



Σχολή Θετικών Επιστημών και Τεχνολογίας
Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών «Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία
**«Σύγχρονες Μέθοδοι Προσδιορισμού Μικροθρεπτικών και
Βιοδραστικών Λιπιδικών Συστατικών Μητρικού Γάλακτος »**

Μιράντα Ζαγιάκου

Επιβλέπων Καθηγητής : Κωνσταντίνος Τσιαφούλης

Πάτρα, Ιανουάριος 2025

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του/της φοιτητή/φοιτήτριας («συγγραφέας/δημιουργός») που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο/η συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του/της συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του/της συγγραφέα/δημιουργού. Ο/Η συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

**«Σύγχρονες Μέθοδοι Προσδιορισμού Μικροθρεπτικών και
Βιοδραστικών Λιπιδικών Συστατικών Μητρικού Γάλακτος »**

Μιράντα Ζαγιάκου

Επιτροπή Επίβλεψης Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Κωνσταντίνος Τσιαφούλης, PhD

Μέλος ΣΕΠ του ΕΑΠ

Μέλος ΕΔΙΠ Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Ευάγγελος Μπακέας, PhD

Καθηγητής Αναλυτικής Χημείας,

Τμήμα Χημείας

Εθνικό και Καποδιστριακό

Πανεπιστήμιο Αθηνών

Πάτρα, Ιανουάριος 2025

«Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέπωντα καθηγητή μου, κ. Κωνσταντίνο Τσιαφούλη για την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση και την κατανόηση του καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου. Επίσης ευχαριστώ πολύ τους γονείς μου, τα αδέρφια μου, τις φίλες μου και τον άντρα μου που με στήρηξαν κάθε στιγμή για να ολοκληρώσω τις μεταπτυχιακές μου σπουδές.

Αφιερώνω την διπλωματική μου εργασία στην κόρη μου, Βικτώρια!»

Περίληψη

Το μητρικό γάλα αποτελεί την βέλτιστη διατροφική πηγή για βρέφη λόγω της ιδιαίτερα πλούσιας σύνθεσής του σε θρεπτικά στοιχεία και βιοδραστικές ενώσεις, που συμβάλλουν στην υγεία, την ανάπτυξη και την ανοσοποιητική προστασία των βρεφών. Η σύσταση του μητρικού γάλακτος εξελίσσεται καθ' όλη τη διάρκεια της γαλουχίας και παρουσιάζει μεταβολές ανάλογα με τις μητέρες και τις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, το μητρικό γάλα προσαρμόζεται στις ανάγκες του βρέφους. Τα μικροθρεπτικά και τα βιοδραστικά λιπιδικά συστατικά του μητρικού γάλακτος παίζουν σημαντικό ρόλο.

Στην παρούσα εργασία γίνεται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση των σύγχρονων μεθόδων, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό βιταμινών, ιχνοστοιχείων και βιοδραστικών λιπιδικών συστατικών στο μητρικό γάλα. Η ανάλυση και ερμηνεία των δεδομένων από αυτές τις σύγχρονες μεθόδους προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες για την καλύτερη κατανόηση των διατροφικών αναγκών των βρεφών και ενδεχομένως για την ανάπτυξη πιο εξειδικευμένων διατροφικών συμβουλών και παρεμβάσεων.

Λέξεις – Κλειδιά

Μητρικό γάλα, σύγχρονες μέθοδοι προσδιορισμού, μικροθρεπτικά, βιοδραστικά λιπιδικά συστατικά

«Modern Methods for the Determination of Micronutrients and Bioactive Lipid Components in Human Milk»

«Miranda Zajaku»

Abstract

Human breast milk (HBM) is considered the optimal nutritional source for infants due to its rich composition in nutrients and bioactive compounds that contribute to health, development, and immune protection. The composition of HBM evolves throughout lactation and varies among mothers and different environmental conditions. Specifically, breast milk adapts to the needs of the infant. The micronutrients and bioactive lipid components of breast milk play a crucial role.

This thesis conducts a bibliographic review of modern methods used to determine vitamins, trace elements, and bioactive lipid components in breast milk. The analysis and interpretation of data from these modern methods provide valuable information for a better understanding of infants' nutritional needs and may potentially lead to the development of more specialized dietary advice and interventions.

Keywords

Breast milk, modern methods of determination, micronutrients, bioactive lipid components

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	v
Abstract	vi
Περιεχόμενα	vii
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων	viii
Κατάλογος Πινάκων	ix
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια.....	x
Εισαγωγή.....	1
1. Μητρικό γάλα.....	2
1.1 Εισαγωγή.....	2
1.2 Σύσταση μητρικού γάλακτος.....	4
1.2.1 Μακροθρεπτικά συστατικά.....	4
1.2.1.1 Υδατάνθρακες.....	5
1.2.1.2 Πρωτεΐνες μητρικού γάλακτος.....	5
1.2.1.3 Λίπος μητρικού γάλακτος και βιοδραστικά λιπιδικά συστατικά.....	7
1.2.2 Μικροθρεπτικά Συστατικά.....	11
1.2.2.1 Βιταμίνες και μέταλλα.....	11
1.3 Σύσταση Μητρικού γάλακτος και πρόωρα νεογνά.....	14
1.4 Προφίλ λιπαρών οξέων του μητρικού γάλακτος κατα τα στάδια της γαλουχίας.....	14
2.Σύγχρονες μέθοδοι προσδιορισμού επιλεγμένων μικροθρεπτικών συστατικών μητρικού γάλακτος.....	16
2.1 Σύγχρονες μέθοδοι προσδιορισμού Βιταμίνης D στο μητρικό γάλα.....	16
2.2 Σύγχρονες μέθοδοι προσδιορισμού Βιταμίνης K στο μητρικό γάλα.....	19
2.3 Σύγχρονες μέθοδοι προσδιορισμού σιδήρου στο μητρικό γάλα.....	20
2.4 Σύγχρονες μέθοδοι προσδιορισμού ιωδίου στο μητρικό γάλα.....	25
3.Σύγχρονες μέθοδοι προσδιορισμού βιοδραστικών λιπιδικών συστατικών μητρικού γάλακτος.....	26
3.1 Προετοιμασία δείγματος.....	27
3.1.1 Δειγματοληψία	27
3.1.2 Αποθήκευση.....	31
3.1.3 Μέθοδοι εκχύλισης λίπους.....	31
3.1.4 Μεθυλεστεροποίηση λιπιδίων.....	33
3.2 Αναλυτικές μέθοδοι.....	33
4. Συμπεράσματα.....	40
5. Βιβλιογραφία.....	42

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1. Αναπαράσταση του μηχανισμού και των οφελών του θηλασμού, καθώς και των συστατικών του μητρικού γάλακτος και της επίδρασής τους στην ανάπτυξη του βρέφους	2
Εικόνα 2. Συγκρίσεις συγκεντρώσεων πρωτεϊνών στο γάλα από μητέρες που γέννησαν πρόωρα και κανονικά, ανάλογα με την εβδομάδα κύησης κατά τον τοκετό και τις εβδομάδες μετά τον τοκετό	6
Εικόνα 3. Επίδραση των λιπιδίων του ανθρώπινου μητρικού γάλακτος στα βρέφη	7
Εικόνα 4. Η πηγή των απαραίτητων λιπαρών οξέων στο μητρικό γάλα. ALA – α-λινολενικό οξύ, LA – λινελαϊκό οξύ	10
Εικόνα 5. Τα λιπαρά οξέα στο μητρικό γάλα, Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα- MUFA, Μεσαίας αλυσίδας λιπαρά οξέα- MCFA, Μακράς αλυσίδας πολυακόρεστα λιπαρά οξέα- LCPUFA, inoleic acid (C18:2 n-6; LA), α-linolenic acid (C18:3 n-3; ALA), Arachidonic acid (C20:4 n-6; AA), Eicosapentaenoic acid (C20:5 n-3; EPA) and Docosahexaenoic acid (C22:6 n-3; DHA). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό (% βάρος/βάρος) όλων των ανιχνευθέντων λιπαρών οξέων.....	10
Εικόνα 6. Συγκέντρωση των Zn, Fe και Cu σε δείγματα ανθρώπινου γάλακτος την πρώτη ημέρα μετά τον τοκετό. Τα κουτιά αντιπροσωπεύουν το διάμεσο και τα ποσοστά 25ου και 75ου εκατοστημορίου· τα μουστάκια αντιπροσωπεύουν το εύρος χωρίς ακραίες τιμές ...	24
Εικόνα 7. Μια περίληψη της διαδικασίας ανάλυσης λιπιδιώματος του μητρικού γάλακτος , Εκχύλιση λιπιδίων (Lipid extraction), Απόκτηση δεδομένων (Data acquisition), Ανάλυση φασματικών δεδομένων (Spectral data analysis), Βιοπληροφορική ανάλυση (Bioinformatics) και Προφίλ λιπιδίων (Lipids profile).....	27
Εικόνα 8. Υγρή-υγρή εκχύλιση λιπιδίων ανθρώπινου γάλακτος χρησιμοποιώντας (i) τη μέθοδο εκχύλισης Folch ή (ii) την εκχύλιση με μεθυλικό τερτ-βουτυλού εστέρα.....	32

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Σύγκριση μακροθρεπτικών συστατικών του πρωτογάλακτος (colostrum), του ώριμου μητρικού γάλακτος (mature milk) και της βρεφικής φόρμουλας βασισμένης στο αγελαδινό γάλα (bovine formula).....	3
Πίνακας 2. Σύσταση μητρικού γάλακτος.....	4
Πίνακας 3. Σύγκριση σύστασης μικροθρεπτικών συστατικών πρωτογάλακτος , ώριμου μητρικού γάλακτος με βρεφική φόρμουλα αγελαδινού γάλακτος.....	11
Πίνακας 4. Το αντίκτυπο διάφορων μετάλλων στην ανάπτυξη του παιδιού και τα συνιστώμενα συμπλήρωματα για θηλάζουσες.....	12
Πίνακας 5. Οι βασικές λειτουργίες και η σημασία της συμπλήρωσης για τις βιταμίνες D και K σε βρέφη.....	13
Πίνακας 6. Τεχνικές ανάλυσης ιχνοστοιχείων(σιδήρου & ιωδίου) στο μητρικό γάλα.....	21
Πίνακας 7. Παράμετροι ρυθμίσεων του οργάνου ICP-OES.....	23
Πίνακας 8. Επικύρωση μεθόδου ανάλυσης Πηγή.....	23
Πίνακας 9. Προσδιορισμός λιπιδίων μητρικού γάλακτος με υγροχρωματικές μεθόδους.....	29
Πίνακας 10. Προσδιορισμός λιπαρών οξέων και λιπιδίων μητρικού γάλακτος με αεριοχρωματογραφικές μεθόδους.....	30

Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

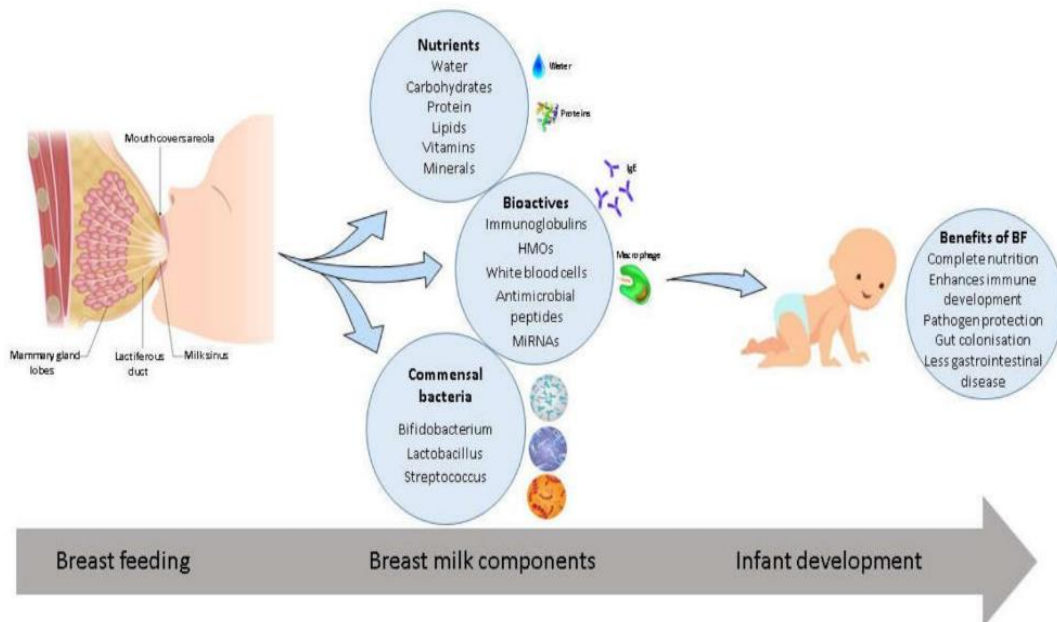
WHO	World Health Organization
HBM	Human Breast Milk
LC	Liquid Chromatography
GC	Gas Chromatography
MS/MS	Tandem Mass Spectroscopy
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
AAS	Atomic Absorption Spectroscopy
BF	Breast Feeding
LA	linoleic acid
ALA	α -linolenic acid
ARA	arachidonic acid
DHA	docosahexaenoic acid
MFGM	milk fat globule membrane
TG	triacylglycerol
LC-PUFA	long chain polyunsaturated fatty acid
PUFA	polyunsaturated fatty acid

Εισαγωγή

Μια από τις βασικές ανάγκες του ανθρώπου είναι η διατροφή του. Η κάλυψη της ανάγκης αυτής σχετίζεται άμεσα με τη διατήρηση στη ζωή. Όλο και περισσότερες έρευνες ασχολούνται με την επίδραση της διατροφής στην ποιότητα της ζωής του σύγχρονου ανθρώπου. Για την βρεφική ηλικία ήταν πάντα γνωστό το μοντέλο της διατροφής. Το μητρικό γάλα αποτελεί την βέλτιστη πηγή διατροφής για το νεογέννητο βρέφος.(Eriksen et al., 2018) Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO-World Health Organization) συνιστά τον αποκλειστικό θηλασμό για τους πρώτους 6 μήνες της ζωής του βρέφους, και τη συνέχιση του θηλασμού έως και τα 2 χρόνια ή και περισσότερο σε συνδυασμό με τις στερεές τροφές. Πολλές έρευνες έχουν εξετάσει πώς αυτή η πρακτική σχετίζεται με την υγιή ανάπτυξη του βρέφους. Όσον αφορά την ανάπτυξη, ο θηλασμός συνδέεται με χαμηλότερα ποσοστά αύξησης του βάρους και μήκος κατά τη βρεφική ηλικία μετά τους δύο μήνες, σε σύγκριση με τη χρήση γάλακτος φόρμουλας, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι ο θηλασμός προστατεύει από την παχυσαρκία αργότερα στη ζωή.(Horta et al., 2015; Victora et al., 2016) Μια αναντικατάστατη πηγή θρεπτικών ουσιών θεωρείται το μητρικό γάλα (HBM) για την πρώιμη ανάπτυξη του ανθρώπου επειδή παρέχει συστατικά τα οποία ενισχύουν την ανάπτυξη των βρεφών. Όμως περιέχει και ποικίλες ανοσολογικές ουσίες με αντιμολυσματικές ιδιότητες και κρίσιμο ρόλο στη διαμόρφωση της ανοσίας. (Yi & Kim, 2021) Η παρουσία μικροθρεπτικών και βιοδραστικών λιπιδικών συστατικών στο μητρικό γάλα είναι κρίσιμη, καθώς μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την υγεία του βρέφους, την αναπτυξιακή του πορεία, τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και την ομαλή λειτουργία των οργάνων του. Ο σκοπός της εργασίας αυτής είναι να μελετήσουμε και να αναλύσουμε σύγχρονες μεθόδους προσδιορισμού μικροθρεπτικών και βιοδραστικών λιπιδικών συστατικών στο ανθρώπινο μητρικό γάλα.

1. Μητρικό γάλα

1.1 Εισαγωγή



Εικόνα 1. Αναπαράσταση του μηχανισμού και των οφελών του θηλασμού, καθώς και των συστατικών του μητρικού γάλακτος και της επίδρασής τους στην ανάπτυξη του βρέφους
Πηγή (Lyons et al., 2020)

Το μητρικό γάλα είναι ένας ζωντανός, δυναμικός ιστός, πλούσιος σε αμυντικούς παράγοντες, που προστατεύουν συνεχώς το νεογνό από λοιμώξεις. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς το ανοσοποιητικό του σύστημα δεν έχει ακόμα αναπτυχθεί πλήρως για να του παρέχει αποτελεσματική άμυνα. Επιπλέον, η σύνθεση του μητρικού γάλακτος προσαρμόζεται, παρέχοντας στο βρέφος τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά σε κάθε στάδιο της ανάπτυξής του. Αυτή η ιδιότητα το καθιστά καθοριστικό για τη σωστή ανάπτυξη και υγεία του παιδιού. Σε παγκόσμιο επίπεδο, το μητρικό γάλα αναγνωρίζεται ως αναντικατάστατη τροφή, χάρη στη μοναδική του σύσταση, η οποία προσαρμόζεται στις ανάγκες του βρέφους, ανάλογα με την ηλικία του και τον χρόνο γέννησής του. (Andreas et al., 2015a; Ballard & Morrow, 2013)

Η εικόνα 1. απεικονίζει μια συνοπτική αναπαράσταση του μηχανισμού και των οφελών του θηλασμού, καθώς και των συστατικών του μητρικού γάλακτος και της επίδρασής τους στην ανάπτυξη του βρέφους. Αποτελείται από τρία βασικά μέρη:

- 1) **Θηλασμός (Breast feeding):** Αριστερά, δείχνει την ανατομία του μαστού και την παραγωγή γάλακτος στους γαλακτοφόρους πόρους.
- 2) **Συστατικά του Μητρικού Γάλακτος (Breast milk components):** Στο κέντρο, παρουσιάζεται μια λεπτομερής ανάλυση των διάφορων συστατικών του μητρικού γάλακτος, χωρισμένα σε:

- ✓ Θρεπτικά συστατικά (όπως νερό, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπίδια, βιταμίνες, μέταλλα και άλλα),
- ✓ Βιοδραστικές ουσίες (όπως ανοσοσφαιρίνες, HMOs, λευκά αιμοσφαίρια, αντιμικροβιακά πεπτίδια, MIRNAS),
- ✓ Συμβιωτικά βακτήρια (όπως Bifidobacterium, Lactobacillus, Streptococcus).

3) Οφέλη του Θηλασμού και Ανάπτυξη του Βρέφους (Benefits of BF and Infant development): Δεξιά, εξηγεί πώς τα συστατικά του μητρικού γάλακτος συμβάλλουν σε διάφορες πτυχές της υγείας και ανάπτυξης του βρέφους, όπως προστασία ενάντια σε παθολόγια, ενίσχυση της ανάπτυξης του ανοσοποιητικού, πλήρη διατροφή, προώθηση της αποίκησης του εντέρου, και μειωμένα περιστατικά γαστρεντερικών νόσων.

Συνολικά, η εικόνα αυτή παρέχει μια ολοκληρωμένη άποψη για τον τρόπο που ο θηλασμός επηρεάζει θετικά την υγεία και την ανάπτυξη του βρέφους μέσα από την ποικιλία των συστατικών του μητρικού γάλακτος. (Lyons et al., 2020)

Το μητρικό γάλα διακρίνεται σε τρεις βασικές φάσεις, στις οποίες αλλάζει η σύσταση του κατά τη διάρκεια της γαλουχίας:

Το πύαρ (πρωτόγαλα-colostrum) είναι το γάλα που παράγεται από την 1η έως την 4η ημέρα της ζωής του νεογέννητου και χαρακτηρίζεται από το κιτρινωπό χρώμα του, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε καροτενοειδή. Περιέχει αυξημένες ποσότητες νατρίου, χλωρίου, πρωτεϊνών, ανοσοσφαιρινών, λευκοκυττάρων και λακτοφερίνης, ενώ τα επίπεδα λίπους, καζεΐνης και λακτόζης είναι χαμηλότερα. Ο κύριος ρόλος του πρωτογάλακτος είναι ανοσολογικός, παρέχοντας εκκριτική ανοσοσφαιρίνη Α (sIgA) και ολιγοσακχαρίτες (HMO), των οποίων η συγκέντρωση είναι διπλάσια από αυτή στο ώριμο γάλα. Επιπλέον, το πρωτόγαλα περιέχει αυξητικούς παράγοντες όπως EGF(epidermal growth factor) , TGF-β και CSF-1 (colony-stimulating factor-1), υποστηρίζοντας όχι μόνο την ανοσολογική προστασία αλλά και την ανάπτυξη του νεογνού.

Το μεταβατικό γάλα (transitional milk) παράγεται από την 4η έως τη 14η ημέρα μετά τη γέννηση του μωρού και χαρακτηρίζεται από την προσαρμογή της ποσότητάς του και τη σταδιακή αλλαγή στη σύνθεση και την εμφάνισή του. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, η παραγωγή γάλακτος αυξάνεται σημαντικά. Οι ποσότητες των ανοσοσφαιρινών και των πρωτεϊνών μειώνονται σταδιακά, ενώ αντίθετα, τα επίπεδα των λιπιδίων και των σακχάρων αυξάνονται, παρέχοντας στο βρέφος την αναγκαία ενέργεια για την ανάπτυξή του.

Το ώριμο μητρικό γάλα (mature milk) παράγεται μετά τη 14η ημέρα από την έναρξη του θηλασμού. Η ποσότητα του γάλακτος που παράγει η μητέρα προσαρμόζεται στις ανάγκες του μωρού και κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 600 και 900 ml ημερησίως, ανάλογα με το βάρος του βρέφους. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα μωρά τείνουν να καταναλώνουν μεγαλύτερες ποσότητες γάλακτος κατά τη διάρκεια της νύχτας. (Andreas et al., 2015a) (Ballard & Morrow, 2013) Στον Πίνακα 1. παρουσιάζεται μια σύγκριση δεδομένων για το περιεχόμενο θερμίδων, υδατανθράκων, λακτόζης, ολιγοσακχαριτών, πρωτεΐνης και συνολικού λίπους σε διαφορετικά είδη γάλακτος, συγκεκριμένα σε κολόστρουμ

(Colostrum, γάλα των πρώτων 1-5 ημερών μετά τον τοκετό), ώριμο μητρικό γάλα (Mature milk, μετά τις 14 ημέρες) και αγελαδινό βρεφικό γάλα (Bovine formula). (Kim & Yi, 2020)

Variable	Colostrum ^{a)} (1-5 days)	Mature milk ^{a)} (>14 days)	Bovine formula ^{b)} (minimum-maximum)
Energy	50-60 kcal/100 mL	65-70 kcal/100 mL	60-70 kcal/100 mL
Carbohydrate	50-62 g/L	60-70 g/L	9.0-14.0 g/100 kcal
Lactose	20-30 g/L	67-70 g/L	
Oligosaccharides	20-24 g/L	12-14 g/L	
Total protein	14-16 g/L	8-10 g/L	1.8-3.0 g/100 kcal
Total fat	15-20 g/L	35-40 g/L	4.4-6.0 g/100 kcal

Πίνακας 1. Σύγκριση σύστασης πρωτογάλακτος, ώριμου μητρικού γάλακτος και αγελαδινού βρεφικού γάλακτος (Bovine Formula)

Πηγή (Kim & Yi, 2020)

1.2 Σύσταση μητρικού γάλακτος

Η σύσταση του μητρικού γάλακτος ήταν πάντα σημαντική για τους ερευνητές. Πρώτη φορά παρατηρήθηκε το 1960 από τους Karmakar & Ramakrishnan, ότι στις αναπτυσσόμενες χώρες το μητρικό γάλα των γυναικών έχει μικρότερο ποσοστό λίπους και πρωτεϊνών σε σύγκριση με αυτό των γυναικών στις αναπτυγμένες χώρες. Το 1979 κατάφερε ο Jenness να καταγράψει με λεπτομέρεια τη σύσταση του ώριμου ανθρώπινου γάλακτος. Πιο συγκεκριμένα μελέτησε τις συγκεντρώσεις κάποιων συστατικών όπως σιδήρου, πρωτεϊνών, χαλκού, ψευδαργύρου και λιπαρών οξέων. (R Jenness, n.d.) Το μητρικό γάλα αποτελείται περίπου από 87% νερό, 1% πρωτεΐνη, 4% λιπίδια και 7% υδατάνθρακες, συμπεριλαμβανομένων 1 έως 2,4% ολιγοσακχαριτών. Περιέχει επίσης πολλά μέταλλα όπως Ασβέστιο, Φώσφορο, Μαγνήσιο, Κάλιο, Νάτριο κ.λπ. και πολλές βιταμίνες. (Boquien, 2018)

Συστατικά	Ποσοστό περιεκτικότητας
Νερό	85-90%
Λίπος	3-5%
Πρωτεΐνες	0,8-0,9%
Λακτόζη	6,9-7,2%
Ανόργανα Άλατα	0,2%

Πίνακας 2. Σύσταση μητρικού γάλακτος Πηγή : (R Jenness, n.d.)

