



Retinol a tokoferol v buvolím mléce

Retinol and Tocopherol in Buffalo Milk



Dluhošová, S., Králová, M., Doležalová, J., Bartáková, K., Bursová, Š.
Veterinární univerzita Brno

Koncentrace retinolu a tokoferolu byly sledovány v syrovém buvolím mléce. Analýza vzorků probíhala pomocí kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí a detekcí v UV oblasti. Vzorky byly před analýzou ošetřeny extrakcí methanolickým roztokem hydroxidu draselného a hexanem k vyvázání těchto lipofilních látek. Obsah retinolu byl v rozmezí 0,081-0,340 mg/100 g mléka; pro tokoferol byly hodnoty 0,009-0,133 mg/100 g mléka. Byl zjištěn statisticky významný rozdíl ve srovnání bazénových a individuálních vzorků na hladině významnosti $p < 0,05$ pro retinol i tokoferol.

Obsah liposolubilních vitaminů je variabilní v závislosti na podmínkách zpracování mléka, období (ročním, laktačním), živočišném druhu, složení krmné dávky atd. (Chotyakul et al., 2014; Zava et Sansiřena, 2017). Jako vitamin A jsou označovány různé varianty této chemické látky s aktivitou vitaminu A – může jím být retinol, retinal, retinová kyselina, retinyl ester a provitamin vitaminu A, beta-karoten. Nejčastější formou v potravinách živočišného původu je ester retinyl palmitát, který je hydrolyzován v enterocytech na alkohol retinol. Tento derivát je nalézán v živočišných tkáních a mléčných produktech. Forma beta-karotenu je typická pro potraviny rostlinného i živočišného původu. Přeměna beta-karotenu přijímaného z krmiva na retinol probíhá v mléčné žláze laktujících samic. Do jaké míry se tato přeměna děje je dáno živočišným druhem (Chotyakul et al., 2014). Vitamin A hraje základní i zásadní roli v biochemických procesech souvisejících s viděním. Je důležitý pro správný vývoj kostí, dělení a zrání buněk a při fetálním vývoji. Je to efektivní antioxidant. Účastní se syntézy proteinů, nukleových kyselin a lipoproteinů (Michlová et al., 2015).

Vitamin E se v potravinách může nacházet ve čtyřech formách: alfa-, beta-, gama- a delta-tokoferol. Gama-tokoferol je nejčastěji zastoupen v západním způsobu stravování. Alfa-tokoferol je forma vitaminu E dostupná z mléka. Tokoferoly jsou látky lipidové povahy s antioxidačními účinky, které brání oxidaci, tvorbě volných radikálů a stavů, které negativně mohou ovlivnit lidské zdraví (vznik aterosklerózy, rakoviny, buněčného poškození, rizika srdečně-cévních nemocí apod.) (Barba et al., 2011; Haro-Vicente et al., 2013; Michlová et al., 2015). Alfa-tokoferol má vysokou biologickou aktivitu a antioxidační účinky v prevenci chronických nemocí (Chotyakul et al., 2014).

Buvolí mléko v našich podmínkách může pro běžného konzumenta v České republice mít jistý exotický nádech. Nicméně ve státech asijských a státech Blízkého Východu tvoří až 68% podíl z celosvětové produkce mléka. Postupně se rozšiřuje do oblastí Jižní Ameriky a Evropy. Konzumace buvolího mléka hraje velmi důležitou nutriční roli osob žijících v rozvojových zemích. V určitých oblastech se vyrábí typické výrobky z buvolího mléka, jako například sýr „Mozzarella“ či máslo ghee (Abd-El Salam et El-Shibiny, 2011). Je to potravina se zajímavým výživovým profilem, ne úplně nepodobným mléku kravskému. Ovšem ve srovnání s bovinním mlékem obsahuje mléko buvolí vyšší obsah tuku, proteinů, laktózy a pevných látek. Uvádí se, že obsah tuku je 2,5-3x vyšší (7,3-8,3 %) než v mléku krav. Buvolí mléko má jasně bílou barvu. Tato skutečnost je způsobená absencí karotenu v tukové frakci a tím, že organismus buvolích dojnic je schopen metabolizovat všechny karoten na vitamin A (retinol), který přechází do mléka. Pro objasnění, mléko krav je typické svou nažloutlou smetanovou barvou právě díky obsahu beta-karotenu (Zava et Sansiřena, 2017; Abd-El Salam et El-Shibiny, 2011).

