

Marek Kardas, Elżbieta Grochowska-Niedworok

RÓŻNICOWA KALORYMETRIA SKANINGOWA JAKO METODA TERMOANALITYCZNA STOSOWANA W FARMACJI I ANALIZIE ŻYWNOŚCI

Zakład Żywienia Człowieka Wydziału Zdrowia Publicznego
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
Kierownik: dr n. farm. *E. Grochowska-Niedworok*

Hasła kluczowe: metody termooanalityczne, różnicowa kalorymetria skaningowa, farmacja, analiza żywności.

Key words: thermoanalytical methods, differential scanning calorimetry, pharmacy, food analysis.

Metody analizy termicznej (TA) dostarczają szeregu informacji dotyczących zmian wybranych właściwości badanej substancji pod wpływem zmieniającej się w określony, zaprogramowany sposób temperatury. Wśród związków często badanych za pomocą metod analizy termicznej jest wiele przykładów zastosowania metod TA w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym. Badania w tym zakresie dotyczą analizy związków nieorganicznych oraz organicznych, zarówno małych – jak i wielkocząsteczkowych (1).

Podstawowe znaczenie dla charakterystyki większości związków ma określenie takich ich parametrów termicznych, jak temperatura zeszczenia, topnienia, rozkładu, określonych ubytków masy czy przemian polimorficznych. Decydują one często o jakości produktu. Zasadnicze znaczenie mają badania dotyczące oznaczania ciepła topnienia, krystalizacji, przemian polimorficznych oraz ciepła właściwego. Mogą one dotyczyć właściwości samych substancji, mogą też odnosić się do sposobu ich wytwarzania i ewentualnie dalszego przetwarzania (2, 3).

Do metod termooanalitycznych, pomocnych w określeniu wyżej wymienionych parametrów zaliczamy m. in. różnicową analizę termiczną (DTA), różnicową kalorymetrię skaningową (DSC), analizę termogravimetryczną (TGA) i analizę termomechaniczną (TMA).

Całokszałem zagadnień dotyczących standaryzacji i nomenklatury w analizie termicznej zajmuje się International Confederation for Thermal Analysis and Calorimetry (ICTAC), która została utworzona w roku 1968 jako International Confederation for Thermal Analysis (ICTA) a od 1992 r. działa już pod pełną nazwą ICTAC. Od początku jej istnienia czynione są wysiłki, by ujednoczyć terminologię stosowaną w zakresie analizy termicznej i zdefiniować jej obszar. W latach 1998 i 1999 ICTAC opublikowała zalecenia dotyczące definicji, nazw i skrótów w analizie termicznej i kalorymetrii (4, 5).

Podstawowym kryterium wg którego dokonano podziału metod termooanalitycznych jest rodzaj właściwości, która jest analizowana. Termogravimetria (TG) odnosi się do zmiany masy próbki, a różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) do

zmiany różnicy strumieni ciepłych do próbki i do próby odniesienia, w badanym zakresie temperatur. DSC, która formalnie jest metodą kalorymetryczną uznawana jest również jako metoda termoanalityczna (6).

W roku 2004 ICTAC przedstawiła dodatkowe propozycje zaleceń dotyczących definicji, nazw i skrótów w analizie termicznej (7). Zgodnie z nimi: analiza termiczna oznacza grupę technik badania zależności między właściwością próbki i jej temperaturą. Metody analizy termicznej podzielono również wg rodzaju badanej właściwości próbki – określanej jako funkcja temperatury (7).

