

**Naše studie byla zaměřena na stanovení obsahu cholesterolu, vitamínu A a E v konzumním polotučném mléce ošetřeném metodou ESL (Extended Shelf Life) a změny sledovaných analytů v průběhu pěti týdnů skladování. Pro přípravu vzorku byla zvolena saponifikace a extrakce z kapaliny do kapaliny. Pro analýzu byla použita kapalinová chromatografie s detekcí fluorescenční a v UV oblasti. Koncentrace cholesterolu v průběhu skladování byla naměřena v hodnotách 0,971–2,112 mg/100 ml; vitamínu A 0,027–0,052 mg/100 ml; vitamínu E 0,007–0,027 mg/100 ml. U sledovaných parametrů byl zjištěn v průběhu skladování vzrůstající trend s kolísavým charakterem. Mezi srovnávanými skupinami byly zaznamenány statisticky vysoce významné ( $p < 0,01$ ) i významné ( $p < 0,05$ ) rozdíly.**

Kravné mléko je jedna ze základních potravin ve výživě člověka. Je to vyvážený zdroj plnohodnotných bílkovin a vápníku (Scholz-Ahrens et al., 2020) a jako základní surovina slouží pro další technologické zpracování (Litwinczuk et al., 2012). Mléko je z pohledu bezpečnosti potravin rizikovou surovinou. Je zde tedy nezbytný legislativní dohled. Definice mléka, stejně jako požadavky na produkci jsou zaneseny v nařízení EP a R (EU) č. 1308/2013, v Codex Alimentarius (2011) i v nařízení EP a R (ES) č. 853/2004. Složení mléka je specifické pro daný živočišný druh. Složky mléka se významně podílejí na technologických, reologických a senzorických vlastnostech mléka při jeho zpracování (Samková, 2012; Pereira, 2014; Šustová a Sýkora, 2013; Navrátilová a kol., 2012). Složení mléka je také ovlivněno řadou vnitřních i vnějších faktorů (Navrátilová a kol., 2012; Zamberlin et al., 2012; Haug et al., 2007; Campbell and Marshall, 2016; Pereira, 2014; Guetouache et al., 2014).

Cholesterol a lipofilní vitaminy A a E jsou obsaženy v živočišných potravinách ve větší či menší míře. Jedná se o látky, které mají v lidském organismu specifické funkce na buněčné i systémové úrovni, a proto je jejich příjem pro život nezbytný. V případě cholesterolu je možná jeho syntéza v organismu (Murray, 2012; Drabina, 2020; Kopřiva, 2014; Ledvina a kol., 2009). Cholesterol byl řadu let vnímán jako rizikový faktor při vzniku kardiovaskulárních nemocí, ale tato tvrzení již nejsou v současné době tak striktní, jako v dřívějších letech. Stále je dobré mít na paměti jistou míru rizika u predisponovaných osob, ovšem vyšší hodnoty cholesterolu v krvi mohou souviset celkově s nezdravým životním stylem, včetně špatného stravování, kouření, přemíry stresu, opakovaných infekcí. Doporučení příjmu cholesterolu ze stravy je 300 mg/den (Babička, 2016; Brát, 2017; Kunová, 2011; Frej, 2016; Velíšek, 2002; Kopřiva, 2014).

Vitamin A tvoří skupinu látek, kam jsou zařazeny z potravin živočišného původu retinol, retinal, retinoestery a kyselina retinová; z potravin rostlinného původu zde patří provitamin A – beta-karoten (Debieer et al., 2005; Combs and McClung, 2017). Do skupiny vitamin E patří tokoferoly a tokotrienoly. Jeho hlavní zdroje jsou především potraviny rostlinného původu, zatímco v živočišných je jejich koncentrace nižší (Atkinson et al., 2013; Zingg, 2007; Combs and McClung, 2017; Ball, 2006).

