

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mateja BLATNIK KONC

**UGOTAVLJANJE KEMIJSKE ZVRSTI CINKA V
RAZLIČNIH VZORCIH MLEKA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mateja BLATNIK KONC

**UGOTAVLJANJE KEMIJSKE ZVRSTI CINKA V RAZLIČNIH
VZORCIH MLEKA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETERMINATION OF CHEMICAL SPECIES OF ZINC IN DIFFERENT MILK
SAMPLES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Odseku za znanosti o okolju Instituta Jožef Stefan.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Kristino Sepčič in za somentorja prof. dr. Janeza Ščančarja.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter MAČEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Janez ŠČANČAR
Instit ut »Jozef Stefan«, Odsek za znanosti o okolju

Član: prof. dr. Kristina SEPČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Damjana DROBNE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 2. 6. 2016

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Mateja Blatnik Konc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	612(043.2)=163.6
KG	mleko/cink/dojenje/nadomestno mleko/kravje/ovčje/kozje/sojino mleko/ materino mleko/biodostopnost cinka
AV	BLATNIK KONC, Mateja
SA	SEPČIČ, Kristina (mentorica)/ŠČANČAR, Janez (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2016
IN	UGOTAVLJANJE KEMIJSKE ZVRSTI CINKA V RAZLIČNIH VZORCIH MLEKA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni, predbolonjski študij)
OP	XIII, 60 str., 3 pregl., 8 sl., 51 vir.
IJ	SI
JI	sl/en
AI	Analizirali smo vzorce človeškega, kravjega, kozjega, ovčjega, različne vzorce nadomestnega mleka, sojino in riževo mleko. Koncentracije cinka smo določili s FAAS (plamensko atomsko absorpcijsko spektrofotometrijo). Kemijske zvrsti cinka v LMM (nizkomolekularni) frakciji smo ločili na monolitni šibki anionsko izmenjalni kromatografski koloni CIM DEAE, njihovo koncentracijo pa določili s FAAS. Ligand, na katerega je bil cink vezan, smo identificirali z elektrorazpršilno tandemsko masno spektrometrijo (ESI-MS-MS). Poskus biološke dostopnosti smo izvedli <i>in vitro</i> pri kislih (pH 3-4) in rahlo alkalnih (pH 7,2-8) vrednostih, ki so simulirali pH v želodcu in tankem črevesu. Rezultati so pokazali, da vsebuje mleko živalskega izvora visoke celotne koncentracije cinka (kozje mleko 2,4-3,3 µg/mL, ovčje mleko 8 µg/mL, kravje mleko 1,3-3,8 µg/mL), v človeškem mleku pa so bile celotne koncentracije cinka 0,2-3,1 µg/mL. V preiskovanih vzorcih nadomestnega mleka, pripravljenega na osnovi kravjega mleka, so bile koncentracije cinka 4,2-7,1 µg/mL, v vzorcih sojinega in riževega mleka pa 1,9 in 1,2 µg/mL. V mleku živalskega izvora je bil delež cinka v LMM frakciji okoli 1 % celotne vsebnosti cinka, v sojinem mleku 78 % in riževem 25 %. V človeškem mleku se približno 25 % celotne vsebnosti cinka nahaja v LMM frakciji, v vzorcih nadomestnega mleka pa 0,5-1,3 %. Pri prehodu čez kisli in bazični pH Zn-citrat v človeškem mleku večinoma ne spremeni kemijske oblike. V kravjem mleku se cink, ki se v kislem mediju delno sprosti iz kompleksov s proteini, pri bazičnem pH večinoma obori, delno pa ostane v obliki hidrokso kompleksov cinka.

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn
DC 612(043.2)=163.6
CX milk/zinc/breast-feeding/milk formulae/cow/caprine/ewe/soy milk/ human milk/zinc bioavailability
AU BLATNIK KONC, Mateja
AA SEPČIČ, Kristina (supervisor)/ŠČANČAR, Janez (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Biological Department
PY 2016
TI DETERMINATION OF CHEMICAL SPECIAES OF ZINC IN DIFFERENT MILK SAMPLES
DT Graduation thesis (University studies)
NO XIII, 60 p., 3 tab., 8 fig., 51 ref.
LA sl/en
AL SI
AB Samples of human, cow, goat and sheep milk, infant formulae, as well as rice and soy milk were analysed. Zinc concentrations were determined by the FAAS procedure (flame atomic absorption spectrometry). Chemical species of zinc in the LMM milk fraction were separated using a weak anion exchange monolithic chromatographic column CIM DEAE, whereas their concentrations were determined by the FAAS procedure. Zinc binding ligand was identified by electrospray tandem mass spectrometry (ESI-MS-MS). The experiment on zinc bioavailability was performed *in vitro*, in acidic (pH 3-4) and slightly alkaline (pH 7.2-8) conditions, which simulated both stomach and small intestine environment. The results revealed that milk of animal origin contains high total zinc concentrations (goat milk 2.4-3.3 µg/mL, sheep's milk 8 µg/mL, cow's milk 1.3-3.8 µg/mL), while in human milk total zinc concentrations ranged from 0.2 to 3.1 µg/mL. In the examined milk formulae, prepared on the basis of cow milk, total zinc concentrations ranged between 4.2 and 7.1 µg/mL, while in soy and rice milk, total zinc concentrations were 1.9 and 1.2 µg/mL. In the milk of animal origin, the proportion of zinc in the LMM fraction was about 1 % of the total zinc content, whereas in soy milk 78 % and in rice milk to 25 % of total zinc content. Human milk contained about 25 % of zinc in LMM fraction, and the proportion of zinc in the LMM milk fraction of the infant formulae samples was 0.5-1.3 %. In human milk, Zn-citrate generally keeps the acidic and slightly basic pH without changing its chemical form. In cow milk, zinc is partially released from zinc-protein complexes in acidic media, and is mostly precipitated at alkaline pH. In consequence, it partially remains in the form of zinc hydroxo complexes.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD).....	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli.....	X
1 UVOD.....	14
2 PREGLED LITERATURE.....	15
2.1 SESTAVA MLEKA	15
2.1.1 Človeško mleko.....	15
2.1.2 Kravje mleko	18
2.1.3 Kozje mleko	19
2.1.4 Ovčje mleko	19
2.1.5 Sojino mleko	19
2.2 CINK.....	19
2.2.1 Vloga cinka v živih organizmih	19
2.3 CINK V MLEKU	20
2.4 BIOLOŠKA DOSTOPNOST IN PREHOD CINKA SKOZI PREBAVNI TRAKT	21
2.5 KEMIJSKE METODE DOLOČITVE CINKA V VZORCIH MLEKA	22
3 MATERIAL IN METODE	23
3.1 MATERIAL.....	23
3.1.1 Laboratorijska steklovina in ostali pripomočki:.....	23
3.1.2 Reagenti	23
3.1.3 Vzorci mleka.....	24
3.1.4 Naprave in strojna oprema	25
3.1.4.1 Plamenska atomska absorpcijska spektrometrija.....	25

3.1.4.2	Visoko zmogljivostna tekočinska kromatografija	25
3.1.4.3	Instrumenti, ki smo jih uporabili:.....	26
3.2	METODE.....	27
3.2.1	Priprava vzorcev	27
3.2.1.1	Priprava vzorcev človeškega in živalskega mleka.....	27
3.2.1.2	Priprava vzorcev nadomestnega mleka.....	27
3.2.1.3	Priprava LMM frakcije vzorcev mleka.....	28
3.2.1.4	Priprava standardnih raztopin cinka.....	28
3.2.1.5	Priprava sintetičnih raztopin Zn-citrata.....	28
3.2.1.6	Postopek, ki smo ga uporabili pri določanju celotnih koncentracij cinka v vzorcih mleka in frakcijah po kromatografski ločbi s FAAS	29
3.2.1.7	Postopek, ki smo ga uporabili pri določanju Zn-citrata v LMM frakciji mleka.	29
3.2.1.8	Postopek, ki smo ga uporabili za oceno biološke dostopnosti in absorpcije cinka iz človeškega in kravjega mleka v prebavilih	30
4	REZULTATI	31
4.1	DOLOČANJE CELOTNIH KONCENTRACIJ CINKA V VZORCIH ČLOVEŠKEGA MLEKA, NADOMESTNEGA MLEKA TER MLEKA ŽIVALSKEGA IN RASTLINSKEGA IZVORA.....	31
4.2	DOLOČANJE KONCENTRACIJ CINKA V LMM FRAKCIJI V VZORCIH ČLOVEŠKEGA MLEKA, NADOMESTNEGA MLEKA TER MLEKA ŽIVALSKEGA IN RASTLINSKEGA IZVORA.....	33
4.3	SPECIACIJA CINKA NA CIM DEAE KOLONI S FAAS DETEKCIJO	36
4.4	PREUČEVANJE BIOLOŠKE DOSTOPNOSTI CINKA V ČLOVEŠKEM IN KRAVJEM MLEKU	38
5	RAZPRAVA	49
5.1	KONCENTRACIJE CINKA V VZORCIH ČLOVEŠKEGA MLEKA, NADOMESTNEGA MLEKA TER MLEKA ŽIVALSKEGA IN RASTLINSKEGA IZVORA	49
5.2	BIOLOŠKA DOSTOPNOST CINKA V ČLOVEŠKEM IN KRAVJEM MLEKU	50
6	SKLEPI	53

7	POVZETEK	55
8	VIRI.....	57

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Energijska vrednost ter sestava človeškega meziva in zrelega mleka (Ajlec, 2011).....	17
Preglednica 2: Program kromatografske ločbe s CIM DEAE (Milačič in sod., 2012)	29
Preglednica 3: Postopek čiščenja CIM DEAE kolone (Milačič in sod., 2012).....	30

KAZALO SLIK

Slika 1:	Celotne koncentracije cinka v različnih vzorcih mleka določene s FAAS	31
Slika 2:	Koncentracije cinka v LMM (MWCO 3000 Da) frakcijah v različnih vzorcih mleka določene s FAAS	33
Slika 3:	Celotne koncentracije cinka in koncentracije cinka v LMM (MWCO 3000 Da) frakcijah v različnih vzorcih človeškega mleka določene s FAAS	34
Slika 4:	pH vrednosti v različnih vzorcih mleka	35
Slika 5:	Porazdelitev cinka v vzorcu standardne raztopine Zn^{2+} (0,8 $\mu gZn/mL$) (A) nakisane s HCl (pH 3) in (B) z dodatkom $NaHCO_3$ (pH 8)	37
Slika 6:	Porazdelitev cinka v vzorcu človeškega mleka (vzorec III) na CIM DEAE koloni s FAAS detekcijo. (A) Vzorec LMM frakcije mleka (pH 6,5). (B) Vzorec mleka smo nakisali s HCl, po eni uri filtrirali in analizirali sirotko (pH 3). (C) Vzorec mleka smo najprej nakisali s HCl, po eni uri smo dodali $NaHCO_3$, pustili stati še eno uro, filtrirali in analizirali filtrat (pH 8).....	39
Slika 7a:	(A) MS spekter prvega kromatografskega vrha cinka v vzorcu človeškega mleka (vzorec III) (pH 6,5) po ločbi na CIM DEAE koloni ter (B) MS-MS spekter hčerinskega iona (m/z 191)	40
Slika 7b:	(A) MS spekter drugega kromatografskega vrha cinka v vzorcu človeškega mleka (vzorec III) (pH 6,5) po ločbi na CIM DEAE koloni ter (B) MS-MS spekter hčerinskega iona (m/z 191)	41
Slika 7c:	(A) MS spekter prvega kromatografskega vrha cinka v vzorcu človeškega mleka (vzorec III) po nakisanju s HCl (pH 3) in ločbi na CIM DEAE koloni ter (B) MS-MS spekter hčerinskega iona (m/z 191).....	42
Slika 7d:	(A) MS spekter drugega kromatografskega vrha cinka v vzorcu človeškega mleka (vzorec III) po nakisanju s HCl (pH 3) in ločbi na CIM DEAE koloni ter (B) MS-MS spekter hčerinskega iona (m/z 191).....	43
Slika 7e:	(A) MS spekter prvega kromatografskega vrha cinka v vzorcu človeškega mleka (vzorec III) po nakisanju s HCl ter dodatku $NaHCO_3$ (pH 3) in ločbi na CIM DEAE koloni ter (B) MS-MS spekter hčerinskega iona (m/z 191)	44
Slika 7f:	(A) MS spekter drugega kromatografskega vrha cinka v vzorcu človeškega mleka (vzorec III) po nakisanju s HCl ter dodatku $NaHCO_3$ (pH 3) in ločbi na CIM DEAE koloni ter (B) MS-MS spekter hčerinskega iona (m/z 191).....	45

Slika 8: Porazdelitev cinka v vzorcu kravjega mleka Planika. (A) Vzorec mleka smo nakisali s HCl, po eni uri filtrirali in analizirali sirotko (pH 4). (B) Vzorec mleka smo najprej nakisali s HCl, po eni uri smo dodali NaHCO₃, pustili stati še eno uro ter filtrirali in analizirali filtrat (pH 7)..... 47

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CIM	stacionarna faza s konvektivnim prenosom snovi (<u>C</u> onvective <u>I</u> nteraction <u>M</u> edia)
Da	Dalton, enota za molekulsko maso, ki ustreza 1/12 mase čistega izotopa ^{12}C
DEAE	dimetilaminoetil
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ESI-MS-MS	tandemska masna spektrometrija z elektrorazpršilno ionizacijo (<u>E</u> lectrospray <u>I</u> onization Tandem <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry)
FAAS	plamenska atomska absorpcijska spektrometrija (<u>F</u> lame Atomic <u>A</u> bsorption <u>S</u> pectrometry)
HCl	klorovodikova kislina
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperzinetansulfonska kislina
HMM-Zn	visoko molekularne cinkove kemijske zvrsti (<u>H</u> igh <u>M</u> olecular <u>M</u> ass)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
ICP-MS	masna spektrometrija z induktivno sklopljeno plazmo (<u>I</u> nductively <u>C</u> oupled <u>P</u> lasma <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry)
LMM-Zn	nizkomolekularne kemijske zvrsti cinka (<u>L</u> ow <u>M</u> olecular <u>M</u> ass)
M	mol/L
Mili Q voda	voda po reverzni osmozi s prevodnostjo največ 18,2M Ω cm
min	minuta
<i>m/z</i>	enota mase na enoto naboja
MWCO	izključitev na osnovi molekulske mase
NaCl	natrijev klorid
NH ₄ OH	vodna raztopina amonijaka
rpm	obrati na minuto
RNA	ribonukleinska kislina

SEC	velikostno izključitvena kromatografija (<u>S</u> ize <u>E</u> xclusion <u>C</u> hromatograpy)
Zn	Cink
Zn-citrat	cinkov citrat

1 UVOD

Materino mleko je za mladiče sesalcev prva in hkrati najprimernejša hrana. Sestava mleka se med njihovimi različnimi vrstami spreminja. Tako je npr. pri vodnih sesalcih, ki živijo v hladni vodi, v mleku veliko maščob, pri netopirjih, ki imajo zelo majhno telesno težo, relativno malo vode in pri primatih, pri katerih se morajo možgani po rojstvu še razviti, veliko ogljikovih hidratov (Lucock, 2007).

Človeško mleko vsebuje vsa potrebna hranila za normalno rast in razvoj dojenčka v prvih mesecih življenja. Njegove glavne sestavine so ogljikovi hidrati, maščobe, beljakovine, vitamini in minerali (Hambreus, 1984; Ballard in Morrow, 2013). Med elementi v sledovih je v mleku prisoten tudi cink (Zn), ki je nujen za pravilni razvoj in rast ter imunsko odpornost dojenčka (Dorea, 2000; Chasapis, 2012). Cink naj bi se v človeškem mleku nahajal porazdeljen med njegove visokomolekularne (HMM) in nizkomolekularne (LMM) kemijske zvrsti. Med slednjimi predvsem v kompleksu s citronsko kislino, kot Zn-citrat, ki se pri ljudeh absorbira v prebavnem traktu (Martin in sod., 1984, Milačič in sod., 2012).

V primeru, ko zaradi različnih razlogov materinega mleka ni dovolj, otroka hranimo z nadomestnim mlekom, ki mora biti po sestavi materinemu čim bolj podobno. V ta namen se uporablja mleko drugih vrst sesalcev in industrijsko pripravljene mlečni nadomestki (Tapiero in Dew, 2003). V njih je cink večinoma vezan na HMM proteine, v živalskem mleku predvsem na mlečne kazeine. Cink je v taki kemijski zvrsti za človeško telo slabo dostopen (Solomons, 1982).