Według przyjętej klasyfikacji (8, 9) zasada działania kalorymetrów, urządzeń umożliwiających określanie różnicy strumieni ciepłych, wykorzystuje najczęściej jedną z dwóch metod wyznaczania efektów termicznych: metodę kompensacyjną lub przepływu ciepła. Stosowane są więc dwa główne typy różnicowych kalorymetrów skaningowych: kompensacyjne (ang.: power compensation DSC; pc-DSC) oraz przewodzące (ang.: heat flux DSC; hf-DSC). System pomiarowy różnicowych kalorymetrów skaningowych typu pc-DSC składa się z dwóch pieców, w jednym z nich umieszczona zostaje próbka S (ang.: sample), w drugim próba odniesienia R (ang.: reference sample). Piece wyposażone są w grzejniki elektryczne i termometry oporowe, oddzielone od siebie i umieszczone w osłonie o stałej lub programowo zmiennej temperaturze. W czasie pomiaru do grzejników obu pieców dostarczana jest taka moc, aby zmieniać ich temperaturę zgodnie z założonym programem (szybkością) ogrzewania. Jeżeli występuje idealna symetria cieplna układu, to temperatura obu pieców (próbek) jest jednakowa i różnica mocy dostarczanej do ich grzejników wynosi zero. Asymetria, wywoływana przemianą próbki lub powodowana różnicą pojemności cieplnej próbek S i R, generuje różnicę temperatur między piecami. Układ pomiarowy usiłuje ją wówczas skompensować odpowiednią zmianą mocy elektrycznej dostarczanej do grzejnika pieca próbki. Ta dodatkowa moc jest mierzona i rejestrowana jako ilość ciepła (10).

W różnicowych kalorymetrach skaningowych typu hf-DSC próbki (S i R) umieszczone są w jednakowych naczynkach pomiarowych symetrycznie we wspólnym piecu, którego temperatura jest regulowana w sposób niezależny od zmian właściwości próbek w czasie pomiaru, zgodnie z założonym programem temperaturowym. Mierzona jest różnica temperatur między próbkami. Analogicznie jak poprzednio, gdy piec kalorymetru jest ogrzewany, a układ jest symetryczny cieplnie, to do obu próbek płynie taki sam strumień ciepła, różnica ich temperatur wynosi wówczas zero. Gdy stan równowagi dynamicznej pomiędzy próbkami S i R zostaje zakłócony przemianą w próbce lub gdy istnieje asymetria cieplna układu powodowana różnicą pojemności cieplnej próbek, w pomiarze DSC występuje różnica temperatur, proporcjonalna do różnicy strumieni ciepłych do próbki i do próbki odniesienia (11).

Kalorymetr zarejestruje efekt energetyczny tylko wtedy, gdy układ (próbka) pochłonie lub wydzieli ciepło (w wyniku przemiany lub zmiany ciepła właściwego), a wartość pochłoniętego lub wydzielonego ciepła jest wyższa niż czułość aparatu (10). Do podstawowych parametrów opisujących jakość i przydatność kalorymetrów należy zaliczyć: czułość, czyli minimalną, mierzalną wielkość efektu energetycznego, określającą poziom detekcji aparatu; stałą czasową (im krótsza stała czasowa, tym szybciej zarejestrowana zostanie różnica temperatur pojawiająca się między próbka badaną a referencyjną); poziom szumów; zakres wielkości mierzal-

nych efektów energetycznych; zakresy szybkości grzania i chłodzenia; zakres temperatury badań.

Wynikiem pomiaru realizowanego techniką DSC jest krzywa DSC, przedstawiająca zależność mierzonej różnicy strumieni cieplnych od czasu/temperatury. Według ICTAC zaleca się prezentację krzywej DSC tak by sygnały pochodzące od efektów egzotermicznych skierowane były w dół, a endotermicznych w górę. Dopuszczalne jest jednakże prezentowanie wyników w konwencji odwrotnej (z efektami egzotermicznymi skierowanymi w górę), zaznaczając to jednoznacznie, czego zresztą wymagają zalecenia ICTAC dotyczące zakresu informacji i sposobu prezentacji danych termooanalizacyjnych (12).

Jednym z intensywniej rozwijających się obszarów zastosowania różnicowej kalorymetrii skaningowej jest jej wykorzystanie w przemyśle farmaceutycznym. DSC obok TG z powodzeniem stosowana jest do:

- pomiaru temperatury i ciepła topnienia,
- wyznaczania czystości substancji farmaceutycznych,
- badania związków cząsteczkowych,
- badania przemian polimorficznych,
- określania kompatybilności,
- wyznaczania stabilności termicznej,
- ilościowego oznaczania wody krystalizacyjnej i wody zaabsorbowanej,
- badania czynności optycznej (1).