Το μητρικό γάλα αποτελεί την ιδανική τροφή για τα βρέφη, αποτέλεσμα εκατομμυρίων ετών εξέλιξης, κατά τη διάρκεια των οποίων προσαρμόστηκε με ακρίβεια στις ανάγκες του βρέφους. (Andreas et al., 2015b) Τα θρεπτικά συστατικά του ανθρώπινου γάλακτος προέρχονται από τρεις πηγές: α) από τη σύνθεση στα γαλακτοκύτταρα β) διαιτητικής προέλευσης και γ) από τα μητρικά αποθέματα. Συνολικά, η διατροφική ποιότητα του ανθρώπινου γάλακτος διατηρείται σε μεγάλο βαθμό, αλλά η προσοχή στη διατροφή της μητέρας είναι σημαντική για ορισμένες βιταμίνες και τη σύνθεση λιπαρών οξέων του ανθρώπινου γάλακτος. (Ballard & Morrow, 2013)

1.2.1 Μακροθρεπτικά συστατικά

Το ώριμο μητρικό γάλα περιέχει συνήθως 65-70 kcal ανά 100 mL, με το 50% της ενέργειάς του να προέρχεται από λίπη και το 40% από υδατάνθρακες. Σε αντίθεση με τις βρεφικές φόρμουλες, που έχουν αυστηρά καθορισμένη σύνθεση βάσει κατευθυντήριων γραμμών και επιδράσεων στην υγεία των βρεφών, η σύσταση του μητρικού γάλακτος είναι ευέλικτη και μεταβάλλεται λόγω πολλών παραγόντων. Η σύνθεσή του επηρεάζεται από τη διατροφή και τη φυσιολογία της μητέρας, την υγεία της, καθώς και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Επιπλέον, η σύνθεση του γάλακτος διαφέρει ανάλογα με το αν πρόκειται για πρωτόγαλα, μεταβατικό ή ώριμο γάλα, ενώ μπορεί να επηρεαστεί από διαδικασίες επεξεργασίας όπως αποθήκευση και παστερίωση. Κατά τη διάρκεια του θηλασμού, το αρχικό γάλα (foremilk), που απελευθερώνεται πρώτο, έχει χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λίπος, ενώ το τελικό γάλα (hindmilk) έχει υψηλότερη συγκέντρωση λιπιδίων. Αντίθετα, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λακτόζη παραμένει σχετικά σταθερή. (Kim & Yi, 2020)

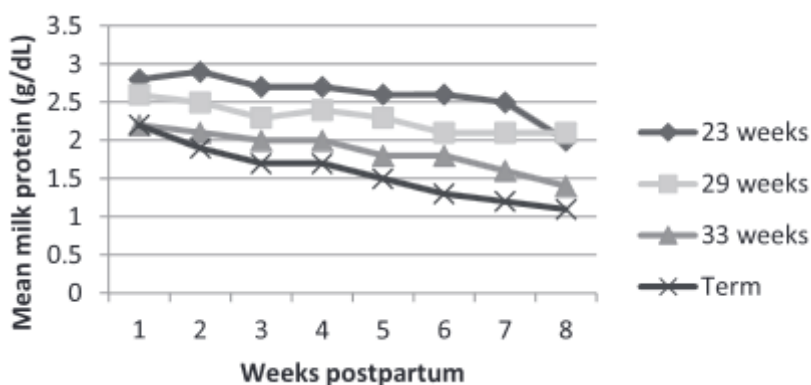
1.2.1.1 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες είναι το κύριο μακροθρεπτικό συστατικό στο μητρικό γάλα (HBM), παίζοντας σημαντικό ρόλο στη διατροφή των βρεφών, την ανάπτυξη του γαστρεντερικού συστήματος και τη ρύθμιση του μικροβιώματος. Η λακτόζη είναι ο κυρίαρχος υδατάνθρακας και βασική πηγή ενέργειας για τα βρέφη. Η σταθερή συγκέντρωσή της διατηρεί την οσμωτική ισορροπία του μητρικού γάλακτος, ενώ συνδέεται με ολιγοσακχαρίτες (HMOs- Human milk oligosaccharides), οι οποίοι διευκολύνουν την απορρόφηση μετάλλων και ασβεστίου. Οι HMOs είναι το δεύτερο πιο άφθονο είδος υδατανθράκων και λειτουργούν ως πρεβιοτικά, προάγοντας την ανάπτυξη των bifidobacteria και τη διαμόρφωση του εντερικού μικροβιώματος. Επιπλέον, συμμετέχουν στην παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (SCFAs- short-chain fatty acids), τα οποία βελτιώνουν την υγεία του εντέρου και αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων. Η παρουσία των HMOs στο μητρικό γάλα συνδέεται με μειωμένη διάρκεια διάρροιας και καλύτερη ανοσολογική απόκριση, ενώ φαίνεται να προσφέρουν προστασία έναντι λοιμώξεων, όπως το Campylobacter. Παρότι η έρευνα συνεχίζεται, τα HMOs αναγνωρίζονται ως βασικό στοιχείο της βρεφικής υγείας. (Yi & Kim, 2021)

1.2.1.2 Πρωτεΐνες μητρικού γάλακτος

Η πρωτεΐνη είναι ένα βασικό στοιχείο για τη δομή και λειτουργία των κυττάρων στον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ η επαρκής πρόσληψή της είναι ζωτικής σημασίας για τη σωστή ανάπτυξη και τις φυσιολογικές διεργασίες του σώματος. Το μητρικό γάλα περιέχει δύο κατηγορίες πρωτεϊνών, συνδυασμό πρωτεϊνών ορού γάλακτος (whey) και καζεΐνης (casein), . Ο ορός γάλακτος είναι ευκολότερα απορροφήσιμος, ενώ η καζεΐνη του μητρικού γάλακτος έχει πιο εύπεπτη μορφή σε σχέση με την αντίστοιχη του αγελαδινού γάλακτος. (Kim & Yi, 2020) Ανάλογα με το στάδιο του γάλακτος, το 80% έως 50% της πρωτεΐνης στο μητρικό γάλα είναι ορός. Η αναλογία ορού/καζεΐνης στο ανθρώπινο γάλα κυμαίνεται από 70/30 έως 80/20 στην αρχική γαλουχία και μειώνεται σε 50/50 στην ύστερη γαλουχία. Αυτή η αναλογία είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε σύγκριση με το γάλα άλλων θηλαστικών. Στο γάλα της αγελάδας, οι πρωτεΐνες του ορού αντιπροσωπεύουν μόνο το 18% της πρωτεΐνης του γάλακτος. Παραδοσιακά, οι βρεφικές φόρμουλες περιέχουν υψηλότερα επίπεδα καζεΐνης, κάνοντάς τες δυσκολότερα πεπτικές σε σύγκριση με το ανθρώπινο μητρικό γάλα.

Επειδή τα αμινοξέα προφίλ της καζεΐνης και των πρωτεϊνών ορού διαφέρουν, το συνολικό αμινοξέα προφίλ του ανθρώπινου γάλακτος ποικίλλει ανάλογα με το στάδιο της γαλουχίας. Η γλουταμίνη, το πιο αφθονούν ελεύθερο αμινοξύ, είναι σχεδόν 20 φορές υψηλότερη στο ώριμο γάλα σε σύγκριση με τη χαμηλότερη τιμή της στο πρωτόγαλα. Η γλουταμίνη είναι σημαντική για την παροχή κετογλουταρικού οξέος για τον κύκλο του κιτρικού οξέος, ενδεχομένως λειτουργώντας ως νευροδιαβιβαστής στον εγκέφαλο και ως βασικό ενεργειακό υπόστρωμα για τα εντερικά κύτταρα. (Martin et al., 2016) Σύμφωνα με έρευνες των Lönnerdal et al., η χαμηλή περιεκτικότητα καζεΐνης στο μητρικό γάλα μπορεί να συσχετίζεται με πιο αργή ανάπτυξη στα θηλάζοντα βρέφη. (Lã-Nnerdal et al., 1987) Η πρωτεϊνική περιεκτικότητα του γάλακτος που λαμβάνεται από μητέρες που γεννούν πρόωρα είναι σημαντικά υψηλότερη από αυτή των μητέρων που γεννούν κανονικά (βλ. Εικόνα 2). Τα επίπεδα πρωτεΐνης μειώνονται στο ανθρώπινο γάλα κατά τις πρώτες 4 έως 6 εβδομάδες ή περισσότερο της ζωής, ανεξάρτητα από το χρόνο του τοκετού. (Ballard & Morrow, 2013)



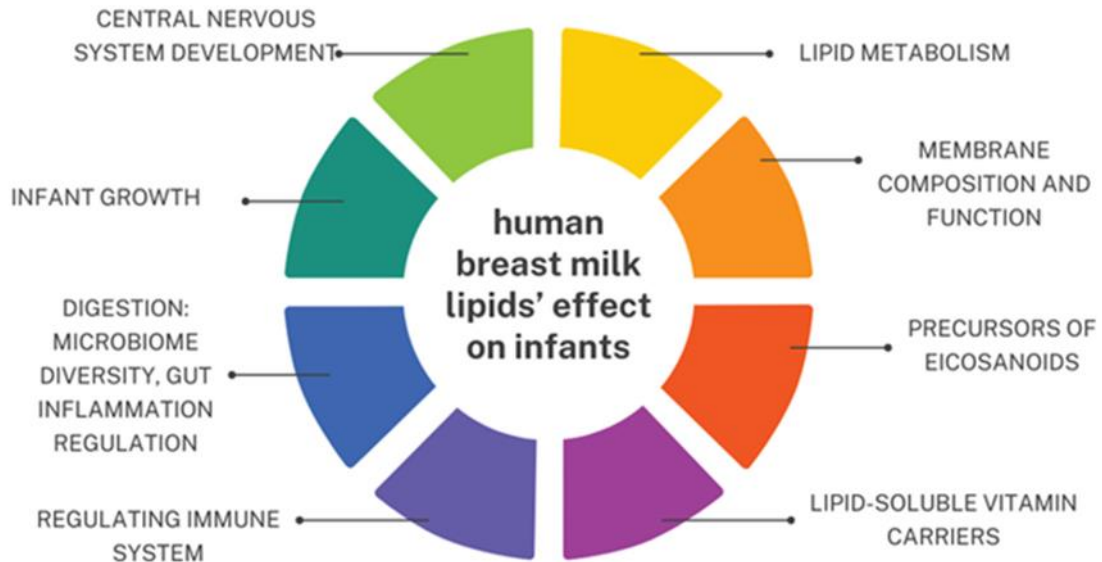
Εικόνα 2. Συγκρίσεις συγκεντρώσεων πρωτεϊνών στο γάλα από μητέρες που γέννησαν πρόωρα και κανονικά, ανάλογα με την εβδομάδα κύησης κατά τον τοκετό και τις εβδομάδες μετά τον τοκετό
Πηγή (Ballard & Morrow, 2013)

Οι κύριες πρωτεΐνες του ορού γάλακτος στο μητρικό γάλα περιλαμβάνουν:

- Άλφα-λακταλβουμίνη (περίπου 40% της συνολικής πρωτεΐνης του ορού), η οποία συμβάλλει στη σύνθεση της λακτόζης, στην παροχή βασικών αμινοξέων και στην απορρόφηση ιχνοστοιχείων και μετάλλων από τα βρέφη.
- Λακτοφερρίνη και λυσοζύμη, που βοηθούν στην αναστολή της ανάπτυξης παθογόνων βακτηρίων.
- Εκκριτική ανοσοσφαιρίνη A (IgA), η οποία προστατεύει τον εντερικό βλεννογόνο και συμβάλλει στην καταπολέμηση βακτηρίων.

Η συγκέντρωση πρωτεΐνης στο μητρικό γάλα δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη διατροφή της μητέρας, αλλά σχετίζεται με τον σωματικό της δείκτη μάζας. (Kim & Yi, 2020)

1.2.1.3 Λίπος μητρικού γάλακτος και βιοδραστικά λιπιδικά συστατικά



Εικόνα 3. Επίδραση των λιπιδίων του ανθρώπινου μητρικού γάλακτος στα βρέφη
Πηγή (Szyller et al., 2024)

Το κύριο λιπιδικό συστατικό είναι τα τριγλυκερίδια (95%-98%), που περιέχουν δύο απαραίτητα λιπαρά οξέα: το λινελαϊκό (ω -6) και το α -λινολενικό οξύ (ω -3). Αυτά μετατρέπονται σε αραχιδονικό οξύ (AA) και εικοσαπενταενοϊκό οξύ (EPA), το οποίο με τη σειρά του μετατρέπεται σε δοκοσαεξαενοϊκό οξύ (DHA), απαραίτητο για την ανάπτυξη του εγκεφάλου και της όρασης. Δεδομένου ότι ο ανθρώπινος οργανισμός δεν μπορεί να τα συνθέσει, πρέπει να προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής.

Η περιεκτικότητα σε λίπος αυξάνεται σταδιακά κατά τη διάρκεια της γαλουχίας:

- Στο πρωτόγαλα κυμαίνεται από 15-20 g/L
- Στο ώριμο γάλα φτάνει περίπου τα 40 g/L
- Το τελικό γάλα (hindmilk) περιέχει 2-3 φορές περισσότερο λίπος από το αρχικό γάλα (foremilk).

Το λίπος στο μητρικό γάλα είναι πιο εύκολα απορροφήσιμο από αυτό των βρεφικών τροφών, λόγω της παρουσίας ειδικών λιπασών που ενεργοποιούνται από τα χολικά άλατα και βοηθούν στην πέψη. Επιπλέον, η μοριακή δομή των τριγλυκεριδίων του μητρικού γάλακτος επηρεάζει το λιπιδαιμικό προφίλ του βρέφους, συμπεριλαμβανομένων των επιπέδων χοληστερόλης. Η ποσότητα και η σύσταση του λίπους στο μητρικό γάλα εξαρτάται από τη διατροφή της μητέρας και την αύξηση βάρους κατά την εγκυμοσύνη. Διατροφικές συνήθειες, όπως η κατανάλωση fast food, επεξεργασμένων τροφίμων και μαργαρίνης, μπορεί να αυξήσουν την περιεκτικότητα σε trans λιπαρά οξέα, τα οποία

μπορούν να φτάσουν έως 7.7% του συνολικού λίπους. Τα trans λιπαρά επηρεάζουν αρνητικά την ανάπτυξη του βρέφους, καθώς ανταγωνίζονται το λινελαϊκό και το α-λινολενικό οξύ. Η πρόσληψη αραχιδονικού οξέος, EPA και DHA από το μητρικό γάλα συνδέεται άμεσα με τη διατροφή της μητέρας. Οι χορτοφάγες μητέρες συχνά έχουν χαμηλά επίπεδα DHA στο μητρικό γάλα, λόγω της έλλειψης ψαριών ή άλλων τροφών πλούσιων σε DHA στη διατροφή τους. Για το λόγο αυτό, συνιστάται η καθημερινή πρόσληψη έως 300 mg DHA, ώστε να διατηρηθούν επαρκή επίπεδα DHA στο μητρικό γάλα. (Kim & Yi, 2020) Στην παραπάνω εικόνα 3. γίνεται αναφορά στην επίδραση των λιπιδίων του ανθρώπινου μητρικού γάλακτος στα βρέφη. Κάθε τμήμα του κύκλου αντιπροσωπεύει μια διαφορετική λειτουργική πτυχή που επηρεάζεται από αυτά τα λιπίδια:

- Ανάπτυξη Κεντρικού Νευρικού Συστήματος: Τα λιπίδια στο μητρικό γάλα συμβάλλουν στην ανάπτυξη του εγκεφάλου και του κεντρικού νευρικού συστήματος των βρεφών.
- Μεταβολισμός Λιπιδίων: Σημαντικός για την ενεργειακή ισορροπία και την επεξεργασία των λιπιδίων στο σώμα του βρέφους.
- Σύνθεση και Λειτουργία Μεμβρανών: Τα λιπίδια συμβάλλουν στη δομή και τη λειτουργία των κυτταρικών μεμβρανών.
- Πρόδρομοι Εικοσανοειδών: Τα λιπίδια παρέχουν πρόδρομες ουσίες για την παραγωγή εικοσανοειδών, ουσιών που εμπλέκονται σε διάφορες φλεγμονώδεις και άλλες βιολογικές διαδικασίες.
- Μεταφορείς Λιποδιαλυτών Βιταμινών: Τα λιπίδια στο μητρικό γάλα βοηθούν στη μεταφορά λιποδιαλυτών βιταμινών, ουσιαστικών για την υγεία του βρέφους.
- Ανάπτυξη του Βρέφους: Τα λιπίδια συμβάλλουν γενικά στη φυσική ανάπτυξη και ανάπτυξη των βρεφών.
- Πέψη: Ποικιλομορφία Μικροβιώματος, Ρύθμιση Εντερικής Φλεγμονής: Τα λιπίδια επηρεάζουν τη σύνθεση του μικροβιώματος στο έντερο και βοηθούν στη ρύθμιση των εντερικών φλεγμονών.
- Ρύθμιση του Ανοσοποιητικού Συστήματος: Τα λιπίδια στο μητρικό γάλα βοηθούν στη ρύθμιση και στην υποστήριξη της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος του βρέφους. (Szyller et al., 2024)

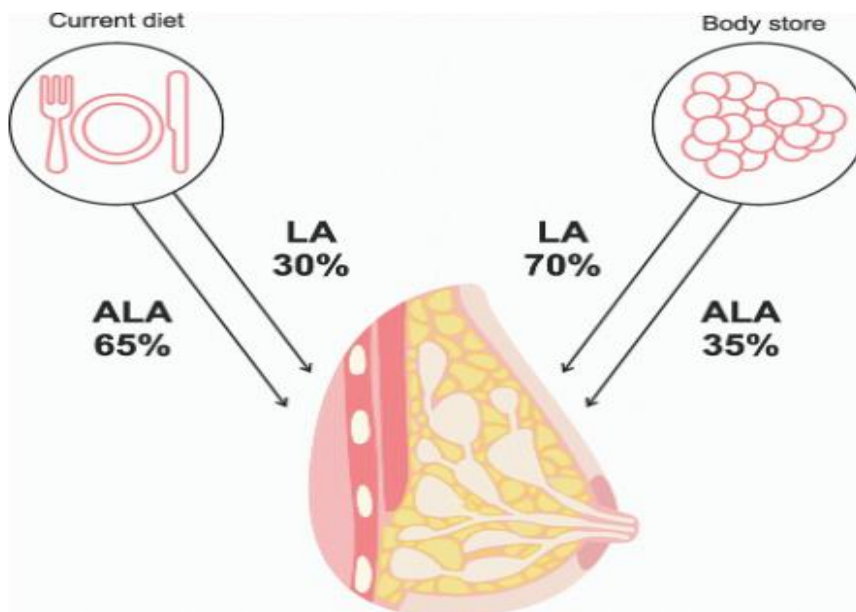
Τα λιπίδια στο μητρικό γάλα είναι βασική πηγή ενέργειας για τα βρέφη έως 6 μηνών, καλύπτοντας 50–60% των ενεργειακών τους αναγκών. Το λίπος αποτελεί περίπου το 3-5% του μητρικού γάλακτος κατά βάρος. Η περιεκτικότητα σε λίπος αυξάνεται με το στάδιο της γαλουχίας. Πιο συγκεκριμένα το πρωτόγαλα έχει περίπου 2,2 g/100 ml, το μεταβατικό γάλα περίπου 3 g/100 ml και το ώριμο γάλα περίπου 3,4 g/100 ml. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.) βλέπουμε τις πριεκτικότητες κατηγοριών των λιπιδίων και των υποκατηγοριών φωσφολιπιδίων στο ώριμο μητρικό γάλα. Τα λιπίδια εμφανίζονται ως σφαιρίδια του λίπους του γάλακτος, περιβαλλόμενα από τη μεμβράνη λιποσφαιρίου γάλακτος (milk fat globule membrane - MFGM), που αποτελείται κυρίως από φωσφολιπίδια και χοληστερόλη. Τα φωσφολιπίδια αποτελούν μια κατηγορία λιπιδίων που βρίσκονται σε μικρό ποσοστό (<1%) του συνολικού λίπους στο μητρικό γάλα και είναι οι βασικοί δομικοί λίθοι των κυτταρικών μεμβρανών. Συμβάλλουν στη σταθεροποίηση των λιπιδίων και διευκολύνουν την απορρόφηση των λιπαρών οξέων. Τα τριγλυκερίδια (TAGs - Triacylglycerols ή

Triglycerides) αποτελούν περίπου το 98-99% του συνολικού λίπους και πριέχουν από ένα μόριο γλυκερόλης και τρία μόρια λιπαρών οξέων, τα οποία συνδέονται με εστερικούς δεσμούς στη γλυκερόλη. Στην εικόνα 5 φαίνονται τα λιπαρά οξέα του μητρικού γάλακτος. Τα λιπαρά οξέα διακρίνονται στα παρακάτω είδη:

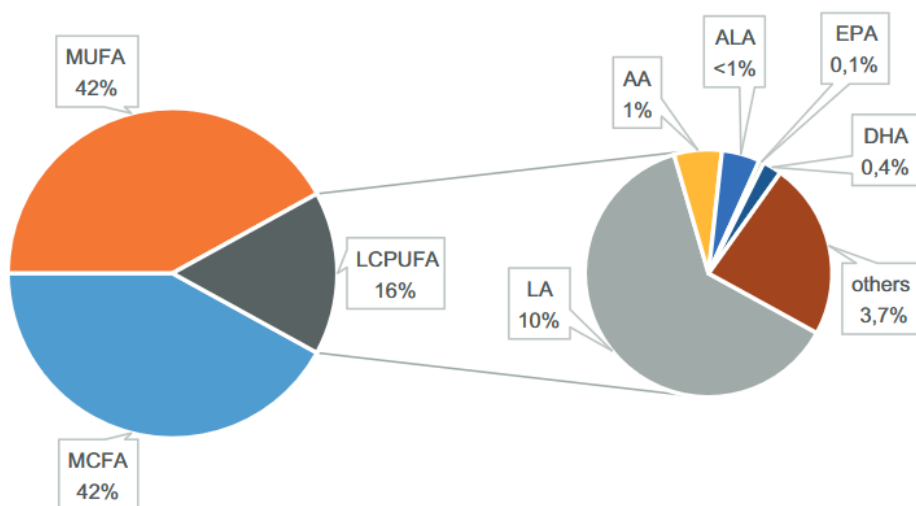
- Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA- Saturated Fatty Acids) τα οποία δεν πριέχουν διπλούς δεσμούς στην ανθρακική τους αλυσίδα και αποτελούν το 53.2–58% των συνολικών λιπαρών (παλμιτικό, στεατικό, καπρυλικό, καπρικό, λαυρικό, μυριστικό, αραχιδικό οξύ). Η περιεκτικότητά τους αυξάνεται από το πρωτόγαλα στο μεταβατικό γάλα και μειώνεται στο ώριμο γάλα.
- Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA – Monounsaturated Fatty Acids) που έχουν έναν διπλό δεσμό και αποτελούν το 23–55% (ελαϊκό, παλμιτολεϊκό, μυριστολεϊκό, βακκενικό, ερουκικό οξύ). Τα MUFAs μειώνονται από 40.7% στο πρωτόγαλα σε 36.9% στο ώριμο γάλα, με κυρίαρχο το ελαϊκό οξύ.
- Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA- Polyunsaturated Fatty Acids) είναι σημαντικά συστατικά του μητρικού γάλακτος, περιλαμβάνοντας οξέα με δύο ή περισσότερους διπλούς δεσμούς. Τα PUFAs αποτελούν το 6% έως 36% των λιπαρών οξέων στο μητρικό γάλα, όπου περιλαμβάνονται το λινελαϊκό (LA) και α-λινολενικό (ALA) οξύ. Αυτά τα οξέα είναι πρόδρομοι των αραχιδονικών (AA), εικοσαπεντανοϊκών (EPA) και δοκοσαεξανοϊκών (DHA) οξέων και τα επίπεδα τους αυξάνονται καθώς προχωρά η γαλουχία. Στην εικόνα 4 φαίνεται η πηγή των απαραίτητων λιπαρών οξέων στο μητρικό γάλα. ALA – α-λινολενικό οξύ, LA – λινελαϊκό οξύ.

