



CHALMERS

Vitamin- och mineralnehåll i bröstmjök

En metodutveckling och analys av
näringens koppling till allergiutveckling
hos små barn

Kandidatarbete inom Livsmedelsvetenskap

Christoffer Gyllensten

Ellen Olofsson

Erik Nylander

Fredrik Nilsson

Michelle Kha

Tobias Storsjö

Abstract

There has been a remarkable increase in allergy during the last century and many theories have been proposed to explain this issue. The risk of developing allergy has been shown to be significantly lower if the child is raised on a farm. This phenomenon is evaluated by the FARMFLORA birth cohort, which examines families living on a farm and families living in the same rural area but not on a farm. Breastmilk and data of the mothers' diet during breastfeeding were collected. Additionally, the children were examined by a doctor, in order to diagnose allergies.

Since the immune system is developed at an early age, the nutrition content in breastmilk is considered an important factor in allergy development for infants. Studies have indicated that vitamins and minerals affect allergy development. Because of this, the purpose of this bachelor thesis, being part of the FARMFLORA birth cohort, was set to develop methods for evaluating vitamin and mineral content in small samples of breastmilk. Another purpose was to statistically analyze data of the mother's vitamin and mineral intake during breastfeeding in relation to living area and to allergy development of the child.

Methods were developed, in order to study the content of vitamin A and D along with iron, zinc, copper, cobalt, manganese and nickel in breastmilk. The methods used for vitamin extraction were protein precipitation and saponification, followed by hexane extraction. The method used for mineral extraction was microwave digestion. All extracted samples were analysed in HPLC.

Results from the method development indicated that saponification is the superior method for vitamin A analysis, whereas protein precipitation was more suitable for vitamin D analysis. The results also indicated that microwave digestion can be used to quantify the minerals of interest, given that contamination can be avoided.

Simultaneously, the mothers' intake of vitamin and mineral during breastfeeding was tested against living area and allergy development of the child at the age of 36 months. No significance was found. However, further studies are required in order to evaluate the possible connection between allergy and the mother's intake of vitamins and minerals during breastfeeding.

Sammanfattning

En stor ökning av allergi har skett det senaste århundradet och många teorier har lagts fram om bakomliggande orsaker. Risken att drabbas av allergi har visats vara mindre om barnet växer upp på bondgård. En studie som undersöker detta fenomen är Bondgårdsflorastudien, i vilken familjer boende på bondgård och familjer boende på landet men inte på bondgård studeras. I studien har bröstmjolk och data över kostintag och amning samlats in från mammorna. Barnen har dessutom undersökts av läkare med avseende på allergi.

Eftersom immunsystemet utvecklas i tidig ålder tros näringsinnehållet i bröstmjolk vara en viktig faktor för allergiutveckling hos små barn. Vidare har studier indikerat att vitaminer och mineraler kan påverka allergiutveckling. Utifrån detta utvecklades syftet med detta kandidatarbete, som är en del av Bondgårdsflorastudien, till att utveckla laborationsmetoder för att undersöka vitamin- och mineralinnehåll i de små volymer bröstmjolk som finns insamlade. Ett andra syfte var att statistiskt analysera data på mammans vitamin- och mineralintag under amning, för att undersöka eventuell koppling till boendemiljö respektive barnets allergiutveckling.

I projektet utvecklades laborationsmetoder för att studera vitamin A och D samt mineralerna järn, zink, koppar, kobolt, mangan och nickel i bröstmjolk. Metoderna som användes för extraktion av vitaminerna var proteinfällning och saponifiering, följda av hexanbaserad extraktion. För extraktion av mineralerna användes mikrovågsnedbrytning. Samtliga metoder avslutades med analys i HPLC.

Resultat från metodutvecklingen indikerade att saponifiering är en mer optimal metod för analys av vitamin A, jämfört med proteinfällning som i sin tur är lämpligast vid analys av vitamin D. Vidare indikerade resultaten att de undersökta mineralerna troligtvis kan kvantifieras genom mikrovågsnedbrytning, förutsatt att kontaminering kan undvikas.

Parallellt med metodutvecklingen undersöktes om mammans vitamin- och mineralintag under amning var kopplad till boendemiljö respektive allergi hos barnet vid 36 månaders ålder. Dock kunde ingen signifikant skillnad observeras. Vidare studier är nödvändiga för att undersöka den eventuella kopplingen mellan allergi och mammans vitamin- och mineralintag.

Innehållsförteckning

| | |
|---|----|
| 1. Introduktion..... | 1 |
| 1.1 Bakgrund | 1 |
| 1.2 Syfte | 1 |
| 1.3 Metod | 1 |
| 1.4 Avgränsningar | 2 |
| 2. Teori..... | 2 |
| 2.1 Allergi..... | 2 |
| 2.2 Hygienhypotesen | 2 |
| 2.3 Bröstmjölkens näringsinnehåll | 3 |
| 2.4 Vitaminer och mineraler..... | 3 |
| 2.4.1 Vitamin A | 3 |
| 2.4.2 Vitamin D..... | 4 |
| 2.4.3 Järn | 4 |
| 2.4.4 Zink..... | 4 |
| 2.4.5 Koppar | 4 |
| 2.4.6 Kobolt, mangan och nickel | 4 |
| 2.5 Koppling mellan bröstmjölkens näringsinnehåll och mammas näringsintag | 4 |
| 2.6 Koppling mellan mammas kostintag under graviditet och amning respektive allergiutveckling hos barnen..... | 5 |
| 2.7 Koppling mellan allergi och amning | 5 |
| 2.8 Laborationsmetoder..... | 6 |
| 2.8.1 Vitaminanalys | 6 |
| 2.8.2 Mineralanalys | 7 |
| 2.8.3 HPLC..... | 7 |
| 2.8.4 Standarder..... | 7 |
| 2.9 Statistik..... | 8 |
| 2.9.1 Normalitetstest | 8 |
| 2.9.2 t-test samt Levene's test..... | 8 |
| 2.9.3 Mann-Whitney-U's test | 8 |
| 2.9.4 Variationskoefficient | 8 |
| 3. Metodutveckling..... | 9 |
| 3.1 Vitaminanalys..... | 9 |
| 3.1.1 Metodutveckling av vitaminlaborationer | 9 |
| 3.1.2 Resultat | 11 |
| 3.1.3 Diskussion | 12 |
| 3.2 Mineralanalys | 15 |
| 3.2.1 Metodutveckling av minerallaboration | 15 |
| 3.2.2 Resultat | 16 |
| 3.2.3 Diskussion | 18 |
| 4. Statistisk analys av vitamin- och mineralintag kopplat till boendemiljö respektive allergi | 19 |
| 4.1 Insamling av data..... | 19 |
| 4.2 Statistiska metoder..... | 19 |
| 4.3 Resultat..... | 20 |
| 4.4 Diskussion | 20 |
| 5. Slutsats | 22 |
| 6. Referenser | 23 |
| 7. Bilagor..... | I |

1. Introduktion

I detta avsnitt introduceras den teoretiska bakgrund om de områden som berörts i projektet. Vidare presenteras projektets syfte, en översikt av genomförande samt de avgränsningar som gjorts.

1.1 Bakgrund

Under 1900-talet har en ökning av antal allergiska skett (1). Idag är cirka en tredjedel av Sveriges befolkning allergiska och ofta drabbas dessa i tidig ålder, med kvarvarande allergi resten av livet (1,2). En hypotes, hygienhypotesen, säger att exponering av mikroorganismer tidigt i livet påverkar utvecklingen av immunsystemet positivt och minskar därmed risken att utveckla allergi (3,4). Tidigare studier har visat att barn uppväxta på bondgård löper mindre risk att drabbas av allergi jämfört med barn uppväxta på landet, i samma område, men inte på bondgård (1,3,4). Troliga orsaker till detta är bland annat djurkontakt och intag av opastöriserad mjölk (1,3,4). Det har visats att risken att drabbas av astma, hösnuva och eksem, som är symptom för allergi, minskar för barn som tidigt och under en längre tid får vistas i stall eller andra platser med boskap (3,4).

Det här kandidatarbetet ingår i den del av Bondgårdsflorastudien som analyserar om det finns någon koppling mellan allergiutvecklingen hos barn vid tre års ålder och bröstmjölkens innehåll av vitaminer och mineraler en respektive fyra månader efter förlösning. I Bondgårdsflorastudien har bröstmjolk och data över kostintag samt amning samlats in från två grupper av mammor. Den ena gruppen bestående av bondgårdsmammor, mammor boende på bondgård med djurhållning, och den andra bestående av icke bondgårdsmammor, mammor boende på landet men inte på bondgård. Tidigare resultat från Bondgårdsflorastudien har visat att det kan finnas en korrelation mellan allergiutveckling hos barn och mammans fettintag under graviditet och amning (1). Vidare är intressant att studera huruvida även vitamin- och mineralinnehållet är kopplat till allergiutveckling.

1.2 Syfte

Syftet med detta projekt var att utveckla laborationsmetoder för att kunna analysera vitamin- och mineralinnehåll i små volymer bröstmjolk. Detta för att i framtiden kunna tillämpa metoderna vid analys av de små bröstmjölksprover som finns tillgängliga i Bondgårdsflorastudien, för att därefter kunna koppla vitamin- och mineralinnehåll i bröstmjolk till barnens eventuella allergiutveckling. Ett andra syfte i projektet var att analysera data från Bondgårdsflorastudien över mammornas intag av vitaminer och mineraler under amning, för att undersöka huruvida skillnader i dessa kan kopplas till boendemiljö respektive barnets risk att drabbas av allergi.

1.3 Metod

Inledningsvis genomfördes en litteratursökning, för att få teoretisk bakgrund om allergi, hygienhypotesen, bröstmjölkens näringsinnehåll samt vitaminer respektive mineraler och dess koppling till allergi. Vidare undersöktes huruvida bröstmjölkens innehåll speglas av mammans näringsintag, om mammans kost under graviditet och amning påverkar barnens allergiutveckling samt om amning har en positiv eller negativ inverkan på allergiutveckling hos barnen. Litteratursökningen har utförts genom att eftersöka vetenskapliga artiklar om ovan nämnda områden i databaser som PubMed, Google Scholar och Summon. Vidare har innehållet i dessa artiklar analyserats och jämförts med varandra för att skapa en helhetsbild av rådande teorier kring dessa områden och på så vis kunna jämföra erhållna resultat från kostanalysen med tidigare studier.

Laborationsmetoder utvecklades där bröstmjolk och komjolk analyserades med avseende på innehållet av vitamin och mineral. All bröstmjolk som användes i metodutvecklingen var insamlad vid ett och samma tillfälle i januari 2016, från en enskild mamma. Komjölken som användes var producerad av Arla Foods. Laborationsmetoderna som tillämpades var proteinfällning respektive saponifiering följda av hexanbaserad extraktion för vitaminanalysen och mikrovågsnedbrytning för mineralanalysen. Både vitamin- och mineralanalysen avslutades med analys i HPLC.

Data från Bondgårdsflorastudien analyserades med statistiska tester genom att inledningsvis undersöka om data på mammans vitamin- och mineralintag under amning var normalfördelade. Därefter undersöktes huruvida det fanns en koppling mellan vitamin- och mineralintaget samt boendemiljö och

barnets allergi vid 36 månaders ålder. Analysen genomfördes i datorprogrammen Excel version 2013 (Microsoft Corporation, Washington) och SPSS Statistics version 22 (IBM Corporation, New York).

1.4 Avgränsningar

De ämnen som undersöktes i mjölken var vitamin A och D samt mineralerna järn, zink, koppar, kobolt, mangan och nickel på grund av att dessa var intressanta ur allergisynpunkt och/eller på grund av tillgänglig utrustning. Metodutvecklingen av vitaminextraktion begränsades till proteinfällning, saponifiering och hexanbaserad extraktion, då dessa metoder används frekvent inom extraktion av vitamin A och D från serum och livsmedel. Vidare begränsades metodutvecklingen för mineralextraktionen till mikrovågsnedbrytning, som används på avdelningen för livsmedelsvetenskap på Chalmers Tekniska Högskola för denna typ av extraktion. Påföljande analys genomfördes i HPLC för både vitamin- och mineralproverna, då noggrannare analysutrustning inte fanns tillgänglig.

Metodutvecklingen genomfördes med separat insamlad bröstmjolk samt med komjolk från Arla Foods. De tillgängliga bröstmjölksproverna i Bondgårdsflorastudien analyserades inte, då metodutvecklingen av vitamin- och mineralanalyserna resulterade i provvärden med stor varians och därmed ansågs inte metoderna tillräckligt tillförlitliga. Därmed kunde det ursprungliga syftet inte genomföras, vilket var att först analysera och därefter koppla vitamin- och mineralinnehåll i mammans bröstmjolk till barnets allergi.

All data som studerats i projektet kommer från Bondgårdsflorastudien, där 65 mammor boende i Skaraborg på bondgård (n=28) respektive boende på landet men inte på bondgård (n=37) deltagit. Data på allergiutveckling hos dessa mammors barn var insamlad både vid 18 och 36 månaders ålder, varpå en kumulativ diagnos även fanns tillgänglig. I detta projekt har enbart allergidiagnos vid 36 månader studerats, då denna bättre speglar allergi senare i livet. På grund av projektets begränsande tid utfördes ingen analys av korrelation mellan de studerade variablerna.

2. Teori

I detta avsnitt behandlas teori om allergi och dess möjliga orsaker samt bröstmjölakens näringsinnehåll. Därefter följer de olika laborationsmetoder som använts samt statistiska metoder för analys av data från Bondgårdsflorastudien.

2.1 Allergi

Allergi uppkommer då kroppens immunsystem överreagerar på främmande ämnen i omgivningen, även kallat allergener. Det finns två typer av allergier, IgE-medierad allergi och icke IgE-medierad allergi. Vid IgE-medierad allergi bildas IgE-antikroppar som aktiverar mastceller och basofiler, vilka är två typer av vita blodkroppar. Dessa frisätter inflammatoriska molekyler som skapar allergiska symptom (5). Symptomen, såsom astma och eksem, uppkommer vanligen inom två timmar efter kontakt med allergenen (5). Vid icke IgE-medierad allergi produceras inga IgE-antikroppar, utan immunsystemet använder vita blodkroppar och andra celler för att framkalla inflammation i kroppen och därmed allergiska symptom, vilka liknar de som uppstår för IgE-medierad allergi (2).

Orsaken till allergiutveckling är ännu okänd, men en vanlig faktor är ärftlighet (5). Vad föräldern är allergisk mot avgör dock inte vad barnet utvecklar för typ av allergi (5). Det finns flera olika typer av allergener, såsom pollen, kvalster och mat (2) och då endast mat innehållande protein (5). Barn utvecklar ofta matallergi i tidig ålder, särskilt mot mjölkprotein och ägg (5). Sådan allergi tenderar dock att försvinna efter några år, medan allergi mot nötter och fisk kvarstår livet ut. Dessutom brukar små barn utveckla eksem som även den avtar i takt med att barnet växer upp (6).

2.2 Hygienhypotesen

Under de senaste decennierna har det skett en ökning av allergi i västvärlden som tros bero på urbanisering och en minskning av lantliga levnadsmiljöer (7). Det har observerats att risken att utveckla allergi i Västeuropa är mindre hos bondgårdsfamiljer jämfört med icke bondgårdsfamiljer (1,8). Ytterligare bidragande faktorer till den lägre allergiutvecklingen i bondgårdsmiljön är intag av

opastöriserad mjölk, tidig kontakt med boskap och dess foder samt kontakt med andra bondgårdsdjur (9–12).

Utöver boendemiljön har andra faktorer med avseende på familjesituation observerats minska risken för allergiutveckling. En av dessa är ett större antal syskon, där äldre syskon har störst påverkan (9). En skyddande effekt har även upptäckts hos barn som tidigt börjat gå till dagis, men endast för barn utan syskon (13). I samma studie har det observerats att allergi är vanligare hos familjer med diskmaskin jämfört med familjer som handdiskar. Då handdiskning är en mindre effektiv rengöringsmetod än diskmaskin tros det ge tolerans mot mikroorganismer. Den skyddande effekten förstärktes om barnen konsumerade inlagd mat eller mat köpt direkt från bondgårdar (13). I en annan studie har det observerats att barn till föräldrar som rengör barnets napp genom att suga på den innan barnet får den, löper mindre risk för allergiutveckling (14). Detta på grund av att barnets orala flora förändras då föräldrarnas orala bakterier överförs. De orala bakterierna kan även överföras vid munkontakt.

Den gemensamma nämnaren för ovan nämnda faktorer är exponering av mikroorganismer, och dess inverkan på allergiutveckling är sammanfattad i den så kallade hygienhypotesen (3,4). Bakteriefloren utvecklas mycket fort i tidig ålder och detta antas bland annat vara anledningen till att den största effekten märks om exponeringen sker under graviditeten samt under de första åren i livet (9,11). Den skyddande effekten har observerats upp till sex års ålder (11).

2.3 Bröstmjölakens näringsinnehåll

Bröstmjölk har flera olika beståndsdelar såsom mikrober, proteiner, lipider, kolhydrater, vitaminer, mineraler, hormoner och antikroppar (7,15–17). Flera av dessa hjälper till att bygga upp barnets immunsystem och skydda barnet från infektioner (15,17). Ämnens koncentrationer skiljer sig åt beroende på flera olika faktorer såsom tidpunkt på dagen, tid efter förlossningen och om provet tas innan eller efter en enskild amning (17). Andra faktorer är boendeplats, årstid, mammans kosthållning och hur lång tid som gått sedan senaste amningstillfälle (7,17–19).

Bröstmjölk delas in i flera olika typer, vilka beror på tidpunkt vid varje enskilt amningstillfälle samt hur lång tid som gått sedan förlossningen. Den första mjölken efter förlossningen kallas råmjölk och innehåller en extra hög halt av olika ämnen som hjälper till att bygga upp barnets immunsystem (15,17). Ungefär fem veckor efter förlossningen anses mjölken vara helt mogen och därefter är sammansättningen relativt konstant i förhållande till tiden sedan förlossningen (15). Benämningen på mjölken mellan råmjölken och den mogna mjölken är övergångsmjölk, som är ett mellanting mellan råmjölken och den mogna mjölken (17). Den första bröstmjölken barnet får i början av amningstillfället kallas förmjölk (17). Då barnet ammas sker en gradvis förändring i bröstmjölakens sammansättning, vilket innebär att den sista mjölken, eftermjölken, har en avsevärt annorlunda sammansättning än förmjölken (17).

2.4 Vitaminer och mineraler

I detta avsnitt presenteras teori om de vitaminer och mineraler som studerats i projektet.

2.4.1 Vitamin A

Vitamin A är ett fettlösligt vitamin som ingår i ämnesgruppen retinoider. Det finns många olika varianter av retinoider, men grundformerna är retinol, retinal och retinoinsyra (7,20). I kroppen lagras retinol i levern i en esterform, retinylester, som sedan släpps ut i blodet (21). I blodet kan sedan retinol oxideras till retinal och slutligen till retinoinsyra, som är den aktiva formen. Minskade koncentrationer av retinoinsyra har visats leda till minskad utsöndring av IL-2, en signalmolekyl i immunsystemet som reglerar aktiviteten hos T-celler (21). Dessutom har studier om inverkan av brist på vitamin A hos barn visat tecken på att kroppen mer aggressivt reagerar på främmande antigen, vilket i sin tur leder till en allergisk reaktion (22,23). Det finns även tecken på att närvaro av vitamin A minskar produktionen av cytokiner, vilket innebär att höga koncentrationer av vitamin A leder till ett mindre responsivt immunsystem (24).

2.4.2 Vitamin D

Vitamin D är ett fettlösligt vitamin som finns i formerna vitamin D₂ och vitamin D₃, även kallade ergokalciferol respektive kolekalciferol (7,25,26). Båda formerna av vitamin D hydroxyleras först till 25-hydroxyvitamin D i levern och sedan i njurarna till den biologiskt aktiva formen 1,25-dihydroxyvitamin D (7). Vid undersökning av vitamin D i kroppen är det vanligast att mäta koncentrationen av 25-hydroxyvitamin D, lagringsformen av vitamin D, i blodet eftersom dess koncentration är relativt konstant över tiden (26,27). Brist på vitamin D har kopplats ihop med en ökad risk för flera olika sjukdomar, däribland autoimmuna sjukdomar såsom allergi (25–29). Dessutom har tidigare studier indikerat att koncentrationen vitamin D i kroppen har en betydande men komplex roll i regleringen och funktionen av immunsystemet (26,27).

2.4.3 Järn

Järn är viktigt hos nyfödda för en god fysisk utveckling (7). Mineralet är nödvändigt i många biokemiska reaktioner, däribland vid transporten av syre, i elektrontransportkedjan samt för reglering av celltillväxt och celldifferentiering (30). Järn är kopplat till utvecklingen av immunsystemet och är väsentligt för immuncellsproliferation (31). I studier har järnbrist kopplats till mindre bildning av T-celler respektive minskad aktivitet hos NK-celler (30,31). I kroppen lagras järn främst bundet till proteinet ferritin och komplexet hemosiderin och regleras därifrån till hemprotein, såsom hemoglobin, myoglobin och cytokromer (7).

2.4.4 Zink

Zink är en viktig spårmetall som är nödvändig för fysisk tillväxt samt har stor inverkan på exempelvis nerv-, reproduktions-, skelett- och immunsystem (7,32,33). Zinkbrist har visats ge en sämre aktivitet hos T-celler och NK-celler samt en försämrad fagocytos hos neutrofiler och makrofager (32). Mineralet verkar även som kofaktor i flertalet enzym som indirekt påverkar immunsystemet (32). I kroppen förekommer zink exempelvis i serum, bundet till protein som albumin och transferrin (32).

2.4.5 Koppar

Koppar är essentiellt för att immunsystemet ska fungera normalt (34). Studier som undersökt hur kopparbrist påverkar immunsystemet fann att det specifika immunsystemet blir mindre effektivt och antalet antikroppar i blodet minskar (34). Antalet neutrofiler i blodet blir också färre och med en lägre aktivitet (34).

2.4.6 Kobolt, mangan och nickel

Kobolt har visats påverka immunsystemet negativt genom att bland annat aktivera TLR4 (toll-like receptor 4), vilken vidare kan aktivera T-celler och leukocyter som leder till inflammation (35). Däremot är mangan ett livsnödvändigt mineral och är viktig för barns utveckling (36). Behovet av nickel är inte fastställt, dock kräver vissa bakterier i människors tarmar nickel (37). En del studier tyder på att nickelbrist kan leda till att tarmens bakterieflora störs och inte utvecklas normalt (37). Dessa störningar kan leda till problem med immunsystemet (38).

2.5 Koppling mellan bröstmjölkens näringsinnehåll och mammans näringsintag

Som beskrivet i avsnitt 2.3, skiljer sig bröstmjölkens näringsinnehåll och producerad volym åt mellan individer. Likaså är dessa faktorer beroende av tidpunkt under amningsperiod, vilket innebär skillnader mellan förmjolk och eftermjolk samt mellan råmjolk, övergångsmjolk och mogen mjolk. Till viss del kan även skillnader i vitamin- och mineralinnehåll påverkas av mammans näringsstatus och kostintag (39,40). Denna inverkan varierar dock mellan de olika näringsämnena (39), och i de flesta fall påverkas inte koncentrationen av de olika ämnena i bröstmjölken markant av en eventuell näringsbrist hos mamman (40).

Fettlösliga vitaminer, såsom vitamin A och D, är ämnen vars koncentration i bröstmjölken påverkas av mammans näringsstatus (7,41). Den främsta källan genom vilken vitamin D kan erhållas är solenergi, medan endast låga doser kan tas upp via kosten (7). Vid mindre tillgång på solenergi, såsom vid mörkare årstider, blir därför kostintaget en mer betydande källa, liksom den mängd av vitaminet som finns lagrad i mammans fettvävnader (7,42). Flertalet studier har visat på en signifikant skillnad i bröstmjölkens koncentration av vitamin D hos de mammor som tagit tillskott eller vistats i områden med ökad

exponering för solenergi (7,40,43). På motsvarande sätt har även skillnader observerats i mjölkens vitamin A-koncentration hos välnärda respektive undernärda mammor (7,44). Studier har visat att tillskott av vitamin A ger förhöjda koncentrationer i bröstmjölken, och därmed påverkas mjölkens koncentration sannolikt av mammans kostintag (7,44). Kortvarig brist på vitamin A kan dock kompenseras genom reglering, då vitaminet finns lagrat i mammans lever (40,44).

Vad gäller bröstmjölakens koncentration av mineraler är mammans näringsintag inte en lika bidragande faktor (39). I flera studier har inga tydliga kopplingar observerats mellan intag av mineralerna järn, zink och koppar och dess koncentrationer i bröstmjölken (45–48). Detta förklaras genom att regleringen av dessa mineraler sker genom aktiv transport i bröstkörtlarna och därmed inte avgörs av intag via kosten (45–48). I vissa studier, där skillnader observerats i bröstmjölakens koncentration av mineralerna, diskuteras dock inverkan av näringsintag och boendeplats (45). Detta är emellertid något som bör studeras ytterligare för att några slutsatser ska kunna dras kring eventuell påverkan (45).

Likt järn, zink och koppar regleras koncentrationen mangan troligtvis genom aktiv transport i bröstkörtlarna (49). Viss variation i bröstmjölakens koncentration av mangan har dock observerats och därför kan även andra faktorer inverka (40,49).

Ett mindre underlag finns om kopplingen mellan mammans näringsintag relativt bröstmjölakens koncentration av kobolt och nickel. Skillnader i mjölkens koncentration har observerats för kobolt, både mammor och studier emellan (49). Dessa skillnader kan dock bero på såväl koppling till mammans näringsintag som på brister i försöksmetod (49). Uppmätta skillnader i mjölkens koncentration av nickel har inte heller någon tydlig orsak (50). Intag av livsmedel och vatten diskuteras dock som potentiella förklaringar (50), vilket skulle tyda på att det finns en koppling mellan mammans näringsintag och bröstmjölakens koncentration av nickel.

2.6 Koppling mellan mammans kostintag under graviditet och amning respektive allergiutveckling hos barnen

Mammans kosthållning under graviditet och amning kan ha en betydande effekt för barnets risk att utveckla allergi. Flera studier visar på att ett högt intag av vitamin D under graviditeten är associerat med en lägre risk för såväl astma som väsande andning hos barnet (51–54). Detsamma gäller för höga kostintag av fisk och ämnena vitamin E och zink under graviditeten (53–55). En annan studie har dock inte funnit någon koppling mellan någon form av allergi och intag av varken vitamin E och zink (56). Ingen koppling har heller observerats mellan väsande andning och dessa två ämnen samt vitamin A och D (57).

Ett reducerat järnintag har kopplats samman med minskad risk för väsande symptom för barn (58). Samtidigt har ett ökat kopparintag kopplats ihop med minskad risk för eksem, väsande andning och allergiska sjukdomar (56). Ett högt intag av mangan har i en studie associerats med en mindre risk för väsande symptom (57). I samma studie kunde dock inga kopplingar mellan väsande andning och koppar eller järn observeras.

Hög konsumtion av citrusfrukter och vitamin C under graviditet kan orsaka en högre risk för allergiutveckling, vilket även ett högt intag av selleri och rå paprika associerats med (52,54,55). Det finns dock studier som tyder på att höga intag av vitamin C kan minska risken för väsande andning (56,57). Höga intag av margarin, smör och oljor samt kost innehållande omega-6 fleromättade fettsyror och omega-9 enkelomättade fettsyror har visats vara associerade med en ökad risk för allergi, både i Bondgårdsflorastudien och i andra studier (1,55,59).

2.7 Koppling mellan allergi och amning

Amning har sedan 1800-talet minskat (60,61). Under denna tidsperiod har dessutom förekomsten av allergi och astma ökat (62,63). Tidigare resultat i Bondgårdsflorastudien har funnit att både barn som ammas exklusivt och delvis hade lägre risk att utveckla allergi jämfört med barn som inte ammas (1).

Utöver tidigare resultat i Bondgårdsflorastudien har andra studier funnit antydningar om att risken att drabbas av astma minskar om barnet ammas (64–66). Det finns dock data som tyder på att exklusiv amning inte påverkar risken att drabbas av astma (67). I en studie observerades att personer som ammas

exklusivt hade lägre risk att drabbas av astma innan sju års ålder, men större risk efter sju års ålder (68). En annan studie fann att risken för astma möjligen ökade om barnet ammat exklusivt (69).

Förutom att studier har funnit att det finns ökad risk att drabbas av astma om barnet ammas, finns det en studie som har funnit en ökad risk om barnet ammat exklusivt (70). I samma studie observerades en ökad risk för eksem för varje månad som barnet ammat (70). En annan studie observerade att exklusiv amning de första fyra månaderna ökade risken för eksem om barnets föräldrar inte led av eksem (71). I de fall där något av, eller båda, barnets föräldrar hade eksem observerades ingen ökad risk. I motsats till detta har dock observerats att barn som ammat hade lägre risk att drabbas både av eksem och matallergi (72).

2.8 Laborationsmetoder

I detta avsnitt presenteras de metoder som utvecklats för analys av vitaminer och mineraler i bröstmjolk. Avsnittet inleds med de metoder som använts i vitaminlaborationerna, proteinfällning respektive saponifiering följt av hexanbaserad extraktion, och den metod som använts i minerallaborationerna, mikrovågsnedbrytning. Därefter följer användandet av HPLC och standarder, som tillämpats i samtliga laborationer.