Denní referenční hodnoty příjmu u dospělých osob jsou dle nařízení EP a R (EU) č. 1169/2011 pro vitamin A 800 µg a pro vitamin E 12 mg. Dle doporučení Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) jsou hodnoty odlišné v závislosti na populačních skupinách. Přívod vitamínu A pro dospělého muže je 750 µg/den, pro dospělé ženy 650 µg/den, pro těhotné ženy 700 µg/den a děti 250–750 µg/den (EFSA, 2015a). Denní příjem vitamínu E ve formě alfa-tokoferolu činí pro muže 13 mg, pro ženy 11 mg a pro děti 5–13 mg (EFSA, 2015b).

Cílem této práce bylo stanovení vybraných lipofilních látek (cholesterol, vitamin A, vitamin E) ve vzorcích mléka a sledovat změny koncentrace těchto látek vlivem skladování. Byla vyslovena hypotéza, že s časem dojde k poklesu obsahu těchto látek vlivem oxidace tuků.

## Materiál a metodika

Použité standardy cholesterolu, vitamínu A, vitamínu E a chemikálie byly analytického stupně čistoty. Instrumentace a laboratorní pomůcky, které byly k experimentu použity jsou součástí chemického oddělení pracoviště Ústavu hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie VETUNI Brno.

Pro stanovení byly použity vzorky komerčního polotučného ESL mléka ( $n=12$ ). Mléka byla odebrána ve spotřebitelských obalech přímo z mlékárny v ČR. Po otevření balení byla odebrána část vzorku mléka, z toho byl odstředěn tuk a analyzován jako „čerstvý“. Odstředění tuku a analýzy byly opakovány i po 1., 2., 3. a 4. týdnu skladování v lednici. Pro lepší odběr extra čistého tuku byly vzorky zamrazeny a uchovány do analýzy při teplotě  $-20 \pm 2$  °C.

Ke vzorku odstředěného tuku byl přidán methanolytický roztok KOH; pro stabilizaci sledovaných lipofilních látek byly přidány hydrochinon a kyselina askorbová. Vzorek byl saponifikován během varu. Následně byla provedena extrakce analytů metodou LLE (Liquid Liquid Extraction). Extrakt byl neutralizován deionizovanou vodou do neutrální reakce (indikátor 2% roztok fenolftaleinu). Pro odstranění zbytkové vody z extraktu byl přidán bezvodý síran sodný. Vzorek byl odpařen na vakuové rotační odparce, rekonstituován do methanolu a přefiltrován. Každý vzorek byl zpracován v triplicátu. Celkový počet analyzovaných vzorků byl 180. Obsah tuku byl stanoven acidobutyrometrickou metodou dle ČSN 570530 1972.

Pro stanovení lipofilních látek byl použit kapalinový chromatograf UPLC (Waters, USA). Kolona Acquity UPLC BEH C8 2,1x100 mm, 1,7 µm (Waters, Irsko) byla použita k separaci analytů. Další nastavení: vodná mobilní fáze a organická mobilní fáze (methanol) v poměru 7 : 93; průtok 0,4 ml/min, izokratická eluce; teplota na koloně 35 °C, doba analýzy 4,5 min. Pro detekci byl použit UV detektor (cholesterol: 205 nm, 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).

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.