Ως προς τις κατηγορίες των PUFAs, υπάρχουν τα Ω-3 και Ω-6 λιπαρά οξέα:

- Ω-3 Λιπαρά Οξέα:
 - DHA (δοκοσαεξανοϊκό οξύ): Είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του εγκεφάλου και την όραση, παίζοντας κρίσιμο ρόλο στην νευρική ανάπτυξη και την υγεία των οφθαλμών.
 - ALA (α-λινολενικό οξύ): Συμβάλλει στην υγεία των κυττάρων και υποστηρίζει την καρδιακή λειτουργία.
- Ω-6 Λιπαρά Οξέα:
 - ARA (αραχιδονικό οξύ): Είναι σημαντικό για την ανάπτυξη του εγκεφάλου και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, βοηθώντας στην ανάπτυξη και την προστασία του οργανισμού.
 - LA (λινελαϊκό οξύ): Συμβάλλει επίσης στην καρδιακή υγεία και είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη και λειτουργία των κυττάρων.
- Τα Ω-3 και Ω-6 λιπαρά οξέα αποτελούν κρίσιμα στοιχεία του μητρικού γάλακτος για την ανάπτυξη και την υγιεινή λειτουργία του νευρικού, ανοσοποιητικού και οπτικού συστήματος του βρέφους. (Koletzko, 2017)



Εικόνα 4. Η πηγή των απαραίτητων λιπαρών οξέων στο μητρικό γάλα. ALA – α-λινολενικό οξύ, LA – λινελαϊκό οξύ, Πηγή (Bobiński & Bobińska, 2022)



Εικόνα 5. Τα λιπαρά οξέα στο μητρικό γάλα, Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα- MUFA, Μεσαίας αλυσίδας λιπαρά οξέα- MCFA, Μακράς αλυσίδας πολυακόρεστα λιπαρά οξέα- LCPUFA, inoleic acid (C18:2 n-6; LA), α-linolenic acid (C18:3 n-3; ALA), Arachidonic acid (C20:4 n-6; AA), Eicosapentaenoic acid (C20:5 n-3; EPA) and Docosahexaenoic acid (C22:6 n-3; DHA). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσοστό (% βάρους/βάρους) όλων των ανιχνευθέντων λιπαρών οξέων.

Πηγή (Bobiński & Bobińska, 2022)

1.2.2 Μικροθρεπτικά Συστατικά

1.2.2.1 Βιταμίνες και μέταλλα

Το μητρικό γάλα (HBM) παρέχει τις περισσότερες απαραίτητες βιταμίνες και μέταλλα για τη φυσιολογική ανάπτυξη του βρέφους. Ωστόσο, οι βιταμίνες D και K συχνά δεν επαρκούν σε αποκλειστικά θηλάζοντα βρέφη, καθιστώντας αναγκαία τη συμπληρωματική χορήγησή τους. Η βιταμίνη D επηρεάζεται από την έκθεση στον ήλιο και τη διατροφή της μητέρας, αλλά η περιεκτικότητά της στο μητρικό γάλα είναι χαμηλή (<40 IU/L). Επομένως, συνιστάται η λήψη 200-400 IU/ημέρα για συντήρηση και 2.000 IU/ημέρα σε περιπτώσεις ανεπάρκειας. Παρομοίως, η βιταμίνη K, που μεταφέρεται ελάχιστα από τη μητέρα στο έμβρυο, απαιτεί συμπλήρωμα αμέσως μετά τη γέννηση. Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες εξαρτώνται από τη διατροφική κατάσταση της μητέρας. Αν και τα επίπεδα θειαμίνης (B1) και ριβοφλαβίνης (B2) είναι συνήθως επαρκή, μητέρες με ανεπαρκή διατροφή μπορεί να παρουσιάσουν χαμηλά επίπεδα βιταμίνης B6, B12 και φυλλικού οξέος. Το μητρικό γάλα περιέχει πάνω από 20 μέταλλα και ιχνοστοιχεία, όπως σίδηρο, χαλκό και ψευδάργυρο, με υψηλότερες συγκεντρώσεις στο πρωτόγαλα που μειώνονται καθώς προχωρά η γαλουχία. Η περιεκτικότητα των μετάλλων στο μητρικό γάλα δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη διατροφή της μητέρας, και παρά το ότι το μητρικό γάλα περιέχει λιγότερα μέταλλα από τις βρεφικές φόρμουλες, η υψηλή βιοδιαθεσιμότητά τους εξασφαλίζει ότι δεν απαιτούνται συμπληρώματα κατά τον αποκλειστικό θηλασμό. Ο σίδηρος είναι 0.5–1.0 mg/L στο πρωτόγαλα και 0.3–0.7 mg/L στο ώριμο γάλα, με βιοδιαθεσιμότητα 20%-50%, πολύ υψηλότερη από τις βρεφικές φόρμουλες (4%-7%). Επομένως, τα αποκλειστικά θηλάζοντα βρέφη δεν χρειάζονται συμπληρωματικό σίδηρο πριν από τους 4-6 μήνες, οπότε και συνιστάται η εισαγωγή εμπλουτισμένων στερεών τροφών. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακα 3.) παρουσιάζεται μια σύγκριση μικροθρεπτικής σύστασης μητρικού γάλακτος σε δυο διαφορετικά στάδια της γαλουχίας (πρωτόγαλα - colostrum, ώριμο γάλα - mature milk) με τις προτεινόμενες συγκεντρώσεις μικροθρεπτικών συστατικών στις βρεφικές φόρμουλες αγελαδινού γάλακτος. (Kim & Yi, 2020)

Micronutrient	Colostrum ^{a)} (1–5 days)	Mature milk ^{a)} (>14 days)	Bovine formula ^{b)} (minimum–maximum)
Iron	0.5–1.0 mg/L	0.3–0.7 mg/L	0.45– mg/100 kcal
Calcium	250 mg/L	200–250 mg/L	50– mg/100 kcal
Phosphorus	120–160 mg/L	120–140 mg/L	25– mg/100 kcal
Magnesium	30–35 mg/L	30–35 mg/L	5– mg/100 kcal
Sodium	300–400 mg/L	150–250 mg/L	20–60 mg/100 kcal
Chloride	600–800 mg/L	400–450 mg/L	50–160 mg/100 kcal
Potassium	600–700 mg/L	400–550 mg/L	60–180 mg/100 kcal
Manganese	5–12 µg/L	3–4 µg/L	1– µg/100 kcal
Iodine	40–50 µg/L	140–150 µg/L	10– µg/100 kcal
Selenium	25–32 µg/L	10–25 µg/L	1– µg/100 kcal
Copper	0.5–0.8 µg/L	0.1–0.3 µg/L	35– µg/100 kcal
Zinc	5–12 µg/L	1–3 µg/L	0.5– mg/100 kcal

Πίνακας 3. Σύγκριση σύστασης μικροθρεπτικών συστατικών πρωτογάλακτος , ώριμου μητρικού γάλακτος με βρεφική φόρμουλα αγελαδινού γάλακτος

Πηγή(Kim & Yi, 2020)

	Σίδηρος	Ψευδάργυρος	Ασβέστιο	Χαλκός	Φωσφόρος	Σελήνιο	Μαγνήσιο	Ιώδιο
Λειτουργία	Μεταβολικές διεργασίες, μεταφορά οξυγόνου και μυελίνωση στο ΚΝΣ	Κυτταρικές λειτουργίες; ανοσία, ανάπτυξη και ανάπτυξη	Υγεία των οστών και κυτταρική σήμανση	Κυτταρική αναπνοή και μεταβολισμός σιδήρου	Οστική ορμικοποίηση, σήμανση και δημιουργία κυτταρικών μεμβρανών και νουκλεϊκών οξέων	Προστασία αντιοξειδωτικού, λειτουργία θυρεοειδούς, ανοσία και μεταβολισμός χοληστερόλης	Δομή και μεταβολικές αντιδράσεις των οστών	Ανάπτυξη, νευρικό σύστημα και σύνθεση ορμόνης θυρεοειδούς
Επίπεδο στο μητρικό γάλα	Υψηλότερο στο πρωτόγαλα και μειώνεται κατά τη γαλουχία	Στάδια ως εξής: υψηλά στο πρωτόγαλα, στη συνέχεια γρήγορη μείωση, φάση πλατό και περαιτέρω μείωση	Μειώνεται κατά τη γαλουχία (συνολικό ασβέστιο; η ιονισμένη μορφή είναι σταθερή)	Μειώνεται κατά τη γαλουχία	Υψηλά στη μεταβατική περίοδο και μειώνεται κατά τη γαλουχία	Υψηλά στο πρωτόγαλα και μειώνεται κατά τη γαλουχία	Μεταβάλλεται μεταξύ πρωτογάλακτος και κανονικού γάλακτος	Μέγιστα επίπεδα στο πρωτόγαλα και μείωση κατά τη γαλουχία; δεν υπάρχει διαφορά αξιών μεταξύ πρώτου και τελευταίου γάλακτος
Επίδραση μητρικών παραγόντων στα επίπεδα	Καμία επίδραση	Καμία σημαντική σχέση	Μητρική πρόσληψη, γεωγραφική περιοχή και αναιμία	Καμία επίδραση	Καμία επίδραση	Ισχυρά επηρεασμένο από τη διατροφή της μητέρας	Δεν παρατηρήθηκε	Μητρική πρόσληψη και γενετικοί παράγοντες
Σχόλιο	Τόσο σε λιπαρή όσο και μικροπεπτιδική μορφή στο ΜΓ; τα νεογνά έχουν τα δικά τους αποθέματα	Και σε λιπαρή και μικροπεπτιδική μορφή στο ΜΓ; παρόμοια διαθεσιμότητα μεταξύ πρώτου και τελευταίου γάλακτος; υψηλή βιοδιαθεσιμότητα	-	Τα νεογνά έχουν τα δικά τους αποθέματα	Σχετικά χαμηλή συγκέντρωση στο ΜΓ προστατεύει το ανώριμο νεφρικό σύστημα ενός νεογνίστη	Συστατικό της γλουταθειόνης περοξειδάσης στο ΜΓ; τα νεογνά έχουν τα δικά τους αποθέματα	Η πλειοψηφία δεσμεύεται σε πρωτεΐνες στο ΜΓ	Η πλειοψηφία υπάρχει σε μορφή ιοντικού ιωδίου στο ΜΓ
Συνιστώμενη συμπλήρωση στοιχείων στη διατροφή των θηλάζουσων μητέρων	Συνήθως συνιστάται, αλλά όχι απαραίτητο	Αύξηση της πρόσληψης ψευδαργύρου κατά 50%	Σύνολο 5 μερίδων την ημέρα από τρόφιμα πλούσια σε ασβέστιο	Ποσότητα +400 μg στην RDA ³	Δεν χρειάζεται	Ποσότητα +15 μg στην RDA	Δεν χρειάζεται	Σύνολο 200 μg ιωδίου ανά ημέρα

Πίνακας 4. Το αντίκτυπο διάφορων μετάλλων στην ανάπτυξη του παιδιού και τα συνιστώμενα συμπλήρωμα για θηλάζουσες
Πηγή (Szyller et al., 2024)

Ο παραπάνω πίνακας 4. παρουσιάζει περιληπτικά το αντίκτυπο διάφορων μετάλλων στην ανάπτυξη του παιδιού και τα συνιστώμενα συμπλήρωμα για θηλάζουσες. Τα ιχνοστοιχεία και τα μικροθρεπτικά στοιχεία, όπως οι βιταμίνες και τα μέταλλα (συμπεριλαμβανομένων των μακρομετάλλων και των ιχνοστοιχείων), είναι καθοριστικά για την υγιή ανάπτυξη του παιδιού. Αυτά τα στοιχεία διαδραματίζουν θεμελιώδη ρόλο τόσο στη διαμόρφωση και αναγέννηση των ιστών όσο και στη ρύθμιση των λειτουργιών των συστημάτων του σώματος. Η έλλειψη αυτών των θρεπτικών στοιχείων μπορεί να οδηγήσει σε ασθένειες και σοβαρές ανωμαλίες στο μωρό και το παιδί. Επίσης, αρκετά από αυτά τα μικροθρεπτικά στοιχεία είναι ενεργά στις αμυντικές λειτουργίες του σώματος. Τα μέταλλα, ιδιαίτερα, επηρεάζουν σημαντικά την απορρόφηση, τον μεταβολισμό και την απέκκριση άλλων θρεπτικών ουσιών. Σε αντίθεση με τα μακροθρεπτικά, έχει παρατηρηθεί ότι η ανεπαρκής μητρική διατροφή μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη σύνθεση των μικροθρεπτικών

στοιχείων του μητρικού γάλακτος, όπως κάποια λιπαρά οξέα και βιταμίνες, καθώς και νάτριο, κάλιο, χλώριο, φώσφορο, χαλκό, ψευδάργυρο, μαγγάνιο και σίδηρο. Η σχέση μεταξύ των επιπέδων των μετάλλων στο μητρικό γάλα και της διατροφής της μητέρας είναι μεταβλητή, εξαρτώμενη σε μεγάλο βαθμό από την πρόσληψη και τα αποθέματα της μητέρας. Οι αλλαγές αυτές έχουν σοβαρές συνέπειες για την ανάπτυξη και την υγεία των θηλαζόντων βρεφών. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχουν διαφορές στη σύνθεση του γάλακτος ανάλογα με τις φυλετικές ομάδες. (Pinto & Almeida, 2018) Ο παρακάτω πίνακας περιγράφει τις βασικές λειτουργίες και τη σημασία της συμπλήρωσης για τις βιταμίνες D και K σε βρέφη, καθώς και τους κινδύνους ανεπάρκειας που μπορεί να προκύψουν αν δεν υπάρχει επαρκής πρόσληψη αυτών των βιταμινών. (Szyller et al., 2024)

Βιταμίνη	Κύριες Μορφές	Λειτουργία	Συνιστώμενη Διαιτητική Πρόσληψη για Βρέφη (0-6 μηνών)	Κίνδυνος Ανεπάρκειας
Βιταμίνη D	εργοκαλσιφερόλη και χοληκαλσιφερόλ	ορθή ορυκτοποίηση οστών, ανάπτυξη και ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και της γλυκόζης στο αίμα	10 µcg; 400 IU	οι συγκεντρώσεις στο μητρικό γάλα είναι ανεπαρκείς για να καλύψουν τις καθημερινές διαιτητικές ανάγκες ενός αποκλειστικά θηλαζόμενου βρέφους. Απαραίτητη η συμπλήρωση.
Βιταμίνη K	φυλλοκινόνη και μενακινόνη-4	συνένζυμο για τη σύνθεση των παραγόντων πήξης II, VII, IX, X, και των πρωτεϊνών C και S	2.0 µcg	η κακή διαπλάκουσα μετάβαση αυξάνει τον κίνδυνο για αιμορραγία από έλλειψη βιταμίνης K (VKDB). Για την πρόληψη της VKDB, συνιστάται μία ενδομυϊκή δόση βιταμίνης K1 κατά τη γέννηση.

Πίνακας 5. Οι βασικές λειτουργίες και η σημασία της συμπλήρωσης για τις βιταμίνες D και K σε βρέφη
Πηγή (Szyller et al., 2024)

1.3 Σύσταση Μητρικού γάλακτος και πρόωρα νεογνά

Τα πρόωρα βρέφη αντιμετωπίζουν αυξημένο κίνδυνο για αναπτυξιακές διαταραχές, σηψαιμία και γαστρεντερικά προβλήματα, όπως η νεκρωτική εντεροκολίτιδα, λόγω της ανεπαρκούς πρόσληψης θρεπτικών συστατικών που μεταφέρονται από τον πλακούντα κατά το τελευταίο τρίμηνο της κύησης. Το μητρικό γάλα (HBM) παραμένει η καλύτερη διατροφική επιλογή, αλλά διαφέρει από το γάλα των τελειόμηνων βρεφών. Το γάλα μητέρων πρόωρων βρεφών έχει:

- Περισσότερη πρωτεΐνη και βιοδραστικά συστατικά
- Υψηλότερα επίπεδα λίπους, ελεύθερων αμινοξέων και νατρίου
- Υψηλότερα επίπεδα χαλκού και ψευδάργυρου, που μειώνονται προοδευτικά
- Χαμηλότερο αρχικά ασβέστιο, το οποίο αυξάνεται σταδιακά με τη γαλουχία.

Η λακτόζη είναι αρχικά χαμηλή, αλλά αυξάνεται καθώς προχωρά η γαλουχία, ενώ η λακτάση (ένζυμο για την πέψη της λακτόζης) δεν εκκρίνεται πριν την 32η εβδομάδα, δυσκολεύοντας την πέψη στα πολύ πρόωρα βρέφη. Η σύσταση των ολιγοσακχαριτών (HMOs) διαφέρει ανάλογα με τη γενετική ποικιλομορφία, ενώ υπάρχουν σημαντικές διαφορές στα βιοδραστικά μόρια, όπως οι αυξητικοί παράγοντες και η λακτοφερρίνη. Σε περιπτώσεις έλλειψης μητρικού γάλακτος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί γάλα δότριας ή εμπλουτισμένο γάλα για τη μακροπρόθεσμη ανάπτυξη των πρόωρων βρεφών. (Kim & Yi, 2020)

1.4 Προφίλ λιπαρών οξέων του μητρικού γάλακτος σε διάφορα τα στάδια της γαλουχίας

Η πρώτη φάση της ζωής είναι ιδιαίτερα κρίσιμη για την ανάπτυξη των οργάνων και των ιστών ενός βρέφους. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου ταχείας αναπτυξιακής δραστηριότητας, η διατροφή παίζει έναν αποφασιστικό ρόλο, καθορίζοντας τη μελλοντική υγεία του ατόμου και την αντοχή του στην εκδήλωση μεταδοτικών και μη μεταδοτικών νοσημάτων. Το ανθρώπινο γάλα (HM) αποτελεί την ιδανική διατροφική πηγή για τα νεογνά και συνιστάται ως η αποκλειστική τροφή για τους πρώτους έξι μήνες ζωής, ενώ συνιστάται η συνέχιση του θηλασμού μέχρι και τα δύο έτη. Το μητρικό γάλα διαθέτει ένα πλούσιο προφίλ λιπαρών οξέων, περιλαμβάνοντας πάνω από 200 διαφορετικούς τύπους λιπαρών οξέων σε διάφορες συγκεντρώσεις. Αυτά τα λιπαρά οξέα είναι ουσιώδη για τις κυτταρικές μεμβράνες, λειτουργούν ως μόρια που εκπέμπουν σήματα και ρυθμίζουν την ανοσοποιητική απόκριση, και βοηθούν στη δημιουργία ενός ευνοϊκού περιβάλλοντος για τη μικροβιοχλωρίδα του πεπτικού συστήματος. (Floris et al., 2020)

Τα πιο διερευνημένα είναι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (LCPUFA) και οι μεταβολίτες τους, οι οποίοι ρυθμίζουν οδούς σηματοδότησης πόνου, φλεγμονής, θρόμβωσης και αγγειοσυστολής. Η διαιτητική πρόσληψη συγκεκριμένων LCPUFA έχει

συνδεθεί με βελτιωμένη νευρογνωστική ανάπτυξη και ανάπτυξη των βρεφών, ειδικά των πρόωρων βρεφών που έχουν λίγα αποθέματα σωματικού λίπους και κινδυνεύουν από νευρογνωστική δυσλειτουργία. Ωστόσο, για πολλά λιπαρά οξέα του ανθρώπινου γάλακτος, η συμβολή στη φυσιολογική λειτουργία και ανάπτυξη του βρέφους παραμένει ακόμα υπό μελέτη. Η σύνθεση του μητρικού γάλακτος (HM) παρουσιάζει διακύμανση, η οποία καθορίζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η διάρκεια του θηλασμού, το κλίμα, η εθνικότητα, το στάδιο της γαλουχίας, καθώς και η διατροφή και ο τρόπος ζωής της μητέρας. Αν και δεν είναι πλήρως εξακριβωμένο αν η σύνθεση του μητρικού γάλακτος διαφέρει ανάλογα με την ηλικία κύησης, έχουν παρατηρηθεί διαφορές σε ορισμένα θρεπτικά συστατικά, όπως το δοκοσαεξαενοϊκό οξύ (DHA) στο μητρικό γάλα πρόωρων βρεφών σε σύγκριση με το μητρικό γάλα τελειόμηνων βρεφών.

Η αλλαγή της σύστασης των λιπαρών οξέων του μητρικού γάλακτος ανάλογα με τα στάδια της γαλουχίας αποτελεί αμφιλεγόμενο ζήτημα, καθώς ορισμένες μελέτες αναφέρουν μεταβολές στο χρόνο, ενώ άλλες δεν διαπιστώνουν τέτοιες αλλαγές. Πολλές ατομικές μελέτες έχουν εξετάσει τη σύνθεση λιπαρών οξέων στο μητρικό γάλα σε συγκεκριμένα στάδια ή σε ειδικούς πληθυσμούς, αλλά δεν υπάρχει μέχρι στιγμής μια συγκεντρωτική ανάλυση που να περιλαμβάνει τα λιπαρά οξέα του μητρικού γάλακτος σε δείγματα από όλο τον κόσμο, καλύπτοντας την περίοδο της γαλουχίας τόσο για πρόωρα όσο και για τελειόμηνα βρέφη.

Τα trans-λιπαρά οξέα (trans-FAs) εμφανίζονται φυσικά στο λίπος των μηρυκαστικών ή σε γαλακτοκομικά προϊόντα ή σχηματίζονται μέσω υδρογόνωσης φυτικών ελαίων. Τα trans-λιπαρά οξέα μεταφέρονται στο μητρικό γάλα από τη διατροφική πρόσληψη της μητέρας.

Στο γάλα τελειόμηνων βρεφών, το ελαϊδικό οξύ (trans-C18:1 n-9) εμφανίζεται σε αξιόλογες ποσότητες, με τις υψηλότερες μέσες τιμές στο πρωτόγαλα, οι οποίες μειώνονται στη συνέχεια στο μεταβατικό και ώριμο γάλα. Αντίθετα, τα λίγα διαθέσιμα δεδομένα για το ρουμενικό οξύ (trans-C18:2 n-6) δείχνουν χαμηλή συνολική περιεκτικότητα, που φαίνεται να μειώνεται ακόμα περισσότερο στο μεταβατικό γάλα. Το βακκενικό οξύ (C18:1 n-7) είναι το κυρίαρχο trans-λιπαρό οξύ στο μητρικό γάλα και τα δεδομένα μας υποδεικνύουν ότι η περιεκτικότητά του παραμένει σχετικά σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της γαλουχίας τόσο στο γάλα τελειόμηνων όσο και πρόωρων βρεφών.

