Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca

Memòria justificativa de recerca de les convocatòries PBR, DEBEQ, FI, MQD, ACOM, RDG, AREM, ARIE, INEFC, AMIC, EXCAVA, ARAI i XIRE

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:
1.- Dades bàsiques i resums
2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Nom de la convocatòria
FI

Llegenda per a les convocatòries:

ACOM	Ajuts a projectes de recerca d'abast local i comarcal
AMIC	Ajuts per a projectes de recerca en matèria d'immigració internacional a Catalunya
AREM	Ajuts per a projectes adreçats a la recuperació de la memòria històrica
ARAI	Ajuts per a incentivar la recerca aplicada en matèria d'immigració a Catalunya
ARIE	Ajuts per a donar suport al desenvolupament de projectes de recerca i innovació en matèria educativa i d'ensenyament formal i no formal
DEBEQ	Beques de Cooperació Internacional i Desenvolupament
EXCAVA	Ajuts per al desenvolupament de treballs de camp de prospecció i/o excavació arqueològica o paleontològica de rellevància científica i d'impacte internacional
FI	Beques predoctorals per a la formació de personal investigador
INEFC	Beques predoctorals i de col·laboració, dins de l'àmbit de l'educació física i l'esport i les ciències aplicades a l'esport
MQD	Ajuts per al finançament de projectes per a la millora de la qualitat docent a les universitats de Catalunya
PBR	PBR Projectes Batista i Roca. Ajuts per al finançament de projectes de recerca en l'àmbit de les Ciències Socials i les Humanitats
RDG	Ajuts per al finançament de projectes de recerca que tinguin per finalitat l'estudi de les desigualtats i violències originades per motius de gènere
XIRE	Ajuts per a donar suport a l'establiment de xarxes incentivadores de la recerca educativa

Títol del projecte ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.
Evolució i estabilitat d'àcids grassos i vitamines antioxidants a la llet materna

Dades de l'investigador responsable

Nom	Cognoms
Carolina	Moltó Puigmartí

Correu electrònic
carolinamolto@ub.edu

Dades de la universitat / centre al que s'està vinculat

Universitat de Barcelona
Facultat de Farmàcia
Avda. Joan XXIII s/n 08028 Barcelona

Número d'expedient

2007FIC 00766

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.

llet materna, àcids grassos, vitamines, àcid linoleic conjugat, cromatografia de gasos

Data de presentació de la justificació

23/05/2007

Resum del projecte: cal adjuntar dos resums del document, l'un en anglès i l'altre en la llengua del document, on a més s'esmenti les dades següents: les dades del lloc on s'ha fet l'estada i la durada del projecte.

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)

La nutrició durant els primers anys de vida té una enorme importància, amb repercussions no només en el creixement i desenvolupament del nen, sinó també en possibles malalties futures. Tenint en compte que la llet materna és l'aliment ideal per al nadó durant els primers sis mesos de vida, és important conéixer la composició nutricional de la mateixa i la seva evolució durant les diferents etapes de la lactància (calostre, llet de transició i madura). La llet conté nutrients majoritaris (proteïnes, carbohidrats i lípids) i nutrients minoritaris, com vitamines i minerals. S'ha desenvolupat i validat un mètode per a la determinació d'àcids grassos (AG) i Àcid Linoleic Conjugat (CLA) en llet materna per Cromatografia de Gasos "fast" (fast-GC), que ha permès reduir el temps d'anàlisi considerablement en comparació amb els mètodes utilitzats fins el moment. La repetibilitat i reproducibilitat trobades han estat bones, amb coeficients de variació inferiors al 10% en tots els casos. L'aplicació a 6 mostres de llet materna ha demostrat que es tracta d'un mètode senzill, ràpid, eficient i pràctic per a l'anàlisi rutinari d'un elevat nombre de mostres. També s'ha començat a desenvolupar un mètode per a l'anàlisi dels anàlegs de tocoferol de la llet materna, degut a l'interès de la vitamina E com a antioxidant natural. És un mètode per Cromatografia Líquida d'Ultra Resolució (UPLC) amb detecció per Fluorescència (FD) i per Photodiode Array (PDA) que permet treballar amb quantitats de mostra petites mantenint o inclús millorant la sensibilitat i realitzar anàlisis en menys temps del que caldria per un mètode de Cromatografia Líquida d'Alta Resolució (HPLC). Aquest treball s'ha desenvolupat durant el periode Gener 2006-Abril 2007, a la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona (Avda. Joan XXIII s/n, 08028, Barcelona) sota la direcció de la Dra. M. Carmen López Sabater.

Resum en anglès(màxim 300 paraules)
Early nutrition is extremely important, not only because it directly affects children's health but also because it is associated with some diseases in adulthood. Taking into account that human milk is the ideal form for nourishing infants during the first 6 months of life, it should be interesting to know human milk's composition as well as its evolution during the different stages of lactation (colostrum, transitional and mature milk). Milk contains major and minor nutrients (proteins, carbohydrates and lipids, and vitamins and minerals, respectively). We have developed and validated a method for the determination of Conjugated Linoleic Acid (CLA) in human milk by fast-Gas Chromatography (fast-GC). It permits to save time in comparison with the current methods for the analysis of CLA. Repetibility and reproducibility have shown good results, with relative standard deviations (R.S.D.) <10% in all cases. The application of the method to 6 human milk samples have demostrated that this is a simple, fast, efficient and practical method for the rutine analysis of a large number of samples. In addition, we have developed a new method for the determination of tocopherols in human milk by Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) with Fluorescence Detector (FD) and Photodiode Array Detector (PDA), which permits to save time and use smaller amounts of sample in comparison with HPLC methods.
This work has been developed during January 2006-April 2007 at the Faculty of Pharmacy, University of Barcelona (Avda. Joan XXIII s/n, 08028, Barcelona), under the direction of Dra. M. Carmen López Sabater.

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

1. INTRODUCCIÓ

La nutrició durant els primers anys de vida té una enorme importància, amb repercussions no només en el creixement i desenvolupament del nen, sinó també en possibles malalties futures. En aquest sentit, s'ha trobat relació entre l'alletament matern i una menor incidència de malalties cròniques com l'obesitat, l'aterosclerosi, la hipertensió i la diabetes, en l'edat adulta.

