

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 the milk fat free fatty acids and the method of a reference sample preparation

Genčurová, V.¹ – Hanuš, O.² – Jedelská, R.¹ – Kopecký, J.²

¹ Výzkumný ústav pro chov skotu s.r.o.

² Agrovýzkum Rapotín s.r.o.

ABSTRACT

The content of free fatty acids (FFA) is an indicator of raw milk quality. Reference method of FFA determination is inappropriate for routine milk quality control. The aim of this study was evaluated the suitability of the different infrared analyzers (FTIR, IR) for analyses FFA. At first it is necessary to calibrate these instruments according to the results of a reference method. Set of milk samples for this purpose has to contain enough large range of FFA concentration. We prepare this range (0.56–6.13 mmol 100g⁻¹ fat) by mixing (mechanical stress) some samples and incorporating milk samples from the cows with malnutrition. The achieved results from three pilot calibrations show the possibility to use all tested instrument for screening milk samples with good quality, which are not damaged with lipolysis and the ability to differentiate them from milk with poor quality. Limit value for acceptability of calibration is 0.841 (P < 0.05).

Key words:

milk, free fatty acid, instrumental method, calibration

ABSTRAKT

Obsah volných mastných kyselin (VMK) mléčného tuku je ukazatelem kvality mléka. Referenční metody stanovení obsahu VMK jsou nevhodné pro rutinní kontrolu kvality mléka. Cílem této práce bylo určit vhodnost různých infraanalyzátorů (FTIR, IR) pro měření VMK. Nejprve bylo nezbytné nastavit tyto přístroje podle výsledků získaných referenčními metodami. Sada vzorků mléka pro tento účel musela mít dostatečně široký rozsah koncentrace VMK. Tento rozsah (0,56–6,13 mmol 100g⁻¹ tuku) byl připraven mícháním některých vzorků (mechanické zatížení) a vložením vzorků mléka od krav s podvýživou. Dosažené výsledky ze tří pilotních kalibračních ukazovaly možnost užití všech přístrojů pro screening vzorků mléka s dobrou kvalitou, které nejsou poškozeny lipolýzou, a schopnost odlišit je od vzorků s kvalitou horší. Limitní hodnota pro parametr přijatelné kalibrace činila 0,841 (P < 0,05).

Klíčová slova:

mléko, volné mastné kyseliny, instrumentální metody, kalibrace

ÚVOD

Volné mastné kyseliny jako prekursory mléčného tuku vznikají během fermentace škrobu a celulózy v bacheru. Malé množství těchto kyselin zůstává neesterifikováno v triglyceridech a jsou volně rozptýleny hlavně v tukové a mírně ve vodné fázi mléka. Kromě tohoto přirozeného původu, mohou vznikat i z lipolýzy tuků. Se zavedením strojních systémů dojení a potravním

vedením mléka do tanků za pomoci vakua začaly být zaznamenávány vyšší hladiny volných mastných kyselin vznikajících odbouráváním tuku, které mohou vyústit ve žluklou pachut' (cizí příchut') především díky volné kyselině máselné a kyselinám s krátkým řetězcem a také ve změněnou vůni mléka u mléčných výrobků. Zvýšení VMK způsobuje enzymatická hydrolyza mléčného tuku lipoproteinovou lipázou produkovanou psychrotrofy v mléce. Vyletělová *et al.* (1999, 2000) uvádějí zvýšení VMK jako následek vyšší mikrobiální kontaminace mléka psychrotrofní nebo termorezistentní mikroflórou.

Lipázy přitom mohou být termorezistentní a projevit se tak i po tepelném ošetření mléka rozkladem mlékárenských výrobků (Peterková, 2002). Pokud je obal mléčných tukových kuliček narušen mícháním, třepáním, mastné kyseliny mohou být lipázou z triglyceridů odděleny. Další negativní vliv může mít homogenizace mléka (Sjaunja, 1984) – míchání příliš malého množství mléka v chladičím tanku, teplotní změny až namrzání mléka při skladování a následná deformace tukových kuliček při rozmrazování. Při správně nastavené pulsaci by proud mléka v potrubí neměl přesáhnout rychlost 1 až 1,5 m/s. Pak laminární proudění může přejít do agresivnějšího turbulentního a rychlosti vyšší, zejména přes 2,7 m/s zvyšují obsah VMK a dochází k nim zejména v místech zúžení transportního potrubí. Dalším působícím faktorem je management farmy (četnost dojení, výživa zvířat, hygiena ve stáji). Těmito vlivy se zabývali Cvak *et al.* (1992). Hanuš *et al.* (2008 a, 2009) uvádějí, že nedostatek energie ve výživě může způsobit nekompletnost fosfoproteinových obalů tukových kuliček. Díky negativní energetické bilanci zvláště na počátku laktace může dojít k nedostatečné tvorbě membrány Pešek *et al.* (2006). Existují i jiné faktory zvyšující obsah VMK v mléce jako jsou mastitidní onemocnění se zvýšeným počtem somatických buněk v mléce, pozdní stadium laktace ale i zkrácené intervaly mezi dojeními. Růst může navodit i vícečetné denní dojení. Slaghuis *et al.* (2004) uvádějí zvýšené množství VMK u mléka z farem dojících třikrát denně a také u mléka od pasoucích se dojnic.

