

Η σημασία της βιταμίνης Ε και η περιεκτικότητά της στο μητρικό γάλα: αποτελέσματα προοπτικής μελέτης σε δείγμα Ελληνίδων

Αντωνάκου Αγγελική, Χίου Αντωνία, Ματάλα Αντωνία-Λήδα

Τμήμα Επιστήμης Διατολογίας & Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Αλληλογραφία: Αντωνάκου Αγγελική
Ζαγορίου 88, Ίλιον, Τηλ.: (+30) 6942 705 366
E-mail: a.antonakou@mail.gr

Περίληψη

Σκοπός: Η μέτρηση της συγκέντρωσης της βιταμίνης Ε στο μητρικό γάλα Ελληνίδων μητέρων στη διάρκεια των 3 πρώτων μηνών αποκλειστικού θηλασμού και η συσχέτισή της με διατροφικές παραμέτρους.

Μέθοδος: Έγινε δειγματοληψία ώριμου μητρικού γάλακτος και συμπλήρωση διατροφικών ημερολογίων κατά τον 1ο και 3ο μήνα γαλουχίας. Η συγκέντρωση της βιταμίνης Ε προσδιορίστηκε με τη μέθοδο υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας (HPLC).

Αποτελέσματα: Η σύσταση του μητρικού γάλακτος σε βιταμίνη Ε ήταν $8,9 \pm 3,6 \mu\text{mol/l}$ και $8,7 \pm 4,6 \mu\text{mol/l}$ κατά τον 1ο και 3ο μήνα γαλουχίας, αντίστοιχα, χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών. Η διατροφική πρόσληψη της βιταμίνης Ε ήταν $7,2 \pm 3,7 \text{mg/ημέρα}$ και $6,8 \pm 3,5 \text{mg/ημέρα}$ κατά τον 1ο και 3ο μήνα γαλουχίας, αντίστοιχα. Αν και η διατροφική πρόσληψη βιταμίνης Ε ήταν μικρότερη από τις συστάσεις, η περιεκτικότητά της στο μητρικό γάλα θεωρήθηκε επαρκής για την κάλυψη των διατροφικών αναγκών του βρέφους. Μόνο η διατροφική πρόσληψη του λίπους και των κορεσμένων λιπαρών οξέων φάνηκε να συσχετίζεται σημαντικά με τη βιταμίνη Ε στο μητρικό γάλα. Η διαιτητική πρόσληψη της μητέρας σε βιταμίνη Ε δε φάνηκε να επηρεάζει την περιεκτικότητα του μητρικού γάλακτος σε βιταμίνη Ε.

Συμπέρασμα: Η μελέτη αυτή είναι μία από τις λίγες που υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία όπου διερευνάται η σύσταση του ώριμου μητρικού γάλακτος και γίνεται προσπάθεια να αναγνωριστούν οι διατροφικοί παράγοντες που την επηρεάζουν. Συγκεκριμένα, αναγνωρίζοντας τη μεγάλη σημασία της βιταμίνης Ε στη διατροφή του νεογνού, οι μόνοι διαιτητικοί παράγοντες της μητέρας που βρέθηκε να συσχετίζονται με το περιεχόμενο του μητρικού γάλακτος σε βιταμίνη Ε ήταν η πρόσληψη λίπους και κορεσμένων λιπαρών οξέων, ενώ η διαιτητική πρόσληψη βιταμίνης Ε δεν εμφάνισε σημαντική συσχέτιση. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται ωστόσο, προκειμένου να διευκρινιστούν οι διαιτητικοί παράγοντες που θα χρησιμοποιηθούν σαν στόχοι διατροφικής στρατηγικής κατά τη γαλουχία με σκοπό την καλύτερη δυνατή ποιοτικά και ποσοτικά σύσταση του μητρικού γάλακτος.

Λέξεις κλειδιά: Βιταμίνη Ε, τοκοφερόλες, μητρικό γάλα, Μεσογειακή διατροφή

Εισαγωγή

Η βιταμίνη E αποτελεί μια ομάδα από οκτώ φυσικές λιποδιαλυτές μορφές: την α-,β-,γ-,δ- τοκοφερόλη και την α-,β-,γ-,δ- τοκοτριενόλη, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη χημική δομή και τη βιοδιαθεσιμότητά τους¹. Η κυρίαρχη ποσοτικά μορφή είναι η α-τοκοφερόλη, η οποία λειτουργεί ως αντιοξειδωτικός παράγοντας και αντιδρά με ρίζες υπεροξειδίων και ελεύθερες ρίζες^{2,3}. Οι άλλες φυσικές μορφές της βιταμίνης E (β-,γ-,δ- τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες) δε συνεισφέρουν σημαντικά στην κάλυψη των απαιτήσεων του οργανισμού σε βιταμίνη E παρόλο που απορροφώνται, διότι δε μετατρέπονται σε α-τοκοφερόλη και δεν αναγνωρίζονται επομένως επαρκώς από την ειδική πρωτεΐνη μεταφοράς της βιταμίνης E στο ήπαρ (RRR-α-tocopherol - μεταφορική πρωτεΐνη της α-τοκοφερόλης)⁴⁻⁶. Η βιταμίνη E αποτελεί ποσοτικά το άθροισμα της α-,β-,γ-,δ-τοκοφερόλης και παρουσιάζει σημαντικές αντι-οξειδωτικές ιδιότητες εμποδίζοντας κυρίως την αυτόματη οξείδωση ευάλωτων λιπιδίων, όπως είναι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα⁷. Η πρόσληψη της βιταμίνης E γίνεται με τη διατροφή, ενώ η ανεπάρκειά της είναι πολύ σπάνια και παρατηρείται σε άτομα που πάσχουν από αβητα-λιποπρωτεϊναιμία⁸.