Temperatura topnienia jest jedną z zasadniczych i charakterystycznych cech każdego związku. Można ją wyznaczyć m.in. za pomocą metody różnicowej kalorymetrii skaningowej. W porównaniu do innych metod stosowanych do wyznaczania temperatury topnienia, pomiary za pomocą metod analizy termicznej przeprowadzane są w stałych warunkach (stała szybkość ogrzewania), są znacznie szybsze i bardziej precyzyjne, ponadto do pomiaru wystarczająca jest bardzo niewielka ilość (kilka mg) badanej substancji. Dodatkowo na podstawie kształtu piku na krzywej DSC możliwe jest wnioskowanie o obecności innych związków w substancji badanej, w tym również zanieczyszczeń w preparatach leczniczych (1).

Określenie stopnia czystości substancji stosowanych jako preparaty farmaceutyczne jest ważne ze względu na ich aktywność i bezpieczeństwo. Czystość zdefiniowana jako ułamek molowy może być wyznaczona za pomocą metody DSC nawet wówczas, gdy rodzaj zanieczyszczeń nie jest znany. Obniżenie wartości temperatury topnienia substancji zawierającej zanieczyszczenia zależy zgodnie z równaniem van't Hoffa od ułamka molowego zanieczyszczeń. Wyznaczanie czystości przy użyciu metody DSC daje szybkie i precyzyjne wyniki. Metoda ta może być jednak stosowana tylko w ściśle określonych warunkach. Ilość zanieczyszczeń nie powinna przekraczać 5% (1).

Polimorfizm, czyli wielopostaciowość (gr. *polys* – liczny, *morphe* – postać) jest zjawiskiem odnoszącym się do ciała stałego. Występowanie substancji farmakologicznych w postaci różnych form polimorficznych ma istotny wpływ na ich właściwości fizykochemiczne i działanie lecznicze. Zmiany w strukturze krystalicznej substancji leczniczej wpływają bezpośrednio na jej rozpuszczalność, zachowanie podczas topnienia, właściwości chemiczne oraz stabilność termiczną. Dla wielu substancji czynnych ze względu na rozpuszczalność pożądana jest postać amor-

ficzna, która z punktu widzenia termodynamicznego jest postacią niestabilną, a układ wykazuje naturalną tendencję do przechodzenia w formę krystaliczną. Następujący proces krystalizacji substancji może z kolei prowadzić do powstawania różnych form polimorficznych, znacznie różniących się właściwościami fizykochemicznymi, które mogą jednocześnie współistnieć w badanym układzie. Przemiany polimorficzne należą do przemian fazowych pierwszego rzędu, towarzyszy im określony efekt cieplny: endo- lub egzotermiczny. Odznaczają się one tym, że w punkcie przemiany, czyli w punkcie inwersji struktury krystalicznej, następuje skokowa zmiana takich właściwości, jak np. gęstość, twardość, objętość molowa i ciepło molowe, entalpia i entropia procesu, itp. W szczególny sposób na dostępność biologiczną substancji leczniczych wpływa rozpuszczalność poszczególnych odmian polimorficznych. W praktyce farmaceutycznej jako zasadę przyjęto wybór takiej odmiany polimorficznej substancji aktywnej, która jest termodynamicznie trwała w temperaturze pokojowej. Takie podejście gwarantuje, że nie nastąpi proces transformacji jednej odmiany polimorficznej w drugą w gotowej postaci leku, a w związku z tym ewentualne różnice w biodostępności substancji leczniczej zostaną zminimalizowane.