2.8.1 Vitaminanalys

Vitamin A och D är båda fettlösliga vitaminer som ofta är svåra att detektera i biologiska vätskor och livsmedel på grund av den komplexa sammansättningen hos strukturerna som vitaminerna är bundna till (73,74). De är starkt lipofila och har hög affinitet för vitaminbindande proteiner (74). De är dessutom känsliga för ökad temperatur, ljus, syre och extremt pH (73). Två vanliga metoder för att frigöra vitaminerna vid analys i biologiska vätskor och livsmedel är proteinfällning och saponifiering (74–76). Proteinfällning är vanligast vid analys av biologiska vätskor som serum och plasma, medan saponifiering används vid analys av livsmedel (75,76). När vitaminerna har frigjorts ur proteinerna och hamnat i vätskefasen kan dessa extraheras ytterligare i en hexanbaserad extraktion (76–79).

Proteinfällning

I proteinfällning blandas provet med vattenbaserade eller organiska lösningsmedel för att fälla ut proteinerna genom denaturering där de vanligaste utfällningsmedlen är acetonitril, metanol eller en blandning av dessa två lösningsmedel (76,78). Därefter blandas provet innan det centrifugeras (78,80). För att maximera proteinfällningen kan ett inkuberingssteg läggas till innan provet centrifugeras, vilket ökar frisättningen av vitaminerna (80). Då centrifugeringen sker bildar de utfällda proteinerna en pellet och vitaminerna, som nu är frigjorda från proteinerna, hamnar i vätskefasen (76). Vätskefasen, även kallad supernatanten, kan extraheras med hjälp av hexan, alternativt kan supernatanten extraheras direkt utan någon tillsats (76,78,79). En nackdel med proteinfällning är att extraktet inte blir helt rent och orenheterna kan därmed försvåra analysen av vitaminerna (76).

Saponifiering

I saponifiering bryts esterbindningen mellan hydroxylgruppen i vitaminerna och karboxylgruppen i proteinerna genom basisk hydrolys för att möjliggöra analys av vitamininnehållet (76). Detta sker genom att blanda provet med kaliumhydroxid som kan vara antingen alkohol- eller vattenbaserad (76). Vanligen används vattenbaserad kaliumhydroxid då den är mer stabil än den alkoholbaserade (77). Alkoholbaserad kaliumhydroxid föredras dock vid analys av mejeriprodukter eftersom den löser sig väl med fett vilket förhindrar emulsionbildning (77). I vissa fall tillsätts även antioxidanter i form av askorbinsyra för att minska instabiliteten hos vitaminerna och skydda dem mot oxidation och annan nedbrytning (75). Saponifieringen utförs i rumstemperatur över natten under omrörning, alternativt vid en högre temperatur, runt 80°C, i några få timmar (76). En lång reaktionstid innebär dock att oxidationen av vitaminerna ökar, vilket minskar vitamininnehållet i provet (81). Isomerisering av vitamin D till ett förstadie av vitamin D sker i värme och därför föredras kall saponifiering vid analys av vitamin D (75,77). Studier har visat att mer vitamin D frigörs om reaktionstiden och koncentrationen av kaliumhydroxid ökas (75). Efter saponifieringen hamnar vitaminerna i den övre fasen av lösningen, vilken sedan extraheras med hjälp av hexan (77).

Hexanbaserad extraktion

Hexan är ett mättat kolväte och används som organiskt lösningsmedel (82). Dess opolära karaktär gör det användbart vid extraktion av andra opolära ämnen, såsom vitamin A och D. Hexanbaserad extraktion kan utföras med ren hexan eller i kombination med andra organiska lösningsmedel, exempelvis diklormetan (83,84), vilket påverkar lösningsmedlets polaritet (85).

Extraktionen utförs genom att hexan, alternativt hexan:diklormetan, tillsätts en lösning ur vilken det opolära ämnet önskas erhållas (83,84). De båda vätskorna blandas genom att provet skakas kraftigt, till exempel genom att vortexas (83). Det undersökta ämnet förflyttas då till hexanfasen. Efter centrifugering av provet erhålls faser av de olika vätskorna i lösningen (84). Den övre fasen, innehållande det undersökta ämnet löst i hexan, förflyttas till ett nytt rör (83,84). Extraktionsproceduren upprepas en eller fler gånger för att erhålla en större andel av ämnet från det ursprungliga provet (83,84). Den slutliga volymen hexanlösning kan därefter indunstas för vidare analys av ämnet (83,84).

2.8.2 Mineralanalys

Mineraler är vattenlösliga och kan ingå i olika enzymssystem (86). Mineraler är mycket stabila och bryts inte ned i sin fria jonform av varken värme eller ljus. Därför behöver inga speciella åtgärder, såsom kylning eller mörker, vidtas för att förhindra nedbrytning av mineralerna.

Mikrovågsnedbrytning

För att bryta ner bröstmjölksproverna i mindre komponenter och förstöra det organiska materialet, och därmed frisätta mineralerna, behandlas proverna med starka syror och hög temperatur (87). Det organiska materialet måste förstöras helt för att mineralerna ska kunna analyseras, något som är svårt i prover innehållande mycket proteiner, såsom mjölk (87). Proverna körs därför tillsammans med starka syror i en mikrovågsugn, som kan programmeras att köra olika temperaturprogram efter behov. Prover överförs till vialer, varav en kräver en större totalvolym vätska än de andra, då en mätsticka är förankrad till denna. Mätstickan används för att mäta trycket och temperaturen i vialerna för att minska explosionsrisken i mikrovågsugnen.

PAR och PDCA

PAR (4-(2-pyridylazo)resorcinol) och PDCA (pyridin-2-6-dikarboxylsyra.) kan användas vid analys av järn, zink, koppar, kobolt, mangan och nickel. PAR bildar färgstarka kelater med metalljonerna, som möjliggör detektion av dessa även vid låga nivåer (88–90). PDCA kan användas för att separera metalljonerna i lösning. Detta gör att även metalljoner som är mycket lika, såsom Fe^{2+} och Fe^{3+} , kan kvantifieras separat (90).

2.8.3 HPLC

HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) är en separations- och mängdanalysmetod som idag används frekvent för att kvantifiera ämnen. HPLC består av två faser, en mobil och en stationär fas (91). Den stationära fasen bestäms beroende på vad som ska analyseras. Vid analys av ett prov innehållande joner används en jonbindande fas, medan en opolär fas används vid analys av ett opolärt ämne (92). Provet som ska analyseras placeras i den mobila fasen och pressas igenom den stationära fasen under högt tryck (92). De olika ämnena i provet kommer därmed att separeras från varandra och färdas igenom den stationära fasen (92). Ämnena färdas med olika hastigheter då de interagerar med den stationära fasen med olika styrkor och får därigenom olika retentionstider, tiden det tar för ämnet att färdas igenom kolonnen (92). Kopplad till HPLC:n sitter en detektor, som består av en ljuskälla och en ljusdetektor (92). När ett ämne passerar framför denna detektor kommer ämnet att absorbera ljuset och ge upphov till en absorptionstopp. Denna absorptionstoppsarea är proportionell mot mängden av ämnet, vilket då kan kvantifieras (92). För att med större säkerhet validera att ämnet som detekterats är det intressanta, kan en masspektrometer kopplas till HPLC:n (93).

2.8.4 Standarder

För att tyda resultaten i det kromatogram som erhålls vid analys av ett prov i HPLC används interna och externa standarder. Dessa underlättar identifiering av de olika absorptionstopparna i kromatogrammet samt möjliggör beräkningar av ett undersökt ämnes ursprungliga koncentration i provet.

En extern standard består av samma ämne som undersöks i provet (94). Då provet analyseras i HPLC:n injiceras i en annan vial en känd koncentration av den externa standarden (94). I kromatogrammet för standarden erhålls ämnets retentionstid och area. Med hjälp av retentionstiden kan motsvarande topp identifieras i kromatogrammet för det undersökta provet. Ämnets ursprungliga koncentration i provet beräknas genom erhållna areor, enligt ekvation (a).

$$C_{\text{undersökt ämne (ursprunglig)}} = \frac{\frac{A_{\text{undersökt ämne (uppmätt)}}}{A_{\text{extern standard (uppmätt)}}} \times m_{\text{extern standard (tillsatt)}}}{V_{\text{undersökt prov (ursprunglig)}}} \quad (\text{a})$$

För att kompensera för eventuell förlust i utbyte efter genomförd laboration kan även en intern standard användas, vilken tillsätts i ett tidigt skede i extraktionen (95). Den interna standarden bör ha mycket liknande egenskaper som det undersökta ämnet, men inte finnas naturligt i provet (94). Detta ämne ska inte heller reagera med ett annat ämne i provet (94). Då utbytet för det undersökta ämnet antas vara lika stort som för standarden, kan det analyserade ämnets ursprungliga koncentration i provet beräknas utifrån mängd tillsatt intern standard, enligt ekvation (b).

$$C_{\text{undersökt ämne (ursprunglig)}} = \frac{\frac{A_{\text{undersökt ämne (uppmätt)}}}{A_{\text{intern standard (uppmätt)}}} \times m_{\text{intern standard (tillsatt)}}}{V_{\text{undersökt prov (ursprunglig)}}} \quad (\text{b})$$

2.9 Statistik

I detta avsnitt presenteras de olika statistiska tester och figurer som användes i den statistiska analysen av vitaminer och mineraler kopplat till boendemiljö respektive barnets allergiutveckling.

2.9.1 Normalitetstest

Histogram är ett vanligt sätt att undersöka normalitet, det vill säga om dataserien är normalfördelad. Ett histogram är ett stapeldiagram som delar upp kontinuerlig data i intervaller och gör staplar av dessa som plottas efter varandra. Om histogrammet är klockformat är dataserien sannolikt normalfördelad. En annan metod att grafiskt avgöra om data är normalfördelad är att plotta den längs en normalfördelad trendlinje, om data avviker mycket från linjen är den antagligen inte normalfördelad (96). Ytterligare en metod att avgöra om data är normalfördelad är att använda något av de olika normalitetstester som finns, till exempel, Shapiro-Wilks test (97).

2.9.2 t-test samt Levene's test

Ett t-test utförs på två normalfördelade dataserier för att testa huruvida de är signifikant åtskilda eller om de är tillräckligt lika för att kunna anses härstamma från samma population (98,99). Testet kan justeras på olika sätt beroende på om de skattade varianserna kan anses vara lika eller skilda, vilket kan testas med Levene's test. Levene's test är ett test för likadana varianser, det vill säga ett test för att avgöra huruvida två normalfördelade stickprov har samma varians (97,100). Det är dock inte lämpligt för stickprov som har flera extremvärden, då testet påverkas av dessa (97).

2.9.3 Mann-Whitney-U's test

Mann-Whitney-U's test kan användas istället för t-testet då normalfördelning inte kan antas (100). I Mann-Whitney-U's test storleksordnas samtliga värden från båda stickproven och värdena får en rang utefter placeringen (100). Stickprovernas ranger summeras sedan och testas mot varandra för att se om de kan anses signifikant skilda (100).

2.9.4 Variationskoefficient

Variationskoefficienten, ofta kallad RSD (relativ standardavvikelse, från engelskans "relative standard deviation"), skalar standardavvikelsen efter medelvärdet genom att ta kvoten av medelvärdet och standardavvikelsen, följaktligen ger stor spridning på data ett stort RSD (99). Därefter kan talet multipliceras med 100 för att ge ett tal i procentform. Den här omskalningen innebär att det blir lättare

att jämföra standardavvikelser mellan olika variabler och är den beräkning av variation som valts övergripande i detta projekt.

3. Metodutveckling

De olika metodutvecklingarna för analys av vitaminer och mineraler i bröstmjök utfördes på liknande vis och genomfördes parallellt under projektets gång. Metodutvecklingen inleddes med en introduktion till de metoder som redan fanns tillgängliga på avdelningen, för att analysera ämnena ifråga. Då dessa metoder krävde större provmängder än vad som fanns tillgängligt krävdes omarbetning av laborationsgenomförandet. Med hjälp av resultat från litteratursökning, samt konsultation av handledare och forskningsingenjör på avdelningen, sammanställdes preliminära laborationshandledningar för de olika analyserna. Efter genomförda laborationer, och analys av resultat, gjordes lämpliga justeringar och metodernas användbarhet diskuterades.

Nedan presenteras först metodutvecklingen av vitaminanalysen med resultat samt efterföljande diskussion, följt av metodutvecklingen av mineralanalysen med samma upplägg.

3.1 Vitaminanalys

I detta avsnitt presenteras metoderna som använts för att analysera vitamininnehållet i mjölken, följt av resultat och diskussion för dessa analyser.

3.1.1 Metodutveckling av vitaminlaborationer

Den laborationsmetod som tidigare använts på avdelningen för att undersöka vitamininnehåll var anpassad för blodserum och bestod av proteinfällning följt av hexanbaserad extraktion. Genom en artikelsökning på laborationsmetoder undersöktes därför inledningsvis om denna metod var lämplig även för analys av bröstmjök, vilken innehåller lägre koncentrationer av vitaminerna ifråga, jämfört med blodserum. Utifrån funna artiklar (83,84), och med hjälp av handledare och forskningsingenjör, utarbetades två preliminära laborationshandledningar. Metoderna, som finns beskrivna i teoriavsnittet, var proteinfällning respektive saponifiering följda av hexanbaserad extraktion. Tillvägagångssättet för utvecklingen av de olika metoderna är beskrivna nedan och en översikt finns tillgänglig i tabell 3.1-3.2.

Proteinfällning och hexanbaserad extraktion

En första laboration inleddes utifrån den preliminära laborationshandledningen, se laboration 1 i Bilaga A, där fyra prover av 1 mL bröstmjök fälldes med 2 mL acetonitril. De två interna standarderna ergokalciferol och retinylacetat tillsattes, 10 respektive 50 µL med koncentrationen 10 ppm (µg/mL), varpå rören vortexades och centrifugerades. Den erhållna supernatanten användes för hexanbaserad extraktion, där 3 mL hexan:diklormetan (4:1 volym/volym) tillsattes. Efter att ha vortexat och centrifugerat lösningen fördes den översta av de tre erhållna faserna över till ett nytt rör. Extraktionen upprepades ytterligare en gång och rören innehållande de översta faserna indunstades därefter med kvävgas. 100 µL metanol tillsattes inför analys i HPLC (injektionsvolym: 20 µL, flöde: 0,5 mL/min, tryck: 84 bar, körtid: 20 min, mobil fas: 97% metanol, 3% vatten, stationär fas: C₁₈-kolonn, detektionsvåglängd: 265/300 nm). Externa standarder med ergokalciferol, kolekalciferol, retinylacetat samt retinol analyserades samtidigt i HPLC. Utifrån resultaten beräknades utbytet och de ursprungliga mjölkprovernas koncentration av retinol och kolekalciferol.

Laborationen upprepades därefter med vissa justeringar, se laboration 2 i Bilaga B, för att erhålla bättre och tydligare resultat än i laboration 1. På grund av den begränsade mängd bröstmjök som fanns tillgängligt, genomfördes denna laboration med mellanmjök. I proteinfällningen användes, till skillnad från föregående laboration, en lösning av metanol:isopropanol (75:25 volym/volym) istället för acetonitril, för att kunna jämföra om denna medförde ett bättre utbyte. De interna standarderna tillsattes denna gång i en större volym, 100 µL, och med en lägre koncentration, 1 ppm, med förhoppning om att erhålla tydligare absorptionstoppar i kromatogrammet då proverna körts i HPLC. Rören inkuberades sedan på låg skakningsfrekvens innan centrifugering, vilket gav en mer ihållande omblandning än i föregående laboration. I extraktionen användes denna gång 2 mL hexan istället för hexan:diklormetan. Den dubbla volymen metanol, 200 µL, tillsattes efter indunstning för att kunna överföra en tillräckligt stor volym till vialerna inför HPLC (injektionsvolym: 10 µL, flöde: 0,6 mL/min, tryck: 132 bar, körtid:

20 min, mobil fas: 100% metanol, stationär fas: C₁₈-kolonn, detektionsvåglängd: 265/300 nm). Resultaten analyserades på samma sätt som tidigare.

På grund av fortsatt låga utbyten utfördes en tredje laboration, se laboration 3 i Bilaga C, med en liknande proteinfällning som i laboration 2. Här användes dubbelprover av lättmjölk, mellanmjölk, standardmjölk respektive bröstmjölk. För att undersöka hur väl vitaminet lösgjordes från proteinerna och förflyttades till lösningsmedlet, genomfördes extraktionen därefter på både pellet och supernatant. Detta gjordes genom att 3 mL hexan:diklormetan tillsattes både rören innehållande den erhållna pelleten och rören innehållande supernatanten. Till rören med pellet tillsattes även 1,5 mL milliQ-vatten för att lösa upp den. Samtliga rör vortexades och centrifugerades och på samma sätt som innan flyttades den översta av de erhållna faserna till nya rör. Jämfört med tidigare laborationer utvecklades extraktionsmetoden genom att hexan:diklormetan tillsattes ytterligare en gång. Efter indunstning tillsattes även denna gång 200 µL metanol inför analys i HPLC, med samma inställningar som i föregående laboration, men med detektionsvåglängd 265/325 nm.

Vidare utfördes en fjärde laboration som liknade laboration 3, men där proteinfällningen istället utfördes med 50 µL koncentrerad saltsyra och där dubbel volym standard tillsattes, se laboration 4 i Bilaga D. Endast den erhållna pelleten förväntades denna gång innehålla vitaminerna och extraherades med hexan:diklormetan. Analys av proven genomfördes i HPLC som ovan.

I tabell 3.1 visas en översikt över laborationerna som genomfördes i metodutvecklingen för proteinfällning och hexanbaserad extraktion. Skillnader i val av mjölk, antal prover, lösningsmedel och extraktionsmetod kan ses i tabellen. Övriga justeringar, såsom injektionsvolym för HPLC, är inte inkluderade.

Tabell 3.1. Översikt över de fyra laborationer som genomförts i metodutvecklingen för analys av vitaminer i bröstmjölk med proteinfällning och hexanbaserad extraktion. Tabellen visar mjölksort samt volym mjölk som analyserats, med vilket medel fällning och extraktion genomförts samt med vilken volym, antal gånger extraktionen upprepades samt om den genomfördes på supernatant eller pellet.

| Laboration | Mjölksprov (volym, antal) | Proteinfällning: utfällningsmedel (volym) | Extraktion: Lösningsmedel (volym, antal extraktioner, komponent) |
|------------|--|---|--|
| 1 | Bröstmjölk (1 mL, x4) | Acetonitril (2 mL) | Hexan:diklormetan 4:1 (3 mL, x2, supernatant) |
| 2 | Mellanmjölk (1 mL, x4) | Metanol: isopropanol 75:25 (2 mL) | Hexan (2 mL, x2, supernatant) |
| 3 | Lättmjölk, mellanmjölk, standardmjölk och bröstmjölk (1 mL, x2 för samtliga) | Metanol: isopropanol 75:25 (2 mL) | Hexan:diklormetan 4:1 (3 mL, x3, supernatant, pellet) |
| 4 | Lättmjölk, mellanmjölk, standardmjölk och bröstmjölk (1 mL, x2 för samtliga) | Saltsyra (50 µL) | Hexan:diklormetan 4:1 (3 mL, x3, pellet) |

Saponifiering och hexanbaserad extraktion

För metoden med saponifiering genomfördes, på motsvarande sätt, en första laboration enligt den framtagna preliminära laborationshandledningen, se laboration 5 i Bilaga E. Till fyra prover med 1 mL mellanmjölk tillsattes 2 mL 50% kaliumhydroxidlösning samt 1 mL 95% etanol. 100 µL av de två standarderna ergokalciferol och retinylacetat tillsattes med koncentrationen 1 ppm. Rören vortexades och inkuberades därefter på värmeblock, 45°C i 2 timmar. Från lösningen som erhållits efter utförd saponifiering av proverna genomfördes den hexanbaserade extraktionen. Detta gjordes på samma sätt som i föregående laborationer med proteinfällning, här med 3 mL hexan och totalt tre gånger. Efter indunstning med kvävgas tillsattes 200 µL metanol och 10 µL av proverna användes som injektionsvolym för analys i HPLC (injektionsvolym: 10 µL, flöde: 0,6 mL/min, tryck: 132 bar, körtid: 20 min, mobil fas: 100% metanol, stationär fas: C₁₈-kolonn, detektionsvåglängd: 265/325 nm). Liksom för proteinfällningen analyserades prover med externa standarder samtidigt i HPLC. Provernas koncentration av retinol och kolekalciferol beräknades.

Laborationen upprepades med dubbelprover av lättmjölk, mellanmjölk och bröstmjölk, se laboration 6 i Bilaga F. För att erhålla tydligare absorptionstoppar i HPLC:n tillsattes denna gång dubbel volym, 200 µL, av de interna standarderna. Lösningen som erhållits i saponifieringen inkuberades under omrörning över natten. Extraktion och analys utfördes som i föregående laboration.

Då ingen topp i HPLC:n erhöles för en av de interna standarderna, kontrollerades metoden i en sista laboration, se laboration 7 i Bilaga G. Denna gång användes 1 mL milliQ-vatten istället för mjölk och retinylacetat tillsattes som enda standard. Extraktion och analys genomfördes i övrigt på samma sätt.

I tabell 3.2 visas en översikt av laborationerna som genomförts i metodutvecklingen för saponifiering och hexanbaserad extraktion. Skillnader i val av mjölk, antal prover, lösningsmedel och extraktionsmetod kan ses i tabellen. Övriga justeringar, såsom volym tillsatt standard, är inte inkluderade.

Tabell 3.2. Översikt för de tre laborationer som genomförts i metodutvecklingen för analys av vitaminer i bröstmjölk med saponifiering och hexanbaserad extraktion. Tabellen visar mjölksort samt volym mjölk som analyserats, med vilket medel saponifiering och extraktion genomförts samt med vilken volym, antal gånger extraktionen upprepades samt om den genomfördes på supernatant eller pellet.

| Laboration | Mjölksprov (volym, antal) | Saponifiering: lösningsmedel (volym) | Extraktion: lösningsmedel (volym, antal extraktioner, komponent) |
|------------|---|--|--|
| 5 | Mellanmjölk (1 mL, x4) | Kaliumhydroxid 50% (2 mL), etanol 95% (1 mL) | Hexan (3 mL, x3, supernatant) |
| 6 | Lättmjölk, mellanmjölk och bröstmjölk (1 mL, x2 för samtliga) | Kaliumhydroxid 50% (2 mL), etanol 95% (1 mL) | Hexan (3 mL, x3, supernatant) |
| 7 | Vatten (1 mL, x1) | Kaliumhydroxid 50% (2 mL), etanol 95% (1 mL) | Hexan (3 mL, x3, supernatant) |

3.1.2 Resultat

Nedan presenteras resultat från vitaminlaborationerna, uppdelat i proteinfällning och saponifiering. Ett representativt kromatogram från varje laboration presenteras i Bilaga H. Samtliga värden från HPLC-analysen av laborationsproverna, tillsammans med beräknade koncentrationer retinol och kolekalciferol för respektive prov, är presenterade i Bilaga I. Då värden saknas för vissa eller alla ämnen i saponifieringslaborationerna är koncentrationerna retinol och kolekalciferol inte beräknade för dessa.

Proteinfällning och hexanbaserad extraktion

Från den första proteinfällningen, laboration 1, erhöles resultat som var varierande mellan proverna. Gemensamt för dem alla var att de visade små absorptionstoppar för de undersökta retinol och kolekalciferol, men relativt tydliga absorptionstoppar för standarderna, retinylacetat och ergokalciferol. I figur H.1-H.2 i Bilaga H presenteras kromatogrammet, med detektionsvåglängd 265 nm respektive 300 nm, för ett av proverna från HPLC-analysen i laboration 1.

I figur H.3-H.4 i Bilaga H visas resultatet från HPLC-analysen, med detektionsvåglängd 265 nm respektive 300 nm, från ett av proverna i den andra proteinfällningen, laboration 2, som utfördes på mellanmjölk istället för bröstmjölk. Laboration 2 gav mindre variation mellan proverna, men små absorptionstoppar för kolekalciferol, obefintliga absorptionstoppar för retinol och mindre absorptionstoppar för standarderna, vilket tyder på att utbytena för både standarder och undersökta ämnen var lägre än i laboration 1. Värdena av areor på absorptionstopparna i HPLC-kromatogrammen från laboration 2 presenteras i tabell I.2 i Bilaga I.

I den tredje proteinfällningen, laboration 3, analyserades både pelleten och supernatanten av fyra olika mjölksorter. För de flesta av proverna var nivån av retinol så pass låg att den inte kunde detekteras i HPLC:n. I figur H.5-H.8 i Bilaga H visas resultatet från två av proven innehållande pellet respektive supernatant, med detektionsvåglängd 265 nm och 325 nm, erhållna från lättmjölk. Större areor på absorptionstopparna kan observeras i HPLC-kromatogrammet för kolekalciferol i pelleten jämfört med

supernatanten. På omvänt sätt är absorptionstopparna för de interna standarderna, retinylacetat och ergokalciferol, större i supernatanten jämfört med pelleten.

Även den fjärde proteinfällningen, laboration 4, resulterade i knappt detekterbara nivåer av retinol. Det var dessutom minimala nivåer av kolekalciferol i bröstmjölkproverna. Dessa prover avvek även i det avseende att proteinerna i bröstmjölken inte koagulerade fullständigt utan bildade istället små klumpar. För de resterande tre mjölksorterna erhöles däremot tydliga absorptionstoppar samt låg variation för kolekalciferol och standarderna, mellan dubbelproven. I figur H.9-H-10 i Bilaga H presenteras resultatet av HPLC-analysen, med detektionsvåglängd 265 nm respektive 325 nm, för ett av standardmjölksproverna.

Koncentrationen av retinol och kolekalciferol som uppmättes i de fyra analyserna med proteinfällning är sammanfattade i tabell 3.3. I de flesta fall var koncentrationen av kolekalciferol totalt gånger större än den förväntade koncentrationen i komjolk, se Bilaga J. I laboration 3 detekterades låga koncentrationer av kolekalciferol i supernatant jämfört med pellet. I både laboration 3 och 4, då olika mjölksorter analyserades, noterades även att koncentrationen av kolekalciferol ökar med fetthalten i mjölken. Generellt erhöles odetekterbar retinolkoncentration i proteinfällningslaborationerna.

Tabell 3.3. Översikt av resultatet från proteinfällningslaborationerna. Resultaten är angivna som medelvärde \pm RSD. Tabellen visar laborationsmetod, mjölksort samt beräknade medelvärden för retinol respektive kolekalciferol, i vilken **n** är antal prov som RSD beräknades utifrån och - innebär inga detekterbara nivåer av ämnet. I de fall då resultat erhöles för endast ett av proven saknas RSD.

| Laboration | Mjolk | Retinol [ng/mL] | Kolekalciferol [ng/mL] |
|-------------------------------|---------------|------------------------|------------------------|
| Proteinfällning 1 supernatant | Bröstmjolk | 10,6 \pm 23,8% (n=4) | 101 \pm 154% (n=4) |
| Proteinfällning 2 supernatant | Mellanjolk | - | 97,1 \pm 60,1% (n=4) |
| Proteinfällning 3 pellet | Lättmjolk | - | 329 \pm 34,0% (n=2) |
| Proteinfällning 3 pellet | Mellanjolk | - | 397 \pm 9,56% (n=2) |
| Proteinfällning 3 pellet | Standardmjolk | - | 709 \pm 54,8% (n=2) |
| Proteinfällning 3 pellet | Bröstmjolk | 6,06 (n=1) | - |
| Proteinfällning 3 supernatant | Lättmjolk | - | 24,9 \pm 49,4% (n=2) |
| Proteinfällning 3 supernatant | Mellanjolk | - | 37,6 (n=1) |
| Proteinfällning 3 supernatant | Standardmjolk | - | 82,8 (n=1) |
| Proteinfällning 3 supernatant | Bröstmjolk | 72,4 \pm 7,37% (n=2) | - |
| Proteinfällning 4 pellet | Lättmjolk | - | 128 \pm 9,92% (n=2) |
| Proteinfällning 4 pellet | Mellanjolk | - | 242 \pm 14,2% (n=2) |
| Proteinfällning 4 pellet | Standardmjolk | - | 380 \pm 1,48 % (n=2) |
| Proteinfällning 4 pellet | Bröstmjolk | - | - |

Saponifiering och hexanbaserad extraktion

HPLC-analysen av proven från den första saponifieringen, laboration 5, gav antingen minimala eller inga absorptionstoppar vid retentionstiderna för de eftersökta ämnena. Följaktligen erhöles inga värden på areor av absorptionstopparna. Resultatet presenteras i figur H.11-H-12 i Bilaga H, med detektionsvåglängd 265 nm respektive 325 nm.

Den andra saponifieringen, laboration 6, resulterade i höga nivåer av retinol och ergokalciferol i samtliga prov, men varken retinylacetat eller kolekalciferol kunde detekteras, se figur H.13-H.14 i Bilaga H, med detektionsvåglängd 265 nm respektive 325 nm,

Den slutgiltiga saponifieringen, laboration 7, resulterade i en topp för retinol, men ingen för den tillsatta retinylacetaten. Resultatet presenteras i figur H.15 i Bilaga H, med detektionsvåglängd 325 nm,

Samtliga saponifieringslaborationer gav otillräckliga resultat för att möjliggöra beräkning av koncentrationen retinol och kolekalciferol.

3.1.3 Diskussion

Som presenteras i resultatet i tabell 3.3, erhöles varierande koncentrationer av vitaminerna, både laborationer och mjolkprover emellan för proteinfällningen. Ofta har koncentrationen av retinol inte varit detekterbar. I fallet för saponifiering, bortsett från den första laborationen, detekterades däremot

retinol men inte den tillsatta standarden retinylacetat. Eftersom olika mjölksorter användes i de olika laborationerna var en direkt jämförelse mellan dem svår, men förändring har genomförts kontinuerligt för att förbättra metoderna från en laboration till en annan.