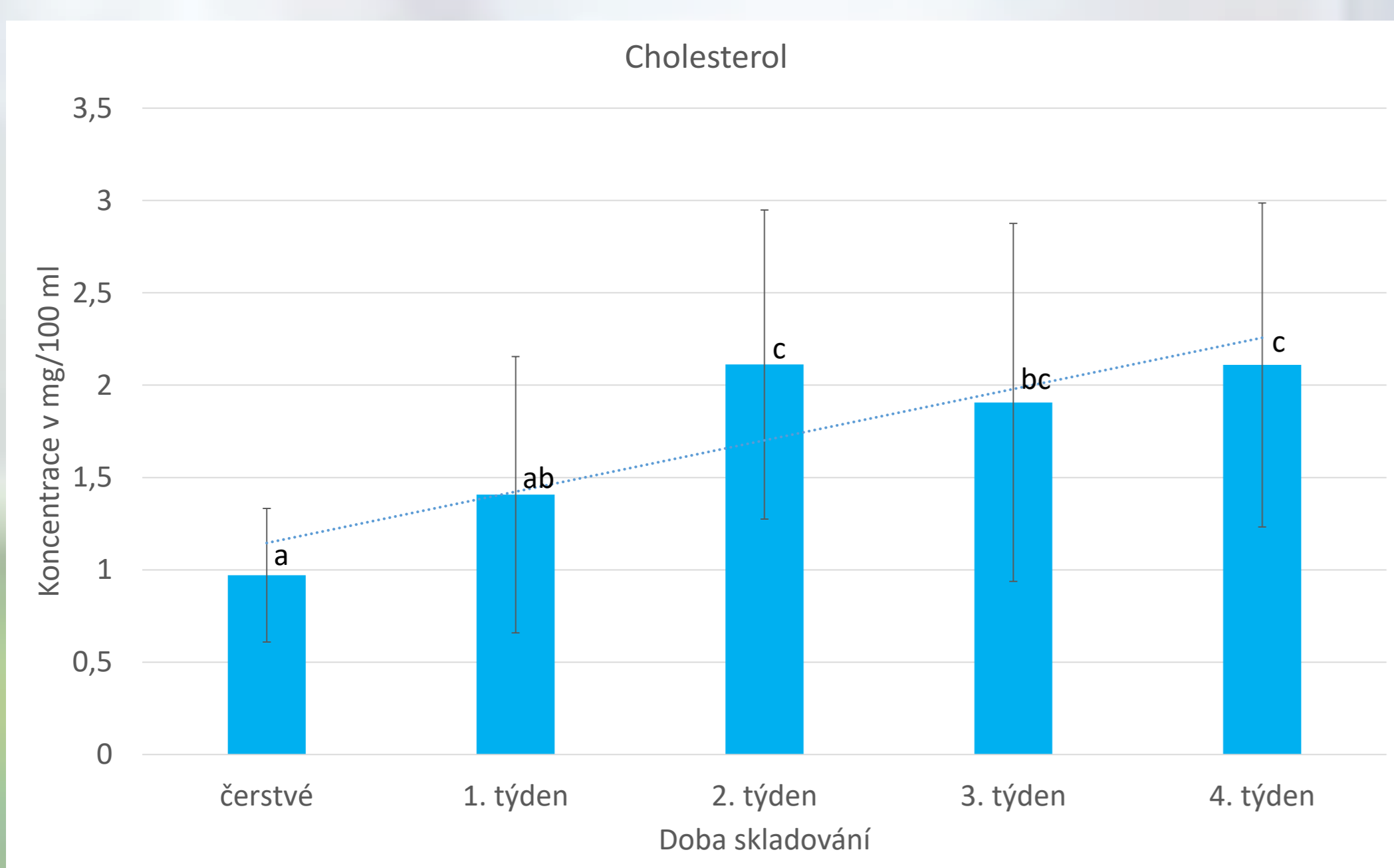
## Výsledky a diskuze

Obsah cholesterolu v mléce v průběhu skladování byl naměřen v rozmezí hodnot 0,971–2,112 mg/100 ml. I když je zaznamenán kolísavý charakter patrný mezi 2. a 4. týdnem skladování, změny koncentrace cholesterolu mají vzrůstající trend. Statisticky vysoce významný rozdíl ( $p < 0,01$ ) byl zaznamenán mezi skupinami „čerstvé“+„2. týden“ a „čerstvé“+„4. týden“. Statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) byl u skupin „čerstvé“+„3. týden“, „1. + 2. týden“, „1. + 4. týden“ (graf 1).