Spośród szerokiej gamy metod termoanalitycznych dogodną metodą służącą do badania zjawiska polimorfizmu jest metoda DSC. Szerokie zastosowanie tej metody w badaniu polimorfizmu polega na tym, że umożliwia ona wyznaczenie charakterystycznych temperatur i ciepła przemian a przez to wykrycie poszczególnych odmian polimorficznych. Przemiany krystaliczne wielu substancji stosowanych w lecznictwie, badane są za pomocą technik termoanalitycznych.

Dobrym przykładem zastosowania analizy termicznej może być karbowir, substancja o potencjalnej aktywności *in vitro* w stosunku do wirusa HIV. Karbowir tworzy dwie uwodnione i trzy bezwodne odmiany polimorficzne w różny sposób reprezentowane przez krzywe DSC. Innym przykładem może być: analiza chlorowodoru meksyletyny – preparatu przeciwwirusowego tworzącego sześć odmian polimorficznych; analiza chlorowodoru tulobuterolu – leku rozszerzającego oskrzela, który występuje w postaci czterech form krystalicznych, oraz w formie amorficznej (13).

W powyższych przykładach istotną zaletą użycia techniki DSC jest możliwość wykonania jednocześnie analizy czystości badanej substancji, wykorzystując w tym celu tą samą krzywą DSC. Pamiętać jednak należy, że wyniki analizy termicznej zależą w dużym stopniu od założonego reżimu temperaturowego, obecności i rodzaju zanieczyszczeń w próbce, jej wielkości, ziarnistości i wielu innych czynników. Bardziej dogłębną w porównaniu do tradycyjnej metody DSC analizę przemian polimorficznych substancji leczniczych umożliwia użycie metody DSC z modulacją temperatury (mt-DSC).

Kolejny przykład zastosowania DSC w farmacji wynika z faktu, iż przy użyciu metody DSC możliwe staje się odróżnienie racematu (równomolowej mieszaniny enancjomerów) od czystego enancjomeru, a także stwierdzenie obecności mieszaniny racemicznej w enancjomerze. Racemat charakteryzuje się w porównaniu do czystych enancjomerów inną strukturą krystaliczną, rozpuszczalnością i temperaturą topnienia. W przypadku obecności mieszaniny racemicznej w enancjomerze obserwuje się obniżenie temperatury topnienia w stosunku do czystego enancjomeru. Nie jest natomiast możliwe rozróżnienie enancjomerów (+) i (–), ponieważ mają te same

temperatury topnienia. W takim przypadku do nieznanego enancjomeru można dodać formy (+) znanego enancjomeru. Jeżeli na krzywej DSC dla tak przygotowanej próbki nie zostanie zaobserwowana zmiana temperatury topnienia będzie to świadczyło, że nieznanym enancjomerem była forma (+), natomiast jeżeli temperatura topnienia ulegnie zmianie, będzie to oznaczało, że w próbka była enancjomerem (-) (14).

Metody analizy termicznej stosowane są także do badania żywności i środków pomocniczych. Uzyskane wyniki wykorzystywane są m.in. w optymalizacji procesów przetwórczych i ocenie warunków przechowywania. Należy pamiętać, że DSC pozwala na badanie tylko efektów energetycznych, towarzyszących przemianom zachodzącym w analizowanych produktach spożywczych. Najczęściej efekty te powstają na skutek przemian fazowych (topnienie, krzepnięcie, krystalizacja, rekrytalizacja, itp.), rzadziej natomiast towarzyszą przemianom chemicznym. Technika DSC stosuje się do analizy żywności zawierającej białka, węglowodany lub tłuszcze. Ponadto, metoda ta umożliwiła termooanalityczne oznaczenie wody występującej w żywności, oraz badanie warunków termicznego utrwalania produktów spożywczych na drodze ich zamrażania i suszenia (15, 16, 17). Spośród licznych przykładów zastosowania metod analizy termicznej do badania produktów żywnościowych wymienić można:

- badanie degradacji tłuszczów jadalnych na skutek reakcji utleniania,
- wyznaczenie wskaźnika fazy stałej tłuszczu,
- badanie kleikowania i retrogradacji skrobi,
- analizę białek mięsa,
- badanie warunków zamrażania i suszenia produktów spożywczych.