Mimo to ale také může dojít u chlazeného skladovaného mléka ke spontánní lipolýze, která je definována jako lipolýza při chlazeném skladování čerstvého mléka bez jakéhokoli ošetření. Membrány tukové kuličky nejsou narušeny, ale vlivem některých látek může dojít k interakci mezi tukem a lipázou a mění se podle odlišných genetických a fyziologických faktorů.

Roubal *et al.* (2006) uvedli v ČR pro syrové kravské mléko nejvyšší hodnoty v září a říjnu ($0,98$ a $0,97$ mmol 100g^{-1}) a nejnižší v dubnu a květnu ($0,72$ a $0,71$ mmol 100g^{-1}) s ročním průměrem $0,82$ mmol 100g^{-1} tuku. Efekt sezóny na obsah VMK v mléčném tuku byl významný ($P < 0,05$). V těchto sezónních trendech lze pozorovat vlivy výživy dojnic na obsahy VMK v mléce. Pro dobrou kvalitu mléka a mléčných výrobků je žádoucí obsah volných mastných kyselin $< 1,30$ mmol 100g^{-1} tuku pro metodu stlukem a nebo $3,20$ mmol 100g^{-1} pro metodu extrakčně-titrační (ČSN 57 0529). Tyto referenční analytické metody (ČSN 57 0533; Koops *et al.*, 1990) ale neumožňují sériové analýzy, protože jsou zdlouhavé a pracné. Metody analýz studovali také autoři dalších prací (Sjaunja, 1984; Koops, 1990; Foss 2001, 2004; Bijgaart, 2006), kteří se zabývali spolehlivostí metod, ale také značnou variabilitou měřených kyselin vznikajících rozpadem tuku s ohledem na výživu krav. Se zavedením automatizované efektivnější metody infračervené spektrofotometrie ve středové oblasti s Fourierovými transformacemi (FT-MIR) lze i tyto minoritní složky mléka měřit rychle a ve větších sériích, čemuž musí předcházet nastavení (kalibrace) infraanalýzátoru pomocí vzorků mléka se známými hodnotami VMK získanými pomocí metod referenčních (Bijgaart, 2006; Hanuš *et al.*, 2008 b).

Z výše uvedeného vyplývá, že zjištěné koncentrace VMK ve vzorcích mléka lze využít pro monitoring zdraví dojnic a možnost dostatečně efektivního a spolehlivého stanovení VMK může přispět ke zvýšení senzorické kvality mléčných výrobků a rovněž jejich trvanlivosti.

Cílem práce bylo vyvinout metodiku přípravy referenčních kalibračních standardů pro možnost spolehlivého rutinního vyšetřování syrového mléka na koncentraci volných mastných kyselin a stanovit některé významné charakteristiky validace metody využívající infračervené spektroskopie (FT-MIR).

MATERIÁL A METODY

Během jednoho roku byly provedeny tři pilotní kalibrace automatických přístrojů využívající pro měření analytu absorpci elektromagnetického záření ve střední části infračervené (IČ) oblasti světla. Ze čtyř přístrojů používají tři k vyhodnocení signálu Fourierovy transformace, jeden přístroj je vybaven filtrovou technologií.

Pro zjištění obsahu VMK byly odebrány bazénové vzorky syrového kravského mléka, první a druhý od krav českého strakatého plemene (CF), třetí od stáda smíšeného (CF a H) a čtvrtý od stáda holštýnského (H, na pastvě). První, druhé a čtvrté stádo bylo dojeno na stání, třetí v dojárně.

Subvzorek od každého vzorku byl mechanicky namáhán: nádoba o objemu 2 litry (výška 19 cm, průměr 13 cm) s 1 litrem mléka; teplota 18 až 22 °C; míchadlo ponořené na vertikální tyči (ose míchání) horizontálně excentricky od středu sloupce mléka; osa míchání 2 až 3 cm od středu podélné osy nádoby k její stěně; rozměr míchadla, nerez plocha 7 × 7 cm se třemi kruhovými perforacemi o průměru 12 mm; 550 otáček za minutu; doba míchání 25 až 30 minut. Uvedené zvyšuje původní obsah VMK o cca 100 %. Vzorky byly vychlazeny, konzervovány (Broad Spectrum Microtabs II, DaF Control Systems, England; 0,02 %) a v termoboxech odeslány do laboratoří ke kalibraci IR přístrojů Bentley 150 (filtrová technologie, USA), dvakrát MilkoScan FT 6000 (FTIR, Foss, Dánsko) a LactoScope FTIR (Delta Instruments, Dánsko).

Mléko pro přípravu kalibračních vzorků a pro referenční metodu bylo skladováno a dopravováno stejným způsobem. Vzorky v lázni před analýzou byly jen po dobu nutnou k dosažení teploty 40° C pro měření, veškeré míchání vzorků bylo šetrné. Referenční metoda byla vždy provedena dvakrát, aby se zabránilo chybě výsledku. Obsah VMK byly stanoven metodou stlukem, která byla použita jako metoda referenční (ČSN 57 0533). Výsledky analýzy jsou vyjadřovány v mmol 100g⁻¹ tuku. Pokud bylo u některých přístrojů použito přednastavení výrobcem vyjadřující obsah v mmol 1000g⁻¹ mléka, pak je třeba výsledky přepočítat podle obsahu tuku ve vzorku mléka. Kalibrace byla prováděna podle návodu výrobce k jednotlivým přístrojům.

