12)	-	0,41	-	-	0,61
C18:3n3 (all *cis*-9, 12, 15)	-	0,27	0,15	-	0,87
C18:2 (*cis*-9, *trans*-11; CLA)	-	0,80	0,59	-	0,78
SFA	0,51-0,74	0,77	0,91	0,99	0,98
MUFA	0,27-0,57	0,69	0,89	-	0,97
PUFA	0,08-0,41	0,22	0,65	-	0,59
TFA	0,03-0,33	-	0,75	-	0,80
SCFA	0,11-0,37	-	-	0,95	-
MCFA	0,05-0,14	-	-	0,96	-

* S2006 = SOYEURT et al., 2006; MK byly vyjádřeny v g/100 g tuku; C2010 = COPPA et al., 2010; MK byly stanoveny metodou NIRS (near-infrared reflectance spektroskopy) a vyjádřeny v g/100 g MK; M2013 = MAURICE-VAN EIJNNDHOVEN et al., 2013; g/dl mléka; F2014 = FERRAND-CALMELS et al., 2014; g/100 g MK;

R^2 = (korelační koeficient r_{xy})^2; CLA = konjugovaná kyselina linolová; SFA = nasycené MK; MUFA = mononenasycené MK; PUFA = polynenasycené MK; TFA = *trans* isomery nenasycených MK; SCFA = MK s krátkým uhlíkovým řetězcem; MCFA = MK se středním uhlíkovým řetězcem.

Lze shrnout, že při porovnání těsnosti dosažených vztahů výsledků stanovení MK a jejich skupin mezi metodou přímou a nepřímou s literárními prameny existuje sice vyšší variabilita celkem, i uvnitř porovnávaných entit (MK a jejich skupin), nicméně, ve velké většině případů se jedná o vztahy statisticky významné. Proto jsou většinou dané kalibrační modely použitelné, někdy za specifikovaných podmínek dodatečného ošetření výsledků, pro rutinní analýzy spektra MK mléčného tuku pro praktické použití výsledků.

VI) Závěry ze studia

Byly ověřeny poměrně patřičně věrohodné možnosti dosahování výsledků stanovení profilu MK nepřímou rutinní metodou MIR-FT pro praktické využití. Tyto výsledky umožnily formou certifikované metodiky pro rutinní mléčné laboratoře formulovat požadavky na:

- A) postup a provádění praktické průběžné validace těchto nepřímých metod MIR-FT pro určení MK mléka a jejich výsledků;

- B) sestavování validačních sad vzorků mléka pro kontrolu věrohodnosti výsledků MK metodu MIR-FT;

- C) interpretace výsledků MK mléčného tuku prostřednictvím metody MIR-FT.

4) Závěr certifikované metodiky

Certifikovaná uplatněná metodika je zaměřena na objasnění provádění: postupu přípravy validační referenční sady vzorků; postupu ověření kalibrace nepřímé instrumentální metody MIR-FT pro analýzy obsahu MK v mléce. Certifikovaná uplatněná metodika podává informace o konkrétním návrhu a metodě efektivnějšího postupu řízení a kontroly analytické práce v mlékařství. Jsou popsány interpretace k navrženým postupům i dosaženým výsledkům.

Referenční a nepřímé stanovení MK mléčného tuku

Při vývoji této metodiky byl profil MK mléčného tuku stanoven metodou plynové chromatografie (GC), parametry této analýzy jsou uvedeny výše.

Jako nepřímá metoda, která byla podrobena validaci kalibrace za uvedených podmínek, byla použita metoda MIR-FT (mid infrared, středová infračervená spektroskopie celého IR spektra s Michelsonovým interferometrem a s Fourierovými transformacemi) v technickém provedení MilkoScan FT 6000 (M–Sc; Foss Electric, Dánsko). S přístroji se pracovalo podle návodu výrobce.

Doporučení pro pravidelnou validaci kalibrace nepřímého stanovení profilu MK

A)

- Bezprostředně po přípravě se provede transport sady referenčních vzorků z centrální referenční laboratoře do rutinních laboratoří s dobou dodání do 24 hod. (spěšná vlaková zásilka). Vzorky se rozpipetují do čistých vzorkovnic o potřebném objemu pro přístroj. Konzervační prostředek, bronopol (2-bróm, 2-nitro, 1, 3 propandiol), je připraven ve vzorkovnicích (microtabs DF Control Systems) s koncentrací účinné látky ve vzorku od 0,2 do 0,4 %, u všech vzorků stejně (tableta na 25 až 50 ml mléka). Činidlo musí být šetrným mícháním rozpuštěno – mírné překlápění vzorkovnic. Efekt konzervace je eliminován v kalibraci stejným použitím konzervačního činidla pro měření rutinních vzorků mléka.

- Vzorky se vychladí na 6 až 8 °C (cca 3 až 6 hodin), vloží do termoboxu s chladicími vložkami a transportují šetrně při teplotě do 10 °C.

- Transport vzorků referenční sady musí být co nejšetrnější s ohledem na čas, teplotu, mechanické namáhání. Bylo doloženo experimentálně, podle časového transportního gradientu teplotní křivky, že praktikovaný systém přepravy je použitelný (SOJKOVÁ et al., 2009).

- Doporučuje se kontrolovat kalibraci MIR-FT jedenkrát ročně až jedenkrát za 2 roky referenčním postupem GC.

Statistické vyhodnocení validace kalibrace

K vyhodnocení výsledků validace kalibrace nepřímé metody (MIR-FT) byly a budou využívány, vedle určení průměrných diferencí (nepřímá metoda – referenční hodnoty), především korelační koeficienty a koeficienty determinace (lineární regresní analýza – základní metoda kalibrace mléčných analyzátorů (BAUMGARTNER, 2006; Příloha 1) vztahu výsledků relevantních metod.

B)

Doporučuje se provést výběr sady validačních vzorků kalibrace následujícím způsobem:

- počet vzorků mléka ve validační sadě minimálně 40;

- polovina vzorků bazénových, polovina vzorků individuálních pro zajištění potřebné variability MK;

- polovina vzorků z každé skupiny (bazénové a individuální) od plemene CF a polovina od plemene H v podmínkách ČR;

- referenční sada vzorků obsahuje minimálně 2/3 v individuálních vzorcích mléka z první poloviny laktace;

- zajistit cca ¼ vzorků původem od zvířat s přikrmením zelené píce v objemné složce krmné dávky (především ve skupině bazénové vzorky mléka, možnost i v individuálních);

- proto se doporučuje provádět validaci kalibrace v letním krmném období, nejlépe červen až srpen;

- doporučuje se zahrnout chovy dojnic s průměrnou dojivostí, tedy mezi 6 500 až 8 000 kg mléka za laktaci;

- nezáleží, zda jsou individuální vzorky z večerního, ranního nebo celodenního nádoje.

C)

Pro interpretaci výsledků MK v mléce:

- pro MK a skupiny MK s malým průměrným rozdílem a vyšší determinací výsledků MIR-FT k referenční metodě (GC) – přebírat výsledky MK MIR-FT přímo jako prakticky věrohodné;

- pro MK a skupiny MK s větším průměrným rozdílem a vyšší determinací výsledků MIR-FT k referenční metodě (GC) – podmíněně přebírat výsledky MK MIR-FT jako prakticky věrohodné po přepočtu výsledků MIR-FT na GC podle regresních rovnic v příloze 2;

- pro MK a skupiny MK s malým průměrným rozdílem a nižší determinací výsledků MIR-FT k referenční metodě (GC) – podmíněně přebírat výsledky MK MIR-FT jako prakticky věrohodné po přepočtu výsledků MIR-FT na GC podle regresních rovnic v příloze 2;

- pro MK a skupiny MK s větším průměrným rozdílem a nižší determinací výsledků MIR-FT k referenční metodě (GC) – nepřebírat výsledky MK MIR-FT jako prakticky věrohodné.

III) Srovnání „novosti postupů" a předání certifikované metodiky: Validace a doporučení ke kalibraci nepřímé metody infračervené spektroskopie pro stanovení profilu mastných kyselin mléčného tuku:

- vyvinutá certifikovaná metodika byla předána do užívání systému kontroly kvality mléka ČR v elektronické i písemné formě 8. 9. 2017 (ČMSCH);

- jedná se o nový postup kalibrace, validace kalibrace, měření a rozšíření spektra stanovovaných analytů v laboratořích kontroly kvality mléka. Tato skutečnost je doložena přiloženými vlastními publikovanými výsledky. Uvedené postupy reference jsou v laboratořích používány krátce, právě v souvislosti s vývojem metodiky a uvedené postupy kontroly měření nebyly doposud v konkrétních laboratořích používány.

IV) Popis uplatnění certifikované metodiky - Závěr - Kontrola uplatnění certifikované metodiky:

- kontrola existence a aplikace certifikované uplatněné metodiky jako pracovního postupu pro adjustaci a validaci měření profilu MK (a jejich skupin) mléčného tuku metodou MIR-FT v mléčných laboratořích je proveditelná prostřednictvím revize dokladů a dokumentů o prováděných pracovních postupech a výsledcích při kalibracích a kontrole infraanalyzátorů v Laboratoři rozborů mléka v Buštěhradu, tedy na pracovišti klienta, především ČMSCH a.s.;

- certifikovaná uplatněná metodika obsahuje technicko-organizační doporučení, opatření a postupy v systému QA/QC (quality assurance/quality control, zajištění a řízení kvality) k řešení referenčně-rutinních systémů analytických laboratoří k testaci kvality syrového mléka a pro zvýšení věrohodnosti výsledků;

- certifikovaná uplatněná metodika byla zpracována v šesti exemplářích a předána v kroužkové vazbě na příslušná pracoviště.

V) Ekonomické aspekty

Ekonomický dopad může být součástí neoficiální kontroly kvality mléka (MK) pro vybrané lokality s cílnou selekcí suroviny pro výrobu specifických mléčných potravin. Tím může spotřebitelsky pozitivně modifikovat (předpoklad některých zdravotních benefitů) část mléčného potravinového řetězce. To lze účinně realizovat pouze na základě spolehlivých výsledků o vlastnostech mléka. Postup podporuje tuto spolehlivost výsledků (profil MK mléčného tuku) kontroly kvality syrového mléka pro účely potravinové specifity nebo možné kontroly zdraví dojnic (energetické hospodaření ve vztahu k dojivosti, reprodukci a ketózám (kyselina olejová)). Na bázi zajištění potravinové kvality může tvořit podíl do 0,3 % z efektu ve smyslu podílu kontroly kvality a objektivity výběru suroviny. Objem možných ekonomických ztrát, v případě absence takového postupu, je ovšem obtížné vyčíslit konkrétněji. Na úrovni státu může přínos z cílené selekce suroviny a posílení kvality, činit částky v řádu statisíců až milionů ročně.

Náklady na konkrétní zavedení postupu uvedeného v metodice mohou pro uživatele činit ročně, podle kvalifikovaného odhadu, celkem cca 50 tis. Kč (náklady na servisní sestavení validační sady kalibrace pro laboratoře kontroly kvality mléka a kontroly mléčné užitkovosti a ověření těsnosti vztahů výsledků nepřímých analýz MK k referenčním výsledkům). Přínos pro uživatele (mléčné laboratoře kontroly kvality a užitkovosti) v podobě udržení rozsahu analýz produkce mléka a

kontroly jeho kvality a kontroly dojivosti a zdravotního stavu může být odhadnut na 380 tis. Kč tržeb ročně s možností opakování efektu po rocích.

VI) Seznam použité související literatury

5) Použité jiné literární prameny při tvorbě certifikované metodiky

ARAZI, A.- PINSKI, N.- SCHCOLNIK, T.- AIZINBUD, E.- KATZ, G.- MALTZ, E.: Innovations arising from applied research on a new on-line milk analyzer and a behavior meter. New Trends for Innovation in the Mediterranean Animal Production. Vol. 129. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, 2012, 34-43.

ASHES, J. A.- GULATI, S. K.- SCOTT, T. W.: Potential to alter the content and composition of milk fat through nutrition. Journal of Dairy Science, 80, 9, 1997, 2204-2212.

BARLOWSKA, J.- SZWAJKOWSKA, M.- LITWIŃCZUK, Z.- KRÓL, J.: Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 10, 6, 2011, 291-302.

BAUMAN, D. E.- MATHER, I. H.- WALL, R. J.- LOCK, A. L.: Major advances associated with the biosynthesis of milk. Journal of Dairy Science, 89, 4, 2006, 1235-1243.