Τα LCPUFAs αποτελούν σημαντικό ποσοστό (15–20%) του συνολικού προφίλ λιπαρών οξέων, με τα n-6 PUFAs, και συγκεκριμένα το λινελαϊκό οξύ (LA; C18:2 n-6), να είναι τα πιο άφθονα σε σύγκριση με τα n-3 PUFAs. Σχεδόν όλα τα μέσα επίπεδα LCPUFAs, συμπεριλαμβανομένου του αραχιδονικού οξέος (ARA; C20:4 n-6), μειώνονται περίπου στο μισό κατά τη διάρκεια της γαλουχίας τόσο στο γάλα τελειόμηνων όσο και πρόωρων βρεφών. Το DHA (C22:6 n-3) και το δοκοσαπεντανοϊκό οξύ (DPA; C22:5 n-3) μειώνονται σταθερά σε όλα τα στάδια γαλουχίας στο γάλα τελειόμηνων, ενώ στο γάλα πρόωρων παραμένουν σε υψηλά επίπεδα για μεγαλύτερο διάστημα. Το DHA είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη του εγκεφάλου και της όρασης, ενώ τα επίπεδα του DHA ποικίλλουν ανάλογα με τη διατροφή της μητέρας.

Τέσσερις εξαιρέσεις παρατηρούνται: Το γ-λινολενικό οξύ (GLA; C18:n-6) διπλασιάζεται μετά το πρωτόγαλα και συνεχίζει να αυξάνεται σταθερά μεταξύ του μεταβατικού και ώριμου γάλακτος. Τα μέσα επίπεδα του LA (C18:2 n-6), του εικοσιπεντανοϊκού οξέος

(EPA; C20:5 n-3) και του α-λινολενικού οξέος (ALA; C18:3 n-3) παραμένουν σχετικά σταθερά σε όλα τα χρονικά σημεία.(Floris et al., 2020)

2. Σύγχρονες μέθοδοι προσδιορισμού επιλεγμένων μικροθρεπτικών συστατικών μητρικού γάλακτος

Οι τεχνικές που εφαρμόζονται για την ανάλυση των μικροθρεπτικών συστατικών στο ανθρώπινο γάλα συχνά προέρχονται από μεθόδους που αρχικά αναπτύχθηκαν για διαφορετικά υλικά, όπως το αίμα ή τα ούρα. Αν και αυτά τα υλικά δεν περιέχουν σημαντικές ποσότητες λίπους ή σακχάρων, στο ανθρώπινο γάλα αυτά τα μακροθρεπτικά αποτελούν πάνω από το 10% της σύνθεσής του κατά βάρος, επηρεάζοντας τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του δείγματος και καθιστώντας απαραίτητες τις προσαρμογές στη διαδικασία προετοιμασίας του. Για την ανάλυση των μικροθρεπτικών στοιχείων στο μητρικό γάλα χρησιμοποιούνται μέθοδοι όπως μικροβιολογικές, και ανταγωνιστικές ανοσοδεσμικές δοκιμασίες (CPBAs), αέρια ή υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτές UV, φθορισμού ή φασματοσκοπίας, φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης, και φασματοσκοπία επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος με ατομική εκπομπή (ICP-AES) ή ICP-MS.(Hampel et al., 2018)

2.1 Σύγχρονες μέθοδοι προσδιορισμού Βιταμίνης D στο μητρικό γάλα

Στο ανθρώπινο γάλα, η βιταμίνη D βρίσκεται κυρίως στις μορφές βιταμίνης D2 (εργοκαλσιφερόλη-ergocalciferol) και βιταμίνης D3 (χοληκαλσιφερόλη-cholecalciferol), εμπλουτισμένες με τους 25-υδροξυ μεταβολίτες τους και πιθανόν με την 24,25-διυδροξυβιταμίνη D και την 1,15-διυδροξυβιταμίνη D. Αυτές οι στερολικές ενώσεις απελευθερώνονται στο γάλα αρχικά δεμένες σε πρωτεΐνες δέσμησης του πλάσματος ή του κυτοσόλης και με την πάροδο του χρόνου διανέμονται στο λιπώδες στοιχείο του γάλακτος. Αναφέρθηκε επίσης η ύπαρξη μιας υδατοδιαλυτής μορφής της βιταμίνης D, της D-3β-θειικής, η οποία ωστόσο έχει αποδειχθεί βιολογικά αδρανής και για αυτό το λόγο δεν θεωρείται σημαντική για την ενεργό δράση της βιταμίνης D στο γάλα.(Hampel et al., 2018)

Οι Jones et al., 2023 ανέφεραν ότι η βιταμίνη D είναι κρίσιμη για την άριστη υγεία των οστών καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής. Στα νεογνά και τα βρέφη, η έλλειψη βιταμίνης D που προκαλεί υποκαλσιαιμία μπορεί να οδηγήσει σε πολλαπλά προβλήματα υγείας με συνέπειες στην ανάπτυξη και στην αναπτυξιακή πρόοδο. Η ανεπαρκής πρόσληψη βιταμίνης D, σε συνδυασμό με ανεπαρκή πρόσληψη ασβεστίου, μπορεί να οδηγήσει σε ραχίτιδα με τις συνοδευτικές υγειονομικές επιπτώσεις. Ωστόσο, ο κίνδυνος ραχίτιδας μπορεί να μειωθεί με την επαρκή πρόσληψη βιταμίνης D. Παρότι η κατάσταση της βιταμίνης D έχει συσχετιστεί με πολλές άλλες υγειονομικές συνέπειες, οι μετα-αναλύσεις των παρατηρησιακών δεδομένων και των δοκιμών συμπλήρωσης βιταμίνης D κατά την εγκυμοσύνη, την περίοδο μετά τον τοκετό ή τη βρεφική ηλικία, παρέχουν περιορισμένα στοιχεία για ένα ευεργετικό αποτέλεσμα της βιταμίνης D σε σχέση με την ανάπτυξη ή τις ανοσολογικές λειτουργίες. Εντούτοις, η επαρκής κατάσταση της βιταμίνης D είναι ουσιώδης για την πρόληψη της έλλειψης βιταμίνης D και των συναφών επιπτώσεων στην υγεία. Τα νεογνά και τα μικρά βρέφη εξαρτώνται από τη βιταμίνη D από τα αποθέματα που συσσωρεύονται ενδομήτρια

μέσω του πλακούντα και από τη σύνθεση βιταμίνης D που επάγεται από το UVB φως, καθώς και από τη διατροφική πρόσληψη. (Jones et al., 2023)

Προσδιορισμός Βιταμίνης D στο μητρικό γάλα με Υγρή Χρωματογραφία - Φασματομετρία Μάζας LC–MS/MS

Οι Jones et al., 2023 ανέλυσαν τον προσδιορισμό της Βιταμίνης D στο μητρικό γάλα με LC–MS/MS.

Οι μέθοδοι εκχύλισης για τους μεταβολίτες της βιταμίνης D στο ανθρώπινο γάλα (HM) προς ανάλυση με LC-MS/MS περιλαμβάνουν συνήθως σαπωνοποίηση, αποκατάσταση πρωτεϊνών (PP), υγρή-υγρή εκχύλιση (LLE) με διάφορους διαλύτες, εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και ημιπροετοιμαστική HPLC. Η σαπωνοποίηση και η PP χρησιμοποιούνται για να απομονώσουν τους μεταβολίτες της βιταμίνης D από τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Σε σύγκριση με τη σαπωνοποίηση, η χημική PP έχει δείξει καλύτερη απόδοση, δίνοντας 1.5 έως 2 φορές καλύτερη ανάκτηση. Για τη LLE, χρησιμοποιούνται διαλύτες όπως το εξάνιο, επτάνιο, ισοπροπανόλη, μεθανόλη, διχλωρομεθάνιο ή ένας συνδυασμός εξάνιου και αιθυλοξικού, ανάλογα με τις απαιτήσεις βελτιστοποίησης για διαφορετικούς μεταβολίτες της βιταμίνης D.

Όρια ευαισθησίας και παραγωγοποίηση

Η περιγραφή της ευαισθησίας στις μεθόδους ανάλυσης δεν είναι πάντα συνεπής, κάτι που δυσκολεύει τη σύγκριση της ευαισθησίας μεταξύ διαφορετικών μεθόδων. Ορισμένες μελέτες καθορίζουν το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ), αλλά δεν περιγράφουν πάντα πώς ορίζονται αυτά τα όρια. Οι τρόποι αντιμετώπισης των δεδομένων κάτω από το όριο ανίχνευσης δεν περιγράφονται πάντα, επηρεάζοντας τα συμπεράσματα της μελέτης.

Η αναλυτική ευαισθησία μπορεί να βελτιωθεί με την παραγωγοποίηση, μια διαδικασία που βελτιώνει την ανίχνευση μαζικής φασματομετρίας αυξάνοντας την αποδοτικότητα ιονισμού και το μοριακό βάρος της ένωσης. Με την παραγωγοποίηση, τα LOD και LOQ παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερες τιμές, ενώ σε μελέτες χωρίς παραγωγοποίηση τα αντίστοιχα όρια είναι υψηλότερα. Αυτή η διαδικασία είναι κρίσιμη για την κατανόηση και βελτίωση των τεχνικών ανάλυσης βιταμίνης D.

Επιλογή μεταβολιτών της βιταμίνης D και αναφορά

Παρά την γνωστή συμβολή της βιταμίνης D και της 25(OH)D στην αντιραχτική δραστηριότητα (ARA) στο ανθρώπινο γάλα (HM), δεν όλες οι μελέτες χρησιμοποιούν την εξειδικευμένη μέθοδο LC–MS/MS για τη μέτρηση και των δύο μεταβολιτών· ορισμένες μετρούν μόνο την 25(OH)D. Οι συγκεντρώσεις της βιταμίνης D₂ είναι γενικά χαμηλότερες από της βιταμίνης D₃ και συχνά κάτω από το όριο ανίχνευσης, αν και υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν παρόμοιες συγκεντρώσεις D₂ και D₃. Οι συγκεντρώσεις της βιταμίνης D αναφέρονται σε ng/ml, pmol/L ή nmol/L και ορισμένες μελέτες περιλαμβάνουν την ARA, αποδίδοντας υψηλότερη βιοδραστικότητα στην 25(OH)D. Η αδιακριτική χρήση του όρου

"βιταμίνη D" μπορεί να προκαλέσει σύγχυση στις βιβλιογραφίες, καθώς δεν διακρίνει μεταξύ της βιταμίνης D και της 25(OH)D.

Συγκεντρωμένα δεδομένα

Σε μελέτες που περιλαμβάνουν παρατηρήσεις και ελεγχόμενες δοκιμές, παρουσιάζονται συγκεντρώσεις 25(OH)D και βιταμίνης D στο ανθρώπινο γάλα (HM) από διάφορες χώρες και ηπείρους. Οι συγκεντρώσεις της 25(OH)D3 συνήθως κυμαίνονται από 0.1 έως 1.4 nmol/L και οι συγκεντρώσεις της βιταμίνης D3 από 0.1 έως 7.8 nmol/L. Υπάρχει μια αναφορά από την Ισπανία με ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση βιταμίνης D3 περίπου 16 nmol/L, πολύ υψηλότερη από άλλες αναφορές. Οι συγκεντρώσεις 25(OH)D3 αναφέρονται συχνά στη νανομολική κλίμακα, που είναι συμβατές με συγκεντρώσεις σε ορό και πλάσμα. Οι μελέτες χωρίς συμπλήρωση δείχνουν παρόμοιες ή ελαφρώς υψηλότερες συγκεντρώσεις 25(OH)D3 σε σχέση με τη βιταμίνη D3, αν και υπάρχουν εξαιρέσεις. Οι υψηλότερες τιμές για τις συγκεντρώσεις βιταμίνης D3 μπορεί να είναι πολύ υψηλότερες από τις τιμές για την 25(OH)D3, ανάλογα με τον πληθυσμό.

Συμπέρασμα

Οι μελέτες που αξιολογήθηκαν εδώ διεξήχθησαν σε διάφορες ηπείρους αλλά γενικά είχαν μικρό μέγεθος, με περίπου 20 έως 100 συμμετέχοντες. Αναφέρουν ευρεία γκάμα συγκεντρώσεων 25(OH)D και βιταμίνης D, με τις τελευταίες να είναι δυνατόν να τροποποιηθούν με συμπλήρωση βιταμίνης D. Το γάλα των γυναικών που δεν παίρνουν συμπληρώματα και δεν εκτίθενται σε UVB φαίνεται να έχει χαμηλές συγκεντρώσεις βιταμίνης D και δεν επαρκεί για να διατηρήσει την κατάσταση βιταμίνης D των βρεφών. Συχνά δεν αναφέρονται οι συνολικοί όγκοι γάλακτος, καθιστώντας δύσκολο τον ακριβή καθορισμό της πρόσληψης βιταμίνης D σε αποκλειστικά θηλαζόμενα βρέφη. Η μελέτη MILQ ξεκίνησε για να καταγράψει παγκοσμίως αντιπροσωπευτικά δεδομένα για το μικροθρεπτικό περιεχόμενο του HM, εστιάζοντας στη βιταμίνη D. Η χρήση LC-MS/MS προσφέρει σημαντικές δυνατότητες για τη δημιουργία δεδομένων για τις συγκεντρώσεις μεταβολιτών της βιταμίνης D στο HM, αλλά αναλυτικές δυσκολίες και διαφορετικά πρωτόκολλα συλλογής προσθέτουν περιπλοκότητα στην ερμηνεία των δεδομένων. Μελλοντικές έρευνες θα πρέπει να εστιάσουν στη βελτίωση και επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων και στη διεξαγωγή μεγαλύτερων μελετών. (Jones et al., 2023)

Γρήγορη μέθοδος HPLC και διαδικασίες εκχύλισης δειγμάτων για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων 25- hydroxyvitamin D3 στο ανθρώπινο μητρικό γάλα.

Οι Mohammed Ali Hadi et al., 2013 ανέπτυξαν ένα πρωτόκολλο για την εκχύλιση της cholecalciferol στο μητρικό γάλα για ανάλυση με HPLC χρησιμοποιώντας ως εσωτερικά πρότυπα την ρετινυλοξικετόνη (retinyl acetate). Η προτεινόμενη HPLC επιτρέπει τον επιτυχημένο διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση της Βιταμίνης D3 (χοληκαλσιφερόλη) και των αντίστοιχων εσωτερικών προτύπων της (ρετινυλοξικετόνη) σε λιγότερο από 10 λεπτά. Χρησιμοποιείται στήλη RP-C18 (100 x 4.6 mm I.D. με μέγεθος σωματιδίου 5 μικρόν) με ρυθμό ροής 1 ml/λεπτό, ενώ η κινητή φάση ήταν μεθανόλη. Το ελυώμα παρακολουθήθηκε με φωτοδιόδικο ανιχνευτή πίνακα στα κύματα μήκους 265 nm. Δεν βρέθηκαν παρεμβολές από άλλες λιποδιαλυτές βιταμίνες (βιταμίνη A) που συνήθως συνυπάρχουν με τη βιταμίνη D. Μελέτες αναπαραγωγικότητας που διεξήχθησαν με συγκεντρωμένο μητρικό γάλα

έδειξαν ότι η ακρίβεια εντός ημέρας και μεταξύ ημερών της ανάλυσης δεν υπερέβη το 2.6% και 4% αντίστοιχα για τη χοληκαλσιφερόλη. Τα όρια ανίχνευσης ήταν 2.8 ng/ml, η γραμμικότητα του προτύπου ήταν εξαιρετική ($r^2 > 0.999$), σε εύρος συγκεντρώσεων από 0-100 ng/ml. Αυτή η μέθοδος διαχωρίζει τις λιποδιαλυτές βιταμίνες στο ανθρώπινο μητρικό γάλα, συμπεριλαμβανομένης της χοληκαλσιφερόλης, χρησιμοποιώντας ρετινυλοξικετόνη ως εσωτερικά πρότυπα. Η μέθοδος HPLC είναι μια γρήγορη διαδικασία για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των βιταμινών D στο ανθρώπινο μητρικό γάλα, αποφεύγοντας χρονοβόρα βήματα και έχει αποδειχθεί ότι είναι ευαίσθητη και αξιόπιστη. (Mohammed Ali Hadi et al., 2013)

2.2 Σύγχρονες μέθοδοι προσδιορισμού Βιταμίνης K στο μητρικό γάλα

Η βιταμίνη K (VK), μια απαραίτητη λιποδιαλυτή βιταμίνη, υπάρχει κυρίως στη μορφή της φυλλοκινόνης (PK ή VK1) και των μενακινονών (VK2 ή MK-n). Ανάλογα με τη δομή της πλευρικής αλυσίδας, η VK2 είναι επί του παρόντος χωρισμένη σε 10 ισομορφές (MK-4 έως MK-13), μεταξύ των οποίων το MK-4 και το MK-7 είναι τα συνηθέστερα. Η VK έχει κρίσιμη σημασία για τα βρέφη και τα νεαρά παιδιά. Τα βρέφη με χαμηλά επίπεδα VK βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης νεονατικής αιμορραγικής νόσου (NHD), γνωστής επίσης ως αιμορραγία λόγω έλλειψης βιταμίνης K (VKDB). Η VK έχει προσηπτική λειτουργία, και η συμπλήρωση VK μπορεί να προλάβει την VKDB. Επιπλέον, τα πιθανά οφέλη της VK για καταστάσεις όπως η οστεοπόρωση, ο διαβήτης, οι καρδιαγγειακές νόσοι, η φλεγμονή, ο καρκίνος και άλλες ασθένειες έχουν προσελκύσει σημαντικό ενδιαφέρον. (Wang et al., 2024)

Η HPLC υπέρσχυσε ως μέθοδος ανάλυσης **βιταμίνης K** λόγω υψηλότερης ευαισθησίας. Οι μέθοδοι περιλαμβάνουν FLD, ECD και UV ανίχνευση. Συνήθως, η λιπάση χρησιμοποιείται για επεξεργασία του λιπιδικού εκχυλίσματος, ακολουθούμενη από διπλό καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης και ημι-παρασκευαστική HPLC. Η FLD και η ECD προσφέρουν ευαισθησία δύο τάξεων μεγέθους μεγαλύτερη από την UV, απαιτώντας όμως μετατροπή των βιταμερών της βιταμίνης K στη μειωμένη μορφή τους, που επιτυγχάνεται με χημικές, ηλεκτροχημικές, φωτοχημικές ή καταλυτικές μεθόδους. Η καταλυτική μείωση με στερεή φάση μετά τη στήλη, χρησιμοποιώντας ψευδάργυρο ή οξείδιο του λευκόχρυσου, περιγράφεται ως η ευκολότερη εναλλακτική. Η LC-MS/MS έχει περιγραφεί για την ανάλυση βιταμίνης K. Τα δείγματα υφίστανται επεξεργασία με λιπάση, καταβύθιση πρωτεϊνών και εκχύλιση με εξάνιο. Μετά από καθαρισμό με φυσίγγιο πυριτίας, το εκχύλισμα είναι έτοιμο για ανάλυση. (Hampel et al., 2018)

Προσδιορισμός φυλλοκινόνης και μενακινόνης στο ανθρώπινο γάλα μ την μέθοδο HPLC

Οι Isshiki et al., 1988 περιγράφουν στο άρθρο τους <Determination of Phylloquinone and Menaquinone in Human Milk Using High Performance Liquid Chromatography> τον προσδιορισμό φυλλοκινόνης και μενακινόνης στο ανθρώπινο γάλα μ την μέθοδο HPLC. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιούν την μέθοδο HPLC για να αναλύσουν την βιταμίνη K στο μητρικό γάλα και στο αγελαδινό γάλα. Οι βιταμίνες K εκχυλίστηκαν με n-πεντάνιο από ενζυματικό υδρολύσιμο γάλα, καθαρίστηκαν με ημιπροετοιμαστική HPLC και στη συνέχεια αναλύθηκαν με αντίστροφης φάσης HPLC εξοπλισμένη με διπλό ηλεκτροχημικό ανιχνευτή (EC detector). Η ποσότητα φυλλοκινόνης και μενακινόνης-4 στο ανθρώπινο γάλα ήταν $2,1 \pm 0,9$ και $1,3 \pm 1$ μg/L αντίστοιχα. (Isshiki et al., 1988)

Ποσοτικοποίηση των βιταμινών A, E, και K και καροτενοειδών σε μητρικό γάλα

Οι Levêques et al., 2019 ποσοτικοποίησαν τις βιταμίνες A, E, και K και καροτενοειδή σε <1 mL μητρικό γάλα. Οι βιταμίνες E και K και τα καροτενοειδή απομονώνονται ταυτόχρονα από 750 μ L γάλα με εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE). Οι τοκοφερόλες και τα καροτενοειδή προσδιορίζονται με LC-UV και LC-FLD αντίστοιχα. Η βιταμίνη K αναλύεται στα ίδια εκχυλίσματα μετά από επαναδιαλύση και καθαρισμό με την μέθοδο LC-MS/MS. Η ανάλυση της βιταμίνης A περιλαμβάνει σαπωνοποίηση 200 μ L γάλακτος ακολουθούμενη από LLE και προσδιορισμό με την μέθοδο LC-UV, όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

Αποτελέσματα: Παρουσιάζεται η πλήρης επικύρωση ενός εργαστηρίου σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης. Τα ποσοστά ανάκτησης ήταν μεταξύ 90-105% σε όλες τις περιπτώσεις εκτός από μία (ρετινόλη στα 1.9 μ g/mL, ανάκτηση 88%), με RSDs επαναληψιμότητας και ενδιάμεσης αναπαραγωγικότητας κάτω από 10 και 15% αντίστοιχα για όλες τις ενώσεις. (Levêques et al., 2019)

2.3 Σύγχρονες μέθοδοι προσδιορισμού σιδήρου στο μητρικό γάλα

Οι Pinto & Almeida, 2018 ανέφεραν ότι ο σίδηρος αποτελεί ένα ζωτικό συστατικό για διάφορες πρωτεΐνες, όπως τα ένζυμα, τα κυτοχρώματα, η μυογλοβίνη και η αιμοσφαιρίνη. Περίπου δύο τρίτα του συνολικού σιδήρου στο σώμα εντοπίζονται στην αιμοσφαιρίνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων, υπεύθυνη για τη μεταφορά οξυγόνου. Ένα ποσοστό περίπου 25% αποθηκεύεται σε μορφή εύκολα κινητοποιήσιμων αποθεμάτων, ενώ το υπόλοιπο 15% βρίσκεται στη μυοσφαιρίνη των μυών. Η ποσότητα των αποθεμάτων σιδήρου στο σώμα επηρεάζει σημαντικά την απορρόφησή του, με τα υψηλά αποθέματα να αναστέλλουν τη γαστρεντερική απορρόφηση σιδήρου, η οποία λαμβάνει χώρα στο λεπτό έντερο. Η έλλειψη σιδήρου οδηγεί σε αναιμία, την πιο διαδεδομένη διατροφική ελλειμματικότητα σε ουσιαστικά στοιχεία, με κύρια συμπτώματα τη μειωμένη εργασιακή απόδοση και την καθυστερημένη ψυχοκινητική ανάπτυξη στα παιδιά, προκαλώντας γνωστικά ελλείμματα. Η αναιμία αποτελεί επίσης την πιο συνηθισμένη πάθηση στα παιδιά. Στους πρώτους έξι μήνες μετά τον τοκετό, η συγκέντρωση σιδήρου στο μητρικό γάλα παραμένει σχετικά σταθερή, μεταξύ 0.21 και 0.27 mg/L. Ωστόσο, κάποιοι ερευνητές αναφέρουν ότι μετά από αυτό το διάστημα τα επίπεδα σιδήρου στο γάλα μειώνονται δραματικά, φτάνοντας τιμές μεταξύ 0.08 και 0.10 mg/L, ενώ άλλοι παρατηρούν ότι τα επίπεδα παραμένουν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια της γαλουχίας. Δεν έχουν εντοπιστεί σημαντικές διαφορές που να συνδέονται με την ηλικία της μητέρας, τον αριθμό των παιδιών ή τον αριθμό των προηγούμενων θηλαζόντων βρεφών. Επίσης, δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ του περιεχομένου σιδήρου στη διατροφή της μητέρας και της συγκέντρωσης σιδήρου στο μητρικό γάλα. (Pinto & Almeida, 2018) Πολλές μελέτες in vivo και in vitro έχουν επιβεβαιώσει ότι το Fe είναι ένας κρίσιμος παράγοντας στο μητρικό γάλα για την προστασία από παιδιατρικούς παθογόνους. (Durović et al., 2017)