Statistické vyhodnocení (Microsoft Office Excel 2003) zahrnovalo testování diferencí a lineární regresní a korelační analýzu. Metodické postupy (Leray, 1993; 2009 a, b, c) jsou v souladu s iniciativami pracovní sítě referenčních mléčných laboratoří organizací ICAR (International Committee for Animal Recording) a AFEMA (Arbeitsgruppe zur Förderung von Eutergesundheit und Milchhygiene in den Alpenländern e.V).

VÝSLEDKY A DISKUZE

V případě určení volných mastných kyselin ve vzorcích mléka přístrojovou technikou je nutné nejprve provést věrohodnou kalibraci infraanalyzátoru (IDF Standard 141A; Biggs, 1972; ČSN ISO 8196 – 1, 2) pomocí sady kalibračních standardů o známém složení. Koncentrace analytu v kalibračních vzorcích je určena referenční analytickou metodou (stluková metoda, ČSN 57 0533), vzorků musí být dostatečné množství 5–10 a měly by pokrývat celý koncentrační rozsah. V případě VMK jsou vyšší hodnoty dosahovány mechanickou námahou vzorku mléka.

Referenční sada vzorků pro analýzu VMK a následnou kalibraci infraanalyzátorů obsahovala 8 vzorků kravského mléka, z nichž čtyři byly původní neupravené vzorky a čtyři byly původní vzorky po mechanické námaze. Vliv různé doby a intenzity míchání jako podklad pro sestavení kalibrační sady již byl vyhodnocen (Obr. 1, Hanuš *et al.*, 2008 a). Průměrná hodnota souboru původních vzorků ze všech tří kalibrací byla 1,37 ± 1,26 mmol 100g⁻¹ tuku. V souboru byly zařazeny tři chovy s vyrovnanou výživou 0,69 ± 0,11 mmol 100g⁻¹ tuku, jeden s výživou nedostatečnou 3,42 ± 0,60 mmol 100g⁻¹ tuku. Stádo bylo vybráno proto, aby v referenční sadě byl i vzorek s vyšší hodnotou VMK „přirozeného“ původu. Malnutrice byla odhadnuta u plemene Holštýn podle nízké dojivosti a současně nízkého obsahu močoviny, bílkovin a sušiny tukuprosté v mléce (Kirchgessner *et al.*, 1986; Hanuš *et al.* 2010). Vybrané stádo tedy mělo z matričních důvodů permanentně vysoký obsah VMK v mléčném tuku. Vliv výživy tj. trvalý nedostatek

vlákniny, dusíkatých látek a zejména energie na obsah VMK je zachycen na Obr. 2 (Genčurová *et al.*, 2009). Průměrná hodnota souboru vzorků po provedeném mechanickém zatížení dosáhla hodnoty 3,28 mmol 100g⁻¹ tuku (od 2,42 do 6,13 mmol 100g⁻¹ tuku). Variační obor kalibrační sady zahrnující jak nativní tak upravené mléčné vzorky byl od 0,56 do 6,13 mmol 100g⁻¹ tuku a pokryl očekávanou škálu hodnot.

Tabulka I ukazuje, jakých diferencí bylo dosaženo při měření referenční metodou a pomocí infraanalýzátoru. Průměrná hodnota difference pro metodu stlukovou byla 1,91 mmol 100g⁻¹ tuku (minimální zvýšení po mechanické námaze 0,29 a maximální zvýšení 2,46). Infraanalýzátořem LactoScope FTIR byly zjištěny difference od 0,74 do 4,22, průměrná hodnota činila 1,85 mmol 100g⁻¹ tuku .

Analýzy pomocí infraanalýzátořů byly provedeny 1–3 den po provedení referenčních stanovení (podle doby doručení do laboratoře). Ve většině případů bylo provedeno první proměření vzorků na předchozí kalibraci, poté byl přístroj nakalibrován a vzorky byly znovu proměřeny na seřizovaném přístroji. První rok, kdy byla zaváděna adjustace přístrořů na obsah VMK, se prvním měřením rozumí určení koncentrace pomocí dat přednastavených výrobcem. Vlastní kalibrace přístrořů funguje na principu lineární regrese analýzy signálů očištěných od interferenčních efektů při simultánní multikomponentní analýze.

Dosažené korelační koeficienty mezi výsledky manuální referenční metodou a výsledky měření infraanalýzátořu před kalibrací (první měření, původní kalibrace; PM; Tabulka II) a po kalibraci (kontrolní měření, KM; validační korelace, úspěšnost kalibrace; Tabulka II) se pohybovaly v hodnotách od 0,6–0,99. Nejnižších hodnot dosáhl přístroj používající filtrovou technologii, přístroje pracující na principu FTIR měly nejnižší hodnotu korelačního koeficientu 0,8. To znamená, že 45,5 až 99,0 % variability VMK u infraanalýzátořů bylo určeno variabilitou v referenční sadě vzorků, u FTIR od 77,0 %. Výsledky provedených centrálních kalibrací vykazaly: – dobrou shodu průměrných hodnot mezi metodami referenčními a instrumentálními (R a I); – korelační koeficienty cca od 0,60 do 0,72 pro filtrový analyzátoř a od 0,81 do 0,99 pro FTIR; – vyšší variabilitu individuálních diferencí I – R pro filtrový analyzátoř v porovnání k FTIR. Postup FTIR proto dosahuje vyšší výtěžnosti signálu určovaného přítomností VMK a menší citlivost k náhodným a interferenčním efektům. Uvedené korelační koeficienty dokázaly dobrou schopnost metody kvantifikovat uvedený analyt (Bijgaart, 2006; Hanuš *et al.*, 2008 a). Příklad těchto závislostí zobrazuje Obr. 3. Materiály FOSS (2001) dolořily hodnotu 0,90 FTIR k titrační BDI metodě jako referenční.