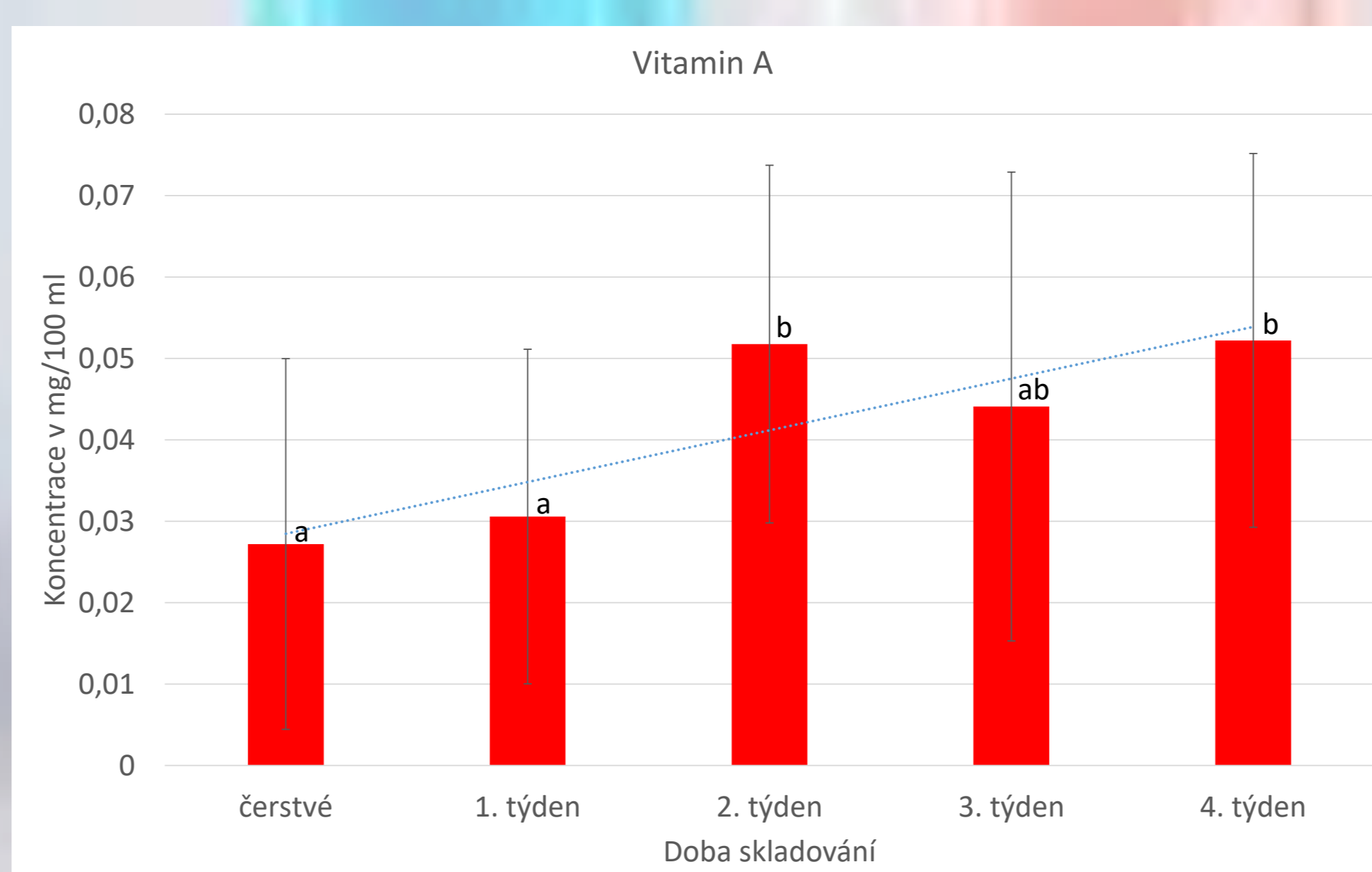
Dle Ramalho et al. (2011) je průměrná hodnota cholesterolu v srovnání mléce 12 mg/100 ml, zatímco u komerčních konzumních mlék se hodnota liší v závislosti na obsahu tuku. Pro plnotučné mléko činí průměrná hodnota 11,6±0,2 mg/100 ml, pro polotučné mléko jsou koncentrace 6,4±0,1 mg/100 ml. Podle studie Piironena z roku 2002 byly zjištěny hodnoty cholesterolu v polotučných mléčích 6,1 mg/100 ml. Jak již bylo řečeno výše, je obsah lipofilních látek závislý na mnoha faktorech, tudíž množství těchto látek je značně variabilní. Roli jistě hraje i vlastní extrakční část při přípravě vzorku. Naše výsledky byly v porovnání s danými studiemi značně nižší.