Takie właściwości jadalnych tłuszczów, jak smak, zapach czy barwa ulegają pewnym zmianom podczas często długiego okresu magazynowania. Jest to wynikiem powolnego utleniania. Niektóre przemiany będące wynikiem reakcji z tlenem, jego absorpcji i innych reakcji w stosunku do tłuszczów mogą być badane za pomocą metod termooanalitycznych, w tym DSC. Otrzymane wyniki pozwalają na dobór odpowiednich przeciwutleniaczy, ustalenie optymalnych warunków przechowywania oraz określenie terminu przydatności do spożycia (1).

Technika DSC umożliwia również na podstawie określenia maksymalnej temperatury na krzywej topnienia wyznaczenie tzw. wskaźnika zawartości fazy stałej tłuszczu (*Solid Fat Index*). Indeks fazy stałej definiuje się jako procentową zawartość tłuszczów stałych w badanej próbce. Parametr ten w sposób ilościowy opisuje właściwości fizyczne tych substancji (18). Otrzymane tą metodą wartości SFI w wysokim stopniu są zgodne z otrzymanymi o wiele bardziej czasochłonną metodą dylatometryczną (19).

Metoda kalorymetrii skaningowej jest użyteczna przy bezpośrednim lub pośrednim wyznaczaniu takich właściwości lipidów jak ciepło właściwe i pojemność ciepła – jako zmiana zaabsorbowanego ciepła do zmiany temperatury (20).

Różnicowa kalorymetria skaningowa jest ponadto pomocna w analizie współmieszalności tłuszczów. Jednym z najbardziej znanych objawów tych zmian jest powstawanie „wykwitów” na powierzchni czekolady wynikających z zachodzących w wyrobie przemian polimorficznych triacylogliceroli (21). Metodę DSC w tym wypadku stosuje się do wyznaczania tzw. diagramów fazowych, które przedstawiają zależność pomiędzy współmieszalnością badanych tłuszczów i innych składników mieszaniny oraz ich temperaturą a co się z tym wiąże fazą w jakiej się znajdują (22).

Metoda DSC często jest stosowana w analizie tłuszczów stołowych (masło, margaryna). Dzięki niej można wyznaczać charakterystykę procesów topnienia i krystalizacji tłuszczów będących składnikami tych produktów. Analizy kalorymetryczne polegają na porównaniu termogramów DSC masła lub margaryn o różnej zawartości tłuszczu (23). Prowadzone były również badania nad próbą określania zależności pomiędzy sposobem żywienia krów, a cechami jakościowymi otrzymanego z ich mleka masła czy serów (24, 25).

Podczas analizy termicznej tłuszczów należy pamiętać, że są to często substancje o złożonym składzie chemicznym, co więcej cechują się skomplikowanym charakterem równowag fazowych oraz wysokim stopniem polimorfizmu niektórych składników. Wszystko to powoduje pewne trudności w badaniach oraz analizie i interpretacji wyników (26).

Wśród prac badawczych z zastosowaniem DSC dotyczących węglowodanów występujących w żywności najwięcej jest doniesień dotyczących skrobi. Zarówno skrobi natywnych różnego pochodzenia jak i skrobi modyfikowanych. Użycie techniki kalorymetrycznej umożliwia analizę procesu kleikowania a pośrednio także procesu retrogradacji (27, 28, 29, 30). Znajomość przebiegu tych przemiany ma duże znaczenie dla optymalizacji jakości produktów zawierających skrobię. Oprócz skrobi natywnych i modyfikowanych badaniami techniką DSC mogą zostać objęte produkty w których ten polisacharyd występuje w dużych ilościach (np.: mąka, pieczywo). Idea procesu analizy termicznej jest w tych przypadkach taka sama, jednakże często odmienna jest metodyka badań. Powodem jest współobecność w badanych produktach innych związków, np.: białek, których ewentualne przemiany będą również odnotowywane na krzywych DSC (31, 32).