Shoda dvou totožně nakalibrováných přístrořů měřících na stejném principu pak byla vyjádřena korelací pohybující se v hodnotách kolem 0,97–0,99, což platilo pro všechny tři provedené kalibrace, při zahrnutí přístroje využívající filtrovou technologii byla dosažena nejnižší hodnota korelačního koeficientu 0,7. Příklady dosažených korelací jsou na Obr. 4.

Všechny laboratoře se zúčastnily kruhového testu provedeného jen s bazénovými vzorky mléka (tedy bez vzorků s uměle zvýšenými hladinami VMK). Vzorků bylo 10, s fyziologickým rozsahem 0,664–3,153. Průměrný obsah VMK stanovený referenční metodou byl 1,46 ± 0,94. Výkonostní test byl zpracován na bázi výpočtu Euklidické vzdálenosti od počátku (Leray, 1993). Také zde korelační koeficienty mezi přístroji pracujícími na stejném principu dosáhly vysokých hodnot 0,99–1, při zahrnutí přístroje využívající filtrovou technologii mírně nižší 0,92. Zobrazení dosažených výsledků dokumentuje Tabulka III a Obr.5.

Z provedeného ročního sledování byly z rozdílů mezi referenční hodnotou a měřením po provedené kalibraci pro oba typy přístrořů vypočítány průměry v hodnotách –0,05 a 1,17 a dvojnásobek směrodatné odchylky 0,47 a 0,51 (FTIR × IR). Pro přístroje FTIR byla vypočítána limitní hodnota pro parametr přijatelné kalibrace na hladině spolehlivosti 95 % a to tak, že byla od průměrné hodnoty korelačního koeficientu 0,92 odečtena hodnota sd × 1,64. Výsledek 0,841 je pak hraniční hodnotou pro přijatelnost kalibrace. Také pro další parametr a to směrodatnou

odchylku individuálních diferencí byl k průměru přičten 1,64 násobek směrodatné odchylky, výsledek je pak 0,75 mmol 100g⁻¹ tuku.

Pro ukazatel průměrné odchylky výsledků nepřímé metody od referenčních hodnot po přijaté kalibraci by podobnou kalkulací (sd × 1,96, oboustranné omezení, interval spolehlivosti 95 %) mohl sloužit limit 0,23 mmol 100g⁻¹ tuku.

Celkově lze výsledky provedených kalibrací hodnotit jako úspěšné a výsledky získané infraanalýzátory vhodné pro kvalitní screening volných mastných kyselin v mléce při rutinním měření. Kalibrace pro VMK je výrobcem přístroje doporučena provádět každý měsíc, frekvence v našich laboratorích zatím není vyjasněna. Limitní hodnota VMK v ČSN 57 0529 je jednoznačně určena pro referenční metodu, např. stlukem, nikoliv pro metodu nepřímou. Pokud by se měl obsah VMK zohledňovat při proplácení mléka podle kvality, a obsah VMK zjišťován nepřímou metodou, pak by bylo vhodné provádět dodatečné výpočty z hodnot právě platné kalibrace a to z důvodu vyšší relativní velikosti směrodatných odchylek diferencí IR metod od metody referenční. Touto korekcí by se upravil výskyt nevyhovujících výsledků.

Specifický postup přípravy referenční sady se zařazením mechanicky namáhaných vzorků vedl k rozšíření kalibrační škály. Také výběr jednoho bazénového vzorku mléka se zvýšenou hodnotou VMK podle výživy stád dojníc do sady RS podle nízkých hodnot bílkovin, sušiny tukuprosté a močoviny se stal standardní součástí metodiky přípravy kalibrační sady.

ZÁVĚR

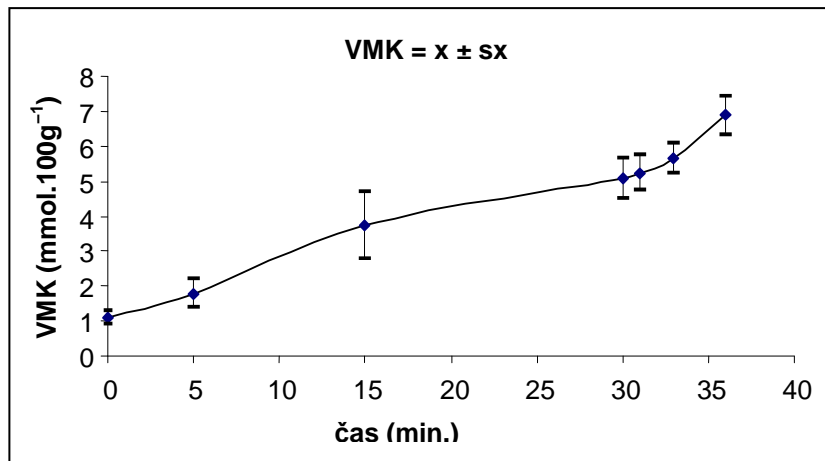
Výsledky získané analyzátory mléka nemohou sloužit pro přípravu referenčních vzorků, ale z hlediska lipolýzy úspěšně rozliší mléko kvalitní a nekvalitní. Instrumentální metoda pro určení VMK se jeví jako dobrá screeningová metoda a pro možnou modifikaci ceny syrového mléka podle jeho kvality.