Ο ρόλος της βιταμίνης E στον ανθρώπινο οργανισμό είναι πολλαπλός. Έχει βρεθεί πως σχετίζεται με την καλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, τη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων, τη διακυτταρική μεταγωγή σήματος και τη ρύθμιση διαφόρων μεταβολικών οδών⁹. Η υψηλή διαιτητική πρόσληψη α-τοκοφερόλης σχετίζεται με μείωση του κινδύνου εμφάνισης νόσων που σχετίζονται με ελεύθερες ρίζες, όπως της αθηροσκλήρωσης, καρκίνου, καταρράκτη και καταστροφής κυττάρων που παρατηρείται στην επαναιμάτωση ιστών μετά από ισχαιμία (reperfusion)¹⁰. Επίσης, όσον αφορά στο νεογνό έχει δείχτει πως η βιταμίνη E αποτρέπει το οξειδωτικό στρες που υφίσταται κατά τη μετάβαση από το ενδομήτριο περιβάλλον στην εξωμήτριο ζωή και την έκθεση στα υψηλότερα επίπεδα οξυγόνου^{11,12}. Τα πρόωρα νεογνά είναι πιο ευαίσθητα στην έλλειψη της βιταμίνης E και μπορούν να αναπτύξουν διάφορα κλινικά συμπτώματα, όπως αιμολυτική αναιμία, οπισθοφακική ινοπλασία και βρογχοπνευμονική δυσπλασία¹³. Υπάρχουν αναφορές πως τα πολύ χαμηλού βάρους γέννησης πρόωρα νεογνά (<1.500g) μπορεί να αναπτύξουν επιπλοκές σχετιζόμενες με τον αμφιβληστροειδή καθώς και λοιμώξεις λόγω έλλειψης βιταμίνης E¹⁴.

Ο σημαντικός επομένως ρόλος της βιταμίνης E

στην υγεία και την ανάπτυξη του οργανισμού και ειδικά των βρεφών, καθορίζει τη σπουδαιότητα της επαρκούς πρόσληψης της βιταμίνης αυτής μέσω της τροφής. Για τα βρέφη το μητρικό γάλα αποτελεί την ιδανική τροφή μέχρι τον 6ο μήνα της ζωής¹⁵. Το μητρικό γάλα υγιών, καλά σιτιζόμενων γυναικών περιέχει όλα τα θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα στο βρέφος. Το πρωτόγαλα και το ώριμο μητρικό γάλα περιέχουν βιταμίνες που είναι απαραίτητες για την υγεία του βρέφους, παρόλο που η συγκέντρωσή τους διαφέρει σε κάθε μητέρα¹⁶. Είναι πολύ σημαντικό τα βρέφη να θηλάζουν, δεδομένου ότι σημαντικά συστατικά, όπως η βιταμίνη E δε διέρχεται τον πλακουντιακό φραγμό στη διάρκεια της κύησης¹⁷. Στην περίπτωση αυτή, μόνο με το μητρικό γάλα μπορεί το νεογνό να καλύψει τις αυξημένες του ανάγκες. Για τον ίδιο λόγο, τα παρασκευάσματα γάλακτος πρώτης βρεφικής ηλικίας έχουν εμπλουτισθεί με οξεικό και παλμιτικό εστέρα ρετινόλης για τη βιταμίνη A, και με οξεικό εστέρα α-τοκοφερόλης για τη βιταμίνη E¹⁸. Είναι χαρακτηριστικό ότι η Ευρωπαϊκή Νομοθεσία απαιτεί τα παρασκευάσματα βρεφικού γάλακτος να έχουν μία ελάχιστη περιεκτικότητα βιταμίνης E της τάξεως του 0,1mg α-τοκοφερόλης ισοδύναμο ανά διαθέσιμα 100 KJ ή 0,5mg α-τοκοφερόλης ισοδύναμο ανά διαθέσιμα 100 kcal¹⁹. Ακόμη και έτσι, η σταθερότητα αυτών των βιταμινών στο εμπλουτισμένο γάλα αποτελεί θέμα που διερευνάται²⁰. Επίσης, η σύσταση του μητρικού γάλακτος όσον αφορά στα μακροθρεπτικά συστατικά έχει βρεθεί πως επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως είναι η γεωγραφική περιοχή²¹, η διάρκεια του θηλασμού²², ο τόκος²³ και η διατροφή της μητέρας^{24,25}. Με όμοιο τρόπο, υπάρχουν αναφορές πως το περιεχόμενο σε βιταμίνη E του μητρικού γάλακτος επηρεάζεται από τη διάρκεια της γαλουχίας και τη διατροφή της μητέρας²⁶.

Η παρούσα μελέτη έχει ως σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό της βιταμίνης E του μητρικού γάλακτος Ελληνίδων μητέρων στη διάρκεια των πρώτων τριών μηνών της γαλουχίας και τη συσχέτισή της με παραμέτρους από τη διατροφή των μητέρων.

Υλικό και Μέθοδοι

Στην προοπτική αυτή μελέτη συμμετείχαν μητέρες που γέννησαν υγιή τελειόμηνα (>37 εβδομάδες κύησης) νεογνά με βάρος γέννησης >2.5 kg σε ιδιωτικά μαιευτήρια της περιοχής των Αθηνών και είχαν σκοπό να θηλάσουν αποκλειστικά τουλάχιστον για 3 μήνες. Η προσέγγιση των γυναικών έγινε από μέλος της ερευνητικής ομάδας κατά το τρίτο

τρίμηνο της κύησης. Αφού υπήρξε πλήρης ενημέρωση σχετικά με τους σκοπούς και τα αναμενόμενα αποτελέσματα της μελέτης ζητήθηκε έγγραφη συγκατάθεση από όλες τις γυναίκες που θα συμμετείχαν στη μελέτη μετά τον τοκετό τους. Επίσης, ζητήθηκε και δόθηκε έγκριση της μελέτης από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου.

Οι γυναίκες που συμμετείχαν στη μελέτη είχαν ελεύθερο ιατρικό ιστορικό και δεν λάμβαναν συμπληρώματα διατροφής με βιταμίνη Ε στη διάρκεια της κύησης ή της λοχείας. Στη μελέτη συμμετείχαν αρχικά $n=64$ θηλάζουσες γυναίκες και η δειγματοληψία του μητρικού γάλακτος έγινε σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές. Η πρώτη δειγματοληψία έγινε στις 20-30 μέρες της λοχείας (1ος μήνας, $n=64$). Η δεύτερη δειγματοληψία έγινε στην αρχή του 3ου μήνα της γαλουχίας και αφορούσε $n=39$ γυναίκες που εξακολουθούσαν να θηλάζουν.

Συλλογή δεδομένων

- **Ανθρωπομετρικά δεδομένα:** Η συλλογή των δεδομένων έγινε τις πρωινές ώρες. Το ύψος και βάρος των γυναικών μετρήθηκε με την ίδια ψηφιακή ζυγαριά (εύρος 0.1-150 Kg) και τη χρήση μεζούρας (εύρος 0-200cm). Με αυτόν τον τρόπο υπολογίστηκε ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) (kg/m^2). Το βάρος πριν την κύηση καταγράφηκε από το ιατρικό αρχείο της κάθε γυναίκας.