V současné době je nedostatek vědeckých studií, které by se přímo zabývaly skladováním mléka a příčinami, které vedou ke změně obsahu lipofilních látek. Autoři se shodují, že problematika není zcela prozkoumána. Za možnou příčinu autoři uvádějí vliv oxidace cholesterolu v mléce, objem skladovaného vzorku, typ a uspořádání tukových kuliček (Gupta et al., 2016; Pikul et al., 2013). Byl zkoumán vliv skladování mléka pasterovaného a ošetřeného jak pastecí, tak mikrofiltrací. Mléko bylo skladováno při 4 °C po dobu jednoho týdne. Rozdíl byl zaznamenán pouze 7. den skladování s vyšší koncentrací cholesterolu v pasterovaném mléce. V tomto typu mléka docházelo ke zvyšování obsahu cholesterolu, ovšem bez statistické významnosti. Autoři také zdůrazňují, že není příliš jasný vliv skladování na obsah cholesterolu (Yue et al., 2016). Zajímavá je i studie Patton et al. (1980), kdy byl sledován obsah cholesterolu a fosfolipidů po dobu 24 hodin při 2–4 °C v kravském a kozím mléce. U kravského mléka ke změnám nedocházelo, zatímco kozí mléko vykazovalo podstatné zvyšování v obou parametrech právě vlivem stárnutí mléka. Vliv skladování popisují také Ali and Abdel-Razig (2011) v různých tučných sýrech typu mozzarella po dobu 1 měsíc při 4 °C. Autoři zjistili, že v průběhu skladování se množství cholesterolu zvyšuje. Ovšem také nevytvětlují, čím je nárůst koncentrace cholesterolu zapříčiněn. Sledování změn cholesterolu v jogurtech z kravského a kozího mléka se zabývali Gupta et al. (2016). Experiment probíhal po dobu 4 týdnů při 4 °C. Koncentrace cholesterolu se mírně zvýšila vlivem skladování.