V naši preiskavi smo poskušali oceniti katero mleko je, glede na njegovo vsebnost in kemijsko obliko cinka, najbolj primerno za dojenčke, kadar mati ne more dojiti. Predvideli smo, da je cink, ki se v človeškem mleku nahaja v LMM kompleksu Zn-citrat, otroku biološko bolj dostopen kot cink, ki se v mleku živalskega izvora nahaja v HMM oblikah, vezan na mlečne proteine. Biološko dostopnost cinka v vzorcih človeškega in kravjega mleka smo ocenili še s poskusi, v katerih smo sledili spremembam njegovih kemijskih oblik v odvisnosti od pH, kot potekajo pri prehodu mleka čez prebavilo dojenčka.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 SESTAVA MLEKA

Sestava mleka se med posameznimi vrstami sesalcev razlikuje tako, da zadovolji različnim potrebam njihovih potomcev. Glede glavnih hranil se razlikuje ne samo v razmerju med proteini, maščobami in sladkorji, temveč tudi v njihovi sestavi (Lucock, 2007).

2.1.1 Človeško mleko

Prva hrana, ki jo zaužije novorojenec, se imenuje kolostrum ali mlezivo. Vsebuje vsa za rast in razvoj organizma potrebna hranila ter protitelesa in rastne dejavnike. Od poznejšega zrelega mleka se razlikuje predvsem po večji vsebnosti somatskih celic, proteinov in mineralov in večji raznovrstnosti ter manjši vsebnosti ogljikovih hidratov in maščob. Zrelo človeško mleko je v povprečju sestavljeno iz 6,7-7,8 % ogljikovih hidratov, predvsem laktoze, 0,9-1,2 % proteinov, 3,2-3,6 % maščob in približno 0,2 % mineralov. Preostali del predstavlja voda. (Jenness, 1979; Hambraeus, 1984; Ballard in Morrow, 2013)

Večino ogljikovih hidratov v človeškem mleku predstavlja laktoza (okoli 7 g/100 mL mleka). Njen delež je večji kot v mleku ostalih vrst sesalcev. V manjših koncentracijah je prisotnih še približno 30 različnih ogljikovih hidratov, ki so sestavljeni iz 3 do 14 monosaharidnih enot. Njihovo zaporedje se vedno konča z galaktozo in glukozo (Gal-(β 1,4)-Glc). Mednje sodijo monosaharidi (glukoza in galaktoza), disaharidi (razen laktoze še laktuloza), oligosaharidi (tri- do okta-saharidi) in kompleksni ogljikovi hidrati kot so npr. glikoproteini. Medtem ko se koncentracija laktoze v mleku tekom laktacije povečuje, se koncentracija ostalih sladkorjev zmanjšuje. Povprečna koncentracija laktoze naraste iz okoli 5,3 g/100 mL v kolostrumu na 7 g/100 mL v zrelem mleku (Jenness, 1979).

Povprečna vsebnost proteinov v človeškem mleku je okoli 1 g/100 mL mleka. Od tega je največ kazeina in α -laktoalbumina. Od ostalih proteinov pa še laktoferin, sekretorni imunoglobulini, serumski albumin, lizocim in, v sledovih, nekateri drugi (Ballard in Morrow, 2013). Človeško mleko vsebuje tudi proste esencialne aminokislino oz. njihove prekurzorje in približno 30 različnih encimov kot so aldolaza, amilaza, distaza, β -glukoronidaza, katalaza, lipaza, lizocim in nekatere proteaze ter transaminaze (Hambraeus, 1984).

Za vsebnost maščob, ki jih je v človeškem mleku okoli 3,8 %, je značilno veliko dnevno nihanje. Podobno kot celotne koncentracije proteinov in laktoze, se njihove celotne koncentracije v mleku mater, ki imajo različne prehranske navade ali prihajajo iz različnih geografskih območij, med seboj bistveno ne razlikujejo. Razlike pa so večje glede vsebnosti posameznih maščobnih kislin. Maščobe so v mleku prisotne kot proste maščobne kisline, mono, di in trigliceridi maščobnih kislin, steroli in njihovi estri ter fosfolipidi. Med maščobnimi kislinami je največ oleinske in palmitinske kisline. Vsebnost maščob je v

kolostrumu in mleku na začetku dojenja nižja in s časom narašča. V mleku se maščobe nahajajo v obliki maščobnih kapljic, ki so v premeru velike 2-3 μm (Hambreus, 1984; Ballard in Morrow, 2013).

Minerali, ki so v mleku tipično prisotni v koncentracijskem območju med 1 in 13 mmol/L, so natrij, kalij, kalcij, magnezij, fosfor in klor. Pogosto jih imenujemo makro elementi. Med mikro elementi oz. elementi v sledovih so še posebej pomembni železo, baker in cink. Njihove tipične koncentracije v mleku so v območju med 7 in 30 $\mu\text{mol/L}$. Ajlec (2011) je po podatkih iz literature povzel energijsko vrednost in tipično sestavo človeškega kolostruma in zrelega mleka. Vrednosti zanj so prikazane v preglednici 1. Vsebnost mineralov se tekom dojenja spreminja. V primeru za rast potrebnih mineralov so koncentracije najvišje v kolostrumu in se s časom, v zrelem mleku, počasi nižajo. Človeško mleko lahko vsebuje tudi druge elemente v sledovih, kot so stroncij, rubidij, molibden, barij, svinec, kadmij, nikelj, kobalt, cerij, cezij, kositer in drugi (Ballard in Morrow, 2013).

Mleko mater, ki so rodile predčasno, vsebuje več spojin z imunsko zaščitnimi lastnostmi ter več laktoferina kot mleko mater, ki so otroka normalno donosile. Manjša pa je vsebnost glavnih hranil in makro ter mikroelementov. Kljub temu je njihovo mleko za nedonošenčke najprimernejše. Ko mati iz različnih vzrokov otroka ne doji, ga hranimo z nadomestnim mlekom. V ta namen se najpogosteje uporablja kravje mleko oziroma izdelki iz njega (Triphathi in sod. 1999; Dorea, 2000).

Preglednica 1: Energijska vrednost ter sestava človeškega meziva in zrelega mleka (Ajlec, 2011)

Parameter	Človeško mleko	
	Kolostrum	Zrelo mleko
energijska vrednost ^a (kcal/100 mL)	55	67
maščobe ^d (g/100 mL)	2,9	4,2
laktoza ^d (g/100 mL)	5,3	7,0
proteini ^d (g/100 mL)		
-celotni	2,0	1,1
-IgA	0,5	0,1
-laktoferin	0,5	0,2
-kazeini	0,5	0,4
makro elementi (µg/mL)/(mmol/L)		
natrij ^a	920/40	110/5
kalij ^a	555/14	500/13
kalcij ^a	230/6	300/7
magnezij ^a	30/1,2	30/1,2
fosfor ^a	30/0,97	40/1,3
mikro elementi (µg/mL)/(mmol/L)		
železo ^b	0,5/0,009	0,4/0,007
baker ^b	0,3/0,005	0,3/0,005
cink^b	8,6/0,13	2,0/0,03
anioni (µg/mL)/(mmol/L)		
klorid ^a	1340/38	370/10
oksalat ^c	6,1/0,07	8,3/0,09
sulfat ^c	4,3/0,04	5,0/0,05
citrat^c	460/2,4	515/2,7
vitamini ^d (µg/100 mL)		
vitamin A	150	75
vitamin B ₁	2	15
vitamin B ₂	30	40
vitamin C	6	5
pH ^a (enota)	7,4	6,8

2.1.2 Kravje mleko

Kravje mleko je tisto, ki ga v zahodnem svetu zaužijemo največ. V njem je v povprečju 4,9 % laktoze, 3,5 % proteinov, 3,9 % maščob in 0,9 % mineralov. V sodobni množični pridelavi kravjega mleka na farmah na sestavo kravjega mleka najpomembneje vplivajo pasma živali ter njihova prehrana in režim hranjenja (Schönfeldt in sod., 2012). Od proteinov je največ kazeinov, med njimi α -kazeina. Prisotni so še β -laktoglobulin, α -laktoalbumin, albumin govejega seruma in imunoglobulini. Večino maščob kravjega mleka predstavljajo trigliceridi (95 %), ki so sestavljeni iz različno dolgih nasičenih in nenasičenih maščobnih kislin. Med nenasičenimi prevladuje oleinska kislina. Preostale maščobe so digliceridi (približno 2 %), fosfolipidi (približno 1 %), holesterol (manj kot 0,5 %) in proste maščobne kisline (manj kot 0,5%). (Haug in sod., 2007). Kravje mleko vsebuje več nekaterih esencialnih elementov v sledovih, med njimi tudi cinka, kot človeško. Kljub temu so ti elementi ljudem manj dostopni, saj so prisotni v kemijskih oblikah, ki se razlikujejo od tistih v človeškem mleku (Martin in sod., 1984; Blakeborough in Gurr, 1986). Pri prenehanju dojenja in prehodu na hranjenje otroka s kravjim mlekom bi zato lahko prišlo do premajhnega vnosa esencialnih elementov v sledovih kot so železo, baker, mangan in cink. V zadnjem času se pri ljudeh vseh starosti večja pojavnost alergij na kravje mleko. V prehrani otrok in starejših ljudi, vključno z različnimi pripravki, ki se uporabljajo kot nadomestilo človeškemu mleku, ga zato nadomeščamo z mlekom drugih živali ali rastlin. Največkrat, med živalskimi, s kozjim ali ovčjim mlekom ter med rastlinskimi, s sojinim mlekom (Iancono, G. in sod., 1998; Almaas in sod., 2006). Ker se proteini v mleku ostalih živali po zgradbi rahlo razlikujejo od tistih, ki so prisotni v kravjem mleku, alergij v glavnem ne povzročajo oziroma so le-te manj izrazite (Barłowska in sod., 2011).

Kravje mleko je osnova večini industrijskih nadomestnih pripravkov človeškega mleka. Tovrstni pripravki imajo dodane sestavine, ki bi naj otrokom različnih starostnih skupin omogočile normalni zdrav razvoj. S starostjo otroka se namreč spreminjajo njegove potrebe po energiji in mineralih ter z njimi količina in sestava zaužitega mleka oziroma njegovega nadomestila (Tripathi in sod., 1999). V Evropski Skupnosti so določila glede sestave mlečnih nadomestkov zapisana v direktivi EU 2006/141/EC. Po tej direktivi je mlečni nadomestek hrana, ki zadosti vse prehranske zahteve otroka v prvih nekaj mesecih življenja oziroma do takrat, ko lahko pričnemo otroka hraniti z dopolnilno hrano. V mlečnih nadomestkih mora biti prisotnih 0,5 do 15 mg cinka na 100 kcal mleka. Lucas in sodelavci so že leta 1994 ugotovili, da so nedonošenčki, ki so jih matere hranile s standardnim adaptiranim mlekom, v starosti 18 mesecev slabše razviti kot otroci, ki so jih s svojim mlekom hranile nadomestne matere z lastnimi starejšimi dojenčki. Rezultati njihove raziskave so potrdili, da je za normalni razvoj otroka najprimernejše človeško

mleko, in da uporaba mlečnih nadomestkov za otroka pomeni večjo možnost premajhnega vnosa nekaterih pomembnih hranil (Lucas in sod., 1994).

2.1.3 Kozje mleko

Povprečna vsebnost laktoze v kozjem mleku je 4,5 %, proteinov 3,4 %, maščob 4,1 % in mineralov 0,9 %. Razmerje in sestava glavnih sestavin se časovno spreminja. Spreminjajo se tudi koncentracije glavnih elementov in elementov v sledovih, predvsem bakra in cinka (Kondylii in sod., 2007).

2.1.4 Ovčje mleko

Sestava ovčjega mleka je odvisna od okolja, prehrane, trajanja in števila laktacij, zdravja ter pasme ovc (Raynal-Ljutovac in sod., 2008). V mleku se v povprečju nahaja 4,9 % laktoze, 6,2 % proteinov, 7,9 % maščob in 0,9 % mineralov. Sezonsko nihanje sestave mleka pri živalih, ki se pasejo na prostem je v večji meri odvisno od lokalnega okolja (Park, 2007).

2.1.5 Sojino mleko

Sojino mleko je rastlinski nadomestek človeškega mleka, ki se že dolgo uporablja pri osebah, ki so alergične na kravje mleko. Včasih so poročali o pogosti podhranjenosti zaradi njegove uporabe v prehrani. Vendar se je stanje precej izboljšalo in danes lahko dobimo kakovostne sojine mlečne nadomestke (Miniello in sod., 2003; Bhatia in sod., 2009).

2.2 CINK

Cink (Zn) je kemijski element, ki spada med prehodne elemente. V periodnem sistemu se nahaja v II (stranski) skupini. Njegovo vrstno število je 30, relativna atomska masa 65,37 in elektronska konfiguracija $[\text{Ar}]4s^23d^{10}$. V naravi tvori stabilne komplekse v katerih je skoraj izključno v oksidacijskem stanju +2.

2.2.1 Vloga cinka v živih organizmih

Cink je za vse žive organizme esencialen element v sledovih. Njegova vsebnost v človeškem telesu je med elementi v sledovih ena največjih. Proteini, ki imajo vezan cink predstavljajo največjo skupino metaloproteinov. Najdemo ga v vseh šestih skupinah encimov (oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze, ligaze). V njih ima cink katalitično, nekatalitično, regulatorno ali strukturno vlogo. Cinkovi encimi sodelujejo pri homeostazi, imunski odpornosti, oksidativnem stresu, apoptozi in staranju. (Chasapis in sod., 2012). Splošne značilnosti cinka na biokemijskem nivoju so (Frausto da Silva in Williams, 2001):

- v citoplazmi celic aerobnih živih organizmov ga je med vsemi elementi v sledovih največ,
- vključen je v reakcije velikega števila encimov, od katerih jih večina poteka izven celic ali znotraj celičnih veziklov in ne v celični citoplazmi (primer so cinkovi encimi, ki sodelujejo pri prebavi),
- redko ga najdemo vezanega na celično membrano,

- njegova strukturna vloga je zelo široka (od stabilizacije različnih filamentov, struktur podobnih keratinu do vloge pri organizaciji kromosomov),
- regulatorni proteini, ki vsebujejo cink (primer so proteini z motivom cinkovega prsta, ki se vežejo na promotorske regije deoksiribonukleinske kisline), so bili odkriti le pri eukariontih.

Koncentracija cinka je pri zdravem človeku stabilna. Njegova homeostaza je regulirana tako, da se ob povečanem vnosu cink iz telesa izloča z blatom in urinom, pri pomanjkanju pa ga telo črpa iz jeter in mišic. Večino cinka vnesemo v telo s hrano. Hrana živalskega izvora velja za bogatejši vir cinka od hrane rastlinskega izvora. Do pomanjkanje cinka pride pri zdravih ljudeh zelo redko. Klinične znake hudega pomanjkanja cinka imajo predvsem bolniki z gensko presnovno motnjo acrodermatitis enteropatica, ki zmanjša njegovo absorpcijo iz hrane v telo, osebe, ki uživajo hrano z zelo majhno vsebnostjo cinka in alkoholiki. Včasih se, kot neželeni stranski učinki, pojavijo tudi pri ljudeh, ki se zdravijo z določenimi antibiotiki. Glavni klinični znaki pomanjkanja cinka so oslabljen imunski sistem, številne težave s kožo in lasmi, kognitivne in motorične motnje, prizadetost vida in sluha, izguba apetita, ponavljajoča diareja ter številni drugi (Prasad, 2013). Pri otrocih in mladostnikih pa še zaostanek v rasti in razvoju. Različni organi v telesu so na pomanjkanje cinka različno občutljivi. Le-to se najprej pokaže v krvni plazmi, ki s hranili oskrbuje vsa tkiva in organe v telesu. Povprečna koncentracija cinka v plazmi je 15 $\mu\text{mol/L}$, od tega je 84 % cinka vezanega na albumin, 15 % na α_2 -makroglobulin in 1 % na LMM ligande. Poleg krvne plazme so za pomanjkanje cinka občutljiva jetra, kosti in testisi, najmanj pa koža, lasje ter srčna in skeletne mišice (Tapiero in Tew, 2003).

2.3 CINK V MLEKU

Vsebnost cinka v mleku se med različnimi vrstami sesalcev in materami znotraj posamezne vrste razlikuje. Različna je tudi porazdelitev cinka med njegove posamezne kemijske zvrsti, oziroma kemijska speciacija cinka v mleku. Pri rastlinojedih živalih, kot so krave, koze in ovce, je cink večinoma kemijsko vezan na mlečne kazeine (Cousins in Smith, 1980; Blakeborough in Gurr, 1986). Močna vezava cinka na kazeine povzroči njihovo zvitje iz linearne v globularno obliko in s tem njihovo stabilizacijo (Srinivas in Prakash, 2011). V človeškem mleku, ki vsebuje precej manj mlečnih kazeinov, se med HMM ligandi cink veže predvsem na protein laktoferin, relativno veliki delež pa se ga nahaja v LMM frakciji (Dorea, 2000). Raziskovalci so predvideli, da naj bi bil v njej cink vezan bodisi na citronsko ali pikolinsko kislino bodisi na mešanico več LMM ligandov, ki so prisotni v mleku (Solomons, 1982; Martin in sod., 1984; Blakeborough, 1986). Milačič in sod. so leta 2012 objavili rezultate dela v katerem so pokazali, da se cink v LMM frakciji človeškega mleka nahaja predvsem vezan v kompleksu s citronsko kislino, kot Zn-citrat.