La llet materna és l'aliment ideal per a la nutrició del nen durant els primers sis mesos de vida. Conté nutrients majoritaris com proteïnes, carbohidrats i lípids. Els lípids representen la principal font d'energia pel recén nascut, aportant fins a un 50% de les calories diaries totals. A la llet materna el contingut en lípids oscil·la entre el 3 i el 5%. La fracció majoritària dels lípids de la llet materna són els triglicèrids, que vehiculitzen la major part dels àcids grassos. A més del paper dels lípids com a font d'energia, molts estudis científics demostren la seva importància des del punt de vista estructural i regulador de l'organisme. Un exemple clar d'aquests compostos profundament implicats en el funcionalisme corporal són els àcids grassos poliinsaturats de cadena llarga (AGPI-CL). D'aquests, destaquen l'àcid araquidònic (C20:4 n-6, AA) i el docosahexaenoic (C22:6 n-3, DHA) que intervenen en la correcta formació del cervell i la retina dels nadons. Tot i que l'AA i el DHA poden ser sintetitzats per l'organisme a través d'una elongació i desaturació dels seus repectius precursors de 18 carbonis, l'àcid linoleic (C18:2 n-6, LA) i l'àcid linolènic (C18:3 n-3, ALA), s'ha observat que el contingut d'aquests AGPI-CL en teixits de nens alimentats amb AA i DHA preformat és major que en nens que han rebut dietes riques en els precursors, però no en AA i DHA. Això s'explica per la immaduresa de les rutes metabòliques en el nounat per a la síntesi d'AGPI-CL, especialment en nens prematurs. És per això que la *European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition* (ESPGHAN) va recomanar que les fórmules infantils per a recén nascuts a preterme tinguessin uns continguts d'AGPI-CL el més similars possible als de la llet materna.

La llet humana també conté àcid linoleic conjugat (CLA), un grup d'àcids grassos poliinsaturats que existeixen com a estereo-isòmers i isòmers de posició de l'àcid linoleic (C18:2 n-6, LA). El CLA es troba de forma natural als productes lactis i en carns de rumiants, com a resultat de la biohidrogenació endògena que té lloc en el rumen d'aquests animals i també com a resultat d'una conversió endògena a partir de l'àcid *trans*-vaccènic (t11-18:1). A la llet humana hi és present principalment com a resultat de la ingesta dietètica, pero també com a resultat d'una producció endògena. L'isòmer més abundant als productes lactis, carns de rumiants, així com a la llet materna és l'àcid rumènic (RA: c9,t11-C18:2 n-6).

S'ha demostrat que la composició en àcids grassos de la llet humana varia a les diferents etapes de la lactància (calostre, llet de transició i llet madura), i que el contingut de CLA a la llet pot variar en funció del consum d'aliments rics en CLA durant la lactància. Nombrosos estudis indiquen que el CLA

pot infuir sobre funcions fisiològiques i promoure la salut en relació al càncer, a les malalties cardiovasculars, la diabetis, la formació òssia, la modulació del creixement i la immunitat. Malgrat tot, aquests efectes no són iguals per a tots els isòmers. Mentre que es creu que l'RA és l'isòmer més actiu biològicament, l'isòmer t10,c12-CLA sembla tenir efectes indessitjables sobre la salut. Alguns estudis suggereixen que l'isòmer t10,c12-CLA, però no l'RA, pot disminuir la concentració lipídica de la llet materna. Aquest efecte és important en Salut Pública perquè una disminució en el contingut lipídic de la llet podria resultar en una menor ingesta energètica per part dels neonats.

Per altra banda, la llet materna també conté nutrients minoritaris, com vitamines i minerals, que exerceixen funcions importants en la salut del nadó. Donat que els AGPI-CL són compostos molt làbils a la peroxidació lipídica perquè contenen un gran nombre de dobles enllaços (punts altament reactius amb l'oxígen), seria important conéixer els nivells de vitamines antioxidants (vitamina E i C) a la llet materna. A banda del seu paper protector dels AGPI-CL, tenen també un paper importantíssim a nivell fisiològic. Tenint en compte les contradiccions descrites a la literatura, s'ha cregut que cal efectuar més estudis de seguiment del contingut d'AGPI-CL i vitamines antioxidants de la llet de dones amb parts prematurs i molt prematurs.

Degut a la importància de la llet materna en la nutrició pediàtrica, els objectius d'aquesta tesi són els que s'exposen a continuació.

2. OBJECTIUS DE LA TESI

1. Determinar la composició **d'àcids grassos** (inclòs el CLA) **i vitamines antioxidants** (vitamina C i E) en llet de **calostre, transició i madura** de mares amb parts molt prematurs, prematurs i a terme.

2. Estudiar **l'estabilitat de la llet materna en funció de diferents mètodes de conservació:** congelació, refrigeració, descongelació, pasteurització i liofilització. S'efectuaran les mateixes determinacions de laboratori que a l'activitat anterior.

Tenint en compte els objectius esmentats, a continuació es detalla el treball realitzat durant el període becat, des del gener del 2006 fins el maig del 2007 i els resultats obtinguts.

3. TREBALL DESENVOLUPAT

3.1. Recerca bibliogràfica

- Recerca sobre funcions fisològiques de la vitamina C, la vitamina E, els àcids grassos i l'àcid linoleic conjugat (CLA), el seu contingut en la llet materna i la seva relació amb la dieta de les mares en període de lactància.
- Recerca sobre els mètodes d'extracció i mètodes de conservació de la llet materna.
- Recerca sobre les variacions de la composició de la llet en funció de diferents factors (paritat, edat de la mare, grau de prematuritat, etapa de la lactància, etc.).
- Recerca sobre mètodes d'anàlisi instrumental existents per a la determinació dels 4 nutrients a estudiar (vitamina C, vitamina E, àcids grassos i CLA).

3.2. Recollida de mostres, elaboració de protocols i enquestes dietètiques

S'ha iniciat la **recollida de mostres de llet materna** per a l'anàlisi de la composició de la llet. La mostres provenen de mares sanes que han donat a llum a l'Hospital Clínic-Maternitat de Barcelona amb parts molt prematurs (< 30 setmanes de gestació), prematurs (30-38 setmanes de gestació) o a terme (38-42 setmanes de gestació). S'ha elaborat un **protocol de criteris d'exclusió** que inclou els següents criteris: malaltia de la mare; medicació de la mare amb psicòtrops o estupefaents; mares de recén nascuts amb C.I.R. extrems (pes al néixer menor al percentil 25 d'acord amb la seva edat gestacional).

S'ha elaborat un **protocol per a la recollida de la llet** que inclou aspectes com: dia post-part per a recollir llet, horari de recollida de la mostra, condicions higièniques per a la recollida, transport i emmagatzematge de la mostra.

S'han establert les **dades a recollir per part del personal mèdic** de l'Hospital respecte el recén nascut (talla, pes, perímetre cranial i perímetre toràcic) així com les dades a recollir sobre la mare (nom, edat, nacionalitat, pes corporal, alçada, paritat, edat gestacional, nombre de fills en el part, pes guanyat durant l'embaràs, hàbit tabàquic, historial d'al·lèrgies, tipus de part, medicació en el moment actual).