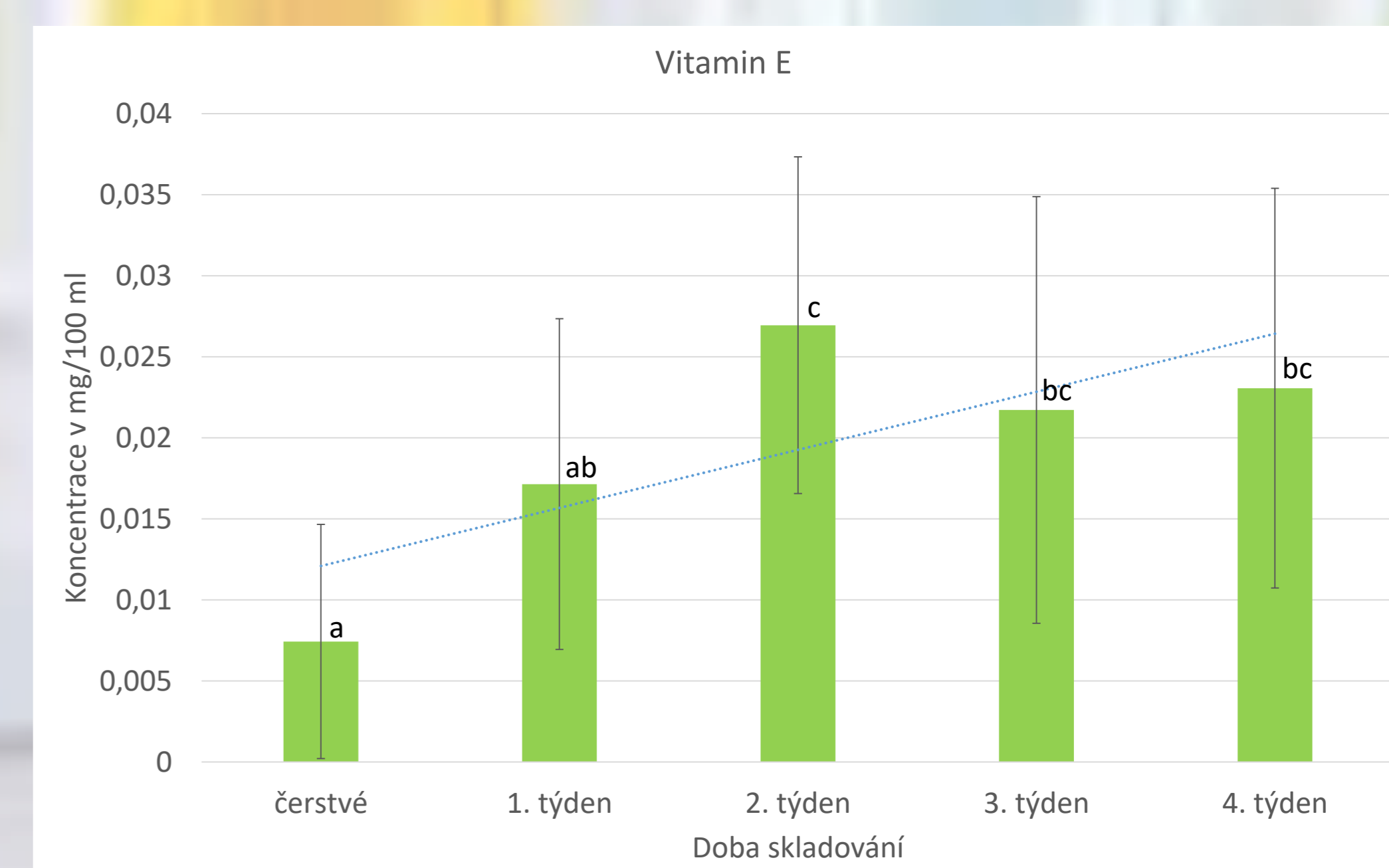
Stejně jako byl zmíněn nedostatek studií hodnocení vlivu skladování mléka u cholesterolu, v případě lipofilních vitaminů je obdobný problém. Vliv skladování je vědeckou literaturou hodnocen především u mlék fortifikovaných, sušených a určených pro kojeneckou výživu. Nutriční profil mléka sledovali Bahman et al. (2012). Vzorky byly vyšetřeny před skladováním a po 24 hodinách při uchování při teplotě 2–8 °C. U vitamínu A autoři pozorovali pokles koncentrace o 26 %. Hodnoty vitamínu E nebyly detekovatelné. Obsah vitaminů studovali v kozím a ovčím mléce také Michlová et al. (2015). Po dvou týdnech skladování při teplotě  $-20$  °C byl zaznamenán pokles o 11–55 %. Chavéz-Servín et al. (2008) zjistili při studii zaměřené na kojeneckou výživu pokles vitamínu A o 4,7–34,3 % během skladování při teplotě 25 °C po dobu 70 dní. Také Fávoro et al. (2011) vyhodnotil pokles vitamínu A v kojenecké výživě po 9. a 12. měsíci skladování o 18,9–28,3 %. Nicméně tyto autoři vyslovili hypotézu o degradaci lipofilních vitaminů v průběhu skladování. U většiny vzorků došlo ale k navýšení jejich koncentrace. Jejich hypotéza tedy nebyla potvrzena. Ve studii MacDonald et al. (2011) také pozorovali zvýšení koncentrace lipofilních vitaminů. Jejich vědecká práce byla více zaměřena na použití různých pasteračních podmínek. Autoři zaznamenali statisticky významné rozdíly u sedmi z osmi provedených analýz v kozím, kozím a ovčím mléce. V grafech 2 a 3 jsou zaznamenány změny koncentrací vlivem skladování u vitamínu A i E. Obsah vitamínu A byl naměřen v hodnotách 0,027–0,052 mg/100 ml, zatímco obsah vitamínu E byl v nižších hodnotách od 0,007 do 0,027 mg/100 ml. U obou lze pozorovat kolísavý průběh a mírnou vzrůstající tendenci v průběhu pěti týdnů. U vitamínu A byl statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi skupinami „čerstvé“+„2. týden“, „čerstvé“+„4. týden“, „1. + 2. týden“ a „1. + 4. týden“. Pro vitamin E byl rozdíl statisticky vysoce významný ( $p < 0,01$ ) mezi skupinami „čerstvé“+„2. týden“, „čerstvé“+„3. týden“ a „čerstvé“+„4. týden“. Z výsledků naší práce lze usoudit, že koncentrace vitamínu A ve vzorcích mléka dosahovala vyšších hodnot vlivem skladování, než toho bylo u vitamínu E. Je to dáno i tím, že obsah vitamínu E je v kravském mléce a mléčných výrobcích minimální v porovnání s vitamínem A (Morrissey and Hill, 2009). Validací parametry metody jsou uvedeny v tabulce 1.