V prvih sedmih dneh po porodu se koncentracija cinka v človeškem materinem mleku zmanjša na polovico, po mesecu in pol na četrtno in do šestega meseca pade na petino vrednosti petnajstega dne dojenja. Kljub temu, da se količina mleka, ki ga zaužije otrok s

časom večja, se vnos cinka zaradi njegove nižje vsebnosti v mleku zmanjša. Tako se v prvih desetih dneh dojenja količina zaužitega cinka zmanjša za dobro tretjino. Za normalno rast in razvoj organizma se zato črpajo tudi njegove telesne zaloge. Predvsem pri nedonošenčkih, ki imajo manjše zaloge cinka je večje tveganje, da pride do njegovega pomanjkanja (Dorea, 2000). Znaki pomanjkanja cinka pri dojenčku so počasnejša rast in manjše pridobivanje teže, oslABLJENA odpornost, težave s kožo, slabokrvnost, napačen razvoj kosti, diareja, itd. (Perales in sod., 2006). Opisani znaki se pri dojenčkih lahko pojavijo tudi v primeru dednega avtosomalnega recesivnega obolenja acrodermatitis enteropatica, kjer je okvarjen gen ZIP4, ki kodira cinkov transportni protein (Dufner-Beattie in sod., 2004).

2.4 BIOLOŠKA DOSTOPNOST IN PREHOD CINKA SKOZI PREBAVNI TRAKT

Za oceno ustreznosti dnevne količine cinka, ki jo dobi otrok z materinim ali nadomestnim mlekom, moramo poznati njegovo celotno koncentracijo in biološko dostopnost. Slednja predstavlja tisti delež zaužitega cinka, ki se v prebavilih absorbira in v telesu uporabi za normalni potek različnih fizioloških procesov. Po zaužitju se cink tekom prebave sprosti iz hrane in absorbira v večji meri v začetnem delu tankega črevesa. Manjši delež absorpcije poteka po celotnem črevesju (Krebs, 2013). Raziskovalci predvidevajo, da je mesto absorpcije odvisno od kemijske oblike v kateri se nahaja cink. Njegove vodotopne oblike naj bi se absorbirale v začetnih delih tankega črevesa, netopni kompleksi pa deloma pozneje v črevesju oziroma se jih večji del izloči iz telesa (Perales in sod., 2006). Kemijska oblika v kateri se ob prisotnosti številnih ligandov nahaja cink je, med drugim, odvisna od pH v prebavnem traktu. Pri odraslih je pH vrednost želodčnega soka med 1 in 2, medtem ko je pri otrocih nekoliko višji. Ob vstopu hrane v želodec se pH želodčne vsebine zviša na vrednost med 4 in 5, odvisno od sestave hrane. Zaužita hrana se pri odraslih zadrži v želodcu povprečno okoli dve in pri otrocih eno uro. Vrednost pH se pri ljudeh postopno zviša iz močno kislega v želodcu do pH 6 v dvanajsterniku in rahlo bazičnega pH 7,4 v končnem delu tankega črevesa. V začetnem delu debelega črevesa pH vrednost pade na 5,7 in se do njegovega končnega predela ponovno dvigne do pH 6,7 (Fallingborg, 1999). V mleku živalskega izvora, ki ga za svojo prehrano uporabljamo ljudje, je večji del cinka vezan na fosfopeptide kazeinov. Cink v tej kemijski zvrsti ostane tudi po njeni razgradnji v prebavilih slabo biološko dostopen. V primeru kravjega mleka je delež cinka, ki je vezan s kazeinskimi miceli večji od 90 %. (Martin in sod., 1984; Perales in sod., 2006). Biološka dostopnost cinka v človeškem mleku je večja od tiste v živalskem, ker se ga bistveno večji del nahaja v LMM kemijskih zvrsteh. Materino mleko je zato za otroka najboljši prehranski vir cinka (Milačič in sod., 2012).

2.5 KEMIJSKE METODE DOLOČITVE CINKA V VZORCIH MLEKA

Za določitev celotnih koncentracij cinka v vzorcih mleka različnega izvora se uporabljajo analizni postopki, ki so večinoma sestavljeni iz predpriprave vzorcev in kvantitativne določitve cinka z uporabo različnih instrumentalnih analiznih tehnik (Kellner in sod., 2004). V strokovni literaturi je opisanih nekaj analiznih metod določitve vsebnosti cinka v mleku, pri katerih so raziskovalci uporabili elektrokemijske (Suturović in sod., 2014) ali jedrske analizne metode (Solis in sod., 2009), večinoma pa so v ta namen uporabili atomsko absorpcijo ali atomsko emisijsko spektrometrijo in elementno masno spektrometrijo (Luo in sod., 2010). Za slednje se vzorce mleka največkrat razkroji v analizni mikrovalovni pečici, redkeje pa se celotne koncentracije cinka določi v vzorcih, ki se razkrojijo po ustrezno preverjenem alternativnem postopku ali direktno v ustrezno zredčenih vzorcih (McKinstry in sod., 1999). V zadnjih tridesetih letih je instrumentalni razvoj omogočil, da v mleku določamo tudi porazdelitev cinka med njegove posamezne kemijske zvrsti oziroma njegovo kemijsko speciacijo. Začetne raziskave porazdelitve cinka v katerih so različni raziskovalci, za ločitev HMM od LMM cinkovih zvrsti, uporabili velikostno izključitveno kromatografijo (SEC), so pokazale, da se cink v kravjem mleku nahaja pretežno v HMM, medtem ko se v človeškem mleku večji delež cinka nahaja v LMM frakciji. Sledilo je eksperimentalno delo, s katerim so raziskovalci poskusili določiti posamezne ligande, ki vežejo cink v mleku različnega izvora in nekaterih njegovih industrijsko pripravljenih nadomestkih (Günter in Kastenholz, 2005). Mleko ima danes pomembno mesto v sodobni prehrani otrok in odraslih. Mnoge raziskave so pokazale, da je biološka dostopnost cinka za dojenčke v človeškem mleku dosti večja kot v kravjem. Raziskovalci so na podlagi eksperimentalnih rezultatov sklepali, da je to povezano z veliko vsebnostjo LMM zvrsti cinka v človeškem mleku. Med njimi naj bi prevladoval Zn-citrat. Podatki o vsebnosti Zn-citrata v mleku različnega izvora so zelo različni. Uporabljene analizne metode za njegovo določitev so bile v glavnem kvalitativne. Milačič in sod. so 2012 razvili analizno metodo za kvantitativno določitev Zn-citrata v človeškem mleku, ki smo jo uporabili v predstavljenem diplomskem delu.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

Za pripravo reagentov in različnih standardnih raztopin cinka smo uporabili deionizirano Milli-Q vodo. Laboratorijsko steklovino in pribor iz plastičnega materiala smo pred uporabo čistili z enodnevnim namakanjem v 10 % (v/v) dušikovi kislini, ki mu je sledilo temeljito spiranje z deionizirano vodo. Na ta način smo odstranili sledove cinka, ki bi lahko vplivali na rezultate analiz. Vse uporabljene kisline so bile spektralno čiste (s.p.) in uporabljeni reagenti analize stopnje čistosti (p.a.). Točnost določitve celotnih koncentracij cinka v vzorcih mleka s FAAS smo preverili z analizo referenčnega materiala mleka v prahu (Reference material 8435 NIST, Whole Milk Powder).

3.1.1 Laboratorijska steklovina in ostali pripomočki:

- steklene čaše (50 mL)
- umerjene plastične epruvete s pokrovom (10, 20 in 30 mL)
- plastične centrifugirke s pokrovom (20 mL)
- plastične mikroultracentrifugirke z izločitveno molekulsko maso 3000 Da Ultra-4 Centrifugal Filter Devices, Ultracel 3 K, MWCO 3000 Da (Amicon, Beverly, MA, ZDA)
- mikro epruvete (1,5 mL)
- stojala
- steklenice iz Duran stekla s pokrovom (25 mL) za shranjevanje mleka v zamrzovalniku
- injekcijske brizge (20 mL)
- steklene erlenmajerice (50 mL) za pripravo Zn-citrata in natrijevega hidrogen karbonata
- steklenice iz Duran stekla (1L) za reagente HPLC
- liji
- filtrirni papir
- avtomatske pipete

3.1.2 Reagenti

Razen če je označeno drugače, so bili vsi reagenti, ki smo jih uporabili pri laboratorijskem delu proizvedeni v podjetju Merck (Darmstadt, Nemčija).

- deionizirana voda (Direct-Q 5 Ultrapure water system, Milipore Watertown, MA, ZDA)
- referenčni material mleka v prahu (Reference material 8435 NIST, Whole Milk Powder, Gaithersburg, MD, ZDA)
- amonijev nitrat (NH_4NO_3)

- vodna raztopina cinkovega nitrata pripravljena iz soli $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ ali raztopine Zn^{2+} v 5 % HNO_3
- citronska kislina ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$)
- HEPES (pH 5)
- NaCl
- NH_4OH

3.1.3 Vzorci mleka

Poskuse smo opravljali na vzorcih kravjega, kozjega, ovčjega, človeškega in industrijskih pripravkih nadomestnega adaptiranega mleka v prahu. Vzorce kravjega mleka, ki so bili predhodno neobdelani, smo kupili neposredno na kmetiji oziroma v trgovini z živili, kjer smo kupili tudi na visoki temperaturi kratkotrajno toplotno obdelano (UHT sterilizirano) in homogenizirano mleko. Kozje in ovčje mleko, ki predhodno ni bilo obdelano, smo kupili pri lokalnih pridelovalcih in toplotno obdelanega v trgovini. Človeško mleko so prostovoljno darovale tri anonimne darovalke.

- kravje mleko:
 - neobdelano kravje mleko (Mlekarna Planika, Kobarid in kmetija Meglič, Mošnje, Radovljica, Slovenija),
 - UHT sterilizirano in homogenizirano kravje mleko (Alpsko mleko, Ljubljanske mlekarne, Ljubljana, Slovenija)
- kozje mleko:
 - domače kozje mleko (kmetija Čepon, Stična, Slovenija),
 - UHT sterilizirano in homogenizirano kozje mleko (Vindija, Varaždin)
- ovčje mleko: domače ovčje mleko (kmetija Sitar, Spodnji Otok, Radovljica)
- materino človeško mleko treh različnih anonimnih darovalk
- nadomestni pripravki mleka Novalac (Novalac, Francija) ter Premantil in Aptamil (Milupa, Nemčija)
 - Novalac 1 – začetno mleko za dojenčke, nadomestno mleko primerno za dojenčke v obdobju prvih 6 mesecev
 - Novalac 2 – nadaljevalno mleko za dojenčke starosti od 6 do 12 mesecev
 - Novalac 3 – nadaljevalno mleko za dojenčke starosti od 12 mesecev do 3 let
 - Novalac AC – posebej prilagojeno mleko za dojenčke s kolikami starosti do enega leta
 - Premantil - nadomestno mleko za nedonošenčke
 - Aptamil 1 (Milupa) – začetno mleko za dojenčke, nadomestno mleko primerno za dojenčke v obdobju prvih 6 mesecev
 - Aptamil 2 – nadaljevalno mleko za dojenčke starosti od 6 do 12 mesecev
 - Aptamil 3 – nadaljevalno mleko za dojenčke starosti od 12 mesecev do 3 let

3.1.4 Naprave in strojna oprema

3.1.4.1 Plamenska atomska absorpcijska spektrometrija

Koncentracije cinka v vzorcih mleka in zbranih frakcijah po kromatografski ločbi smo določili s plamensko atomsko absorpcijsko spektrometrijo (FAAS). FAAS je instrumentalna analizna metoda, ki temelji na sposobnosti atomov, da absorbirajo fotone, za atome posameznega kemijskega elementa značilnih valovnih dolžin. Vir svetlobe je žarnica z votlo katodo. Atome, ki svetlobo absorbirajo, tvorimo z razprševanjem tekočega vzorca v plamenu. Temperatura plamena zrak – acetilen, ki ga uporabimo za atomizacijo v primeru določitve cinka, je približno 2100 °C. Delež svetlobe značilne valovne dolžine, ki jo absorbirajo prosti atomi, zazna detektor, fotopomnoževalka. Cink določimo pri 213,86 nm. Množina absorbirane svetlobe je sorazmerna koncentraciji atomov v plamenu. Odnos med njima opisuje Beer-Lambertov zakon po katerem velja: $A = -\log(I/I_0) = \epsilon bc$

A – absorbanca

I_0 – intenziteta vpadne svetlobe

I – intenziteta svetlobe po prehodu skozi atomizacijski medij (plamen)

ϵ - atomski absorpcijski koeficient

b – dolžina poti skozi atomizacijski medij

c – koncentracija

Značilnost FAAS tehnike je tudi, da je absorpcijski signal, ki ga zazna fotopomnoževalka v UV delu svetlobnega spektra, sestavljen iz specifičnega signala prostih atomov in nespecifičnega, ki ga povzročijo nedisociirane molekule ter sipanje svetlobe na neizparjenih trdnih delcih v plamenu. Interferenco nespecifične absorpcije, zaradi katere določimo previsoke koncentracije elementa, ki ga merimo, odpravimo z merjenjem molekularne absorpcije z uporabo devterijeve žarnice. V splošnem je koncentracijsko območje v katerem določamo koncentracije elementov s FAAS od 0,1 do 50 µg/mL in natančnost tehnike, ki je izražena kot relativni standardni odklon (RSD) pod 5 %.

3.1.4.2 Visoko zmogljivostna tekočinska kromatografija

Posamezne spojine v vzorcu ločujemo s pomočjo visoko zmogljivostne tekočinske kromatografije (HPLC) po principu njihovih različnih časov zadrževanja na trdni ali nemobilni tekoči stacionarni fazi. Ločbo HMM kemijskih zvrsti cinka od njegovih LMM zvrsti smo v vzorcih mleka izvedli z uporabo mikroultrafiltracije. Negativno nabite LMM-Zn smo v ultrafiltratu (LMM frakciji vzorcev mleka) nato ločili še z uporabo anionsko-

izmenjalne kromatografije, kjer do ločbe pride zaradi počasnejšega prehoda kemijskih zvrsti z negativnim nabojem čez kromatografsko kolono od tistih, ki so nevtralne oz. imajo v pogojih kromatografske ločbe pozitivni naboj. Temelj ločbe je ionska izmenjava med ionskimi skupinami stacionarne faze kolone in proti-ioni vzorca.

3.1.4.3 Instrumenti, ki smo jih uporabili:

- plamenski atomski absorpcijski spektrometer (FAAS) Varian SpectrAA 110 (Mulgrave, Victoria, Avstralija) s korekcijo ozadja z devterijevo žarnico
- visoko zmogljivostni tekočinski kromatografski sistem (HPLC, Agilent serija 1100, Tokijo, Japonska),
- Rheodyne injektor model 7725i, volumen zanke 0,5 mL (Cotati, CA, ZDA)
- CIM DEAE-1 monolitna kromatografska kolona s stacionarno fazo s konvektivnim prenosom snovi (šibka anionsko izmenjalna kromatografska kolona, poliglicidil metakrilatno polnilo zamreženo z etilen glikol dimetakrilatom na katerega je vezan dietilaminoetil, pH stabilnost v območju 2 do 14, volumen kolone 1 mL) (Bia Separations d.o.o., Ajdovščina, Slovenija)
- tehtnica Mettler AE 163 (Zürich, Švica)
- WTW pH 330 pH meter (Weilheim, Nemčija)
- centrifuga Hettich Centrifuges Universal 320 (Beverly, MA, ZDA)

3.2 METODE

3.2.1 Priprava vzorcev

3.2.1.1 Priprava vzorcev človeškega in živalskega mleka

Neobdelano človeško in živalsko mleko smo do analize hranili v 25 mL steklenicah iz Duran stekla pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pred analizo smo vzorce odtalili na sobno temperaturo. Pri tem se je na vrhu vzorcev nabrala večina mlečne maščobe. Spodnjo, vodno fazo vzorca, smo s pomočjo brizge prenesli iz steklenice v centrifugirke in preostalo dispergirano mlečno maščobo odstranili z 10 min centrifugiranjem pri 3000 rpm. Maščobo, ki ne vsebuje merljivih količin cinka, smo odstranili, da bi se izognili mašenju razpršilnika in nespektralnim interferencam merjenja pri določitvi koncentracij cinka v vzorcih s FAAS ter hkrati omogočili ločevanje kemijskih zvrsti cinka z monolitno kromatografijo s stacionarno fazo s konvektivnim prenosom snovi (CIM) (Milačič in sod., 2012). Pred določitvijo celotnih koncentracij cinka s FAAS smo vzorce brez maščobe redčili z vodo v razmerju 1:5.