- **Διατροφικά δεδομένα:** Η διαιτητική πρόσληψη αξιολογήθηκε με τη χρήση 3ήμερων ημερολογίων καταγραφής τροφίμων. Εξηγήθηκε στις γυναίκες πώς να συμπληρώνουν το ημερολόγιο, πώς να μετρούν την ποσότητα των τροφίμων και πόσο σημαντικό ήταν να μην παραβλέπουν την καταγραφή κάποιας τροφής. Επίσης, τους ζητήθηκε να μην αλλάξουν τις διατροφικές τους συνήθειες στη διάρκεια της 3ήμερης καταγραφής. Η ανάλυση των διατροφικών ημερολογίων έγινε με τη χρήση του προγράμματος Esha Diet Analysis Plus με το οποίο προσδιορίστηκαν η διαιτητική πρόσληψη ενέργειας, υδατανθράκων, λίπους, πρωτεϊνών και βιταμίνης Ε.

- **Δειγματοληψία μητρικού γάλακτος:** Μετά τη συμπλήρωση των διατροφικών ημερολογίων, μέλος της ερευνητικής ομάδας επισκέπτονταν τις γυναίκες σπίτι τους και γίνονταν λήψη δείγματος μητρικού γάλακτος (περίπου 30ml) από τον ένα μαστό με τη χρήση ηλεκτρικής αντλίας (mini electric breast pump, MEDELA Inc, USA). Στη συνέχεια, το δείγμα γάλακτος τοποθετούνταν σε τρεις αδια-

φανείς αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες χωρίς συντηρητικά και μεταφέρονταν αμέσως σε ένα ψυχρό-δοχείο στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο όπου και αποθηκεύονταν στους -80°C μέχρι να υποστεί τελική επεξεργασία και ανάλυση. Η βιβλιογραφία αναφέρει πως η βιταμίνη Ε παραμένει σταθερή σε συνθήκες φύλαξης στη θερμοκρασία των -80°C ²⁷. Η επίσκεψη στο σπίτι γίνονταν τις πρωινές ώρες και αφού είχε δοθεί η οδηγία στη μητέρα να μην έχει θηλάσει τουλάχιστον 2 ώρες πριν από τη δειγματοληψία με το θήλαστρο, προκειμένου να ληφθεί μια σημαντική ποσότητα λίπους στο μητρικό γάλα^{28,29}.

- **Άλλα δεδομένα:** Η ηλικία κύησης προσδιορίστηκε με βάση την ημερομηνία της τελευταίας εμμηνορροσίας της κάθε γυναίκας καθώς και με την υπερηχογραφική ηλικία κύησης στο 1ο τρίμηνο της κύησης. Καταγράφηκαν επίσης η ηλικία της γυναίκας, τυχόν παθολογία κύησης, το μορφωτικό επίπεδο, τόκος (parity), καθώς και η χρήση καπνού και αλκοόλ.

Εργαστηριακή μεθοδολογία

- **Υλικό:** Χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια αιθανόλης, εξανίου, ισο-προπανόλης, ακετονιτρώλης και μεθανόλης (Merck Inc., Darmstadt-Germany) για τη μέθοδο υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας (HPLC-High Performance Liquid Chromatography). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια α-τοκοφερόλης, δ-τοκοφερόλης, οξεικής α-τοκοφερόλης (Aldrich Inc., Steinheim-Germany), καθώς και γ-τοκοφερόλης (Fluka Inc., Steinheim-Germany).

- **Ανάλυση και ποσοτικός προσδιορισμός τοκοφερόλης:** Χρησιμοποιήθηκε πειραματική μέθοδος που έχει περιγραφεί σε προηγούμενα δημοσιευμένες μελέτες^{26,30,31} αφού πρώτα τροποποιήθηκε ως ακολούθως: Τα δείγματα αφέθηκαν να αποψυχθούν από τους -80°C και να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου πάνω σε συσκευή κίνησης (vortex), προκειμένου να προληφθεί ο διαχωρισμός της λιπώδους από την υδατινή φάση³². Στο δείγμα γάλακτος προστέθηκαν τα κατάλληλα αντιδραστήρια (διάλυμα πυρογαλλόλης 12% σε αιθανόλη και μετά 2ml εξανίου και οξεικής α-τοκοφερόλης σε μεθανόλη, συγκέντρωσης 0,5mg/ml). Το δείγμα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 15min στις 2000 στροφές/λεπτό, και συλλέχθηκε το υπερκείμενό του. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο στρώμα υποβλήθηκε σε ξηρά εξάχνωση σε ρεύμα αζώτου, και τέλος αφού στο υλικό προστέθηκαν 200μl ισοπροπανόλης τοποθετήθηκε

στο σύστημα υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας-HPLC (HPLC-system Agilent Technologies model 1050, Waldbronn, Germany), με στήλη χρωματογραφίας Nucleosil C18 100 (125mm x 4.6mm) (Macherey-Nagel, Düren, Germany)³³, για να γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός των διαφόρων τοκοφερολών. Χρησιμοποιήθηκαν κλάσματα των 50 ΦL για χρωματογραφική ανάλυση ανάστροφης φάσης με υπεριώδη UV (280 nm, 295 nm) και ανίχνευση φθορισμού (Mex=295 nm, Mem=330 nm). Η προτυποποίηση της μεθόδου έγινε με τη χρήση πέντε διαφορετικών συμβατικών συγκεντρώσεων τοκοφερόλης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της τοκοφερόλης έγινε με τη χρήση της καμπύλης μέτρησης που προέκυπτε από τα δεδομένα. Όλοι οι ποσοτικοί προσδιορισμοί επαναλήφθηκαν από τον ίδιο ερευνητή δύο φορές και χρησιμοποιήθηκε η μέση τιμή των δύο μετρήσεων ως η καλύτερη προσέγγιση της πραγματικής τιμής στο δείγμα.

• **Ποσοτικός προσδιορισμός λίπους στο μητρικό γάλα:** Η περιεκτικότητα σε λίπος των δειγμάτων μητρικού γάλακτος μετρήθηκε με την παραδοσιακή μέθοδο του κρεματοκρίτη (crematocrit)³⁴.