S'ha elaborat un **full d'informació al participant** en el qual s'exposen el títol del projecte, els investigadors principals i el centre participant, l'objectiu de l'estudi, la metodologia emprada, els beneficis i riscos per al participant, la voluntarietat a l'hora de participar i la confidencialitat. Tanmateix, s'ha elaborat un **full de consentiment informat** que ha de signar la voluntària a l'hora de entrar a l'estudi.

S'ha elaborat un **qüestionari sobre freqüència dietètica** incloent els principals grups d'aliments i en especial aquells aliments més rics en vitamines, greixos i CLA. Aquest qüestionari es durà a terme en forma d'entrevista i, sempre que sigui possible, per part del mateix entrevistador. Per a cada mare hi ha un total de 3 entrevistes per a cadascun dels tres dies de recollida de llet (calostre, transició i madura).

3.3. Desenvolupament d'un mètode per a la determinació del gamma i alfa tocoferols en llet materna amb Cromatografia Líquida d'Ultra Resolució amb detector de fluorescència i PDA.

La vitamina E és el principal antoxidant natural liposoluble. Engloba un gran nombre d'anàlegs de tocoferol (alfa, beta, gamma i delta o α, β, γ i δ) i els seus corresponents tocotrienols insaturats. Només els tocoferols són importants des del punt de vista fisiològic. L'α-Tocoferol és el més actiu, mentre que l'activitat dels altres anàlegs és d'un 70 a un 95% menys.

La llet materna és l'única font de vitamina E per un nadó alimentat al pit. Prevé el dany oxidatiu del neonat, exposat sobtadament a uns nivells d'oxígen molt majors que els que hi havia a l'entorn intrauterí. Tenint en compte que els nivells de vitamina E a la llet materna poden ser diferents entre dones i que poden variar en els diferents estadis de la lactància (calostre, llet de transició i llet madura), es va creure interessant desenvolupar un mètode per Cromatografia Liquida d'Ultra Resolució (UPLC) per a conéixer el contingut d'aquesta vitamina en la llet humana..

Aquest mètode es va comparar amb el mètode d'HPLC que s'estava utilitzant fins al moment. A la taula que es mostra a continuació es poden veure els límits de detecció i quantificació pels tres anàlegs d'interès (delta, gamma i alfa-tocoferol). Aquests són menors amb el nou mètode d'UPLC, tant quan es treballa amb el detector PDA com amb el de fluorescència (FD), que amb el mètode d'HPLC. Això suposa un avantatge perquè permet detectar quantitats petites, però importants, de vitamina E a la llet. També s'observa una bona precisió (RSD) i linialitat (R^2) per a cadascun dels mètodes provats.

QUALITY PARAMETERS UPLC-PDA					
Compound	Range (ng)	R2	LOD (ng)	LOQ (ng)	Precision RSD (%)
Delta-Tocopherol	5-20	0,996	1,69	3,38	1,75
Gamma-Tocopherol	5-20	0,997	1,17	1,96	1,8
Alpha-Tocopherol	5-20	0,998	2,41	4	1,41
QUALITY PARAMETERS UPLC-FD					
Compound	Range (ng)	R2	LOD (ng)	LOQ (ng)	Precision RSD (%)
Delta-Tocopherol	5-20	0,996	0,04	0,08	0,11
Gamma-Tocopherol	5-20	0,997	0,03	0,05	0,26
Alpha-Tocopherol	5-20	0,995	0,12	0,2	0,13
QUALITY PARAMETERS HPLC-UV/Vis					
Compound	Range (ng)	R2	LOD (ng)	LOQ (ng)	Precision RSD (%)
Delta-Tocopherol	5-20	0,995	2,6	5,2	1,04
Gamma-Tocopherol	5-20	0,991	1,8	3,02	1,85
Alpha-Tocopherol	5-20	0,997	3,72	6,16	2,47

Per altra banda, s'aconsegueix una important reducció del temps d'anàlisis amb el mètode d'UPLC respecte el d'HPLC (0,8 min amb UPLC i 9 min per HPLC).

3.4. Desenvolupament d'un mètode per a la determinació d'àcids grassos i àcid linoleic conjugat (CLA) en llet materna.

Tenint en compte la importància del CLA en l'alimentació del recén nascut, es va creure important posar a punt un mètode per a la determinació de CLA en llet materna per Cromatografia de Gasos (GC). Aquest nou mètode és adequat per a la determinació rutinària dels isòmers *c*9,*t*11 i *t*10,*c*12-

CLA en llet humana, i s'ha enviat un article de títol **"Conjugated linoleic acid determination in human milk by fast gas chromatography"** (Autors: Carolina Moltó-Puigmartí, Ana Isabel Castellote, M. Carmen López-Sabater) a la revista "Analytica Chimica Acta" que es troba actualment en estat de revisió.

L'objectiu de l'estudi és desenvolupar i validar un mètode simple, directe (sense extracció lipídica prèvia) i eficient per a la determinació simultània dels isòmers *c*9,*t*11-CLA, *t*10,*c*12-CLA i la resta d'àcids grassos de la llet materna per Cromatografia de Gasos ràpida (fast-GC). El mètode també s'ha validat per llet de rata, tenint en compte que són animals monogàstrics que poden servir com a models pels humans pel que respecta als estudis amb CLA.

Les tècniques actuals per a la determinació de CLA generalment consisteixen en una etapa de preparació de la mostra (que inclou una extracció lipídica i una metil·lació), seguida d'una separació, identificació i quantificació dels isòmers de CLA. Malgrat tot, aquest procés encara suposa un repte analític important. El fet de requerir una extracció lipídica en l'etapa de preparació de la mostra enlenteix el procés i implica un important ús de dissolvents, fent aquestes tècniques poc pràctiques pels anàlisis rutinaris. Per una altra banda, l'optimització del procés de metil·lació requereix el control tant de la temperatura com del temps de reacció per aconseguir una metil·lació completa del CLA i per minimitzar la isomerització i la formació d'artefactes d'oxidació.

En quant a la identificació i quantificació del CLA, l'eina més utilitzada és la Cromatografia de Gasos acoplada a un espectròmetre de masses (GC-MS) i a la Comatografia Líquida d'Alta Resolució d'ió plata (Ag^+-HPLC), utilitzant normalment columnes capil·lars llargues (100 m x 0.25 mm x 0.20 µm), que permeten un anàlisi complert de tots els isòmers de CLA però requereixen fins a 80 min d'anàlisi, la qual cosa allarga encara més l'anàlisi. Les tècniques de fast-GC permeten reduir significativament el temps d'anàlisi, mantenint o inclús millorant la resolució.