Literatura

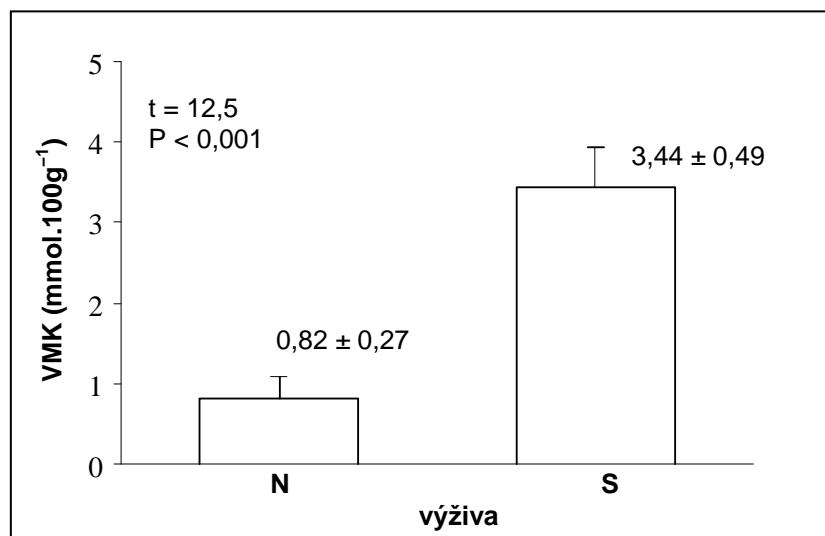
- BIGGS, D. A. (1972): Precision and accuracy of infrared milk analysis. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 1972, 55, s. 488–497, ISSN 0004-5756
- BIJGAART VAN DEN, H. (2006): New applications of mid-infra-red spectrometry for the analysis of milk and milk products. 2. Free fatty acids. *IDF Bulletin*, 2006, 406, s. 22–28. ISSN 0259-8434
- CVAK, Z. – PETERKOVÁ, L. – ČERNÁ, E. (1992): *Chemické a fyzikálně-chemické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků*. VÚPP, Milcom servis a.s. Praha, 1992, 222s. ISBN 80-85120-36-4
- ČSN 57 0529: *Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování*, 1993
- ČSN 57 0533: *Mléko – stanovení látkového obsahu volných mastných kyselin*, 1997
- ČSN ISO 8196-1: *Mléko – definice a vyhodnocení celkové přesnosti nepřímých metod pro analýzu mléka – Část 1: Analytické atributy nepřímých metod*, 2001
- ČSN ISO 8196-2: *Mléko – definice a vyhodnocení celkové přesnosti nepřímých metod pro analýzu mléka – Část 2: Kalibrace a kontrola řízení práce v laboratorích při analýzách mléka nepřímými metodami*, 2001
- FIL IDF (1990): Whole milk. Determination of milk fat, protein and lactose content. *Guide for the operation of mid-infra-red instruments, No. 141A*, Brussels, 1990.
- FOSS (2001): MilkoScan FT 6000; Free fatty acids measurement (FFA). *Spectrum Calibration*. FOSS, 2001, s. 1–8
- FOSS (2004): MilkoScan FT 120; Improved milk calibration. *Analytical Application Note No. 128e*, FOSS, 2004, P/N 580282, s. 1–14.
- GENČUROVÁ, V. – HANUŠ, O. – KUČERA, J. – SOJKOVÁ, K. – KOPECKÝ, J. – JEDELSKÁ, R. (2009): Free fatty acids as possible indicator for milk quality improvement. *Acta fytotechnica et zootechnica*, 2009, 12, s. 25–28. ISSN 1335-258X
- HANUŠ, O. – VEGRIGHT, J. – FRELICH, J. – MACEK, A. – BJELKA, M. – LOUDA, F. – JANŮ, L. (2008 a): Analyse of raw cow milk quality according to free fatty acids contents in the Czech Republic. *Czech J. Anim. Sci.*, 2008, 53, 1, s. 17–30. ISSN 121-1819