BAUMGARTNER, C.: Reference system – Principle and practice. In: Proceeddings of the 35th biennial session of ICAR, EAAP publication No. 121, Breeding, production recording, health and the evaluation of farm animals, Kuopio, Finland, 2006, 309. *www.proagria.fi/icar2006*.

BIJGAART VAN DEN, H.: New applications of mid-infra-red spectrometry for the analysis of milk and milk products. 2. Free fatty acids. IDF Bulletin, 406, 2006, 22-28.

BULLETIN IDF (2010): Bulletin of the International Dairy Federation No. 447/2010: New Applications of Mid Infra-Red Spectrometry for the Analysis of Milk and Milk Products.

COPPA, M.- FERLAY, A.- LEROUX, CH.- JESTIN, M.- CHILLIARD, Y.- MARTIN, B.- ANDUEZA, D.: Prediction of milk fatty acid composition by near infrared reflectance spectroscopy. International Dairy Journal, 20, 3, 2010, 182-189.

COPPA, M.- FERLAY, A.- CHASSAING, C.- AGABRIEL, C.- GLASSER, F.- CHILLIARD, Y.- BORREANI, G.- BARCAROLO, R.- BAARS, T.- KUSCHE, D.- HARSTAD, O. M.- VERBIČ, J.- GOLECKÝ, J.- MARTIN, B.: Prediction of bulk milk fatty acid composition based on farming practices collected through on-farm surveys. Journal of Dairy Science, 96, 7, 2013, 4179-4211.

COUVREUR, S.- HURTAUD, C.- LOPEZ, C.- DELABY, L.- PEYRAUD, J. L.: The linear relationship between the proportion of fresh grass in the cow diet, milk fatty acid composition, and butter properties. Journal of Dairy Science, 89, 6, 2006, 1956-1969.

ČSN 57 0530 (1973). Metody zkoušení mléka a tekutých mléčných výrobků. Český normalizační institut, Praha.

ČSN 57 0536 (1999). Stanovení složení mléka infračerveným absorpčním analyzátorem. Český normalizační institut, Praha.

ČSN EN ISO/IEC 17025 (2005). Posuzování shody - Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří. Český normalizační institut, Praha.

ČSN EN ISO 13366–1 (57 0531) (1998). Mléko - Stanovení počtu somatických buněk - Část 1: Mikroskopická metoda. Český normalizační institut, Praha.

ČSN EN ISO 13366–2 (57 0531) (2007). Mléko - Stanovení počtu somatických buněk - Část 2: Návod pro ovládání fluoro-opto-elektronického přístroje. Český normalizační institut, Praha.

ČSN ISO 8196-1 (570536) (2016): Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 1: Analytické atributy alternativních metod. Český normalizační institut, Praha.

ČSN ISO 8196-2 (570536) (2016): Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 2: Kalibrace a řízení kvality v laboratoři při

analýzách mléka alternativními metodami. Český normalizační institut, Praha.
ČSN ISO 8196-3 (570536) (2016): Mléko - Definice a vyhodnocení celkové přesnosti alternativních metod pro analýzu mléka - Část 3: Protokol pro hodnocení a validaci alternativních metod pro analýzu mléka. Český normalizační institut, Praha.
DOSTÁLOVÁ, J.- HRUBÝ, S.- TUREK, B.: Společnost pro výživu. Konečné znění Výživových doporučení pro obyvatelstvo ČR. [online]. 2009. Dostupné na www: *http://www.vyzivaspol.cz/rubrika-dokumenty/konecne-zneni-vyzivovych-doporuceni.html*
DRIFT VAN DER, S. G. K.- JORRITSMA, R.- SCHONEWILLE, J. T.- KNIJN, H. M.- STEGEMAN, J. A: Routine detection of hyperketonemia in dairy cows using Fourier transform infrared spectroscopy analysis of β-hydroxybutyrate and acetone in milk in combination with test-day information. Journal of Dairy Science, 95, 9, 2012, 4886-4898.
DURKIN, J.: AfiLab the Tool for Ketosis. 2012
http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=29&ved=0CHUQFjAIOBQ&url=http%3A%2F%2Fwww.oabp.ca%2FMembers%2FContinuing%2520Education%2F2012%2FFall%2FDurkin%2520-2520AfiLab_The%2520tool%2520for%2520ketosis.ppt&ei=aOApU724EYnOygP-44GACg&usg=AFQjCNGwmfxF31mSSZqKOp0_aCHuqOKnzA&bvm=bv.62922401,d.bGQ
DVORAK, L.- MLCEK, J.- SUSTOVA, K.: Comparison of FT-NIR Spectroscopy and ELISA for Detection of Adulteration of Goat Cheeses with Cow's Milk. Journal of AOAC International, 99, 1, 2016, 180-186.
ELLIS, K. A.- INNOCENT, G.- GROWE-WHITE, D.- CRIPPS, P.- MCLEAN, W. G.- HOWARD, C. W.- MIHM, M.: Comparing the fatty acid composition of organic and conventional milk. Journal of Dairy Science, 89, 2006, 1938-1950.
FERRAND-CALMES, M.- PALHIERE, I.- BROCHARD, M.- LERAY, O.- ASTRUC, J. M.- AUREL, M. R.- BARBEY, S.- BOUVIER F.- BRUNSCHWIG, P.- CAILLATT, H.- DOUGUET, M.- FAUCON-LAHALLE, F.- GELE, M.- THOMAS, G.- TROMMENSCHLAGER, J. M.- LARROQUE, H.: Prediction of fatty acid profiles in cow, ewe, and goat milk by mid-infrared spectrometry. Journal of Dairy Science, 97, 2014, 17-35.
FERRAND, M.- HUQUET, B.- BARBEY, S.- BARILLET, F.- FAUCON, F.- LARROQUE H.- LERAY, O.- TROMMENSCHLAGER, J. M.- BROCHARD, M.: Determination of fatty acid profile in cow's milk using mid-infrared spectrometry: Interest of applying a variable selection by genetic algorithms before a PLS regression. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 106, 2011, 183-189.
FOSS, Application Note 64: Milkoscan™ FT+ Fatty Acid Prediction Models. 35 pp.
GONZALEZ, S.- DUNCAN, S. E.- O'KEEFE, S. F.- SUMNER, S. S.- HERBEIN, J. H.: Oxidation and textural characteristics of butter and ice cream with modified fatty acid profiles. Journal of Dairy Science, 86, 1, 2003, 70-77.
GONZALEZ-MARTIN, I.- HERNANDEZ-HIERRO, J. M.- SALVADOR-ESTEBAN, J.- GONZALEZ-PEREZ, C.- REVILLA, I.- VIVAR-QUINTANA, A.: Discrimination of seasonality in cheeses by near-infrared technology. Journal of the Science of Food and Agriculture, 91, 2011, 1064-1069.
HULOVÁ, I.- DOŠLÍK, V.- ŠKROBÁK, F.- LANDOVÁ, H.- SUCHÁ, S.- KOPEČEK, P.: Innovation in agriculture - Agroječmínek Ltd. Result report. Reg. n. 13/018/11120/672/000599, 2014, 14.
CHEN, S.- BOBE, G.- ZIMMERMAN, S.- HAMMOND, E. G.- LUHMAN, C. M.- BOYLSTON, T. D.- FREEMAN, A. E.- BEITZ, D. C.: Physical and sensory properties of dairy products from cows with various milk fatty acid compositions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 11, 2004, 3422-3428.
ISHAY, E.- LEMBERSKIY KUZIN, L.- KATZ, G.- PINSKI, N.: Calibration, monitoring and control approach for multi-devices system performing analysis in rough environment. S.A.E. Afikim. 2011 *http://www.icar.org/Documents/Bourg-en-Bresse2011/Presentations/session%204%20-%2023%20am/3%20Lembersky%20Kusini.pdf*
JANKOVSKÁ, R.- ŠUSTOVÁ, K. Analysis of cow milk by near-infrared spectroscopy. Czech

Journal of Food Science, 21, 4, 2003, 123-128.
JENKINS, T. C.- MCGUIRE, M. A.: Major advances in nutrition: impact on milk composition. Journal of Dairy Science, 89, 4, 2006, 1302-1310.
JENSEN, R. G.: The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. Journal of Dairy Science, 85, 2002, 295-350.
KAMPHUIS, C.- PIETERSMA, D.- VAN DER TOL, R. P. P.- WIEDEMANN, M.- HOGEVEEN, H.: Using sensor data patterns from an automatic milking system to develop predictive variables for classifying clinical mastitis and abnormal milk. Computers and Electronics in Agriculture, 62, 2, 2008, 169-181.
KANIYAMATTAM, K.- DE VRIES, A.: Agreement between milk fat, protein, and lactose observations collected from the Dairy Herd Improvement Association (DHIA) and a real-time milk analyzer. Journal of Dairy Science, 97, 5, 2014, 2896-2908.
KARP, H. J.- PETERSSON WOLFE, C.: Use of milk lactose concentration as an indicator of mastitis following the validation of a novel in-line milk analysis system designed to measure milk components. The first North American conference on precision dairy management, 2010, 1-2.
KATZ, G.: Milk Analyzer. Real Time Measuring of Milk Components. 2. Patented in Europe and pended in USA. June 2nd, – *AfiLab™*. 2007, *http://www.icar.org/Documents/Verona_Presentations/SAE_Afikim_Katz.pdf*
KATZ, G.- PINSKI, N.: *AfiLab™*. *A new approach to perform analysis* of milk components incorporating statistical methods adapted in a real time sensor. 2008 *https://www.google.cz/?gfe_rd=cr&ei=iKnSVuG9IOOg8wfwiKroDA&gws_rd=ssl#q=AfiLab+A+new+approach+to+perform+analysis+Gil+Katz*
KAWASAKI, M.- KAWAMURA, S.- TSUKAHARA, M.- MORITA, S.- KOMIYA, M.- NATSUGA, M.: Near-infrared spectroscopic sensing system for online milk quality assessment in a milking robot. Computers and Electronics in Agriculture, 63, 1, 2008, 22-27.
KAY, J. K.- THOMSON, N. A.: Pasture, fish oil and sunflower oil: The perfect combination for healthier milk. Australian Journal of Dairy Technology, 58, 2, 2003, 193.
KAYLEGIAN, K. E.- DWYER, D. A.- LYNCH, J. M.- BAUMAN, D. E.- FLEMING, J. R.- BARBANO, D. M.: Impact of fatty acid composition on the accuracy of mid-infrared fat analysis of farm milks. Journal of Dairy Science, 92, 6, 2009, 2502-2513.
KAYLEGIAN, K. E.- LINDSAY, R. C.: Handbook of Milkfat Fractionation Technology and Applications. Champaign, Illinois: AOCS Press, 1995. 657. ISBN 0-935315-57-8.
KRAMER, J. K. G.- PARODI, P. W.- JENSEN, R. G.- MOSSOBA, M. M.- YURAWECZ, M. P.- ADLOF, R. O.: Rumenic acid: a proposed common name for the major conjugated linoleic acid isomer found in natural products. Lipids, 33, 8, 1998, 835.
KUKAČKOVÁ, O.- ČURDA, L.- JINDŘICH, J.: Multivariate calibration of raw cow milk using NIR spectroscopy. Czech Journal of Food Science, 18, 1, 2000, 1-4.
MAURICE-VAN EIJNDHOVEN, M. H. T.- SOYEURT, H.. DEHARENG, F.- CALUS, M. P. L.: Validation of fatty acid predictions in milk using mid-infrared spectrometry across cattle breeds. Animal, 7, 2013, 348-354.
MLCEK, J.- DVORAK, L.- SUSTOVA, K.- SZWEDZIAK, K.: Accuracy of the FT-NIR Method in Evaluating the Fat Content of Milk Using Calibration Models Developed for the Reference Methods According to Röse-Gottlieb and Gerber. Journal of AOAC International, 99, 5, 2016, 1305-1309.
MLČEK, J.- ROP, O.- DOHNAL, V.- ŠUSTOVÁ, K.: Application of near infrared spectroscopy to estimate selected free amino acids and soluble nitrogen during cheese ripening. Acta Veterinaria Brno, 80, 2011, 293-297.
MLČEK, J.- ŠUSTOVÁ, K.- ROP, O.- JURÍKOVÁ, T.- HUMPOLÍČEK, P.- BALLA, Š.: Rapid assessment of selected free amino acids during Edam cheese ripening by near infrared spectroscopy. Acta Veterinaria Brno, 82, 2013, 191-196.