Metoda DSC jest użyteczna w śledzeniu procesu denaturacji termicznej białek, zarówno zwierzęcych, jak i roślinnych. W przypadku tych pierwszych jednym z częściej badanych tą metodą surowców jest mięso, ponieważ ogólnie pojęte właściwości mięsa są w dużym stopniu zależne od białek (26). Wykorzystuje się w tym zastosowaniu DSC różnice w temperaturach w których zachodzą przemiany denaturacyjne poszczególnych białek występujących w badanych próbkach mięsa (33, 34, 35).

Różnicowa kalorymetria skaningowa jako technika termoanalityczna ma bardzo uniwersalny charakter o czym mogą świadczyć wymienione powyżej przykłady jej zastosowania. Jej zalety czynią ją w kontekście badania artykułów żywnościowych oraz preparatów farmaceutycznych jedną z najczęściej stosowanych metod analizy termicznej. Jej użyteczność w ostatnich latach rośnie wraz z udoskonalaniem rozwiązań technicznych, a także dzięki możliwości jej połączenia z innymi komplementarnymi metodami analitycznymi. Warto jednak pamiętać, że interpretacja wyników różnicowej kalorymetrii skaningowej, aczkolwiek ułatwiona dzięki zastosowanemu oprogramowaniu komputerowemu, wymaga jednak zrozumienia bardzo niekiedy złożonej fizykochemicznej istoty zachodzących i analizowanych zjawisk.