V vzorcih živalskega mleka iz trgovine, v katerih je bila mlečna maščoba predhodno homogenizirana, smo mlečno maščobo odstranili s centrifugiranjem brez predhodnega zamrzovanja mleka.

3.2.1.2 Priprava vzorcev nadomestnega mleka

Vzorce nadomestnega mleka smo pripravili iz mleka v prahu po postopku, ki je naveden na embalaži. V umerjeno epruveto smo natehtali 5,00 g mleka v prahu in do 30 mL dopolnili z deionizirano vodo ogreto na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ko se je mleko v prahu raztopilo, smo pripravek pred analizo ohladili na sobno temperaturo. Preskusili smo osem najpogosteje uporabljenih nadomestkov materinega mleka za dojenčke različnih starosti. Izbiro so nam svetovali v Ljubljanskih lekarnah, izpostava Vič. Kemijska oblika, v kateri se nahaja cink v nadomestnem mleku, (cinkov sulfat) je bila podana na ovojnini izdelka.

Pred odstranitvijo mlečne maščobe smo izmerili pH vrednost vzorcev.

3.2.1.3 Priprava LMM frakcije vzorcev mleka

Za določitev porazdelitve cinka v vzorcih različnega mleka med njegove LMM in HMM kemijske zvrsti smo 4 mL vzorca z odstranjeno maščobo mikroultrafiltrirali (3000 MWCO) 20 min pri 8100 rpm. Vsebnost cinka v ultrafiltratu smo določili s FAAS in Zn-citrata s CIM DEAE-FAAS postopkom.

3.2.1.4 Priprava standardnih raztopin cinka

Za pripravo delovnih standardnih raztopin cinka, ki smo jih uporabili za umeritveno krivuljo pri določitvah koncentracij cinka s FAAS, smo osnovno raztopino (1000 mg Zn/mL v 5 % HNO₃) ustrezno redčili z vodo. Pripravili smo pet različnih delovnih standardnih raztopin cinka v koncentracijskem območju od 0,1 do 2 µg Zn/mL.

3.2.1.5 Priprava sintetičnih raztopin Zn-citrata

Osnovno raztopino Zn-citrata (50 µg Zn/mL) smo pripravili tako, da smo zmešali ustrezno množino raztopin citronske kisline (C₆H₈O₇·xH₂O) in cinka (1000 mg Zn²⁺/mL v 5 % HNO₃ ali vodna raztopina cinkovega nitrata) tako, da je bilo molarno razmerje med cinkom in citrónico kislino 1 : 100. Za popolno tvorbo Zn-citrata smo raztopino pred uporabo pustili stati pri sobni temperaturi najmanj 24 ur. Raztopina Zn-citrata ima pH 2 in je pri 4 °C obstojna vsaj 30 dni. Pred analizo smo iz osnovne raztopine v pufru HEPES (željeno pH vrednost v pufru smo naravnali z ustreznim dodatkom 0,1 mol/L NH₄OH) pripravili delovne standardne raztopine s pH med 3 in 8 tako, da smo približno 19 mL pufrne raztopine z določeno pH vrednostjo odpipetirali v plastično umerjeno epruveto z volumnom 20 mL, dodali 0,4 mL Zn-citrata (50 µg Zn/mL) ter epruveto dopolnili do oznake s pufrno raztopino. Tako pripravljene delovne raztopine Zn-citrata (1 µg Zn/mL) smo pustili pri sobni temperaturi 24 ur, da se je pri izbranih pH vrednostih vzpostavilo novo ravnotežje med zvrstmi Zn-citrata. V hladilniku pri 4 °C so delovni standardi obstojni vsaj teden dni.

3.2.1.6 Postopek, ki smo ga uporabili pri določanju celotnih koncentracij cinka v vzorcih mleka in frakcijah po kromatografski ločbi s FAAS

Celotne koncentracije cinka v mleku in po kromatografski ločbi smo določili s FAAS pri optimalnih pogojih merjenja v plamenu zrak-acetilen. Absorbanco cinka smo merili na valovni dolžini 213,9 nm. Nespecifično absorpcijo smo korigirali z devterijevo žarnico.

3.2.1.7 Postopek, ki smo ga uporabili pri določanju Zn-citrata v LMM frakciji mleka

Zn-citrat v LMM frakciji mleka (mikroultrafiltrat, 3000 MWCO) smo določili po postopku, ki so ga razvili Milačič in sod. (2012) s CIM DEAE-FAAS. Na kromatografsko kolono smo injicirali 0,5 mL vzorca. Ločba je potekala 10 min pri pretoku 1 mL/min, regeneracija kolone 1 min pri pretoku 10 mL/min ter spiranje kolone 14 min pri pretoku 10 mL min⁻¹ in eno min pri pretoku 1 mL/min.

Program kromatografske ločbe prikazuje preglednica 2.

Preglednica 2: Program kromatografske ločbe s CIM DEAE (Milačič in sod., 2012)

Čas (min)	Pretok (mL/min)	A (%)	B (%)	C (%)
0,0	1,0	100	0	0
10,0	1,0	70	30	0
10,1	10,0	0	100	0
11,0	10,0	0	100	0
11,1	10,0	0	0	100
13,0	10,0	0	0	100
13,1	10,0	100	0	0
24,0	10,0	100	0	0
24,1	1,0	100	0	0
25,0	1,0	100	0	0

A: voda

B: 4M HN₄NO₃

C: (0,2 mol/L HEPES, pH 5)

Po desetih zaporednih kromatografskih ločbah smo kolono očistili z 1 mol L⁻¹ NaOH in 2 mol NaCl po postopku, ki so ga uporabili Milačič in sod. (2012). Kolono smo izmenično spirali z vodo ali 0,2 mol/L HEPES (pH 5). Postopek čiščenja kolone prikazuje tabela 2.

Preglednica 3: Postopek čiščenja CIM DEAE kolone (Milačič in sod., 2012)

Reagent	Volumen (mL)	Pretok
1 mol/L NaOH	20 mL	1 mL/min
H ₂ O	50 mL	10 mL/min
0,2 mol/L HEPES (pH5)	50 mL	10 mL/min
2 mol/L NaCl	20 mL	10 mL/min
H ₂ O	10 mL	10 mL/min
0,2 mol/L HEPES (pH5)	50 mL	10 mL/min
H ₂ O	50 mL	10 mL/min

3.2.1.8 Postopek, ki smo ga uporabili za oceno biološke dostopnosti in absorpcije cinka iz človeškega in kravjega mleka v prebavilih

Za oceno biološke dostopnosti in absorpcije cinka iz človeškega in kravjega mleka smo uporabili *in vitro* poskus po poenostavljenem postopku, ki so ga uporabili Ruby in sod. (1996) pri preučevanju biološke dostopnosti svinca in arzena iz trdnih matric. Simulirali smo reprezentativne pogoje v človekovih prebavilih pri prehodu zaužite hrane skozi želodec in tanko črevo, pri čemer smo upoštevali povprečne vrednosti pH v želodcu in tankem črevesu ter zadrževalni čas hrane v prebavilih dojenčka. Poskus smo opravili v človeškem in kravjem mleku, ki sta si podobna po celotni koncentraciji cinka, bistveno pa se razlikujeta v vsebnosti LMM frakcije cinka in mlečnih proteinov.

In vitro poskus je potekal po sledečem postopku: K 20 mL mleka brez maščobe smo dodali 5 mL 0,1 mol/L HCl in tako znižali pH na vrednost 3. Vsebinsko smo pustili stati eno uro. S tem smo simulirali pogoje v želodcu dojenčka po zaužitju mleka. Po eni uri smo nakisan vzorec mleka (sirotko) pretresli in razdelili na dva enaka alikvota po 10 mL. En alikvot vzorca smo prefiltrirali skozi 0,45 µm filter. 4 mL filtrata smo mikroultrafiltrirali (3000 MWCO) 10 min pri 8100 rpm (6981 g), da smo ločili cink vezan na proteine od cinka v obliki LMM zvrsti. V ultrafiltratu smo določili celotno koncentracijo cinka s FAAS in Zn-citrata s CIM DEAE-FAAS postopkom.

V preostali alikvot (10 mL) nakisanega mleka (sirotke) smo dodali 0,6 mL 4 mol/L NaHCO₃ in pH dvignili na vrednost 7,2 – 8,0. Vzorec smo pustili stati eno uro. S tem smo posnemali pogoje zadrževanja in absorpcije hrane dojenčka v tankem črevesu. Po eni uri smo vzorec prefiltrirali skozi 0,45 µm filter. 4 mL filtrata smo mikroultrafiltrirali (3000 MWCO) 10 min pri 8100 rpm (6981 g). V ultrafiltratu smo določili celotno koncentracijo cinka s FAAS in Zn-citrata s CIM DEAE-FAAS postopkom.

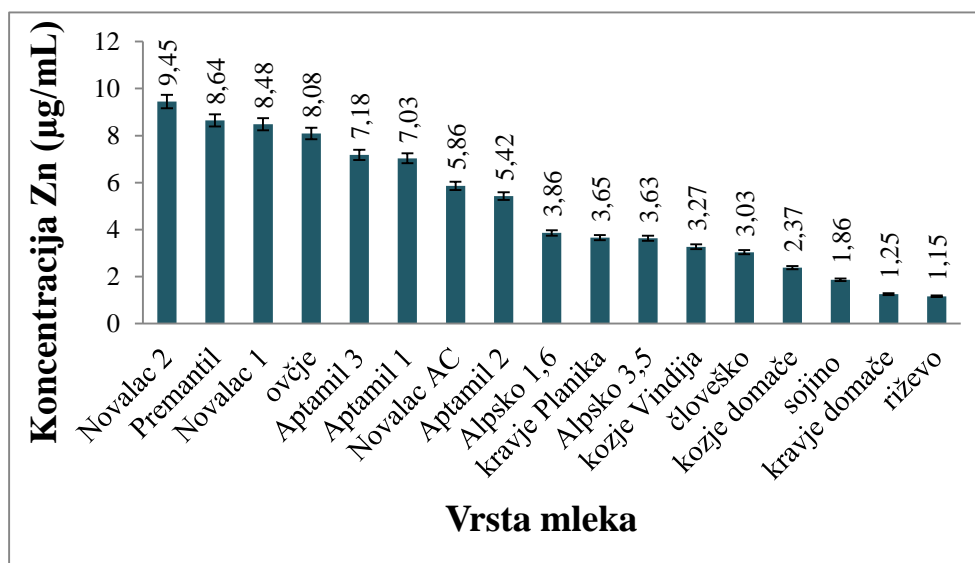
Vse analize smo izvedli v najmanj dveh paralelnih določitvah.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE CELOTNIH KONCENTRACIJ CINKA V VZORCIH ČLOVEŠKEGA MLEKA, NADOMESTNEGA MLEKA TER MLEKA ŽIVALSKEGA IN RASTLINSKEGA IZVORA

Cink je za vse žive organizme esencialen element v sledovih (Chasapis in sod., 2012). Novorojenček ga dobi v zadostnih količinah z materinim mlekom, ki je običajno prva otrokova hrana. Kadar mati otroka ne more dojiti, ga hrani z nadomestnim mlekom ali mlekom živalskega izvora. V naši študiji smo želeli ugotoviti, kakšne so celotne koncentracije cinka v materinem mleku, nadomestnem mleku ter mleku živalskega in rastlinskega izvora, ki ga nudijo proizvajalci ali zasebniki na slovenskem tržišču. Podroben opis vzorcev je podan v poglavju 3.1.3. Vzorce smo pripravili tako kot je opisano v poglavju 3.2.1.1 in 3.2.1.2 ter celotne koncentracije cinka določili s FAAS.

Rezultati so prikazani na sliki 1.



Slika 1: Celotne koncentracije cinka v različnih vzorcih mleka določene s FAAS

Iz slike 1 je razvidno, da smo najvišje celotne koncentracije cinka določili v nekaterih vrstah nadomestnega mleka: Novalac 2 ($9,5 \pm 0,3$ µg/mL), Premantil ($8,6 \pm 0,2$ µg/mL) in Novalac 1 ($8,5 \pm 0,2$ µg/mL). Koncentracije cinka v ostalih analiziranih vzorcih nadomestnega mleka so nekoliko nižje (med 5,4 in 7,2 µg/mL). Med vzorci mleka živalskega izvora je največ cinka v ovčjem mleku ($8,1 \pm 0,2$ µg/mL). Koncentracije cinka v kravjem mleku različnih proizvajalcev se gibljejo med 3,6 in 3,8 µg/mL, medtem ko smo v domačem kravjem mleku določili bistveno nižjo koncentracijo cinka $1,3 \pm 0,1$ µg/mL.

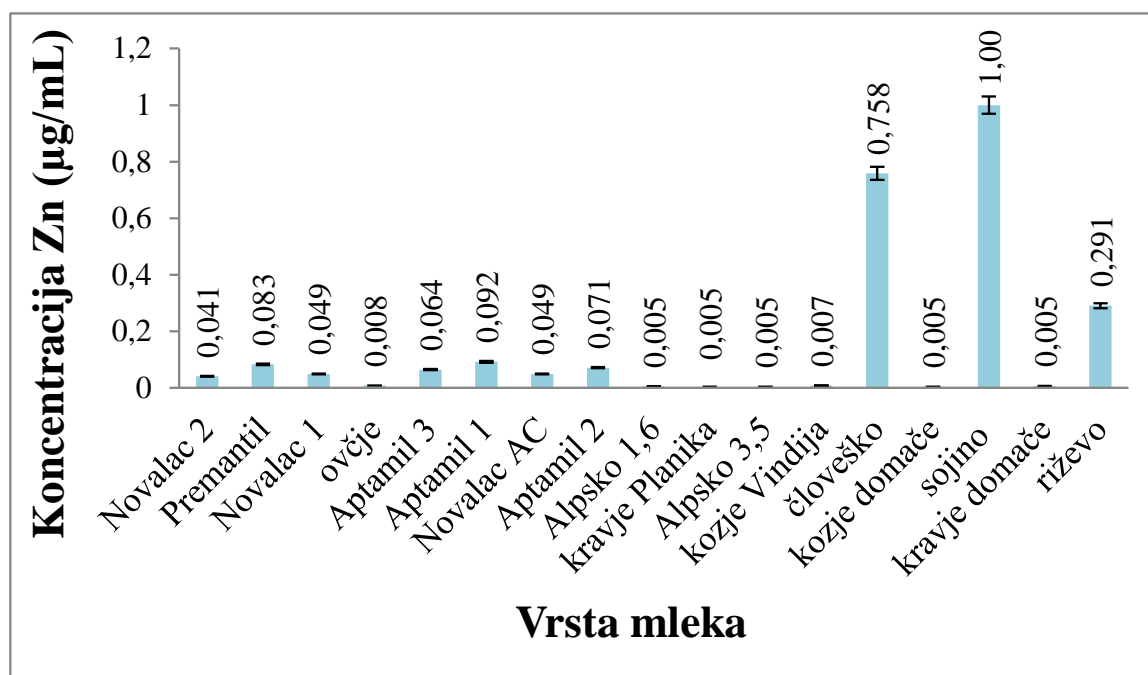
Tudi koncentracije cinka v kozjem mleku proizvajalca Vindija ($3,3 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$) so višje kot v domačem kozjem mleku ($2,4 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$). Relativno nizke celotne koncentracije cinka smo določili tudi v mleku rastlinskega izvora. V sojinem mleku je bila koncentracija cinka $1,9 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$, v riževem mleku pa $1,2 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$. Določena koncentracija cinka v vzorcu človeškega mleka $3,1 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ je podobna koncentraciji cinka v kravjem mleku.

Točnost analiznega postopka smo preverili z analizo cinka v standardnem referenčnem materialu mleka v prahu (8435 NIST). Koncentracija cinka, ki smo jo določili, ($27,2 \pm 0,5 \mu\text{g/g}$) se je dobro ujemala s certificirano vrednostjo ($28,0 \pm 3,1 \mu\text{g/g}$).