PARODI, P. W.: Milk fat in human nutrition. Australian Journal of Dairy Technology, 59, 1, 2004, 3-59.
PEŠEK, M.- SAMKOVÁ, E.- ŠPIČKA, J.: Fatty acids and composition of their important groups in milk fat of Czech Pied cattle. Czech Journal of Animal Science, 51, 5, 2006, 181-188.
PIPEROVA, L. S.- MOALLEM, U.- TETER, B. B.- SAMPUGNA, J.- YURAWECZ, M. P. et al.: Changes in milk fat in response to dietary supplementation with calcium salts of trans-18:1 or conjugated linoleic fatty acids in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science, 2004, 87 (11): 3836-3844.
PIVA, G.- FUSCONI, G.- PRANDINI, A.- CAPRI, E.: Composizione acidica del grasso del latte: fattori di variabilita in aziende dell'area padana. Scienza e Tecnica Lattiero Casearia, 44, 5, 1993, 309-323.
PRECHT, D.- MOLKENTIN, J.: Frequency distributions of conjugated linoleic acid and trans fatty acids contents in European bovine milk fats. Milchwisseschaft, 55, 12, 2000, 687-691.
RAMASWAMY, N.- BAER, R. J.- SCHINGOETHE, D. J.- HIPPEN, A. R.: Composition and flavor of milk and butter from cows fed fish oil, extruded soybeans, or their combination. Journal of Dairy Science, 84, 10, 2001, 2144-2151.
REIS, M. G.- DOS REIS, M. M.- LEATH, S.- STELWAGEN, K.: Direct analysis of fatty acid profile from milk by thermochemolysis gas chromatogramy mass spectrometry. Journal of Chromatography, A 1218, 2011, 316-323.
SELBERG, K. T.- LOWE, A. C.- STAPLES, C. R.- LUCHINI, N. D.- BADINGA, L.: Production and metabolic responses of periparturient Holstein cows to dietary conjugated linoleic acid and trans-octadecenoic acids. Journal of Dairy Science, 87, 1, 2004, 158-168.
SOYEURT, H.- DARDENNE, P.- DEHARENG, F.- LOGNAY, G.- VESELKO, D.- MARLIER, M.- BERTOZZI, C.- MAYERES, P.- GENGLER, N.: Estimating fatty acid content in cow milk using mid-infrared spectrometry. Journal of Dairy Science, 89, 9, 2006, 3690-3695.
STEFANOV, I.- BAETEN, V.- ABBAS, O.- COLMAN, E.- VLAEMINCK, B.- DE BAETS, B.- FIEVEZ, V.: Determining milk isolated and conjugated trans-unsaturated fatty acids using Fourier transform Raman spectroscopy. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 2011, 12771-12783.
ŠUSTOVÁ, K.- RŮŽIČKOVÁ, J.- KUCHTÍK, J.: Application of FT near spectroscopy for determination of true protein and casein in milk. Czech Journal of Animal Science, 52, 9, 2007, 284-291.
TSENKOVA, R.- ATANASSOVA, S.- ITOH, K.- OZAKI, Y.- TOYODA, K.: Near infrared spectroscopy for biomonitoring: Cow milk composition measurement in a spectral region from 1,100 to 2,400 nanometers. Journal of Animal Science, 78, 2000, 515-522.
TSENKOVA, R.- ATANASSOVA, S.- TOYODA, K.- OZAKI, Y.- ITOH, K.- FEARN, T.: Near-infrared spectroscopy for dairy management: Measurement of unhomogenized milk composition. Journal of Dairy Science, 82, 1999, 2344-2351.
VELÍŠEK, J.: Chemie potravin 1, 2, 3. 1.vyd. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-2-8.
WOJCIECHOWSKI, K. L.- BARBANO, D. M.: Prediction of fatty acid chain length and unsaturation of milk fat by mid-infrared milk analysis. Journal of Dairy Science, 99, 2016, 8561-8570.

VII) Seznam publikací, které předcházely metodice

6) Použité vlastní výsledky a publikace při návrhu a validaci certifikované metodiky

Publikace:

GENČUROVÁ, V.- HANUŠ, O.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Tvorba a vývoj kalibračního modelu pro nepřímé stanovení volných mastných kyselin mléčného tuku a metody přípravy

referenčních vzorků. Creation and development of the calibration model for the indirect determination of milk fat free fatty acids and the method of a reference sample preparation. (In Czech) Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, LIII, 193, 1, ISSN 0139-7265, 2011, 10-20.

HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- HERING, P.- KLIMEŠ, M.: Quality assurance of protein analyses in the Czech milk recording system. In Focus, 30, 1, 2006, 16-18.

HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- JANŮ, L.: Empirické argumenty k podpoře měsíčního intervalu pro kalibrace rutinních mléčných analyzátorů a zlepšení kontroly kvality mlékařské analytické práce. Empirical arguments to support of month calibration interval for calibration of routine milk analysators and improvement of control of dairy analytical work quality. (In Czech) Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, L, 181, 1, 2008, ISSN 0139-7265, 59-62.

HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- JANŮ, L.- JEDELSKÁ, R.: Rámcové představení hlavních prvků systému QA u chemických a fyzikálních metod v referenčních a rutinních laboratořích pro analýzy kvality syrového mléka v ČR. A framework performance of main elements of QA system of chemical and physical methods in reference and routine laboratories for raw milk quality analyses in the CR. (In Czech) Sborník přednášek, 2 THETA Analytical standards and equipment, Zajištění kvality analytických výsledků, ISBN: 978-80-86380-37-7, Komorní Lhotka, 2007, 33-50.

HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- JANŮ, L.- MACEK, A.- HERING, P.- KLIMEŠ, M.- ZAJÍČKOVÁ, I.: Zajištění kvality výsledků analýz složení mléka modifikacemi testů laboratorní způsobilosti. The analytical result quality assurance at milk composition determination by modifications of laboratory proficiency tests. Výzkum v chovu skotu, XLVIII, 173, ISSN 0139-7265, 1, 2006, 1-19.

HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- JANŮ, L.- MACEK, A.- KLIMEŠ, M.- HERING, P.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: Vyhlazení driftů křivek kalibračních hladin IR-analýzy syrového kravského mléka během sezóny a odhady jejich adekvátního kolísání a optimální délky kalibračního intervalu – retrospektivní studie. The tabulation of the curve drifts of the calibration levels at the infrared raw cow milk analyse during season and estimations of their adequate fluctuation and optimal period of the calibration interval – a retrospective study. Výzkum v chovu skotu, XLVIII, 176, ISSN 0139-7265, 4, 2006, 1-9.

HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- JANŮ, L.- MACEK, A.- KLIMEŠ, M.- HERING, P.- ZAJÍČKOVÁ, I.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- DOLÍNKOVÁ, A.: Komparativní studie vývoje a stavu systémů zajištění analytické kvality pro laboratoře při kontrole základního složení syrového kravského mléka v ČR. Comparative study of development and state of analytical quality assurance systems of laboratories at raw milk composition monitoring in the Czech Republic. Výzkum v chovu skotu, XLVII, 170, 2, 2005, 8-18.

HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- ŠTOLC, L.- KLÍMOVÁ, Z.- MOTYČKA, Z.- KOPECKÝ, J.: Validace a nejistoty měření koncentrace močoviny a bodu mrznutí mléka metodou infračervené spektroskopie (MIR-FT) pro laboratoře kvality mléka. Validation and uncertainties of urea concentration and milk freezing point measurement via infrared spectroscopy (MIR-FT) for laboratories of milk quality. (In Czech) Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, LI, 186, 2, ISSN 0139-7265, 2009, 40-53.

HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- MOTYČKA, Z. jun.- ČERNOCKÝ, M.: Interpretace výsledků experimentální kalibrace rutinních IR přístrojů pro měření látkového obsahu volných mastných kyselin (VMK) mléčného tuku. The interpretation of experimental calibration results of routine IR instruments for determination of free fatty acid contents of milk fat. (In Czech) Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, L, 182, 2, 2008, ISSN 0139-7265, 55-62.

HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- KOPEC, T.- YONG, T.- JANŮ, L.: Validation of modified milk reference sample in terms of its suitability for infra-red analysis calibration via evaluation of physical properties. Ověření modifikovaného referenčního vzorku mléka ve smyslu jeho

vhodnosti pro kalibraci infračervené analýzy pomocí hodnocení fyzikálních vlastností. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., ISSN 1211-8516, LVIII, 2, 2010, 101-110.

HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- ŘÍHA, J.- VYLETĚLOVÁ, M.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.- DOLÍNKOVÁ, A.: Specifika referenčních materiálů a výkonnostního testování způsobilosti výsledků u základních mlékařských analýz. Specificity of reference materials and results proficiency testing in basic milk analyses. (In Czech) In proceedings: Referenční materiály a mezilaboratorní porovnávání zkoušek III. Reference materials and interlaboratory investigation comparison III. Mezinárodní konference, 2 THETA Analytical standards and equipment, Medlov, 2008, ISBN: 978-80-86380-46-9, 53-78.

HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- SAMKOVÁ, E.- ROUBAL, P.- JEDELSKÁ, R.- DOLÍNKOVÁ, A.: Zajištění efektivní retrospektivní močovinové kalibrace moderní infračervené spektroskopie mléka MIR-FT. Assurance of effective retrospective urea calibration for modern milk MIR-FT infrared spectroscopy. (In Czech) Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, LIII, 194, 2, ISSN 0139-7265, 2011, 19-33.

HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- ŠTOLC, L.- HULOVÁ, I.- MOTYČKA, Z.- KLIMEŠ, M.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Zajištění kvality stanovení minoritních metabolicko-diagnostických složek mléka metodou infračervené spektroskopie (MIR a MIR-FT). Quality assurance of investigation of minority metabolic diagnostic milk components via method of infrared spectroscopy (MIR and MIR-FT). (In Czech) Sborník přednášek, 2 THETA Analytical standards and equipment, Zajištění kvality analytických výsledků, ISBN: 978-80-86380-49-0, Komorní Lhotka, 2009, 211-237.

HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- ŠTOLC, L.- KUČERA, J.- SOJKOVÁ, K.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.- DOLÍNKOVÁ, A.: Srovnání a vyhodnocení parametrů kalibrací metody infračervené spektroskopie (MIR a MIR-FT) podle výsledků referenčních metod pro složení kravského, kozího a ovčího mléka. A comparison and evaluation of calibration parameters of infrared spectroscopy method (MIR and MIR-FT) according to results of reference methods for cow, goat and sheep milk composition. (In Czech) Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, LI, 187, 3, ISSN 0139-7265, 2009, 51-59.

HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- YONG, T.- KUČERA, J.- ŠTOLC, L.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Reference and indirect instrumental determination of basic milk composition and somatic cell count in various species of mammals. Referenční a nepřímé přístrojové stanovení základního složení mléka a počtu somatických buněk u různých druhů savců. Scientia Agriculturae Bohemica, 40, 4, ISSN 1211-3174, 2009, 196-203.

HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- ZHANG, Y.- HERING, P.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- DOLÍNKOVÁ, A.- MOTYČKA, Z.: Milk acetone determination by the photometrical method after microdiffusion and via FT infra-red spectroscopy. Stanovení acetonu v mléce fotometricky po mikrodifůzi a pomocí infračervené spektroskopie FT. Journal of Agrobiology, 28, 1, ISSN 1803-4403, 2011, 33-48.

HANUŠ, O.- HERING, P.- FRELICH, J.- JÍLEK, M.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.: Reliability of results of milk urea analysis by various methods using artificial milk control samples. Czech Journal of Animal Science, 53, 4, ISSN 1212-1819, 2008, 152-161.

HANUŠ, O.- HERING, P.- GENČUROVÁ, V.- MOTYČKA, Z.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Validation of deep freezing of pilot samples for checking of time stability of indirect analyses of basic milk composition and for their long shelf-life. Validace hlubokého zamrazování pilotních vzorků pro kontrolu stability výsledků nepřímých analýz základního složení mléka a pro jejich dlouhodobou údržnost. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., ISSN 1211-8516, LVI, 5, 2008, 57-68.

HANUŠ, O.- HULOVÁ, I.- GENČUROVÁ, V.- ŠTOLC, L.- KUČERA, J.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- MOTYČKA, Z.: Interpretace výsledků pokusné kalibrace pro stanovení kyseliny citronové v mléce infračervenou spektroskopií (MIR-FT). Result interpretation of experimental calibration for milk citric acid determination via infra-red spectroscopy (MIR-FT). (In Czech)

Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., ISSN 1211-8516, LVII, 5, 2009, 87-101.