Πίνακας 6. Τεχνικές ανάλυσης ιχνοστοιχείων(σιδήρου & ιωδίου) στο μητρικό γάλα Πηγή (Pinto & Almeida, 2018)

Element	Average or interval (mg/L)	Time after delivery ¹	Milk type ²	n	Country ³	Analytical technique ⁴
Fe	0.16952	2–6 w	M	20	USA	ICP-MS
	0.13094	1–7 w	M	6	NAM	
	0.18687	2–6 w	M	23	POL	
	0.21104	3–7 w	M	21	ARG	
	0.38 ^b	—	—	27	AUT	ICP-SFMS
	0.3–0.6	—	—	—	—	—
	1.72	1–7 d	C	50	BRA	TXRF
	1.19	—	M	—	JPN	ICP-AES
	0.5	30–45 d	M	31	USA (Texas)	AAS
	0.4	75–90 d		17		
	0.36	—	—	27	IRN	FAAS
	0.558	5–17 d	T	55	GTM	ICP-MS
	0.581	18–46 d	M	73		
	0.320	4–6 mo	M	100		
	0.047	—	—	12	AUS	ICP-MS
	1.27	2–6 w	M	20	USA	ICP-MS
	1.53	1–7 w	M	6	NAM	ICP-MS
	1	2–6 w	M	23	POL	ICP-MS
I	0.99	3–7 w	M	21	ARG	ICP-MS
	0.098–0.247	14 d–3.5 y	—	14–24	—	—
	0.0478	30–45 d	M	31	USA (Texas)	NAA
	0.0423	75–90 d		17		
	0.113	—	—	12	AUS	ICP-MS

Ανάλυση σιδήρου άλλων ιχνοστοιχείων με την μέθοδο Φασματομετρία Ατομικής / Οπτικής Εκπομπής Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος Αργού (Inductively Coupled Plasma AES ή OES) και τη φασματομετρία ατομικής απορρόφησης με φλόγα (FAAS)

Οι Durović et al., 2017 ποσοτικοποίησαν ιχνοστοιχεία μητρικού γάλακτος με την μέθοδο Φασματομετρία Ατομικής / Οπτικής Εκπομπής Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος Αργού (Inductively Coupled Plasma AES ή OES) και τη φασματομετρία ατομικής

απορρόφησης με φλόγα (FAAS). Πιο συγκεκριμένα ερεύνησαν τις συγκεντρώσεις των στοιχείων ψευδαργύρου (Zn), σιδήρου (Fe) και χαλκού (Cu) σε ανθρώπινο γάλα και βρεφικό γάλα καθορίστηκαν χρησιμοποιώντας μια νέα μέθοδο προετοιμασίας δειγμάτων, με τη φασματομετρία εκπομπής πλάσματος με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-OES) και τη φασματομετρία ατομικής απορρόφησης με φλόγα (FAAS). Στον πίνακα 5. παρουσιάζονται κάποιες τεχνικές ανάλυσης ιωδίου και σιδήρου. (Pinto & Almeida, 2018)

Υλικά και μέθοδοι

Είκοσι οκτώ δείγματα ανθρώπινου γάλακτος (10-20 ml) συλλέχθηκαν από υγιείς μητέρες (ηλικίας $31,2 \pm 6$ ετών) την πρώτη ημέρα μετά την περίοδο τοκετού στο Τμήμα Νεογνολογίας του Νοσοκομείου Σουμπότιτσα τον Ιανουάριο του 2013. Τα δείγματα αυτά αντλήθηκαν με χειροκίνητη αντλία ή με παθητικό συλλέκτη γάλακτος, τόσο στην αρχή όσο και στο τέλος της συνεδρίας θηλασμού. Τα δείγματα ανθρώπινου γάλακτος επισημάνθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -20°C πριν από την ανάλυση. Τυχαία δείγματα βρεφικών φόρμουλας αποκτήθηκαν από την τοπική αγορά. Στη συνέχεια τα δείγματα ανθρώπινου γάλακτος ξεπαγώθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και αραιώθηκαν δέκα φορές με υπερκαθαρό νερό. Τα δείγματα βρεφικής φόρμουλας προετοιμάστηκαν ως εξής: 1 γραμμάριο διαλύθηκε σε 100 ml υπερκαθαρού νερού, λόγω των υψηλότερων συγκεντρώσεων των μικροστοιχείων και της μεγαλύτερης πυκνότητας των προκύπτων διαλυμάτων σε σύγκριση με τα αραιωμένα δείγματα ανθρώπινου γάλακτος. Αυτή η διαδικασία επέτρεψε τις αναλύσεις να εμπίπτουν στα γραμμικά εύρη των καμπυλών βαθμονόμησης των αναλυτικών προτύπων. Η μεθοδολογία μας επέτρεψε την άμεση ανάλυση των δειγμάτων χωρίς πέψη και λαμβάνοντας υπόψη πιθανές αναμίξεις από οργανική ύλη κατά τον εντοπισμό των μικροστοιχείων. Με τις παραπάνω διαδικασίες αραιώσης, τα δείγματα προετοιμάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι πολύ παρόμοια (περιεχόμενο λίπους και πρωτεΐνης) και μας επέτρεψαν να επικυρώσουμε σωστά τη μέθοδο. Το περιεχόμενο των αναλυθέντων μικροστοιχείων στα δείγματα ήταν παρόμοιο με το επιλεγμένο υλικό αναφοράς.

Αντιδραστήρια

Όλα τα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκαν ως αναλυτικής καθαρότητας. Οι αναλυτικές διαλύσεις των Zn, Fe και Cu προετοιμάστηκαν μετά από σειριακές αραιώσεις αποθεματικών διαλυμάτων αναφοράς που περιείχαν 1000 mg L⁻¹ κάθε στοιχείου (LGC-ICP-OES αποθεματικό διάλυμα). Ως βαθμονομητές χρησιμοποιήθηκαν υλικό αναφοράς από το Εθνικό Ινστιτούτο Προτύπων και Τεχνολογίας (NIST) και η βρεφική/ενηλίκων διατροφική φόρμουλα SRM-1849.

Εξοπλισμός

Το όργανο ICP-OES (με αξονική διαμόρφωση) αγοράστηκε από την Spectro Analytical Instruments GmbH (Kleve, Γερμανία). Χειριζόταν μέσω του λογισμικού Smart Analyzer Vision (έκδοση 5.01.0928) και συνδεόταν σε ένα αυτόματο δειγματολήπτη ASX-520 (CETAC). Χρησιμοποιήθηκε η λύση Spectro ICAL (συμπύκνωμα 10x, Berd Kraft Der Standard) για τον αυτοέλεγχο και την αυτορύθμιση του οργάνου (σε ολόκληρο το πολυχρωμάτορα). Οι παράμετροι ρυθμίσεων του οργάνου ICP-OES φαίνονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 7. παράμετροι ρυθμίσεων του οργάνου ICP-OES Πηγή (Durović et al., 2017)

Parameter	Setting
Plasma Power	1.4 KW
Pump Speed	30 Rpm
Coolant Flow	14 L min ⁻¹
Auxiliary Flow	0.7 L min ⁻¹
Nebulizer Flow	0.9 L min ⁻¹
Spray chamber	Cyclonic
Plasma viewing mode	Axial
Processing mode	Area
Metal (wavelength, nm)	Zn (213.857), Fe (238.204), Cu (327.396)
Correlation Coefficient	0.999
Number of replicates	3
Rinse delay	30 s
Read delay	30 s

Στατιστική ανάλυση

Οι στατιστικές αναλύσεις διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό SPSS. Οι συντελεστές συσχέτισης για τα Zn, Fe και Cu σε δείγματα ανθρώπινου γάλακτος καθορίστηκαν (συντελεστής Pearson). Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά εάν το p ήταν <0.05 . Η γραμμική παλινδρόμηση χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των διαφορών μεταξύ FAAS και ICP-OES. Περιγραφική στατιστική χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των δεδομένων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως πίνακες και διαγράμματα κουτιών. Τα κουτιά αντιπροσωπεύουν το διάμεσο και τα ποσοστά 25ου και 75ου εκατοστημορίου· τα μουστάκια αντιπροσωπεύουν το εύρος χωρίς ακραίες τιμές. Οι ακραίες τιμές και τα άκρα ορίζονταν ως τιμές των σημείων δεδομένων που ήταν περισσότερο από 1.5 και 3 το εύρος του τεταρτημορίου (IQR) έξω από το κουτί.

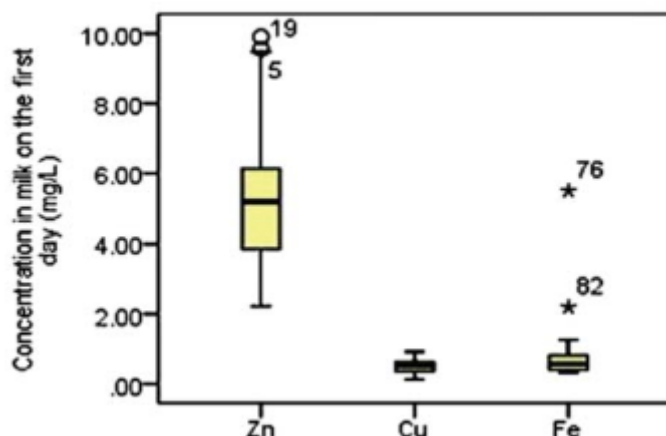
Επικύρωση μεθόδου

Πίνακας 8. Επικύρωση μεθόδου ανάλυσης Πηγή (Durović et al., 2017)

Element	Relative precision (%)	R ²	Linearity range (μg L ⁻¹)	LOD (μg L ⁻¹)	LOQ (μg L ⁻¹)
Zn	4	0.99994	0.9–2400	1.5	5
Fe	8	0.99971	0.7–2400	1.5	5
Cu	1	0.99957	1.2–2400	3.0	10

Στη μελέτη αυτή, αναλύθηκαν πρότυπα διαλύματα σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mg L⁻¹) τριπλά για την εκτίμηση της γραμμικότητας της μεθόδου μέτρησης. Τα δείγματα αναλύθηκαν τακτικά για να παρακολουθείται η μεταβλητότητα του οργάνου και για την αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης. Οι καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάστηκαν και ο στόχος ήταν να επιτευχθεί συντελεστής συσχέτισης $R^2 > 0.999$. Οι συντελεστές συσχέτισης για τα Zn, Fe και Cu ξεπέρασαν το $R^2 > 0.9999$, συνεπώς ο στόχος της μελέτης επιτεύχθηκε. Οι αποκλίσεις από τις θεωρητικές τιμές ήταν κάτω από 5%, δείχνοντας καλή συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσης και μέτρησης.

Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) υπολογίστηκαν με βάση τις συστάσεις της Διεθνούς Ένωσης Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC), όπου το υψηλότερο LOD ήταν για το Fe, 3.0 mg L⁻¹. Η ακρίβεια αξιολογήθηκε μέσω της μεταβλητότητας των μετρήσεων (CV), με τις τυπικές αποκλίσεις των μεταβλητοτήτων να είναι 4% για το Zn, 8% για το Fe και 1% για το Cu με την ICP-OES, και 3% για το Zn, 3% για το Fe και 0.6% για το Cu με τη FAAS, καθιστώντας τις τιμές αυτές αποδεκτές για την ανίχνευση κλινικών δειγμάτων.



Εικόνα 6. Συγκέντρωση των Zn, Fe και Cu σε δείγματα ανθρώπινου γάλακτος την πρώτη ημέρα μετά τον τοκετό. Τα κουτιά αντιπροσωπεύουν το διάμεσο και τα ποσοστά 25ου και 75ου εκατοστημορίου· τα μoustάκια αντιπροσωπεύουν το εύρος χωρίς ακραίες τιμές
Πηγή (Durović et al., 2017)

Τα ληφθέντα δεδομένα έδειξαν ότι η μέθοδος ICP-OES παρείχε στατιστικά σημαντικά υψηλότερες μέσες τιμές για το Zn, 9.5 mg L⁻¹, σε σύγκριση με την FAAS ($p = 0.001$). Η μέθοδος FAAS παρείχε στατιστικά σημαντικά υψηλότερες μέσες τιμές για το Fe, 23.25 mg L⁻¹, σε σύγκριση με την ICP-OES ($p < 0.001$). Για το Cu, δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων ($p = 0.671$). Το Σχήμα 1 δείχνει τις μεταβολές των συγκεντρώσεων των Zn, Cu και Fe στα δείγματα ανθρώπινου γάλακτος την πρώτη ημέρα μετά τον τοκετό.

Αποτελέσματα

Σε αυτή τη μελέτη αναπτύχθηκε μια γρήγορη, εύκολη, οικονομική και απλή μέθοδος προετοιμασίας δειγμάτων (χωρίς αποικοδόμηση), προκειμένου να προσδιοριστούν τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία στο ανθρώπινο μητρικό γάλα. Η αξιολόγηση της μεθόδου και η ανίχνευση κλινικών δειγμάτων με τη χρήση ICP-OES χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση της ακρίβειας, της αξιοπιστίας και της πρακτικότητας. Το κύριο πλεονέκτημα της παρουσιασθείσας μεθόδου προετοιμασίας δείγματος είναι το γεγονός ότι δεν υπάρχει χημική κατανάλωση και θεωρείται μια πράσινη χημική μέθοδος, δηλαδή είναι περιβαλλοντικά αποδεκτή. Συνοπτικά, η προτεινόμενη μέθοδος είναι απλή, οικονομική, ακριβής και ιδιαίτερα αξιόπιστη και ως εκ τούτου, μπορεί να εφαρμοστεί στην κλινική ανίχνευση ιχνοστοιχείων σε βιολογικά δείγματα. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων Zn, Fe και Cu στα δείγματα ανθρώπινου γάλακτος.

Με βάση τα ληφθέντα δεδομένα και τη γραμμική παλινδρόμηση, μπορεί να συμπερασθεί ότι η ICP-OES είναι καλύτερη μέθοδος για τον προσδιορισμό του Zn, η FAAS για τον Fe, ενώ δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών των δύο μεθόδων, όσον αφορά το Cu. (Durović et al., 2017)

2.4 Σύγχρονες μέθοδοι προσδιορισμού ιωδίου στο μητρικό γάλα

Το ιώδιο είναι κρίσιμο συστατικό των θυρεοειδικών ορμονών θυροξίνης (T4) και τριιωδοθυρονίνης (T3), οι οποίες ρυθμίζουν διάφορα ένζυμα και μεταβολικές διαδικασίες. Τα κύρια όργανα που επηρεάζονται από αυτές τις ορμόνες περιλαμβάνουν τον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο, τους μυς, την καρδιά, την υπόφυση και τα νεφρά. Εξαιτίας αυτού, το ιώδιο είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση των θηλαστικών. Η έλλειψη ιωδίου συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο περιγεννητικής θνησιμότητας και μειωμένο βάρος γέννησης. Δεδομένου ότι ο εγκέφαλος του νεογνού έχει αναπτυχθεί μόλις στο ένα τρίτο του τελικού μεγέθους του και συνεχίζει να αναπτύσσεται επιταχυνόμενα μέχρι την ηλικία των δύο ετών, οι θυρεοειδικές ορμόνες και το ιώδιο διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο σε αυτή τη φάση. Πληθυσμοί με σοβαρή έλλειψη ιωδίου αντιμετωπίζουν υψηλό κίνδυνο για νοητική υστέρηση και κρητινισμό. Η συνιστώμενη πρόσληψη ιωδίου είναι 110 και 130 μg/ημέρα για το πρώτο και το δεύτερο εξάμηνο της ζωής αντιστοίχως. Η περιεκτικότητα του ιωδίου στο μητρικό γάλα συνδέεται άμεσα με τη διατροφική πρόσληψη της μητέρας. Οι θηλάζουσες γυναίκες συνιστάται να προσλαμβάνουν 220 μg ιωδίου την ημέρα. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι οι καπνιστικές συνήθειες της μητέρας μπορεί να μειώσουν σημαντικά την περιεκτικότητα του ιωδίου στο γάλα. (Pinto & Almeida, 2018)

Η κύρια μέθοδος ανάλυσης του **ιωδίου** στο μητρικό γάλα είναι η χρωματομετρική μέθοδος βασισμένη στην αντίδραση Sandell-Kolthoff, όπου το ιώδιο καταλύει την αναγωγή του κερίου (IV) από αρσενικό (III) υπό όξινο περιβάλλον. Το δείγμα υποβάλλεται σε διαδικασία αποτέφρωσης πριν από την ανάλυση και μετράται με τη χρήση αυτόματου αναλυτή. Η ICP-MS έχει δείξει ότι παρέχει συγκρίσιμα αποτελέσματα με την χρωματομετρική μέθοδο χωρίς αναλυτική απόκλιση, αν και πρόσφατη μελέτη ανέδειξε την ICP-MS ως τη μέθοδο επιλογής για την ανάλυση συγκεντρώσεων ιωδίου στο μητρικό γάλα λόγω της ανώτερης ανάκτησης και ευαισθησίας της σε σχέση με την χρωματομετρική μέθοδο, υποδεικνύοντας μια άγνωστη απόκλιση μεταξύ των δύο μεθόδων. Άλλες αναλυτικές τεχνικές περιλαμβάνουν τη μέθοδο ενεργοποίησης νετρονίων, την ιοντική χρωματογραφία συνδεδεμένη με MS και τη χρήση ηλεκτροδίου ειδικού για ιωδίδιο. Οι τελευταίες μέθοδοι συνήθως παρέχουν αποτελέσματα μόνο για το ιωδίδιο, όχι για το συνολικό ιώδιο στο μητρικό γάλα. Η επαρκής πρόσληψη (AI) ιωδίου για βρέφη 0–6 μηνών βασίζεται σε λίγες μελέτες που χρησιμοποίησαν την χρωματομετρική μέθοδο ή το ηλεκτρόδιο ειδικό για ιωδίδιο. Με βάση τα πρόσφατα ευρήματα σχετικά με την ICP-MS και τη χρωματομετρική μέθοδο, η ICP-MS είναι η προτιμώμενη αναλυτική προσέγγιση για την ανάλυση της συνολικής περιεκτικότητας σε ιώδιο στο ανθρώπινο γάλα. (Hampel et al., 2018)

Προσδιορισμός του ιωδίου στο μητρικό γάλα με την μέθοδο ICP-MS

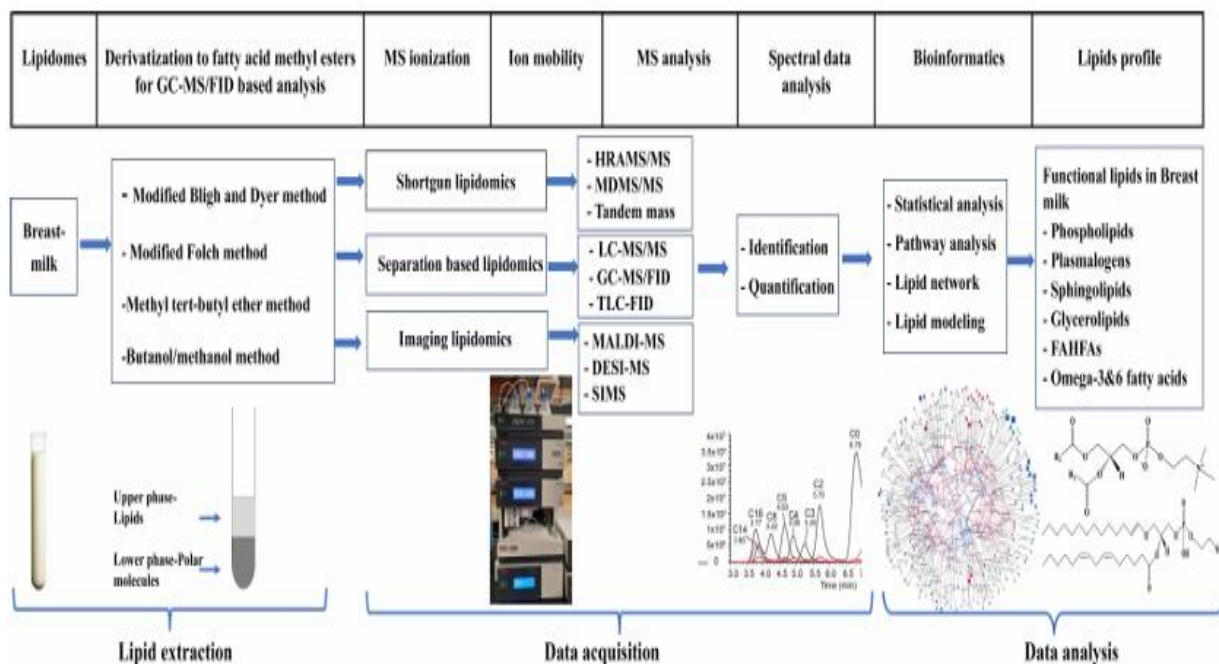
Οι Fernández-Sánchez et al., 2007 περιγράφουν, στο άρθρο < Determination of iodine in human milk and infant formulas>, τον προσδιορισμό του ιωδίου με την μέθοδο ICP-MS στο μητρικό γάλα και σε βρεφική φόρμουλα. Λόγω των χαμηλών επιπέδων ιωδίου στο γάλα, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί μια αναλυτική τεχνική με χαμηλό όριο ανίχνευσης,

όπως η ICP-MS. Επειδή προέκυψαν προβλήματα κατά τον άμεσο προσδιορισμό του ιωδίου στο γάλα με τη μέθοδο ICP-MS, είναι απαραίτητη η πέψη του δείγματος. Τα δείγματα γάλακτος υποβλήθηκαν σε πέψη χρησιμοποιώντας αλκαλική πέψη (5% NH₃, 45 W, 2 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα), και η μέθοδος επικυρώθηκε χρησιμοποιώντας ένα πιστοποιημένο αναφορικό υλικό (CRM) BCR CRM151. Από την άλλη, το γάλα χωρίστηκε σε τρεις φράξεις, σε ορρό, λίπος και καζεΐνες χρησιμοποιώντας υπερκεντροφορισμό (15 λεπτά, 4 1C, 50,000 rpm) και το ιώδιο προσδιορίστηκε στις διαφορετικές φράξεις. Περίπου 27 δείγματα διαφορετικών βρεφικών φαρμάκων και 14 δείγματα ανθρώπινου γάλακτος έχουν μελετηθεί. Στο ανθρώπινο γάλα, οι τιμές που βρέθηκαν ήταν μεταξύ 144793,2 mg kg⁻¹, ενώ στις βρεφικές φόρμουλες οι τιμές ήταν 53,3 έως 719,5. Για και τους δύο τύπους δειγμάτων, η μεγαλύτερη ποσότητα ιωδίου βρίσκεται στη φράξη του ορρού, μεταξύ 80% και 90%, ενώ στο λίπος υπάρχει περίπου το 2% του συνολικού ιωδίου και στη φράξη της καζεΐνης τα επίπεδα είναι μεταξύ 5% και 10% ανάλογα με τον τύπο του δείγματος. (Fernández-Sánchez et al., 2007)

3.Σύγχρονες μέθοδοι προσδιορισμού βιοδραστικών λιπιδικών συστατικών μητρικού γάλακτος