**Graf 1** Vliv skladování na obsah cholesterolu v konzumním mléce (abc, rozdílná písmenka značí statistickou významnost na hladině  $p < 0,01$  nebo  $p < 0,05$ )



**Graf 2** Vliv skladování na obsah vitamínu A v konzumním mléce (abc, rozdílná písmenka značí statistickou významnost na hladině  $p < 0,01$  nebo  $p < 0,05$ )



**Graf 3** Vliv skladování na obsah vitamínu E v konzumním mléce (abc, rozdílná písmenka značí statistickou významnost na hladině  $p < 0,01$  nebo  $p < 0,05$ )

**Tabulka 1** Validací parametry metody pro stanovení lipofilních látek v mléce

		Cholesterol	Vitamin A	Vitamin E
Linearita	Rozmezí [mg/l]	0,962–96,200	0,152–15,200	0,156–15,600
	R <sup>2</sup>	0,9999	0,9999	0,9999
Přesnost	Ø* [mg/l]	32,421	0,917	0,504
	SD	0,222	0,005	0,009
	RSD	0,684	0,578	1,762
Správnost	Ø** [mg/l]	32,430	0,916	0,507
	SD	0,256	0,006	0,009
	RSD	0,789	0,641	1,686
LOQ	[mg/l]	0,962	0,152	0,156
LOD	[mg/l]	0,289	0,046	0,047

R<sup>2</sup>, korelační koeficient; Ø\*, průměr z 12 paralelních stanovení; Ø\*\*, průměr z 9 paralelních stanovení; SD, směrodatná odchylka; RSD, relativní směrodatná odchylka; LOQ, limit kvantifikace; LOD, limit detekce

**Lipofilní látky v mléce v průběhu skladování po dobu pěti týdnů vykázaly ve většině vzorků stoupající trend. Téma je velmi specifické a odborná literatura se shoduje, že v současnosti není tato problematika dostatečně prozkoumána. Není proto snadné výsledky jednoznačně interpretovat. V této oblasti je potřeba dalších výzkumů. Naše hypotéza o poklesu lipofilních látek vlivem skladování nebyla potvrzena.**

**Obsah cholesterolu v konzumním mléce je nízký. Přiměřená konzumace mléka pro zdravé osoby je vhodná. Nadměrná konzumace potravin s obsahem nasycených mastných kyselin, trans-mastných kyselin a cukrů, má větší vliv na množství cholesterolu v krvi, než konzumace mléka samotná. Přestože je koncentrace lipofilních vitaminů nízká, mléko a mléčné výrobky nadále zůstávají jejich dobrým zdrojem.**