Materiál a metodika

Použité standardy a chemikálie byly analytického stupně čistoty. *Standardy*: retinol (95%) a tokoferol ($\geq 96\%$) (Sigma-Aldrich, Německo); hydroxid draselný, bezvodý síran sodný, hydrochinon, kyselina askorbová (Penta, ČR); methanol (Fisher Scientific, UK) a n-hexan pro HPLC (Sigma-Aldrich, Německo); 2% roztok fenolftaleinu (Penta, ČR) v ethanolu (Merck, Německo). Byla použita deionizovaná voda (Aqua Osmotic 03 device, ČR). *Instrumentace*: analytické laboratorní váhy Kern ALI 160-4NM (Balingen, Německo), varné magnetické desky (Scott SLR, Německo), ultrazvuková lázeň (Kreintek, Slovensko), orbitální třepačka GFL 3005 (Merci, ČR), třepačka Reax Control (Heidolph Instruments, Německo), vakuová rotační odparka s vodní lázní (Büchi Labortechnik AG Flawil, Švýcarsko), vakuové čerpadlo ME2NT Vacuumbrand (Wertheim, Německo). Mobilní fáze byly přefiltrovány přes membránový filtr (0,2 μm) a odplyněny v ultrazvukové vodní lázni po dobu 15 minut. Vzorky byly filtrovány přes 0,2 μm nylonový stříkačkový filtr. K práci byly použity skleněné, plastové, keramické a kovové laboratorní pomůcky.

Vzorky buvolího mléka

K analýze byly odebrány vzorky syrového buvolího mléka ze dvou buvolích farem ve středních Čechách České republiky. Odběry probíhaly od května do června 2025 v množství 32 vzorků, z toho 24 vzorků od individuálních buvolích dojnic a 8 vzorků bazénových. Vzorky byly zamrazeny ($-24\pm 2^\circ\text{C}$) do stanovení. Ve dni analýzy byly vzorky vytemperovány na teplotu 35°C , ochlazeny na laboratorní teplotu ($22\pm 2^\circ\text{C}$) a naváženy.

Příprava vzorků

Pro saponifikaci vzorku varem bylo použito methanolického roztoku KOH s přídavkem kyseliny askorbové a hydrochinonu ke stabilizaci vzorku. Po provedení extrakce do hexanu byly vzorky promývány do neutrální reakce. Vzorky byly zakoncentrovány a po rozpuštění přefiltrovány k chromatografické analýze. Každý ze vzorků byl připraven v trojím stanovení.

Chromatografická analýza

Pro stanovení vybraných lipofilních vitaminů byl použit kapalinový chromatograf Acquity UPLC (Waters, USA). Kolona Acquity UPLC BEH C8 2,1x100 mm, 1,7 μm (Waters, Irsko) byla použita k separaci analytů. Mobilní fáze byly voda a methanol (7:93); průtok mobilních fází při izokratické eluci byl 0,4 ml/min; teplota na koloně 35°C , doba analýzy 4,5 min. Pro detekci byl použit UV detektor (vitamin A: 325 nm) a fluorescenční detektor (vitamin E: ex. 295 nm/em. 340 nm). Vyhodnocení bylo provedeno metodou kalibrační přímky přes software Empower 2 (Waters, USA).