Οι George et al., 2018 ανέφεραν ότι το μητρικό γάλα αποτελείται έναν πολύπλοκο συνδυασμό λιπιδίων, πρωτεϊνών, υδατανθράκων και ανόργανων στοιχείων, που είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και εξέλιξη του βρέφους. Ενώ τα λιπίδια είναι μόνο το 5% της συνολικής σύστασης του ανθρώπινου γάλακτος, παρέχουν πάνω από το 50% της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης του βρέφους. Η σύσταση των λιπιδίων του μητρικού γάλακτος μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του θηλασμού, μέσα στην ημέρα και σε διαφορετικές φάσεις γαλουχίας, και φυσικά αυτό καθιστά δύσκολη την τυποποίηση της διαδικασίας δειγματοληψίας. Συγκρίνοντας το μητρικό γάλα με το αίμα, παρατηρούμε ότι έχουν βιοδραστικές ιδιότητες και περιέχουν ενδογενείς λιπάσες, καθιστώντας κρίσιμη την ορθή αποθήκευση του για την αποφυγή της λιπόλυσης. Για την ανάλυση της σύνθεσης των λιπαρών οξέων στα λιπίδια του ανθρώπινου γάλακτος χρησιμοποιούνται μέθοδοι αέριας χρωματογραφίας. Όμως με την εξέλιξη νέων χρωματογραφικών τεχνικών, όπως η υγρή χρωματογραφία και η χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού, καθώς και η φασματομετρία μάζας η ανάλυση έχει γίνει πιο ακριβής και λεπτομερής. Με την κατάλληλη μεθοδολογία και τα κατάλληλα όργανα, μπορεί να επιτευχθεί περαιτέρω κατανόηση του λιπιδιώματος του ανθρώπινου γάλακτος και της επίδρασής του που έχει στα βρέφη. (George et al., 2018)

Ορισμοί Το λιπιδίωμα αναφέρεται στο σύνολο των λιπιδικών ειδών σε ένα κύτταρο ή όργανο. Ενώ η λιποδομική μελετάει το συνολικό λιπιδικό προφίλ ενός κυττάρου σε μοριακό επίπεδο. Οι πρόσφατες εξελίξεις στη φασματομετρία μάζας επιτρέπουν την ακριβή ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των λιπιδίων σε βιολογικά δείγματα. Επομένως οι πληροφορίες που προκύπτουν συμβάλλουν στην κατανόηση των λιπιδικών μεταβολικών διεργασιών και του ρόλου τους στη διατροφή και την ανθρώπινη υγεία, μέσα σε μία ολιστική, βιολογική προσέγγιση. (Han & Gross, 2003; Kishimoto et al., 2001) Μια περίληψη της διαδικασίας ανάλυσης λιπιδιώματος του μητρικού γάλακτος φαίνεται παρακάτω στην εικόνα 3. Συγκεκριμένα παρουσιάζονται τα παρακάτω στάδια: Εκχύλιση λιπιδίων (Lipid extraction), Απόκτηση δεδομένων (Data acquisition), Ανάλυση φασματικών δεδομένων (Spectral data analysis), Βιοπληροφορική ανάλυση (Bioinformatics) και Προφίλ λιπιδίων (Lipids profile) (Ganeshalingam et al., 2022)



Εικόνα 7. Μια περίληψη της διαδικασίας ανάλυσης λιπιδιώματος του μητρικού γάλακτος, Εκχύλιση λιπιδίων (Lipid extraction), Απόκτηση δεδομένων (Data acquisition), Ανάλυση φασματικών δεδομένων (Spectral data analysis), Βιοπληροφορική ανάλυση (Bioinformatics) και Προφίλ λιπιδίων (Lipids profile) Πηγή (Ganeshalingam et al., 2022)

3.1 Προετοιμασία δείγματος

3.1.1 Δειγματοληψία

Η συγκέντρωση και η σύνθεση των λιπιδίων στο μητρικό γάλα δεν είναι σταθερή, αλλά μεταβάλλεται ανάλογα με τις ανάγκες του βρέφους κάθε στιγμή. Η συνολική περιεκτικότητα σε λιπίδια στο ανθρώπινο γάλα κυμαίνεται από 11,4 g/L έως 61,8 g/L, αλλά οι τιμές αυτές διαφοροποιούνται από γυναίκα σε γυναίκα, κατά τη διάρκεια ενός θηλασμού, στα διάφορα στάδια της γαλουχίας και μέσα στην ημέρα. Ένα βασικό πρόβλημα στις μεθόδους δειγματοληψίας είναι ότι οι μελέτες αυτές διεξάγονται σε ανθρώπους, και συγκεκριμένα σε θηλάζουσες μητέρες, γεγονός που απαιτεί προσεκτικό σχεδιασμό ώστε να μην επηρεάζονται οι συνήθειες θηλασμού και ύπνου του βρέφους. Οι διαδικασίες συλλογής δειγμάτων είναι μη επεμβατικές και περιλαμβάνουν την άντληση γάλακτος με το χέρι ή με τη χρήση θηλάστρου. Επιπλέον, οι διαφορές στις μεθόδους δειγματοληψίας και ο χρόνος συλλογής του δείγματος αποτελούν παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα, συμβάλλοντας στις διακυμάνσεις των μετρήσεων. Ως εκ τούτου, είναι ζωτικής σημασίας η εφαρμογή αυστηρών και τυποποιημένων πρωτοκόλλων συλλογής προκειμένου να διασφαλιστεί η ακρίβεια και η αντιπροσωπευτικότητα των δειγμάτων στις μελέτες που αφορούν το μητρικό γάλα. (HM). (George et al., 2018). (Ganeshalingam et al., 2022)

Δειγματοληψία με σεβασμό προς τον θηλασμό

Οι George et al., 2018 αναφέρουν ότι όταν το στήθος αδειάζει από γάλα κατά τη διάρκεια του θηλασμού παρατηρείται αύξηση της περιεκτικότητας του μητρικού γάλακτος σε λιπαρά. Επομένως, η δειγματοληψία γάλακτος πριν τον θηλασμό (pre-feed) θα δώσει χαμηλότερη συνολική περιεκτικότητα σε λιπαρά σε σύγκριση με δείγματα που συλλέγονται κατά τη διάρκεια (mid-feed) ή μετά τον θηλασμό (post-feed). Πιο συχνά χρησιμοποιείται η μέθοδος δειγματοληψίας για την ανάλυση ολόκληρου του θηλασμού. Συγκεκριμένα γίνεται η πλήρης άντληση του στήθους με θήλαστρο και η συλλογή δείγματος από το αντλημένο γάλα. Ωστόσο, καθώς τα βρέφη σπάνια αδειάζουν πλήρως το στήθος, αυτή η μέθοδος αφαιρεί περισσότερο γάλα από το τέλος του θηλασμού, το οποίο έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά, οδηγώντας σε υπερεκτίμηση της κατανάλωσης του βρέφους. (George et al., 2018)

Δειγματοληψία σε διάστημα 24 ωρών

(Lubetzky et al., 2006) επισήμαιναν ότι καθώς η περιεκτικότητα σε λιπαρά αυξάνεται με την αφαίρεση του γάλακτος από το στήθος, η περιεκτικότητα σε λιπίδια στο ανθρώπινο γάλα (HM) μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια μιας περιόδου 24 ωρών, αυξάνοντας από τον πρώτο θηλασμό της ημέρας έως τον τελευταίο, με υψηλότερες τιμές το βράδυ σε σύγκριση με το πρωί. (Lubetzky et al., 2006) (Kent et al., 2006) επιβεβαίωσαν ότι με τη δειγματοληψία και τη ζύγιση του βρέφους πριν και μετά από κάθε θηλασμό σε διάστημα 24 ωρών, είναι δυνατόν να μετρηθεί η παραγωγή γάλακτος καθώς και η πραγματική ποσότητα λιπιδίων γάλακτος που καταναλώνει το βρέφος. (Kent et al., 2006)

Δειγματοληψία κατά τα στάδια της γαλουχίας

Ενώ γνωρίζουμε ότι η συνολική συγκέντρωση λιπιδίων στο ανθρώπινο γάλα (HM) αυξάνεται κατά τη διάρκεια της γαλουχίας, η μελέτη των Mitoulas και συνεργατών έδειξε ότι στο ποσοστό λιπιδίων υπάρχει μείωση από τον πρώτο στον δεύτερο μήνα, αλλά αυξάνονται έως τον ένατο μήνα της γαλουχίας. (George et al., 2018; Mitoulas et al., 2002) Παρ' όλα αυτά, η μέση πρόσληψη λιπαρών από το βρέφος το βρέφος παραμένει αμετάβλητη, καθώς τόσο η παραγωγή γάλακτος της μητέρας όσο και η κατανάλωση του βρέφους προσαρμόζονται με την πάροδο των μηνών. (Mitoulas et al., 2002) Άρα είναι απαραίτητο να οριστούν συγκεκριμένα χρονικά σημεία δειγματοληψίας σε μία μελέτη. Για παράδειγμα, η συλλογή δειγμάτων σε προκαθορισμένες ημέρες (π.χ. 1η, 14η και 42η ημέρα μετά τον τοκετό) ή η δειγματοληψία μέσα σε ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα της γαλουχίας (π.χ. τις πρώτες 22–25 ημέρες της γαλουχίας) θα πρέπει να επιλέγεται βάσει του ερευνητικού στόχου. (George et al., 2018)

Ιδανικό πρωτόκολλο δειγματοληψίας

Λόγω των διακυμάνσεων στην περιεκτικότητα και τη σύνθεση των λιπιδίων, η λιποδομική ανάλυση μπορεί να εμφανίζει σημαντικές διαφοροποιήσεις ανάλογα με το χρονικό σημείο δειγματοληψίας. Είναι απαραίτητο οι μελέτες να λαμβάνουν υπόψη αυτούς τους παράγοντες και να σχεδιάζονται κατάλληλα για τον έλεγχό τους, κάτι που συχνά παραλείπεται. (George et al., 2018)

Οι George et al., 2018 προτείνουν τον σαφή καθορισμό του ερευνητικού ερωτήματος και στη συνέχεια τον καθορισμό των κατάλληλων δειγμάτων, προκειμένου να οριστούν και να

τυποποιηθούν οι διαδικασίες δειγματοληψίας ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι μεταβλητές και οι συγχυτικοί παράγοντες. Η συνδυαστική χρήση δειγματοληψίας με 24ωρη ζύγιση του βρέφους θα μπορούσε να βελτιώσει την ακρίβεια στην ερμηνεία της πρόσληψης λιπιδίων και της επίδρασής τους στην ανάπτυξη. Αν και η τεχνική αυτή δεν εφαρμόζεται ευρέως, θα μπορούσε να μειώσει τη μεταβλητότητα των αναφερόμενων τιμών λιπιδίων και να ενισχύσει την αξιοπιστία των μελετών. (George et al., 2018)

Εκχύλιση λιπιδίων	Ανάλυση και ανίχνευση	Λιπίδια (μοριακά είδη)	Βιβλιογραφική αναφορά
Εκχύλιση με διαλύτες (αμμωνία, αιθανόλη, διαιθυλαιθέρας, πετρελαιοειδές αιθέρας)	HRLC-MS (Orbitrap hybrid)	TAGs 23	Kim, Park & Shim, 2015
Τροποποιημένη διαδικασία Folch	RPLC-ESI-MS/MS για ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση με ιόντα αργύρου σε χειρόμορφη HPLC APCI-MS	TAGs 23	Chen et al., 2020a
Υπερήχων με εξαγωγή n-εξάνιο και υπερεκρίσιμου CO ₂	UPLC-Q-TOF-MS	TAGs (57)	Gao, Wu, & Feng, 2019
Μέθοδος εκχύλισης φάσης υγρού (μεθυλο-τριοβουτυλαιθέρας και μεθανόλη)	LC-IM (Ion Mobility)-MS	TAGs (205)	George, Gayed, Trenogue, Murray, & Geddes, 2020

Πίνακας 9. Προσδιορισμός λιπιδίων μητρικού γάλακτος με υγροχρωματικές μεθόδους

Πηγή (George et al., 2018)

Λιπίδια που ανιχνεύτηκαν	Δειγματοληψία	Αποθήκευση	Προετοιμασία δείγματος	Όργανα	Βιβλιογραφική αναφορά
Λιπαρά οξέα από 10:0 έως 22:6 συμπεριλαμβανομένων cis & trans ισομερών και κάποιων αγνώστων	198 δείγματα, 3-4 εβδομάδες	-	5g μητρικό γάλα - χλωροφόρμιο:μεθανόλη (2:1) - 0.002% BHT συντηρητικό, -παραγωγοποίηση BF ₃	GC-FID	Chen et al. (1995)
1. Λιπαρά οξέα από 4:0 έως 22:6 2. 18:1 f ισομερών	81 δείγματα	Θερμοκρασία δωματίου (4ώρες), λιπιδική στρώση ψύχεται στους -20 °C	2 g λιπιδική στρώση από μητρικό γάλα LLE χλωροφόρμιο:μεθανόλη (2:1) υδρόλυση KOH, παραγωγοποίηση BF ₃	GC-FID και GC-MS	Mosley et al. (2005)
Ομάδες FAMES και περίπου 36 ειδικά FAMES	1 τυχαίο δείγμα	-20	1mg λίπους από μητρικό γάλα LLE με κυκλοεξάνιο/αιθυλοξικό οξύ	GC-EI-MS	Dreiucker et al. (2011)

			Υδρόλυση μεθανολικό - KOH Παραγωγοποίηση BF ₃ SPE fractionation Ag ⁺ - SPE		
DHA και AA και άλλα λιπαρά οξέα	52 συμμετέχουσες	-	1mL μητρικό γάλα Υδρόλυση methanolic-KOH Derivatisation H ₂ SO ₄ LLE hexane	GC-FID	Kelishadi et al.(2012)
Λιπαρά οξέα από 12:0 έως 18:2	101 τυχαία δείγματα από συμμετέχουσες σε 3 ημέρες	-80°C	20 µL μητρικού γάλακτος Transsterification methanolic BF ₃	GC	Akmar et al.(2013)
1. Λιπαρά οξέα μεταξύ 10:0 και 20:4, 2. Τριγλυκερίδια μεταξύ 32:0 και 54:5	2 δείγματα από 4 τυχαίες εβδομάδες μετά τον τοκετό	-	200 µL μητρικού γάλακτος LLE (1) chloroform:methanol (2:1) Transesterification with acid LLE(2) chloroform: methanol: isopropanol	GC-FID	Sokol et al. (2015)
8 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας	514 συμμετέχουσες, μεταξύ 09:00 και 11:00 για τις πρώτες 25 ημέρες	-80°C	0.2 mL λίπος μητρικού γάλακτος Transesterification methanolic-CH ₃ COCl	GC-FID	Liu et al. (2016)
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα	225 συμμετέχουσες, παρείχαν γάλα πριν ή μετά τη σίτιση, κατά την κρίση τους, στους 2 μήνες	4°C (≤24 ώρες), -80°C	200 µL μητρικού γάλακτος LLE Transesterification	GC-FID	Rosenlund et al.(2016)
64 τριγλυκερίδια από C ₃₅ H ₆₂ O ₆ έως C ₆₅ H ₁₁₀ O ₆	27 συμμετέχουσες, παρείχαν δείγματα στις ημέρες 7 και 42	-20°C	0.1 mL μητρικού γάλακτος LLE hexane Φιλτράρισμα με νάylon φίλτρο 0.22 µm	SFC ESI-QTOF-MS	Tu et al. (2017)
Λιπαρά οξέα από 8:0 έως 20:3	26 συμμετέχουσες, αριστερό και δεξί δείγμα την ίδια ώρα για 3 συνεχόμενες ημέρες	-20°C (≤1 εβδομάδα), -80°C	-mL μητρικό γάλα LLE chloroform:methanol (2:1) Transesterification mthanolic-H ₂ SO ₄	GC-FID	Gardner et al. (2017)

Πίνακας 10. Προσδιορισμός λιπαρών οξέων και λιπιδίων μητρικού γάλακτος με αεριοχρωματογραφικές μεθόδους

Πηγή (George et al., 2018)

3.1.2 Αποθήκευση

Στη λιπιδομική ανάλυση του ανθρώπινου γάλακτος (HM), είναι κρίσιμο να ελαχιστοποιηθεί η λιπόλυση και η λιπογένεση κατά την αποθήκευση, λόγω της δράσης ενδογενών ενζύμων, όπως η λιπάση (διεγείρεται από άλατα χολής και λιποπρωτεϊνική λιπάση). Αν και η άμεση ανάλυση είναι ιδανική για τη διατήρηση της σύνθεσης των λιπιδίων, δεν είναι πάντα εφικτή. Συνεπώς, η σωστή αποθήκευση των δειγμάτων είναι απαραίτητη, καθώς η ακατάλληλη διαχείρισή τους μπορεί να επηρεάσει την αξιοπιστία και την ερμηνεία των ερευνητικών αποτελεσμάτων. (George et al., 2018)

Κατάψυξη

Η διατήρηση της ακεραιότητας του ανθρώπινου γάλακτος (HM) απαιτεί σωστή κατάψυξη σε -70°C ή -80°C , καθώς η αποθήκευση στους -20°C μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια λιπιδίων έως 20% λόγω ενζυμικής δραστηριότητας. Ο αριθμός των κύκλων κατάψυξης-απόψυξης επηρεάζει επίσης τα αποτελέσματα, με μελέτες να δείχνουν ότι δύο κύκλοι μπορούν να προκαλέσουν σημαντική λιπόλυση. Η διάρκεια αποθήκευσης και ο σωστός χειρισμός των δειγμάτων είναι κρίσιμοι παράγοντες για την ακρίβεια και τη συγκρισιμότητα των αναλύσεων. (George et al., 2018)

Συντηρητικά

Το ανθρώπινο γάλα (HM) διαθέτει φυσική αντιοξειδωτική ικανότητα που προλαμβάνει την οξειδωτική αποδόμηση, κυρίως στα ακόρεστα λιπαρά οξέα. Εκτός από την κατάψυξη, έχει χρησιμοποιηθεί και η αντιοξειδωτική συντήρηση με ενώσεις όπως το butylated hydroxytoluene (BHT), που αποτρέπει την υπεροξείδωση των λιπιδίων δεσμεύοντας το διαθέσιμο οξυγόνο. Αν και δεν υπάρχουν μελέτες για την αποτελεσματικότητά του στο HM, έρευνες σε ερυθρά αιμοσφαίρια έδειξαν ότι το BHT αύξησε τη διατήρηση των λιπαρών οξέων από 4 σε 17 εβδομάδες. (George et al., 2018)

3.1.3 Μέθοδοι εκχύλισης λίπους

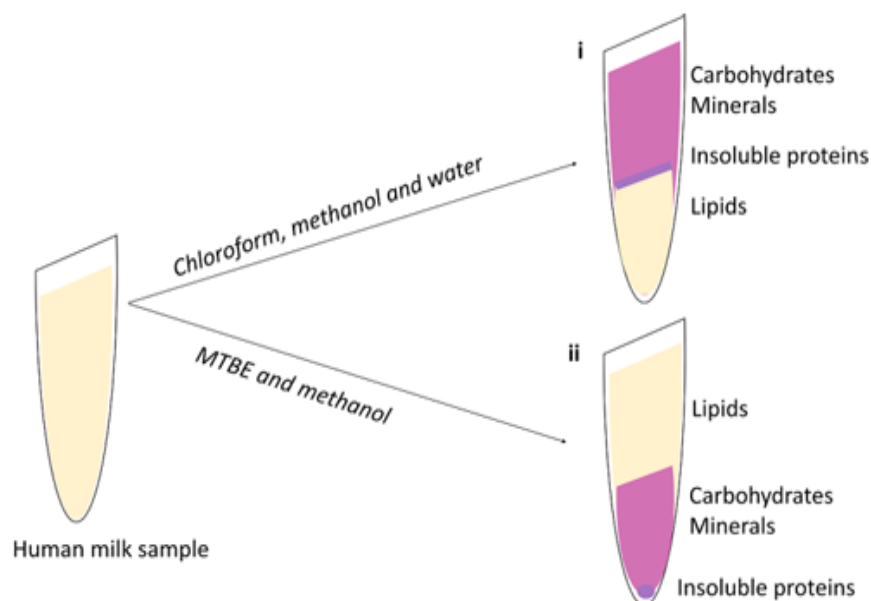
Η σωστή προετοιμασία των δειγμάτων ανθρώπινου γάλακτος (HM) είναι κρίσιμη για την ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα της λιπιδομικής ανάλυσης. Συνήθως, χρησιμοποιούνται τεχνικές φασματομετρίας μάζας, ενώ διαδικασίες καθαρισμού, όπως η υγρή-υγρή και στερεάς φάσης εκχύλιση, απομακρύνουν πρωτεΐνες και σάκχαρα, συγκεντρώνοντας τα λιπίδια. Πριν από την εκχύλιση των λιπιδίων, απαιτείται ομογενοποίηση για ομοιόμορφη κατανομή των λιποσφαιρίων.

Υγρή- υγρή εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction - LLE)

Σύμφωνα με τους (George et al., 2018) η υγρή-υγρή εκχύλιση (LLE) χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό ενώσεων με βάση τη διαλυτότητά τους σε δύο μη αναμίξιμα υγρά. Στην ανάλυση του μητρικού γάλακτος (HM), οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι είναι οι

Folch και Bligh-Dyer, που χρησιμοποιούν χλωροφόρμιο, μεθανόλη και νερό σε διαφορετικές αναλογίες (8:4:3 και 1:2:0.8, αντίστοιχα). Η μέθοδος Bligh-Dyer απαιτεί μικρότερο όγκο διαλυτών και είναι πιο γρήγορη, ενώ και οι δύο έχουν προσαρμοστεί σε διάφορους τύπους ιστών. Κατά την εκχύλιση, τα λιπίδια διαλύονται στη οργανική φάση (χλωροφόρμιο), ενώ οι υδατοδιαλυτές ουσίες (υδατάνθρακες, άλατα) παραμένουν στη υδατική φάση (μεθανόλη και νερό), με ένα ενδιάμεσο στρώμα κυτταρικών υπολειμμάτων και πρωτεϊνών. Παρόλο που αυτές οι μέθοδοι είναι ευρέως χρησιμοποιούμενες, έχουν μειονεκτήματα, όπως η τοξικότητα του χλωροφορμίου και ο κίνδυνος απώλειας λιπιδίων κατά τον διαχωρισμό των φάσεων. Για να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα, έχουν γίνει τροποποιήσεις, όπως η αντικατάσταση του χλωροφορμίου με διχλωρομεθάνιο και η χρήση φυγοκέντρησης για καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων.(George et al., 2018)

Πρόσφατα, εφαρμόστηκε μια μέθοδος εκχύλισης με μεθυλο-τριτοταγή-βουτυλαιθέρα (methyl-tert-butyl ether - MTBE), η οποία αρχικά ανεπτυγμένη για την εκχύλιση λιπιδίων από το πλάσμα, χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση λιπιδίων του ΗΜ για την ανάλυση τόσο των λιπιδίων όσο και άλλων μεταβολιτών του μητρικού γάλακτος (Villaseñor et al., 2014). Σε αυτή τη μέθοδο εκχύλισης, αντί να βρίσκεται η οργανική φάση στο κάτω μέρος, σχηματίζει την άνω στρώση που περιέχει τα λιπίδια, ενώ η υδατική φάση (με το υπόστρωμα του δείγματος) βρίσκεται στο κάτω μέρος όπως απεικονίζεται στην εικόνα 8 ii. Αυτή η τεχνική απλοποιεί τη διαδικασία εκχύλισης και μειώνει τον κίνδυνο επιμόλυνσης.(Villaseñor et al., 2014)



Εικόνα 8. Υγρή-υγρή εκχύλιση λιπιδίων ανθρώπινου γάλακτος χρησιμοποιώντας (i) τη μέθοδο εκχύλισης Folch ή (ii) την εκχύλιση με μεθυλικό τερτ-βουτυλού εστέρα (MTBE).