HANUŠ, O.- JANŮ, L.- GENČUROVÁ, V.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: Postup k omezení dopadu změny interferenčních vlivů při modifikaci složení mléka pro přípravu referenčních vzorků ke kalibraci infraanalýzy. The procedure for limitation of impact of interference effects at milk composition modification for reference sample preparation to infraanalyse calibration. (In Czech) Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, L, 182, 2, 2008, ISSN 0139-7265, 9-32.

HANUŠ, O.- JANŮ, L.- HERING, P.- KLIMEŠ, M.- MACEK, A.- GENČUROVÁ, V.- ZAJÍČKOVÁ, I.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.- DOLÍNKOVÁ, A.: Vývoj systému a komparativní studie diagnostických grafických prostředků pro redukci výskytu chybovosti výsledků při rutinních analýzách základního složení mléka. The development and comparative study of diagnostical and graphical tools for occurrence reduction of result errors at routine analyses of basic milk composition. Výzkum v chovu skotu, XLVII, 169, 1, 2005, 1-27.

HANUŠ, O.- JANŮ, L.- KLIMEŠ, M.- HERING, P.- ZAJÍČKOVÁ, I.- GENČUROVÁ, V.- MACEK, A.: Postupy odhadů a použití diskriminačních limitů pro hodnocení správnosti výsledků při testování mlékařských laboratoří. The estimation procedures and using of discrimination limits for result reliability evaluation at testing of milk laboratories. Výzkum v chovu skotu, XLVIII, 174, ISSN 0139-7265, 2, 2006, 1-17.

HANUŠ, O.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- ŠTOLC, L.- GENČUROVÁ, V.- SOJKOVÁ, K.- DOLÍNKOVÁ, A.: Výsledky NRL-SM v internacionálním testování analytické způsobilosti referenčních metod pro základní složení syrového kravského mléka. Results of NRL-RM in international proficiency testing of reference methods for basic composition of raw cow milk. (In Czech) Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, LI, 185, 1, ISSN 0139-7265, 2009, 32-38.

HANUŠ, O.- KUČERA, J.- GENČUROVÁ, V.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: Vybrané parametry validace metody MIR-FT k měření volných mastných kyselin v mléčném tuku pro laboratoře kvality mléka. Selected parameters of MIR-FT method validation to measurement of free fatty acids in milk fat for milk quality laboratories. (In Czech) Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, LI, 187, 3, ISSN 0139-7265, 2009, 27-34.

HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- ŘÍHA, J.- VYLETĚLOVÁ KLIMEŠOVÁ, M.- SAMKOVÁ, E.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Development in indirect infra-red determination of milk acetone. Vývoj v nepřímém infračerveném určení acetonu v mléce. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 62, 5, ISSN 1211-8516, 2014, 919-927.

HANUŠ, O.- ŘÍHA, J.- SAMKOVÁ, E.- LEDVINA, D.- CHLÁDEK, G.- KUČERA, J.- ROUBAL, P.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: A comparison of result reliability for investigation of milk composition by alternative analytical methods in Czech Republic. Srovnání věrohodnosti výsledků pro vyšetření složení mléka pomocí alternativních analytických metod v České republice. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 62, 5, ISSN 1211-8516, 2014, 929-937.

HANUŠ, O.- SAMKOVÁ, E.- ŘÍHA, J.- VYLETĚLOVÁ - KLIMEŠOVÁ, M.- ROUBAL, P.: Evaluation of development in indirect determination of milk fat free fatty acids in Czech Republic. Hodnocení vývoje v nepřímém stanovení volných mastných kyselin mléčného tuku v České republice. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., LXI, 6, ISSN 1211-8516, 2013, 1669-1679.

HANUŠ, O.- SAMKOVÁ, E.- ŠPIČKA, J.- HASOŇOVÁ, L.- KALA, R.- KLÍMOVÁ, Z.- KOPUNECZ, P.- KOPECKÝ, J.: Porovnání metod používaných při stanovení zastoupení zdravotně významných mastných kyselin mléčného tuku v bazénových vzorcích mléka dojnic. Comparison of methods used for the determination of the healthy important fatty acids of milk fat in bulk milk samples of dairy cows. Mlékařské listy - zpravodaj, 151, ISSN 1212-950X, 2015, XII-XV.

HANUŠ, O.- STÁDNÍK, L.- TOMÁŠKA, M.- KLIMEŠOVÁ, M.- HASOŇOVÁ, L.- FALTA, D.- KUČERA, J.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: The evaluation of real time milk analyse result reliability in the Czech Republic. Hodnocení věrohodnosti výsledků mléčných analýz v reálném čase v České republice. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 64, 4, ISSN 1211-8516, 2016,

1155-1166.
HANUŠ, O.- VYLETĚLOVÁ, M.- LANDOVÁ, H.- GENČUROVÁ, V.- KOPECKÝ, J.: Provedení efektivní retrospektivní kalibrace moderní infračervené spektroskopie MIR a MIR-FT na měření bodu mrznutí mléka. Performance of effective retrospective calibration of modern MIR and MIR-FT infrared spectroscopy on milk freezing point depression measurement. (In Czech) Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, LIII, 195, 3, ISSN 0139-7265, 2011, 17-31.
HANUŠ, O.- YONG, T.- KUČERA, J.- GENČUROVÁ, V.- HANUŠOVÁ, K.- KOPEC, T.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: Analýza výsledků kalibrací pro stanovení kaseinu nepřímou metodou infračervené spektroskopie. Analysis of calibration results for casein determination via indirect method of infrared spectroscopy. (In Czech) Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., ISSN 1211-8516, LVIII, 5, 2010, 123-136.
HERING, P.- HANUŠ, O.- FRELICH, J.- PYTLOUN, J.- MACEK, A.- JANŮ, L.- KOPECKÝ, J.: Relationships between the results of various methods of urea analysis in native and enriched milk. Czech Journal of Animal Science, 53, 2, ISSN 1212-1819, 2008, 64-76.
KALAČ, P.- SAMKOVÁ, E.: The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. Czech Journal of Animal Science, 55, 12, 2010, 521-537.
PECOVÁ, L.- HANUŠ, O.- HASOŇOVÁ, L.- SAMKOVÁ, E.- STÁDNÍK, L.- KUČERA, J.- TRÁVNÍČEK, J.- ROUBAL, P.-KLIMEŠOVÁ, M.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: Evaluation of the result reliability of basic milk composition in an automated milking system through indirect real-time analysis. Hodnocení věrohodnosti výsledků základního složení mléka v automatickém dojicím systému prostřednictvím nepřímé metody real time analýzy. MendelNet, 2017.
PEŠEK, M.- SAMKOVÁ, E.- ŠPIČKA, J.: Fatty acids and composition of their important groups in milk fat of Czech Pied cattle. Czech Journal of Animal Science, 51, 5, 2006, 181-188.
ŘÍHA, J.- HANUŠ, O.- KLEINOVÁ, M.- KOPUNECZ, P.- ROUBAL, P.- KOLÁŘ, A.- KOPECKÝ, J.: Milk urea analytical result reliability and its methodical possibilities in the Czech Republic. Věrohodnost analytických výsledků mléčné močoviny a její metodické možnosti v České republice. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., LXI, 1, 2013, ISSN 1211-8516, 169-186.
SAMKOVÁ, E. et al. (CEMPÍRKOVÁ, R., HANUŠ, O., HASOŇOVÁ, L., HLAVÁČEK, J., JELEN, P., JEŘÁBKOVÁ, J., KOPÁČEK, J., LUŽOVÁ, T., NAVRÁTILOVÁ, P., SEYDLOVÁ, R., ŠUSTOVÁ, K., ŠPIČKA, J., VORLOVÁ, L., VYLETĚLOVÁ, M.): Mléko: produkce a kvalita. Milk: production and quality. Vědecká monografie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Tři kapitoly: SAMKOVÁ, E.- ŠPIČKA, J.- HANUŠ, O.: 5. Jakostní ukazatele mléka. 5.1. Mléčný tuk. 5. Milk quality indicators. 5.1. Milk fat. 61-76; HANUŠ, O.- VYLETĚLOVÁ, M.: 5. Jakostní ukazatele mléka. 5.11. Technologické vlastnosti mléka. 5. Milk quality indicators. 5.11. Milk technological properties. 168-177; HANUŠ, O.- VYLETĚLOVÁ, M.- JEŘÁBKOVÁ, J.: 6. Kontrola jakosti mléka. 6. Milk quality control. 178-203; ISBN: 978-80-7394-383-7, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2012, 240.
SAMKOVÁ, E.- HANUŠ, O.- ŠPIČKA, J.- KALA, R.- KOUBOVÁ, J.- SMETANA, P.- HASOŇOVÁ, L.- KŘÍŽOVÁ, Z.- KOPUNECZ, P.- KOPECKÝ, J.: Porovnání metod stanovení mastných kyselin v mléce. Comparison of methods for determination of milk fatty acids. Náš chov, LXXV, 9, ISSN 0027-8068, 2015, 74-76.
SAMKOVÁ, E.- PEŠEK, M.- ŠPIČKA, J.: Mastné kyseliny mléčného tuku skotu a faktory ovlivňující jejich zastoupení. Fatty acids of cow milk fat and factors affecting their composition. (In Czech) ISBN 978–80–7394–104–8. České Budějovice: JU ZF, 2008, 90.
SOJKOVÁ, K.- HANUŠ, O.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: Stanovení teplotního gradientu mezilaboratorního transportu vzorků mléka. Determination of thermogradient for interlaboratory milk sample transport. (In Czech) Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, LI, 187, 3, ISSN 0139-7265, 2009, 35-41.
SOJKOVÁ, K.- HANUŠ, O.- KUČERA, J.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Určení limitu přijatelnosti pro validační korelační koeficient jako parametr kvality kalibrace

infračervené spektroskopie (MIR) při měření základního složení kravského mléka. A determination of acceptability limit for validation correlation coefficient as calibration quality parameter of infrared spectroscopy (MIR) at measurement of basic cow milk composition. (In Czech) Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, LI, 188, 4, ISSN 0139-7265, 2009, 50-55.

Předchozí tématicky relevantní certifikované metodiky k problematice kalibrací nepřímých analytických metod v mlékařství:

HANUŠ, O.- GENČUROVÁ, V.- LANDOVÁ, H.- SOJKOVÁ, K.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.- DOLÍNKOVÁ, A.: Certifikovaná metodika MSM 2678846201 CM 11: Příprava referenčních vzorků, posouzení kvality kalibrace a výkonnostní testy stanovení kaseinu metodou infračervené spektroskopie FT v mléčných laboratořích. Datum certifikace 8. 12. 2010.

HANUŠ, O.- HERING, P.- JANŮ, L.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.- DOLÍNKOVÁ, A.: Uplatněná metodika MSM 2678846201 UM 1: Postup při adjustaci a kontrole různých metod stanovení koncentrace močoviny v mléce v mléčných laboratořích. Doložená smlouvou z 12. 12. 2006.

HANUŠ, O.- HULOVÁ, I.- GENČUROVÁ, V.- VYLETĚLOVÁ, M.- KOPECKÝ, J.- JEDELSKÁ, R.: Certifikovaná metodika MSM 2678846201 CM 10: Kalibrace metod MIR a MIR-FT v laboratořích kvality mléka za účelem měření koncentrace volných mastných kyselin (VMK) v mléčném tuku. Datum certifikace 30. 9. 2009.

HANUŠ, O.- JANŮ, L.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.: Uplatněná metodika QF 3019 UM 5: Příprava referenčního standardu pro kalibraci infraanalýzy mléka se sníženým obsahem hlavních komponent mléka jako dolními hodnotami kalibračních přímek a s vybalancovanou změnou interferenčního vlivu mléčné matrice. Doložená smlouvou z 11. 4. 2008.

HANUŠ, O.- JANŮ, L.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.- DOLÍNKOVÁ, A.: Uplatněná metodika QF 3019 UM 1: Adjustační principy a postupy – centrální adjustace rutinních měření chemických složek v mléčných laboratořích. Doložená smlouvou 12. 12. 2006.

HANUŠ, O.- JANŮ, L.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.- DOLÍNKOVÁ, A.: Uplatněná metodika QF 3019 UM 2: Principy a postupy výkonnostního testování analytické způsobilosti měření chemického složení v mléčných laboratořích. Doložená smlouvou z 12. 12. 2006.