En aquest estudi es va fer servir un cromatògraf de gasos *HP-6890 Series GC System*, equipat amb un detector de flama (FID), un injector automàtic *HP-6890 Series Injector* i un software *Hewlett-Packard ChemStation*. Els ésters metíl·lics d'àcids grassos es van separar amb una columna *RTX-2330* (40m x 0.18 mm i.d.) amb una fase estacionària composta per *10% cyanopropylphenyl- 90% biscyanopropyl polysiloxane (0.10 µm film thickness)* de Restek (Restek, USA). El temps d'anàlisi en el cromatògraf de gasos va ser de 26 min. El mètode "fast" es va aconseguir gràcies a l'ús d'una columna curta (40 m) amb un diàmetre intern i un tamany de partícula petits (0,18 mm i 0,10 µm respectivament), així com a l'ús d'un programa cromatogràfic amb elevades rampes d'increments de temperatura.

En quant a la metil·lació, se'n van provar dues de diferents: una àcida, amb HCl/MeOH a diferents temps, i una combinació de bàsica i àcida durant pocs minuts, emprant $NaOCH_3$/MeOH seguit de BF_3/MeOH. Es va veure que la metil·lació àcida originava isomerització i oxidació del CLA, mentre que la metil·lació bàsica + àcida aconseguia una metil·lació complerta dels àcids grassos de la llet amb una formació d'artefactes oxidats mínima.

Un cop decidits el temps, la temperatura i els reactius metil·lants es va validar el mètode en termes de sensibilitat i precisió, trobant uns límits de detecció i quantificació de 0.32 i 1.07 μg mL^{-1} respectivament, en el rang de ppm (μg per mL de llet) i una repetibilitat i reproducibilitat bones, amb RSDs (Relative Standard Deviation) menors al 10% per a tots els àcids grassos. Els resultats es mostren a les *taules 1 i 2*.

Per tal de provar l'aplicabilitat del mètode als anàlisis rutinaris, es van analitzar 6 mostres de llet humana madura. La *figura 1a* mostra el cromatograma d'una de les mostres, i la *1b* mostra un detall de la regió del CLA. El contingut d'ésters metíl·lics es mostra a la *taula 3*, expressat com al percentatge respecte al total d'àcids grassos, i a la *taula 4* en μg per mL de llet. Com pot observar-se, el *t*10,*c*12-CLA i l'EPA (C20:5 n-3) són els àcids grassos minoritaris, tant en llet humana com de rata; en algunes mostres no es podien detectar.

Taula 1

Repetibilitat per a llet humana i de rata n=6.

		Llet humana		Llet de rata	
	FAME	Mitjana (%)	R.S.D. (%)	Mitjana (%)	R.S.D. (%)
1	$C_{8:0}$	0.08	3.78	1.09	3.39
2	$C_{10:0}$	0.84	4.59	6.25	2.22
3	$C_{12:0}$	5.27	4.16	8.21	0.99
4	$C_{14:0}$	6.91	3.58	11.50	0.41
5	$C_{14:1}$	0.20	5.36	0.05	1.48
6	$C_{15:0}$	0.27	5.44	0.10	2.80
7	$C_{16:0}$	22.61	3.95	28.51	0.71
8	$C_{16:1\ n\text{-}9}$	0.40	3.87	0.29	0.31
9	$C_{16:1\ n\text{-}7}$	1.79	4.35	1.31	0.36
10	$C_{17:0}$	0.38	6.61	0.10	2.66
11	$C_{17:1}$	0.22	6.45	0.07	0.97
12	$C_{18:0}$	6.85	4.16	3.42	0.72
13	$C_{18:1\ n\text{-}9\ t}$	-	-	0.05	4.04
14	$C_{18:1\ n\text{-}9\ c}$	38.46[a]	2.24[a]	14.64	0.64
15	$C_{18:1\ n\text{-}7}$	1.40	4.85	0.97	1.87
16	$C_{18:2\ t9,.t12}$	0.08	3.79	0.01	8.67
17	$C_{18:2\ c/t,\ t/c}$	0.19	6.26	0.11	2.84
18	$C_{18:2\ n\text{-}6\ c}$	10.55	1.73	17.24	0.56
19	$C_{18:3\ n\text{-}6}$	0.09	4.25	0.42	0.46
20	$C_{20:0}$	0.19	8.01	0.11	1.15
21	$C_{18:3\ n\text{-}3}$	0.39	2.34	1.99	0.50
22	CLA $_{c9.,t11}$	0,19	2.51	0.02	1.53
23	$C_{20:1\ n\text{-}9}$	0.40	4.51	0.18	0.85
24	CLA $_{t10,c12}$	0.01	6.56	N.D.	-
25	CLA $_{t,t}$	0.01	6.50	0.01	7.78
26	$C_{20:2\ n\text{-}6}$	0.30	1.97	0.42	0.44
27	$C_{20:3\ n\text{-}6}$	0.34	2.35	0.57	0.63
28	$C_{22:0}$	0.06	5.80	0.05	3.48
29	$C_{20:4\ n\text{-}6}$	0.49	1.81	1.19	0.66
30	$C_{22:1\ n\text{-}9}$	0.09	5.45	0.04	4.96
31	$C_{20:5\ n\text{-}3}$	Tr.	-	0.01	5.97
32	$C_{22:2}$	0.04	4.78	0.29	1.75
33	$C_{24:0}$	0.04	7.79	0.04	5.91
34	$C_{22:4\ n\text{-}6}$	0.10	1.86	0.26	2.86
35	$C_{24:1}$	0.04	4.06	0.01	3.10
36	$C_{22:5\ n\text{-}6}$	0.04	5.88	0.04	6.55
37	$C_{22:5\ n\text{-}3}$	0.14	2.04	0.21	1.23
38	$C_{22:6\ n\text{-}3}$	0.25	1.90	0.22	0.55

R.S.D : relative standard deviation. N.D: no detectable. Tr: traces

(a) C18:1 n-9 *c* en llet humana representa la suma dels isòmers *cis* i *trans del* C18:1

Taula 2

Reproducibilitat per a llet humana i de rata n=6.