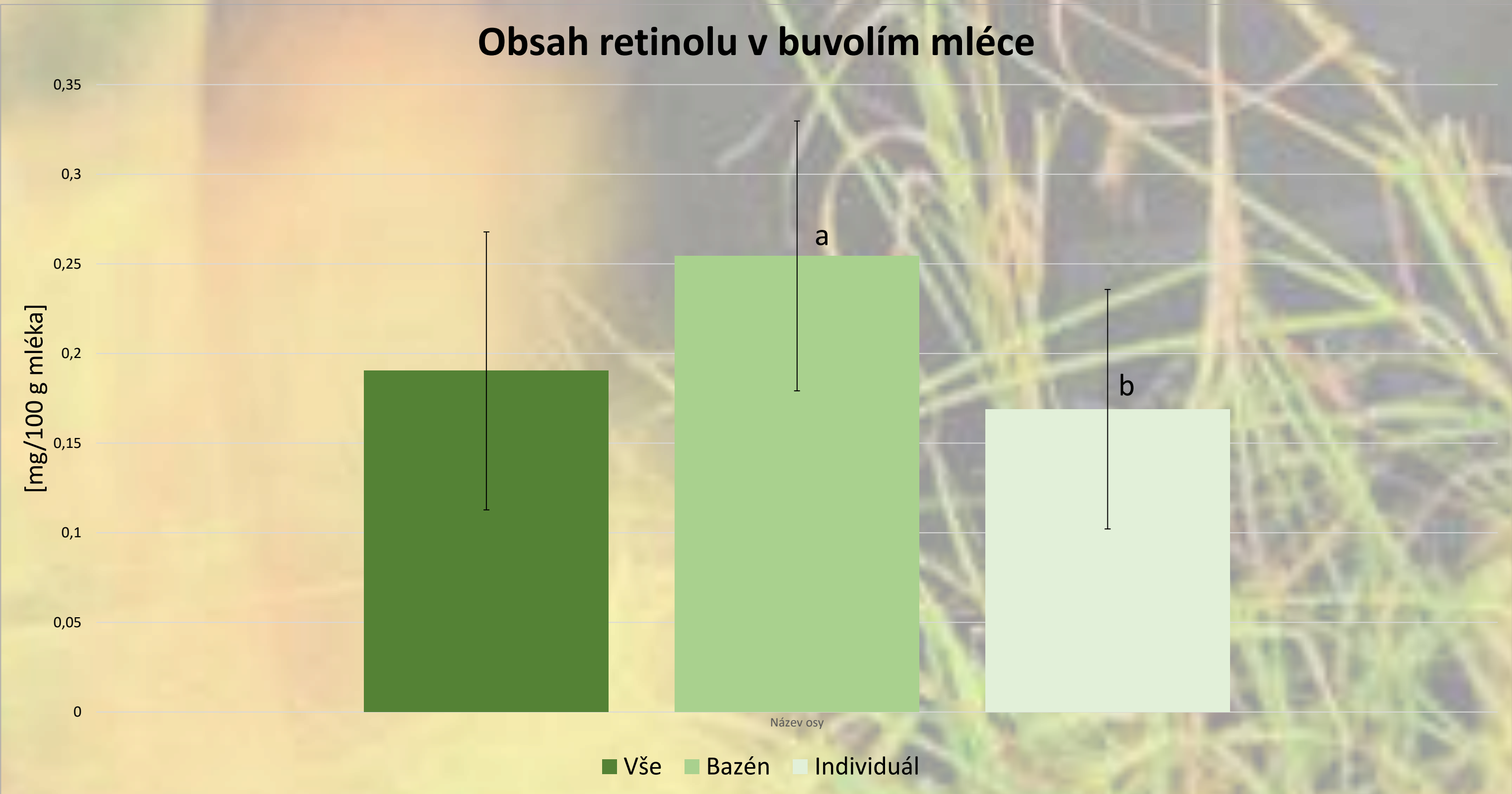
Statistické vyhodnocení

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny programem Microsoft Excel (Microsoft, USA) a Unistat for Excel 6.5 (Londýn, UK) za použití testů normality Shapiro-Wilkova, neparametrického Kruskal-Wallisova a mnohonásobného porovnávání.