HANUŠ, O.- JANŮ, L.- GENČUROVÁ, V.- JEDELSKÁ, R.- KOPECKÝ, J.- DOLÍNKOVÁ, A.: Uplatněná metodika QF 3019 UM 3: Grafická diagnostika (GRADIS 2003) a specifikace původu a charakteru výsledkových neshod chemických složek v mléčných laboratořích. Doložená smlouvou z 12. 3. 2007.

HANUŠ, O.- JEDELSKÁ, R.- GENČUROVÁ, V.- KOPECKÝ, J.- HERING, P.- MOTYČKA, Z.: Uplatněná metodika MSM 2678846201 UM 4: Postup hlubokého zamrazování pilotních vzorků pro kontrolu stability výsledků analýz složení mléka a jejich dlouhou expiraci. Datum certifikace 27. 9. 2010.

HANUŠ, O.- JEDELSKÁ, R.- GENČUROVÁ, V.- VYLETĚLOVÁ, M.- KOPECKÝ, J.- SOJKOVÁ, K.: Certifikovaná metodika MSM 2678846201 CM 7: Metodika validace a odhadu nejistoty výsledků měření u minoritních složek a vlastností mléka pro nepřímé metody MIR a MIR-FT v laboratořích kontroly užitkovosti a kvality mléka. Datum certifikace 30. 9. 2009.

HANUŠ, O.- JEDELSKÁ, R.- HULOVÁ, I.- VYLETĚLOVÁ, M.- KOPECKÝ, J.- GENČUROVÁ, V.- SOJKOVÁ, K.: Certifikovaná metodika MSM 2678846201 CM 6: Referenční materiál pro adjustaci určení kyseliny citrónové pomocí MIR-FT infraanalýzy mléka. Datum certifikace 30. 9. 2009.

HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- GENČUROVÁ, V.- ELICH, O.- KOPECKÝ, J.- HÖFER, J.: Certifikovaná metodika MSM 2678846201 MSM 2672286101 CM 20: Efektivní kalibrace techniky MIR-FT pro měření močoviny v mléčných laboratořích na bázi referenčních hodnot výkonnostních

testů. Datum certifikace 12. 12. 2011.

HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- VYLETĚLOVÁ, M.- ELICH, O.- JEDELSKÁ, R.- HÖFER, J.: Certifikovaná metodika MSM 2678846201 MSM 2672286101 CM 18: Příprava referenčních vzorků a posouzení kvality kalibrace pro stanovení ketonů jako acetonu metodou infračervené spektroskopie FT v mléčných laboratořích. Datum certifikace 13. 12. 2011.

HANUŠ, O.- ROUBAL, P.- VYLETĚLOVÁ, M.- ELICH, O.- KOPECKÝ, J.- HÖFER, J.- SNÁŠELOVÁ, J.- SEYDLOVÁ, R.: Certifikovaná metodika INGO LA 09030 CM 21: Efektivní kalibrace techniky MIR-FT pro screening hodnoty ekvivalentu bodu mrznutí mléka v mléčných laboratořích na bázi referenčních hodnot výkonnostních testů. Datum certifikace 28. 12. 2012.

Ne všechny práce ze seznamu literatury (5, 6), jejichž studium a poznatky byly využity při vývoji metodiky, jsou citovány explicitně v textu vlastní metodiky pro praxi. Jsou však pro úplnost uvedeny v seznamu výše.

Většina vlastních prací, použitá při tvorbě této certifikované metodiky, byla předtím již samostatně odborně oponována, jak plyne ze seznamu výše.

Afilace QJ1510336 RO1417 CM 35

Projekty a podpory rozvoje instituce (podíly): MZe NAZV KUS QJ1510336 (71 %), MZe RO1417 (29 %).

Oponenti CM: Ing. Václava Genčurová, Ph.D. (v oboru laktologie), Vápenka Vitošov, analytik specialista; MVDr. Jiří Hlaváček, Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy, odbor veterinární hygieny.

Autorský kolektiv (podíly): Eva Samková (15 %), Oto Hanuš (15 %), Jiří Špička (14 %), Marcela Klimešová (14 %), Lucie Hasoňová (7 %), Radoslava Jedelská (7 %), Jan Trávníček (7 %), Jaroslav Kopecký (7 %), Robert Kala (7 %), Ondřej Elich (7 %).

Přílohy, dokumenty a doklady:

technická řešení a postupy této certifikované metodiky byly zejména podpořeny výsledky vlastního výzkumu, vývoje a empirických poznatků, které byly publikovány.

Datum: 8. 9. 2017

Za zhotovitele:

doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.

.....

Certifikovaná metodika pro praxi byla podporována řešením projektů MZe NAZV KUS QJ1510336 a MZe RO1417.

7) Přílohové materiály s podklady pro vývoj certifikované metodiky

Přílohy této certifikované uplatněné metodiky (Validace a doporučení ke kalibraci nepřímé metody infračervené spektroskopie pro stanovení profilu MK mléčného tuku) tvoří vlastní výsledky vývoje a metodického testování, tzn. textové, tabulkové a grafické zpracování informací a statistických dat.

Přílohy:

Příloha 1: LineárníModelKalibraceZpůsobŽivotaMlékařství

Příloha 2: Regresní analýza

Abstrakty:

RIV

Certifikovaná metodika je zaměřena na validaci kalibrace stanovení mastných kyselin mléčného tuku metodou infračervené spektroskopie s Fourierovými transformacemi. Byly odebrány bazénové (BVM) a individuální vzorky (IVM) mléka (n = 60 a 345) v chovech (15 stád) dojnic plemene Holštýn a České strakaté za účelem porovnání dvou metod stanovení mastných kyselin (MK) – rutinní/nepřímá (pomocí infračervené spektroskopie – MIR-FT) a referenční/přímá (pomocí plynové chromatografie - GC). Těsnost vztahů mezi oběma metodami je významným ukazatelem kvality kalibrace. 51,4 a 85,2 % variability v hodnotách nasycených MK (SFA) a nenasycených MK (UFA) podle MIR-FT je vysvětlitelných variacemi v analýzách přímé referenční metody GC (BVM). Více jak 70 % variability v hodnotách nasycených MK a 86,2 % variability v hodnotách nenasycených MK podle nepřímé rutinní metody MIR-FT je vysvětlitelných variacemi v analýzách přímé referenční metody GC (IVM). Relativně shodné údaje a vyšší těsnosti vztahů byly zjištěny (BVM) u kyseliny palmitové (0,7517; P<0,001), SFA (0,7169; P<0,001) a UFA (0,9232; P<0,001). Výsledky naznačují, že řadu informací MIR-FT o výskytu MK lze využít pro rutinní stanovení těchto skupin MK a případnou praktickou selekci mléčné suroviny pro specifickou potravinářskou výrobu.

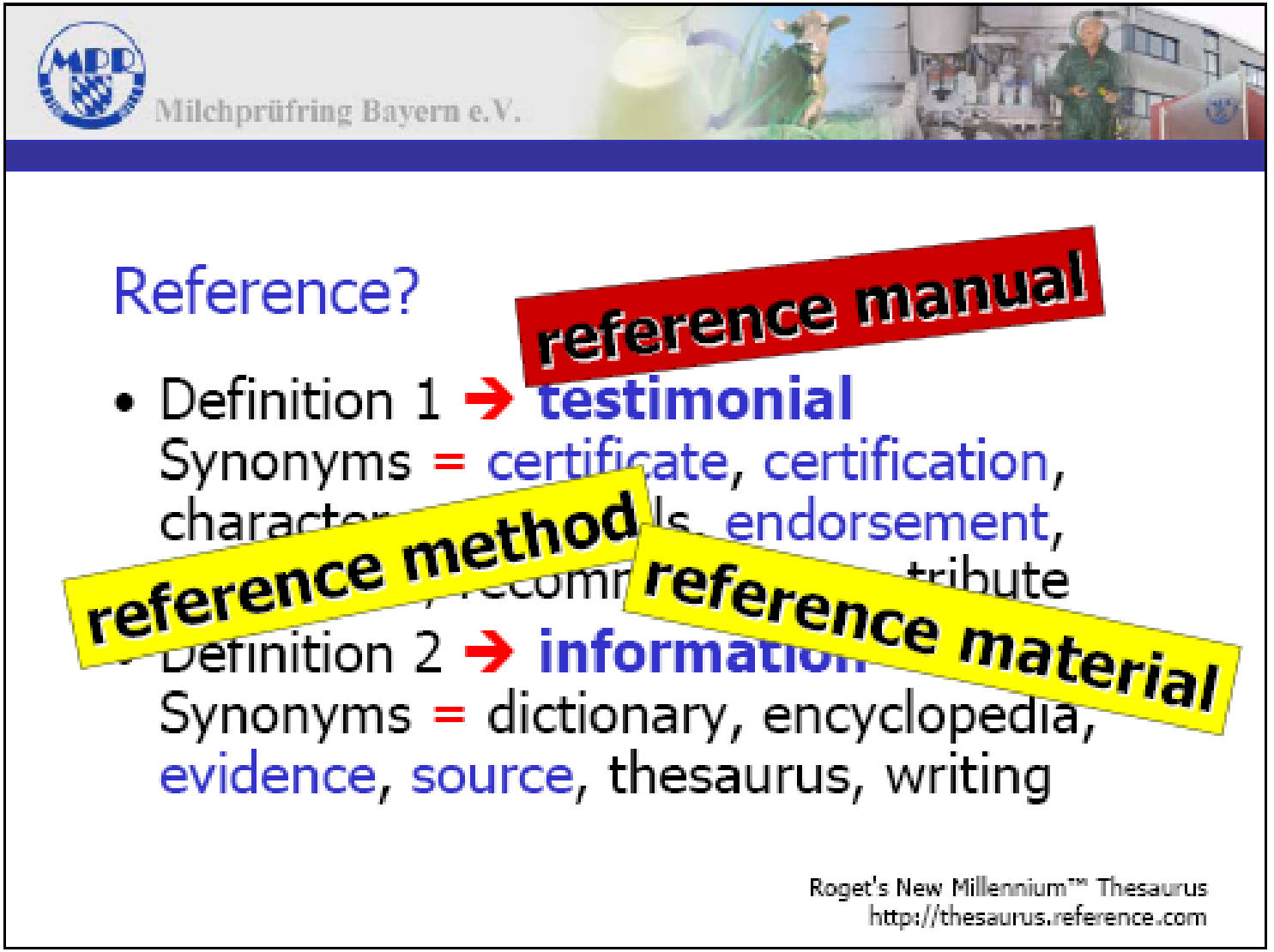
kráva, bazénový a individuální vzorek mléka, plynová chromatografie, infračervená spektroskopie, věrohodnost analytických výsledků, kalibrace, determinace, korelace