Proteinfällning

I den första proteinfällningen, då acetonitril användes som fällningsmedel och hexan:diklormetan användes för extraktion, bildades tre faser. Dock var ett tvåfassystem förväntat och eftersom endast den översta fasen användes kan någon av de andra två faserna ha innehållit både polära och opolära komponenter. Därför kan även någon av de kvarvarande två faserna innehållit vitaminer i en betydande mängd. Detta kan även förklara den stora variansen mellan proverna enligt tabell 3.3. Eftersom acetonitril löser sig bra i både vatten och organiska lösningsmedel (101), kan det ha varit anledningen till bildandet av ett trefassystem, men det finns även en möjlighet att hexan:diklormetanblandningen kunde påverka detta. Av denna anledning byttes både utfällningsmedlet och extraktionsmedlet ut till laboration 2.

Eftersom mellanmjölk användes i den andra proteinfällningen kunde inte resultatet jämföras med föregående proteinfällning. Den beräknade koncentrationen kolekalciferol var tiotals gånger större än den förväntade koncentrationen i mellanmjölk dock hade variansen mellan proverna minskat. Däremot detekterades ingen retinol i proverna, varför laborationsmetoden behövde utvecklas ytterligare.

På grund av att det bildades ett tvåfassystem i den andra proteinfällningen användes samma utfällningsmedel i laboration 3, men hexan:diklormetan användes för extraktion. Därmed ansågs det troligt att acetonitrilen bidrog till ett trefassystem. I laborationen observerades dessutom att pelleten innehöll cirka tio gånger mer kolekalciferol än supernatanten, se tabell 3.3, vilket var tvärt emot det förväntade resultatet. De tillsatta interna standarderna, ergokalciferol och retinylacetat, detekterades dock i högre nivå i supernatanten. Detta kan tyda på att redan lösta ämnen förflyttas lättare till den opolära fasen jämfört med de eftersökta vitaminerna, då dessa är bundna till proteiner som ska brytas ner vid proteinfällning. Som en följd av detta är inte resultatet från proteinfällningslaborationerna särskilt pålitliga i och med att en stor andel av de eftersökta vitaminerna troligtvis stannade kvar i pelleten, bundna till proteiner. Detta kan vara en anledning till de låga utbytena i proteinfällningslaborationerna.

I den fjärde laborationen utfördes proteinfällningen med hjälp av saltsyra som koagulerade proteinerna tillsammans med vitaminerna. Det var då endast intressant att analysera vitamininnehållet i pelleten. Koagulering fungerade inte i bröstmjölksproverna, då endast små klumpar i provet bildades. Det förklarar bristen på resultat i dessa prover, enligt tabell 3.3. Utifrån denna laboration kan saltsyra antas fungera bra som utfällningsmedel för komjolk med olika fetthalt, medan något annat utfällningsmedel bör testas för bröstmjolk. Skillnaden i resultat för ko- respektive bröstmjolk kan möjligtvis bero på proteininnehållet då en fullständig koagulering inte skedde för fallet med bröstmjolk. Tabell 3.3 visar även att proven innehållande komjolk gav resultat med liten varians och höga nivåer av kolekalciferol, dock tiotals gånger högre än den koncentration som angetts av producenten Arla Foods. Det kan även observeras att koncentrationen kolekalciferol ökar med fetthalten i mjölk, vilken ska vara konstant enligt Arla Foods, se tabell J.1. i Bilaga J. Detta kan innebära att det är en komponent i opolära delen av mjölken som hamnar på samma retentionstid som kolekalciferol i HPLC-analysen.

Metoderna för proteinfällning gav i allmänhet låga utbyten. Detta tyder på att vitaminerna stannade kvar i den opolära fasen vid extraktionen. För att öka utbytet kan frystorkning av mjölk testas i framtida studier. Om mjölken frystorkas avlägsnas allt vatten från provet och då bildas ett enfassystem vid extraktionssteget. Detta enfassystem spräcks sedan genom att vatten tillsätts. Ett enfassystem skulle teoretiskt sett underlätta extraktionen av vitaminerna och på så sätt öka utbytet. Utöver detta kan även en tillsats av antioxidanter öka utbytet, då både vitamin A och D är kolföreningar som oxiderar vid rumstemperatur. Detta gäller även för de tillsatta standarderna, då oxidering och nedbrytning av dessa medför ett högt utbyte.

Saponifiering

De två laborationer som genomfördes med saponifiering följt av hexanbaserad extraktion gav otydliga resultat, både för de tillsatta interna standarderna, retinylacetat och ergokalciferol, samt för de former som undersöktes i mjölken, retinol och kolekalciferol.

I den första laborationen var absorptionstopparna som erhöles via HPLC så pass otydliga att dessa värden inte kunde antas motsvara koncentrationen av någon av formerna för vitamin A eller D. En trolig orsak till detta är att proverna inte vortexades efter att hexan tillsatts under extraktionen. De två faserna som erhöles då hexan tillsattes blandades då inte, vilket kan ha medfört att de fettlösliga vitaminerna inte förflyttades, i lika stor utsträckning, till hexanfasen.

I den andra laborationen vortexades proverna under extraktionen, trots detta kunde endast absorptionstoppar för retinol och ergokalciferol erhållas i kromatogrammet vid analys i HPLC. Detta resultat var förvånande, då de båda interna standarderna, retinylacetat och ergokalciferol, hade tillsatts proverna och därmed borde även retinylacetaten och inte endast ergokalciferol synas i resultaten från HPLC. En förklaring till detta erhöles i den slutgiltiga laborationen där mjölken ersattes med vatten och endast retinylacetat tillsattes som intern standard. Som visat i figur H.8 i Bilaga H, erhöles endast koncentrationer av retinol även här, vilket tyder på att den retinylacetat som tillsattes omvandlades till retinol under laborationen.

Vidare bekräftades denna teori, då retinylacetat, i egenskap av ester, kan omvandlas till en alkohol och en karboxylsyra under basiska betingelser (82). Den basiska hydrolysen som sker under saponifieringen kan därmed ske även för retinylacetat, vilken då skulle kunna omvandlas till retinol vid tillsats av kaliumhydroxid. Detta är en uppenbar brist i metoden och eftersom laborationsgenomförandet utvecklades från en redan beprövad och publicerad metod (84), där retinylacetat använts som intern standard, var detta utfall inte förväntat. För att kringgå detta problem skulle den interna standarden tillsatts efter saponifieringen (102,103). Detta hade dock inte gett ett helt pålitligt resultat vid beräkning av utbyte, då ingen hänsyn hade tagits till förlust av det analyserade ämnet innan tillsatsen av den interna standarden.

En justering att föredra kan vara att använda en annan intern standard, exempelvis 3,4-didehydroretinylacetat som föreslås av Tanumihardjo et al. (103). När denna utsätts för basen under saponifieringen erhålls dehydroretinol, vilken kan urskiljas efter analys i HPLC då den har en annan retentionstid än retinol (103).

Sammanfattning och förslag på framtida förbättringar av vitaminanalysen

Då koncentrationen retinol och kolekalciferol är låga i bröstmjolk, är tillgänglig volym bröstmjolk avgörande för att kunna erhålla pålitliga resultat. Detta är tydligt i denna studies resultat, då de erhållna koncentrationerna varierar mellan de olika proverna. En större mängd bröstmjolk hade gjort att en liten variation i analysen av proverna inte hade lett till att koncentrationerna skiljer sig med tiotals procent i uppmätbara nivåer.

I de prover där detekterbara nivåer av komjölkens koncentration av kolekalciferol erhöles, se tabell 3.3, har dessa värden varit tiotals gånger större än producenten Arla Foods innehållsdata, som tidigare diskuterats. Det är orimligt att producentens siffror är så pass felaktiga, vilket tyder på att HPLC-resultatet är opålitligt. Troligtvis är det något eller några ämnen som färdas igenom kolonnen på samma retentionstid som kolekalciferol och därmed ökar arean av absorptionstoppen. I framtida studier av kolekalciferol i bröstmjolk skulle det vara användbart att koppla en kromatograf till en masspektrometer för att ämnena i absorptionstoppen skulle kunna separeras och identifieras var för sig.

Som kan observeras i Bilaga I är värden på areor av absorptionstoppar för retinol från de flesta laborationer antingen låg eller obefintlig, jämfört med motsvarande värden för kolekalciferol. Detta motsäger den data om mjölkens koncentration av vitamin A som erhöles vid litteraturstudier, se tabell J.1-J.2 i Bilaga J, då denna ska finnas i högre koncentration än vitamin D. Detta gäller för både bröstmjolk och komjolk. På grund av detta gjordes ytterligare litteraturstudier, vilka visade att majoriteten av bröstmjölkens vitamin A-koncentration finns i form av retinylester, främst retinylpalmetinester och inte som retinol vilket är vad som analyserats i detta projekt (104). Detta kan

förklara varför koncentrationen retinol var nästintill obefintlig i proteinfällningslaborationerna för bröstmjolk. Dock förklarar detta inte bristen på resultat av retinol vid analys av komjölkproverna, då majoriteten av vitamin A i komjolk är retinol (105). Vid fortsatta studier där vitamin A analyseras i form av retinol, bör saponifiering därför användas, då retinylester omvandlas till retinol under de basiska betingelserna och nästintill det fullständiga vitamin A-innehållet erhålls i form av retinol. Som nämnts tidigare är det dock viktigt att en annan intern standard än retinylacetat används, då den är en form av retinylester och därmed bryts ner till retinol vid saponifiering.

Vid analys av vitamin D kan emellertid proteinfällning vara lämpligt för vidareutveckling av metod, då absorptionstoppar för kolekalciferol inte kunde detekteras efter extraktion med saponifiering, vilket kan ses i tabell I.5 i Bilaga I. Antalet genomförda saponifieringar är dock för få till antalet för att denna metod ska kunna uteslutas som tillämpbar vid analys av vitamin D. I en tidigare studie har dock proteinfällning observerats vara en mer optimal metod i ändamålet (83), vilket även indikerats i detta projekt. Vidare är saponifiering vanligt förekommande vid analys av vitamin D i livsmedel, medan proteinfällning främst används för analys av vitaminet i biologiska vätskor (75,76). Bröstmjolk och komjolk kan karaktäriseras som båda dessa, men främst som biologisk vätska. Därför är troligen proteinfällning mest relevant för vidareutveckling av metod i detta avseende.

3.2 Mineralanalys

I det här avsnittet presenteras den metod som utvecklats för mineralanalys tillsammans med de resultat som erhöles. Metodens användbarhet diskuteras sedan utifrån resultaten.

3.2.1 Metodutveckling av minerallaboration

Den metod som finns tillgänglig på avdelningen är mikrovågsnedbrytning, med efterföljande analys i en HPLC (88). Metodutvecklingen påbörjades med en litteratursökning, där mineralkoncentrationer som bör finnas i bröstmjolk undersöktes, se tabell K.1 Bilaga K. Därefter påbörjades laborationsdelen av metodutvecklingen med en tidigare skriven laborationshandledning som grund, se Bilaga L.

Gemensamt för alla laborationer var att det tillsattes bröstmjolk till varje vial, enligt en bestämd provuppsättning. Därefter fylldes alla vialer upp med milliQ-vatten till en total volym av 3 mL. I en av vialerna fylldes dock milliQ-vatten upp till en total volym av 5 mL istället för 3 mL eftersom mätsticken placerades i denna. Sedan tillsattes 0,75 mL koncentrerad salpetersyra och 0,15 mL koncentrerad saltsyra till varje vial. Vialerna förslöts och placerades i mikrovågsugnen. Ett program startades där temperaturen i mikrovågsugnen ökade från rumstemperatur till 180°C på 15 minuter och därefter bibehölls konstant temperatur på 180°C i 20 minuter. Vialerna fick sedan svalna till rumstemperatur innan de öppnades.

I en första laboration gjordes en provuppsättning, bestående av 16 prover med 0,5 mL bröstmjolk, 4 prover med 1,25 mL och 4 prover med 3 mL, se tabell M.1 i Bilaga M, för att kunna mäta effekten av bröstmjolkens volym på variansen av resultaten. Efter att stegen som var gemensamma för alla laborationer genomförts, överfördes proverna till 15 ml Falconrör. Vialerna sköljdes sedan ur en gång med milliQ-vatten och detta överfördes också till Falconröret. Den totala volymen för varje Falconrör är angiven i tabell M.1 i Bilaga M. Proverna i Falconrören indunstades över natten med luft, bortsett från rör 11,12 och 19-22. Tillsammans med proverna indunstades även tre nya blankar innehållande 5 mL milliQ-vatten. Därefter tillsattes askorbinsyra (2 mg/mL) till de indunstade Falconrören, upp till volymen som anges i tabell M.1, i Bilaga M. Från rör 11,12 och 19-22 överfördes 0,9 mL prov som blandades med 0,1 mL askorbinsyra (20 mg/mL). 500 µL av den nya lösningen överfördes till mindre plastvialer. Det förbereddes även tre plastvialer med 500 µL standard som innehåller 1 ppm av varje mineral. Proverna och standarderna analyserades sedan i HPLC (mobil fas: pyridin-2,6-dikarboxylat (PDCA), flöde: 0,8 mL/min, injektionsvolym: 25 µL, körtid: 18 minuter, detektionsvåglängd: 500 nm, analytisk kolonn: IonPac CS5A Dionex 250·4 mm, förkolonn: IonPac CG5A Dionex 50·4 mm). Det användes även en 4-(2-pyridylazo)-resorcinol (PAR) lösning för att möjliggöra detektion av mineralerna i HPLC:n.

Resultaten från första laborationen hade stor spridning och dessutom hade flera prover kontamineringar. I nästa laboration uteslöts proverna med 3 mL bröstmjolk då deras resultat var likvärdiga med resultat

från prover med lägre bröstmjölksvolym. Proverna med 0,5 mL bröstmjolk gav tydligare absorptionstoppar i förhållande till de andra proverna, därför inkluderas ett antal prov med 0,25 mL bröstmjolk i den kommande laborationen för att testa om ännu lägre volymer kunde ge bättre resultat.

Inför den andra laborationen skapades en ny provuppsättning, se tabell M.2 i Bilaga M. Den utfördes efter samma gemensamma steg som den första laborationen. Precis som i den första laborationen överfördes proverna till Falconrör och vialerna sköljdes. Till skillnad från den första laborationen späddes proverna i Falconrören till en totalvolym av 10 mL. Därefter överfördes 5 mL från varje rör till nya Falconrör, vilket gav upphov till två identiska uppsättningar. En av Falconrörsuppsättningarna sattes på indunstning, denna gång med filtrerad luft över natten. Till de indunstade Falconrören tillsattes 0,1 mL askorbinsyra (20 mg/mL) och 0,9 mL milliQ-vatten. Den andra uppsättningen av Falconrör indunstades inte och från dessa överfördes 0,9 mL lösning till Eppendorfrör tillsammans med 0,1 mL askorbinsyra. Samtliga rör vortexades och 500 µL överfördes till vialer som sedan analyserades i HPLC. Samma inställningar användes på HPLC:n som i första laborationen, men med 50 µL som injektionsvolym i prov 28-30 och 40-49. Körtiden för proverna var 19 minuter.

Den andra laborationens koncentrationer hade mindre spridning och färre kontamineringar än i föregående. På grund av kontaminering i blankproverna beslutades att även använda blankar från indunstningssteget till HPLC-analysen och inte endast från mikrovågsnedbrytningen till HPLC-analysen i nästa laboration. Detta för att kunna detektera om kontamineringen kom från indunstningen eller ett tidigare steg i laborationen. Det beslutades även att inga icke indunstade prover ska undersökas då de konsekvent gett för små absorptionstoppar på HPLC:n för att kunna urskilja dem från bakgrundsbruset.

Den tredje laborationen utfördes på samma sätt som i föregående laboration, dock vortexades Falconrören inte innan de överfördes till vialerna inför HPLC-analysen. Körtiden för HPLC-analysen var denna gång 17 minuter. I laborationen användes inte koncentrerad saltsyra, utan istället användes en med koncentrationen 1 M. Till denna laboration förbereddes även tre indunstningsblankar innehållande 5 mL milliQ-vatten inför indunstningen. Provuppsättningen för denna laboration presenteras i tabell M.3 i Bilaga M.

Då proverna från den tredje laborationen fortfarande var kontaminerade adderades industningsblankar med milliQ-vatten och syra till nästa laboration. Vidare uteslöts proverna på 0,25 mL bröstmjolk då koncentrationerna av de undersökta mineralerna i lösningen som analyserades i HPLC:n var så pass låga att kontamineringar spelade en för stor roll i dessa.

Den fjärde laborationen utfördes på samma sätt som i laboration 2, men HPLC:n kördes endast 17 minuter. Provuppsättningen för denna laboration visas i tabell M.4 i Bilaga M. Inför industningen förbereddes också tre industningsblankar med samma syravolymer som de andra proverna och milliQ-vatten upp till 5 mL.

3.2.2 Resultat

I Bilaga N presenteras ett kromatogram från varje laboration, se figur N.1-N.4, samt ett kromatogram med tydlig järn- och nickelkontaminering, se figur N.5, samtliga erhållna från HPLC-analysen. Värden på areorna av absorptionstopparna i kromatogrammen presenteras i tabell O.1-O.4 i Bilaga O. Dessa jämfördes med motsvarande värden för de externa standarderna för att beräkna mineral-koncentrationerna i varje prov, se tabell P.1-P.4 i Bilaga P.

Från samtliga laborationer erhöles inga detekterbara nivåer av varken mangan eller kobolt, bortsett från ett avvikande prov som innehöll mangan. Ett fåtal prover innehöll nickel samt en avvikande stor mängd järn jämfört med de andra proverna, på grund av kontaminering, se tabell P.1 samt tabell O.3-O.4 i Bilaga O. Dessa prover uteslöts från samtliga beräkningar. De beräknade mineralkoncentrationer som erhöles i laborationerna låg inom de koncentrationsintervall som togs fram i litteratursökningen, se tabell K.1 i Bilaga K.

Beräknade medelvärden för mineralkoncentrationer för de olika volymerna bröstmjolk i proverna, med tillhörande RSD, för den första laborationen presenteras i tabell 3.4.

Tabell 3.4. Resultat från den första laborationen, innefattande järn-, zink- och kopparkoncentrationer i bröstmjölk. Tabellen visar ett medelvärde av de olika mineralkoncentrationerna, samt \pm RSD för olika startvolymerna av bröstmjölk, i vilken **n** är antal prov som RSD beräknades utifrån.

| Volym bröstmjölk [mL] | Järn [$\mu\text{g/mL}$ bröstmjölk] | Zink [$\mu\text{g/mL}$ bröstmjölk] | Koppar [$\mu\text{g/mL}$ bröstmjölk] |
|-----------------------|--|--|--|
| 0,5 (n=11) | 0,354 \pm 32,7% | 1,31 \pm 9,35% | 0,734 \pm 52,0% |
| 1,25 (n=3) | 0,196 \pm 52,3% | 1,53 \pm 20,4% | 0,299 \pm 25,1% |
| 3 (n=4) | 0,131 \pm 46,3% | 1,15 \pm 21,2% | 0,179 \pm 36,3% |

Tabell 3.4 tar inte hänsyn till att olika prover spädades olika mycket inför HPLC-analysen därför har också tabell 3.5 tagits med som visar resultaten av de olika spädningarna. Många av de prover som inte indunstades hade för låga koncentrationer av mineraler för att kunna detektera dem i HPLC:n. Därför är vissa resultat baserade på ett fåtal mätningar. För alla enskilda mineralkoncentrationer i proverna, se tabell P.1 i Bilaga P.

Tabell 3.5. Resultat från den första laborationen, innefattande järn-, zink- och kopparkoncentrationer i bröstmjölk. Tabellen visar medelvärde \pm RSD av mineralkoncentrationer för olika spädningar av proverna, i vilken **n** är antal prov som RSD beräknades utifrån. I de fall då resultat erhöles för endast ett av proven saknas RSD.

| Volym innan HPLC [mL] | Järn [$\mu\text{g/mL}$ bröstmjölk] | Zink [$\mu\text{g/mL}$ bröstmjölk] | Koppar [$\mu\text{g/mL}$ bröstmjölk] |
|--------------------------|--|--|--|
| 0,5 (n=7) | 0,304 \pm 23,0% | 1,34 \pm 11,1% | 0,701 \pm 70,2% |
| 2,75 (n=7) | 0,317 \pm 54,5% | 1,39 \pm 18,0% | 0,543 \pm 52,6% |
| 10,5 (n=2) | 0,163 \pm 37,0% | 1,09 \pm 35,9% | 0,225 \pm 6,71% |
| 11,25 (n=1) | 0,138 | 1,14 | 0,088 |
| 13,5 (n=1) | 0,059 | 1,28 | 0,179 |

Beräknade medelvärden och RSD för den andra laborationen presenteras i tabell 3.6. För alla enskilda provers bröstmjölks- och mineralkoncentrationer, se tabell P.2 i Bilaga P. Blankarna från den andra laborationen hade koppar- och järnkontamineringar, se tabell Q.1 i Bilaga Q. De icke indunstade 0,25 mL- och 0,5 mL-proverna hade icke detekterbara nivåer av mineralerna.

Tabell 3.6. Resultat från den andra laborationen, innefattande järn-, zink- och kopparkoncentrationer i bröstmjölk. Tabellen visar medelvärdet \pm RSD av de olika mineralkoncentrationerna för olika startvolymerna bröstmjölk, i vilken **n** är antal prov som RSD beräknades utifrån, - innebär inga detektbara nivåer av ämnet och volymer med +(antal) hade fel injektionsvolym. De två nedre volymerna är från icke indunstade prover. I de fall då resultat erhöles för endast ett av proven saknas RSD.

| Volym bröstmjölk [mL] | Järn [$\mu\text{g/mL}$ bröstmjölk] | Zink [$\mu\text{g/mL}$ bröstmjölk] | Koppar [$\mu\text{g/mL}$ bröstmjölk] |
|--------------------------|--|--|--|
| 0,25 +(1) (n=3) | 0,55 \pm 130,0% | 0,85 \pm 14,6% | 6,2 \pm 49,6% |
| 0,5 (n=3) | 0,48 \pm 30,2% | 0,96 \pm 5,16% | 0,39 \pm 73,4% |
| 1 (n=2) | 0,47 \pm 23,7% | 1,1 \pm 17,0% | 0,47 \pm 9,95% |
| 2 (n=2) | 0,33 \pm 41,3% | 1,1 \pm 10,8% | 0,26 \pm 17,6% |
| 1 +(2) (n=2) | - | 0,257 | - |
| 2 (n=2) | - | 0,69 \pm 23,5% | 0,16 \pm 45,9% |

Koncentrationer av mineralerna i bröstmjölken för olika bröstmjölksvolymerna i den tredje laborationen presenteras i tabell 3.7. För alla enskilda provers bröstmjölks- och mineralkoncentrationer, se tabell P.3 i Bilaga P. Inga kontamineringar observerades i blankarna från indunstningen, medan blankarna från mikrovågsnedbrytningssteget hade järn- och kopparkontamineringar, se tabell Q.1 i Bilaga Q.

Tabell 3.7. Resultat från den tredje laborationen, innefattande järn-, zink- och kopparkoncentrationer i bröstmjolk. Tabellen visar medelvärdet \pm RSD av de olika mineralkoncentrationerna för olika startvolymmer bröstmjolk, i vilken **n** är antal prov som RSD beräknades utifrån.

| Volym bröstmjolk [mL] | Järn [$\mu\text{g/mL}$ bröstmjolk] | Zink [$\mu\text{g/mL}$ bröstmjolk] | Koppar [$\mu\text{g/mL}$ bröstmjolk] |
|-----------------------|--|--|--|
| 0,25 (n=3) | 0,91 \pm 37,2% | 0,97 \pm 14,5% | 0,23 \pm 25,1% |
| 0,5 (n=3) | 0,32 \pm 19,5% | 1,2 \pm 42,5% | 0,24 \pm 35,8% |
| 1 (n=3) | 0,22 \pm 32,4% | 0,79 \pm 31,8% | 0,16 \pm 29,8% |

Koncentrationerna av de olika mineralerna från den fjärde laborationen presenteras i tabell 3.8. För alla enskilda provers bröstmjölks- och mineralkoncentrationer, se tabell P.4 i Bilaga P. I den här laborationen tillsattes syra till samtliga blankar. I samtliga blankar observerades kontamineringar av järn och några från mikrovågsnedbrytningssteget hade även koppar- och zinkkontamineringar, se tabell Q.1 i Bilaga Q.

Tabell 3.8. Resultat från den fjärde laborationen, innefattande järn-, zink- och kopparkoncentrationer i bröstmjolk. Tabellen visar medelvärdet \pm RSD av de olika mineralkoncentrationerna för olika startvolymmer bröstmjolk, i vilken **n** är antal prov som RSD beräknades utifrån.

| Volym bröstmjolk [mL] | Järn [$\mu\text{g/mL}$ bröstmjolk] | Zink [$\mu\text{g/mL}$ bröstmjolk] | Koppar [$\mu\text{g/mL}$ bröstmjolk] |
|-----------------------|--|--|--|
| 0,5 (n=3) | 0,35 \pm 24,0% | 0,86 \pm 12,0% | 0,19 \pm 15,3% |
| 1 (n=6) | 0,30 \pm 20,7% | 1,1 \pm 18,0% | 0,23 \pm 29,0% |

3.2.3 Diskussion

Uppmätta mineralkoncentrationer hade hög varians i samtliga laborationer. Detta antogs bero på kontaminering och förändringar i laborationsgenomförande utfördes för att finna källan till denna och förbättra metoden.

Mikrovågsnedbrytning

Resultaten från den första laborationen visade på stor variation och flera prover hade nickel- och järnkontamineringar. Den stora variansen kan ses i tabell 3.4 där majoriteten av RSD-värdena är höga. Eftersom variansen var stor kunde ingen kombination av volym bröstmjolk och spädning i försöksplaneringen uteslutas. Positivt var att det gick att utläsa resultat från proverna med 0,5 mL bröstmjolk som startvolym, eftersom minimering av bröstmjölksvolymen eftersträvades. De prover med 3 mL bröstmjolk som startvolym uteslöts i nästkommande laborationer på grund av dess stora volym samt att deras resultat var likvärdiga med de andra startvolymerna. Flera av de prover som inte indunstades hade för låg koncentration för att mineralerna skulle kunna detekteras och därmed kunde dessa inte utvärderas.

Då problem med injektion i HPLC:n uppstod i den andra laborationen, resulterade detta i att vissa prover fick opålitliga resultat. Provresultaten hade högre andel lyckade analyserade prov än i första laborationen men det var fortfarande inte godtagbar spridning på dessa. Det visades även finnas en viss koppar- och järnkontaminering i några av proverna, bland annat i blankarna och proven med 0,25 mL bröstmjolk som startvolym. Dessutom hade proverna med 0,25 mL bröstmjolk som startvolym fel injektionsvolym i ett av proven. Detta gjorde det svårt att avgöra dess användbarhet som startvolym, men resultaten tydde på att startvolymen var för låg. Det misstänktes att kontamineringen kunde komma från indunstningssteget, dock borde indunstningsblankarna i den första laborationen då också varit kontaminerade, vilket de inte var. Proverna som inte indunstades fick även under denna laboration odetekterbara resultat, vilket troligtvis beror på att koncentrationerna var för små för att vara detekterbara vid analys i HPLC.

Den tredje laborationen hade likvärdiga resultat med föregående laboration. Blankar från både mikrovågsnedbrytningssteget samt från indunstningen var inkluderade, vilket gav möjligheten att bestämma i vilket laborationssteg som kontamineringen skedde. Det observerades att indunstningsblankarna var helt rena och på grund av detta misstänktes det att kontaminering skedde före indunstningen. Dock var det ingen syra i dessa blankar vilket eventuellt kan ha påverkat mineralernas löslighet. Det observerades även i slutet av denna laboration att fel koncentration på saltsyran använts,

vilket kan ha påverkat resultatet. Ett av proverna i denna laboration visades ha en absorptionstopp vid samma retentionstid som mangan. Denna topp hade ett ovanligt spetsigt utseende gentemot de flesta andra absorptionstoppar och därav antogs det att det blivit fel vid den retentionstiden i analysen för detta prov.

Den fjärde laborationens resultat hade fortfarande för stor varians för att kunna användas för laboration med Bondgårdsflorastudiens bröstmjölksprover. Däremot upptäcktes en trolig källa till en del av kontamineringen i proverna. Syrorna som användes i laborationen hade en garanterad högsta nivå på mineralkontaminering, vilken var högre än de mängder som uppmätts under laborationen, se tabell R.1 i Bilaga R. Denna kontamineringskälla kan eventuellt elimineras genom att använda renare syror.

Sammanfattning och förslag på framtida förbättringar av mineralanalysen

Då den inledande litteratursökningen visade att mineralinnehållet i bröstmjolk är väldigt lågt och stora ursprungsvolymer behövs, blev ett första syfte med projektet att försöka optimera minerallaborationen för att kunna användas på lägre volymer bröstmjolk. Under första laborationen upptäcktes att proverna var kontaminerade med järn och koppar och ett antal laborationer genomfördes därför för att försöka förstå i vilket steg kontamineringen skedde. Resultatet från metodutvecklingen av mineralanalysen visade att en volym om 0,5 mL bröstmjolk eventuellt kan vara möjlig. Dock kvarstår problemet med kontaminering och för stor varians proverna emellan.