4.2 DOLOČANJE KONCENTRACIJ CINKA V LMM FRAKCIJI V VZORCIH ČLOVEŠKEGA MLEKA, NADOMESTNEGA MLEKA TER MLEKA ŽIVALSKEGA IN RASTLINSKEGA IZVORA

Biološka dostopnost cinka iz mleka je odvisna od kemijske oblike, v kateri se cink nahaja. Številne raziskave so pokazale, da je biološka dostopnost cinka v materinem mleku za dojenčka mnogo večja kot v kravjem mleku. Čeprav so si podatki v literaturi o vsebnosti cinka v LMM frakciji v človeškem mleku nasprotujoči, raziskave kažejo, da je koncentracija cinka v LMM frakciji v človeškem mleku in s tem njegova biološka dostopnost mnogo višja kot pri kravjemu mleku (Martin in sod., 1984; Hurley in sod., 1977; Brätter in sod., 1997; Lönnerdal in sod., 2003, Milačič in sod., 2012).

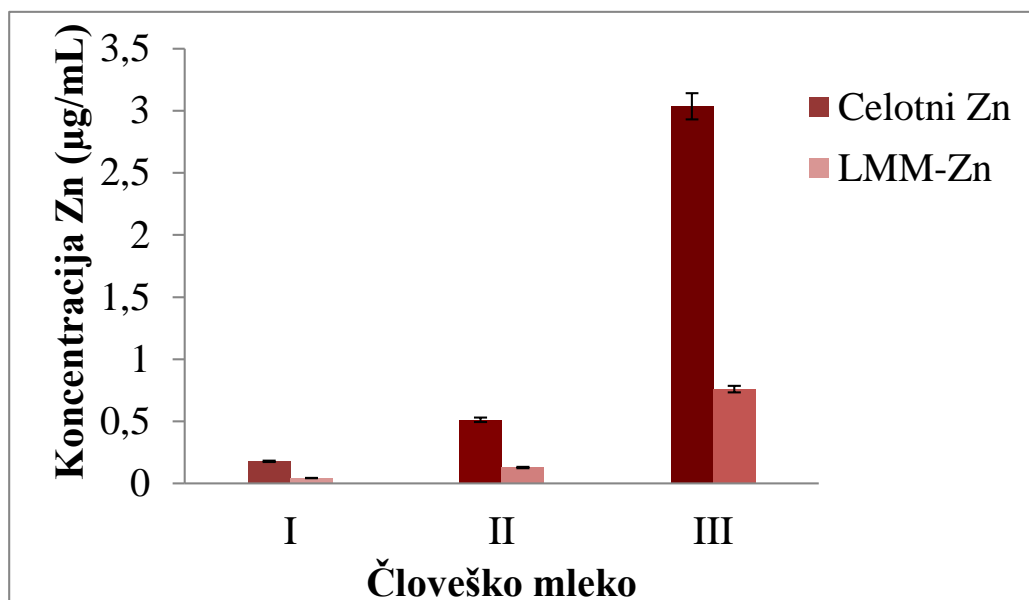
Da bi ugotovili delež cinka, ki je biološko dostopen, smo analizirali koncentracije cinka v LMM frakciji v različnih vrstah mleka. Vzorce mleka smo pripravili tako, kot je opisano v poglavju 3.2.1.3 in vsebnost cinka v mikroultrafiltratu (3000 MWCO) določili s FAAS. Rezultate prikazuje slika 2.



Slika 2: Koncentracije cinka v LMM (MWCO 3000 Da) frakcijah v različnih vzorcih mleka določene s FAAS

Rezultati prikazani na sliki 2 kažejo, da so koncentracije cinka v LMM frakciji mleka v vzorcih mleka živalskega izvora oziroma nadomestnega mleka, ki je pripravljeno na osnovi kravjega mleka, zelo nizke, med 0,005 in 0,09 µg/mL. Višje koncentracije cinka v LMM frakciji smo določili v vzorcu človeškega mleka ($0,76 \pm 0,03$ µg/mL). V vzorcih mleka

rastlinskega izvora je koncentracija cinka v LMM frakciji bistveno višja, kot v mleku živalskega izvora, v sojinem mleku $1,47 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$ in v riževem mleku $0,29 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$.

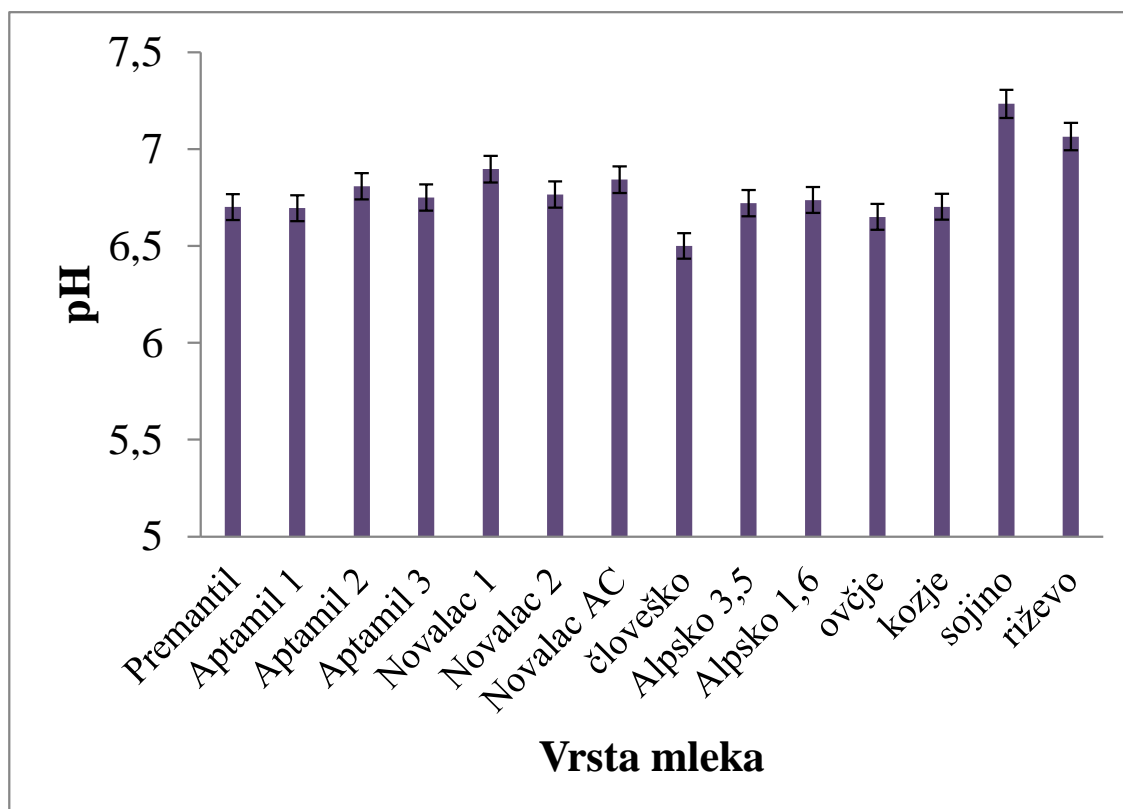


Slika 3: Celotne koncentracije cinka in koncentracije cinka v LMM (MWCO 3000 Da) frakcijah v različnih vzorcih človeškega mleka določene s FAAS

Da bi ugotovili ali se koncentracije cinka v človeškem mleku razlikujejo, smo določili celotno koncentracijo cinka in koncentracijo cinka v LMM frakciji treh prostovoljk. Rezultate prikazuje slika 3.

Iz slike 3 je razvidno, da se celotne koncentracije cinka in koncentracije cinka v LMM frakciji med seboj močno razlikujejo. Vzorec darovalke I je bil odvzet v tretjem mesecu dojenja, vzorec darovalke II v šestem in vzorec darovalke III v četrtem mesecu dojenja. Celotne koncentracije cinka so se gibale med 0,2 in 3,1 $\mu\text{g/mL}$, v LMM frakciji pa je bilo približno 25 % celotnega cinka.

Poleg celotnih koncentracij cinka in koncentracij cinka v LMM frakciji nas je zanimalo tudi, kakšne so pH vrednosti v preiskovanih vzorcih mleka. Rezultate prikazuje slika 4.



Slika 4: pH vrednosti v različnih vzorcih mleka

Podatki iz slike 4 kažejo, da imajo mleka živalskega izvora, človeško mleko in mleka rastlinskega izvora pH blizu nevtralni vrednosti. Najnižjo pH vrednost smo določili v človeškem mleku (pH 6,5), v mleku živalskega izvora so se vrednosti pH gibale med 6,7 in 6,9, riževo mleko je imelo pH 7,1 in sojino pH 7,2.

4.3 SPECIACIJA CINKA NA CIM DEAE KOLONI S FAAS DETEKCIJO

Cink je esencialen element, ki je v okolju prisoten v različnih kemijskih oblikah. Biološka dostopnost oziroma njegova razpoložljivost za živa bitja, pa je bistveno odvisna od kemijskih zvrsti (specij) v katerih se cink nahaja. S speciacijsko analizo, ki največkrat vključuje ločbo kemijskih zvrsti z različnimi kromatografskimi metodami in njihovo kvantifikacijo z elementno specifičnimi detektorji, določimo posamezne kemijske zvrsti elementov v preiskovanem vzorcu.

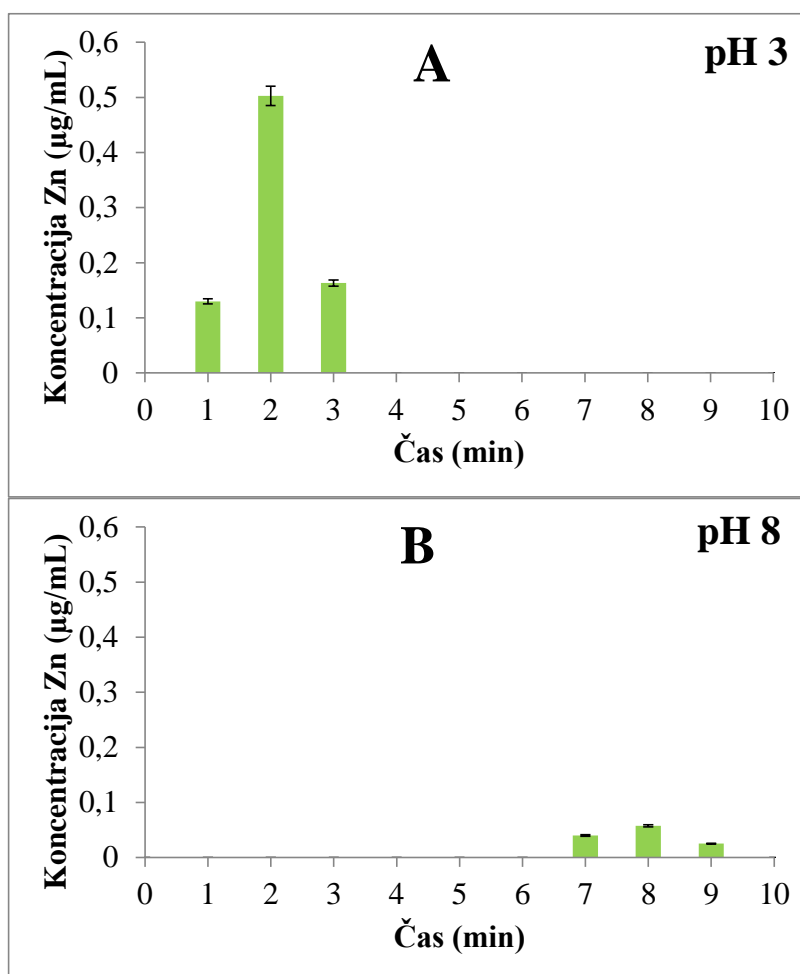
V naši skupini smo v predhodnih raziskavah razvili analizni postopek za kvantitativno določitev Zn-citrata v človeškem mleku. Zn-citrat smo ločili na šibki anionsko-izmenjali monolitni koloni CIM DEAE in ločene zvrsti cinka določili s FAAS ali masno spektrometrijo z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS). Ligand, na katerega je bil cink vezan, smo identificirali s tandemsko masno spektrometrijo z elektrorazpršilno ionizacijo (ESI-MS-MS).

Pri vrednostih pH med 5 in 7 je Zn-citrat prisoten kot mešanica negativno nabitih kompleksov $[\text{Zn}(\text{Cit})]^-$ in $[\text{Zn}(\text{Cit})_2]^{4-}$. Zvrst $[\text{Zn}(\text{Cit})]^-$ prevladuje pri pH 5, z višanjem pH vrednosti pa se povečuje delež $[\text{Zn}(\text{Cit})_2]^{4-}$. Pri pH 7 je prevladujoča zvrst $[\text{Zn}(\text{Cit})_2]^{4-}$. Pri pH vrednostih pod 3 prevladuje pozitivno nabiti kompleks $[\text{ZnH}_2(\text{Cit})]^+$. Citrat tvori s cinkom relativno stabilne komplekse. Odgovarjajoči logaritmi konstant stabilnosti ($\log K$ pri 25 °C in ionski moči 0.16) sta 4,98 za kompleks $[\text{Zn}(\text{Cit})]^-$ in 5,90 za kompleks $[\text{Zn}(\text{Cit})_2]^{4-}$, manj stabilen je kompleks $[\text{ZnH}_2(\text{Cit})]^+$, ki ima konstanto stabilnosti 1,25 (Powel in Petitt, 1997).

Kinetika tvorbe cinkovih kompleksov s citratom je počasen proces. S speciacijsko analizo smo v predhodnih raziskavah pokazali, da je za kvantitativno tvorbo Zn-citrata pri 25 °C potrebno 24 ur (Milačič in sod., 2012). Analizni postopek za speciacijo Zn-citrata, ki smo ga razvili v naši skupini, omogoča pri biološko relevantnih vrednostih pH med 5 in 8, ločbo obeh zvrsti Zn-citrata $[\text{Zn}(\text{Cit})]^-$ in $[\text{Zn}(\text{Cit})_2]^{4-}$. $[\text{Zn}(\text{Cit})]^-$ se eluira med 2 in 4 min, $[\text{Zn}(\text{Cit})_2]^{4-}$ pa med 6 in 8 min. Pri pH vrednostih pod 3 se $[\text{ZnH}_2(\text{Cit})]^+$ eluira pri enakem retencijskem času kot $[\text{Zn}(\text{Cit})]^-$. Pri pH vrednostih pod 5 se Zn^{2+} ioni eluirajo s fronto topila in so ločeni od $[\text{Zn}(\text{Cit})]^-$. Pri nevtralnih in alkalnih pH vrednostih se Zn^{2+} obori. Nastali hidroksid ($\text{Zn}(\text{OH})_2$) se delno adsorbira na kolono, delno pa eluira kot razvlečen kromatografski vrh med 8 in 10 min. (Milačič in sod., 2012).

Z razvitim analiznim postopkom smo v predhodni raziskavi analizirali človeško mleko in pokazali, da je cink, ki se nahaja v LMM frakciji mleka, prisoten v obliki Zn-citrata, njegova koncentracija pa predstavlja približno 25 % celotne koncentracije cinka (Milačič in sod., 2012). Tudi številni drugi raziskovalci so poročali, da je biološko dostopna oblika cinka v človeškem mleku Zn-citrat, a njegove točne koncentracije zaradi neustreznih analiznih postopkov niso mogli določiti (Brätter in sod., 1997; Lönnerdal in sod., 2003; De la Flor St. Remy, 2004).

Pri *in vitro* poskusu biološke dostopnosti cinka smo za speciacijo uporabili enak analizni postopek kot v naših predhodnih raziskavah (Milačič in sod., 2012). Najprej smo preučili obnašanje Zn^{2+} v raztopini, ki smo jo nakisali s HCl, ali ji dodali $NaHCO_3$ na enak način, kot je opisano v 1.6.2.3. Rezultate prikazuje Slika 5. Razvidno je, da se Zn^{2+} nakisan s HCl pri pH 3 kvantitativno eluira med 1 in 3 min, pri pH 8 pa se pretežno obori. Le približno 10 % se ga eluira kot razvlečen kromatografski vrh med 7 in 9 min.