		Leche humana		Leche de rata	
	FAME	Mitjana (%)	R.S.D. (%)	Mitjana (%)	R.S.D. (%)
1	$C_{8:0}$	0.09	4.33	1.14	0.90
2	$C_{10:0}$	0.84	0.74	6.42	0.56
3	$C_{12:0}$	5.34	0.63	8.24	0.44
4	$C_{14:0}$	6.99	0.43	11.40	0.32
5	$C_{14:1}$	0.20	4.32	0.05	1.35
6	$C_{15:0}$	0.27	4.82	0.10	1.71
7	$C_{16:0}$	21.81	0.10	28.53	0.18
8	$C_{16:1\ n-9}$	0.41	1.82	0.29	0.31
9	$C_{16:1\ n-7}$	1.83	0.49	1.30	0.28
10	$C_{17:0}$	0.33	4.15	0.10	2.78
11	$C_{17:1}$	0.28	6.69	0.07	1.41
12	$C_{18:0}$	6.65	0.81	3.43	0.35
13	$C_{18:1\ n-9\ t}$	-	-	0.05	1.16
14	$C_{18:1\ n-9\ c}$	39.22[a]	0.41[a]	14.54	0.20
15	$C_{18:1\ n-7}$	1.37	2.36	0.94	0.92
16	$C_{18:2\ t9,t12}$	0.08	7.28	0.01	8.64
17	$C_{18:2\ c/t,\ t/c}$	0.24	7.92	0.11	1.28
18	$C_{18:2\ n-6\ c}$	10.68	0.37	17.16	0.17
19	$C_{18:3\ n-6}$	0.10	3.87	0.42	0.16
20	$C_{20:0}$	0.20	8.71	0.12	1.83
21	$C_{18:3\ n-3}$	0.39	1.10	1.99	0.17
22	$CLA_{\ c9,t11}$	0.19	3.27	0.02	3.08
23	$C_{20:1\ n-9}$	0.42	1.81	0.17	0.34
24	$CLA_{\ t10,c12}$	0.01	7.51	N.D.	-
25	$CLA_{\ t,t}$	0.02	7.75	0.01	3.46
26	$C_{20:2\ n-6}$	0.31	1.92	0.42	0.40
27	$C_{20:3\ n-6}$	0.35	1.47	0.58	0.48
28	$C_{22:0}$	0.07	2.89	0.05	3.51
29	$C_{20:4\ n-6}$	0.50	0.96	1.19	0.33
30	$C_{22:1\ n-9}$	0.09	4.45	0.05	6.52
31	$C_{20:5\ n-3}$	Tr.	-	0.01	6.98
32	$C_{22:2}$	0.05	5.49	0.30	2.63
33	$C_{24:0}$	0.04	7.90	0.05	8.43
34	$C_{22:4\ n-6}$	0.11	3.92	0.25	1.19
35	$C_{24:1}$	0.04	6.82	0.02	6.22
36	$C_{22:5\ n-6}$	0.04	0.45	0.05	6.69
37	$C_{22:5\ n-3}$	0.15	3.42	0.21	3.62
38	$C_{22:6\ n-3}$	0.27	6.51	0.21	0.89

R.S.D : relative standard deviation. N.D: non detectable. Tr: traces

(a) C18:1 n-9 *c* en llet humana representa la suma dels isòmers *cis* i *trans* del C18:1.

Table 3
Contingut de FAMEs en 6 mostres diferents de llet materna madura (%)

	FAME	1	2	3	4	5	6
1	$C_{8:0}$	0.04	0.07	0.08	0.11	0.08	0.07
2	$C_{10:0}$	0.54	0.90	0.84	0.92	0.78	0.66
3	$C_{12:0}$	2.83	4.33	4.92	4.44	3.52	4.25
4	$C_{14:0}$	2.85	5.30	5.70	5.63	4.48	5.28
5	$C_{14:1}$	0.08	0.12	0.15	0.30	0.29	0.11
6	$C_{15:0}$	0.14	0.23	0.19	0.35	0.29	0.17
7	$C_{16:0}$	18.63	23.15	19.97	21.20	20.78	19.46
8	$C_{16:1\ n\text{-}9}$	0.48	0.38	0.51	0.40	0.41	0.35
9	$C_{16:1\ n\text{-}7}$	1.97	1.62	2.40	2.01	2.36	1.25
10	$C_{17:0}$	0.20	0.29	0.23	0.34	0.31	0.23
11	$C_{17:1}$	0.15	0.19	0.18	0.20	0.28	0.15
12	$C_{18:0}$	4.64	7.60	5.91	6.81	7.01	7.87
13	$C_{18:1\ n\text{-}9\ t}$	-	-	-	-	-	-
14	$C_{18:1\ n\text{-}9\ c}$ [a]	49.65	40.22	43.08	36.80	37.93	37.31
15	$C_{18:1\ n\text{-}7}$	1.65	1.58	1.87	1.55	1.66	1.39
16	$C_{18:2\ t9,t12}$	0.05	0.07	0.06	0.12	0.13	0.05
17	$C_{18:2\ c/t,\ t/c}$	0.13	0.14	0.13	0.18	0.08	0.15
18	$C_{18:2\ n\text{-}6\ c}$	11.89	11.04	10.33	14.94	16.08	17.78
19	$C_{18:3\ n\text{-}6}$	0.10	0.09	0.09	0.09	0.11	0.15
20	$C_{20:0}$	0.14	0.20	0.16	0.18	0.19	0.24
21	$C_{18:3\ n\text{-}3}$	0.51	0.51	0.43	0.88	0.54	0.70
22	CLA $_{c9,t11}$	0.11	0.14	0.13	0.24	0.34	0.11
23	$C_{20:1\ n\text{-}9}$	0.56	0.40	0.59	0.34	0.36	0.36
24	CLA $_{t10,c12}$	N.D.	0.02	N.D.	0.01	N.D.	N.D.
25	CLA $_{t,t}$	0.03	0.02	0.02	0.03	0.04	0.02
26	$C_{20:2\ n\text{-}6}$	0.32	0.21	0.35	0.27	0.31	0.28
27	$C_{20:3\ n\text{-}6}$	0.42	0.21	0.41	0.31	0.33	0.36
28	$C_{22:0}$	0.04	0.04	0.05	0.05	0.06	0.07
29	$C_{20:4\ n\text{-}6}$	0.62	0.36	0.35	0.43	0.49	0.47
30	$C_{22:1\ n\text{-}9}$	0.10	0.06	0.12	0.08	0.07	0.06
31	$C_{20:5\ n\text{-}3}$	Tr.	Tr.	0.01	Tr.	Tr.	0.01
32	$C_{22:2}$	0.03	0.04	0.04	0.06	0.04	0.05
33	$C_{24:0}$	0.05	0.02	0.05	0.03	0.04	0.05
34	$C_{22:4\ n\text{-}6}$	0.12	0.07	0.09	0.09	0.12	0.08
35	$C_{24:1}$	0.05	0.02	0.07	0.03	0.03	0.03
36	$C_{22:5\ n\text{-}6}$	0.06	0.02	0.03	0.04	0.06	0.04
37	$C_{22:5\ n\text{-}3}$	0.10	0.11	0.13	0.17	0.13	0.11
38	$C_{22:6\ n\text{-}3}$	0.28	0.22	0.30	0.38	0.24	0.26

N.D: no detectable. Tr: traces. (a) C18:1 n-9 *c* en llet materna representa la suma dels isòmers c*is* i *trans* del C18:1.

Table 4
Concentració d'àcids grassos en llet materna madura (μg mL^{-1}).