Πηγή (George et al., 2018)

3.1.4 Μεθυλεστεροποίηση λιπιδίων

Μετά την εκχύλιση λιπιδίων από δείγματα ανθρώπινου γάλακτος (HM), μπορεί να απαιτείται μετατροπή των λιπιδίων για την ανάλυση μη πτητικών ελεύθερων ή λιπιδικών-δεσμευμένων λιπαρών οξέων (FA). Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα ελεύθερα FA στο HM είναι αποτέλεσμα λιπόλυσης, αν και μόνο μία μελέτη έχει διερευνήσει τα FA από την υδρόλυση των TAGs (τριγλυκεριδίων) και άλλων λιπιδίων (όπως φωσφολιπίδια και σφιγγολιπίδια). Αυτή η ενότητα θα εξετάσει μόνο την ανάλυση των FA που αποτελούν τα λιπίδια, πιο συγκεκριμένα τη σύνθεση FA των TAGs, τα οποία αποτελούν το 98% των λιπιδίων στο HM, παρότι η μεθοδολογία περιγράφεται ανεπαρκώς. Πριν από την ανάλυση αυτών των FA, εκτελείται μια χημική διεστεροποίηση δύο σταδίων: αρχικά υδrolύεται το TAG, απελευθερώνοντας τρία FA και στη συνέχεια γίνεται παραγωγή των παραγόμενων FA σε μεθυλεστέρες (FAMES) για ανάλυση με GC. Αυτή η αντίδραση μπορεί να καταλυθεί είτε από οξέα είτε από βάσεις.

Η παραγωγή των FA είναι απαραίτητη για την ανάλυση με GC, καθώς η υψηλή πολικότητα των μη παραγώνων FA μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό δεσμών υδρογόνου και συνεπώς σε προβλήματα προσρόφησης στη στήλη GC, προκαλώντας διεύρυνση των ζωνών και αλλαγές στους χρόνους κατακράτησης. Οι παραγόμενοι FAMES έχουν μειωμένη πολικότητα και μπορούν να διαχωριστούν με μια πολική στήλη GC. Η μέθοδος της διεστεροποίησης είναι καλά τεκμηριωμένη και έχει εφαρμοστεί ευρέως στην ανάλυση FA, με την όξινη διεστεροποίηση που χρησιμοποιεί τριφθοριούχο βόριο (BF₃) να είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη, όπως περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1964. Οι πρώιμες μέθοδοι διεστεροποίησης FA στο HM συχνά χρησιμοποιούσαν την προσέγγιση BF₃ και μεθανόλης. Σε άλλες μελέτες HM, έχουν χρησιμοποιηθεί διεστεροποιήσεις με οξέα (μεθανόλη-υδροχλωρικό οξύ) ή βάσεις (μεθανόλη-υδροξείδιο καλίου ή μεθανοξείδιο νατρίου). Παρότι το BF₃ είναι επικίνδυνη χημική ουσία και μπορεί επίσης να αλληλεπιδράσει με συντηρητικά όπως το BHT στα δείγματα, εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως στην προετοιμασία δειγμάτων HM. Τα κύρια μειονεκτήματα της διεστεροποίησης για την ανάλυση FAME περιλαμβάνουν τα χρονοβόρα και πολύπλοκα στάδια της διαδικασίας, γεγονός που υποστηρίζει τη στροφή προς μεθόδους που δεν περιλαμβάνουν τέτοιες προετοιμασίες (όπως υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας).

3.2 Αναλυτικές μέθοδοι

Τα λιπίδια του ανθρώπινου γάλακτος διαφέρουν από τα λιπίδια του γάλακτος άλλων θηλαστικών όσον αφορά τη σύνθεση και την κατανομή των λιπαρών οξέων. Η ανάλυση και η τεχνολογία ανίχνευσης λιπιδίων είναι κλειδί για την κατανόηση των λιπιδίων του γάλακτος, και γι' αυτό συζητούνται οι συγκεντρώσεις, οι συνθέσεις και τα χαρακτηριστικά κατανομής των λιπιδίων του γάλακτος. Οι διαφορές μεταξύ των λιπιδίων του ανθρώπινου

γάλακτος και των υποκατάστατών τους ως προς τη μορφή, τη σύνθεση και τη δομή επηρεάζουν την πέψη, την απορρόφηση και τη λειτουργία τους στα βρέφη. Η ανίχνευση και ανάλυση των λιπιδίων του γάλακτος και των βρεφικών τροφών αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο για τη διερεύνηση των λιπιδίων του ανθρώπινου γάλακτος. Οι ποιοτικές και ποσοτικές αναλύσεις των λιπιδίων περιλαμβάνουν την αξιολόγηση της σύνθεσης (λιπαρά οξέα, μοριακός σκελετός και κεφαλική ομάδα), της δομής (αριθμός άνθρακα, αριθμός διπλών δεσμών, θέση λιπαρών οξέων και θέση διπλών δεσμών) και της συγκέντρωσης των λιπιδίων σε βιολογικά δείγματα. (Liu et al., 2022)

Αέρια χρωματογραφία - Gas Chromatography

Η αέρια χρωματογραφία (GC) σε συνδυασμό με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος διαχωρισμού για την ανάλυση λιπαρών οξέων (FA) από τη δεκαετία του 1950 και είναι ευρέως αποδεκτή για την ποσοτικοποίηση των FA σε πολλούς τύπους δειγμάτων, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπινου γάλακτος (HM) [19]. Στήλες που βασίζονται σε κυανοπροπύλιο, με μήκος από 30 έως 60 μέτρα, χρησιμοποιούνται συνήθως για την ανάλυση μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (FAMES). Ωστόσο, μακρύτερες στήλες (έως 100 μέτρα) χρησιμοποιούνται εάν απαιτείται ο διαχωρισμός ισομερών FAME που σχετίζονται με τη διατροφή, όπως το **cis C18:1** και το **trans C18:1**. Επομένως, η ανάγκη για μακρύτερη στήλη GC μπορεί να επεκτείνει τόσο τον χρόνο προετοιμασίας της μεθόδου όσο και τον χρόνο εκτέλεσης. Ο ανιχνευτής FID χρησιμοποιείται συνήθως στην ανάλυση FAME επειδή είναι σημαντικά φθηνότερος στην αγορά και τη συντήρηση σε σύγκριση με ανιχνευτές φασματομετρίας μάζας (MS). Επιπλέον, η ανθεκτικότητα του FID επιτρέπει την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων πριν από την ανάγκη συντήρησης και δεν έχει τις ίδιες απαιτήσεις και προβλήματα με τη φασματομετρία μάζας (όπως ο καθαρισμός της πηγής ιονισμού και τα προβλήματα ιονισμού).

Η ανάλυση FAME του HM με χρήση GC είναι επίσης καλά χαρακτηρισμένη με βάση τη σειρά έκλουσης και τον χρόνο κατακράτησης, απαιτώντας είτε περιορισμένο αριθμό προτύπων είτε τη χρήση του δείκτη κατακράτησης Kovats, όπως περιγράφεται σε μελέτη του Villasenor et al., για την ταυτοποίηση μέσω σύγκρισης πειραματικών και καθιερωμένων δεικτών κατακράτησης. Επιπλέον, η σταθεροποίηση χρόνου κατακράτησης (retention time locking) μπορεί να συμβάλει στην αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου. Ωστόσο, η GC-FID στερείται επιλεκτικότητας μάζας, σε αντίθεση με τη MS, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη ταυτοποίηση των FAMES παρουσία συνεκλούοντων ενώσεων ή ρυπαντών που μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα, παρόλο που αυτό δεν έχει διερευνηθεί σε μελέτες HM.

Υγρή χρωματογραφία-Liquid Chromatography

Αν και η GC χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση λιπαρών οξέων (FA), η υγρή χρωματογραφία (LC) με ανιχνευτή διασποράς φωτός εξάτμισης (ELSD), ανιχνευτή φορτισμένων αερολυμάτων (CAD), ηλεκτροχημικό ανιχνευτή ή σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (MS) έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση άθικτων λιπιδίων, όπως τα τριγλυκερίδια (TAGs) και τα φωσφολιπίδια [79]. Προς το παρόν, μόνο μία μελέτη έχει χρησιμοποιήσει LC-ELSD στη λιπιδιομική του ανθρώπινου γάλακτος (HM) για την ποσοτικοποίηση φωσφολιπιδίων, ενώ άλλες μέθοδοι LC πραγματοποιούνται κυρίως με

φασματομετρία μάζας . Λόγω της μεγάλης ποικιλίας λιπιδίων στο ΗΜ, χρησιμοποιούνται διάφορες στατικές φάσεις και συνδυασμοί διαλυτών ανάλογα με τον τύπο των λιπιδίων και τον απαιτούμενο διαχωρισμό. Ο διαχωρισμός λιπιδίων σε βιολογικά υγρά, συμπεριλαμβανομένου του ΗΜ, πραγματοποιείται πιο συχνά χρησιμοποιώντας στήλη στατικής φάσης C18, αλλά και άλλες στατικές φάσεις βασισμένες σε πυρίτιο, όπως η C8, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό όλων των τάξεων λιπιδίων και των φωσφολιπιδίων, αντίστοιχα. Η χρωματογραφία αντιστροφής φάσης (reversed-phase LC) διαχωρίζει τα άθικτα λιπίδια και τα ελεύθερα FA με βάση την πολικότητα, τον βαθμό κορεσμού και το μήκος της αλυσίδας των FA, ενώ η χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal-phase LC) διαχωρίζει λιπίδια, όπως τα γλυκεροφωσφολιπίδια, ανάλογα με την κατηγορία τους . Στις αναλύσεις LC, ο διαλύτης και η στατική φάση πρέπει να είναι συμβατά με τη μέθοδο ανίχνευσης, για παράδειγμα τη φασματομετρία μάζας (MS), όπου οι αναλογίες οργανικών και ανόργανων διαλυτών, όπως το ακτονιτρίλιο, οι αλκοόλες και το νερό, χρησιμοποιούνται συχνότερα. Όταν επιλέγεται η MS ως ανιχνευτής, προστίθενται άλατα αμμωνίου (φορμικό ή οξικό) και μυρμηκικό οξύ. Το κύριο πλεονέκτημα της LC σε σχέση με την GC είναι ότι δεν απαιτείται μετατροπή των λιπιδίων, και μπορούν να αναλυθούν άθικτα λιπίδια, όπως τα τριγλυκερίδια.

Χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού - Supercritical Fluid Chromatography

Η χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (SFC) είναι μια τεχνική διαχωρισμού παρόμοια με την υγρή χρωματογραφία (LC), η οποία, αντί για υγρή κινητή φάση, χρησιμοποιεί ένα υπερκρίσιμο ρευστό, όπως το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), ως κινητή φάση. Τα υπερκρίσιμα ρευστά σχηματίζονται όταν ένα συμπιεσμένο αέριο με υψηλή πυκνότητα υποβάλλεται σε συγκεκριμένη πίεση και θερμοκρασία. Το CO₂ είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος υπερκρίσιμος διαλύτης, και οι μη πολικές του ιδιότητες το καθιστούν ιδανικό για τον διαχωρισμό μη πολικών λιπιδίων, όπως τα τριγλυκερίδια (TAGs). Αυτό έχει αποδειχθεί από τους Laakso και Manninen στο γάλα αγελάδας, όπου τα TAGs διαχωρίστηκαν με βάση το μοριακό τους μέγεθος [84]. Παρόλο που η SFC έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην έρευνα για τα λιπαρά του γάλακτος και τον διαχωρισμό ελαίων, η χρήση της στο ανθρώπινο γάλα (ΗΜ) περιορίζεται σε μία μόνο μελέτη, όπου η SFC συνδυάστηκε με φασματομετρία μάζας (MS). Τα πλεονεκτήματα της SFC περιλαμβάνουν την απουσία ανάγκης για παραγωγή, τη δυνατότητα σύνδεσης με όλους τους τύπους ανιχνευτών, όπως FID ή MS, καθώς και το χαμηλό κόστος και τη μειωμένη παραγωγή αποβλήτων σε σύγκριση με την LC. Χρησιμοποιεί λιγότερους οργανικούς διαλύτες από την LC και επιτρέπει ταχύτερο διαχωρισμό και υψηλότερη ανάλυση σε συγκριτικές αναλύσεις μεταβολιτών σε σχέση με την LC και την GC. Αυτά τα χαρακτηριστικά καθιστούν την SFC ιδιαίτερα κατάλληλη για την ανάλυση πολλαπλών κατηγοριών λιπιδίων σε ένα δείγμα με διαφορετικούς βαθμούς πολικότητας.

Χρωματογραφία λεπτού στρώματος - Thin-Layer Chromatography

Όπως και η υγρή χρωματογραφία (LC), η χρωματογραφία λεπτού στρώματος (TLC) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποιοτική ανάλυση, αλλά συνήθως χρησιμοποιείται ως προπαρασκευαστικό βήμα σε ανθρώπινες μελέτες. Στις μελέτες του ανθρώπινου γάλακτος (ΗΜ), η TLC χρησιμοποιείται συχνά για τον διαχωρισμό των λιπιδίων στις επιμέρους κατηγορίες τους, όπως ο διαχωρισμός λιπαρών οξέων βραχείας και μακράς αλυσίδας πριν από την ανάλυση . Αυτή η οικονομική τεχνική πραγματοποιείται κλασικά χρησιμοποιώντας

πλάκα πυριτίου και μη πολικό διαλύτη για τον διαχωρισμό των κατηγοριών λιπιδίων. Οι κατηγορίες που διαχωρίζονται μπορούν στη συνέχεια να συλλεχθούν και να αναλυθούν με πλατφόρμες όπως η GC ή η LC. Δεδομένου ότι η TLC δεν διαθέτει την ανάλυση διαχωρισμού της GC ή της LC, η ικανότητά της για ταυτοποίηση είναι περιορισμένη, και αυτός μπορεί να είναι ο λόγος που η TLC δεν χρησιμοποιείται συχνά στη λιπιδομική του ΗΜ.

Φασματομετρία μάζας -Mass Spectrometry

Οι George et al., 2018 περιγράφουν την φασματομετρία μάζας (MS), η οποία είναι μια τεχνική ανίχνευσης που ταυτοποιεί ιονισμένες ενώσεις με βάση την αναλογία μάζας προς φορτίο τους (m/z). Πρόκειται για μια καταστροφική τεχνική, καθώς το δείγμα καταστρέφεται και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελλοντική ανάλυση. Στη λιπιδομική ανάλυση του ανθρώπινου γάλακτος (ΗΜ), έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι τύποι αναλυτών μάζας, όπως οι τετραπολικοί, οι τριπλοί τετραπολικοί και οι αναλυτές χρόνου πτήσης (time-of-flight), για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση διαφόρων λιπιδίων. Λόγω της αυξημένης ευαισθησίας και ειδικότητας της MS σε σύγκριση με άλλους τύπους ανιχνευτών, όπως FID και ELSD, είναι δυνατή η επιβεβαίωση της ταυτότητας γνωστών λιπιδίων, η ταυτοποίηση άγνωστων λιπιδίων και η διερεύνηση δομικών πληροφοριών των λιπιδίων.

Για να ανιχνευθούν τα λιπίδια μέσω MS, πρέπει πρώτα να ιονιστούν χρησιμοποιώντας μία από τις διάφορες τεχνικές ιονισμού, όπως:

- EI (electron ionization): Ιονισμός με ηλεκτρόνια.
- ESI (electrospray ionization): Ιονισμός με ψεκασμό.
- CI (chemical ionization): Χημικός ιονισμός.
- MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization): Ιονισμός με λέιζερ. Αυτές οι μέθοδοι μπορούν να εκτελεστούν είτε σε θετική λειτουργία (EI, CI, ή ESI) είτε σε αρνητική λειτουργία (CI ή ESI), παράγοντας αντίστοιχα κατιόντα ή ανιόντα. Στη λιπιδομική του ΗΜ, οι μέθοδοι EI και ESI είναι συνηθισμένες. Η τεχνική EI χρησιμοποιείται συνήθως με GC για την ανάλυση FA, όπου τα λιπίδια βομβαρδίζονται με δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας, προκαλώντας ιονισμό και χαρακτηριστική θραύση. Από το 2011, τρεις μελέτες ΗΜ έχουν χρησιμοποιήσει GC-MS για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μεγάλου αριθμού FA ως παράγωγα FAMES. Η MS παρέχει πλεονεκτήματα, όπως η ταυτοποίηση γλυκερολιπιδίων, γλυκεροφωσfolιπιδίων, σφιγγολιπιδίων, πρενολικών λιπιδίων και στερολικών λιπιδίων, που δεν ήταν δυνατόν να ταυτοποιηθούν με GC-FID.

Αντίθετα με την EI-MS, η ESI-MS χρησιμοποιείται ευρέως σε LC για λιπιδομική ανάλυση του ΗΜ. Αυτή η "ήπια" τεχνική ιονισμού επιτρέπει την ταυτοποίηση τόσο του μοριακού ιόντος (π.χ. ενός τριγλυκεριδίου) όσο και την απόκτηση δομικών πληροφοριών μέσω θραύσης του μοριακού ιόντος, όπως η σύνθεση FA ενός συγκεκριμένου τριγλυκεριδίου. Η LC-MS συχνά χρησιμοποιεί πρόσθετα, όπως μυρμηκικό αμμώνιο και μυρμηκικό οξύ, στην κινητή φάση για την προώθηση της δημιουργίας προσθετικών αμμωνίου, τα οποία είναι πιο

σταθερά από τα υδρογονάνθρακα και ευκολότερα στη θραύση από τα μέταλλα, και αποτρέπουν τη μεταβολή των χρόνων κατακράτησης.

Η χρήση και των δύο λειτουργιών ιονισμού (θετικής και αρνητικής) στην ESI-MS καλύπτει ακόμη περισσότερα λιπίδια, για παράδειγμα, την ταυτοποίηση FA σε αρνητική λειτουργία και φωσφολιπίδια σε θετική λειτουργία. Η Shotgun MS, η οποία περιλαμβάνει την άμεση εισαγωγή του δείγματος στην πηγή ιονισμού και την εκτέλεση ανάλυσης τόσο σε θετική όσο και σε αρνητική λειτουργία ιονισμού, είναι μια συνηθισμένη τεχνική για τη μη στοχευμένη ταυτοποίηση και δομική χαρακτηριστική των λιπιδίων, που έχει χρησιμοποιηθεί πρόσφατα για το HM. Αν και αυτή η μέθοδος είναι γρήγορη, ευαίσθητη και απαιτεί μικρή ποσότητα δείγματος, η έλλειψη χρωματογραφικού διαχωρισμού και η καταστολή ιόντων καθιστούν την ερμηνεία δύσκολη. Η καταστολή ιόντων είναι ένα συνηθισμένο φαινόμενο, όπου η απόκριση μιας ενδιαφέρουσας ουσίας καταστέλλεται λόγω ενδογενών ουσιών της μήτρας, όπως πρωτεΐνες, ή εξωγενών ουσιών, όπως πλαστικοποιητές από πλαστικά σωληνάρια ή καπάκια, στο δείγμα που ανταγωνίζονται για ιονισμό. Αυτό μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με αποτελεσματική εκχύλιση λιπιδίων κατά την προετοιμασία του δείγματος, παρέχοντας ένα πιο καθαρό και καθαρό λιπιδικό εκχύλισμα. Καθώς τα μείγματα λιπιδίων είναι δύσκολα στην ερμηνεία, συνήθως χρησιμοποιείται χρωματογραφικός προδιαχωρισμός (GC ή LC) για να βοηθήσει περαιτέρω στον διαχωρισμό των λιπιδίων/ισομερών, παρέχοντας επιπλέον ορθογώνια δεδομένα για ευκολότερη ταυτοποίηση και πιο ακριβή ποσοτικοποίηση σε σύγκριση με την προσέγγιση του shotgun. Επιπλέον, η μη στοχευμένη ανάλυση παράγει μεγάλο αριθμό ενώσεων προς διερεύνηση και συχνά απαιτεί πολύ εξειδικευμένο και ακριβό λογισμικό. (George et al., 2018)

Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) έχει εισαχθεί στη μεταβολομική ανάλυση και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση διάφορων βιομορίων σε ανθρώπινο γάλα. Η τεχνική αυτή επιτρέπει τη μέτρηση σακχάρων, αμινοξέων, νουκλεοτιδίων και ενός περιορισμένου αριθμού λιπιδίων και φωσφολιπιδίων. Έχει το πλεονέκτημα ότι είναι μη καταστροφική, επιτρέποντας την επανάληψη των αναλύσεων και τη χρήση των δειγμάτων για περαιτέρω μελέτες με άλλες μεθόδους. Ωστόσο, παρά τις ευρείες εφαρμογές της, η NMR αντιμετωπίζει προκλήσεις όπως η επικάλυψη των σημάτων σε πολύπλοκα δείγματα, κάτι που μπορεί να καταστήσει δύσκολη τη διάκριση ανάμεσα σε διαφορετικές χημικές αντηχήσεις. Επιπλέον, η NMR απαιτεί μεγαλύτερους όγκους δείγματος σε σύγκριση με άλλες τεχνικές όπως η φασματομετρία μάζας (MS), και παρά την χαμηλότερη ευαισθησία της σε σύγκριση με τη MS, προσφέρει υψηλή αναπαραγωγιμότητα και είναι σχετικά απλή στη χειρισμό για έναν εκπαιδευμένο χρήστη. Η προετοιμασία των δειγμάτων για NMR μπορεί να περιλαμβάνει την εκχύλιση λιπιδίων με μεθόδους όπως η εκχύλιση Folch ή απλά την ανάλυση του ολόκληρου γάλακτος. Παρόλο που η διαδικασία προετοιμασίας είναι απλή, η διεξαγωγή μεγάλου αριθμού αναλύσεων μπορεί να είναι προκλητική χωρίς τη χρήση αυτόματου δειγματολήπτη, κάτι που περιορίζει τη δυνατότητα υψηλής ροής που παρέχουν οι μέθοδοι MS. Οι αναλύσεις που ανιχνεύονται μπορούν στη συνέχεια να ποσοτικοποιηθούν χρησιμοποιώντας την άμεση σχέση μεταξύ της έντασης της αντήχησης και της συγκέντρωσης της χημικής ένωσης. (George et al., 2018)

Μελέτες

Στην ερευνα των Lagutin et al., 2022 μελετήθηκε το προφίλ των βιοδραστικών λιπιδίων ανθρώπινου γάλακτος και γάλακτος γαλακτοπαραγωγών ζώων (αγελάδα, πρόβατο, κατσίκα, βουβάλι, καμήλα, ελάφι) χρησιμοποιώντας ένα σύνολο σύγχρονων αναλυτικών μεθόδων, συγκεκριμένα Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης-Φασματομετρία Μάζας (HPLC-MS), Αέρια Χρωματογραφία (GC) και Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Προσδιορίστηκε η συνολική περιεκτικότητα σε λιπίδια και μετρήθηκαν τα επίπεδα φωσφολιπιδίων, λιπαρών οξέων, ουδέτερων glycosphingolipids and ganglioside (GM3 και GD3). Τα βιοδραστικά λιπίδια στο ανθρώπινο γάλα αναλύθηκαν επίσης και χρησιμοποιήθηκαν ως σημείο αναφοράς.

Δείγματα και αντιδραστήρια

Εκχύλιση των λιπιδίων

Η αρχική μέθοδος των Svennerholm και Fredman τροποποιήθηκε ως εξής: 8 g γάλακτος σε σωλήνα φυγοκέντρωσης 40 mL αναμείχθηκαν με 16 mL μεθανόλης και 8 mL χλωροφορμίου και υποβλήθηκαν σε υπερηχητική επεξεργασία για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκαν στις 2850 rcf για 10 λεπτά. Το ίζημα υποβλήθηκε σε περαιτέρω εκχύλιση με χλωροφόρμιο (6 mL)/μεθανόλη (6 mL) και δύο φορές με χλωροφόρμιο (6 mL)/μεθανόλη (3 mL) χρησιμοποιώντας υπερηχητική επεξεργασία. Τα εκχυλίσματα λιπιδίων που προέκυψαν από κάθε εκχύλιση φυγοκεντρήθηκαν, συνδυάστηκαν και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα φυγοκέντρωσης 100 mL. Στη συνέχεια, πλύθηκαν με νερό (19 mL) και 10% υδατικό διάλυμα KCl (3 mL) και φυγοκεντρήθηκαν στις 2850 rcf για 10 λεπτά. Το κάτω στρώμα αποξηράνθηκε και αποτέλεσε το ακατέργαστο εκχύλισμα λιπιδίων.