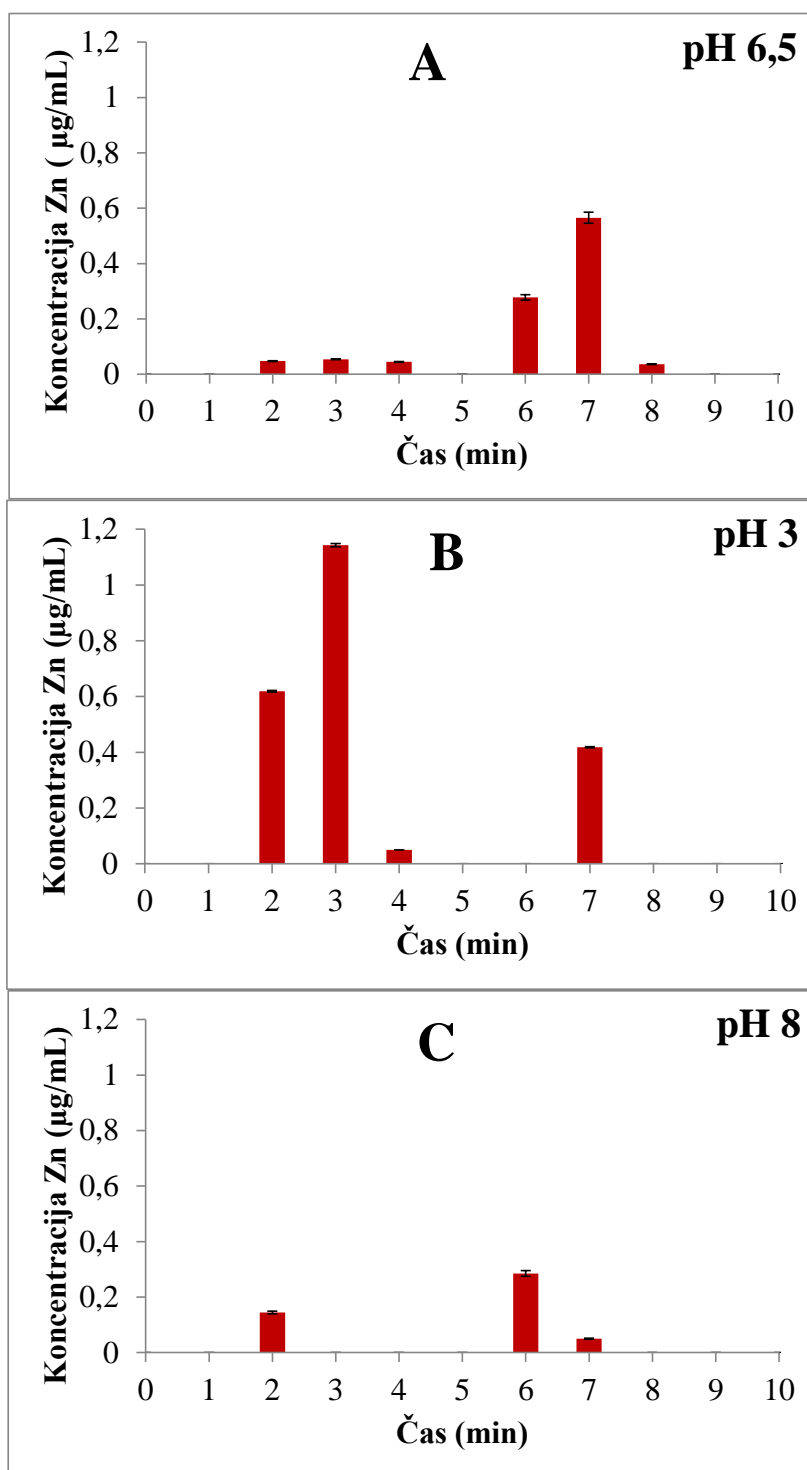
Slika 5: Porazdelitev cinka v vzorcu standardne raztopine Zn^{2+} ($0,8 \mu gZn/mL$) (A) nakisane s HCl (pH 3) in (B) z dodatkom $NaHCO_3$ (pH 8)

4.4 PREUČEVANJE BIOLOŠKE DOSTOPNOSTI CINKA V ČLOVEŠKEM IN KRAVJEM MLEKU

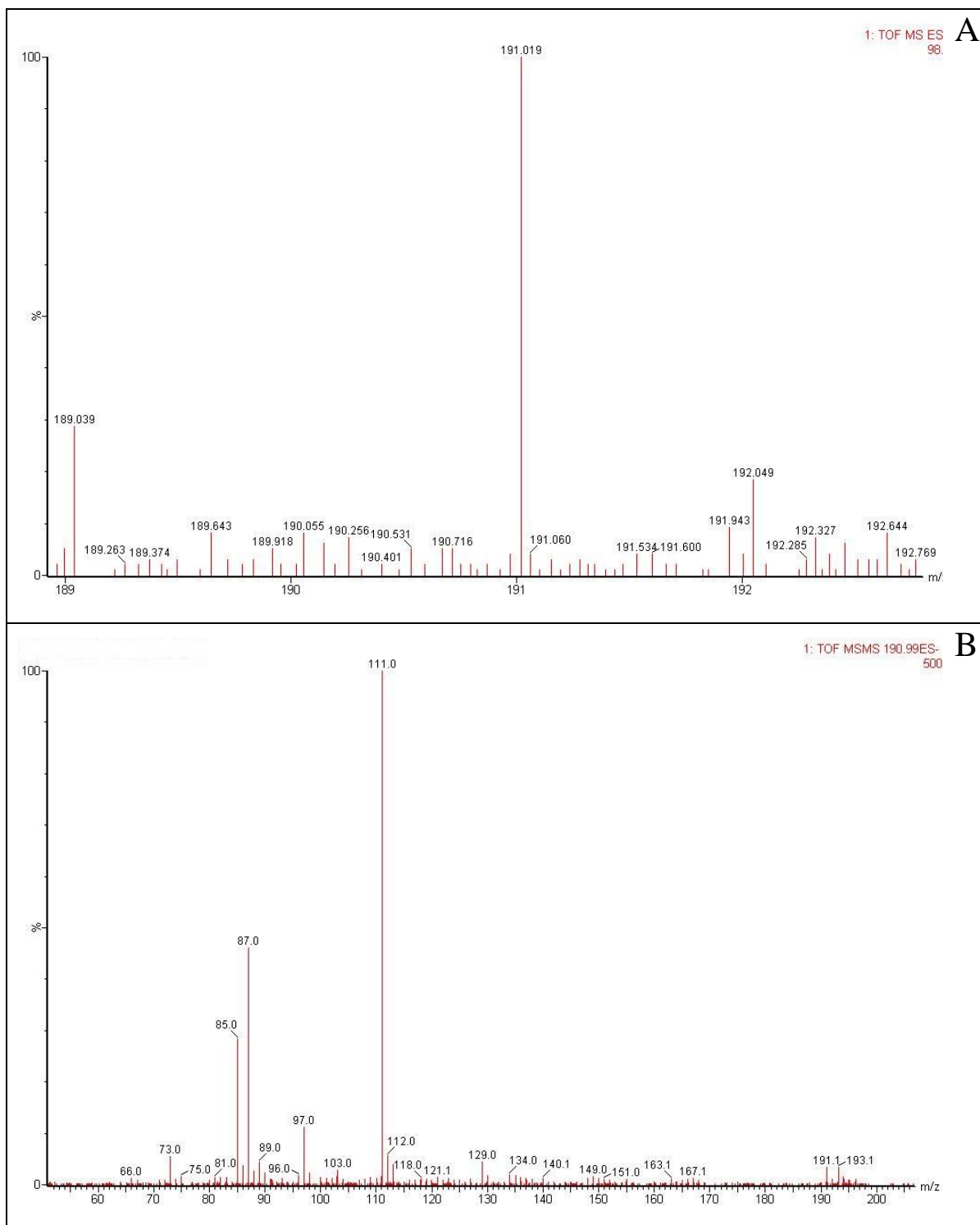
Med prebavo se netopne oblike elementov zaradi spremembe pH v želodcu (pH med 1 in 3) lahko spremenijo v topne oblike, pri prehodu skozi tako črevo (pH med 7 in 8) pa se lahko topne oblike elementov, zaradi obarjanja, ponovno spremenijo v netopne (Ruby in sod., 1996). Da bi ugotovili, kako vplivajo procesi med prebavo na spreminjanje kemijskih oblik cinka v človeškem in kravjem mleku, smo izvedli *in vitro* poskus biološke dostopnosti cinka, po poenostavljenem postopku Ruby-a in sod. (1996). Postopek je podrobno opisan v poglavju 3.2.4.

Pred *in vitro* poskusom smo s CIM DEAE-FAAS določili kemijske oblike cinka v vzorcu mleka. Ligand na katerega je bil cink vezan smo identificirali z ESI-MS-MS v frakcijah, kjer je bila koncentracija cinka v prvem in drugem kromatografskem vrhu najvišja. Nato smo vzorec nakisali s HCl in simulirali pogoje v želodcu. Po eni uri smo vzorec filtrirali in analizirali sirotko. Drugemu alikvotu nakisanega mleka smo pH dvignili z dodatkom NaHCO₃ na vrednost 7,2-8 in simulirali pogoje v tankem črevesu. Po eni uri smo vzorec filtrirali in v filtratu določali kemijske oblike cinka.

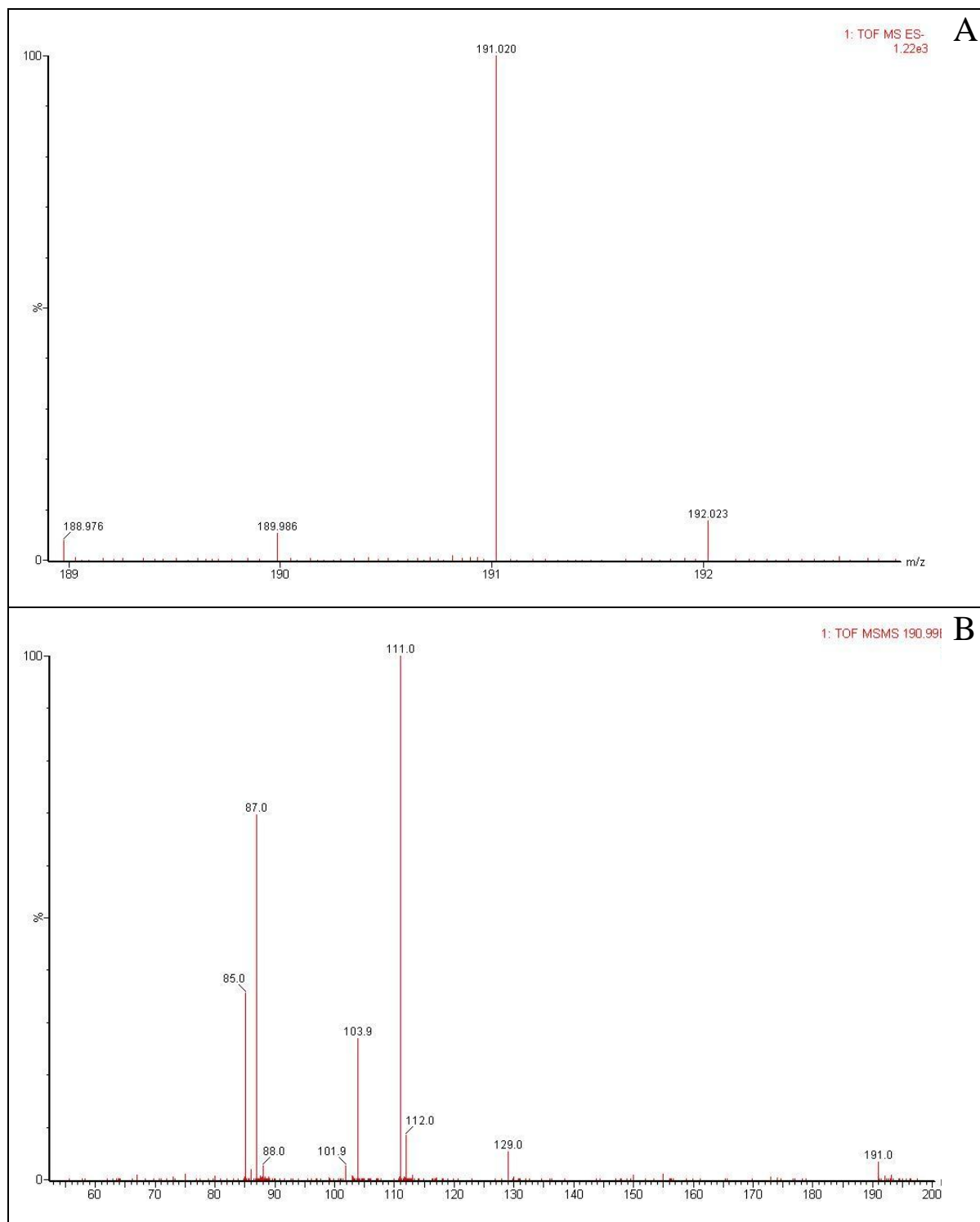
Najprej smo preučevali biološko dostopnost cinka v človeškem mleku. Porazdelitev kemijskih zvrsti cinka človeškega mleka darovalke III, odvzetega v tretjem mesecu dojenja, na CIM DEAE koloni s FAAS detekcijo prikazuje slika 6, masne spektre v frakcijah po kromatografski ločbi (ESI-MS-MS analiza) pa slike 7a do 7f.



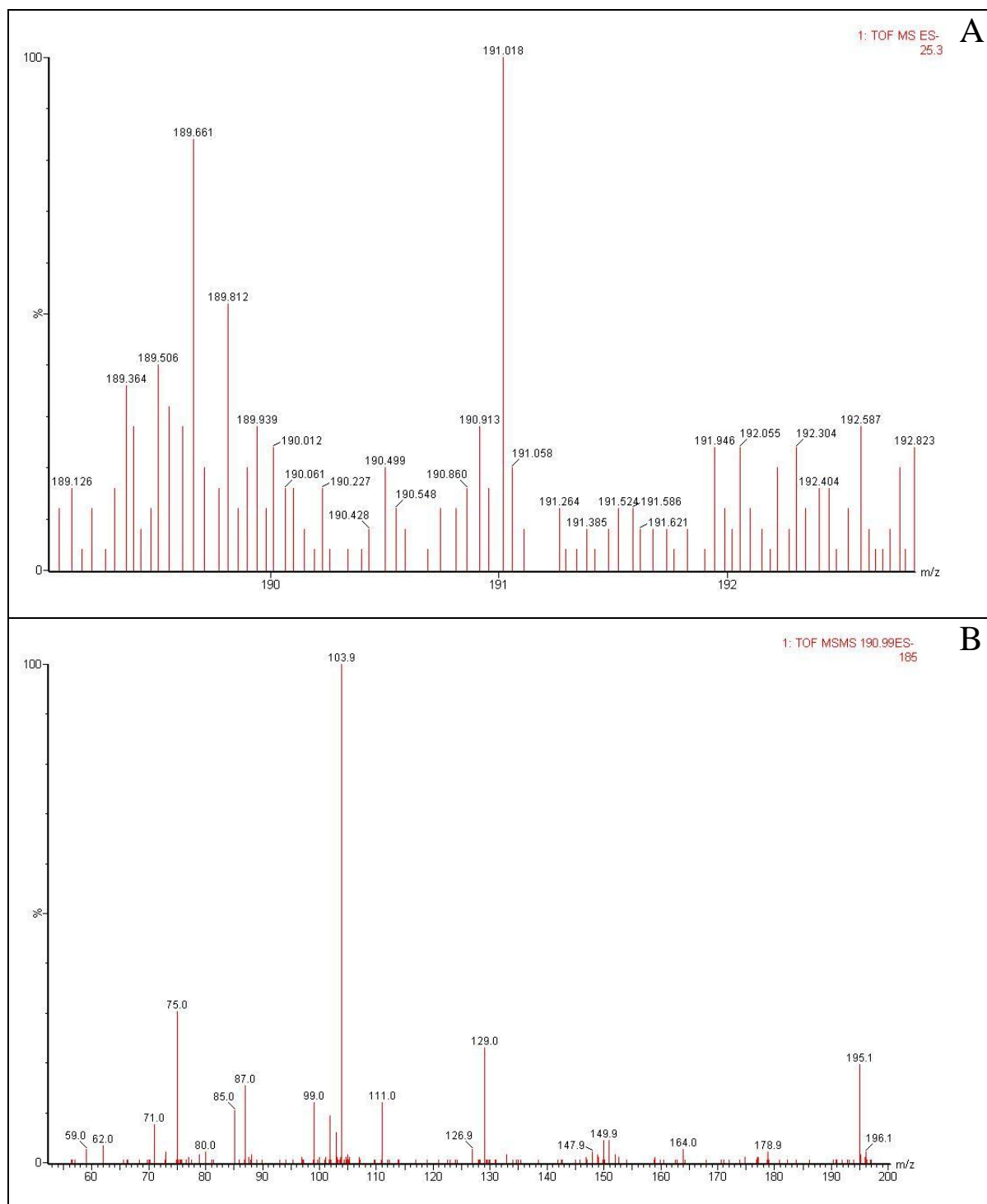
Slika 6: Porazdelitev cinka v vzorcu človeškega mleka (vzorec III) na CIM DEAE koloni s FAAS detekcijo. (A) Vzorec LMM frakcije mleka (pH 6,5). (B) Vzorec mleka smo nakisali s HCl, po eni uri filtrirali in analizirali sirotko (pH 3). (C) Vzorec mleka smo najprej nakisali s HCl, po eni uri smo dodali NaHCO₃, pustili stati še eno uro, filtrirali in analizirali filtrat (pH 8)