• **Στατιστική ανάλυση**

Η κύρια εξαρτημένη μεταβλητή ήταν η συγκέντρωση της βιταμίνης E (άθροισμα της α-, β+γ και δ-τοκοφερόλης) στο μητρικό γάλα. Η σύγκριση της μέσης τιμής της βιταμίνης E στις δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές (1ος και 3ος μήνας) έγινε με τη μέθοδο repeated measures analysis of variance (ANOVA). Έγινε σύγκριση της συγκέντρωσης της α-τοκοφερόλης με τιμές που έχουν δημοσιευτεί σε άλλες μελέτες στη βιβλιογραφία με τη χρήση του independent samples t-test. Απαραίτητη προϋπόθεση βέβαια για να γίνει η σύγκριση ήταν οι δημοσιευμένες μελέτες να αναφέρονταν στο μέγεθος του δείγματός τους, στη μέση τιμή±σταθερά απόκλιση. Τέλος, η επίδραση της ενεργειακής πρόσληψης και της διατροφής στη συγκέντρωση της βιταμίνης E στο μητρικό γάλα μετρήθηκε με τη μέθοδο general linear model (univariate analysis of variance) με τη χρήση των τιμών διατροφικής πρόσληψης ως μεταβλητές. Τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή μέση τιμή±σταθερά απόκλιση. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά στο επίπεδο σημαντικότητας p=0.05. Όλες οι αναλύσεις των δεδομένων έγιναν μέσω του στατιστικού προγράμματος SPSS version 17.0.

Πίνακας 1. Ηλικία και ανθρωπομετρικά στοιχεία του δείγματος

	Mean ±SD	range
Ηλικία (έτη)	32,5±3,1	25-39
Ύψος (m)	1,67±0,06	1,52-1,80
Βάρος (kg)	62,3±11,5	45-106
BMI (kg/m ²)	22,2±4,1	17,4-36,6
Λιποβαρής	4 (6,3%)	
Κανονικού βάρους	50 (78,1%)	
Υπέρβαροι	7 (10,9%)	
Παχύσαρκοι	3 (4,7%)	

Αποτελέσματα

• **Χαρακτηριστικά γυναικών**

Η μέση ηλικία των γυναικών ήταν 32,5±3,1 έτη. Όλες οι συμμετέχουσες ήταν παντρεμένες, η πλειοψηφία τους εργάζονταν (94,3%), τα δύο τρίτα αυτών (64%) ήταν απόφοιτοι ανώτατης εκπαίδευσης και το 78% πρωτοτόκες. Τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά του δείγματος (n=64) παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Μικρός αριθμός γυναικών (4%) είχε δείκτη BMI μικρότερο από 18,5 (λιποβαρείς), ενώ το 10,9% ήταν υπέρβαρες (BMI>25) πριν την εγκυμοσύνη.

• **Συγκέντρωση βιταμίνης E στο μητρικό γάλα**

Όσον αφορά στη σύσταση του μητρικού γάλακτος, στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται οι τιμές της α-,β+γ-,δ-τοκοφερόλης και η συγκέντρωση της βιταμίνης E -η οποία ορίζεται ως το άθροισμα των τοκοφερολών- στο ώριμο μητρικό γάλα τον 1ο και 3ο μήνα της γαλουχίας.

Η συγκέντρωση της βιταμίνης E στο μητρικό γάλα δε διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στις δύο χρονικές στιγμές μέτρησης. Αυτό σημαίνει πως τα επίπεδα στο μητρικό γάλα και για τις τέσσερις μορφές τοκοφερόλης παρέμεναν σταθερά σε όλη τη διάρκεια των 3 πρώτων μηνών αποκλειστικού θηλασμού. Επίσης το λίπος του μητρικού γάλακτος και το πηλίκο βιταμίνης E/λίπος μητρικού γάλακτος τον 1ο και 3ο μήνα γαλουχίας δε διαφοροποιούνταν στατιστικά σημαντικά.

Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την ανάλυση των διατροφικών ημερολογίων. Η διαιτητική πρόσληψη της βιταμίνης E κατά τον 1ο και 3ο μήνα γαλουχίας ήταν 7,2±3,7 και 6,8±3,5 mg/ημέρα, αντίστοιχα.

Στη συνέχεια έγινε συσχέτιση των διαιτητικών παραγόντων με τη σύσταση του μητρικού γάλακτος με

Πίνακας 2. Σύσταση του μητρικού γάλακτος τον 1ο και 3ο μήνα γαλουχίας (mean±SD)

Συγκεντρώσεις	1ος μήνας (n=63)	3ος μήνας (n=39)	p-value
α-τοκοφερόλη(μmol/l)	8,3±3,4	8,1±4,2	0,989
(β+γ)-τοκοφερόλη(μmol/l)	0,59±0,33	0,76±0,48	0,116
δ-τοκοφερόλη(μmol/l)	0,018±0,01	0,007±0,02	0,374
Βιταμίνη E (μmol/l)	8,9±3,6	8,7±4,6	0,894
Λίπος (g/l)	31,5±16,6	27,3±18,0	0,422
Βιταμίνη E/λίπος (mg/g)	0,14±0,06	0,18±0,09	0,145

* Βιταμίνη E= το άθροισμα των α-, (β+γ)- και δ- τοκοφερόλης
 Λίπος= λίπος του μητρικού γάλακτος
 Βιταμίνη E/λίπος= ο λόγος της βιταμίνης E προς το λίπος του μητρικού γάλακτος

σκοπό την ταυτοποίηση εκείνων των παραμέτρων της διατροφής που επηρεάζουν τη σύσταση του ώριμου μητρικού γάλακτος. Χρησιμοποιήθηκε η στατιστική μέθοδος general linear model και εξετάστηκαν οι κάτωθι διαιτητικές παράμετροι: αριθμός γευμάτων την ημέρα, αριθμός διαφορετικών τροφίμων ανά 3 ημέρες, ενεργειακή πρόσληψη, διαιτητική πρόσληψη υδατανθράκων, πρωτεϊνών, λίπους (κορεσμένα-πολυακόρεστα-μονοακόρεστα λιπαρά οξέα) και η διαιτητική πρόσληψη βιταμίνης E. Οι διατροφικές αυτές παράμετροι αξιολογήθηκαν σε σχέση με την επίδρασή τους στη συγκέντρωση της βιταμίνης E στο μητρικό γάλα και τα αποτελέσματα για τον 1ο μήνα θηλασμού παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Ανάλογα ήταν τα αποτελέσματα και για τον 3ο μήνα.