RIV

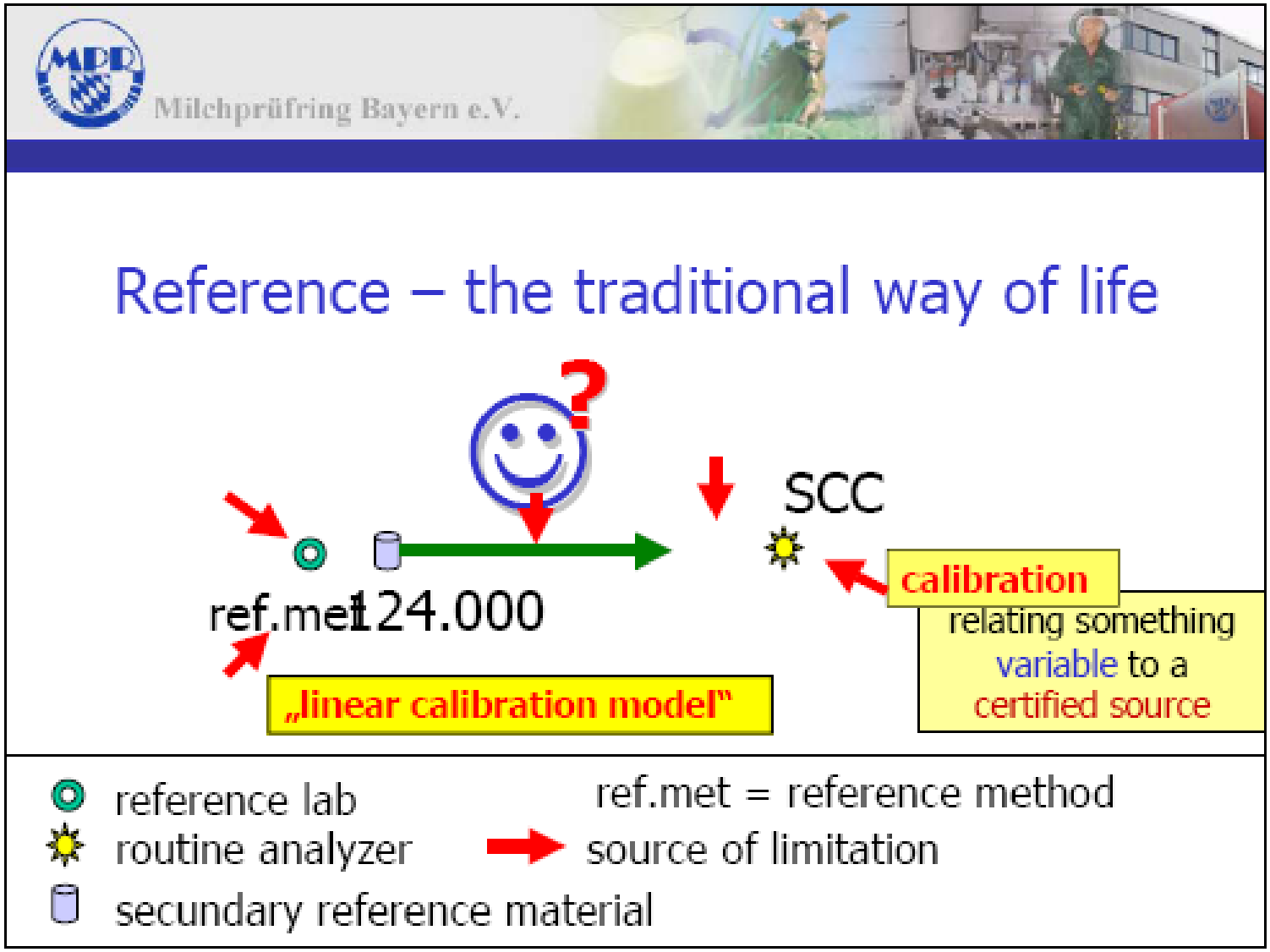
Certified method is focused on calibration validation for milk fat fatty acid determination by infrared spectroscopy with Fourier transformation. 60 and 345 bulk (BMSs) and individual milk samples (IMSs) were taken in 15 Holstein and Czech Fleckvieh dairy cow herds to compare two methods for the determination of fatty acids (FAs) - routine / indirect (by infrared (IR) spectroscopy – MIR-FT) and reference / direct (gas chromatography - GC). Tightness of relations between these two methods is important parameter of calibration quality. 51.4 and 85.2% of variability in saturated (SFAs) and unsaturated FAs UFAs(values by indirect method MIR-FT is explainable by variations in the analyses of direct reference method GC (BMSs). Over 70% of variability in saturated FAs values and 86.2% of variability in unsaturated FAs values by indirect method MIR-FT is explainable by variations in the analyses of direct reference method GC (IMSs). Relatively consistent data and higher tightness of relationships were found (BMSs) for palmitic acid (0.7517; P<0.001), SFAs (0.7169; P<0.001) and UFAs (0.9232, P<0.001). The results indicate that a row of MIR-FT information on the occurrence of FAs can be used for routine determination of such groups of FAs and possible practical selection of raw milk for the specific food production.

cow, bulk and individual milk sample, gas chromatography, infrared spectroscopy, analytical result reliability, calibration, determination, correlation

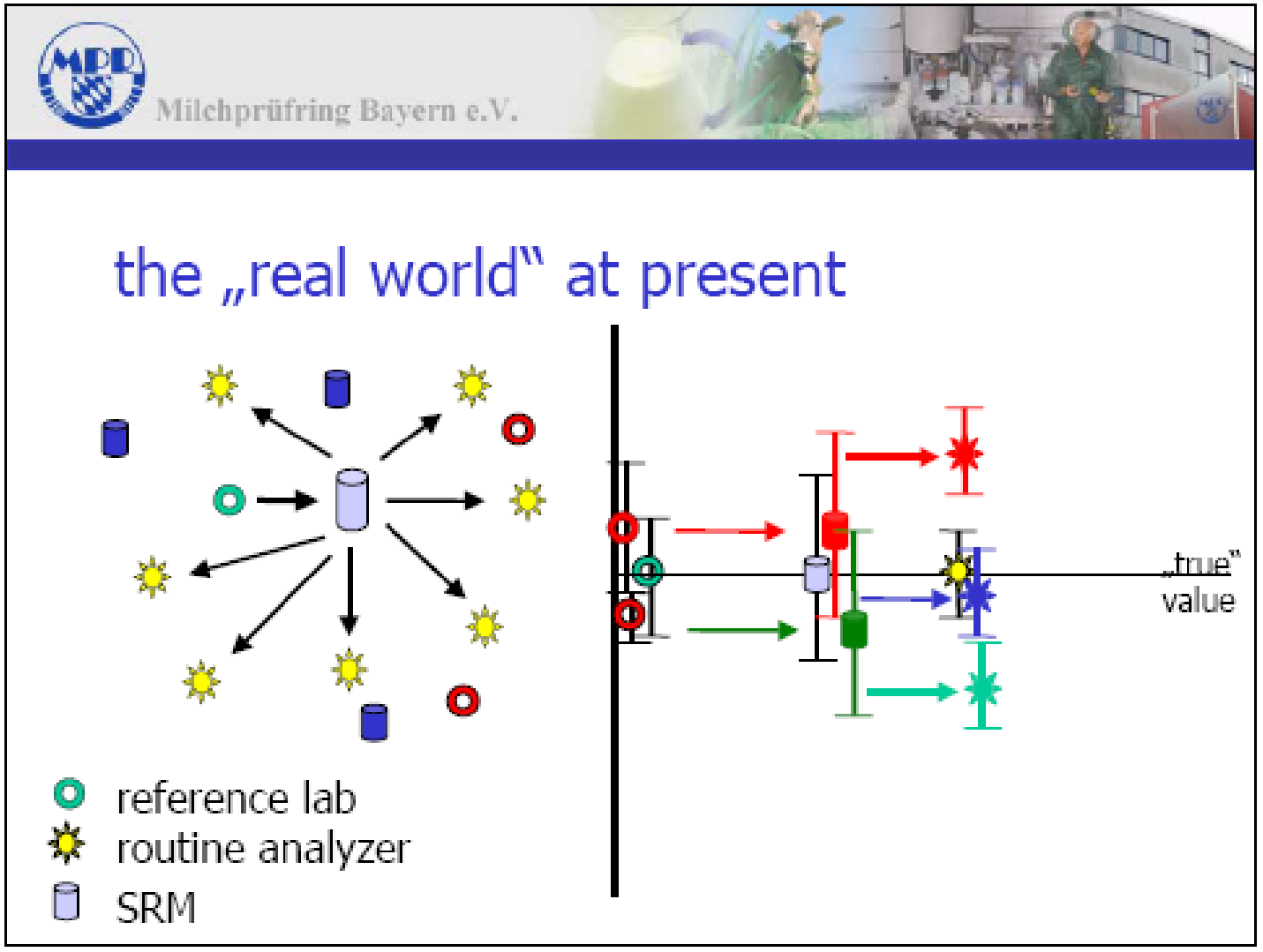
ICAR kongres Kuopio, Finsko; Baumgartner, 2006



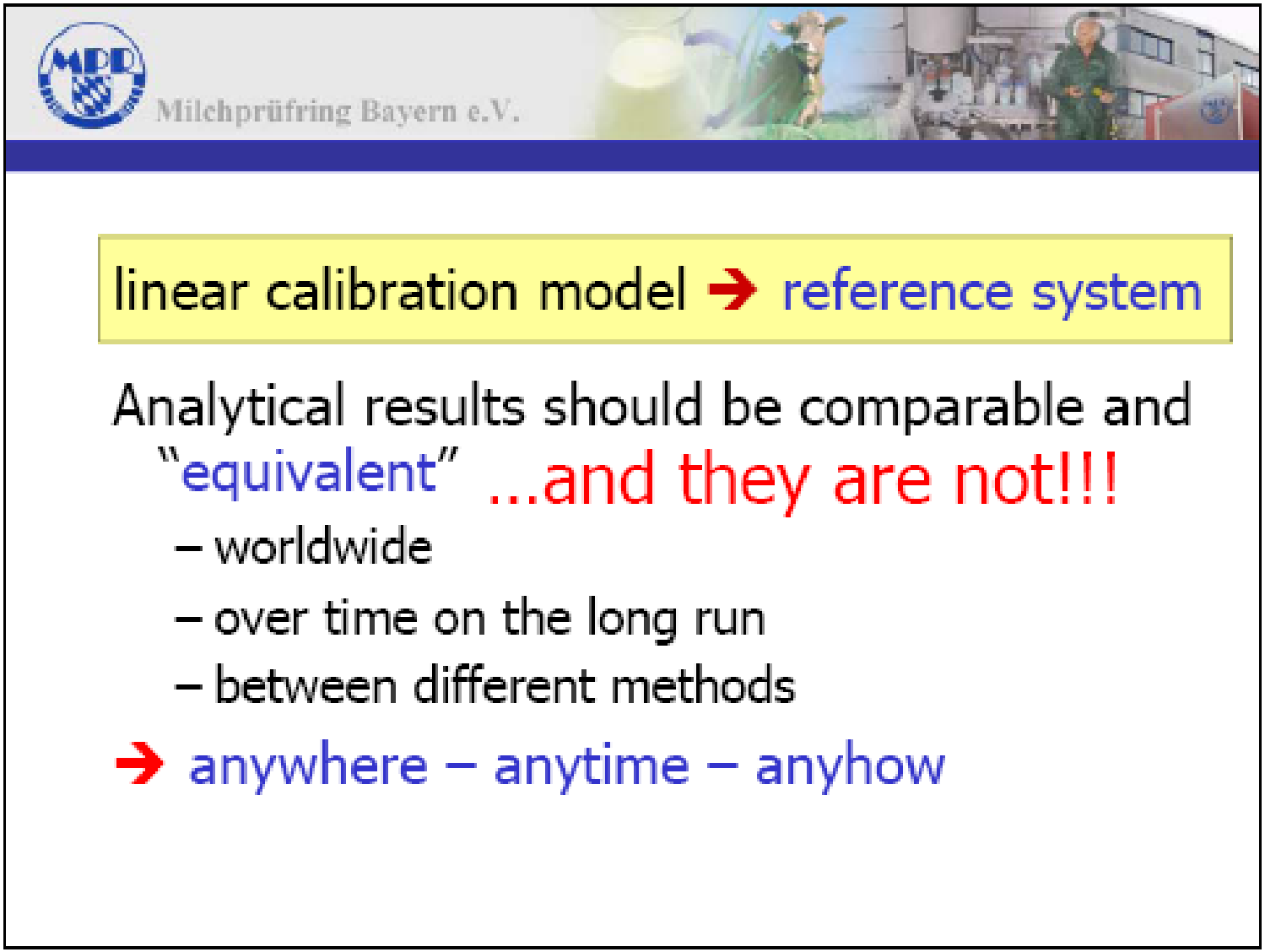
ICAR kongres Kuopio, Finsko; Baumgartner, 2006