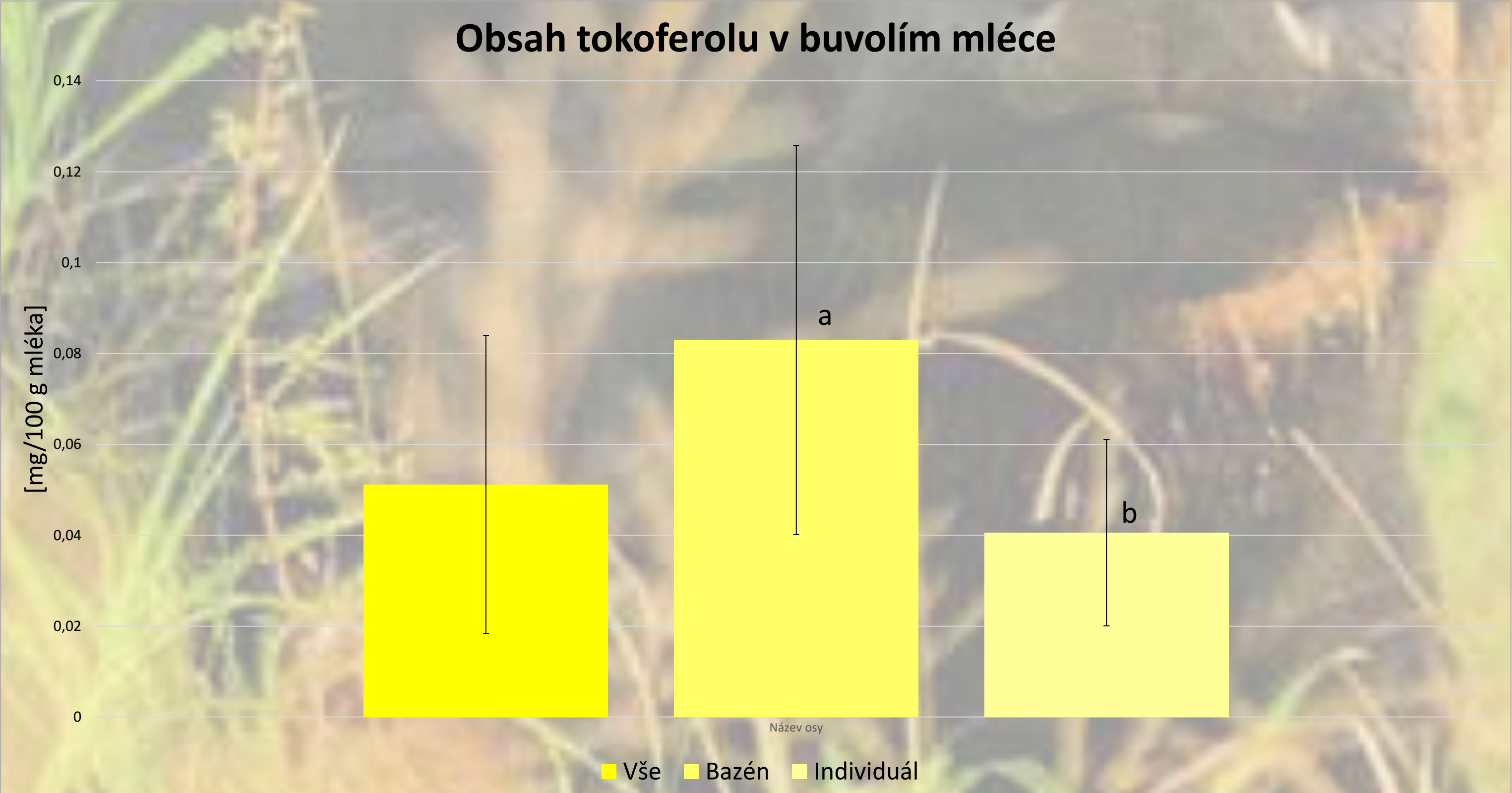
Výsledky a diskuze

Ahmad et al. (2013) uvádějí, že v buvolím mléce je vyšší množství vitaminu A ve srovnání s mlékem kravským. Jeho koncentrace je také ovlivněna ročním obdobím: zima 67,1 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, jaro 73,3 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, léto 48,1 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, podzim 48,4 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$. Autoři také uvádějí, že buvolí mléko má vyšší obsah tokoferolu, nicméně bližší hodnoty uvedeny nejsou. Zato zdroj cituje článek Sahai (1996), kde jsou uvedeny hodnoty vitaminu A 340 IU/ml a vitamin E 334,2 $\mu\text{g}/\text{g}$. Jednotka IU (International Unit) odpovídá 0,3 μg retinolu. Vyšší obsah retinolu v buvolím mléce vysvětlují Ullah et al. (2017) vyšší metabolizací provitaminu beta-karotenu na vitamin A, který přechází do mléka. Gutiérrez-Peña et al. (2018) hodnotili vliv ročního období a pastvy na obsah vitaminů rozpustných v tucích v kozím mléce. Pro vitamin A bylo rozmezí hodnot 51,78-84,97 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, kdy vyšší hodnota převažovala v zimním období, zatímco pro vitamin E bylo rozmezí 109,7-219,62 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ a typické zvýšení během letní pastvy. Starší publikace kolektivu autorů Deschuytere et al. (1987) hodnotila obsah tokoferolu v kolostru a zralém mléce. Hodnoty v kravském mléce byly 5,2-0,9 mg/l. Koncentrace je uváděna sestupně, kdy v kolostru jsou hodnoty vitaminu E vyšší než později ve zralém mléce. Hodulová et al. (2014) hodnotili obsah lipofilních vitaminů v kozím kolostru. Pro retinol byly výsledky v čase 1-132 hodin *post partum*: 14,42-1,00 mg/kg; pro tokoferol: 5,47-1,50 mg/kg. Výsledky jsou opět uváděny v závislosti na čase s klesající tendencí obsahu sledovaných látek. Ke stejným závěrům dospěli i Zava et Sansiřena (2017), které uvádějí hodnoty vitaminu A v buvolím kolostru, a to 1. den produkce kolostra 1,837 % (při obsahu tuku 9,55 %) a 7. den produkce kolostra 0,280 % (při obsahu tuku 7,61 %). Se zralostí mléka klesá obsah tuku i retinolu. Chotyakul et al. (2014) stanovovali obsah vitaminu A v mléce syrovém (0,730-1,075 mg/l), pasterovaném s různým obsahem tuku (0,450-5,540 mg/l) a UHT také s různým obsahem tuku (0,055-1,260 