Τα αποτελέσματα δείχνουν μια στατιστικά σημαντική επίδραση της διαιτητικής πρόσληψης λίπους

και κορεσμένων λιπαρών οξέων στην περιεκτικότητα σε βιταμίνη E του μητρικού γάλακτος. Η συσχέτιση αυτή είναι στατιστικά σημαντική μόνο για τον 1ο μήνα γαλουχίας, ενώ για τον 3ο μήνα γαλουχίας δεν διατηρείται η συσχέτιση. Ταυτόχρονα, και στα δύο χρονικά σημεία παρατήρησης παρουσιάστηκε μια ισχυρή τάση θετικής συσχέτισης της συγκέντρωσης της βιταμίνης E στο γάλα με τη διαιτητική πρόσληψη μονοακόρεστων λιπαρών οξέων. Καμία άλλη διαιτητική παράμετρος δε συσχετίστηκε με τη σύσταση του μητρικού γάλακτος ως προς τη βιταμίνη E και επομένως δε φάνηκε να την επηρεάζει.

Συζήτηση

Η μελέτη αυτή είναι από τις λίγες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία με την οποία καταγράφεται η σύσταση του μητρικού γάλακτος ως προς τη βιταμίνη E και γίνεται προσπάθεια να αναγνωριστούν οι δι-

Πίνακας 3. Αποτελέσματα ανάλυσης των διατροφικών ημερολογίων

	1ος μήνας (n=63)	3ος μήνας (n=39)	P value
Αριθμός γευμάτων/ημέρα	5,85±1,5	5,58±1,4	0,125
Αριθμός τροφίμων/3 μέρες	18,4±4,7	17,9±4,4	0,895
Ενεργειακή Πρόσληψη (ΕΠ) (σε kcal)	1961,4±490,8	2044,9±463,6	0,48
Ενεργειακή Πρόσληψη/Βάρος	29,2±8,7	31,1±8,1	0,335
Υδατάνθρακες (%ΕΠ)	44,7±6,4	45,2±7,3	0,744
Πρωτεΐνες (%ΕΠ)	16,2±3,4	15,5±3,2	0,203
Ολικό Λίπος (%ΕΠ)	38,5±6,4	38,7±7,1	0,981
Κορεσμένα λιπαρά οξέα (% Ολικού λίπους)	13,4±2,8	13,1±3	0,353
Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (% Ολικού λίπους)	16±2,8	16,6±5,8	0,917
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (% Ολικού λίπους)	5,6±1,6	5,4±1,5	0,627
Βιταμίνη E (mg/ημέρα)	7,2±3,7	6,8±3,5	0,118

Πίνακας 4. Συσχέτιση διαιτητικών παραγόντων με τη συγκέντρωση της βιταμίνης E στο μητρικό γάλα τον 1ο μήνα της γαλουχίας.

	p-value	Συντελεστής συσχέτισης (r)
Αριθμός γευμάτων	0,474	-0,212
Αριθμός τροφίμων	0,635	0,098
Ενεργειακή Πρόσληψη	0,559	-0,027
Ενεργειακή Πρόσληψη/Βάρος	0,618	-0,021
Υδατάνθρακες	0,081	-0,301
Πρωτεΐνες	0,088	0,085
Ολικό Λίπος	0,047*	0,244
Κορεσμένα λιπαρά οξέα	0,034*	0,300
Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα	0,092	0,195
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα	0,387	0,092
Βιταμίνη E	0,745	0,002

* Στατιστικά σημαντικό $p < 0,05$

αιτητικοί παράγοντες που την επηρεάζουν.

Η σύσταση του μητρικού γάλακτος των Ελληνίδων μητέρων όσον αφορά στη βιταμίνη E και την α-τοκοφερόλη είναι παρόμοια με αυτή που αναφέρεται στη βιβλιογραφία. Ειδικότερα, η βιταμίνη E του μητρικού γάλακτος στη μελέτη μας ($8,9 \pm 3,6$ $\mu\text{mol/l}$) είναι παρόμοια με αυτή που αναφέρεται από τους Bates & Prentice³⁵ σε μια μετανάλυση 21 μελετών. Επίσης, αν και η διαιτητική πρόσληψη της βιταμίνης E από τις γυναίκες του δείγματος ήταν μικρότερη από τη συνιστώμενη³⁶, η περιεκτικότητα του μητρικού γάλακτος σε βιταμίνη E ανταποκρίνεται στα επίπεδα που θέτουν οι οργανισμοί National Research Council³⁷ και Food and Nutrition Board του Institute of Medicine³⁸. Την ίδια στιγμή, στη δική μας μελέτη η συγκέντρωση της βιταμίνης E στο μητρικό γάλα είναι δέκα φορές μεγαλύτερη από τα κατώτερα φυσιολογικά όρια που έχουν αναφερθεί και είναι $0,9$ $\mu\text{mol/l}$ ³⁹. Στον Πίνακα 5 γίνεται σύγκριση των τιμών της α-τοκοφερόλης στο μητρικό γάλα (της αριθμητικά κυρίαρχης τοκοφερόλης) που βρέθηκαν στη δική μας μελέτη τον 1ο μήνα της γαλουχίας ($8,3 \pm 3,4$ $\mu\text{mol/l}$) με άλλες ενδεικτικές μελέτες από τη βιβλιογραφία στη διάρκεια της τελευταίας εικοσαετίας.

Η διαιτητική πρόσληψη της βιταμίνης E κατά τον 1ο και 3ο μήνα γαλουχίας ήταν $7,2 \pm 3,7$ και $6,8 \pm 3,5$ mg/ημέρα , αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές ήταν παρόμοιες με αυτές που βρέθηκαν σε άλλες μελέτες, όπως των Borgud και συν.⁴⁰ ($8,5 \pm 1,2$ mg/ημέρα) και των Schiff και συν.⁴¹ ($11,3 \pm 7,5$ mg/ημέρα). Μόλις 2/64 (3.1%) γυναίκες της μελέτης είχαν διαιτητική πρόσληψη βιταμίνης E πάνω από τη συνιστώμενη

ημερήσια πρόσληψη⁴¹. Και άλλοι ερευνητές έχουν βρει χαμηλά ποσοστά πρόσληψης βιταμίνης E σε εγκύους^{42,43} και λεχώνες⁴⁴. Για αυτό το λόγο, οι Black και συν.⁴³ αναφέρουν πως η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη (Recommended Intake) είναι πιθανώς υψηλότερη από αυτή που είναι απαραίτητη και για αυτό είναι μάλλον απίθανο να προκύψει διαιτητική ανεπάρκεια της βιταμίνης E με κλινική συμπτωματολογία.