- HANUŠ, O. – GENČUROVÁ, V. – KOPECKÝ, J. – JEDELSKÁ, R. – MOTYČKA, Z. – ČERNOCKÝ, M. (2008 b): 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 skotut*, 2008, 182, s. 55–62. ISSN 0139-7265
- HANUŠ, O. – GENČUROVÁ, V. – ŠTOLC, L. – HULOVÁ, I. – MOTYČKA, Z. – KLIMEŠ, M. – JEDELSKÁ, R. – KOPECKÝ, J. (2009): 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*, Komorní Lhotka, 2009, s. 211–237. ISBN 978-80-86380-49-0
- HANUŠ, O. – FRELICH, J. – TOMÁŠKA, M. – VYLETĚLOVÁ, M. – GENČUROVÁ, V. – KUČERA, J. – TRÍNÁCTÝ, J. (2010): The analysis of relationships between chemical composition, physical, technological and health indicators and freezing point in raw cow milk. *Czech J. Anim. Sci.*, 2010, 55, 1, s. 11–29. ISSN 121-1819
- KIRCHGESSNER, M. – KREUZER, M. – ROTH, MAIER. – DORA, A. (1986): Milk urea and protein content to diagnose energy and protein malnutrition of dairy cows. *Arch. Anim. Nutr.*, 1986, 36, s. 192–197. ISSN 0933-5463
- KOOPS, J. – KLOMP, H. – HEMERT VAN, H. (1990): Rapid enzymatic assay of free fatty acids (lipolysis) in farm tank milk by a segmented continuous-flow method. Comparison of the results with those obtained by the BDI procedure. *Neth. Milk Dairy Journal*, 1990, 44, s. 3–9. ISSN 0028 -209X
- LERAY, O. (1993): CECALAIT: an organization to support analytical quality assurance in dairy laboratories. *Proceedings of an International Analytical Quality Assurance and Good Laboratory Practice in Dairy Laboratories*. Sonthofen/Germany, 1992-05-18/20, Brussels, 1993, s. 349–360.
- LERAY, O. (2009 a): Update on ICAR reference laboratory network. Identification, breeding, production, health and recording of farm animals. *Proc. of 36th ICAR biennial session*, Niagara Falls, USA, June 2008, ICAR Technical series no. 13, 2009, s. 291–294. ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X
- LERAY, O. (2009 b): ICAR AQA strategy – International anchorage and harmonisation. *Proc. of 36th ICAR biennial session*, Niagara Falls, USA, June 2008, ICAR Technical series no. 13, 2009, s. 295–300. ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X
- LERAY, O. (2009 c): Interlaboratory reference system and centralised calibration – Prerequisites and standard procedures. *Proc. of 36th ICAR biennial session*, Niagara Falls, USA, June 2008, ICAR Technical series no. 13, 2009, s. 301–305. ISSN 1563-2504, ISBN 92-95014-09-X
- PEŠEK, M. – SAMKOVÁ, E. – ŠPIČKA, J. (2006): Fatty acids and composition of their important groups in milk fat of Czech Pied cattle. *Czech J. Anim. Sci.*, 2006, 51, s. 181–188. ISSN 1212-1819
- PETERKOVÁ, L. (2002): *Sborník přednášek ze semináře: Problematika prvovýroby mléka XXVI*. (Medlov), s. 26–30.
- ROUBAL, P. *et al.* (2006): *Hodnocení jakosti syrového mléka v centrálních laboratořích České republiky v roce 2005*. VÚM Praha, 2006, s. 1–20.
- SJAUNJA, L. O. (1984): Studies on milk analysis of individual cow milk samples. III. The effect of different treatments on infrared analyses. *Acta Agric. Scand.*, 1984, 34, s. 273–285. ISSN 0001-5121
- SLAGHUIS, B. A. – BOS K. – DE JONG, O. – TUDOS, A. J. – TE GIFFEL M. C. – DE KONING, C. J. A. M. (2004): Robotic milking and free fatty acids. In: *Proceedings of the International Symposium Automatic Milking for a better Understanding*, Wageningen Academic, Wageningen, 2004, s. 341–347. ISBN 9076998388
- VYLETĚLOVÁ, M. – BENDA, P. – HANUŠ, O. – KOPUNECZ, P. (1999): Determination of total counts of psychrotrophic bacteria in pool milk samples and their relation to total counts of microorganisms. *Czech J. Food Sci.*, 17, s. 216–222. ISSN 1212-1800
- VYLETĚLOVÁ, M. – FICNAR, J. – HANUŠ, O. (2000): Effects of lipolytic enzymes *Pseudomonas fluorescens* on liberation of fatty acids from milk fat. *Czech J. Food Sci.*, 18, 5, s. 175–182. ISSN 1212–1800

Obr. 1 Vliv intenzity a doby mechanického namáhání na liberalizaci mastných kyselin (VMK) z tuku



Obr. 2 Vliv nedostatečné výživy dojnic (S, n=4) (nízký obsah močoviny a bílkovin) na obsah VMK (mmol.100g⁻¹) ve srovnání s normální výživou (N, n = 12)



Tabulka I Zjištěné diference mezi vzorky mléka neupravenými a po vystavení mechanické námaze při měření referenční metodou a pomocí infraanalyzátoru

Kalibrace/ vzorek		1	2	3	4	Průměrná diference mezi vzorky (mmol.100g ⁻¹)
referenční metoda						
K-I.	původní	0,58	0,56	0,71	3,92	
	namáhané	2,79	2,34	2,91	6,13	
						d = 2,10 sd = 0,19
K-II.	původní	0,73	0,70	0,69	3,60	
	namáhané	3,19	2,98	2,74	5,19	
						d = 2,10 sd = 0,33
K-III	původní	0,69	0,63	0,93	2,75	
	namáhané	2,44	2,42	3,24	3,04	
						d = 1,53 sd = 0,75
průměr diferencí						d = 1,91 sd = 0,27
IR-analyzátor						
K-I.	původní	1,33	1,55	1,56	5,05	
	namáhané	2,07	3,28	4,50	9,27	
						d = 2,41 sd = 1,02
K-II.	původní	1,272	1,355	3,953	1,381	
	namáhané	2,70	3,17	6,46	2,67	
						d = 1,76 sd = 0,50
K-III	původní	0,98	0,85	0,63	1,68	
	namáhané	2,20	1,65	2,58	3,22	
						d = 1,38 sd = 0,48
průměr diferencí						d = 1,85 sd = 0,43