mg/l); a vitamin E v tomtéž pořadí – mléko syrové (0,590-1,125 mg/l), mléko pasterované (0,400-0,930 mg/l) a mléko UHT (0,135-1,410 mg/l). Michlová et al. (2015) naměřili hodnoty retinolu pro ovčí (0,93 $\pm$ 0,07 mg/kg) a kozí (0,79 $\pm$ 0,08 mg/kg) mléko; tokoferolu v ovčím mléce: 2,93 $\pm$ 0,87 mg/kg, v kozím mléce: 1,29 $\pm$ 0,35 mg/kg. Abd-El Salam et El-Shibiny ve svém review z roku 2011 zmiňují přehledné hodnoty retinolu 28,7-30,7 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$; 7,2-12,1 $\mu\text{g}/\text{g}$ tuku; 35,5-190,1 $\mu\text{g}/100\text{ g}$; a tokoferolu 23,8-26,6 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$; 10,1-18,3 $\mu\text{g}/\text{g}$ tuku; 38,0-136,3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$. Uváděné údaje platí pro buvolí mléko.

Hodnoty pro vitamin A a E jsou uvedeny v grafu 1 a 2. Průměrný obsah retinolu 0,190 $\pm$ 0,078 mg/100 g mléka koresponduje s uvedenými publikacemi. Pro obsah tokoferolu 0,051 $\pm$ 0,033 mg/100 g mléka, platí nižší hodnoty, což je přirozené z hlediska hlavního zastoupení tokoferolu v rostlinné stravě. S postupujícím termínem odběru od jarních měsíců k letním je patrný nárůst hodnot obsahu tokoferolu přímo u jednotlivých vzorků (např. květnový odběr: 0,032 $\pm$ 0,004 mg/100 g mléka vs. červnový odběr: 0,133 $\pm$ 0,004 mg/100 g mléka). To mohlo být způsobeno přechodem krmné dávky výhradně na pastvu.



Graf 1 Obsah retinolu v buvolím mléce [mg/100 g mléka]
a, b různá písmenka značí statistickou významnost na hladině $p < 0,05$



Graf 2 Obsah tokoferolu v buvolím mléce [mg/100 g mléka]
a, b různá písmenka značí statistickou významnost na hladině $p < 0,05$

Mléko je velmi prospěšná základní potravina, která obsahuje řadu cenných látek, makro- i mikroživin, které se podílejí spolu s dalšími potravinami na správném vývoji jedince. Z dlouhodobého hlediska mohou přispět k podpoře zdraví a působit preventivně na celou řadu tzv. civilizačních nemocí. Je přínosné pochopit potraviny a jejich obsažené látky jako celek, které spolu spolupracují a vzájemně se potencují. I když obsah lipofilních vitaminů retinolu a tokoferolu je obecně v nízkých koncentracích, tak v mléce svou roli bezesporu mají. Konzumací dalších živočišných a rostlinných potravin můžeme tyto esenciální látky přijímat v požadovaných dávkách a těžit tak z jejich benefitů.