För att kunna kvantifiera mineraler i lägre volymer bröstmjolk tillförlitligt kan mer exakta metoder såsom, ICP-MS användas (106). Syrorna som användes i laborationerna hade dessutom en garanterad högsta kontamineringsnivå som var så pass hög att den kan ha påverkat resultaten. Därför hade renare syror behövts användas för mineralanalys i bröstmjölksprover.

4. Statistisk analys av vitamin- och mineralintag kopplat till boendemiljö respektive allergi

Detta avsnitt innehåller insamling av data, metoder som har använts i analysen av insamlad data, resultat samt diskussion. De samband som undersöktes var om mammans vitamin- och mineralintag under amning är kopplat till boendemiljö respektive allergi hos barnet vid 36 månaders ålder. I detta avsnitt presenteras ett urval av resultaten i form av grafer. Resterande grafer resultat återfinns i form av grafer i Bilaga S.

4.1 Insamling av data

Data som användes för att analysera huruvida mammans vitamin- och mineralintag under amning är kopplat till boendemiljön respektive barnets utveckling av allergi kommer ifrån Bondgårdsflorastudien. Informationen i detta avsnitt om hur all kost- och allergidata samlades in är tagen från Jonsson et al. (1). Uppgifter som samlades in i studien kom från 65 barn födda i Skaraborg mellan september 2005 och maj 2008. Av dessa 65 barn var 28 uppväxta på bondgård och 37 uppväxta på landet men inte på bondgård.

Data på kostintag under amning samlades in fyra månader efter barnets födsel genom att mammorna ringdes upp och tillfrågades vad, samt hur mycket, som konsumerats de senaste 24 timmarna. Efter samtalet fick de till uppgift att anteckna kostintaget de kommande 24 timmarna.

Astma, eksem, allergisk rinit och matallergi hos barnen undersöktes genom läkarbesök vid 18 och 36 månaders ålder. Eksem bestämdes med hjälp av Williams kriterier och för en diagnos vid 36 månaders ålder behövde barnet visat tecken på det efter 2 års ålder. Matallergi diagnostiserades med hjälp av födoämnesprovokation följt av ett ImmunoCAP-test. Astmasymptom vid 36 månaders ålder diagnostiserades utifrån om barnet vid minst ett tillfälle påvisat väsende andning efter 2 års ålder. Allergisk rinit definierades utifrån symptom i ögon och näsa vid kontakt med djur och/eller pollen och diagnostiserades med ett IgE-test korresponderande till ämnet ifråga.

4.2 Statistiska metoder

Den statistiska analysen genomfördes med hjälp av datorprogrammet SPSS och signifikansnivån valdes till 5%. Inledningsvis användes en normalitetsplot och ett Shapiro-Wilk-test i SPSS för varje variabel

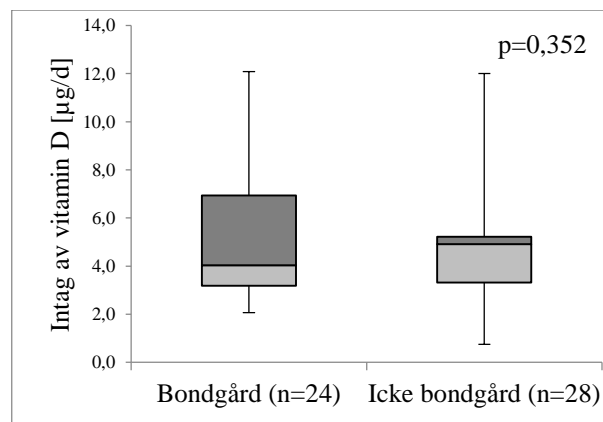
för att testa huruvida de var normalfördelade. Vid jämförelse av två grupper där data var normalfördelad utfördes t-test, medan Mann-Whitney-U's test användes för data som inte var normalfördelad.

Resultaten bearbetades i Excel och låddiagram skapades för att visualisera fördelningarna för data som testades med t-test och Mann-Whitney-U's test.

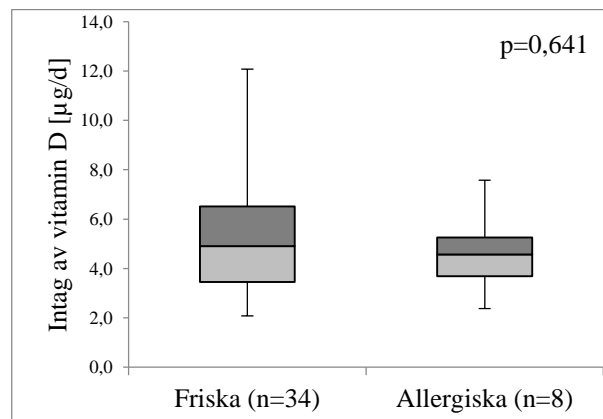
4.3 Resultat

I låddiagrammen som presenteras i detta avsnitt och i Bilaga S är det nedersta strecket det minsta värdet, den ljusgrå rektangeln är den 25:e percentilen upp till medianen, den 50:e percentilen. Den mörkgrå rektangeln är medianen upp till den 75:e percentilen och det översta strecket är det maximala värdet.

Tidigare publikationer från Bondgårdsflorastudien har inte undersökt om mammans vitamin- och mineralintag under amning kan kopplas till boendemiljö respektive barnets utveckling av allergi. För en figur över hur intag av vitamin D hos mamman påverkar barnets allergiutveckling, se figur 4.1. Ingen signifikans observerades i något av testen som behandlade vitaminer samt mineraler och dess koppling till boendemiljö eller allergi, se figur 4.1-4.2 samt figur S.1-S.14 i Bilaga S.



Figur 4.1. Låddiagram över mammans intag av vitamin D i µg/dag 1 månad efter förlossningen för bondgårdsmammor respektive mammor boende på landet men inte på bondgård. n är antalet barn i respektive kategori och p är p-värdet från Mann-Whitney-U's test.



Figur 4.2. Låddiagram över mammans intag av vitamin D i µg/dag 1 månad efter förlossningen för friska respektive allergiska barn. n är antalet barn i respektive kategori och p är p-värdet från Mann-Whitney-U's test.

4.4 Diskussion

De statistiska testerna för vitamin- och mineralupptaget, se figur 4.1-4.2 samt figur S.1-S.14 i Bilaga S, visade inte på någon signifikant koppling mellan boendemiljö respektive allergiutveckling hos barnet

och mammans intag under amning av vitamin A, vitamin D, järn och zink. Flera studier stödjer resultatet att det inte finns någon koppling mellan barnets allergiutveckling och mammans intag av vitamin A och D samt järn och zink (56,57). Dock finns det flera andra rapporter som har funnit kopplingar mellan barnets allergiutveckling och mammans intag av järn, zink och vitamin D (51–55,58).

Som beskrivits i teoriavsnittet har flertalet tidigare studier inte påvisat någon tydlig koppling mellan mammans intag av mineralerna järn och zink samt bröstmjölkens koncentration av ämnena (45–48). Då dessa ämnens koncentration troligtvis regleras genom aktiv transport i bröstkörtlarna, kan det förklara varför ingen signifikant koppling observerats mellan den mängd av mineralerna som erhålls via mammans kostintag och barnets eventuella allergiutveckling.

På omvänt sätt har några studier visat att bröstmjölkens koncentration av vitamin A och D beror på mammans näringsstatus (7,41), vilket därför inte utesluter att det kan finnas en koppling mellan mammans intag av vitaminerna och utveckling av allergi hos barnet via bröstmjölken. Resultaten som erhållits i detta projekt, att intag av vitamin A och D hos mamman inte är kopplat till barnets allergi, motsäger dock det antagandet. En förklaring till den uteblivna kopplingen mellan vitamin D i kosten och allergi hos barnet kan till viss del ges av att den största källan till vitamin D är via solljus under sommarhalvåret, vilket inte tagits hänsyn till i detta projekt. Då data över kostintag från Bondgårdsflorastudien samlats in i Sverige under en flerårig period, 2005-2008, har tillgången på solljus varierat. Därför har denna troligen periodvis varit en mer betydande källa för vitamin D, än intag via kosten.

Det bör även vägas in i resonemanget att data över näringsintag som studerats i projektet endast kommer från ett kort tidsintervall. Enligt Livsmedelsverket är exempelvis inälvsmat en viktig källa för intag av vitamin A (107). Likaså är rotfrukter och grönsaker, vilka innehåller karotenoider som kan omvandlas till vitamin A i kroppen (107). Inälvsmat är även en god källa till intag av järn och zink, liksom bland annat kött samt vissa vegetabiliska livsmedel, såsom fullkornsprodukter (108,109). Utöver detta kan även ett intag av andra ämnen påverka upptaget av vissa av de undersökta näringsämnena (108,109). Då intaget av olika livsmedel troligtvis är relativt individuellt, intas i större eller mindre kvantiteter samt mer eller mindre regelbundet, kan ett kort tidsintervall leda till en felaktig bild av det verkliga intaget.

Likaså kan även storleken på stickprovet haft inverkan på resultatet, då Bondgårdsflorastudien var en relativt liten studie med exempelvis endast 8 barn som hade utvecklat allergi vid 36 månaders ålder. I en framtida studie vore det fördelaktigt med fler deltagande familjer, eftersom större stickprov generellt sett ger en bättre spegling av den faktiska fördelningen.

Följaktigen bör, i framtida studier, intaget av livsmedel studeras över en längre tidsperiod samt med ett större stickprov. Detta för att erhålla ett mer tillförlitligt resultat av hur intaget av dessa näringsämnen varierar med boendemiljö respektive påverkar den eventuella allergiutvecklingen hos barnet.

5. Slutsats

För att möjliggöra laborationer med så pass små volymer bröstmjölksprov är ytterligare utveckling av de olika metoderna nödvändig, då de laborationsmetoder som använts i projektet inte gett tillräckligt tillförlitliga resultat för att kunna tillämpa analys av de prover som finns insamlade i Bondgårdsflorastudien. Resultaten i detta projekt indikerar att saponifiering är en mer lämplig metod för analys av vitamin A och proteinfällning för analys av vitamin D. En betydande förändring kan dessutom vara att analysera vitaminproverna i en masspektrometer, som kan detektera lägre koncentrationer av ämnet jämfört med vid analys i HPLC. Vid kvantifiering av mineraler var kontaminering ett problem på grund av de små provvolymerna, vilket eventuellt kan åtgärdas genom användning av renare kemikalier.

Ingen signifikant koppling kunde observeras mellan boendemiljö respektive barnets allergi vid 36 månader och mammans vitamin- och mineralintag under amning. Trots detta kan det inte uteslutas att det ändå finns en koppling mellan mammans intag under amning av vitaminer samt mineraler och barnets allergi. Detta då livsmedel som konsumeras sällan inte täcks på ett bra sätt med metoden som använts för att registrera mammans kostintag eftersom den endast mäter intag under 48 timmar. Dessutom är Bondgårdsflorastudien en relativt liten studie med relativt få allergiska barn, vilket gör att det inte går att utesluta att ett samband hade kunnat hittas med ett större antal familjer.

6. Referenser

1. Jonsson K, Barman M, Moberg S, Sjöberg A, Brekke HK, Hesselmar B, m.fl. Fat intake and breast milk fatty acid composition in farming and nonfarming women and allergy development in the offspring. *Pediatr Res* [Internet]. International Pediatric Research Foundation, Inc.; januari 2016 [citerad 09 februari 2016];79(1-1):114–23. Hämtad från: <http://dx.doi.org/10.1038/pr.2015.187>
2. Middelveld R. Om allergi | Forskning | Karolinska Institutet [Internet]. 2014-01-21. 2014 [citerad 09 februari 2016]. Hämtad från: <http://ki.se/forskning/om-allergi>
3. Riedler J, Braun-Fahrländer C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, m.fl. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* (London, England) [Internet]. 06 oktober 2001 [citerad 09 februari 2016];358(9288):1129–33. Hämtad från: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673601062523>
4. Perkin MR, Strachan DP. Which aspects of the farming lifestyle explain the inverse association with childhood allergy? *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. juni 2006 [citerad 11 februari 2016];117(6):1374–81. Hämtad från: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674906006518>
5. Livsmedelsverket. Allergi och överkänslighet [Internet]. 2016 [citerad 09 februari 2016]. Hämtad från: <http://www.livsmedelsverket.se/matvanor-halsa--miljo/sjukdomar-allergier-och-halsa/allergi-och-overkanslighet/>
6. 1177 Vårdguiden. Eksem [Internet]. 1177.se; 2014 [citerad 10 maj 2016]. Hämtad från: <http://www.1177.se/Vastra-Gotaland/Fakta-och-rad/Sjukdomar/Eksem1>
7. Butte NF, Lopez-Alarcon MG, Garza C. Nutrient adequacy of exclusive breastfeeding for the term infant during the first six months of life. [Internet]. Geneva Switzerland World Health Organization [WHO] Department of Nutrition for Health and Development 2002.; 2002 [citerad 09 februari 2016]. Hämtad från: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42519/1/9241562110.pdf?ua=1&ua=1>
8. Gern JE. Promising candidates for allergy prevention. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. juli 2015 [citerad 09 februari 2016];136(1):23–8. Hämtad från: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674915007216>
9. Liu AH. Revisiting the hygiene hypothesis for allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. oktober 2015 [citerad 16 februari 2015];136(4):860–5. Hämtad från: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674915011938>
10. Fall T, Lundholm C, Örtqvist AK, Fall K, Fang F, Hedhammar Å, m.fl. Early Exposure to Dogs and Farm Animals and the Risk of Childhood Asthma. *JAMA Pediatr* [Internet]. november 2015 [citerad 16 februari 2016];169(11):e153219. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26523822>
11. Vercelli D, von Mutius E. Farm living: effects on childhood asthma and allergy - ProQuest. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010 [citerad 26 februari 2016];10(12):861–8. Hämtad från: <http://search.proquest.com/docview/815135787?pq-origsite=summon>
12. Pistiner M, Gold DR, Abdulkerim H, Hoffman E, Celedón JC. Birth by cesarean section, allergic rhinitis, and allergic sensitization among children with a parental history of atopy. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. augusti 2008 [citerad 04 mars 2016];122(2):274–9. Hämtad från: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674908009408>
13. Hesselmar B, Hicke-Roberts A, Wennergren G. Allergy in children in hand versus machine dishwashing. - PubMed - NCBI. *Pediatrics* [Internet]. 2015 [citerad 16 februari 2016];135(3):590–7. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25713281>
14. Hesselmar B, Sjöberg F, Saalman R, Aberg N, Adlerberth I, Wold AE. Pacifier cleaning practices and risk of allergy development. *Pediatrics* [Internet]. juni 2013 [citerad 09 mars 2016];131(6):e1829–37. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23650304>
15. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am* [Internet]. februari 2013 [citerad 22 februari 2016];60(1):49–74. Hämtad från: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3586783&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
16. Jensen RG. *Handbook of Milk Composition* - Knovel [Internet]. 1995 [citerad 09 februari 2016]. Hämtad från: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpHMC00006/viewerType:toc/root_slug:handbook-of-milk
17. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev* [Internet]. september 2015 [citerad 09 februari 2015];91(11):629–35. Hämtad från: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378378215001772>
18. Við Streyrn S, Højskov CS, Møller UK, Heickendorff L, Vestergaard P, Mosekilde L, m.fl. Vitamin D content in human breast milk: a 9-mo follow-up study. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 16 december 2015 [citerad 09 februari 2016];103(1):107–14. Hämtad från: <http://ajcn.nutrition.org/content/103/1/107.long>
19. Innis SM. Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. *Am J Clin Nutr* [Internet]. mars 2014 [citerad 07 mars 2016];99(3):734S – 41S. Hämtad från:

- <http://ajcn.nutrition.org/content/99/3/734S.long>
20. Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS. The Retinoids [Internet]. The Retinoids. Elsevier; 1984 [citerad 09 februari 2016]. 1-5 s. Hämtad från:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012658101050007X>
 21. Mora JR, Iwata M, Von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage - ProQuest. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2008 [citerad 09 februari 2016];8(9):685–98. Hämtad från: <http://search.proquest.com/docview/224133960?pq-origsite=summon>
 22. Mucida D, Park Y, Cheroutre H. From the diet to the nucleus: vitamin A and TGF-beta join efforts at the mucosal interface of the intestine. *Semin Immunol* [Internet]. februari 2009 [citerad 09 februari 2016];21(1):14–21. Hämtad från: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104453230800064X>
 23. Pesonen M, Kallio MJT, Siimes MA, Ranki A. Retinol concentrations after birth are inversely associated with atopic manifestations in children and young adults. *Clin Exp Allergy* [Internet]. januari 2007 [citerad 09 februari 2016];37(1):54–61. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210042>
 24. Arts RJW, Blok BA, van Crevel R, Joosten LAB, Aaby P, Benn CS, m.fl. Vitamin A induces inhibitory histone methylation modifications and down-regulates trained immunity in human monocytes. *J Leukoc Biol* [Internet]. 01 juli 2015 [citerad 09 februari 2016];98(1):129–36. Hämtad från:
<http://www.jleukbio.org/content/98/1/129.abstract>
 25. Holick MF. High Prevalence of Vitamin D Inadequacy and Implications for Health - ProQuest. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2006 [citerad 14 maj 2016];81(3):353–73. Hämtad från:
<http://search.proquest.com/docview/216869954?pq-origsite=360link>
 26. Zakariaeeabkoo R, Allen KJ, Koplin JJ, Vuillermin P, Greaves RF. Are vitamins A and D important in the development of food allergy and how are they best measured? *Clin Biochem* [Internet]. juni 2014 [citerad 09 februari 2016];47(9):804–11. Hämtad från:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000991201400068X>
 27. Lange NE, Litonjua A, Hawrylowicz CM, Weiss S. Vitamin D, the immune system and asthma. *Expert Rev Clin Immunol* [Internet]. Taylor & Francis; 10 januari 2014 [citerad 09 februari 2016];5(6):693–702. Hämtad från: <http://search.proquest.com/docview/883226682?pq-origsite=summon>
 28. Belderbos ME, Houben ML, Wilbrink B, Lentjes E, Bloemen EM, Kimpen JLL, m.fl. Cord blood vitamin D deficiency is associated with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatrics* [Internet]. 01 juni 2011 [citerad 24 april 2016];127(6):e1513–20. Hämtad från:
<http://pediatrics.aappublications.org/content/127/6/e1513>
 29. Allen KJ, Koplin JJ, Ponsonby A-L, Gurrin LC, Wake M, Vuillermin P, m.fl. Vitamin D insufficiency is associated with challenge-proven food allergy in infants. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. april 2013 [citerad 09 februari 2015];131(4):1109–16, 1116.e1–6. Hämtad från:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674913001541>
 30. Beard JL. Iron Biology in Immune Function, Muscle Metabolism and Neuronal Functioning. *J Nutr* [Internet]. 01 februari 2001 [citerad 09 februari 2016];131(2):568S – 580. Hämtad från:
<http://jn.nutrition.org/content/131/2/568S.short>
 31. Ekiz C, Agaoglu L, Karakas Z, Gruel N, Yalcin I. *Open Journal Systems. Hematol J* [Internet]. 2005 [citerad 09 februari 2016];(5):579–83. Hämtad från:
<http://hematologyjournal.net/index.php/thj/article/view/thj.2005.1.579/1>
 32. Rink L. Zinc and the immune system. *Proc Nutr Soc* [Internet]. Cambridge University Press; 28 februari 2007 [citerad 09 februari 2016];59(04):541–52. Hämtad från:
http://journals.cambridge.org/abstract_S0029665100000781
 33. Hambidge M. Human Zinc Deficiency. *J Nutr* [Internet]. 01 maj 2000 [citerad 09 februari 2016];130(5):1344S – 1349. Hämtad från: <http://jn.nutrition.org/content/130/5/1344S.full>
 34. Percival S. Copper and immunity. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 01 maj 1998 [citerad 09 februari 2016];67(5):1064S – 1068. Hämtad från: <http://ajcn.nutrition.org/content/67/5/1064S.abstract>
 35. Lawrence H, Deehan D, Holland J, Kirby J, Tyson-Capper A. The immunobiology of cobalt: demonstration of a potential aetiology for inflammatory pseudotumours after metal-on-metal replacement of the hip. *Bone Joint J* [Internet]. september 2014 [citerad 11 februari 2016];96-B(9):1172–7. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25183586>
 36. Avila DS, Puntel RL, Aschner M. Manganese in health and disease. *Met Ions Life Sci* [Internet]. januari 2013 [citerad 09 februari 2016];13:199–227. Hämtad från:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24470093>
 37. Denkhaus E, Salnikow K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. april 2002 [citerad 09 februari 2016];42(1):35–56. Hämtad från:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1040842801002141>
 38. Marsland BJ, Salami O. Microbiome influences on allergy in mice and humans. *Curr Opin Immunol* [Internet]. oktober 2015 [citerad 09 februari 2015];36:94–100. Hämtad från:

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952791515001028>
39. Emmett PM, Rogers IS. Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. *Early Hum Dev* [Internet]. oktober 1997 [citerad 16 februari 2016];49:S7–28. Hämtad från: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378378297000510>
 40. Bates CJ, Prentice A. Breast milk as a source of vitamins, essential minerals and trace elements. *Pharmacology and Therapeutics*. 1994. s. 193–220.
 41. Ares Segura S, Arena Ansótegui J, Díaz-Gómez NM. [The importance of maternal nutrition during breastfeeding: Do breastfeeding mothers need nutritional supplements?]. *An Pediatr (Barc)* [Internet]. 14 september 2015 [citerad 13 januari 2016]; Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26383056>
 42. Mats H. D-vitaminbrist kanske vanligare än vi trott. *Läkartidningen* [Internet]. Malmö; 14 mars 2007 [citerad 12 maj 2016];854–7. Hämtad från: <http://www.lakartidningen.se/Functions/OldArticleView.aspx?articleId=6279>
 43. Brembeck P, Winkvist A, Bååth M, Bärebring L, Augustin H. Determinants of changes in vitamin D status postpartum in Swedish women. *Br J Nutr* [Internet]. Cambridge University Press; 14 februari 2016 [citerad 16 februari 2016];115(3):422–30. Hämtad från: http://journals.cambridge.org/abstract_S0007114515004560
 44. Ahmad SM, Hossain MI, Bergman P, Kabir Y, Raqib R. The effect of postpartum vitamin A supplementation on breast milk immune regulators and infant immune functions: study protocol of a randomized, controlled trial. *Trials*. 2015;16:129.
 45. Choi YK, Kim J-M, Lee J-E, Cho MS, Kang BS, Choi H, m.fl. Association of Maternal Diet With Zinc, Copper, and Iron Concentrations in Transitional Human Milk Produced by Korean Mothers. *Clin Nutr Res* [Internet]. januari 2016 [citerad 16 februari 2016];5(1):15–25. Hämtad från: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4731858&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 46. Domellöf M, Lönnerdal B, Dewey KG, Cohen RJ, Hernell O. Iron, zinc, and copper concentrations in breast milk are independent of maternal mineral status. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(1):111–5.
 47. Nikniaz L, Mahdavi R, Gargari BP, Gayem Magami SJ, Nikniaz Z. Maternal body mass index, dietary intake and socioeconomic status: differential effects on breast milk zinc, copper and iron content. *Heal Promot Perspect* [Internet]. 2011;1(2):140–6. Hämtad från: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3963624&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 48. Lönnerdal B. Regulation of mineral and trace elements in human milk: exogenous and endogenous factors. *Nutr Rev*. 2000;58(August):223–9.
 49. Björklund KL, Vahter M, Palm B, Grandér M, Lignell S, Berglund M. Metals and trace element concentrations in breast milk of first time healthy mothers : a biological monitoring study. *Environ Heal* [Internet]. 2012;11(92):1–8. Hämtad från: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3599153&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 50. Gürbay A, Charehsaz M, Eken A, Sayal A, Girgin G, Yurdak??k M, m.fl. Toxic metals in breast milk samples from Ankara, Turkey: Assessment of lead, cadmium, nickel, and arsenic levels. *Biol Trace Elem Res*. 2012;149(1):117–22.
 51. Erkkola M, Kaila M, Nwaru BI, Kronberg-Kippilä C, Ahonen S, Nevalainen J, m.fl. Maternal vitamin D intake during pregnancy is inversely associated with asthma and allergic rhinitis in 5-year-old children. *Clin Exp Allergy* [Internet]. juni 2009 [citerad 16 februari 2016];39(6):875–82. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19522996>
 52. Nwaru BI, Ahonen S, Kaila M, Erkkola M, Haapala A-M, Kronberg-Kippilä C, m.fl. Maternal diet during pregnancy and allergic sensitization in the offspring by 5 yrs of age: a prospective cohort study. *Pediatr Allergy Immunol* [Internet]. februari 2010 [citerad 07 februari 2016];21(1 Pt 1):29–37. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20003068>
 53. Devereux G, Litonjua AA, Turner SW, Craig LC, McNeill G, Martindale S, m.fl. Maternal vitamin D intake during pregnancy and early childhood wheezing. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 01 mars 2007 [citerad 16 februari 2016];85(3):853–9. Hämtad från: <http://ajcn.nutrition.org/content/85/3/853.short>
 54. Isabel S, Carina V. *Food Hypersensitivity: Diagnosing and Managing Food Allergies and Intolerance* [Internet]. John Wiley & Sons; 2009 [citerad 29 april 2016]. 283 s. Hämtad från: <https://books.google.com/books?id=fvxpTgJprh4C&pgis=1>
 55. Sausenthaler S, Koletzko S, Schaaf B, Lehmann I, Borte M, Herbarth O, m.fl. Maternal diet during pregnancy in relation to eczema and allergic sensitization in the offspring at 2 y of age. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 01 februari 2007 [citerad 16 februari 2016];85(2):530–7. Hämtad från: <http://ajcn.nutrition.org/content/85/2/530.short>
 56. West CE, Dunstan J, McCarthy S, Metcalfe J, D'Vaz N, Meldrum S, m.fl. Associations between

- maternal antioxidant intakes in pregnancy and infant allergic outcomes. *Nutrients* [Internet]. november 2012 [citerad 10 maj 2016];4(11):1747–58. Hämtad från: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3509518&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
57. Watson PE, McDonald BW. Water and nutrient intake in pregnant New Zealand women: association with wheeze in their infants at 18 months. *Asia Pac J Clin Nutr* [Internet]. januari 2014 [citerad 10 maj 2016];23(4):660–70. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25516325>
 58. Nwaru BI, Hayes H, Gambling L, Craig LCA, Allan K, Prabhu N, m.fl. An exploratory study of the associations between maternal iron status in pregnancy and childhood wheeze and atopy. *Br J Nutr* [Internet]. 28 december 2014 [citerad 10 maj 2016];112(12):2018–27. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25342229>
 59. Nwaru BI, Erkkola M, Lumia M, Kronberg-Kippilä C, Ahonen S, Kaila M, m.fl. Maternal intake of fatty acids during pregnancy and allergies in the offspring. *Br J Nutr* [Internet]. augusti 2012 [citerad 29 april 2016];108(4):720–32. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22067943>
 60. Riordan J, Countryman BA. Basics of breastfeeding. Part I: Infant feeding patterns past and present. *JOGN Nurs* [Internet]. januari [citerad 14 maj 2016];9(4):207–10. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7001126>
 61. Eglash A, Montgomery A, Wood J. Breastfeeding. *Dis Mon* [Internet]. juni 2008 [citerad 04 maj 2016];54(6):343–411. Hämtad från: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011502908000230>
 62. Platts Mills TA. The allergy epidemics: 1870-2010 - ProQuest. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2015 [citerad 04 maj 2016];136(1):3–13. Hämtad från: <http://search.proquest.com.proxy.lib.chalmers.se/docview/1692809627?pq-origsite=summon>
 63. Braman SS. The Global Burden of Asthma* - ProQuest. *Chest* [Internet]. 2006 [citerad 04 maj 2016];130(1):4S – 12S. Hämtad från: <http://search.proquest.com.proxy.lib.chalmers.se/docview/200489985/fulltextPDF/53CA129523A44448PQ/1?accountid=10041>
 64. Silvers KM, Frampton CM, Wickens K, Pattermore PK, Ingham T, Fishwick D, m.fl. Breastfeeding protects against current asthma up to 6 years of age. *J Pediatr* [Internet]. juni 2012 [citerad 24 mars 2016];160(6):991–6.e1. Hämtad från: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022347611012297>
 65. Bandoli G, von Ehrenstein OS, Flores MES, Ritz B. Breastfeeding and Asthmatic Symptoms in The Offspring of Latinas: The Role of Maternal Nativity. *J Immigr Minor Health* [Internet]. december 2015 [citerad 02 april 2016];17(6):1739–45. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25576180>
 66. Yamakawa M, Yorifuji T, Kato T, Yamauchi Y, Doi H. Breast-feeding and hospitalization for asthma in early childhood: a nationwide longitudinal survey in Japan. *Public Health Nutr* [Internet]. Cambridge University Press; 01 juli 2015 [citerad 02 april 2016];18(10):1756–61. Hämtad från: http://journals.cambridge.org.proxy.lib.chalmers.se/abstract_S1368980014002407
 67. Kramer MS, Matush L, Vanilovich I, Platt R, Bogdanovich N, Sevkovskaya Z, m.fl. Effect of prolonged and exclusive breast feeding on risk of allergy and asthma: cluster randomised trial. *BMJ* [Internet]. 20 oktober 2007 [citerad 17 mars 2016];335(7624):815. Hämtad från: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2034727&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 68. Matheson MC, Erbas B, Balasuriya A, Jenkins MA, Wharton CL, Tang ML-K, m.fl. Breast-feeding and atopic disease: a cohort study from childhood to middle age. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. november 2007 [citerad 12 april 2016];120(5):1051–7. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17764732>
 69. Sears MR, Greene JM, Willan AR, Taylor DR, Flannery EM, Cowan JO, m.fl. Long-term relation between breastfeeding and development of atopy and asthma in children and young adults: a longitudinal study. *Lancet (London, England)* [Internet]. 21 september 2002 [citerad 12 februari 2016];360(9337):901–7. Hämtad från: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673602110257>
 70. Bergmann RL, Diepgen TL, Kuss O, Bergmann KE, Kujat J, Dudenhausen** JW, m.fl. Breastfeeding duration is a risk factor for atopic eczema. *Clin Exp Allergy* [Internet]. februari 2002 [citerad 26 februari 2016];32(2):205–9. Hämtad från: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2222.2002.01274.x>
 71. Benn CS, Wohlfahrt J, Aaby P, Westergaard T, Benfeldt E, Michaelsen KF, m.fl. Breastfeeding and risk of atopic dermatitis, by parental history of allergy, during the first 18 months of life. *Am J Epidemiol* [Internet]. Oxford University Press; 01 augusti 2004 [citerad 12 februari 2016];160(3):217–23. Hämtad från: <http://aje.oxfordjournals.org/content/160/3/217.full>