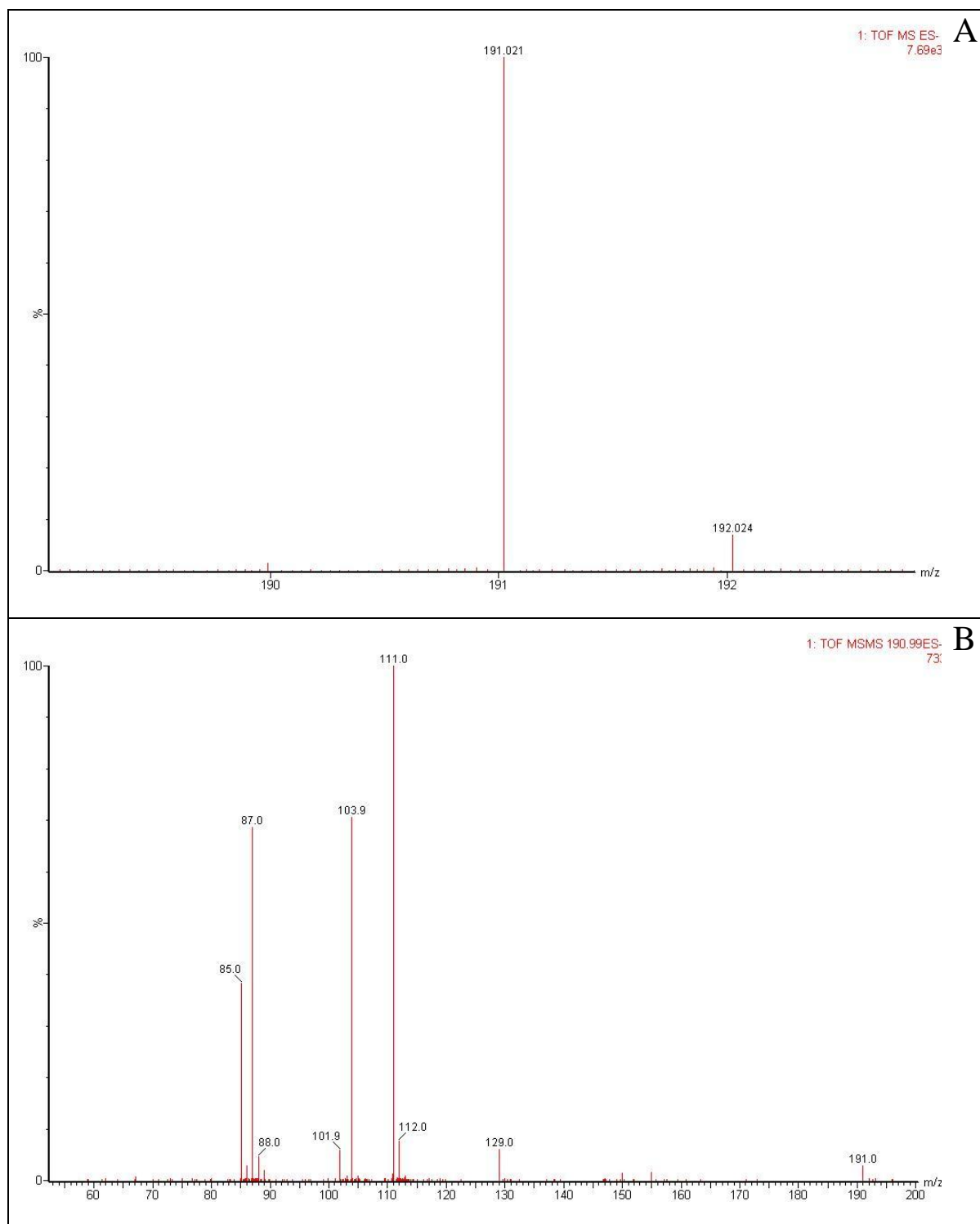
Slika 7a: (A) MS spekter prvega kromatografskega vrha cinka v vzorcu človeškega mleka (vzorec III) (pH 6,5) po ločbi na CIM DEAE koloni ter (B) MS-MS spekter hčerinskega iona (m/z 191)



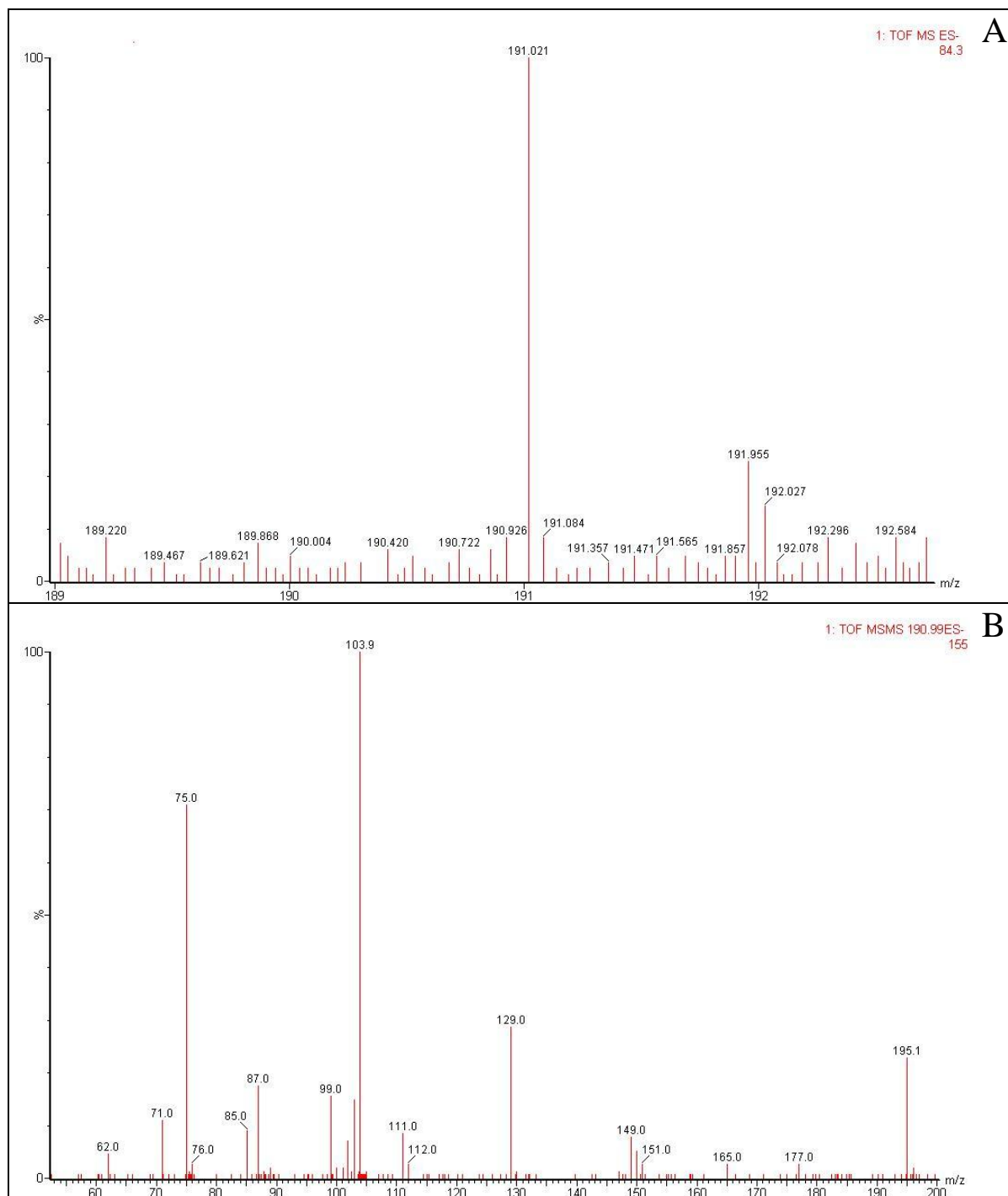
Slika 7b: (A) MS spekter drugega kromatografskega vrha cinka v vzorcu človeškega mleka (vzorec III) (pH 6,5) po ločbi na CIM DEAE koloni ter (B) MS-MS spekter hčerinskega iona (m/z 191)



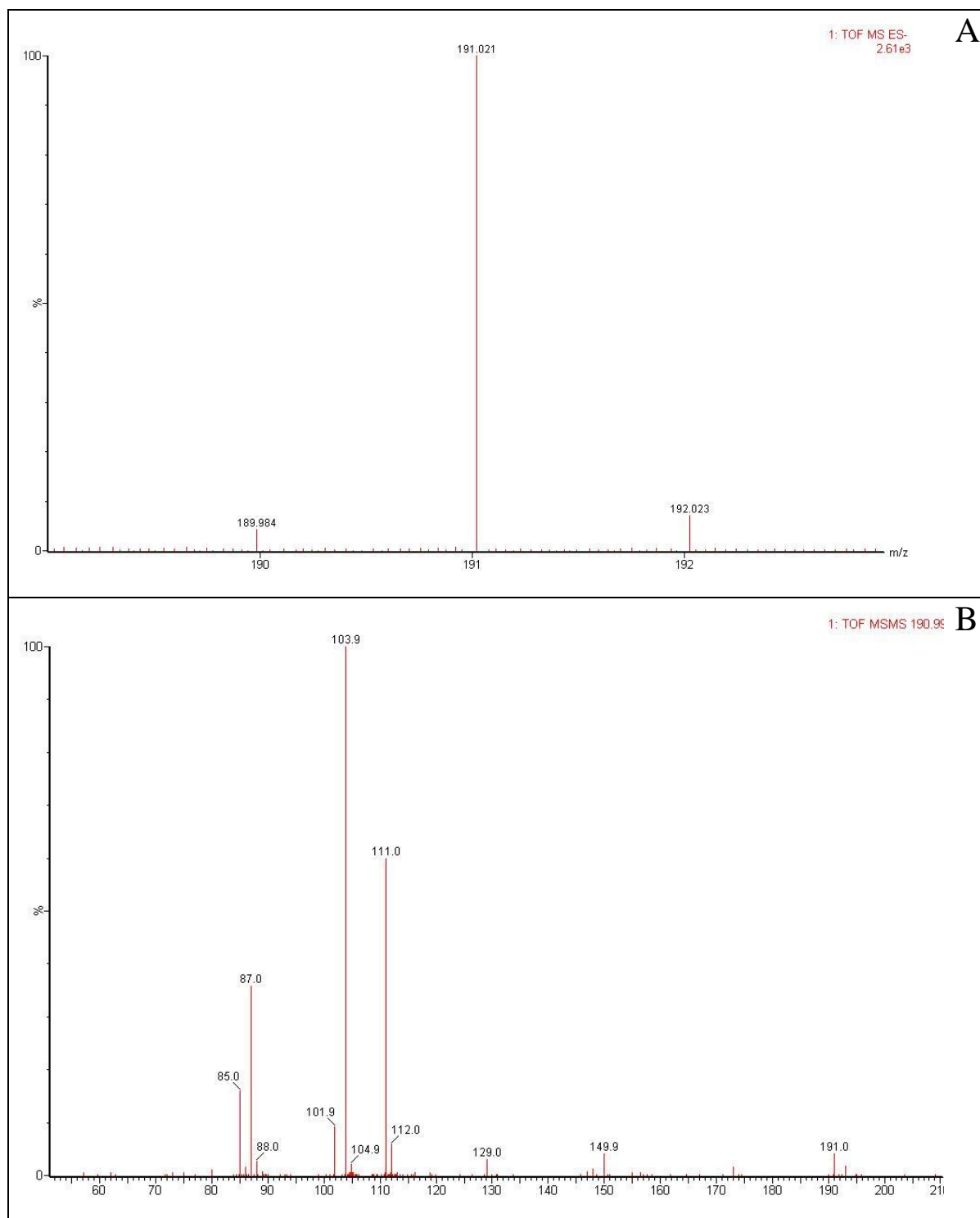
Slika 7c: (A) MS spekter prvega kromatografskega vrha cinka v vzorcu človeškega mleka (vzorec III) po nakisanju s HCl (pH 3) in ločbi na CIM DEAE koloni ter (B) MS-MS spekter hčerinskega iona (m/z 191)



Slika 7d: (A) MS spekter drugega kromatografskega vrha cinka v vzorcu človeškega mleka (vzorec III) po nakisanju s HCl (pH 3) in ločbi na CIM DEAE koloni ter (B) MS-MS spekter hčerinskega iona (m/z 191)



Slika 7e: (A) MS spekter prvega kromatografskega vrha cinka v vzorcu človeškega mleka (vzorec III) po nakisanju s HCl ter dodatku NaHCO₃ (pH 8) in ločbi na CIM DEAE koloni ter (B) MS-MS spekter hčerinskega iona (m/z 191)



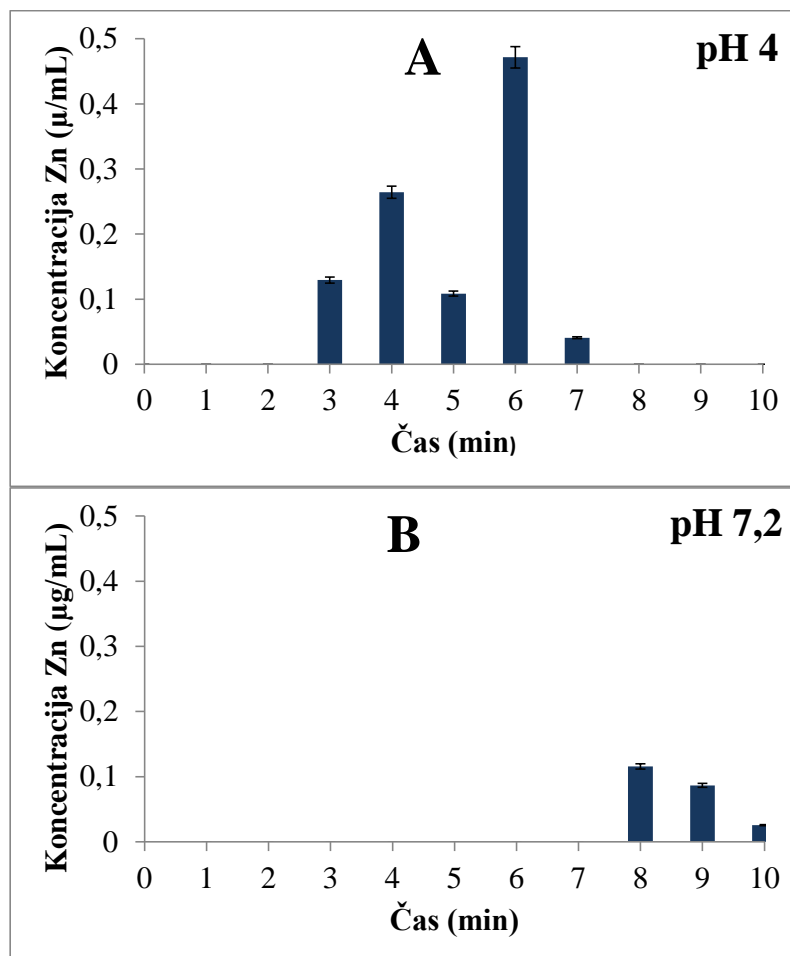
Slika 7f: (A) MS spekter drugega kromatografskega vrha cinka v vzorcu človeškega mleka (vzorec III) po nakisanju s HCl ter dodatku NaHCO₃ (pH 8) in ločbi na CIM DEAE koloni ter (B) MS-MS spekter hčerinskega iona (m/z 191)

V preiskovanem vzorcu človeškega mleka je bila celotna koncentracija cinka $4,1 \pm 0,1$ $\mu\text{g/mL}$, delež v LMM frakciji pa $1,02 \pm 0,04$ $\mu\text{g/mL}$ (25 % celotne koncentracije). Podatki iz slike 6 (A) kažejo, da se cinkove zvrsti v LMM frakciji mleka kvantitativno eluirajo pri retencijskih časih karakterističnih za Zn-citrat. Prvi kromatografski vrh odgovarja $[\text{Zn}(\text{Cit})]^-$ in drugi $[\text{Zn}(\text{Cit})_2]^{4-}$. Tudi razmerje med prvim in drugim kromatografskim vrhom odgovarja teoretični predvideni porazdelitvi Zn-citrata pri pH 6,5 (Powell in Pettit, 1997). Iz masnega spektra prvega kromatografskega vrha (slika 7a (A)) je razvidna prisotnost deprotonirane citronske kisline (m/z 191). Ostale mase izhajajo iz eluentov, ki smo jih uporabili pri kromatografski ločbi in masno spektrometrični analizi. Tudi MS-MS spekter (slika 7a (B)) hčerinskih ionov z m/z 111, 87 in 85 potrjuje prisotnost deprotonirane citronske kisline pod prvim kromatografskim vrhom. MS in MS-MS drugega kromatografskega vrha (slika 7 b) prav tako potrjujejo prisotnost deprotonirane citronske kisline. Na osnovi podatkov iz slike 6 (A) in Slike 7a in b lahko torej sklepamo, da je cink v LMM frakciji človeškega mleka prisoten v obliki Zn-citrata.