Αν και έχουν αξιολογηθεί διάφορες διατροφικές παράμετροι της θηλάζουσας μητέρας όσον αφορά στη συσχέτιση και επίδρασή τους στη σύσταση σε βιταμίνη E του μητρικού γάλακτος, μέχρι στιγμής η μόνη ισχυρή παράμετρος που φαίνεται να συσχετίζεται είναι το στάδιο της γαλουχίας. Υπάρχουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά στη συγκέντρωση της βιταμίνης E στο μητρικό γάλα ανάμεσα στο πύαρ (colostrum), μεταβατικό γάλα (transitional milk) και στο ώριμο γάλα (mature milk)^{30,32,44,45}. Λίγες μελέτες έχουν περιλάβει μεγάλες χρονικές περιόδους γαλουχίας. Ουσιαστικά, μόλις μια μελέτη διερευνά την περιεκτικότητα της βιταμίνης E στο μητρικό γάλα κατά τον 2ο και 4ο μήνα της γαλουχίας⁴⁶. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης είναι σε αντιστοιχία με τα δικά μας αποτελέσματα και προκύπτει πως η βιταμίνη E παραμένει πρακτικά σταθερή στη διάρκεια των 4 μηνών της γαλουχίας, με την εξαίρεση των πρώτων 20 ημερών της γαλουχίας. Επίσης, υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία που δείχνουν πως τα επίπεδα των υπόλοιπων μακροθρεπτικών συστατικών δεν επηρεάζονται και παραμένουν σταθερά μετά τον 1ο μήνα γαλουχίας μέχρι και τον 6ο μήνα γαλουχίας^{21,22}.

Πίνακας 5. Σύσταση του μητρικού γάλακτος: σύγκριση των τιμών της α-τοκοφερόλης στο μητρικό γάλα ανάμεσα στην παρούσα μελέτη και σε άλλες μελέτες από τη βιβλιογραφία (mean ± SD).

Χώρα	Έρευνα	±-τοκοφερόλη (μmol/l)	p-value
Ελλάδα (n=64)	Παρούσα μελέτη	8,3±3,4	-----
ΗΠΑ (n=19)	Gossage και συν., 2002 ³²	↑ 9,4±1,2	0.037
Γερμανία (n=21)	Schweigert και συν., 2004 ⁴⁷	↑ 13,2±5,1	0.001
Κουρακάο (n=47)	Muskiet και συν., 1987 ⁴⁹	↑ 14,4±12,5	0.002
Αγ. Δομίνικος (n=10)	Muskiet και συν., 1987 ⁴⁹	10,6±4,2	NS
Μπελίζε (n=10)	Muskiet και συν., 1988 ⁴⁶	12,2±10,9	NS
Ισλανδία (n=77)	Olafsdottir και συν., 2001 ⁴⁸	↑ 9,6±4,1	0.045
Ισπανία (n=18)	Ortega και συν., 1999 ⁴⁵	↓ 2,2±0,7	<0.001
Κούβα (n=21)	Macias & Schweigert, 2001 ³⁰	↓ 2,7±1,1	<0.001

*NS=non-significant

Στη δική μας μελέτη και με βάση τα αποτελέσματα της στατιστικής μεθόδου general linear model που χρησιμοποιήθηκε για την ερμηνεία των ευρημάτων μας, δεν βρήκαμε καμία διατροφική παράμετρο που να επιδρά σημαντικά στην περιεκτικότητα σε βιταμίνη Ε του ώριμου μητρικού γάλακτος στη συνολική διάρκεια των 3 πρώτων μηνών της γαλουχίας, με μόνη εξαίρεση τον 1ο μήνα της γαλουχίας. Τα δεδομένα της βιβλιογραφίας συμφωνούν σε αυτό και δείχνουν πως αν και η περιεκτικότητα του μητρικού γάλακτος σε λίπος και λιπαρά οξέα επηρεάζεται από τη διατροφή της μητέρας, ωστόσο η περιεκτικότητα του μητρικού γάλακτος σε βιταμίνη Ε δεν επηρεάζεται^{21,30}. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός πως ακόμα και η χρήση συμπληρωμάτων διατροφής πλούσιων σε βιταμίνη Ε στη διάρκεια της κύησης δεν φαίνεται να επηρεάζει την περιεκτικότητα σε τοκοφερόλες του ώριμου μητρικού γάλακτος, σε αντίθεση με την επίδραση που έχει στο μεταβατικό γάλα (transitional milk)⁴⁴. Με όμοιο τρόπο, η συμπληρωματική χορήγηση β-καροτενίου στη διάρκεια της γαλουχίας δεν φαίνεται να επηρεάζει τα επίπεδα της α-τοκοφερόλης στο μητρικό γάλα⁴⁷. Ωστόσο, έχει αναφερθεί μια παροδική αύξηση στη συγκέντρωση της βιταμίνης Ε στο μητρικό γάλα μετά από τη χορήγηση για τρεις ημέρες συμπληρωμάτων διατροφής πλούσιων σε α-τοκοφερόλη⁴⁸. Στη δική μας μελέτη, καμία γυναίκα δεν χρησιμοποίησε συμπληρώματα διατροφής που να περιέχουν βιταμίνη Ε σε όλη τη διάρκεια της κύησης και της γαλουχίας. Τον 1ο μήνα της γαλουχίας στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε μια στατιστικά σημαντική επίδραση της διατροφικής πρόσληψης ολικού και κορεσμένου λίπους και μία ισχυρή τάση θετικής συσχέτισης της πρόσληψης μονοακόρεστων λιπαρών οξέων στη