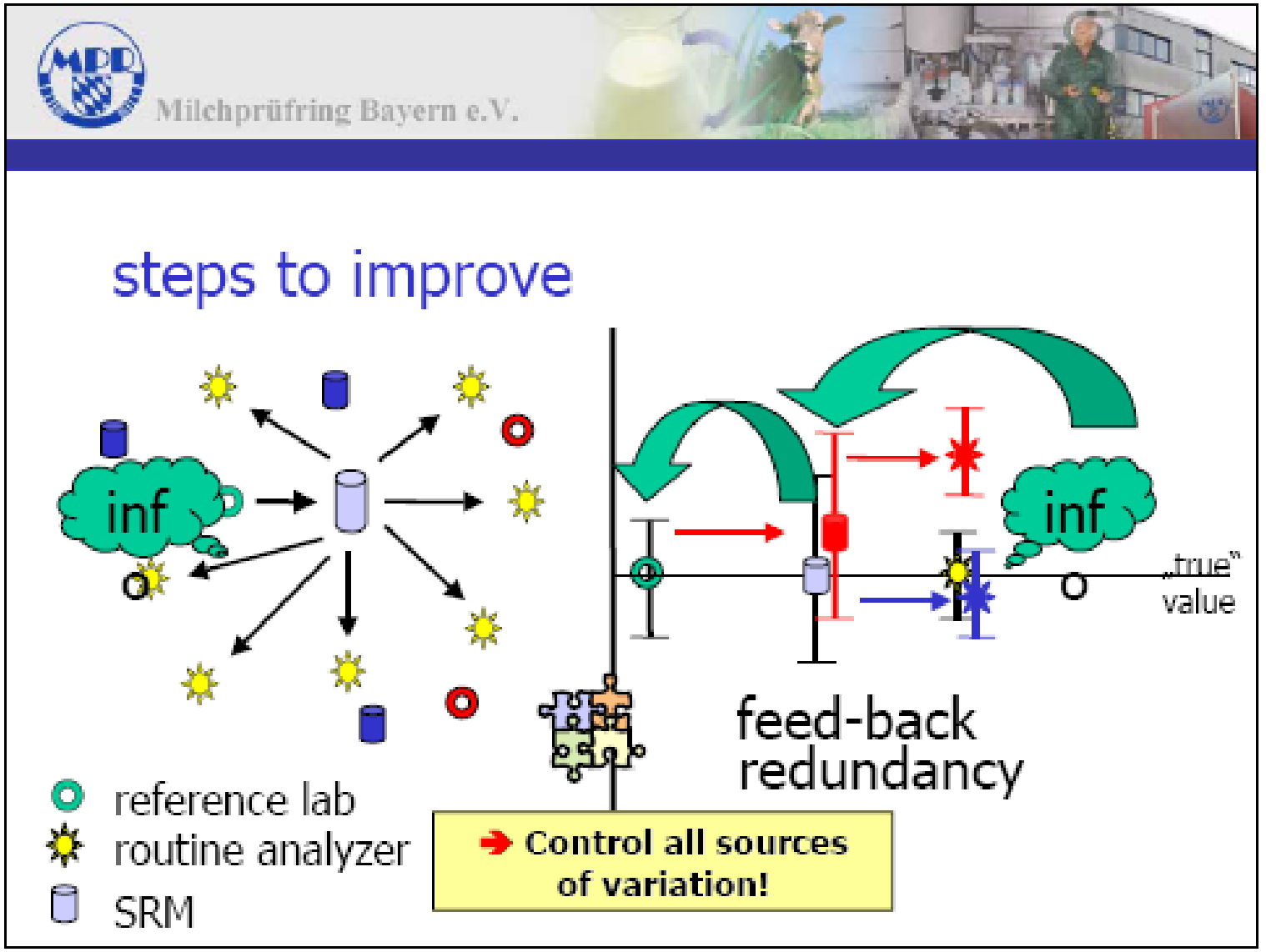
ICAR kongres Kuopio, Finsko; Baumgartner, 2006



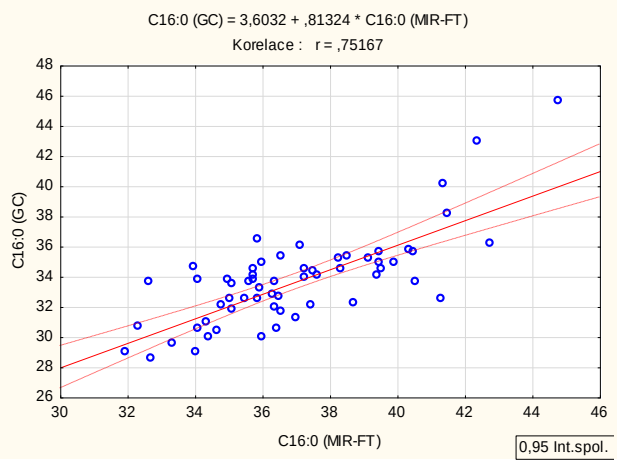
ICAR kongres Kuopio, Finsko; Baumgartner, 2006

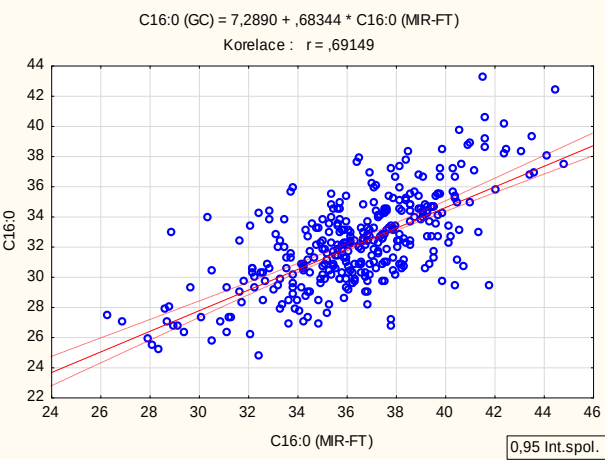


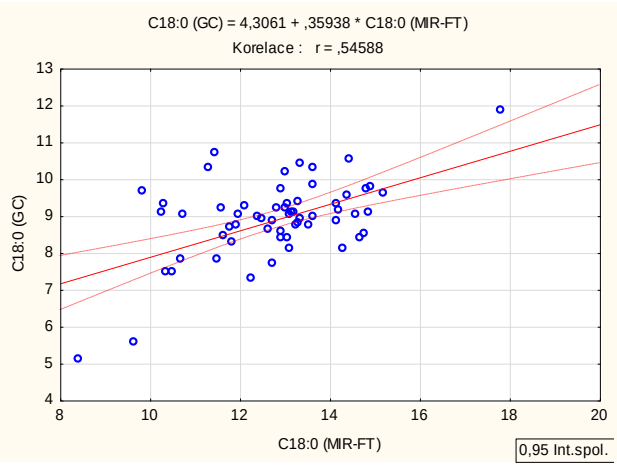
ICAR kongres Kuopio, Finsko; Baumgartner, 2006

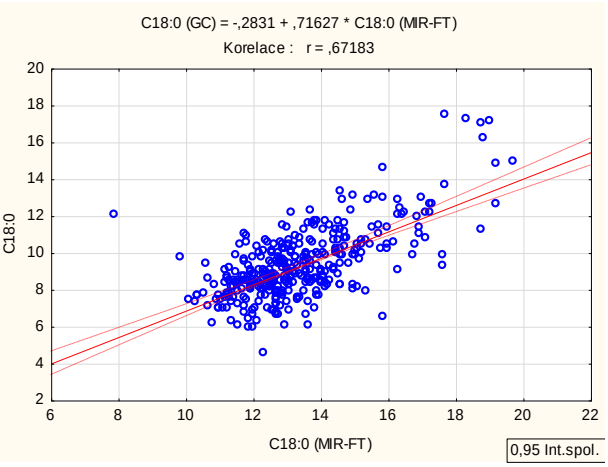


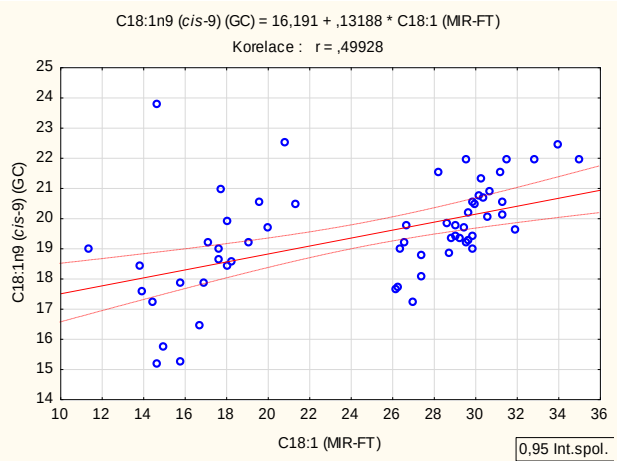
Příloha 2: Regresní analýza (vztahy mezi metodami MIR-FT a GC) u vybraných mastných kyselin a jejich skupin;
levý sloupec – ***bazénové vzorky*** mléka (n = 60),
pravý sloupec – ***individuální*** vzorky mléka (n = 345; TFA – 344, UFA – 121)

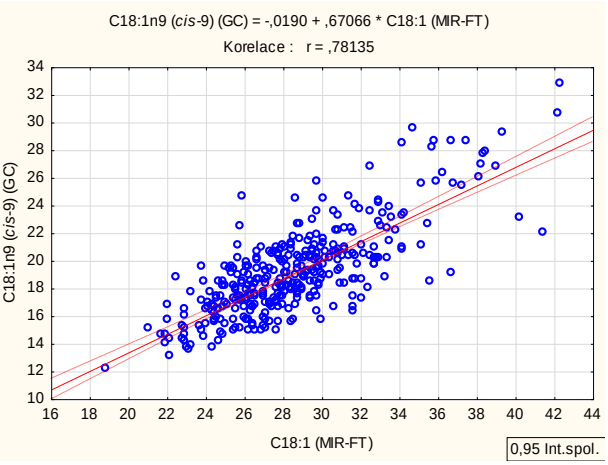




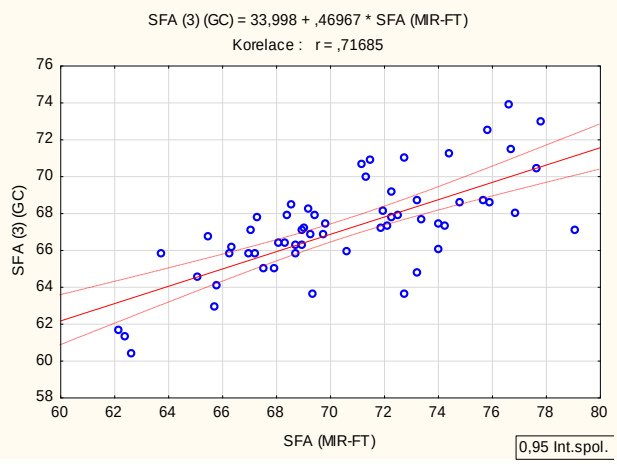


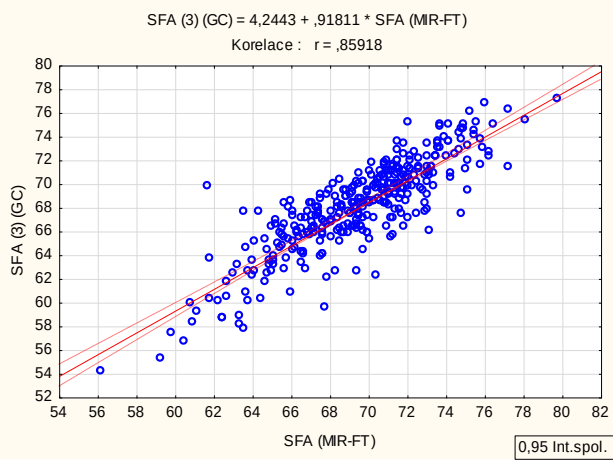


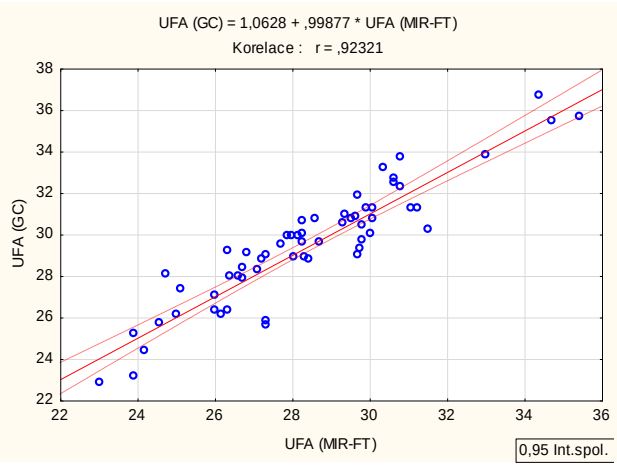


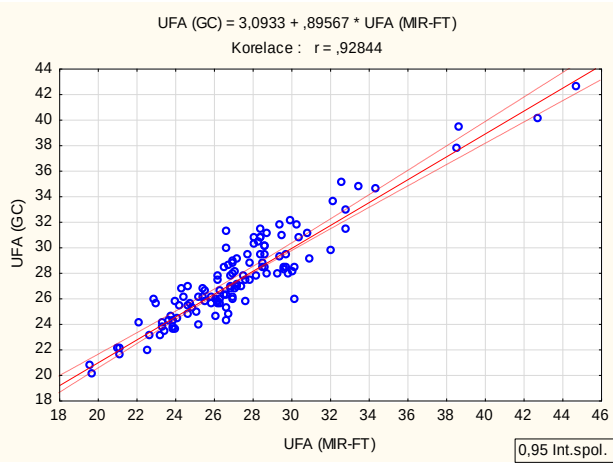


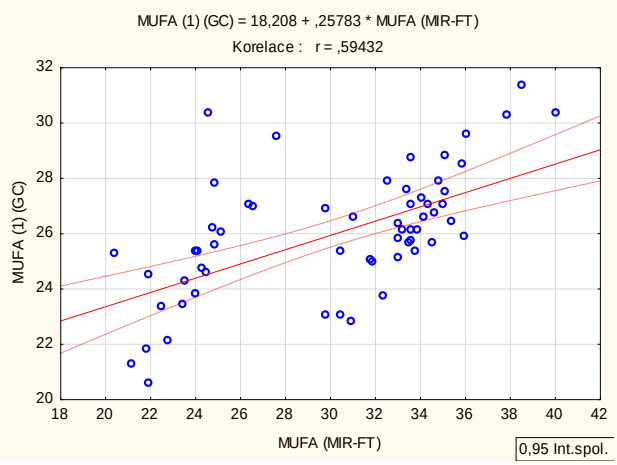
Příloha 2: Regresní analýza (vztahy mezi metodami MIR-FT a GC) u vybraných mastných kyselin a jejich skupin;
levý sloupec – ***bazénové vzorky*** mléka (n = 60),
pravý sloupec – ***individuální*** vzorky mléka (n = 345; TFA – 344, UFA – 121)