72. Saarinen U., Kajosaari M. Breastfeeding as prophylaxis against atopic disease: prospective follow-up study until 17 years old. *Lancet* [Internet]. oktober 1995 [citerad 02 april 2016];346(8982):1065–9. Hämtad från: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014067369591742X>
73. Mathiasson L, Turner C, Berg H, Dahlberg L, Theobald A, Anklam E, m.fl. Development of methods for the determination of vitamins A, E and beta-carotene in processed foods based on supercritical fluid extraction: a collaborative study. *Food Addit Contam* [Internet]. Taylor & Francis Group; 10 juli 2002 [citerad 16 april 2016];19(7):632–46. Hämtad från: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652030110113753>
74. Karażniewicz-Łada M, Główska A. A review of chromatographic methods for the determination of water- and fat-soluble vitamins in biological fluids. *J Sep Sci* [Internet]. januari 2016 [citerad 16 april 2016];39(1):132–48. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26503668>
75. Abu Kassim NS, Gomes FP, Shaw PN, Hewavitharana AK. Simultaneous quantitative analysis of nine vitamin D compounds in human blood using LC-MS/MS. *Bioanalysis* [Internet]. mars 2016 [citerad 15 april 2016];8(5):397–411. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26893268>
76. Gomes FP, Shaw PN, Whitfield K, Koorts P, Hewavitharana AK. Recent trends in the determination of vitamin D. *Bioanalysis* [Internet]. Future Science Ltd London, UK; 09 december 2013 [citerad 15 april 2016];5(24):3063–78. Hämtad från: <http://www.future-science.com/doi/abs/10.4155/bio.13.283>
77. Perales S. Review: Determination of Vitamin D in Dairy Products by High Performance Liquid Chromatography. *Food Sci Technol Int* [Internet]. 01 december 2005 [citerad 16 april 2016];11(6):451–62. Hämtad från: <http://fst.sagepub.com/content/11/6/451>
78. Mena-Bravo A, Priego-Capote F, Luque de Castro MD. Study of blood collection and sample preparation for analysis of vitamin D and its metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* [Internet]. 16 juni 2015 [citerad 29 mars 2016];879:69–76. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26002479>
79. Konieczna L, Kaźmierska K, Roszkowska A, Szlagatys-Sidorkiewicz A, Bączek T. The LC-MS method for the simultaneous analysis of selected fat-soluble vitamins and their metabolites in serum samples obtained from pediatric patients with cystic fibrosis. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 30 maj 2016 [citerad 19 april 2016];124:374–81. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27005269>
80. Meunier C, Montéreal J, Faure P, Ducros V. Four years of LC-MS/MS method for quantification of 25-hydroxyvitamin D (D2+D3) for clinical practice. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 01 maj 2015 [citerad 19 april 2016];989:54–61. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25801997>
81. Kuhn M, Nakib S, De Bandt JP, Cynober L, Loï C. Simultaneous determination of retinol and alpha-tocopherol in polymeric diets for enteral nutrition. *J Chromatogr A* [Internet]. 26 september 2008 [citerad 19 april 2016];1205(1-2):186–90. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18752804>
82. Clayden Jonathan, Greeves Nick, Warren Stuart. *Organic chemistry*. 2:nd uppl. Oxford University Press; 2012. 28,210 s.
83. Gomes FP, Shaw PN, Whitfield K, Hewavitharana AK. Simultaneous quantitative analysis of eight vitamin D analogues in milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. Elsevier; 2015;891:211–20.
84. Bezerra DS, de Araújo KF, Azevêdo GMM, Dimenstein R. A randomized trial evaluating the effect of 2 regimens of maternal vitamin a supplementation on breast milk retinol levels. *J Hum Lact*. 2010;26(2):148–56.
85. Choi M, Lee I-S, Jung R-H. Rapid determination of organochlorine pesticides in fish using selective pressurized liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem* [Internet]. 15 augusti 2016 [citerad 29 mars 2016];205:1–8. Hämtad från: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461630334X>
86. Livsmedelsverket. Salt och mineraler [Internet]. 2016 [citerad 11 maj 2016]. Hämtad från: <http://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/naringsamne/salt-och-mineraler/1/>
87. Alegría A, Barberá R, Farré R, Lagarda MJ, Lorente RM, Torres A. Effectiveness of microwave based digestion procedures for the demineralization of human milk and infant formulas prior to fluorometric determination of selenium. *Food / Nahrung* [Internet]. 1996 [citerad 09 maj 2016];40(2):92–5. Hämtad från: <http://doi.wiley.com/10.1002/food.19960400210>
88. Fredrikson M, Carlsson N-G, Almgren A, Sandberg A-S. Simultaneous and Sensitive Analysis of Cu, Ni, Zn, Co, Mn, and Fe in Food and Biological Samples by Ion Chromatography. *J Agric Food Chem* [Internet]. American Chemical Society; januari 2002 [citerad 09 februari 2016];50(1):59–65. Hämtad från: <http://dx.doi.org/10.1021/jf010792w>
89. Marić L, Široki M, Herak MJ. Extraction of copper(II)-4-(2-pyridylazo)resorcinol complexes by tetraphenylphosphonium and arsonium chloride. *J Inorg Nucl Chem* [Internet]. november 1975 [citerad 17 april 2016];37(11):2309–11. Hämtad från:

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022190275807330>
90. ThermoScientific. PRODUCT MANUAL, IONPAC® CG5A GUARD COLUMN and IONPAC® CS5A ANALYTICAL COLUMN [Internet]. 2002-11-07. 2002 [citerad 17 april 2016]. Hämtad från: http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4342-31188-06_CS5A_V17.pdf
 91. Peter Atkins, Loretta Jones. Chemical Principles: The Quest for Insight. 5th uppl. W. H. Freeman; 2009. 1024 s.
 92. Hanai TT, Smith RM. HPLC, A Practical Guide [Internet]. Smith RM, redaktör. Royal Society of Chemistry; 2007 [citerad 17 april 2016]. 1-146 s. Hämtad från: <http://site.ebrary.com.proxy.lib.chalmers.se/lib/chalmers/detail.action?docID=10621181>
 93. Kocic D, Farrell W, Dennis GR, Shalliker RA. Ultra-fast HPLC MS analyses using active flow technology columns. *Microchem J* [Internet]. juli 2016 [citerad 15 april 2016];127:160–4. Hämtad från: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X16000564>
 94. Brevard H, Cantergiani E, Cachet T, Chaintreau A, Demyttenaere J, French L, m.fl. Guidelines for the quantitative gas chromatography of volatile flavouring substances, from the Working Group on Methods of Analysis of the International Organization of the Flavor Industry (IOFI). *Flavour Fragr J* [Internet]. 18 april 2011 [citerad 12 maj 2016];26(5):297–9. Hämtad från: <http://doi.wiley.com/10.1002/ffj.2061>
 95. Kellner R, Mermet J-M, Otto M, Valcárcel M, Widmer HM. *Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science*. 2nd uppl. Kellner, Robert Mermet, Jean-Michel Otto, Matthias Valcárcel, Miguel Widmer HM, redaktör. Wienheim: Wiley; 2004. 130-131 s.
 96. Yadolah D. *The Concise Encyclopedia of Statistics* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2008 [citerad 24 februari 2016]. Hämtad från: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-0-387-32833-1>
 97. Upton Graham CI. *A Dictionary of Statistics* [Internet]. 3e uppl. Oxford University Press; 2014. Hämtad från: <http://www.oxfordreference.com/view/10.1093/acref/9780199679188.001.0001/acref-9780199679188>
 98. Devore JL. *Probability and Statistics for Engineering and the Sciences*. 8e uppl. Julet M, redaktör. Stratton, Richard; 2012. 286-288 s.
 99. Duignan J. *A Dictionary of Business Research Methods* [Internet]. Oxford University Press; 2016. Hämtad från: <http://www.oxfordreference.com/view/10.1093/acref/9780191792236.001.0001/acref-9780191792236>
 100. Gellerstedt M. M12 Medicinsk statistik. Sollentuna: Merck Sharp & Dohme; 2004. 99-100, 140 s.
 101. Nationalencyklopedin. Acetonitril [Internet]. 2016 [citerad 15 maj 2016]. Hämtad från: <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/l%C3%A5ng/acetonitril>
 102. Giuliano A., Neilson E., Kelly B., Canfield L. Simultaneous Quantitation and Separation of Carotenoids and Retinol in Human Milk by High-Performance Liquid Chromatography. *Methods Enzymol*. 1992;213:391–9.
 103. Tanumihardjo S a, Penniston KL. Simplified methodology to determine breast milk retinol concentrations. *J Lipid Res* [Internet]. 2002;43(2):350–5. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861678>
 104. Stoltzfus RJ, Underwood BA. Breast-milk vitamin A as an indicator of the vitamin A status of women and infants. *Bull World Health Organ* [Internet]. januari 1995 [citerad 14 maj 2016];73(5):703–11. Hämtad från: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2486808&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 105. Livsmedelsverket. Livsmedelsdatabasen Version 2016-02-17 [Internet]. 2016 [citerad 15 maj 2016]. Hämtad från: <http://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/naringsamne/livsmedelsdatabasen/>
 106. Robert T. *Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners* [Internet]. 2:nd uppl. CRC Press; 2008 [citerad 15 maj 2016]. 241-260 s. Hämtad från: <http://www.crcnetbase.com/isbn/9781420067873>
 107. Livsmedelsverket. Vitamin A [Internet]. 2016 [citerad 12 maj 2016]. Hämtad från: http://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/naringsamne/vitaminer-och-antioxidanter/vitamin-a/?_t_id=1B2M2Y8AsgTpgAmY7PhCfG==&_t_q=vitmain+A&_t_tags=language:sv,siteid:67f9c486-281d-4765-ba72-ba3914739e3b&_t_ip=129.16.207.135&_t_hit.id
 108. Livsmedelsverket. Zink [Internet]. [citerad 18 februari 2016]. Hämtad från: <http://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/naringsamne/salt-och-mineraler1/zink/>
 109. Livsmedelsverket. Järn [Internet]. [citerad 14 maj 2016]. Hämtad från: <http://www.livsmedelsverket.se/livsmedel-och-innehall/naringsamne/salt-och-mineraler1/jarn/>

7. Bilagor

Bilaga A: Laboration 1 för vitaminanalys

I denna bilaga presenteras handledningen för laboration 1, i vilken proteinfällning med bröstmjök följt av hexanbaserad extraktion utförts. Metoden är modifierad från Gomes et al. (83).

Proteinfällning

- Blanda 2 mL acetonitril med 1 mL bröstmjök i fyra glasrör.
- Tillsätt 10 µL 10 ppm ergokalciferol och 50 µL 10 ppm retinylacetat i alla rör.
- Vortexa 2 minuter.
- Inkubera rören i rumstemperatur i 15 minuter och centrifugera sedan 10 minuter (4000g).
- För över supernatanten till nya tuber och påbörja hexanbaserad extraktion.

Hexanbaserad extraktion

- Blanda 160 mL hexan med 40 mL diklormetan i en glasbägare.
- Tillsätts 3 mL hexan:diklormetan till rören med lösningar som förberetts i proteinfällningen.
- Vortexa 2 minuter och centrifugera 1 minut (2000 g). Flytta det översta skiktet till nya rör och ytterligare 3 mL hexan:diklormetan tillsätts i de ursprungliga rören.
- Vortexa 2 minuter och centrifugera 1 minut (2000 g). Flytta det översta skiktet till samma tuber som i föregående steg.
- Indunsta rören innehållande de erhållna översta skikten med kväve i rumstemperatur i cirka 45 minuter, tills all vätska avdunstat.
- Tillsätt 100 µL metanol i varje rör och förslut rören genast.
- Vortexa och centrifugera hastigt.
- Flytta över det fullständiga innehållet till vialer för analys i HPLC (injektionsvolym: 20 µL, flöde: 0,5 mL/min, tryck: 84 bar, körtid: 20 min, mobil fas: 97% metanol, 3% vatten, stationär fas: C₁₈-kolonn, detektionsvåglängd: 265/300 nm).

Bilaga B: Laboration 2 för vitaminanalys

I denna bilaga presenteras handledningen för laboration 2, i vilken proteinfällning med mellanmjölk följt av hexanbaserad extraktion utförts. Metoden är modifierad från Gomes et al. (83).

Proteinfällning

- Blanda 22,5 mL metanol med 7,5 mL isopropanol för att erhålla en lösning med förhållande 75:25 volym/volym.
- Blanda 1 mL metanol:isopropanol med 1 mL mellanmjölk i fyra glasrör.
- Tillsätt 100 µL 1 ppm ergokalciferol och 100 µL 1 ppm retinylacetat i samtliga rör.
- Vortexa 1 minut.
- Inkubera rören på låg skakningsfrekvens i 20 minuter.
- Centrifugera 1 minut (5000g).
- Tillsätt ytterligare 1 mL metanol:isopropanol och centrifugera 6 minuter (5500g).
- För över supernatanten till nya rör och påbörja hexanbaserad extraktion.

Hexanbaserad extraktion

- Tillsätt 2 mL hexan till rören med lösningar som förberetts i proteinfällningen.
- Vortexa 2 minuter och centrifugera 2 minuter (3000 min⁻¹). Flytta det översta skiktet till nya rör och tillsätt 2 mL hexan i de ursprungliga rören.
- Vortexa och centrifugera som ovan. Flytta det översta skiktet till samma rör som i föregående steg.
- Indunsta rören innehållande de översta skikten med kväve i 30°C i cirka 45 minuter, tills all vätska avdunstat.
- Tillsätt 200 µL metanol i varje rör och förslut rören genast.
- Vortexa och centrifugera hastigt.
- Flytta över det fullständiga innehållet till vialer för analys i HPLC (injektionsvolym: 10 µL, flöde: 0,6 mL/min, tryck: 132 bar, körtid: 20 min, mobil fas: 100% metanol, stationär fas: C₁₈-kolonn, detektionsvåglängd: 265/300 nm).

Bilaga C: Laboration 3 för vitaminanalys

I denna bilaga presenteras handledningen för laboration 3, i vilken proteinfällning med bröstmjök och komjök av olika sorter följt av hexanbaserad extraktion utförs. Metoden är modifierad från Gomes et al. (83).

Proteinfällning

- Tillsätt 1 mL mjök i åtta glasrör, två med bröstmjök, två med lättmjök, två med mellanmjök och två med standardmjök.
- Tillsätt 100 µL 1 ppm ergokalciferol och 100 µL 1 ppm retinylacetat i samtliga rör.
- Tillsätt 2 mL metanol:isopropanol till rören.
- Vortexa 1 minut.
- Inkubera rören på låg skakningsfrekvens i 20 minuter och centrifugera i 7 minuter (5000g).
- För över supernatanten till nya rör och påbörja hexanbaserad extraktion.

Hexanbaserad extraktion med både pellet och supernatant

- Tillsätt 3 mL hexan:diklormetan (4:1 volym/volym) till samtliga rör.
- Tillsätt 1,5 mL milliQ-vatten till rören innehållande pellet.
- Vortexa tills pelleten har lösts, cirka 20 minuter.
- Centrifugera rören i 4 minuter (5000g).
- Flytta det översta skiktet från samtliga rör till nya rör och tillsätt 3 mL hexan:diklormetan i de ursprungliga rören.
- Vortexa 2 minuter och centrifugera 4 minuter (5000 g). Flytta det översta skiktet till samma rör som i föregående steg. Upprepa extraktionssteget ytterligare en gång.
- Indunsta rören innehållande de översta skikten med kväve i 30°C i cirka 1 timma, tills all vätska avdunstat.
- Tillsätt 200 µL metanol i varje rör och förslut rören genast.
- Vortexa och centrifugera hastigt.
- Flytta över det fullständiga innehållet till vialer för analys i HPLC (injektionsvolym: 10 µL, flöde: 0,6 mL/min, tryck: 132 bar, körtid: 20 min, mobil fas: 100% metanol, stationär fas: C₁₈-kolonn, detektionsvåglängd: 265/325 nm).

Bilaga D: Laboration 4 för vitaminanalys

I denna bilaga presenteras handledningen för laboration 4, i vilken proteinfällning med bröstmjolk och komjolk av olika sorter följt av hexanbaserad extraktion utförs. Metoden är modifierad från Gomes et al. (83).

Proteinfällning

- Tillsätt 1 mL mjölk i åtta glasrör, två rör med bröstmjolk, två med lättmjolk, två med mellanmjolk och två med standardmjolk.
- Tillsätt 200 µL 1 ppm ergokalciferol och 200 µL 1 ppm retinylacetat i alla rör.
- Tillsätt 50 µL koncentrerad saltsyra till rören och vortexa.
- Centrifugera i 8 minuter (5500 min⁻¹).
- För över supernatanten till nya rör och påbörja hexanbaserad extraktion.

Hexanbaserad extraktion med pellet

- Tillsätt 3 mL hexan:diklormetan (4:1 volym/volym) och 1 mL milliQ-vatten till rören med pellet.
- Vortexa tills pelleten har löst sig.
- Centrifugera rören i 2 minuter (5000 min⁻¹).
- Flytta det översta skiktet från samtliga rör till nya rör.
- Upprepa extraktionssteget ytterligare två gånger.
- Indunsta rören innehållande de översta skikten med kväve i 30°C i cirka 45 minuter, tills all vätska avdunstat.
- Tillsätt 200 µL metanol i varje rör och förslut rören genast.
- Vortexa och centrifugera hastigt.
- Flytta över det fullständiga innehållet till vialer för analys i HPLC (injektionsvolym: 10 µL, flöde: 0,6 mL/min, tryck: 132 bar, körtid: 20 min, mobil fas: 100% metanol, stationär fas: C₁₈-kolonn, detektionsvåglängd: 265/325 nm).

Bilaga E: Laboration 5 för vitaminanalys

I denna bilaga presenteras handledningen för laboration 5, i vilken saponifiering med mellanmjölk följt av hexanbaserad extraktion utförs. Metoden är modifierad från Bezerra et al. (84).

- Tillsätt 1 mL mellanmjölk, 2 mL 50% KOH-lösning samt 1 mL 95% etanol i fyra glaströr.
- Tillsätt 100 µL 1 ppm ergokalciferol och 100 µL 1 ppm retinylacetat i rören.
- Vortexa rören i 1 minut och placera i värmeblock på 45°C i 2 timmar. Skaka rören lätt varje halvtimme.
- Till varje rör tillsätts 3 mL hexan för att centrifugeras 10 minuter (500g).
- Flytta det översta skiktet till ett nytt rör och upprepa steget ovan två gånger genom att tillsätta hexan till de ursprungliga rören och samla de översta skikten i ett gemensamt rör.
- Indunsta rören innehållande de översta skikten med kväve i 37°C, tills all vätska avdunstat.
- Lös det erhållna extraktet i 200 µL metanol.
- Vortexa och centrifugera hastigt.
- För över allt innehåll till mindre vialer inför analys i HPLC (injektionsvolym: 10 µL, flöde: 0,6 mL/min, tryck: 132 bar, körtid: 20 min, mobil fas: 100% metanol, stationär fas: C₁₈-kolonn, detektionsvåglängd: 265/325 nm).

Bilaga F: Laboration 6 för vitaminanalys

I denna bilaga presenteras handledningen för laboration 6, i vilken saponifiering med bröstmjölk och komjölk av olika sorter följt av hexanbaserad extraktion utförs. Metoden är modifierad från Bezerra et al. (84).

- Tillsätt 1 mL mjölk, 2 mL 50% KOH-lösning samt 1 mL 95% etanol i sex glasrör, två rör med bröstmjölk, två med mellanmjölk och två med lättmjölk.
- Tillsätt 200 µL 1 ppm retinylacetat och 200 µL 1 ppm ergokalciferol i samtliga rör.
- Homogenisera blandningarna i rören med hjälp av vortex i 1 minut och inkubera rören i rumstemperatur över natten under omrörning.
- Tillsätt 3 mL hexan och vortexa i 10 minuter. Centrifugera rören i 2 minuter (5000g).
- Flytta de översta skikten till nya rör och upprepa steget ovan ytterligare två gånger genom att tillsätta hexan till de ursprungliga rören och samla de översta skikten i ett gemensamt rör för varje enskilt prov. Observera att rören vortexas i 5 minuter istället för i 1 minut.
- Indunsta tuberna innehållande de översta skikten med kväve i 37°C i 35 minuter, tills all vätska avdunstat.
- Lös det erhållna extraktet i 200 µL metanol
- Vortexa och centrifugera hastigt.
- För över allt innehåll till mindre vialer inför analys i HPLC (injektionsvolym: 10 µL, flöde: 0,6 mL/min, tryck: 132 bar, körtid: 20 min, mobil fas: 100% metanol, stationär fas: C₁₈-kolonn, detektionsvåglängd: 265/325 nm).

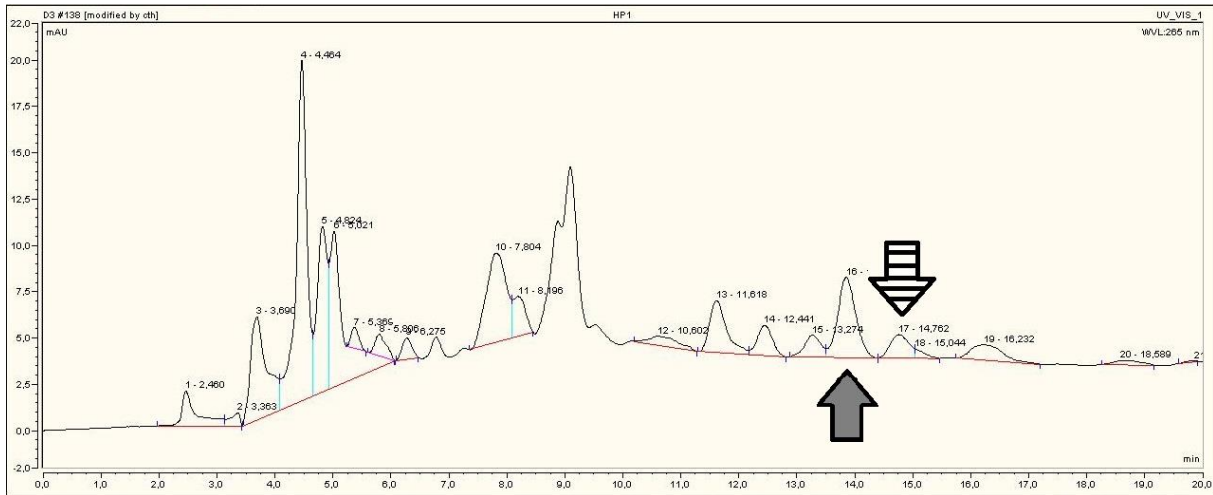
Bilaga G: Laboration 7 för vitaminanalys

I denna bilaga presenteras handledningen för laboration 7, i vilken saponifiering med milliQ-vatten följt av hexanbaserad extraktion utförs. Metoden är modifierad från Bezerra et al. (84).

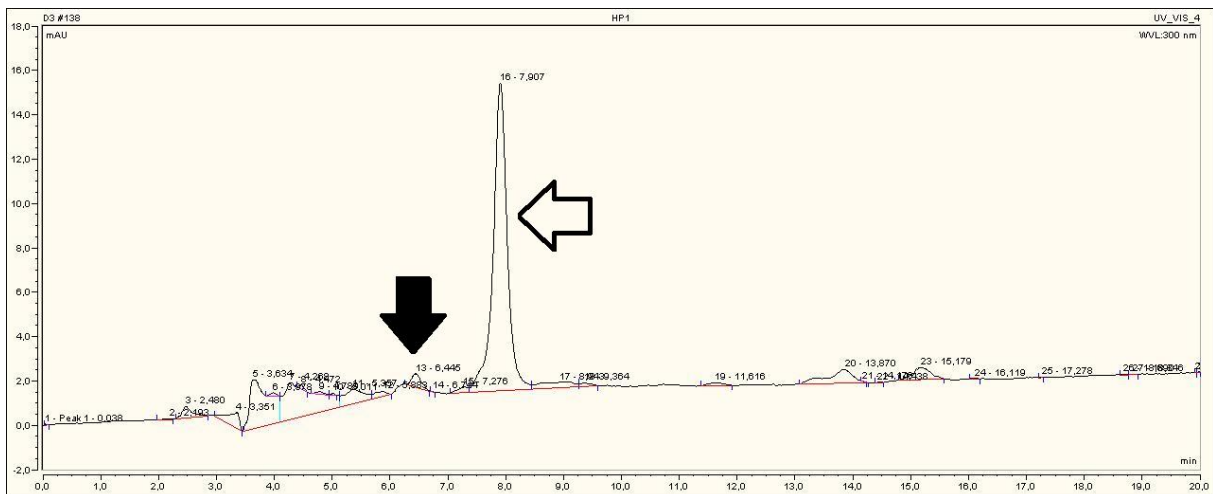
- Tillsätt 1 mL milliQ-vatten, 2 mL 50% KOH-lösning samt 1 mL 95% etanol i ett glasrör.
- Tillsätt 200 µL 1 ppm retinylacetat i röret.
- Homogenisera blandningen i röret med hjälp av vortex i 1 minut och inkubera i rumstemperatur över natten under omrörning.
- Tillsätt 3 mL hexan och vortexa i 10 minuter. Centrifugera röret i 2 minuter (5000g).
- Flytta över det översta skiktet till ett nytt rör och upprepa steget ovan ytterligare två gånger genom att tillsätta hexan till det ursprungliga röret och samla de översta skikten i ett gemensamt rör. Observera att röret vortexas i 5 minuter istället för i 1 minut.
- Indunsta rören innehållande de översta skikten med kväve i 37°C i 35 minuter, tills all vätska avdunstat.
- Lös det erhållna extraktet i 200 µL metanol
- Vortexa och centrifugera hastigt.
- För över allt innehåll till mindre vialer inför analys i HPLC (injektionsvolym: 10 µL, flöde: 0,6 mL/min, tryck: 132 bar, körtid: 20 min, mobil fas: 100% metanol, stationär fas: C₁₈-kolonn, detektionsvåglängd: 265/325 nm).

Bilaga H: Kromatogram från HPLC i vitaminanalys

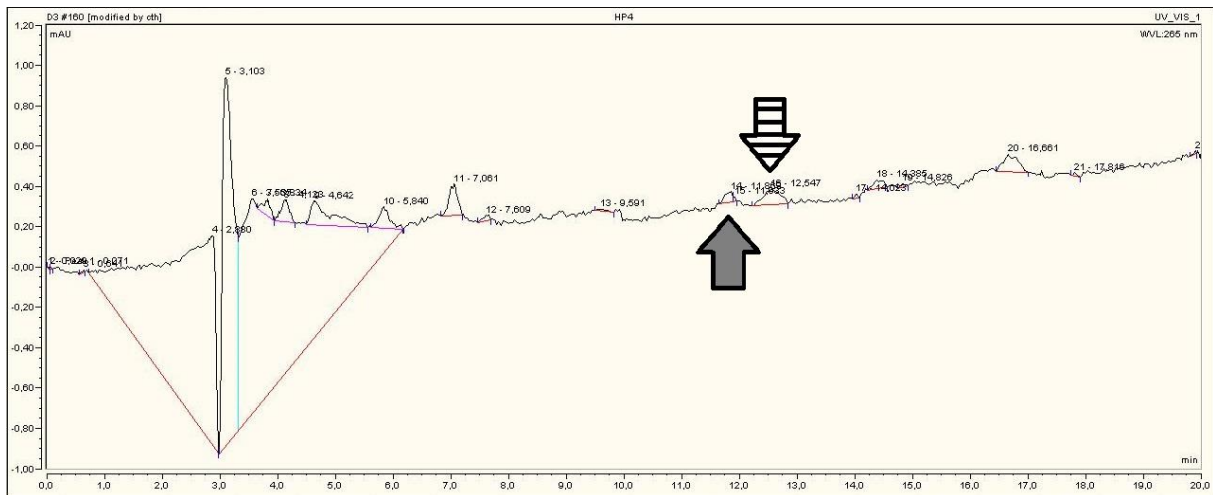
I denna bilaga presenteras ett representativt kromatogram från HPLC-analysen för samtliga laborationer i vitaminanalysen. Detektionsvåglängden är 265 nm för vitamin D och 325 nm för vitamin A. HPLC-kromatogrammen för de två första proteinfällningarna, laboration 1 och 2, har detektionsvåglängden 300 nm för vitamin A.