M. Kardas, E. Grochowska-Niedworok

PIŚMIENICTWO

1. *Pielichowski K.*: Zastosowanie metod analizy termicznej w badaniu materiałów organicznych. Mat. V Szkoły Analizy Termicznej, Zakopane 2008. – 2. *Wunderlich B.*: Thermal Analysis. Academic Press, New York 1990. – 3. *Mathot V* (Ed.): Calorimetry and Thermal Analysis of Polymers. Hanser, Munich 1994. – 4. *Hemminger W., Wilburn F.W., Gravelle P.C., Haglund B.O., Hianes P.J., Hakvoort G., Ohlyba M., Simon J., Sarge S.M.*: ICTAC Nomenclature Committee Report: Recommendation for Names and Definitions in Thermal Analysis and Calorimetry. ICTAC News, 1998; 31/2: 107-122. – 5. *Gmelin E.*: Report of the Chairman of the Scientific Commissions and Working Groups, ICTAC News, 1999; 32/2: 10-12. – 6. *Hemminger W., Sarge S.M.*: Definitions, Nomenclature, Terms and Literature, Gallacher P.K.: Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry. Brown M.E.: Principles and Practice. Elsevier 1998: 1-73. – 7. ICTAC Nomenclature of Thermal Analysis, ICTAC News, 2004; 37/2: 62-70. – 8. *Zielenkiewicz W.*: Pomiar efektyw ciepłych. Metody i zastosowania, Centrum Upowszechniania Nauki PAN, Warszawa 2000. – 9. *Zielenkiewicz W.*: Calorimetry. Inst. of Phys. Chem. of Polish Acad. of Sciences Warszawa 2005. – 10. *Balcerowiak W.*: Kurs analizy termicznej. Cz. I. DSC – ciepło właściwe, ciepło przemian. Laboratorium, 2007; 5: 10-13.
11. *Höhne G.W.H., Hemminger W., Flammersheim H.J.*: Differential Scanning Calorimetry. An Introduction for Practitioners, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1996. – 12. Reporting Thermal Analysis Data – New Draft Version, ICTAC News, 1999; 32/2: 22-25. – 13. *Wesołowski M.*: Analiza termiczna w badaniu polimorfizmu leków. Laboratorium, 2007; 10: 24-28. – 14. *Sarge S.M., Gmelin E., Höhne G.W.H., Cammenga H.K., Hemminger W., Eysel W.*: Thermochim. Acta, 1994; 247: 129-168. – 15. *Kowalski B.*: Analiza termiczna i jej zastosowanie w badaniu żywności. Cz. I. Metody, aparatura, badanie białek i węglowodanów, oznaczanie wody. Przemysł Spożywczy, 1990; 2-3: 41-44. – 16. *Balcerowiak W.*: DSC – charakteryzowanie przemian fazowych. Mat. III Szkoły Analizy Termicznej, Zakopane 2002. – 17. *Pielichowski K.*: Zastosowanie analizy termicznej w badaniu materiałów organicznych. Mat. III Szkoły Analizy Termicznej, Zakopane 2002. – 18. *Pawłowicz R., Drozdowski B.*: Oznaczanie fazy stałej w tłuszczach. Żywność Nauka Technologia Jakość, 2004; 2: 59-68. – 19. *Sichina W.J.*: Characterization of fats in cookies using power compensation DSC, PerkinElmer Application Notes, 2001; 77. – 20. *Sichina W.J.*: Better heat capacity data with the power compensated DSC. PerkinElmer Application Notes, 2000; 25.
21. *Fryer P., Pinschower K.*: The materials science of chocolate. MRS Bulletin, 2000; 12: 25-29. – 22. *Humphrey K.L., Moquin P.H.L., Narine S.S.*: Phase behavior of a binary lipid shortening system: From molecules to rheology. Journal of the American Oil Chemists Society, 2003; 80: 1175-1182. – 23. *Jinjarak S., Olabi A., Jimenez-Flores R., Walker J.H.*: Sensory, functional and analytical comparisons of whey butter with other butters. Journal of Dairy Science, 2006; 89: 2428-2440. – 24. *Avramis C.A., Wang H., McBride B.W., Wright T.C., Hill A.R.*: Physical and processing properties of milk, butter, and cheddar cheese from cows fed supplemental fishmeal, Journal of Dairy Science, 2003; 86: 2568-2576. – 25. *Couvreux 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, 2006; 89: 1956-1969. – 26. *Cieślak E., Komoniewski M.*: Zastosowanie różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) do oceny jakości produktów spożywczych. LAB Laboratoria, Aparatura, Badania, 2007; 12(2): 6-11. – 27. *Sievert D., Pomeranz Y.*: Enzyme-Resistant Starch. I. Characterization and evaluation by enzymatic, thermoanalytical and microscopic methods. Cereal Chem., 1989; 66: 342-347. – 28. *Krzyżaniak W., Jankowski T., Grajek W.*: Optymalizacja parametrów hydrolizy enzymatycznej skrobi ziemniaczanej połączonej z procesem ekstruzji. Żywność Nauka Technologia Jakość, 2005; 1: 48-61. – 29. *Sasaki T.*: Effect of wheat starch characteristics on the gelatinization, retrogradation and gelation properties. Japan Agricultural Research Quarterly, 2005; 39: 253-260. – 30. *Wasserman L.A., Vaccino P., Boggini G., Schiraldi A., Noda T., Kudryavzev A.M., Yuryev V.P.*: Electrophoretic and DSC studies on different wheat starches with various amylose contents. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 2006; 15: 59-66.
31. *Leon A., Duran E., Barber C.B.*: A new approach to study starch changes occurring in the dough-baking process and during bread storage, Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A, 1997; 204: 316-320. – 32. *Katina K.*: Sourdough: a tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread. VTT Publications, 2005; 569. – 33. *Schubring R.*: Differential scanning calorimetric (DSC) measurements on the roe of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): influence of maturation and technological treatment. Thermochimica Acta, 2004; 415: 89-98. – 34. *Tornberg E.*: Effects of heat on meat proteins – Implications on structure and quality of meat products. Meat Science, 2005; 70: 493-508. – 35. *Brunton N.P., Lyng J.G., Zhang L., Jacquier J.C.*: The use of dielectric properties and other physical analyses for assessing protein denaturation in beef biceps femoris muscle during cooking from 5 to 85°C. Meat Science, 2006; 72: 236-244.