συγκέντρωση της βιταμίνης Ε του μητρικού γάλακτος. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην παρακάτω παρατήρηση. Η ανάλυση των διατροφικών ημερολογίων έδειξε πως οι μητέρες που συμμετείχαν στη μελέτη ακολουθούσαν ένα «Μεσογειακό πρότυπο» διατροφής με τροφές πλούσιες σε κορεσμένα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα με ταυτόχρονη χαμηλή πρόσληψη πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Η «Μεσογειακή» τους διατροφή περιελάμβανε τροφές όπως ελαιόλαδο, πράσινα λαχανικά μαγειρεμένα με κρέας και ελαιόλαδο, ξηρούς καρπούς και βούτυρο. Επομένως, υπήρξε μια αυξημένη πρόσληψη κορεσμένων και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων καθώς και ολικού λίπους, που θα μπορούσε να εξηγήσει τη σημαντική συσχέτισή τους με τη βιταμίνη Ε του μητρικού γάλακτος. Συμπερασματικά, οι μεταβολές στην περιεκτικότητα σε βιταμίνη Ε του μητρικού γάλακτος παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστες. Απαιτούνται προοπτικές μελέτες με μεγαλύτερο μέγεθος δείγματος ώστε να ξεκαθαριστεί ο μηχανισμός μεταφοράς της ιδιαίτερα σημαντικής για το βρέφος βιταμίνης Ε από το πλάσμα της μητέρας στο μητρικό γάλα. Η μελέτη αυτή έδειξε πως αν και η διατροφική πρόσληψη της βιταμίνης Ε στη διάρκεια της γαλουχίας είναι μικρότερη από τη συνιστώμενη, η σύσταση του μητρικού γάλακτος φαίνεται να είναι επαρκής για τις ανάγκες του βρέφους. Η επιβεβαίωση τυχόν ύπαρξης διατροφικών παραγόντων που επιδρούν ευνοϊκά στη σύσταση του μητρικού γάλακτος θα επιτρέψει τη χρήση τους ως εργαλείων για τη χάραξη διατροφικής στρατηγικής στη γαλουχία με απώτερο σκοπό την καλύτερη δυνατή ποιοτικά και ποσοτικά σύσταση του μητρικού γάλακτος.

Significance and content of breast milk vitamin E during the first three months of exclusive breastfeeding in a sample of Greek women

Antonakou A., Chiou A., Matalas A.-L.

Department of the Science of Dietetics-Nutrition, Harokopio University of Athens, Greece

Correspondence: Antonakou Angeliki
88 Zagoriou Str., Ilion
Tel.: (+30) 6942 705 366
E-mail: a.antonakou@mail.gr

Summary

Vitamin-E content of Greek mother's milk during the first three months of lactation was determined and associations with maternal diet were explored. Maternal vitamin E dietary intake did not show any relationship to milk's vitamin-E content. On the contrary, maternal total fat and saturated fat dietary intake was associated to milk vitamin-E content. This study is one of a few to determine the vitamin-E content of breast milk among women in Greece. It was found that vitamin E dietary intake during lactation was lower than recommendations and total tocopherol content of breast milk did seem to cover infant requirements. Findings indicate that vitamin E content of breast milk in the first month of lactation was positively related to mothers' dietary fat intake during lactation, but this association was not maintained for the third month of lactation. Future studies with the use of larger samples and for longer periods of lactation are deemed as important in order to better understand the role of maternal nutrition on human milk's vitamin E levels.

Key words: Vitamin E, tocopherols, maternal milk, Mediterranean diet

Βιβλιογραφία

1. Jansson L, Akesson B, Holmberg L. Vitamin E and fatty acid composition of human milk. *Am J Clin Nutr.* 1981;34: 8-13.
2. Sies H & Stahl W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr.* 1995; 62: 1315s-1321s.
3. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols.

- Am J Clin Nutr.* 1991; 53: 194S - 200S.
4. Blatt DH, Leonard SW, Traber MG. Vitamin E kinetics and the function of tocopherol regulatory proteins. *Nutrition* 2001;17: 799-805.
5. Brigelius-Flohe R & Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J* 1999; 13: 1145-55.
6. Traber MG & Kayden HJ. Preferential incorporation of alpha-tocopherol vs gamma-tocopherol in human lipoproteins. *Am J Clin Nutr* 1989; 49: 517-526.
7. Desai ID & Machlin LJ. Vitamin E. In Augustin J, Klein BP, Becker S, Venugopal PB (eds), *Methods of vitamin assay*. 4th ed. New York, Wiley. 1985. pp 255-281.
8. Traber MG, Rader D, Acuff RV, Brewer HB Jr, Kayden HJ. Discrimination between RRR and all-racemic- α -tocopherols labeled with deuterium by patients with abetalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1994; 108:27-37.
9. Traber MG. Vitamin E. In: Shils ME, Shike M, Ross AC, Caballero B, Cousins R, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 10th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2006; 396-411.
10. Escriva A, Esteve MJ, Farré R, Frigola A. Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography. *J. Chrom. A.* 2002; 947(2): 313-318.
11. Van Zoeren-Grobbe D, Lindeman JH, Houdkamp E, Brand R, Schrijver J, Berger HM. Postnatal changes in plasma chain-breaking antioxidants in healthy preterm infants fed formula and/or human milk. *Am J Clin. Nutr.* 1994; 60(6): 900-6.
12. Saugstad OD. Oxygen toxicity in the neonatal period. *Acta Paediatr Scand.* 1990;79(10): 881-92.
13. Romeu-Nadal M, Morera-Pons S, Castellote AI, Lopez-Sabater MC. Determination of gamma- and alpha-tocopherols in human milk by a direct high-performance liquid chromatographic method with UV-vis detection and comparison with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A.* 2006; 1114(1):132-7.
14. Brion LP, Bell EF, Raghuvver TS. Vitamin E supplementation for prevention of morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;4:CD003665.
15. WHO. Evidence on the long-term effects of breastfeeding. Systematic reviews and meta-analysis. Department of child and adolescent health and development. Switzerland. 2003.
16. Worthington-Roberts B. The role of maternal nutrition in the prevention of birth defects. *J Am Diet Assoc.* 1997 Oct; 97(10 Suppl 2):S184-5.
17. Kolb E & Seehawer J. The development of the immune system and vitamin levels in the bovine fetus and neonate: a review including the effect of vitamins on the immune system. *Tierarztl. Umsch.* 1998;53: 723-730.