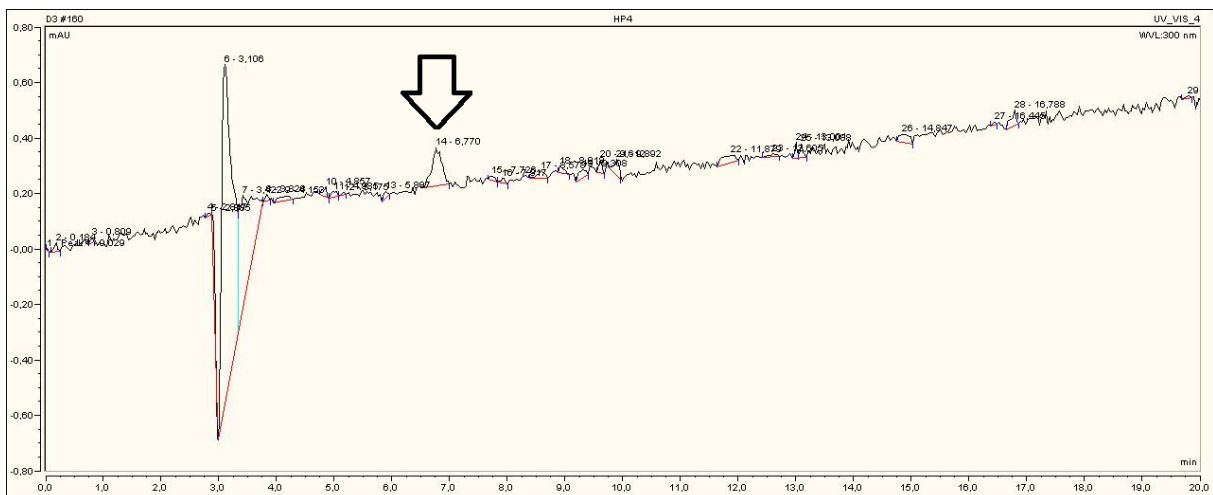
Figur H.1. HPLC-kromatogram för laboration 1; proteinfällning av bröstmjök. Den grå pilen visar absorptionstopp för ergokalCIFerol och den randiga kolekalCIFerol. Detektionsvåglängd 265 nm.



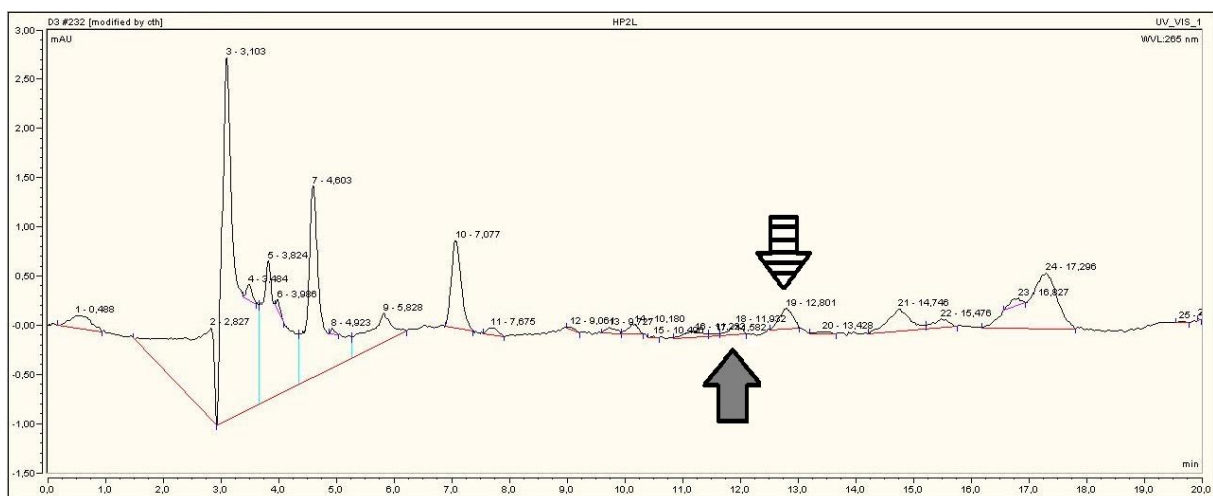
Figur H.2. HPLC-kromatogram för laboration 1; proteinfällning av bröstmjök. Den svarta pilen visar absorptionstopp för retinol och den vita retinylacetat. Detektionsvåglängd 300 nm.



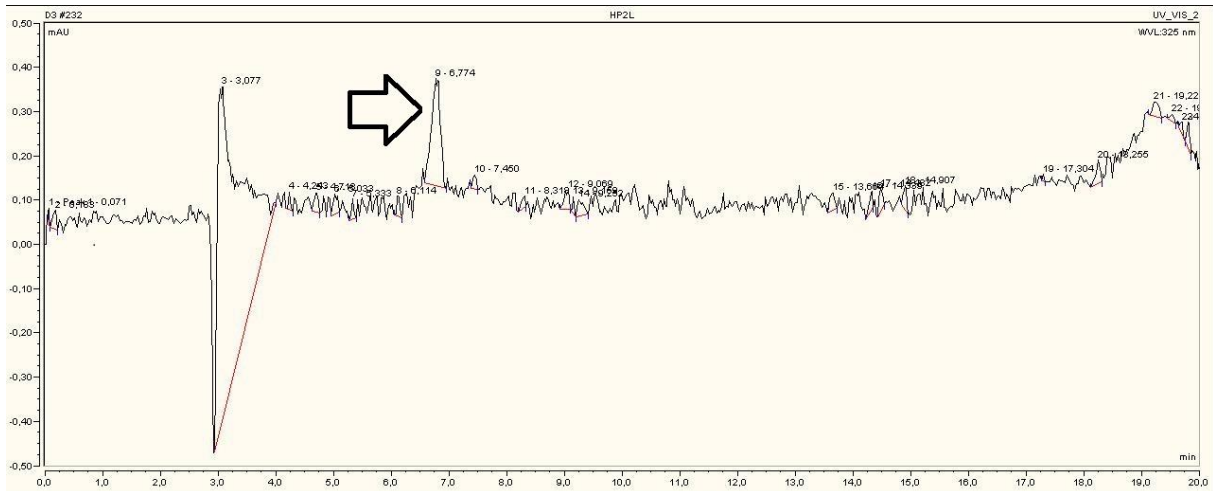
Figur H.3. HPLC-kromatogram för laboration 2; proteinfällning av mellanmjölk. Den grå pilen visar absorptionstopp för ergocalciferol och den randiga kolecalciferol. Detektionsvåglängd 265 nm.



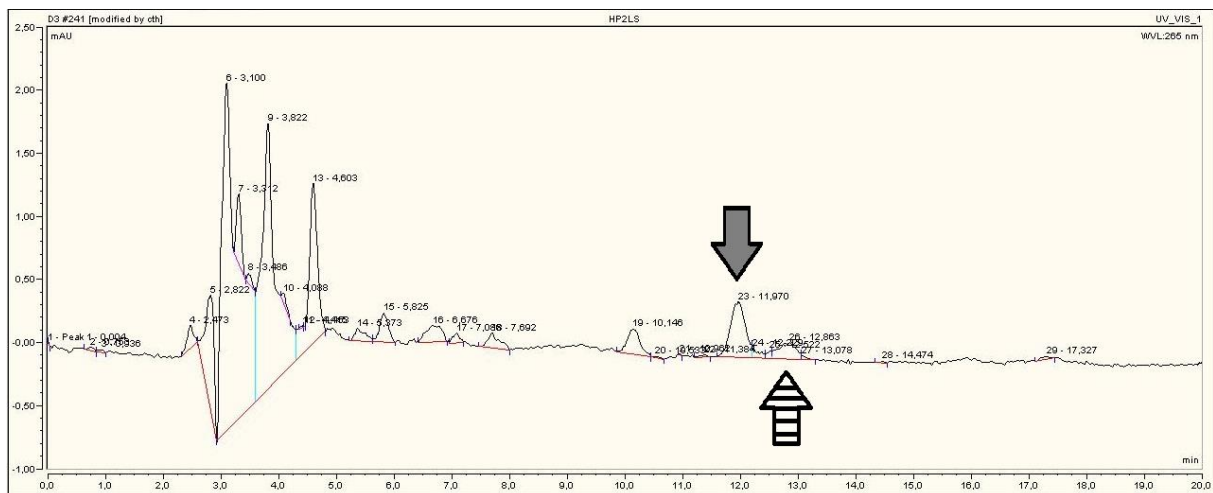
Figur H.4. HPLC-kromatogram för laboration 2; proteinfällning av mellanmjölk. Den vita pilen visar absorptionstopp för retinylacetat. Ingen absorptionstopp för retinol kan detekteras. Detektionsvåglängd 300 nm.



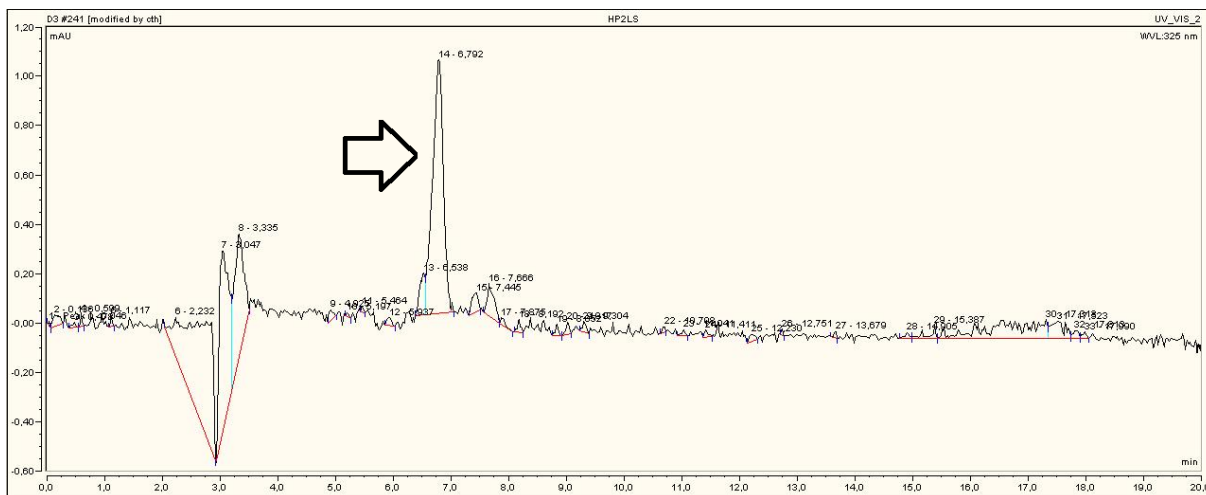
Figur H.5. HPLC-kromatogram för laboration 3; proteinfällning av lättmjölk för pellet. Den grå pilen visar absorptionstopp för ergocalciferol och den randiga kolecalciferol. Detektionsvåglängd 265 nm.



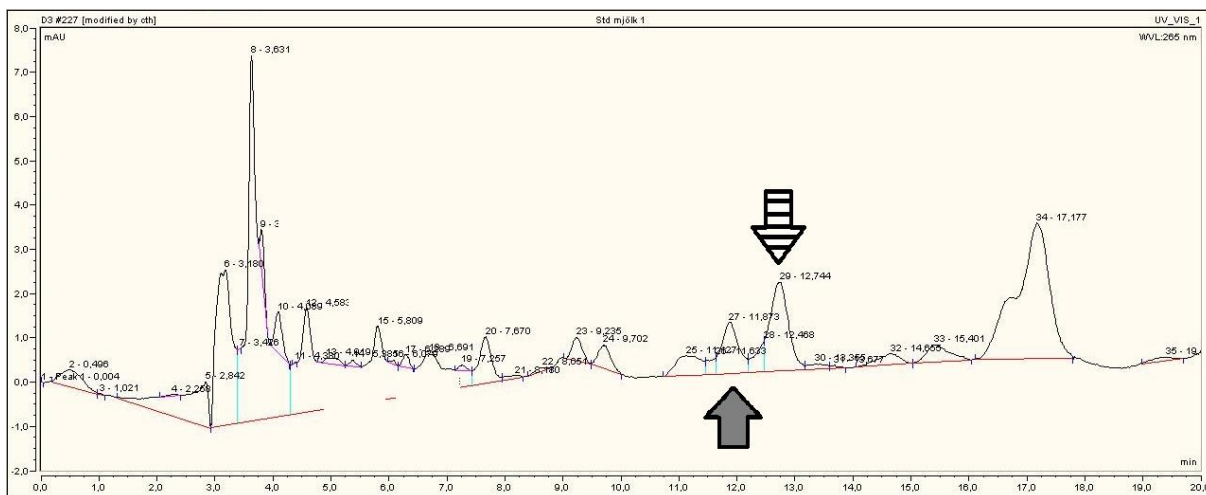
Figur H.6. HPLC-kromatogram för laboration 3; proteinfällning av lättmjölk för pellet. Den vita pilen visar absorptionstopp för retinylacetat. Ingen absorptionstopp för retinol kan detekteras. Detektionsvåglängd 325 nm.



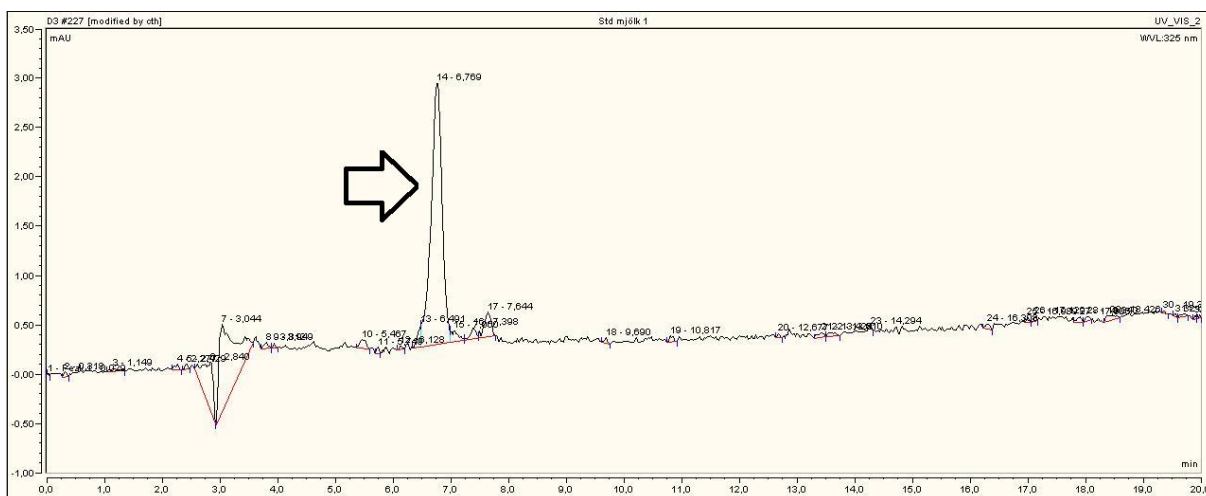
Figur H.7. HPLC-kromatogram för laboration 3; proteinfällning av lättmjölk för supernatant. Den grå pilen visar absorptionstopp för ergocalciferol och den randiga kolecalciferol. Detektionsvåglängd 265 nm.



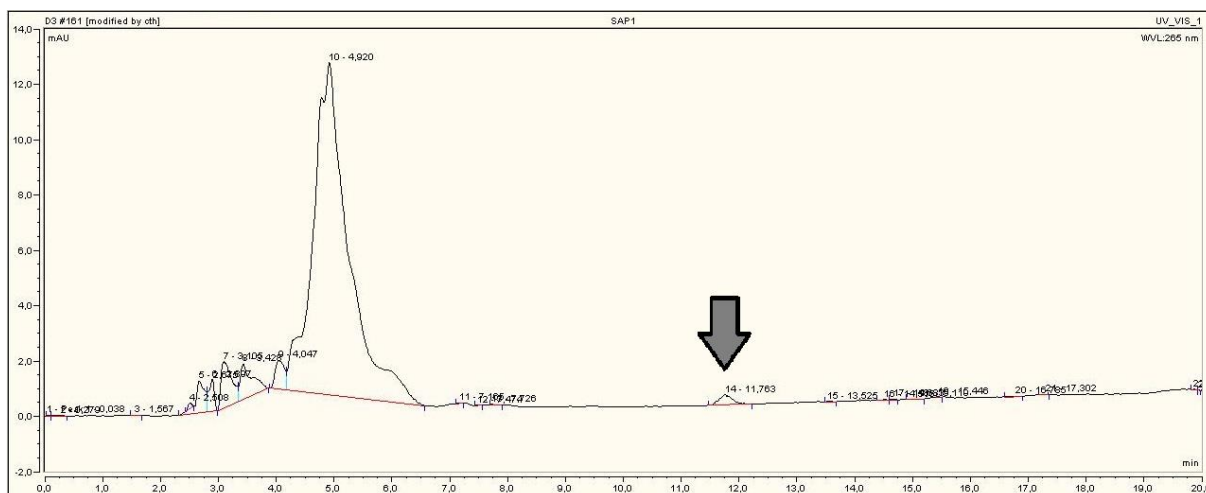
Figur H.8. HPLC-kromatogram för laboration 3; proteinfällning av lättmjölk för supernatant. Den vita pilen visar absorptionstopp för retinylacetat. Ingen absorptionstopp för retinol kan detekteras. Detektionsvåglängd 325 nm.



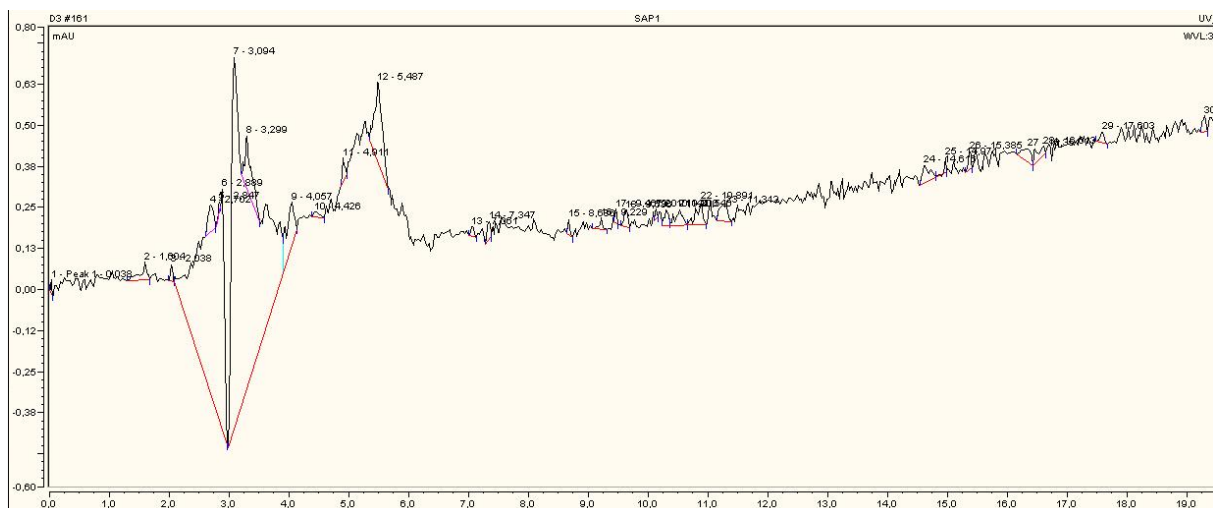
Figur H.9. HPLC-kromatogram för laboration 4; proteinfällning av standardmjölk. Den grå pilen visar absorptionstopp för ergokalciferol och den randiga kolecalciferol. Detektionsvåglängd 265 nm.



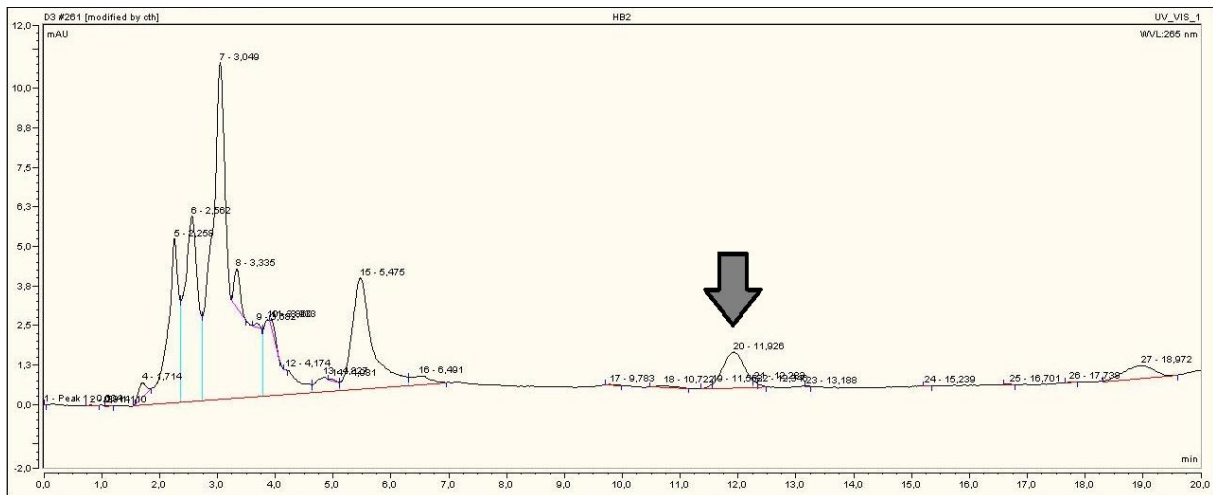
Figur H.10. HPLC-kromatogram för laboration 4; proteinfällning av standardmjölk. Den vita pilen visar absorptionstopp för retinylacetat. Ingen absorptionstopp för retinol kan detekteras. Detektionsvåglängd 325 nm.



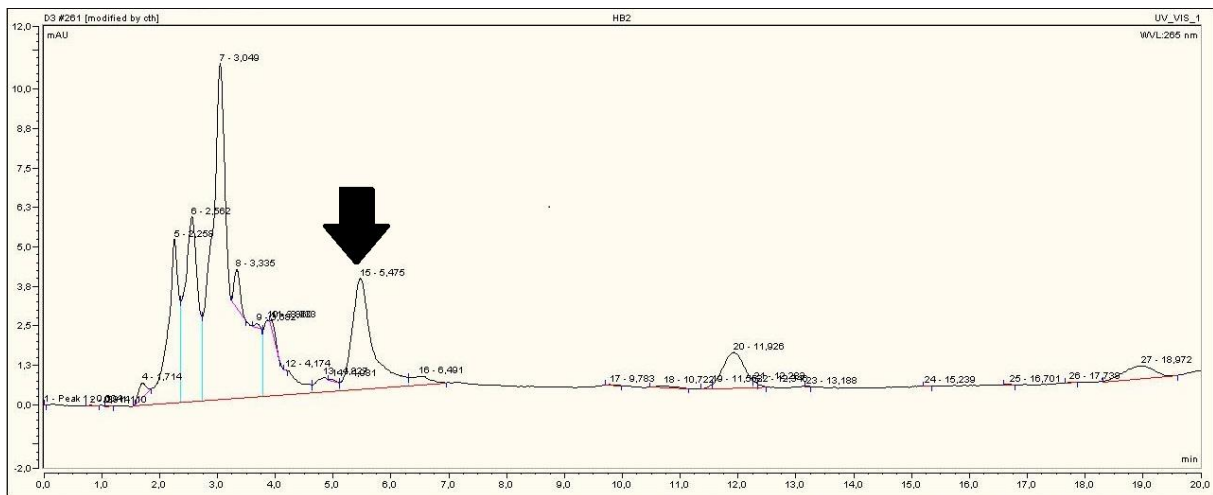
Figur H.11. HPLC-kromatogram för laboration 5; saponifiering av mellanmjölk. Den grå pilen visar absorptionstopp för ergokalciferol. Ingen absorptionstopp för kolekalciferol kan detekteras. Detektionsvåglängd 265 nm.



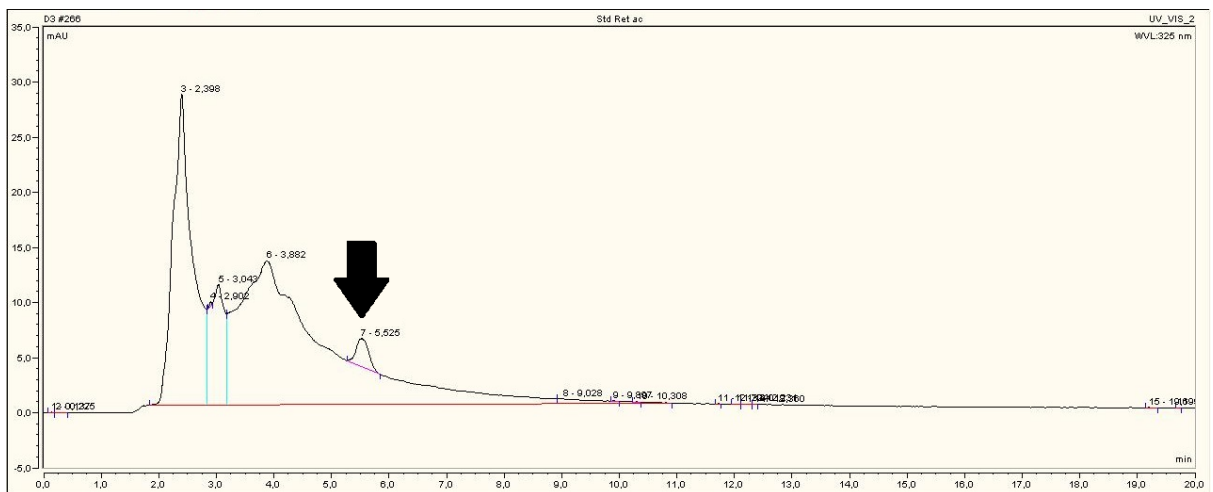
Figur H.12. HPLC-kromatogram för laboration 5; saponifiering av mellanmjölk. Ingen klar absorptionstopp för varken retinol eller retinylacetat kan detekteras. Detektionsvåglängd 325 nm.



Figur H.13. HPLC-kromatogram för laboration 6; saponifiering av bröstmjolk. Den grå pilen visar absorptionstopp för ergocalciferol. Ingen absorptionstopp för kolekalciferol kan detekteras. Detektionsvåglängd 265 nm.



Figur H.14. HPLC-kromatogram för laboration 6; saponifiering av bröstmjolk. Den svarta pilen visar absorptionstopp för retinol. Den tillsatta retinylacetaten kan inte observeras. Detektionsvåglängd 325 nm.



Figur H.15. HPLC-kromatogram för laboration 7; saponifiering av milliQ-vatten. Den svarta pilen visar absorptionstopp för retinol. Den tillsatta retinylacetaten kan inte observeras. Detektionsvåglängd 325 nm.

Bilaga I: Kromatogramareor från HPLC och beräknade vitaminkoncentrationer i vitaminanalys

I denna bilaga presenteras tabeller över erhållna värden på areor från absorptionstoppar för vitaminerna i HPLC-kromatogrammen tillsammans med beräknade koncentrationer retinol och kolekalciferol.