Ανάλυση Λιπαρών Οξέων μέσω Αέριας Χρωματογραφίας (GC)

Οι μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAMES) παρασκευάστηκαν από το συνολικό εκχύλισμα λιπιδίων, όπως περιγράφεται από τους Carreau και Dubacq, και αναλύθηκαν με ένα αέριο χρωματογράφο Agilent 7890B (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), εξοπλισμένο με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) και τριχοειδή στήλη BPX70 (60 m × 0,25 mm εσωτερικής διαμέτρου, 0,25 μm). Το ήλιο χρησιμοποιήθηκε ως αέριο φέρον, με διαχωριστή (split) σε αναλογία 1:100. Οι θερμοκρασίες του εγχυτήρα και του ανιχνευτή ήταν και οι δύο στους 260 °C. Η θερμοκρασία του φούρνου διατηρήθηκε στους 45 °C για 4 λεπτά, στη συνέχεια αυξήθηκε κατά 15 °C/λεπτό έως τους 165 °C (όπου διατηρήθηκε για 1 λεπτό), και ακολούθησε αύξηση κατά 2 °C/λεπτό έως τους 225 °C (όπου διατηρήθηκε για 20 λεπτά). Οι διορθωτικοί παράγοντες FID για τα μεμονωμένα λιπαρά οξέα μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας ποσοτικά πρότυπα και εφαρμόστηκαν αναλόγως.

Η ανάδευση vortex και στη συνέχεια διασκορπίστηκε μέσω υπερηχητικής επεξεργασίας με περιοδική ανακίνηση στους 60 °C για έως και 10 λεπτά.

Τα ποσοτικά φάσματα φωσφόρου μέσω NMR αποκτήθηκαν σε δι-καναλικό φασματόμετρο Bruker Avance III 500 MHz (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) που λειτουργούσε σε συχνότητα 202,52 MHz για τον ^{31}P και 500,11 MHz για τον ^1H . Χρησιμοποιήθηκε αντίστροφη αποσύζευξη πρωτονίου (WALTZ-16 composite pulse decoupling, παλμοί 90°

διάρκειας 80 μ s για τον ^1H) (ακολουθία παλμών zgig) για την καταστολή του πυρηνικού φαινομένου Overhauser, με τις εξής ρυθμίσεις του οργάνου:

1. **Θερμοκρασία δείγματος:** 30 °C
2. **Φασματικό εύρος:** 10,121 Hz (50 ppm)
3. **Συχνότητες μετατροπών ^{31}P και ^1H :** 10,0 ppm και 4,0 ppm αντίστοιχα.

Αποτελέσματα

Ολικά λιπίδια

Η μέση συνολική περιεκτικότητα σε λιπίδια στο ανθρώπινο γάλα ήταν 3,8%, στο αγελαδινό γάλα 4,0%, στο κατσικίσιο γάλα 3,0% και στο καμηλίσιο γάλα 2,7%. Το γάλα βούβαλου, πρόβειο και γάλα ελαφιού είχαν παρόμοια υψηλά επίπεδα συνολικών λιπιδίων: 7,1%, 6,8% και 7,4% αντίστοιχα. Η συνολική περιεκτικότητα σε λιπίδια του δείγματος γάλακτος ελαφιού που μελετήθηκε ήταν 7,4% (προσδιορίστηκε σε τριπλότυπο), κοντά σε αυτή του γάλακτος βούβαλου (7,1%) και του πρόβειου γάλακτος (6,8%), και υψηλότερη από τη συνολική περιεκτικότητα σε λιπίδια του αγελαδινού γάλακτος (4,0%). Το καμηλίσιο γάλα είχε τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λιπίδια, 2,7%.

Ανάλυση Λιπαρών Οξέων μέσω Αέριας Χρωματογραφίας (GC)

Το συνολικό επίπεδο πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) είναι σημαντικά υψηλότερο στο ανθρώπινο γάλα (16,1%) από ό,τι στα υπόλοιπα γάλατα. Το υψηλότερο επίπεδο PUFA στα γάλατα μηρυκαστικών παρατηρήθηκε στο γάλα ελαφιού: 4,6% των συνολικών λιπαρών οξέων. Το κύριο PUFA στο ανθρώπινο γάλα στα δείγματα που μελετήθηκαν ήταν το λινολεϊκό οξύ, το οποίο έφτανε στο 12,3% των συνολικών λιπαρών οξέων. Ακολουθούσε το λινολενικό οξύ σε σημαντική ποσότητα (έως 1,4%). Αυτό το πρότυπο μοιάζει χαλαρά με τα άλλα γάλατα, αλλά με πολύ χαμηλότερα επίπεδα λινολεϊκού οξέος. Το γάλα ελαφιού και κατσίκας περιείχαν λινολενικό οξύ σε επίπεδα παρόμοια με αυτά του ανθρώπινου γάλακτος: 1,6% και 1,4% αντίστοιχα. Το επίπεδο του αραχιδονικού οξέος (AA) στο ανθρώπινο γάλα ήταν 0,4%, ενώ στα άλλα γάλατα τα επίπεδα AA ανέρχονταν μόνο περίπου στο 0,1% των συνολικών λιπαρών οξέων. Τα επίπεδα του εικοσιπενταενοϊκού οξέος (EPA) ήταν πολύ παρόμοια σε όλα τα γάλατα, περίπου στο 0,1%, αλλά το επίπεδο του δοκοσαεξαενοϊκού οξέος (DHA) ήταν πολύ υψηλότερο στο ανθρώπινο γάλα (0,4%), με τα μόνα άλλα γάλατα όπου παρατηρήθηκε να είναι το πρόβειο και κατσικίσιο γάλα (0,1%).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, το επίπεδο DHA στο ανθρώπινο γάλα διέφερε μεταξύ των δοτών από 0,2% έως 0,7% των συνολικών λιπαρών οξέων (δεδομένα μη δημοσιευμένα). Είναι γνωστό ότι η διατροφή της μητέρας έχει μεγάλη επίδραση στη σύνθεση των λιπαρών οξέων στο ανθρώπινο γάλα, και αυτή η παραλλαγή των επιπέδων DHA που παρατηρήθηκε πιθανώς αντανακλά αυτή την επίδραση. Τα επίπεδα του DHA που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία κυμαίνονταν από 0,95% έως 1,33% των συνολικών λιπαρών οξέων στο γάλα γυναικών από την Ιαπωνία, αλλά ήταν κάτω από 0,3% ή ακόμα και ανύπαρκτα στο γάλα γυναικών από το Σουδάν. Το εμπλουτισμό του EPA, DHA και AA για να επιτευχθούν τα επίπεδα του ανθρώπινου γάλακτος εξακολουθεί να απαιτείται. Ωστόσο, το πρόβειο γάλα

(ανά 100 g γάλακτος) παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα αυτών των βασικών PUFA, με τα επίπεδα DHA να ξεπερνούν αυτά του αγελαδινού και βουβαλίσσιου γάλακτος κατά περισσότερο από 10 φορές (δεδομένα μη δημοσιευμένα).

Τρανς Λιπαρά Οξέα

Μια άλλη ομάδα βιοδραστικών λιπαρών οξέων που παρατηρούνται στο γάλα είναι τα τρανς λιπαρά οξέα των μηρυκαστικών. Το υψηλότερο επίπεδο τρανς λιπαρών οξέων παρατηρήθηκε στο βουβαλίσιο γάλα (6,0%), ενώ υψηλά επίπεδα συζευγμένου λινολεϊκού οξέος (CLA) 9c,11t βρέθηκαν στο βουβαλίσιο και πρόβειο γάλα (1,6% και 1,7%, αντίστοιχα). Σε αντίθεση με τα βιομηχανικά τρανς λιπαρά που βρίσκονται σε υδρογονωμένα έλαια, τα τρανς λιπαρά των μηρυκαστικών έχουν αποδειχθεί ότι διαθέτουν ευεργετικές ιδιότητες, όπως αντικαρκινική και αντιαθηρογόνο δράση. Είναι προφανές ότι το ανθρώπινο γάλα διαφέρει σημαντικά από τα γάλατα των μηρυκαστικών, τα οποία διαθέτουν τα δικά τους χαρακτηριστικά. Το βουβαλίσιο γάλα έχει το υψηλότερο επίπεδο τρανς λιπαρών οξέων μηρυκαστικών (trans-FA), το πρόβειο γάλα διαθέτει υψηλότερα επίπεδα μακράς αλυσίδας πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) και συζευγμένου λινολεϊκού οξέος (CLA), το κατσικίσιο γάλα είναι γνωστό για την περιεκτικότητά του σε λιπαρά οξέα μέσης αλυσίδας, ενώ το καμηλίσιο γάλα έχει το υψηλότερο επίπεδο μονοακόρεστων λιπαρών οξέων cis (cis-MUFA) μεταξύ όλων των ζωικών γαλάτων που αναλύθηκαν σε αυτή τη μελέτη. (Lagutin et al., 2022)

4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία γίνεται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση σύγχρονων μεθόδων προσδιορισμού των συστατικών του μητρικού γάλακτος, όπως οι βιταμίνες, τα ιχνοστοιχεία και τα βιοδραστικά λιπίδια συστατικά, που παρέχουν ζωτικής σημασίας θρεπτικά στοιχεία και συμβάλλουν στην υγεία και την ανάπτυξη του βρέφους. Οι βιταμίνες D και K μπορεί να είναι ανεπαρκείς σε βρέφη που θηλάζουν αποκλειστικά, και συχνά απαιτείται συμπλήρωση. Η βιταμίνη D επηρεάζεται από την έκθεση στον ήλιο και τη διατροφή της μητέρας, ενώ το μητρικό γάλα συνήθως περιέχει λιγότερο από 40 IU/L, ποσότητα που δεν επαρκεί για τις ανάγκες των βρεφών. Ανάλογα, η βιταμίνη K μεταφέρεται σε περιορισμένες ποσότητες από τη μητέρα στο έμβρυο, και συνιστάται η συμπλήρωσή της μετά τη γέννηση. Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες επηρεάζονται επίσης σημαντικά από την κατάσταση της μητέρας. Η ανάλυση των βιταμινών D και K στο μητρικό γάλα με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας διπλής χρονισμένης διπλής μάζας (LC-MS/MS) παρέχει ακριβή και ευαίσθητα αποτελέσματα. Οι προκλήσεις στην ανάλυση περιλαμβάνουν την αποτελεσματική εκχύλιση αυτών των λιποδιαλυτών βιταμινών από το λιπαρό περιβάλλον του γάλακτος και την ανάγκη για προσαρμοσμένη προετοιμασία δείγματος. Η εκχύλιση συχνά απαιτεί τη χρήση διαλυτών και μεθόδων ενίσχυσης της διαλυτότητας για να διασφαλιστεί η αποδοτική απελευθέρωση και απομόνωση των βιταμινών πριν την ανάλυση LC-MS/MS. Ο σίδηρος στο μητρικό γάλα είναι ουσιαστικός για την ανάπτυξη του εγκεφάλου και την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων στα βρέφη, με την έλλειψή του να μπορεί να προκαλέσει αναιμία. Το ιώδιο, απαραίτητο για τη λειτουργία του θυρεοειδούς και την ανάπτυξη του εγκεφάλου, είναι κρίσιμο και πρέπει να παρέχεται επαρκώς για να αποτρέψει αναπτυξιακές διαταραχές όπως ο κρετινισμός. Η κατάλληλη πρόσληψη και διαθεσιμότητα αυτών των ιχνοστοιχείων μέσω του μητρικού γάλακτος είναι κρίσιμη για την υγιή ανάπτυξη του βρέφους. Η ανάλυση

σιδήρου στο μητρικό γάλα με τη μέθοδο Ατομικής Απορρόφησης Φασματοσκοπίας (FAAS) απαιτεί προσεκτική προετοιμασία του δείγματος για να εξασφαλίσει ακριβή μετρήσεις. Μία από τις βασικές προκλήσεις στην εκχύλιση του σιδήρου από το μητρικό γάλα είναι η υψηλή περιεκτικότητα σε λίπη και πρωτεΐνες που μπορεί να επηρεάσουν την αποδοτικότητα της εκχύλισης. Κατά συνέπεια, η μέθοδος εκχύλισης συχνά περιλαμβάνει την προθέρμανση και διάλυση του δείγματος σε κατάλληλο διαλυτή, όπως θειικό οξύ, για να διασφαλιστεί η απελευθέρωση του σιδήρου από το μητρικό γάλα και η επακόλουθη ανάλυση με FAAS. Αυτή η διαδικασία απαιτεί ακρίβεια για να αποφευχθούν σφάλματα από πιθανή υπερθέρμανση ή υπερβολική διάλυση που μπορεί να αλλοιώσει τα αποτελέσματα. Ο προσδιορισμός του ιωδίου στο μητρικό γάλα μέσω της μεθόδου Φασματομετρίας Μάζας Πλάσματος Επαγωγικά Συζευγμένου (ICP-MS) προσφέρει υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια. Αυτή η τεχνική επιτρέπει την ταχεία και ακριβή ανάλυση μικρών ποσοτήτων ιωδίου, κάτι κρίσιμο λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης του ιχνοστοιχείου στο γάλα. Η μέθοδος απαιτεί προσεκτική προετοιμασία του δείγματος για να εξασφαλίσει την αποφυγή ρύπανσης και την ορθή εκχύλιση και ανίχνευση του ιωδίου. Η ανάλυση λιπαρών οξέων στο μητρικό γάλα με τη χρήση Αέριας Χρωματογραφίας (GC) επιτρέπει την ακριβή ποσοτικοποίηση και χαρακτηρισμό των προφίλ λιπαρών οξέων, όπως τα ωμέγα-3 και ωμέγα-6, οι οποίοι είναι κρίσιμοι για την εγκεφαλική ανάπτυξη του βρέφους. Η μέθοδος αυτή απαιτεί την μεθυλεστεροποίηση των λιπαρών οξέων σε μεθυλεστερές, βελτιώνοντας τη διαλυτότητα και την ανίχνευσή τους, γεγονός που ενισχύει την ακρίβεια της ανάλυσης. Η GC είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανάλυση αυτών των κρίσιμων θρεπτικών συστατικών, δίνοντας πολύτιμες πληροφορίες για τη διατροφική αξία του μητρικού γάλακτος. Στο πλαίσιο αυτό, η συνεχής έρευνα και η καινοτομία στον τομέα των αναλυτικών τεχνικών των συστατικών του μητρικού γάλακτος είναι επιτακτική ανάγκη για να την βελτίωση των διατροφικών προτάσεων για τα βρέφη. Οι πληροφορίες που αποκτούνται από τις σύγχρονες μεθόδους ανάλυσης προσφέρουν τη δυνατότητα για την ανάπτυξη εξατομικευμένων διατροφικών σχεδίων που λαμβάνουν υπόψη τις ατομικές ανάγκες του κάθε βρέφους, προωθώντας την υγιή ανάπτυξη και μείωση των πιθανών αναπτυξιακών κινδύνων.

5. Βιβλιογραφία

- Andreas, N. J., Kampmann, B., & Mehring Le-Doare, K. (2015a). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. In *Early Human Development* (Vol. 91, Issue 11, pp. 629–635). Elsevier Ireland Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>
- Andreas, N. J., Kampmann, B., & Mehring Le-Doare, K. (2015b). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. In *Early Human Development* (Vol. 91, Issue 11, pp. 629–635). Elsevier Ireland Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>
- Ballard, O., & Morrow, A. L. (2013). Human Milk Composition. Nutrients and Bioactive Factors. In *Pediatric Clinics of North America* (Vol. 60, Issue 1, pp. 49–74).
<https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>
- Bobinski, R., & Bobinska, J. (2022). Fatty acids of human milk- A review. In *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* (Vol. 92, Issues 3–4, pp. 280–291). Hogrefe Verlag GmbH & Co. KG. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000651>
- Durović, D., Milisavljević, B., Nedović-Vuković, M., Potkonjak, B., Spasić, S., & Vrić, M. M. (2017). Determination of microelements in human milk and infant formula without digestion by ICP-OES. *Acta Chimica Slovenica*, 64(2), 276–282.
<https://doi.org/10.17344/acsi.2016.2582>
- Eriksen, K. G., Christensen, S. H., Lind, M. V., & Michaelsen, K. F. (2018). Human milk composition and infant growth. In *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* (Vol. 21, Issue 3, pp. 200–206). Lippincott Williams and Wilkins.
<https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000466>
- Fernández-Sánchez, L. M., Bermejo-Barrera, P., Fraga-Bermudez, J. M., Szpunar, J., & Lobinski, R. (2007). Determination of iodine in human milk and infant formulas. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21(SUPPL. 1), 10–13.
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2007.09.006>
- Floris, L. M., Stahl, B., Abrahamse-Berkeveld, M., & Teller, I. C. (2020). Human milk fatty acid profile across lactational stages after term and preterm delivery: A pooled data analysis. In *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* (Vol. 156). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2019.102023>
- Ganeshalingam, M., Enstad, S., Sen, S., Cheema, S., Esposito, F., & Thomas, R. (2022). Role of lipidomics in assessing the functional lipid composition in breast milk. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 9). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2022.899401>
- George, A. D., Gay, M. C. L., Trengove, R. D., & Geddes, D. T. (2018). Human milk lipidomics: Current techniques and methodologies. In *Nutrients* (Vol. 10, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu10091169>
- Hampel, D., Dror, D. K., & Allen, L. H. (2018). Micronutrients in Human Milk: Analytical Methods. *Advances in Nutrition*, 9, 313S–331S.
<https://doi.org/10.1093/advances/nmy017>
- Han, X., & Gross, R. W. (2003). Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: A bridge to lipidomics. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 44, Issue 6, pp. 1071–1079).
<https://doi.org/10.1194/jlr.R300004-JLR200>

- Horta, B. L., Loret De Mola, C., & Victora, C. G. (2015). Long-term consequences of breastfeeding on cholesterol, obesity, systolic blood pressure and type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. In *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics* (Vol. 104, pp. 30–37). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/apa.13133>
- Isshiki, H., Suzuki, Y., Yonekubo, A., Hasegawa, H., & Yamamoto, Y. (1988). Determination of Phylloquinone and Menaquinone in Human Milk Using High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Dairy Science*, 71(3), 627–632. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79600-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79600-9)
- Jones, K. S., Meadows, S. R., & Koulman, A. (2023). Quantification and reporting of vitamin D concentrations measured in human milk by LC–MS/MS. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 10). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1229445>
- Kent, J. C., Mitoulas, L. R., Cregan, M. D., Ramsay, D. T., Doherty, D. A., & Hartmann, P. E. (2006). Volume and frequency of breastfeedings and fat content of breast milk throughout the day. *Pediatrics*, 117(3). <https://doi.org/10.1542/peds.2005-1417>
- Kim, S. Y., & Yi, D. Y. (2020). Components of human breast milk: From macronutrient to microbiome and microRNA. In *Clinical and Experimental Pediatrics* (Vol. 63, Issue 8, pp. 301–309). Korean Pediatric Society. <https://doi.org/10.3345/cep.2020.00059>
- Kishimoto, K., Urade, R., Ogawa, T., & Moriyama, T. (2001). Nondestructive quantification of neutral lipids by thin-layer chromatography and laser-fluorescent scanning: Suitable methods for “lipidome” analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281(3), 657–662. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4404>
- Koletzko, B. (2017). Human milk lipids. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 69(2), 28–40. <https://doi.org/10.1159/000452819>
- Lagutin, K., Mackenzie, A., Bloor, S., Scott, D., & Vyssotski, M. (2022). HPLC-MS, GC and NMR Profiling of Bioactive Lipids of Human Milk and Milk of Dairy Animals (Cow, Sheep, Goat, Buffalo, Camel, Red Deer). *Separations*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/separations9060145>
- Lã-Nnerdal, B. O., Woodhoãese, L. R., & Glazier, C. (1987). *Compartmentalization and Quantitation of Protein in Human Milk*¹. <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/117/8/1385/4768517>
- Levêques, A., Oberson, J. M., Tissot, E. A., Redeuil, K., Thakkar, S. K., & Campos-Giménez, E. (2019). Quantification of vitamins A, E, and K and carotenoids in submilliliter volumes of human milk. *Journal of AOAC International*, 102(4), 1059–1068. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.19-0016>
- Liu, Q., Zhao, J., Liu, Y., Qiao, W., Jiang, T., Yu, X., & Chen, L. (2022). Advances in analysis, metabolism and mimicking of human milk lipids. In *Food Chemistry* (Vol. 393). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133332>
- Lubetzky, R., Littner, Y., Mimouni, F. B., Dollberg, S., Mandel, D., Lubetzky, R., Lubetzky, R., Littner, Y., Mimouni, F. B., Dollberg, S., & Mandel, D. (2006). Circadian Variations in Fat Content of Expressed Breast Milk from Mothers of Preterm Infants. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(2), 151–154. <https://doi.org/10.1080/07315724.2006.10719526>
- Lyons, K. E., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., Ross, R. P., & Stanton, C. (2020). Breast milk, a source of beneficial microbes and associated benefits for infant health. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12041039>

- Martin, C. R., Ling, P. R., & Blackburn, G. L. (2016). Review of infant feeding: Key features of breast milk and infant formula. In *Nutrients* (Vol. 8, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu8050279>
- Mitoulas, L. R., Kent, J. C., Cox, D. B., Owens, R. A., Sherriff, J. L., & Hartmann, P. E. (2002). Variation in fat, lactose and protein in human milk over 24h and throughout the first year of lactation. *British Journal of Nutrition*, 88(1), 29–37. <https://doi.org/10.1079/bjn2002579>
- Mohammed Ali Hadi, S., Shaalan Hussien, A., & Abdul Jabber, A. (2013). Rapid HPLC method and sample extraction procedures for measuring 25-hydroxyvitamin D3 concentrations in human breast milk. In *International Journal of Basic and Applied Sciences* (Vol. 2, Issue 3). www.sciencepubco.com/index.php/IJBAS
- Pinto, M. de R., & Almeida, A. A. (2018). Trace Elements in the Human Milk. In *Trace Elements - Human Health and Environment*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76436>
- R Jenness. (n.d.). *The composition of human milk*.
- Szyller, H., Antosz, K., Batko, J., Mytych, A., Dziedziak, M., Wrześniewska, M., Braksator, J., & Pytrus, T. (2024). Bioactive Components of Human Milk and Their Impact on Child's Health and Development, Literature Review. In *Nutrients* (Vol. 16, Issue 10). <https://doi.org/10.3390/nu16101487>
- Victora, C. G., Bahl, R., Barros, A. J. D., França, G. V. A., Horton, S., Krasevec, J., Murch, S., Sankar, M. J., Walker, N., Rollins, N. C., Allen, K., Dharmage, S., Lodge, C., Peres, K. G., Bhandari, N., Chowdhury, R., Sinha, B., Taneja, S., Giugliani, E., ... Richter, L. (2016). Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. In *The Lancet* (Vol. 387, Issue 10017, pp. 475–490). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01024-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01024-7)
- Villaseñor, A., Garcia-Perez, I., Garcia, A., Posma, J. M., Fernández-López, M., Nicholas, A. J., Modi, N., Holmes, E., & Barbas, C. (2014). Breast milk metabolome characterization in a single-phase extraction, multiplatform analytical approach. *Analytical Chemistry*, 86(16), 8245–8252. <https://doi.org/10.1021/ac501853d>
- Wang, H., Yang, Z., Wang, S., Wu, H., Pang, X., Hu, Y., & Yang, X. (2024). Study on Vitamin K Levels in Mature Milk of Chinese Lactating Mothers. *Nutrients*, 16(19). <https://doi.org/10.3390/nu16193351>
- Yi, D. Y., & Kim, S. Y. (2021). Human breast milk composition and function in human health: From nutritional components to microbiome and micrnas. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nu13093094>

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.