18. Chavez-Servina JL, Castellotea AI, Riverob M, Lopez-Sabater MC. Analysis of vitamins A, E and C, iron and selenium contents in infant milk-based powdered formula during full shelf-life. *Food Chem* 2008; 3: 1187-1197
19. ECC, Commission Directive 2006/141/EC of 22 December 2006 on infant formulae and follow-on formulae. No L401. 1/12/2006. pp 1-33.
20. Miquel E, Alegria A, Barbera R, Farré R, Clemente G. Stability of tocopherols in adapted milk-based infant formulas during storage. *Int. Dairy J.* 2004;14 (11): 1003-1011.
21. Fidler N, Salobir K, Stibilj V. Fatty acid composition of human milk in different regions of Slovenia. *Ann Nutr Metab.* 2000;44 (5-6):187-93.
22. Allen JC, Keller RP, Archer P, Neville MC. Studies in human lactation: milk composition and daily secretion rates of macronutrients in the first year of lactation. *Am J Clin Nutr.* 1991; 54(1):69-80.
23. Nommsen LA, Lovelady CA, Heinig MJ, Lönnerdal B, Dewey KG. Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 months of lactation: the DARLING Study. *Am J Clin Nutr.* 1991; 53(2):457-65.
24. Meneses F & Trugo NMF. Retinol, β - carotene and lutein + zeaxanthin in the milk of Brazilian nursing women: associations with plasma concentrations and influences of maternal characteristics. *Nutr. Res.* 2005; 25:443- 451.
25. Ortega RM, Andres P, Martinez RM, Lopez-Sobaler AM. Vitamin A status during the third trimester of pregnancy in Spanish women: influence on concentrations of vitamin A in breast milk. *Am J Clin Nutr.* 1997;66:564-8.
26. Romeu-Nadal M, Morera-Pons S, Castellote AI, Lopez-Sabater MC. Determination of gamma- and alpha-tocopherols in human milk by a direct high-performance liquid chromatographic method with UV-vis detection and comparison with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A* 2006; 1114(1): 132-7.
27. Comstock GW, Alberg AJ, Helzlsouer KJ. Reported effects of long-term freezer storage on concentrations of retinol, beta-carotene, and alpha-tocopherol in serum or plasma summarized. *Clin Chem.* 1993; 39(6):1075-8.
28. Saarela T, Kokkonen J, Koivisto M. Macronutrient and energy contents of human milk fractions during the first six months of lactation. *Acta Paediatrica,* 2005; 94: 1176-1181.
29. de Pee S, West CE, Muhilal D, Karyadi D, Hautvast JGAJ. Lack of improvement in vitamin A status with increased consumption of dark-green leafy vegetables. *Lancet.* 1995; 346:75-81.
30. Macias C & Schweigert FJ. Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alpha-tocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. *Ann Nutr Metab.* 2001;45(2):82-5.
31. Schweigert FJ, Hurtienne A, Bathe K. Improved extraction procedure for carotenoids from human milk. *Int J Vitam Nutr Res.* 2000; 70(3):79-83.
32. Gossage CP, Deyhim M, Yamini S, Douglass LW, Moser-Veillon PhB. Carotenoid composition of human milk during the first month postpartum and the response to b-carotene supplementation. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76:193-7.
33. Andrikopoulos NK, Bruschiweiler H, Felber H, Taeschler Ch. HPLC analysis of phenolic antioxidants, tocopherols and triglycerides. *J Am Oil Chem Soc* 1991; 68: 359-364.
34. Lucas A, Gibbs JA, Lyster RL, Baum JD. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. *Br Med J* 1978; 1: 1018-20.
35. Bates CJ, Prentice A. Breast milk as a source of vitamins, essential minerals and trace elements. *Pharmacol Ther.* 1994; 62(1-2):193-220.
36. Schiff E, Friedman SA, Stampfer M, Kao L, Barrett PH, Sibai BM. Dietary consumption and plasma concentrations of vitamin E in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 175(4 Pt 1):1024-8.
37. National Research Council. Recommended Dietary Allowances. 10th Edition. Subcommittee on the Tenth Edition of the RDAs. Food and Nutrition Board Commission on Life Sciences. National Research Council. NATIONAL ACADEMY PRESS, Washington, D.C. 1989.
38. Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes: Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington, DC: National Academy Press, 2000.
39. Anderson DM & Pittard WB. Vitamin E and C concentrations in human milk with maternal megadosing: a case report. *J Am Diet Assoc* 1985;85:715-7.
40. Borrud LG, Krebs- Smith SM, Friedman L, Guenther PM. Food and nutrient intakes of pregnant and lactating women in the United States. *J Nutr Educ* 1993; 25:176-185.
41. National Institute of Health DIETARY REFERENCE INTAKES FOR Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. A Report of the Panel on Micronutrients, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and of

- Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes, and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, NATIONAL ACADEMY PRESS Washington, D.C. 2002.
42. Antal M, Regoly- Merei A, Varsanui H, Biro L, Sagi K, Molnar DV et al. Nutritional Survey of Pregnant Women in Hungary. *Int J Vitam Nutr Res* 1997; 67:115-22.
 43. Black AE, Wiles SJ, Paul AA. The nutrient intakes of pregnant and lactating mothers of good socio-economic status in Cambridge, UK: some implications for recommended daily allowances of minor nutrients. *Br J Nutr.* 1986; 56(1):59-72.
 44. Campos JM, Paixao JA, Ferraz C. Fat-soluble vitamins in human lactation. *Int J Vitam Nutr Res* 2007; 77(5): 303-10.
 45. Ortega RM, Lopez-Sobaler AM, Andres P, Martinez RM, Quintas ME, Requejo AM. Maternal Vitamin E status during the third trimester of pregnancy in Spanish women: influence on breast milk vitamin E concentration. *Nutr Res.* 1999; 19(1):25-36.
 46. Muskiet FAJ, Offringa PJ, Boersma ER. Lipid content and fatty acid composition of human milk in relation to developing countries. In : Boersma ER, Huisjes HJ, Poortman HMC, eds. A holistic approach to perinatal care and the prevention of handicap. Groningen, The Netherlands: Erven B van der Kamp Publishers.1988, pp 294-305.
 47. Schweigert FJ, Bathe K, Chen F, Büscher U, Dudenhausen J W. Effect of the stage of lactation in humans on carotenoid levels in milk, blood plasma and plasma lipoprotein fractions. *Eur J Nutr.* 2004; 43: 39-44.
 48. Olafsdottir AS, Wagner KH, Thorsdottir I, Elmadfa I. Fat-soluble vitamins in the maternal diet, influence of cod liver oil supplementation and impact of the maternal diet on human milk composition. *Ann Nutr Metab.* 2001;45(6): 265-72.
 49. Muskiet FAJ, Hutter NH, Martini IA, Jonxis JHP, Offringa PJ, Boersma ER. Comparison of the fatty acid composition of human milk from mothers in Tanzania, Curacao and Surinam. *Hum Nutr Clin Nutr* 1987; 41C :149-59.