Tabell I.1. Resultat erhållna i HPLC-kromatogram för laboration 1. Tabellen visar värden på areor från absorptionstoppar av retinol, retinylacetat, ergokalciferol och kolekalciferol erhållna i HPLC-analysen samt beräknade koncentrationer av retinol och kolekalciferol för samtliga prov. Intern och extern standard hade inte samma koncentration i denna laboration, därmed kan dessa värden inte jämföras.

| Prov | Retinol [mAU·min] | Retinylacetat [mAU·min] | Retinol [ng/mL] | Ergokalciferol [mAU·min] | Kolekalciferol [mAU·min] | Kolekalciferol [ng/mL] |
|--------------------|----------------------|----------------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Bröstmjök 1 | 0,117 | 3,91 | 7,42 | 1,58 | 0,479 | 331 |
| Bröstmjök 2 | 0,197 | 4,67 | 10,5 | 1,47 | 0,0497 | 36,8 |
| Bröstmjök 3 | 0,184 | 4,21 | 10,9 | 3,14 | 0,0580 | 20,2 |
| Bröstmjök 4 | 0,291 | 5,32 | 13,6 | 4,65 | 0,0658 | 15,5 |
| Extern standard | 1,11 | 2,88 | | 1,60 | 1,67 | |

Tabell I.2. Resultat erhållna i HPLC-kromatogram för laboration 2. Tabellen visar värden på areor från absorptionstoppar av retinol, retinylacetat, ergokalciferol och kolekalciferol erhållna i HPLC-analysen samt beräknade koncentrationer av retinol och kolekalciferol för samtliga prov. - innebär inga detektbara nivåer av ämnet.

| Prov | Retinol [mAU·min] | Retinylacetat [mAU·min] | Retinol [ng/mL] | Ergokalciferol [mAU·min] | Kolekalciferol [mAU·min] | Kolekalciferol [ng/mL] |
|--------------------|----------------------|----------------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Mellanjök 1 | - | 0,0414 | - | 0,0192 | 0,0323 | 172 |
| Mellanjök 2 | - | 0,0361 | - | 0,0280 | 0,0279 | 102 |
| Mellanjök 3 | - | - | - | 0,0199 | 0,0160 | 82,3 |
| Mellanjök 4 | - | 0,0277 | - | 0,0850 | 0,0262 | 31,6 |
| Extern standard | 0,497 | 1,14 | | 0,695 | 0,708 | |

Tabell I.3. Resultat erhållna i HPLC-kromatogram för laboration 3. Tabellen visar värden på areor från absorptionstoppar av retinol, retinylacetat, ergokalciferol och kolekalciferol erhållna i HPLC-analysen samt beräknade koncentrationer av retinol och kolekalciferol för samtliga prov. **P** står för prov innehållande pellet och **S** för prov innehållande supernatant och - innebär inga detektbara nivåer av ämnet.

| Prov | Retinol [mAU·min] | Retinylacetat [mAU·min] | Retinol [ng/mL] | Ergokalciferol [mAU·min] | Kole- kalciferol [mAU·min] | Kole- kalciferol [ng/mL] |
|---------------------|----------------------|----------------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Lättmjök 1 P | - | 0,0474 | - | 0,0155 | 0,0636 | 408 |
| Lättmjök 2 P | - | 0,0431 | - | 0,0221 | 0,0555 | 250 |
| Mellanjök 1 P | - | 0,114 | - | 0,0611 | 0,227 | 370 |
| Mellanjök 2 P | - | 0,108 | - | 0,0628 | 0,268 | 424 |
| Standardmjök 1 P | - | 0,108 | - | 0,0910 | 0,397 | 435 |
| Standardmjök 2 P | - | 0,0781 | - | 0,0342 | 0,338 | 984 |

| | | | | | | |
|---------------------|--------|-------|-------|--------|--------|------|
| Bröstmjöl 1 P | - | 0,139 | - | 0,0761 | - | - |
| Bröstmjöl 2 P | 0,0128 | 0,217 | 6,06 | 0,0813 | - | - |
| Lättmjöl 1 S | - | 0,273 | - | 0,135 | 0,0220 | 16,2 |
| Lättmjöl 2 S | - | 0,223 | - | 0,129 | 0,0437 | 33,6 |
| Mellanjöl 1 S | - | 0,181 | - | 0,0933 | - | - |
| Mellanjöl 2 S | - | 0,167 | - | 0,0950 | 0,0359 | 37,6 |
| Standardmjöl 1 S | - | 0,109 | - | 0,0614 | 0,0511 | 82,8 |
| Standardmjöl 2 S | - | - | - | - | - | - |
| Bröstmjöl 1 S | 0,111 | 0,146 | 0,761 | - | - | - |
| Bröstmjöl 2 S | 0,0957 | 0,140 | 0,686 | 0,0533 | - | - |
| Extern standard | 2,87 | 2,01 | | 0,532 | 0,638 | |

Tabell I.4. Resultat erhållna i HPLC-kromatogram för laboration 4. Tabellen visar värden på areor från absorptionstoppar av retinol, retinylacetat, ergokalciferol och kolekalciferol erhållna i HPLC-analysen samt beräknade koncentrationer av retinol och kolekalciferol för samtliga prov. - innebär inga detektbara nivåer av ämnet

| Prov | Retinol [mAU·min] | Retinylacetat [mAU·min] | Retinol [ng/mL] | Ergokalciferol [mAU·min] | Kole- kalciferol [mAU·min] | Kole- kalciferol [ng/mL] |
|--------------------|----------------------|----------------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Lättmjöl 1 | - | 0,634 | - | 0,189 | 0,125 | 137 |
| Lättmjöl 2 | - | 0,817 | - | 0,282 | 0,162 | 119 |
| Mellanjöl 1 | - | 0,609 | - | 0,347 | 0,367 | 218 |
| Mellanjöl 2 | - | 0,635 | - | 0,255 | 0,329 | 267 |
| Standardmjöl 1 | - | 0,583 | - | 0,396 | 0,738 | 385 |
| Standardmjöl 2 | - | 0,546 | - | 0,389 | 0,711 | 377 |
| Bröstmjöl 1 | - | 0,265 | - | 0,230 | - | - |
| Bröstmjöl 2 | - | - | - | 0,221 | - | - |
| Extern standard | 2,87 | 2,01 | | 0,532 | 0,638 | |

Tabell I.5. Resultat erhållna i HPLC-kromatogram för laboration 6. Tabellen visar värden på areor från absorptionstoppar av retinol, retinylacetat, ergokalciferol och kolekalciferol erhållna i HPLC-analysen för samtliga prov. - innebär inga detektbara nivåer av ämnet.

| Prov | Retinol [mAU·min] | Retinylacetat [mAU·min] | Ergokalciferol [mAU·min] | Kolekalciferol [mAU·min] |
|-----------------|------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Lättmjölk 1 | 0,693 | - | 0,537 | - |
| Lättmjölk 2 | 0,813 | - | 0,522 | - |
| Mellanjölk 1 | 1,04 | - | 0,458 | - |
| Mellanjölk 2 | 0,784 | - | 0,477 | - |
| Bröstmjölk 1 | 4,27 | - | 0,561 | - |
| Bröstmjölk 2 | 4,41 | - | 0,483 | - |
| Extern standard | 2,78 | 1,98 | 0,657 | 0,709 |

Tabell I.6. Resultat i HPLC-kromatogram för laboration 7. Tabellen visar värden på areor från absorptionstoppar av retinol, retinylacetat och kolekalciferol erhållna i HPLC-analysen för provet. - innebär inga detektbara nivåer av ämnet.

| Prov | Retinol [mAU·min] | Retinylacetat [mAU·min] | Kolekalciferol [mAU·min] |
|---------------|------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| milliQ-vatten | 0,650 | - | - |

Bilaga J: Vitaminkoncentrationer i mjölk

I denna bilaga presenteras teoretiska innehåll av vitamin A och D i komjölk från Arla Foods och i bröstmjölk.

Tabell J.1. Vitamininnehåll i mjölk från Arla Foods. Tabellen visar koncentrationen retinol och kolekalciferol för lättmjölk, mellanmjölk och standardmjölk från Arla Foods (105).

| Ämne | Retinol [ng/mL] | Kolekalciferol [ng/mL] |
|---------------|-----------------|------------------------|
| Lättmjölk | 43 | 10 |
| Mellanmjölk | 129 | 10 |
| Standardmjölk | 258 | 10 |

Tabell J.2. Teoretiska vitamininnehåll i bröstmjölk. Tabellen visar teoretiska värden av koncentrationen vitamin A och kolekalciferol i bröstmjölk (J1).

| Ämne | Vitamin A ($\geq 95\%$ retinylestrar) [ng/mL] | Kolekalciferol [ng/mL] |
|------------|--|------------------------|
| Bröstmjölk | 310-620 | 0,25-0,36 |

- J1. LAMMI-KEEFE CJ. Handbook of Milk Composition [Internet]. Handbook of Milk Composition. Elsevier; 1995 [citerad 15 maj 2016]. 693-717 s. Hämtad från:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123844309500317>

Bilaga K: Mineralkoncentrationer i bröstmjök

I denna bilaga presenteras koncentrationsintervall av järn, zink, koppar, kobolt, mangan och nickel i bröstmjök framtagna vid jämförelse av andra studier.

Tabell K.1. Teoretiska mineralinnehåll i bröstmjök (K1–K6).

| Ämne | Järn | Zink | Koppar | Kobolt | Mangan | Nickel |
|--|--------|-------|----------|---------------------------------------|---|---------------------------------------|
| Koncentration i bröstmjök [$\mu\text{g/mL}$] | 0,15-5 | 0,7-5 | 0,12-1,4 | $2 \cdot 10^{-4}$ - $9 \cdot 10^{-3}$ | $2 \cdot 10^{-3}$ - $2,2 \cdot 10^{-2}$ | $1 \cdot 10^{-4}$ - $5 \cdot 10^{-2}$ |

- K1. Biego GH, Joyeux M, Hartemann P, Debry G. Determination of mineral contents in different kinds of milk and estimation of dietary intake in infants. *Food Addit Contam* [Internet]. Taylor & Francis Group; 10 oktober 1998 [citerad 15 maj 2016];15(7):775–81. Hämtad från: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652039809374709>
- K2. Krachler M, Prohaska T, Koellensperger G, Rossipal E, Stingeder G. Concentrations of selected trace elements in human milk and in infant formulas determined by magnetic sector field inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Biol Trace Elem Res* [Internet]. augusti 2000 [citerad 15 maj 2016];76(2):97–112. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11049226>
- K3. Krachler M, Prohaska T, Koellensperger G, Rossipal E, Stingeder G. Concentrations of selected trace elements in human milk and in infant formulas determined by magnetic sector field inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Biol Trace Elem Res* [Internet]. augusti 2000 [citerad 15 maj 2016];76(2):97–112. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11049226>
- K4. Roekens E, Deelstra H, Robberecht H. Trace elements in human milk, selenium a case study. *Sci Total Environ* [Internet]. mars 1985 [citerad 15 maj 2016];42(1-2):91–108. Hämtad från: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0048969785900105>
- K5. Gürbay A, Charehsaz M, Eken A, Sayal A, Girgin G, Yurdakök M, m.fl. Toxic metals in breast milk samples from Ankara, Turkey: assessment of lead, cadmium, nickel, and arsenic levels. *Biol Trace Elem Res* [Internet]. oktober 2012 [citerad 15 maj 2016];149(1):117–22. Hämtad från: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22528772>
- K6. Vuori E, Makinen S, Kara R, Kuitunen P. The effects of the dietary intakes of copper, iron, manganese, and zinc on the trace element content of human milk. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 01 februari 1980 [citerad 15 maj 2016];33(2):227–31. Hämtad från: <http://ajcn.nutrition.org/content/33/2/227.short>

Bilaga L: Laboration för mineralanalys

I denna bilaga presenteras handledningen för minerallaborationen. Metoden är modifierad från Fredrikson et al. (88).

- Tillsätt specifik mängd bröstmjök och fyll upp med milliQ-vatten till en total volym av 3 mL i en teflonvial. Fyll upp med milliQ-vatten till en total volym av 5 mL i den första vialen.
- Tillsätt 0,75 mL koncentrerad salpetersyra och 0,15 mL koncentrerad saltsyra till varje vial.
- Kör ett temperaturprogram som når 180°C på 15 minuter. Håll temperaturen i 20 minuter.
- Låt proverna svalna till rumstemperatur.
- För över proverna till 15 mL Falconrör. Skölj ur vialerna med milliQ-vatten och tillsätt även detta till Falconrören.
- Späd med milliQ-vatten till 10 mL.
- Vortexa rören.
- För över 5 mL till ett nytt 15 mL Falconrör.
- Indunsta rören med luft och späd med 0,9 ml milliQ-vatten.
- Tillsätt 0,1 mL askorbinsyra (20 mg/mL).
- Blanda och överför till 500 µL plastvialer.
- Analysera i HPLC (mobil fas: pyridin-2,6-dikarboxylat (PDCA), flöde: 0,8 mL/min, injektionsvolym: 25 µL, körtid: 18 minuter, detektionsvåglängd: 500 nm, analytisk kolonn: IonPac CS5A Dionex 250·4 mm, förkolonn: IonPac CG5A Dionex 50·4 mm).

Bilaga M: Provuppsättningar i mineralanalys

I denna bilaga presenteras provuppsättningar för alla fyra minerallaborationerna, hur mycket bröstmjök som användes och hur proven späddes.

Tabell M.1. Provuppsättningen och försöksplanering för laboration 1. Tabellen visar identifieringsnumret på vialen, korresponderande bröstmjölksvolym, volymen lösning i varje Falconrör efter mikrovågsnedbrytning, inkluderat volymen milliQ-vatten som den späddes med, samt volymen lösning som provet späddes till efter indunstningssteget (prov 11, 12 och 19-22 indunstades inte men viss volym avdunstade dock).

| Vial | Ursprunglig volym bröstmjök [mL] | Spädning med milliQ-vatten till total volym efter mikrovågsnedbrytning [mL] | Volym lösning innan HPLC [mL] |
|------|----------------------------------|---|-------------------------------|
| 1 | 0,5 | 11 | 0,5 |
| 2 | 0,5 | 10 | 0,5 |
| 3 | 0,5 | 10 | 0,5 |
| 4 | 0,5 | 10,25 | 0,5 |
| 5 | 0,5 | 10 | 0,5 |
| 6 | 0,5 | 10 | 0,5 |
| 7 | 0,5 | 10,25 | 2,75 |
| 8 | 0,5 | 10,25 | 2,75 |
| 9 | 0,5 | 10,25 | 2,75 |
| 10 | 0,5 | 10 | 2,75 |
| 11 | 0,5 | 12 | 11,75 |
| 12 | 0,5 | 10 | 9,75 |
| 13 | 1,25 | 9,5 | 2,75 |
| 14 | 1,25 | 8,5 | 2,75 |
| 15 | 1,25 | 7,8 | 2,75 |
| 16 | 1,25 | 10 | 2,75 |
| 17 | 0,5 | 7,25 | 0,5 |
| 18 | 0,5 | 9,25 | 0,5 |
| 19 | 3 | 13,5 | 13,5 |
| 20 | 3 | 11,75 | 10,5 |
| 21 | 3 | 10,5 | 10,5 |
| 22 | 3 | 11,25 | 11,25 |
| 23 | 0,5 | 12,5 | 0,5 |
| 24 | 0,5 | 14 | 0,5 |

Tabell M.2. Provuppsättning för laboration 2. Tabellen visar identifieringsnumret på vialen, dess korresponderande bröstmjölksvolym och volymen milliQ-vatten som tillsattes varje vial, i vilken **B** indikerar att provet är en blank.

| Vial | Volym bröstmjök [mL] | Volym milliQ-vatten [mL] |
|------|----------------------|--------------------------|
| B28 | 0 | 5 |
| B29 | 0 | 3 |
| 30 | 0,25 | 2,75 |
| 31 | 0,25 | 2,75 |
| 32 | 0,25 | 2,75 |
| 33 | 0,5 | 2,5 |
| 34 | 0,5 | 2,5 |
| 35 | 0,5 | 2,5 |
| 36 | 1 | 2 |
| 37 | 1 | 2 |
| 38 | 2 | 1 |
| 39 | 2 | 1 |

Tabell M.3. Provuppsättning för laboration 3. Tabellen visar identifieringsnumret på vialen, dess korresponderande bröstmjölksvolym och volymen milliQ-vatten som tillsattes varje vial, i vilken **B** indikerar att provet är en blank.

| Vial | Volym bröstmjök [mL] | Volym milliQ-vatten [mL] |
|------|----------------------|--------------------------|
| B52 | 0 | 5 |

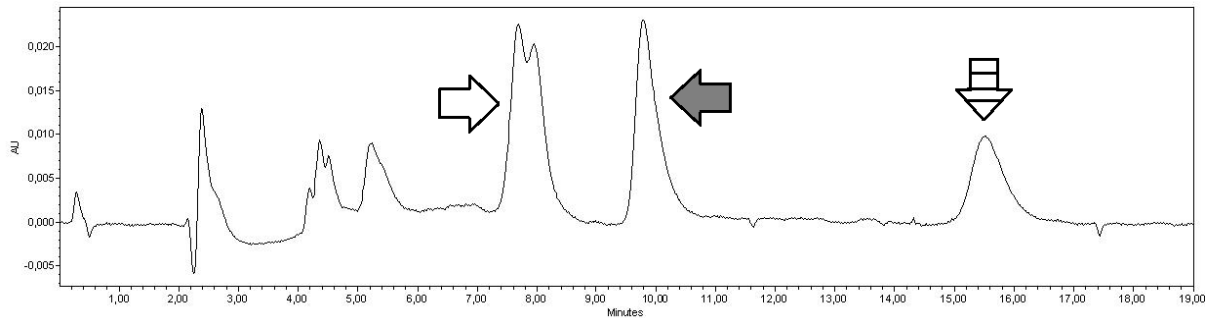
| | | |
|-----|------|------|
| B53 | 0 | 3 |
| B54 | 0 | 3 |
| 55 | 0,25 | 2,75 |
| 56 | 0,25 | 2,75 |
| 57 | 0,25 | 2,75 |
| 58 | 0,5 | 2,5 |
| 59 | 0,5 | 2,5 |
| 60 | 0,5 | 2,5 |
| 61 | 1 | 2 |
| 62 | 1 | 2 |
| 63 | 1 | 2 |

Tabell M.4. Provuppsättning för laboration 4. Tabellen visar identifieringsnumret på vialen, dess korresponderande bröstmjölksvolym och volymen milliQ-vatten som tillsattes varje vial, i vilken **B** indikerar att provet är en blank.

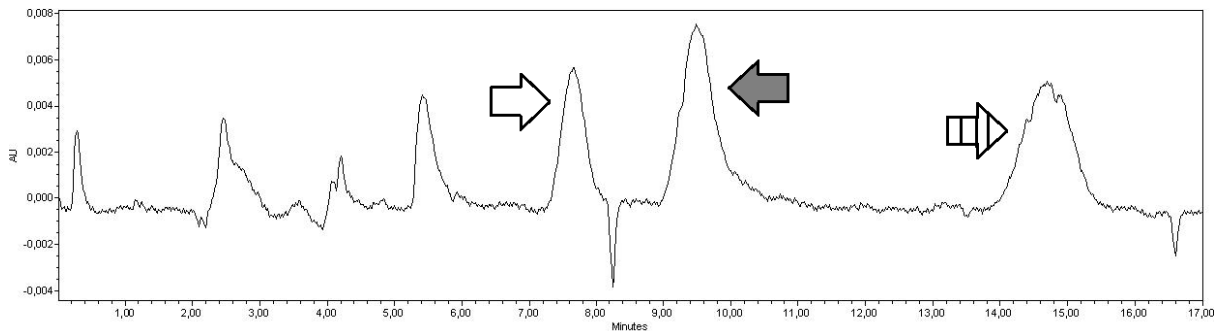
| Vial | Volym bröstmjök [mL] | Volym milliQ-vatten [mL] |
|------|----------------------|--------------------------|
| B67 | 0 | 5 |
| B68 | 0 | 3 |
| B69 | 0 | 3 |
| 70 | 0,5 | 2,5 |
| 71 | 0,5 | 2,5 |
| 72 | 0,5 | 2,5 |
| 73 | 1 | 2 |
| 74 | 1 | 2 |
| 75 | 1 | 2 |
| 76 | 1 | 2 |
| 77 | 1 | 2 |
| 78 | 1 | 2 |

Bilaga N: Kromatogram från HPLC i mineralanalys

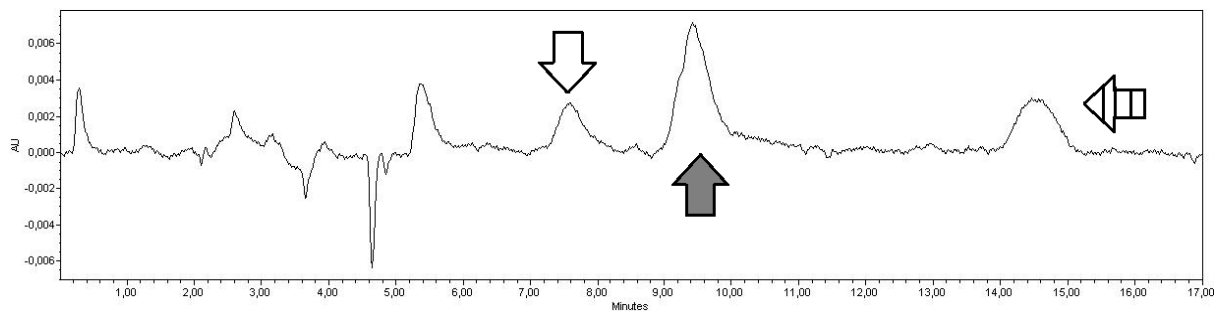
I denna bilaga presenteras exempelbilder från HPLC-analysen för de olika minerallaborationerna, samt ett exempel på ett prov med järn- och nickelkontaminering .



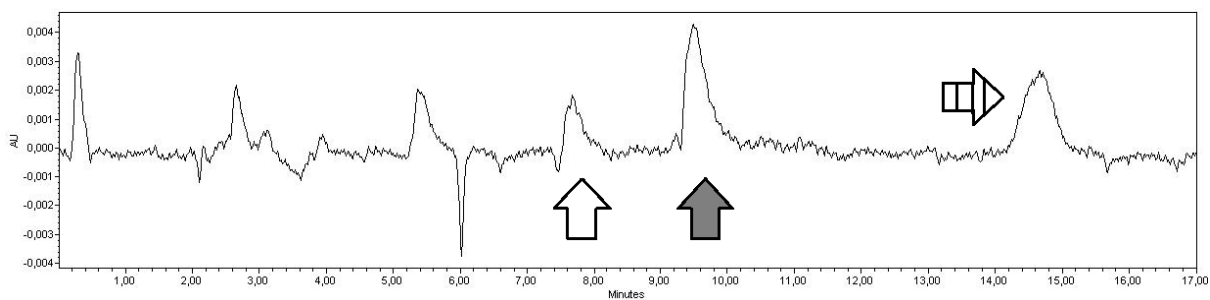
Figur N.1. HPLC-kromatogram för vial 3 laboration 1. Figuren visar ett exempel på ett kromatogram från laboration 1. Den vita pilen visar Cu, den grå Zn och den randiga Fe. Detektionsvåglängd 500 nm



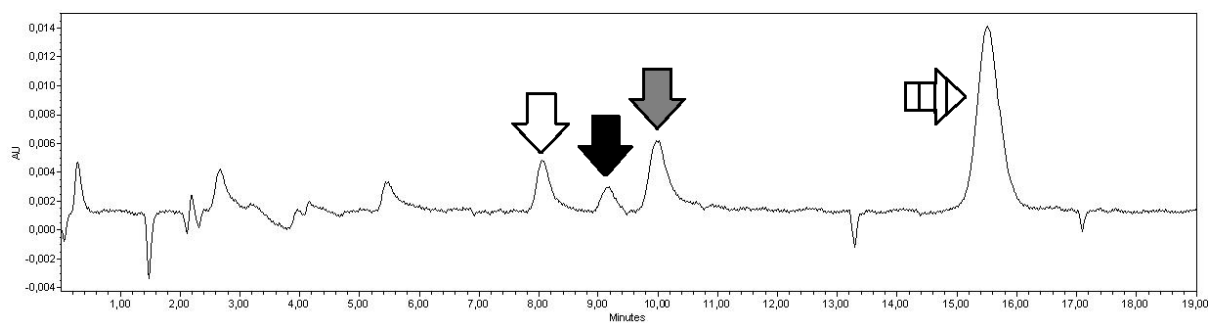
Figur N.2. HPLC-kromatogram för vial 34 laboration 2. Figuren visar ett exempel på ett kromatogram från laboration 2. Den vita pilen visar Cu, den grå Zn och den randiga Fe. Detektionsvåglängd 500 nm.



Figur N.3. HPLC-kromatogram för vial 61 laboration 3. Figuren visar ett exempel på ett kromatogram från laboration 3. Den vita pilen visar Cu, den grå Zn och den randiga Fe. Detektionsvåglängd 500 nm.



Figur N.4. HPLC-kromatogram för vial 72 laboration 4. Figuren visar ett exempel på ett kromatogram från laboration 4. Den vita pilen visar Cu, den grå Zn och den randiga Fe. Detektionsvåglängd 500 nm.



Figur N.5. HPLC-kromatogram för vial 9 laboration 1: Figuren visar ett exempel på ett prov som är kontaminerat med järn och nickel. Den vita pilen visar Cu, den svarta nickel, den grå Zn och den randiga Fe. Detektionsvåglängd 500 nm.

Bilaga O: Kromatogramareor från HPLC i mineralanalys

I denna bilaga presenterar tabeller över värdena på absorptionstopparns areor för mineralerna från HPLC-kromatogrammen.

Tabell O.1. Resultat erhållna i HPLC-kromatogram för laboration 1. Tabellen visar identifieringsnumret på vialen och värden på areor på absorptionstoppar av järn, zink, koppar och nickel erhållna i HPLC-analysen, i vilken **B** indikerar att provet är en blank och - innebär inga detektbara nivåer av ämnet.

| Vialnummer | Järn [mAU·min] | | Zink [mAU·min] | | Koppar [mAU·min] | | Nickel [mAU·min] | |
|--------------|----------------|---------|----------------|--------|------------------|---------|------------------|---------|
| | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| Analysnummer | | | | | | | | |
| 1 | 1650000 | 1690000 | 489000 | 433000 | 222000 | 220000 | 112000 | 98000 |
| 2 | 318000 | 217000 | 520000 | 582000 | 176000 | 183000 | - | - |
| 3 | 342000 | 332000 | 533000 | 574000 | 367000 | 376000 | - | - |
| 4 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | 359000 | 331000 | 549000 | 556000 | 204000 | 217000 | - | - |
| 7 | 73500 | 51300 | 91000 | 86200 | 112000 | 110000 | - | - |
| 8 | 95500 | 80000 | 99500 | 75100 | 81100 | 80000 | - | - |
| 9 | - | 314000 | - | 80100 | - | 44200 | - | 27300 |
| 10 | - | 124000 | - | 88100 | - | 114000 | - | - |
| 11 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 12 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 13 | - | 78100 | - | 244000 | - | 73500 | - | - |
| 14 | - | 195000 | - | 395000 | - | 136000 | - | - |
| 15 | - | 89600 | - | 322000 | - | 139000 | - | - |
| 16 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 17 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 18 | 6760000 | 6830000 | 400000 | 463000 | 613000 | 623000 | 650000 | 681000 |
| 19 | 27200 | - | 201000 | - | 51800 | - | - | - |
| 20 | 123000 | - | 163000 | - | 87200 | - | - | - |
| 21 | 71800 | - | 275000 | - | 79300 | - | - | - |
| 22 | 76600 | - | 215000 | - | 30500 | - | - | - |
| 23 | 389000 | - | 441000 | - | 750000 | - | - | - |
| 24 | 232000 | - | 307000 | - | 592000 | - | - | - |
| Standard 1 | 2390000 | 2160000 | 801000 | 799000 | 1470000 | 1400000 | 1540000 | 1490000 |
| Standard 2 | 2190000 | 2610000 | 728000 | 747000 | 1400000 | 1250000 | 1420000 | 1450000 |
| Standard 3 | 2350000 | 2210000 | 799000 | 832000 | 1610000 | 1520000 | 1620000 | 1590000 |
| B25 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| B26 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| B27 | - | - | - | - | - | - | - | - |

Tabell O.2. Resultat erhållna i HPLC-kromatogram för laboration 2. Tabellen visar identifieringsnumret på vialen och värden på areor på absorptionstoppar av järn, zink, koppar och nickel erhållna i HPLC-analysen, i vilken **B** indikerar att provet är en blank och - innebär inga detektbara nivåer av ämnet.

| Vialnummer | Järn [mAU·min] | Zink [mAU·min] | Koppar [mAU·min] | Nickel [mAU·min] |
|------------|----------------|----------------|------------------|------------------|
| B28 | 306476 | - | 37739 | - |
| B29 | 114537 | - | 14385 | - |
| 30 | 164819 | 55215 | 822497 | - |
| 31 | 18000 | 45000 | 494000 | - |
| 32 | 15000 | 42000 | 295000 | - |
| 33 | 120000 | 112000 | 47000 | - |
| 34 | 78000 | 107000 | 32000 | - |
| 35 | 147000 | 101000 | 125000 | - |
| 36 | 186000 | 213000 | 175000 | - |
| 37 | 261000 | 271000 | 152000 | - |
| 38 | 223000 | 460000 | 203000 | - |
| 39 | 407000 | 536000 | 158000 | - |
| B40 | - | - | - | - |
| B41 | - | - | - | - |

| | | | | |
|------------|--------|--------|--------|--------|
| 42 | - | - | - | - |
| 43 | - | - | - | - |
| 44 | - | - | - | - |
| 45 | - | - | - | - |
| 46 | - | - | - | - |
| 47 | - | - | - | - |
| 48 | - | 57053 | - | - |
| 49 | - | - | - | - |
| 50 | - | 63957 | 26778 | - |
| 51 | - | 45714 | 13651 | - |
| Standard 1 | 992000 | 470000 | 719000 | 783000 |
| Standard 2 | 911000 | 419000 | 674000 | 707000 |

Tabell O.3. Resultat erhållna i HPLC-kromatogram för laboration 3. Tabellen visar identifieringsnumret på vialen och värden på areor på absorptionstoppar av järn, zink, koppar och nickel erhållna i HPLC-analysen, i vilken **B** indikerar att provet är en blank, **IB** att provet är en indunstningsblank, * att absorptionstoppen var svåravläst på grund av problematik med HPLC:n vid den retentionstiden och - innebär inga detektbara nivåer av ämnet.

| Vialnummer | Järn [mAU·min] | Zink [mAU·min] | Koppar [mAU·min] | Nickel [mAU·min] |
|------------|----------------|----------------|------------------|------------------|
| B52 | 56600 | - | 19400 | - |
| B53 | 180000 | - | 10100 | - |
| B54 | 49600* | - | - | - |
| 55 | 80800 | 56500 | 15000 | - |
| 56 | 138000 | 46000 | 21500 | - |
| 57 | 498000 | 45300 | 38400 | 42600 |
| 58 | 82900 | 95600 | 26700 | - |
| 59 | 60500 | 100000 | 34500 | - |
| 60 | 89300 | 193000 | 53200 | - |
| 61 | 66100 | 106000 | 35700 | - |
| 62 | 129001 | 203000 | 65800 | - |
| 63 | 120000* | 195000 | 49800 | - |
| IB64 | - | - | - | - |
| IB65 | - | - | - | - |
| IB66 | - | - | - | - |
| Standard 1 | 951000 | 425000 | 644000 | 688000 |
| Standard 2 | 967000 | 424000 | 649000 | 692000 |

Tabell O.4. Resultat erhållna i HPLC-kromatogram för laboration 4. Tabellen visar identifieringsnumret på vialen och värden på areor på absorptionstoppar av järn, zink, koppar och nickel erhållna i HPLC-analysen, i vilken **B** indikerar att provet är en blank, **IB** att provet är en indunstningsblank, * att absorptionstoppen var svåravläst på grund av problematik med HPLC:n vid den retentionstiden och - innebär inga detektbara nivåer av ämnet.

| Vialnummer | Järn [mAU·min] | Zink [mAU·min] | Koppar [mAU·min] | Nickel [mAU·min] |
|------------|----------------|----------------|------------------|------------------|
| B67 | 51000 | 10700 | - | - |
| B68 | 51000 | - | - | - |
| B69 | 80400 | - | 7750 | - |
| 70 | 98600 | 104000 | 27100 | - |
| 71 | 80700 | 83400 | 25600 | - |
| 72 | 60400 | 87600* | 33900 | - |
| 73 | 121000 | 204000 | 59100 | - |
| 74 | 157000 | 231000 | 65400 | - |
| 75 | 164000 | 215000 | 59700 | - |
| 76 | 116000 | 207000 | 64900 | - |
| 77 | 98500 | 205000 | 111000 | - |
| 78 | 164000 | 310000 | 59700 | - |
| IB79 | 30600 | - | - | - |
| IB80 | 38500 | - | - | - |
| IB81 | 25400 | - | - | - |
| Standard | 910000 | 425000 | 599000 | 664000 |

Bilaga P: Mineralkoncentrationer beräknade från HPLC-resultat

I denna bilaga presenteras de beräknade koncentrationerna av järn, zink, koppar, kobolt, mangan och nickel utifrån uppmätta areor av absorptionstoppar.