	FAME	
1	$C_{8:0}$	51.22
2	$C_{10:0}$	586.59
3	$C_{12:0}$	3598.78
4	$C_{14:0}$	4541.46
5	$C_{14:1}$	125.61
6	$C_{15:0}$	165.85
7	$C_{16:0}$	13532.93
8	$C_{16:1\ n\text{-}9}$	242.68
9	$C_{16:1\ n\text{-}7}$	1197.56
10	$C_{17:0}$	206.10
11	$C_{17:1}$	147.56
12	$C_{18:0}$	4057.32
13	$C_{18:1\ n\text{-}9\ t}$	-
14	$C_{18:1\ n\text{-}9\ c}$ [a]	25374.39
15	$C_{18:1\ n\text{-}7}$	990.24
16	$C_{18:2\ t9,t12}$	54.88
17	$C_{18:2\ c/t,\ t/c}$	87.81
18	$C_{18:2\ n\text{-}6\ c}$	6982.93
19	$C_{18:3\ n\text{-}6}$	56.10
20	$C_{20:0}$	91.46
21	$C_{18:3\ n\text{-}3}$	247.56
22	CLA $_{c9,t11}$	117.07
23	$C_{20:1\ n\text{-}9}$	265.85
24	CLA $_{t10,c12}$	3.29
25	CLA $_{t,t}$	12.20
26	$C_{20:2\ n\text{-}6}$	168.29
27	$C_{20:3\ n\text{-}6}$	218.29
28	$C_{22:0}$	26.83
29	$C_{20:4\ n\text{-}6}$	318.29
30	$C_{22:1\ n\text{-}9}$	64.63
31	$C_{20:5\ n\text{-}3}$	2.56
32	$C_{22:2}$	25.61
33	$C_{24:0}$	20.73
34	$C_{22:4\ n\text{-}6}$	73.17
35	$C_{24:1}$	29.27
36	$C_{22:5\ n\text{-}6}$	30.49
37	$C_{22:5\ n\text{-}3}$	95.12
38	$C_{22:6\ n\text{-}3}$	178.05

(a) $C_{18:1\ n\text{-}9\ c}$ en llet materna representa la suma dels ìòmers *cis* i *trans* del C18:1.

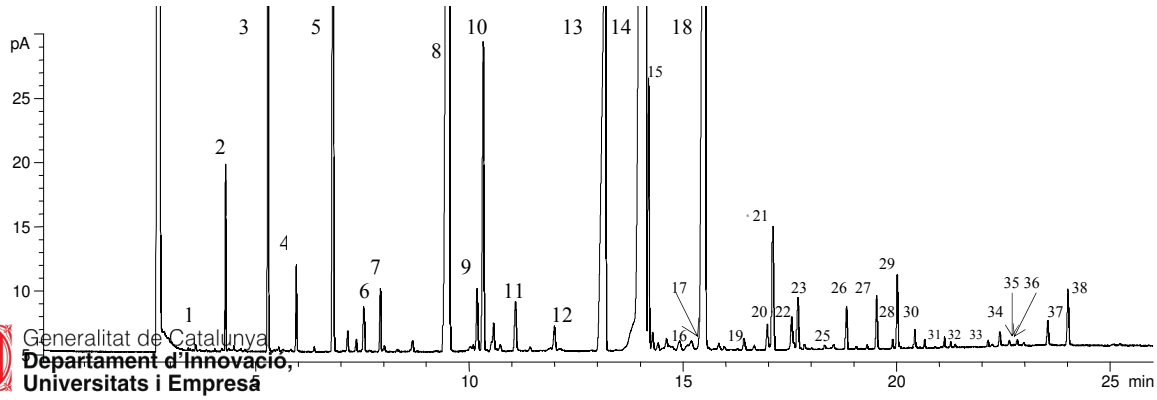

Figura 2a. Cromatograma dels àcids grassos de la llet humana per Fast-GC. Identificació de pics : (1) C8:0; (2) C10:0; (3) C12:0; (4) C13:0; (5) C14:0; (6) C14:1; (7) C15:0; (8) C16:0; (9) C16:1 n-9; (10) C16:1 n-7; (11) C17:0; (12) C17:1; (13) C18:0; (14) C18:1 n-9 *c+t*; (15) C18:1 n-7; (16) C18:2 *t9,t*12; (17) C18:2 *c,t* / *t,c*; (18) C18:2 n-6 *c*; (19) C18:3 n-6; (20) C20:0; (21) C18:3 n-3; (22) CLA *c*9,*t*11; (23) C20:1 n-9; (25) CLA *t,t*; (26) C20:2 n-6; (27) C20:3 n-6; (28) C22:0; (29) C20:4 n-6; (30) C22:1 n-9; (31) C20:5 n-3; (32) C22:2; (33) C24:0; (34) C22:4 n-6; (35) C24:1; (36) C22:5 n-6; (37) C22:5 n-3; (38) C22:6 n-3.

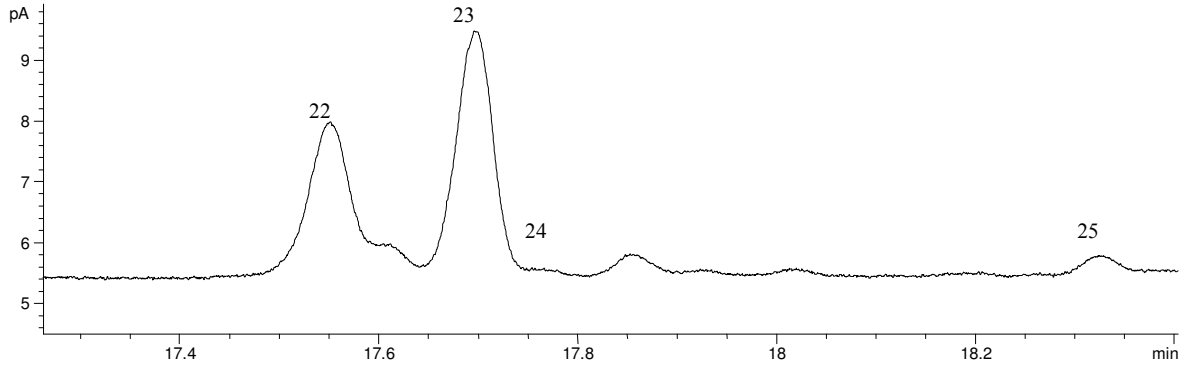

Figure 2b. Detall d'un cromatograma per fast-GC de la regió de CLA d'una mostra de llet humana. Identificació de pics: (22) CLA *c*9,*t*11; (23) C20:1 n-9; (24) CLA *t*10,*c*12; (25) CLA *t,t*.