Tabulka II Korelační koeficienty vztahu referenční metody a nepřímé instrumentální metody pro určení koncentrace VMK

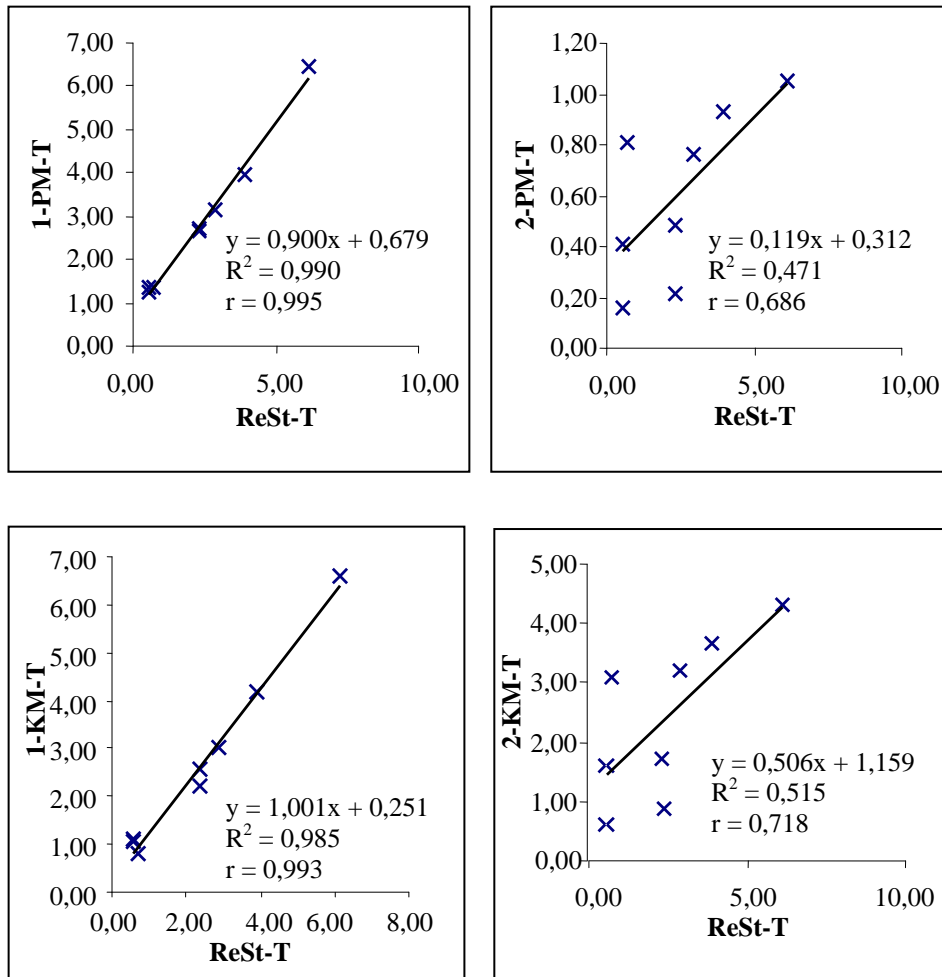
Pořadí kalibrace	I.		II.		III.	
Metoda	PM	KM	PM	KM	PM	KM
1. FTIR	0,88	0,87	0,99	0,99	0,89	0,93
2. IR	0,67	0,66	0,67	0,72	0,69	0,60
3. FTIR	-	0,85	0,99	0,99	0,90	0,91
4. FTIR	0,81	0,90	0,99	0,90	0,91	0,91

PM= první měření, KM= kontrolní měření

Tabulka III Základní statistické údaje pro vyhodnocení kruhového testu (4 přístroje, mléko nativní)