Tabell P.1. Resultat från laboration 1 innefattande mineralkoncentrationer. Tabellen visar identifieringsnumret på vialen, korresponderande bröstmjölksvolym, volymen lösning som provet späddes till efter indunstningssteget och koncentrationerna av järn, zink, koppar, kobolt, mangan och nickel, i vilken **n** är antalet lyckade mätningar, **IB** indikerar att provet är en indunstningsblank och - innebär inga detektbara nivåer av ämnet.

| Vial | Ursprunglig volym bröstmjölk [mL] | Volym innan HPLC [mL] | Järn [µg/mL bröstmjölk] | Zink [µg/mL bröstmjölk] | Koppar [µg/mL bröstmjölk] | Kobolt [µg/mL bröstmjölk] | Mangan [µg/mL bröstmjölk] | Nickel [µg/mL bröstmjölk] |
|----------|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 (n=2) | 0,5 | 0,5 | 1,59 | 1,29 | 0,336 | - | - | 0,152 |
| 2 (n=2) | 0,5 | 0,5 | 0,231 | 1,41 | 0,249 | - | - | - |
| 3 (n=2) | 0,5 | 0,5 | 0,290 | 1,41 | 0,515 | - | - | - |
| 4 (n=0) | 0,5 | 0,5 | - | - | - | - | - | - |
| 5 (n=0) | 0,5 | 0,5 | - | - | - | - | - | - |
| 6 (n=2) | 0,5 | 0,5 | 0,297 | 1,41 | 0,292 | - | - | - |
| 7 (n=2) | 0,5 | 2,75 | 0,302 | 1,27 | 0,864 | - | - | - |
| 8 (n=2) | 0,5 | 2,75 | 0,425 | 1,25 | 0,627 | - | - | - |
| 9 (n=1) | 0,5 | 2,75 | 1,52 | 1,15 | 0,344 | - | - | 0,202 |
| 10 (n=1) | 0,5 | 2,75 | 0,586 | 1,23 | 0,872 | - | - | - |
| 11 (n=0) | 0,5 | 11,75 | - | - | - | - | - | - |
| 12 (n=0) | 0,5 | 9,75 | - | - | - | - | - | - |
| 13 (n=1) | 1,25 | 2,75 | 0,141 | 1,30 | 0,213 | - | - | - |
| 14 (n=1) | 1,25 | 2,75 | 0,314 | 1,89 | 0,352 | - | - | - |
| 15 (n=1) | 1,25 | 2,75 | 0,133 | 1,41 | 0,331 | - | - | - |
| 16 (n=0) | 1,25 | 2,75 | - | - | - | - | - | - |
| 17 (n=0) | 0,5 | 0,5 | - | - | - | - | - | - |
| 18 (n=2) | 0,5 | 0,5 | 5,42 | 1,02 | 0,792 | - | - | 0,810 |
| 19 (n=1) | 3 | 13,5 | 0,0586 | 1,28 | 0,179 | - | - | - |
| 20 (n=1) | 3 | 10,5 | 0,206 | 0,810 | 0,235 | - | - | - |
| 21 (n=1) | 3 | 10,5 | 0,120 | 1,36 | 0,214 | - | - | - |
| 22 (n=1) | 3 | 11,25 | 0,138 | 1,14 | 0,0881 | - | - | - |
| 23 (n=1) | 0,5 | 0,5 | 0,420 | 1,40 | 1,30 | - | - | - |

| | | | | | | | | |
|---------------|-----|-----|-------|------|------|---|---|---|
| 24 (n=1) | 0,5 | 0,5 | 0,280 | 1,07 | 1,15 | - | - | - |
| IB25 (n=1) | 0 | 5 | - | - | - | - | - | - |
| IB26 (n=1) | 0 | 5 | - | - | - | - | - | - |
| IB27 (n=1) | 0 | 5 | - | - | - | - | - | - |

Tabell P.2. Resultat från laboration 2 innefattande mineralkoncentrationer. Tabellen visar identifieringsnumret på vialen, korresponderande bröstmjölksvolym, volymen lösning som provet späddes till efter indunstningssteget och koncentrationerna av järn, zink, koppar, kobolt, mangan och nickel. **B** indikerar att provet är en blank, + betyder fel injektionsvolym på det provet och - innebär inga detektbara nivåer av ämnet.

| Vial | Ursprunglig volym bröstmjolk [mL] | Volym innan HPLC [mL] | Järn [µg/mL bröstmjolk] | Zink [µg/mL bröstmjolk] | Koppar [µg/mL bröstmjolk] | Kobolt [µg/mL bröstmjolk] | Mangan [µg/mL bröstmjolk] | Nickel [µg/mL bröstmjolk] |
|------|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| B28+ | 0 | 1 | - | - | - | - | - | - |
| B29+ | 0 | 1 | - | - | - | - | - | - |
| 30+ | 0,25 | 1 | 1,39 | 0,994 | 9,45 | - | - | - |
| 31 | 0,25 | 1 | 0,151 | 0,810 | 5,67 | - | - | - |
| 32 | 0,25 | 1 | 0,126 | 0,756 | 3,39 | - | - | - |
| 33 | 0,5 | 1 | 0,504 | 1,01 | 0,270 | - | - | - |
| 34 | 0,5 | 1 | 0,328 | 0,963 | 0,184 | - | - | - |
| 35 | 0,5 | 1 | 0,618 | 0,909 | 0,718 | - | - | - |
| 36 | 1 | 1 | 0,391 | 0,958 | 0,503 | - | - | - |
| 37 | 1 | 1 | 0,549 | 1,22 | 0,436 | - | - | - |
| 38 | 2 | 1 | 0,234 | 1,04 | 0,291 | - | - | - |
| 39 | 2 | 1 | 0,428 | 1,21 | 0,227 | - | - | - |
| B40+ | 0 | 5 | - | - | - | - | - | - |
| B41+ | 0 | 5 | - | - | - | - | - | - |
| 42+ | 0,25 | 5 | - | - | - | - | - | - |
| 43+ | 0,25 | 5 | - | - | - | - | - | - |
| 44+ | 0,25 | 5 | - | - | - | - | - | - |
| 45+ | 0,5 | 5 | - | - | - | - | - | - |
| 46+ | 0,5 | 5 | - | - | - | - | - | - |
| 47+ | 0,5 | 5 | - | - | - | - | - | - |
| 48+ | 1 | 5 | - | 0,257 | - | - | - | - |
| 49+ | 1 | 5 | - | - | - | - | - | - |
| 50 | 2 | 5 | - | 0,799 | 0,214 | - | - | - |
| 51 | 2 | 5 | - | 0,571 | 0,109 | - | - | - |

Tabell P.3. Resultat från laboration 3 innefattande mineralkoncentrationer. Tabellen visar identifieringsnumret på vialen, korresponderande bröstmjölksvolym och koncentrationerna järn, zink, koppar, kobolt, mangan och nickel. **B** indikerar att provet är en blank, **IB** att provet är en indunstningsblank, * att absorptionstoppen var svåravläst på grund av problematik med HPLC:n vid den retentionstiden och - innebär inga detektbara nivåer av ämnet.

| Vial | Ursprunglig volym bröstmjolk [mL] | Järn [µg/mL bröstmjolk] | Zink [µg/mL bröstmjolk] | Koppar [µg/mL bröstmjolk] | Kobolt [µg/mL bröstmjolk] | Mangan [µg/mL bröstmjolk] | Nickel [µg/mL bröstmjolk] |
|------|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| B52 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| B53 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| B54 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| 55 | 0,25 | 0,674 | 1,07 | 0,186 | - | - | - |
| 56 | 0,25 | 1,16 | 0,867 | 0,266 | - | - | - |
| 57 | 0,25 | 4,16 | 0,854 | 0,476 | - | - | 0,493 |
| 58 | 0,5 | 0,346 | 0,902 | 0,165 | - | - | - |

| | | | | | | | |
|------|-----|--------|-------|-------|---|--------|---|
| 59 | 0,5 | 0,252 | 0,946 | 0,213 | - | - | - |
| 60 | 0,5 | 0,373 | 1,82 | 0,329 | - | - | - |
| 61 | 1 | 0,138 | 0,502 | 0,110 | - | 0,088* | - |
| 62 | 1 | 0,269 | 0,956 | 0,204 | - | - | - |
| 63 | 1 | 0,251* | 0,921 | 0,154 | - | - | - |
| IB64 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| IB65 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| IB66 | 0 | - | - | - | - | - | - |

Tabell P.4. Resultat från laboration 4 innefattande mineralkoncentrationer. Tabellen visar identifieringsnumret på vialen, korresponderande bröstmjölksvolym och koncentrationerna av järn, zink, koppar, kobolt, mangan och nickel. **B** indikerar att provet är en blank, **IB** att provet är en indunstningsblank, * att absorptionstoppen var svåravläst på grund av problematik med HPLC:n vid den retentionstiden och - innebär inga detektbara nivåer av ämnet.

| Vial | Ursprunglig volym bröstmjolk [mL] | Järn [µg/mL bröstmjolk] | Zink [µg/mL bröstmjolk] | Koppar [µg/mL bröstmjolk] | Kobolt [µg/mL bröstmjolk] | Mangan [µg/mL bröstmjolk] | Nickel [µg/mL bröstmjolk] |
|------|-----------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| B67 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| B68 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| B69 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| 70 | 0,5 | 0,434 | 0,980 | 0,181 | - | - | - |
| 71 | 0,5 | 0,355 | 0,784 | 0,171 | - | - | - |
| 72 | 0,5 | 0,266 | 0,824* | 0,226 | - | - | - |
| 73 | 1 | 0,265 | 0,958 | 0,197 | - | - | - |
| 74 | 1 | 0,344 | 1,09 | 0,218 | - | - | - |
| 75 | 1 | 0,360 | 1,011 | 0,199 | - | - | - |
| 76 | 1 | 0,256 | 0,974 | 0,216 | - | - | - |
| 77 | 1 | 0,217 | 0,966 | 0,371 | - | - | - |
| 78 | 1 | 0,361 | 1,458 | 0,199 | - | - | - |
| IB79 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| IB80 | 0 | - | - | - | - | - | - |
| IB81 | 0 | - | - | - | - | - | - |

Bilaga Q: Blankar för samtliga minerallaborationer

I denna bilaga presenteras de beräknade mineralkoncentrationerna i blankarna från minerallaborationerna.

Tabell Q.1. Mineralkoncentrationer i blankar för samtliga laborationer. Tabellen visar identifieringsnumret på vialen, vilken laboration som den varit delaktig i och kontamineringskoncentrationerna av järn, zink, koppar, kobolt, mangan och nickel. **B** indikerar att provet är en blank, **IB** att provet är en indunstningsblank och - innebär inga detektbara nivåer av ämnet.

| Laboration | Prov | Järn [µg/mL bröst- mjölk] | Zink [µg/mL bröst- mjölk] | Koppar [µg/mL bröst- mjölk] | Kobolt [µg/mL bröst- mjölk] | Mangan [µg/mL bröst- mjölk] | Nickel [µg/mL bröst- mjölk] |
|------------|------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | IB25 | - | - | - | - | - | - |
| 1 | IB26 | - | - | - | - | - | - |
| 1 | IB27 | - | - | - | - | - | - |
| 2 | B28 | 0,322 | - | 0,0542 | - | - | - |
| 2 | B29 | 0,120 | - | 0,0207 | - | - | - |
| 2 | B40 | - | - | - | - | - | - |
| 2 | B41 | - | - | - | - | - | - |
| 3 | B52 | 0,0590 | - | 0,0301 | - | - | - |
| 3 | B53 | 0,188 | - | 0,0156 | - | - | - |
| 3 | B54 | 0,0518 | - | - | - | - | - |
| 3 | IB64 | - | - | - | - | - | - |
| 3 | IB65 | - | - | - | - | - | - |
| 3 | IB66 | - | - | - | - | - | - |
| 4 | B67 | 0,0561 | 0,0253 | - | - | - | - |
| 4 | B68 | 0,0561 | - | - | - | - | - |
| 4 | B69 | 0,0884 | - | 0,0129 | - | - | - |
| 4 | IB79 | 0,0336 | - | - | - | - | - |
| 4 | IB80 | 0,0423 | - | - | - | - | - |
| 4 | IB81 | 0,0279 | - | - | - | - | - |

Bilaga R: Mineralmängder i syror

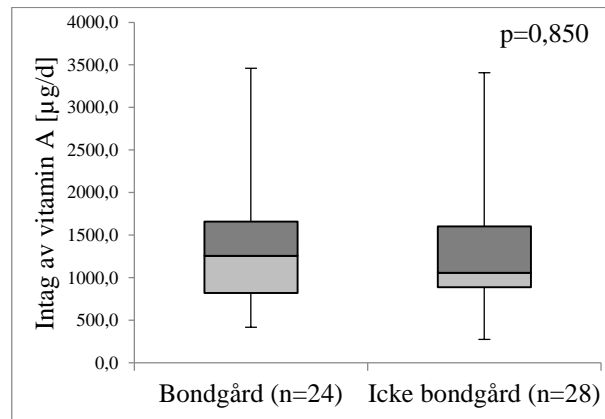
I denna bilaga presenteras syrornas högsta garanterade nivå av olika mineraler.

Tabell R.1. Högsta nivån av mineraler i syror. De två olika syrornas garanterade högsta nivå av olika mineraler mätt i “%”, där 1% motsvarar 10000 ppm, vilket även kan skrivas som 10000 µg/mL.

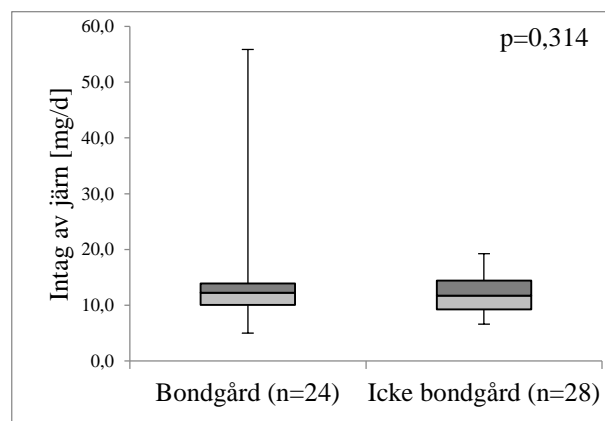
| Syra | Mineral | Garanterad högsta nivå av mineralet i syran |
|--------------|---------|---|
| Saltsyra | Järn | 0,00001% |
| Saltsyra | Zink | 0,000005% |
| Saltsyra | Koppar | 0,000001% |
| Salpetersyra | Järn | 0,00001% |
| Salpetersyra | Zink | 0,000002% |
| Salpetersyra | Koppar | 0,000001% |

Bilaga S: Figurer över mammans intag av vitaminer och mineraler under amning kopplat till boendemiljö respektive barnets allergi vid 36 månaders ålder

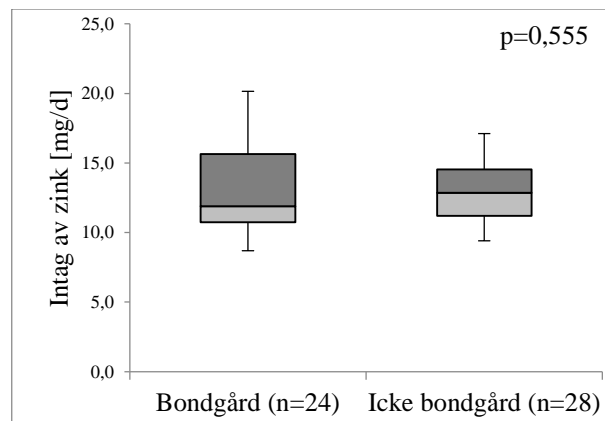
I den här bilagan presenteras låddiagram som visualiserar resultat från den statistiska analysen.



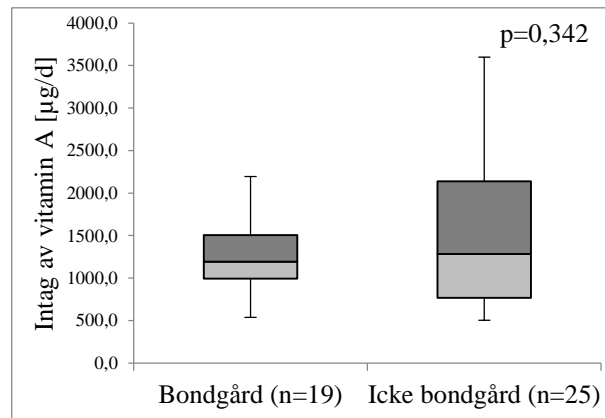
Figur S.1. Låddiagram över mammans intag av vitamin A i µg/dag 1 månad efter förlossningen för bondgårdsmammor respektive mammor boende på landet men inte på bondgård. n är antalet barn i respektive kategori och p är p-värdet från Mann-Whitney-U's test.



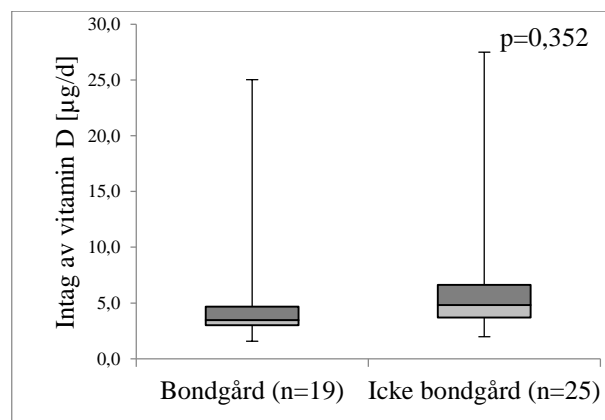
Figur S.2. Låddiagram över mammans intag av järn i mg/dag 1 månad efter förlossningen för bondgårdsmammor respektive mammor boende på landet men inte på bondgård. n är antalet barn i respektive kategori och p är p-värdet från Mann-Whitney-U's test.



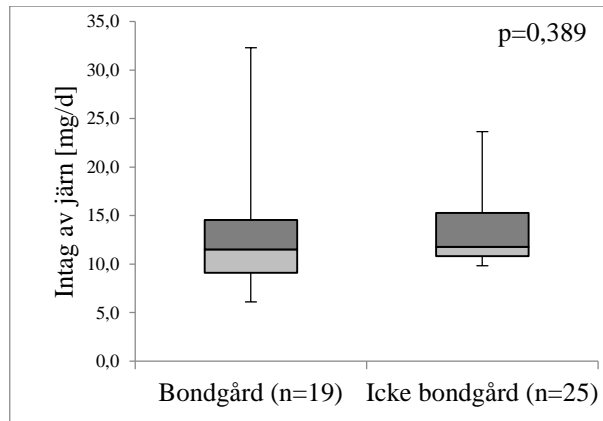
Figur S.3. Låddiagram över mammans intag av zink i mg/dag 1 månad efter förlossningen för bondgårdsmammor respektive mammor boende på landet men inte på bondgård. n är antalet barn i respektive kategori och p är p-värdet från Mann-Whitney-U's test.



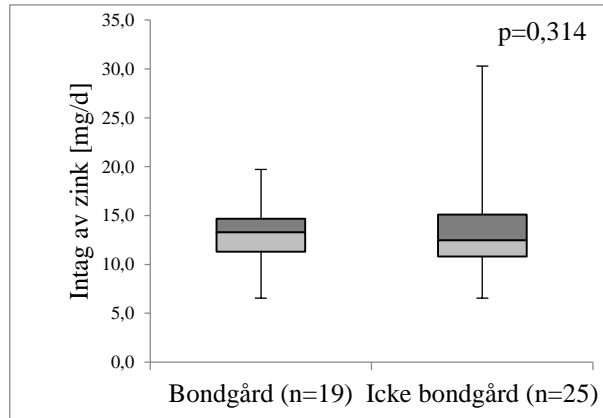
Figur S.4. Låddiagram över mammans intag av vitamin A i µg/dag 4 månader efter förlossningen för bondgårdsmammor respektive mammor boende på landet men inte på bondgård. n är antalet barn i respektive kategori och p är p-värdet från Mann-Whitney-U's test.



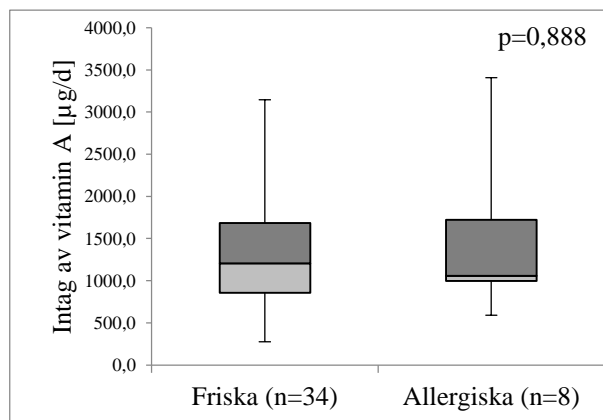
Figur S.5. Låddiagram över mammans intag av vitamin D i µg/dag 4 månader efter förlossningen för bondgårdsmammor respektive mammor boende på landet men inte på bondgård. n är antalet barn i respektive kategori och p är p-värdet från Mann-Whitney-U's test.



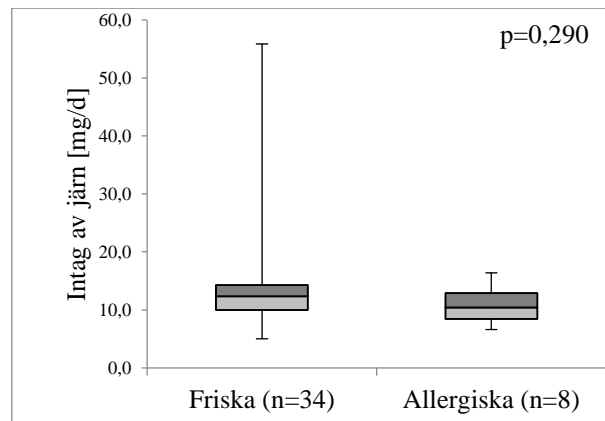
Figur S.6. Låddiagram över mammas intag av järn i mg/dag 4 månader efter förlossningen för bondgårdsmammor respektive mammor boende på landet men inte på bondgård. n är antalet barn i respektive kategori och p är p-värdet från Mann-Whitney-U's test.



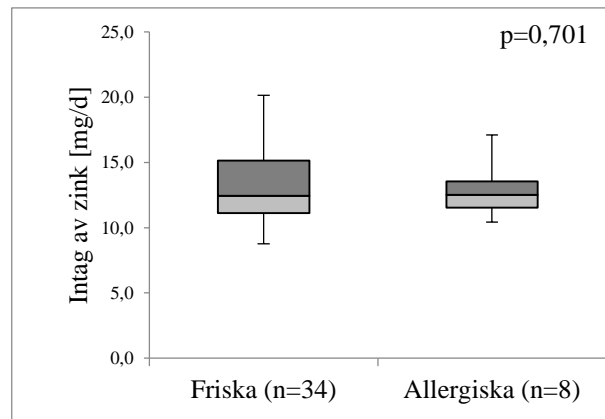
Figur S.7. Låddiagram över mammas intag av zink i mg/dag 4 månader efter förlossningen för bondgårdsmammor respektive mammor boende på landet men inte på bondgård. n är antalet barn i respektive kategori och p är p-värdet från Mann-Whitney-U's test.



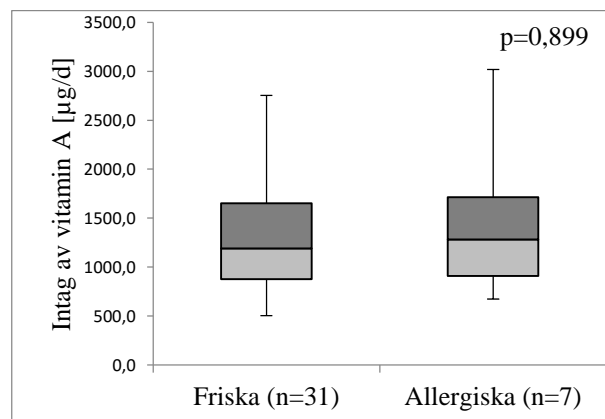
Figur S.8. Låddiagram över mammas intag av vitamin A i µg/dag 1 månad efter förlossningen för friska respektive allergiska barn. n är antalet barn i respektive kategori och p är p-värdet från Mann-Whitney-U's test.



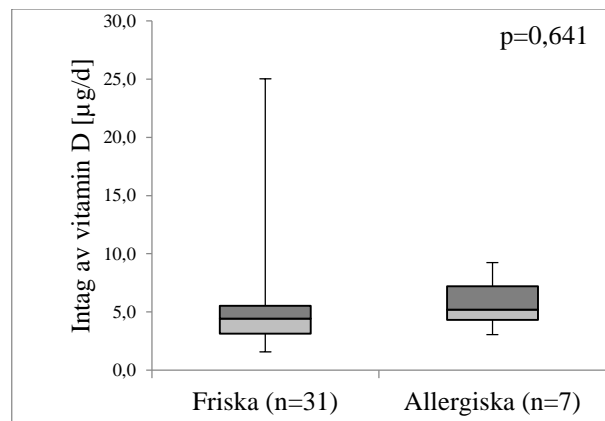
Figur S.9. Låddiagram över mammas intag av järn i mg/dag 1 månad efter förlossningen för friska respektive allergiska barn. n är antalet barn i respektive kategori och p är p-värdet från Mann-Whitney-U's test.



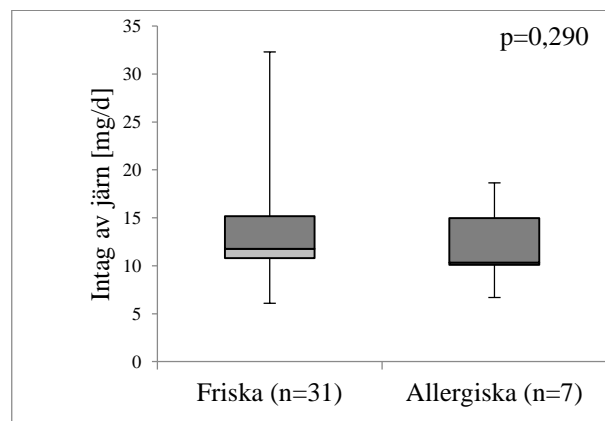
Figur S.10. Låddiagram över mammas intag av zink i mg/dag 1 månad efter förlossningen för friska respektive allergiska barn. n är antalet barn i respektive kategori och p är p-värdet från Mann-Whitney-U's test.



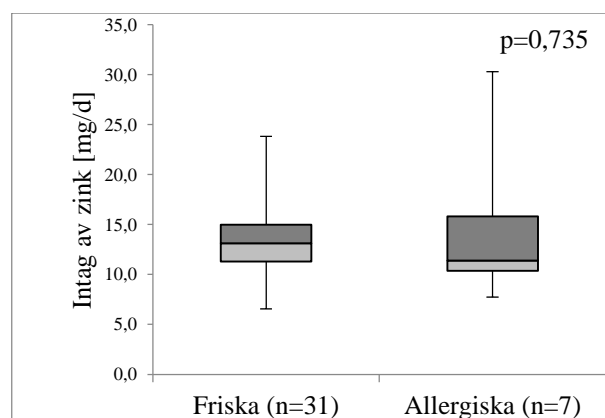
Figur S.11. Låddiagram över mammas intag av vitamin A i µg/dag 4 månader efter förlossningen för friska respektive allergiska barn. n är antalet barn i respektive kategori och p är p-värdet från Mann-Whitney-U's test.



Figur S.12. Låddiagram över mammas intag av vitamin D i µg/dag 4 månader efter förlossningen för friska respektive allergiska barn. n är antalet barn i respektive kategori och p är p-värdet från Mann-Whitney-U's test.



Figur S.13. Låddiagram över mammas intag av järn i µg/dag 4 månader efter förlossningen för friska respektive allergiska barn. n är antalet barn i respektive kategori och p är p-värdet från Mann-Whitney-U's test.



Figur S.14. Låddiagram över mammas intag av zink i µg/dag 4 månader efter förlossningen för friska respektive allergiska barn. n är antalet barn i respektive kategori och p är p-värdet från Mann-Whitney-U's test.