En definitiva, els resultats mostrats demostren la precisió, sensibilitat i robustesa del mètode. L'aplicació senzilla a mostres de llet humana i de rata demostren l'aplicabilitat i practicabilitat del mètode sobretot en termes de cost i temps, convertint-lo en un mètode de rutina per a l'anàlisi dels àcids grassos i els dos isòmers principals del CLA a la llet materna.

4. CONCLUSIONS

La recerca bibliogràfica, la redacció de protocols de treball i enquestes dietètiques, així com el reclutament de voluntàries i la recollida de mostres han estat el punt de partida, indispensable, per a l'estudi.

El mètode per a l'anàlisi de CLA en llet materna ha resultat ser un mètode senzill, ràpid i eficient per a l'anàlisi rutinari dels àcids grassos i els principals isòmers de CLA de la llet, gràcies a l'absència de l'habitual pas previ d'extracció lipídca i de l'ús d'una columna més curta i amb diàmetre intern menor a

les que s'utilitzen habitualment, cosa que permet desenvolupar un mètode ràpid de Cromatografia de Gasos.

El mètode per a l'anàlisi de la vitamina E a la llet materna permetrà conéixer en quines quantitats es troba a la llet humana i establir correlacions amb la dieta materna, la qual cosa, en últim terme, serà útil per a donar recomanacions dietètiques a les mares i establir quins són els nivells desitjables en les fórmules infantils de què s'alimenten molts nadons.

5. REFERÈNCIES

- Abidi SL (2000). Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. *J. Chromatogr. A* **881,** 197.
- Al-Tamer YY, Mahmood AA (2004). Fatty acid composition of the colostrum and serum of fullterm and preterm delivering Iraqi mothers. *Eur. J. Clin. Nutr*. **58**, 1119.
- Bank MR, Avanelle K, Kerstin West RN, George G (1985). Effect of storage time and temperature on folacin and vitamin C levels in term and preterm human milk. *Am. J. Clin. Nutr.* **41**, 235.
- Boersma ER, Offringa PJ, Muskiet FAJ, Chase MW, Simmons IJ (1991). Vitamin E, lipid fractions, and fatty acid composition of colostrums, transitional and mature milk: An international collaborative study. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 1197.
- Bondia-Pons I, Castellote AI, López-Sabater MC (2004). Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination. *J. Chromatogr. B* **809**, 339.
- Bontempo V, Sciannimanico D, Pastorelli G, Rossi R, Rosi F, Corino C (2004). Dietary conjugated linoleic acid positively affects immunologic variables in lactating sows and piglets. *J. Nutr.* **134, 4**, 817.
- Buss IH, McGill F, Darlow BA, Winterbourn CC (2001). Vitamin C reduced in human milk after storage. *Acta Paediatr.* **90**, 831.
- Carlson SE (2001). Docosahexaenoic acid and arachidonic acid in infant development. *Semin. Neonatol*. **6**, 437.
- Cruz-Hernández C, Deng Z, Zhou J, Hill AR, Yurawecz MP, Delmonte P, Mossoba M, Dugan MER, Kramer JKG (2004). Methods for analysis of conjugated linoleic acids and trans-18:1 isomers in dairy fats by using a combination of gas chromatography, silver-ion thin-layer chromatography/gas chromatography, and silver-ion liquid chromatography. *J. AOAC Int.* **87**, No. 2, 545.
- David F, Gere DR, Scanlan F, Sandra P (1999). Instrumentation and applications of fast high-resolution capillarty gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **842**, 309.
- de la Fuente MA, Luna P, Juárez M (2006). Chromatographic techniques to determine conjugated linoleic acid isomers. *Trends Anal. Chem.* **20**.
- de la Presa-Owens S, López-Sabater MC, Rivero-Urgell M (1996). Fatty acid composition of human milk in Spain. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **22**, 180.
- de la Presa-Owens S, López-Sabater MC, Rivero-Urgell M (1996). Fatty acid composition of human milk in Spain. *J. Pediatr. Gastroenerol. Nutr.* **22**, 180.

- Dhar J, Fichtali J, Skura BJ, Nakai S, Davidson AGF (1996). Pasteurization efficiency of a HTST system for human milk. *J. Food Science* **61**, 569.

- ESPGHAN Committee on Nutrition. Aggett PJ, Haschke F, Heine W, Hernell O, Koletzko B, Launiala K, Reu J, Rubino A, Schöch G, Senterre J & Tormo R (1991). Comments on the content and composition of lipids in infant formulas. *Acta Paediatr. Scand*. **80**, 887.

- FAO/WHO Expert Committee (1994). Fats and oils in Human Nutrition. Food and Nutrition Paper 57.

- Fidler N, Sauerwald TU, Demmelmair H, Koletzko B (2001). Fat content and fatty acid composition of fresh, pasteurized or sterilized human milk. *Adv. Exp. Med. Biol.* **501**, 485.

- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957). A Simple Method For The Isolation And Purification Of Total Lipides From Animal Tissues. *Biol. Chem.* **226**, 497.

- Genzel-Boroviczeny O, Wahle J, Koletzko B (1997). Fatty acid composition of human milk during the 1st month after term and preterm delivery. *Eur. J. Pediatr.* **156**, 142.

- Glew RH, Herbein JH, Moya MH, Valdez JM, Obadofin M, Wark WA, VanderJagt DJ (2006). Trans fatty acids and conjugated linoleic acids in the milk of urban women and nomadic Fulani of northern Nigeria. *Clin. Chim. Acta* **367**, 48.

- Golay PA, Dionisi F, Hug B, Giuffrida F, Destaillats F (2006). Direct quantification of fatty acids in dairy powders with special emphasis on trans fatty acid content. *Food Chem.* **101**, 1115.

- González-Corbella MJ, Tortras M, Castellote-Bargallo AI, López-Sabater MC (1999). Retinol and alpha-tocopherol in infant formulas produced in the EEC. *Food Chem.* **64**, 1.

- Griinari JM, Corl BA, Lacy SH, Chouinard PY, Nurmela KVV, Barman DE (2000). Conjugated Linoleic Acid Is Synthesized Endogenously in Lactating Dairy Cows by {Delta}9-Desaturase. *J. Nutr.* **130**, 2285.

- Hanna N., Ahmed K, Anwar M, Petrova A, Hiatt M, Hegyi T (2004). Effect of storage on breast milk antioxidant activity. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal* **89**, F518.

- Heil SH, Hungund BL, Zheng ZH, Jen KLC, Subramanian MG (1999). Ethanol and lactation: effects of milk lipids and serum constituents. *Alcohol* **18**, 43.

- Henderson TR, Fay T, Hamosh M (1998). Effect of pasteurization on long chain polyunsaturated fatty acid levels and enzyme activities of human milk. *J. Pediatrics* **132**, 876.