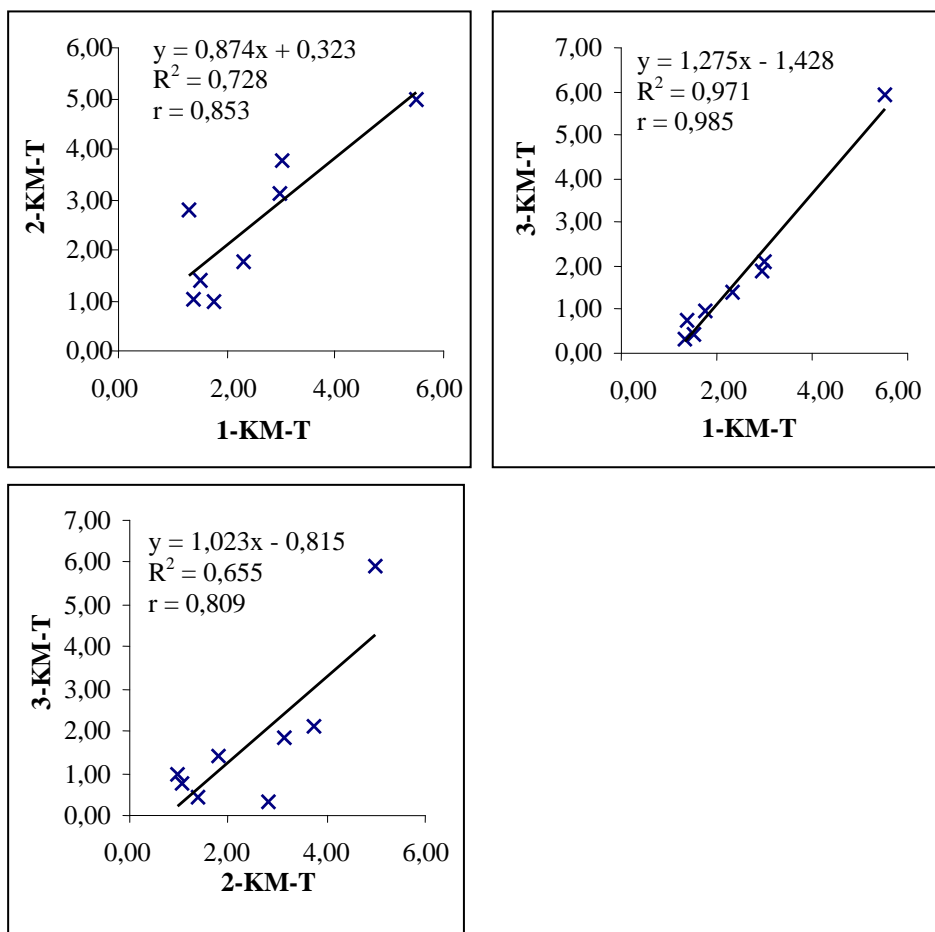
	FTIR	IR	FTIR	FTIR
x	1,52	1,95	0,97	1,39
sx	0,88	1,31	0,91	0,92
min	0,79	0,70	0,25	0,60
max	3,10	4,01	2,54	2,98

Obr. 3 Příklad regresního hodnocení provedených kalibrací VMK pro jednotlivé přístroje (1 – FTIR, 2 – IR) ve vztahu k referenčním standardům (ReSt-T)

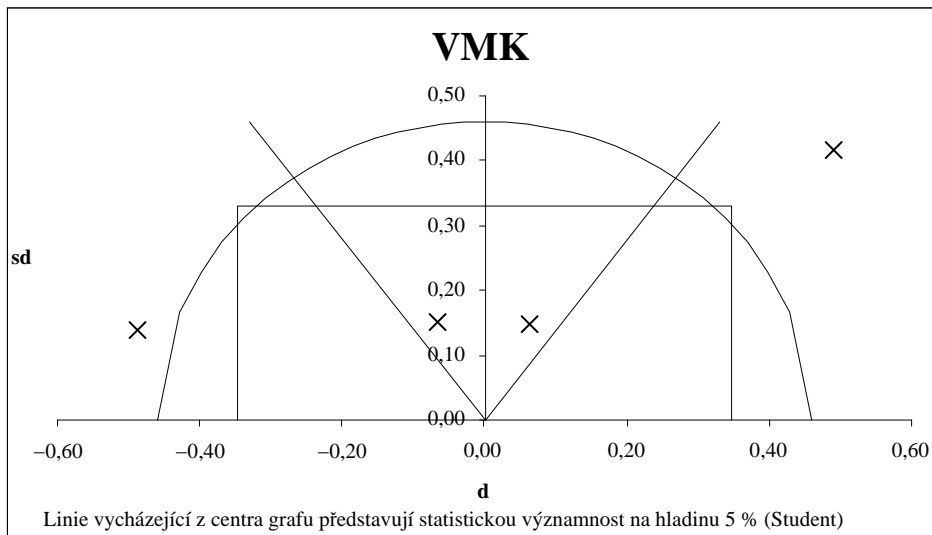


(PM-T= první měření, KM-T= kontrolní měření)

Obr. 4 Vztahy mezi jednotlivými přístroji po provedené kalibraci



Obr. 5 Vyhodnocení kruhového testu provedeného s bazénovými vzorky mléka pomocí výpočtu Euklidické vzdálenosti od počátku



d = průměrná odchylka (diference, nepřímá metoda – referenční hodnota v %); sd = variabilita průměrné diference. Linie vycházející z centra grafu představují významnost odchylek (párový t-test, Studentovo rozdělení), kdy body pod liniemi jsou významně odchýlené ($P \leq 0,05$), nad liniemi nevýznamně ($P > 0,05$). Půlkruh vymezuje úspěšný výsledek (hladina spolehlivosti 90 % pro RE), obdélník velmi úspěšný výsledek.

Kontaktní adresa:

Ing. Václava Genčurová, Ph.D.
Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o.
Rapotín, Výzkumníků 267, 788 13 Vikýřovice
Tel.: 583 392 143, fax: 583 392 129
E-mail: vaclava.gencurova@vuchs.cz

Práce byla podporována prostředky projektů MŠMT MSM 2678846201, INGO LA 09030 a Národní referenční laboratoří pro syrové mléko Rapotín.