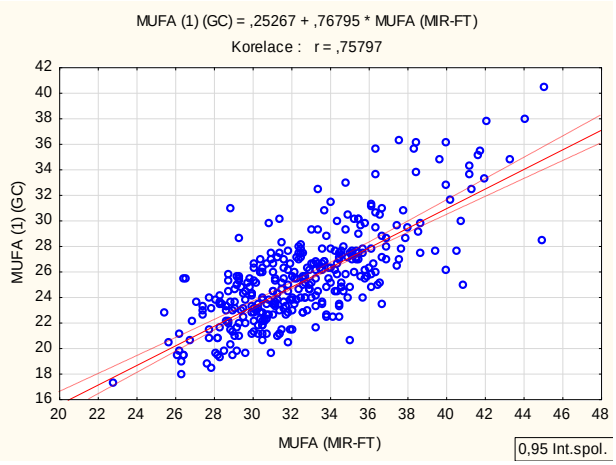




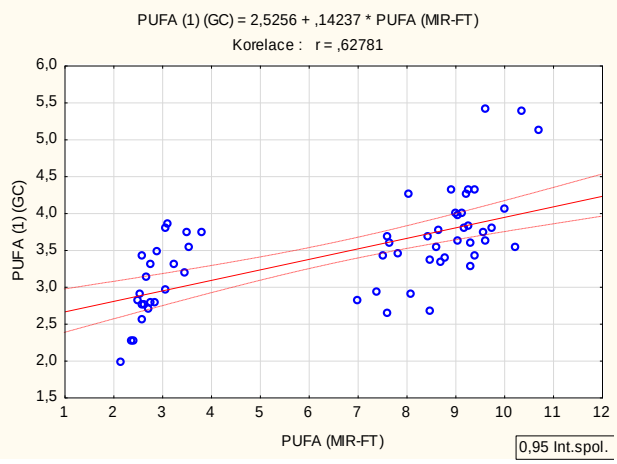


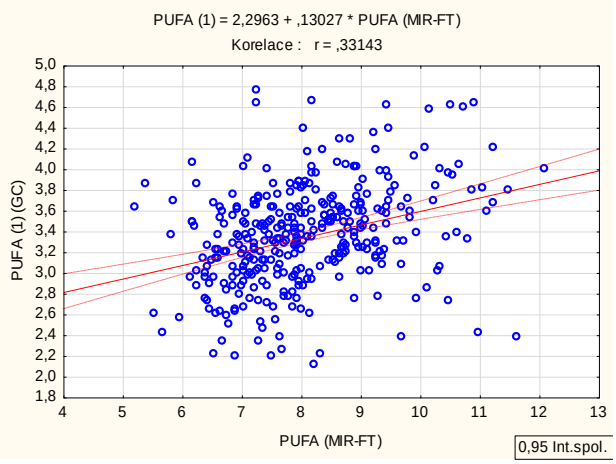


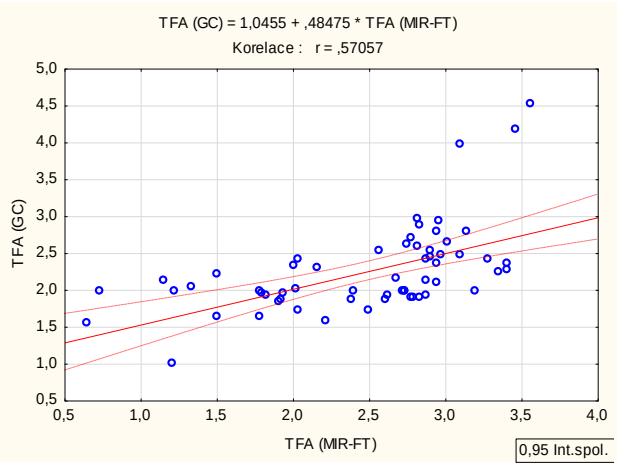


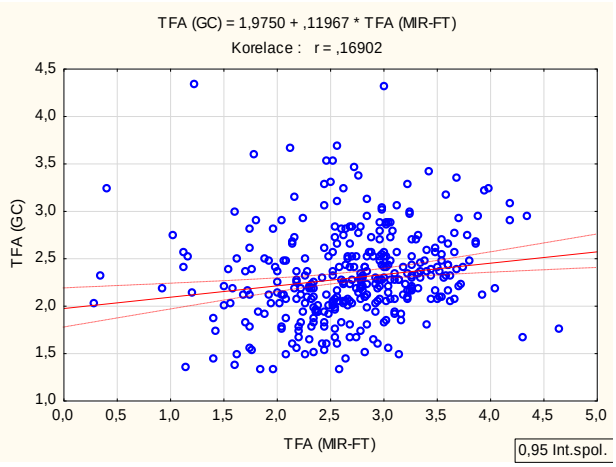


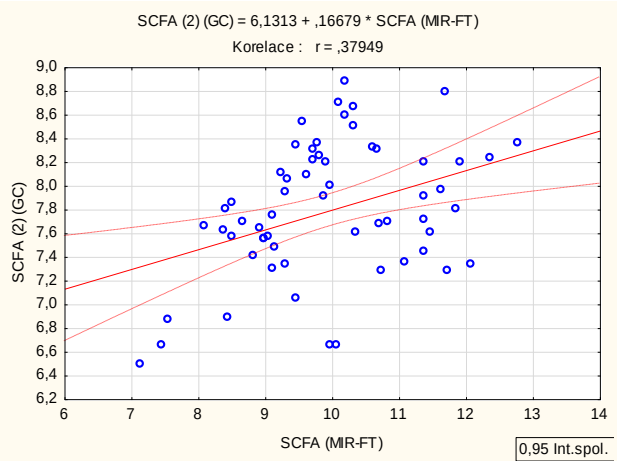
Příloha 2: Regresní analýza (vztahy mezi metodami MIR-FT a GC) u vybraných mastných kyselin a jejich skupin;
levý sloupec – ***bazénové vzorky*** mléka (n = 60),
pravý sloupec – ***individuální*** vzorky mléka (n = 345; TFA – 344, UFA – 121)

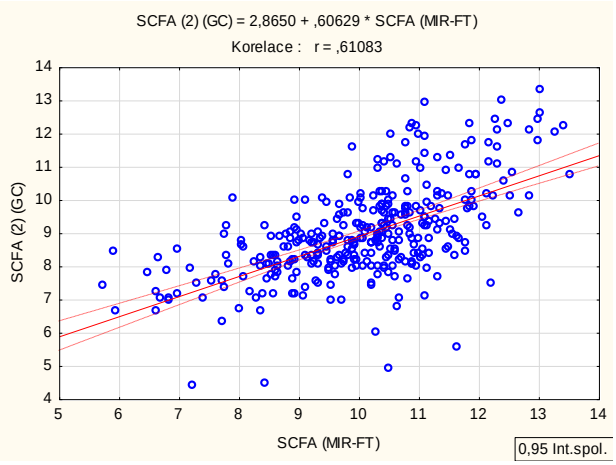
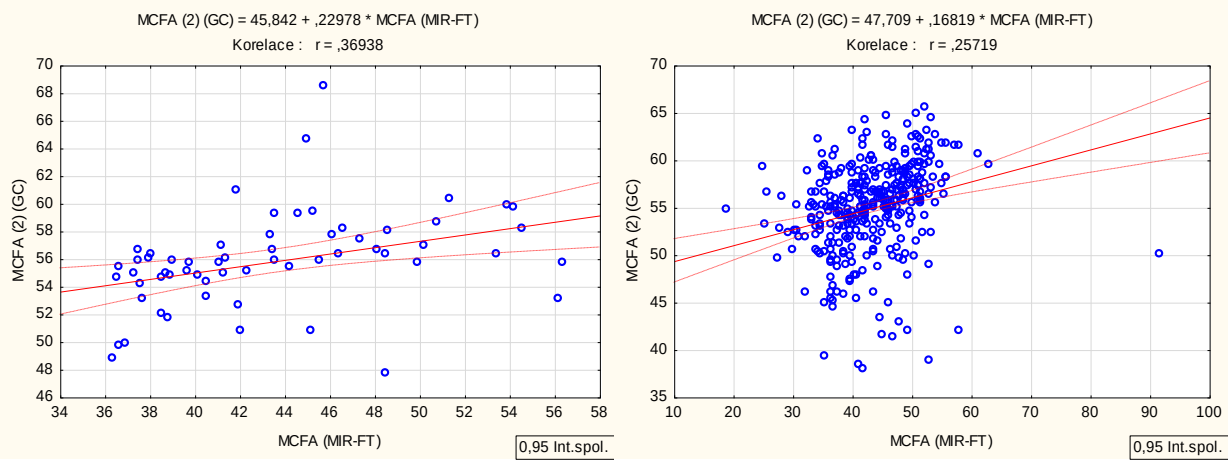
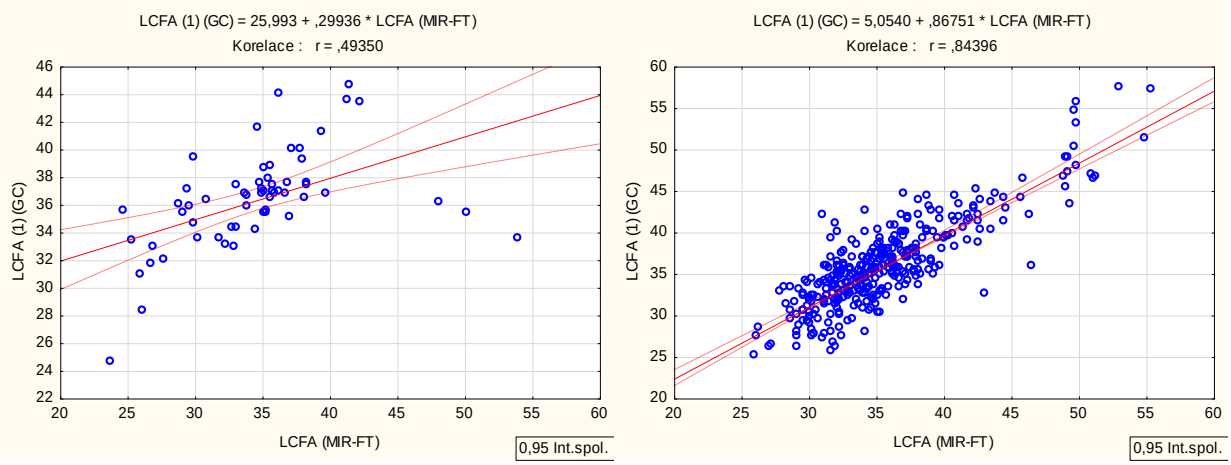












Příloha 2: Regresní analýza (vztahy mezi metodami MIR-FT a GC) u vybraných mastných kyselin a jejich skupin;
levý sloupec – ***bazénové vzorky*** mléka (n = 60),
pravý sloupec – ***individuální*** vzorky mléka (n = 345; TFA – 344, UFA – 121)