- Horwitz W (1982). Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. *Anal. Chem.* **54,** 67A.

- Innis SM (2003). Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J. Pediatr*. **143**, S1-S8.

- Ip C, Singh M, Thompson HJ, Scimeca JA (1994). Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res*. **54**, 1212.

- Jahreis G, Fritsche J, Möckel P, Schöne F, Möller U, Steinhart H (1999). Conjugated linoleic acid in milk fat: High variation depending on production system. *Nutr. Res.* **10**, 1541.

- Jensen RG (1999). Lipids in human milk. *Lipids* **34**, 1243.

- Jiménez R (2001). Lactancia materna. En: *Tojo R, ed. Tratado de Nutrición Pediátrica*. Ediciones Doyma SL, Barcelona, 377-386.

- Jorgensen MH, Hernell O, Hughes E, Michaelsen KF (2001). Is there a relation between docosahexaenoic acid concentration in mothers' milk and visual development in term infants? *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **32**, 293.

- Klee MS, Blumberg LM (2002). Theoretical and Practical Aspects of Fast Gas Chromatography and Method Translation. *J. Chromatogr. Sci.* **40**, 234.

- Koletzko B, Rodríguez-Palmero M (1999). Polyunsaturated fatty acid in human milk and their role in early infant development. J. Mammary Glan. Biol. *Neoplasia* **4**, 269.

- Koletzko B, Rodríguez-Palmero M, Demmelmair H, Fidler N, Jensen R, Sawerwald T (2001). Physiological aspects of human milk lipids. *Early Hum. Dev.* **65** S3.

- Koletzko B, Thiel I, Abiodun PO (1992). The fatty acids composition of human milk in Europe and Africa. *J. Pediatr.* **120**, S62-S70.

- Kramer JKG, Cruz-Hernandez C, Deng Z, Zhou J, Jahreis G, Dugan MER (2004). Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 1137S.

- Kramer JKG, Cruz-Hernández C, Zhou J (2001). Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **103**, 594.

- Kramer JKG, Fellner V, Dugan MER, Sauer FD, Mossoba MM, Yurawecz MP (1997). Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids* **32**, 1219.

- Lammi-Keefe CJ (1995). Vitamins D and E in human milk. En Jensen RG ed. *Handbook of milk composition.* Academic Press, San Diego.

- Lee KN, Kritchevsky D, Pariza MW (1994). Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* **108**, 19.

- Lepage G, Roy CC (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.* **27**, 114.

- Li Y, Watkins BA (1998). Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce ex vivo prostaglandin E2 biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids. *Lipids* **33**, 417.

- Loor JJ, Lin X, Herbein JH (2003). Effects of dietari cis 9, trans 11-18:2, trans 10, cis 12-18:2, or vaccenic acid (trans 11-18:1) during lactation on body composition, tissue fatty acid profiles, and litter growth in mice. *Br. J. Nutr.* **90**, 1039.

- López-López A, Castellote-Bargalló AI, López-Sabater MC (2001). Comparison of two direct methods for the determination of fatty acids in human milk. *Chromatographia* **54,** 743.

- López-López A, López-Sabater MC, Campoy-Folgoso C, Rivero-Urgell M, Castellote-Bargalló AI (2002). Fatty acid and sn-2 fatty acid composition in human milk from Granada (Spain) and in infant formulas. *Eur. J. Clin. Nutr*. **56**, 1242.

- Masters N, McGuire MA, Beerman KA, Dasgupta N, McGuire MK (2002). Maternal supplementation with CLA decreases milk fat in humans. *Lipids* **37**, 133.

- Mondello L, Casilli A, Tranchida PQ, Costa R, Chiofalo B, Dugo P, Dugo G (2004). Evaluation of fast gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry in the analysis of lipids. *J. Chromatogr. A*. **1035**, 237.

- Morera S, Castellote AI, Jauregui O, Casals I, López-Sabater MC (2003). Triacylglycerol markers of mature human milk. *Eur. J. Clin. Nutr.* **57**, 1621.

- Park Y, Albright KA, Cai ZY, Pariza MW (2001). Comparison of methylation procedures for conjugated linoleic acid and artifact formation by commercial (Trimethylsilyl)diazomethane. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1158.

- Park Y, Albright KJ, Storkson JM, Cook ME, Pariza MW (1997). Comparison of methylation procedures for conjugated linoleic acid and artifact formation by commercial (Trimethylsilyl)diazomethane. *Lipids* **32**, 853.

- Park Y, McGuire MK, Behr R, McGuire MA, Evans MA, Shultz TD (1999). High-fat dairy product consumption increases delta 9c,11t-18:2 (rumenic acid) and total lipid concentrations of human milk. *Lipids* **34,** 543.

- The United States Pharmacopeia (USP XXIII), Mack Printing, P.A. Easton, (1989), 1711.

- Yamasaki M, Kishihara K, Ikeda I, Sugano M, Yamada K (1999). Dietary conjugated linoleic acid increases immunoglobulin productivity of Sprague-Dawley rat spleen lymphocytes. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76**, 933.

- Lawrence RA (2001). Milk banking: the influence of storage procedures and subsequent processing on immunologic components of human milk. *Adv. Nutr. Res.* **10**, 389.

- Lepri L, del Bubba M, Maggini R, Doncella GP, Galvan P (1997). Effect of pasteurization and storage on some components of pooled human milk. *J. Chromat. B* **704**, 1.

- López-López A, Castellote-Bargallo AI, López-Sabater MC (2001). Comparison of two direct methods for the determination of fatty acids in human milk. *Chromatographia* **54** (11/12), 60.

- Macias C, Schweigert FJ (2001). Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alpha-tocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. *Ann. Nutr. Metab.* **45**, 82.

- Ovesen L, Jakobsen J, Leth T, Reinholdt J (1996). The effect of microwave heating on vitamins B1 and E, and linoleic and linolenic acids, and immunoglobulins in human milk. *Int. J. Food Sci. Nutr.*

- Rodas Mendoza B, Morera Pons S, Castellote Bargalló AI, López-Sabater MC (2003). Rapid determination by reversed-phase high-performance liquid chromatography of vitamins A and E in infant formulas. *J. Chromatogr. A* **1018**, 197.

- Romeu-Nadal M, Morera-Pons S, Castellote AI, Lopez-Sabater MC (2006). Determination of γ and α-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* **1114,** 132.

- Rupérez FJ, Martin D, Herrera E, Barbas C (2001). Chromatographic analysis of α-tocopherol and related compounds in various matrices. *J. Chromatogr. A* **935,** 45.

- Wardell JM, Hill CM, D'Souza SW (1981). Effect of pasteurization and of freezing and thawing human milk on its triglyceride content. *Acta Paediatr. Scand.* **70**, 467.