Po nakisanju s HCl se je cink vezan na proteine delno sprostil v obliki Zn^{2+} ionov in se je njegova koncentracija v LMM frakciji povečala na vrednost $2,2 \pm 0,1$ $\mu\text{g/mL}$. Iz porazdelitve cinkovih zvrsti po kromatografski ločbi (slika 6 (B)) in masno spektrometrične analize (sliki 7c in d) je razvidno, da ostane cink kljub nakisanju vzorca pri pH 3 v obliki Zn-citrata. Prevladujeta mešanici zvrsti $[\text{Zn}(\text{Cit})]^-$ in $[\text{ZnH}_2(\text{Cit})]^+$, kar je v skladu s teoretičnimi izračuni (Powell in Pettit, 1997) in eksperimentalnimi podatki, ki so jih pri študiju porazdelitve kompleksov Zn-citrata v odvisnosti od pH poročali Milačič in sod. (2012). Pod prvim in drugim kromatografskim vrhom se cink kvantitativno eluira.

Po dodatku NaHCO_3 se je pH vzorca dvignil na vrednost 8. Ker se je cink pri pH 8 delno oboril, se je njegova celotna koncentracija v LMM frakciji mleka znižala na vrednost $1,50 \pm 0,08$ $\mu\text{g/mL}$. Cink se je na koloni ločil v dveh kromatografskih vrhovih (slika 6 (C)), tipičnih za Zn-citrat. Razmerje med prvim in drugim kromatografskim vrhom odgovarja teoretični predvideni porazdelitvi Zn-citrata pri pH 8 (Powell in Pettit, 1997). MS in MS-MS spektra prvega in drugega kromatografskega vrha (sliki 7e in 7f) kažeta prisotnost deprotonirane citronske kisline, kar potrjuje, da je cink v LMM frakciji mleka tudi po dvigu pH na vrednost 8 prisoten v obliki Zn-citrata. Koncentracija cinka, ki se je eluiral pod obema kromatografskima vrhovoma, je bila $0,48 \pm 0,02$ $\mu\text{g/mL}$, kar predstavlja 35 % cinka prisotnega v LMM frakciji pri pH 8. Preostali cink se je v obliki hidrokso zvrsti adsorbiral na kolono.

Po enakem postopku kot pri človeškem mleku, smo *in vitro* poskus biološke dostopnosti cinka opravili z vzorcem kravjega mleka. Preučevali smo kravje mleko Planika. Ker je bila vsebnost cinka v LMM frakciji mleka le $0,005 \pm 0,001$ $\mu\text{g/mL}$, speciacijske analize ni bilo mogoče izvesti. Porazdelitev kemijskih zvrsti cinka na CIM DEAE koloni s FAAS detekcijo v vzorcu kravjega mleka eno uro po nakisanju s HCl in eno uro po dodatku NaHCO_3 prikazuje slika 8.



Slika 8: Porazdelitev cinka v vzorcu kravjega mleka Planika. (A) Vzorec mleka smo nakisali s HCl, po eni uri filtrirali in analizirali sirotko (pH 4). (B) Vzorec mleka smo najprej nakisali s HCl, po eni uri smo dodali NaHCO₃, pustili stati še eno uro ter filtrirali in analizirali filtrat (pH 7)

V kravjem mleku Planika (pH 6,7) je bila celotna koncentracija cinka $3,6 \pm 0,1$ µg/mL, delež v LMM frakciji pa manjši od 1 %. Podatki iz slike 8 (A) kažejo, da se je cink vezan na proteine po nakisanju s HCl v veliki meri sprostil v obliki Zn²⁺ ionov. Njegova koncentracija se je v LMM frakciji pri pH 4 povečala iz 0,005 na vrednost $1,30 \pm 0,09$ µg/mL. Iz porazdelitve cinkovih zvrsti po kromatografski ločbi (slika 8 (A)) je razvidno, da se cink eluira v razvlečenem kromatografskem vrhu med 3 in 7 min. Koncentracija pod kromatografskim vrhom $1,10 \pm 0,08$ µg/mL predstavlja 85 % cinka v LMM frakciji mleka pri pH 4. Elucijski profil cinka ne nakazuje prisotnost Zn-citrata.

Po dodatku NaHCO₃ se je pH vzorca dvignil na vrednost 7,2, koncentracija cinka v LMM frakciji pa se je le nekoliko znižala ($1,06 \pm 0,08$ µg/mL). Kot je razvidno iz slike 8 (B) se je cink na koloni ločil v razvlečenem kromatografskem vrhu med 8 in 10 min, koncentracija pod kromatografskim vrhom $0,228 \pm 0,005$ µg/mL pa predstavlja 22 %

koncentracije cinka v LMM frakciji mleka pri pH 7,2. Preostali cink se je adsorbiral na kolono.

5 RAZPRAVA

5.1 KONCENTRACIJE CINKA V VZORCIH ČLOVEŠKEGA MLEKA, NADOMESTNEGA MLEKA TER MLEKA ŽIVALSKEGA IN RASTLINSKEGA IZVORA

Celotne koncentracije cinka v človeškem mleku so najvišje v prvih dneh dojenja, v kolostrumu. Leotsinidis in sod. (2005) so v 180 vzorcih kolostruma doječih mater določili koncentracije cinka, ki so se gibale med 3,2 – 6,6 $\mu\text{g/mL}$. Vsebnost cinka v materinem mleku s časom dojenja upada. V zrelem materinem mleku se koncentracije cinka gibljejo med 1,2 in 4,6 $\mu\text{g/mL}$ in se močno razlikujejo glede na geografsko poreklo (Caroli in sod., 1994; Dorea, 2000; Luo in sod., 2010; Khaghani in sod., 2010). V naši študiji smo analizirali koncentracije cinka v mleku treh mater v času dojenja 3 do 6 mesecev. Koncentracije cinka so se zelo razlikovale: njihove vrednosti so se nahajale med 0,2 in 3,1 $\mu\text{g/mL}$, kar je skladno z ugotovitvami drugih raziskovalcev o veliki variabilnosti vsebnosti cinka v človeškem mleku (Caroli in sod., 1994).

Vsebnost cinka v kravjem mleku slovenskih proizvajalcev (3,6 do 3,8 $\mu\text{g/mL}$) je v splošnem podobna človeškemu mleku, bistveno nižjo vsebnost cinka pa smo določili v vzorcu domačega kravjega mleka (1,3 $\mu\text{g/mL}$), kar je lahko povezano z daljšim časom laktacije. Podobne koncentracije cinka v kravjem mleku med 3 in 4 $\mu\text{g/mL}$ so poročali tudi Oberleas in Prasad (1969) in Rajnal-Ljutovac in sod. (2008). Najvišje koncentracije cinka v mleku živalskega izvora smo določili v ovčjem mleku, okoli 8 $\mu\text{g/mL}$, najnižje pa v kozjem mleku, med 2,4 in 3,3 $\mu\text{g/mL}$. Tudi drugi raziskovalci so določili podobne koncentracije v ovčjem mleku (5,2 do 7,5 $\mu\text{g/mL}$) in kozjem mleku (3,4 $\mu\text{g/mL}$) (Rajnal-Ljutovac in sod., 2008).

V mleku rastlinskega izvora so bile celotne koncentracije cinka najnižje. V sojinem mleku smo določili 1,9 $\mu\text{g/mL}$ cinka in v riževem 1,2 $\mu\text{g/mL}$.

V nadomestnem mleku, pripravljenem na osnovi kravjega mleka, so celotne koncentracije cinka visoke. Vrednosti, ki smo jih določili so se gibale med 5,4 in 9,5 $\mu\text{g/mL}$ cinka. Podobne koncentracije cinka 4,2 do 7,1 $\mu\text{g/mL}$, so v nadomestnem mleku na osnovi kravjega mleka na avstrijskem tržišču določili Krachler in sod. (1998) in na italijanskem tržišču Plessi in sod. (1997) med 8 in 8,5 $\mu\text{g/mL}$, nižje koncentracije, okoli 4 $\mu\text{g/mL}$ cinka, pa so vsebovali vzorci nadomestnega mleka na iranskem tržišču (Khaghani in sod., 2010).

Kljub visokim celotnim koncentracijam cinka v mleku živalskega izvora, so njegove koncentracije v LMM frakciji mleka zelo nizke in v glavnem ne presegajo vrednosti 1 % celotne koncentracije cinka, kar pomeni, da je cink v mleku živalskega izvora za človeka manj dostopen. Martin in sod. (1984) in Blakeborough in Gurr (1986) so ugotovili, da kravje mleko sicer v splošnem vsebuje več cinka kot človeško, vendar je cink ljudem manj dostopen, saj je prisoten v kemijskih oblikah, ki se razlikujejo od tistih v človeškem mleku.

Harzer in Kauer (1982) sta z uporabo velikostne izključitve kromatografije (SEC) in dializo ločenih kromatografskih frakcij ugotovila, da je približno 90 % cinka v kravjem mleku vezanega v kazeinskih micelih, medtem ko je v človeškem mleku kazeinske frakcije bistveno manj. Srinivas in Prakash (2011) sta dokazala, da je α -kazein glavni kazein v kravjem mleku, ki veže cink. Podobno kot za kravje mleko, lahko sklepamo, da je biološka dostopnost cinka iz kozjega in ovčjega mleka za človeka nizka, saj ovčje in kozje mleko, podobno kot kravje, vsebuje visok delež mlečnih proteinov.

Tudi v naši raziskavi smo ugotovili, da se v človeškem mleku nahaja bistveno večji delež cinka v LMM frakciji mleka (približno 25 %). Ugotovitve te študije se ujemajo z izsledki naše predhodne raziskave (Milačič in sod., 2012).

Podoben odstotek vsebnosti cinka v LMM frakciji mleka se nahaja v riževem mleku, v sojinem mleku pa predstavlja koncentracija LMM-Zn kar 78 % njene celotne vrednosti. Kljub vsemu pa je pri oceni biološke dostopnosti cinka iz riževega ali sojinega mleka pomembno vedeti, na kateri LMM ligand je cink vezan. Slednje pa ni bilo predmet tokratne raziskave.

V nadomestnem mleku na osnovi kravjega mleka, je med 0,5 in 1,3 % cinka v LMM frakciji mleka. Ker so celotne koncentracije cinka v nadomestnem mleku visoke, dojenček, ki se prehranjuje z nadomestnim mlekom, kljub temu najverjetneje v glavnem zadosti dnevne potrebe po cinku.

5.2 BIOLOŠKA DOSTOPNOST CINKA V ČLOVEŠKEM IN KRAVJEM MLEKU

Številne raziskave so pokazale, da je cink v človeškem mleku za dojenčka biološko bolj dostopen kot cink v kravjem mleku (Harzer in Kauer, 1982; Martin in sod., 1984; Blakeborough in Gurr, 1986). S kromatografskimi metodami so ugotovili, da je cink v kravjem mleku vezan pretežno na kazeine (Harzer in Kauer, 1982) in da je med njimi α -kazein najbolj pomemben HMM ligand, ki veže cink (Srinivas in Prakash, 2011). Predvidevanja, da je v človeškem mleku cink v LMM frakciji vezan v obliki Zn-citrata (Martin in sod., 1984; Brätter in sod., 1997; De la Flor St. Remy in sod., 2004), so potrdili Milačič in sod. (2012). Na osnovi kvantitativne določitve Zn-citrata so ugotovili, da predstavlja njegova vsebnost v človeškem mleku približno 25 % celotne vsebnosti cinka.

Človeško mleko se od kravjega zelo razlikuje v koncentraciji kazeinov. V človeškem mleku je kazeinov okoli 0,4 % (Prentice, 1996), v kravjem mleku pa približno 3,0 % (Schönfeldt in sod., 2012, Srinivas in Prakash, 2011). Čeprav je koncentracija citrata v človeškem mleku (2,66 mM) (Bernd in sod., 1998), podobna tisti v kravjem mleku (2 mM) (Baticz in sod., 2002), se zaradi višje koncentracije proteinov in velike afinitete vezave cinka na proteine (kazeine), cink v kravjem mleku prednostno veže na kazeine. S tem se biološka dostopnost cinka v kravjem mleku za človeka zmanjša.

Biološka dostopnost cinka predstavlja delež zaužitega cinka, ki se v prebavilih absorbira. Po zaužitju se cink tekom prebave sprost iz hrane in absorbira v večji meri v proksimalnem delu tankega črevesa (Krebs, 2013). V naši raziskavi nas je zanimalo, kako se v prebavnem traktu spreminjajo kemijske oblike cinka, ki jih dojenček zaužije s človeškim ali kravjim mlekom. S poenostavljenim *in vitro* poskusom za oceno biološke dostopnosti (Ruby in sod., 1996) smo simulirali reprezentativne pogoje v človeških prebavilih pri prehodu zaužite hrane skozi želodec in tanko črevo. Pri *in vitro* poskusu smo upoštevali povprečne vrednosti pH v želodcu (pH 3) in tankem črevesu (pH 7-8) ter zadrževalni čas hrane v prebavilih dojenčka (ena ura v želodcu in ena ura v tankem črevesu). Kemijska oblika v kateri se ob prisotnosti številnih ligandov nahaja cink, je v veliki meri odvisna od pH v prebavnem traktu.

Začetni pH pri preiskovanem človeškem in kravjem mleku je bil podoben (6,5, oziroma 6,7). Po nakisanju z 0,1 M HCl se je pH pri človeškem mleku spustil na vrednost 3, pri kravjem pa na vrednost 4. Pri dvigu pH z NaHCO₃ se je njegova vrednost v človeškem mleku povzpela na 8, v kravjem pa na 7,2. Zaradi večje vsebnosti proteinov ima kravje mleko večjo pufrno kapaciteto kot človeško, zato se pH pri kravjem mleku skozi prebavni trakt ne spreminja tako močno, kot pri zaužitju človeškega mleka. Podobna opažanja so poročali Blakeborough in sod. (1986), ki so 14 dni hranili novorojene prašičje mladiče s kravjim in človeškim mlekom. Po 14 dneh so živali žrtvovali in preučevali koncentracije cinka v želodcu in tankem črevesu. pH v želodčni tekočini je bil eno uro po zaužitju mleka pri kravjem mleku 3,4 pri človeškem pa 2,3 in se je razlikoval za eno enoto, tako kot smo to ugotovili tudi v našem *in vitro* poskusu. V tekočini tankega črevesa se je pri poskusu Blakeborougha in sod. (1986) pH pri kravjem mleku dvignil na 6,7 in pri človeškem mleku na 7,2. Ravno tako smo pri našem *in vitro* poskusu pri simulaciji procesov v tankem črevesu v človeškem mleku določili višji pH kot pri kravjem mleku, kjer je bil pH nižji.

Preiskovan vzorec človeškega mleka je vseboval 4,1 µg/mL cinka. Rezultati določanja kemijskih zvrsti cinka in identifikacija liganda z elektrorazpršilno tandemsko masno spektrometrijo (sliki 6 in 7) so pokazali, da znaša delež cinka v LMM frakciji približno 25 % njegove celotne koncentracije, kar je potrdilo izsledke iz naše predhodne študije (Milačič in sod. 2012).

Rezultati *in vitro* poskusa so pokazali, da se po nakisanju s HCl, cink vezan na proteine delno sprost v obliki Zn²⁺ ionov, in se njegova koncentracija v LMM frakciji podvoji. Glede na porazdelitev cinkovih zvrsti po kromatografski ločbi in podatkov masno spektrometrične analize lahko sklepamo, da je kljub nakisanju vzorca, cink pri pH 3 še vedno prisoten v obliki Zn-citrata. Kljub vsemu pa del cinka, ki se sprost iz proteinov v obliki Zn²⁺ ionov, v času ene ure zadrževanja v želodcu, pri pH 3 ne more tvoriti stabilnega kompleksa s citratom, prisotnim v vzorcu mleka, ker je kinetika tvorbe Zn-citrata počasen proces. Milačič in sod. (2012) so s speciacijsko analizo s CIM DEAE-FAAS postopkom pokazali, da je za kvantitativno tvorbo Zn-citrata iz Zn²⁺ ionov in citronske kisline pri 25

°C potrebno najmanj 24 ur. Iz omenjenih ugotovitev in porazdelitve Zn^{2+} ionov v prisotnosti HCl pri pH 3 (slika 5A) lahko torej sklepamo, da se pod kromatografskim vrhom $[Zn(Cit)]^-$ soeluirira tudi Zn^{2+} .

Po dodatku $NaHCO_3$, ki simulira procese v tankem črevesu, se je pH vzorca dvignil na vrednost 8. Zaradi delnega obarjanja cinkovih zvrsti pri pH 8, se je njegova celotna koncentracija v LMM frakciji mleka znižala na vrednost 1,50 $\mu\text{g/mL}$, od tega je bilo 0,48 $\mu\text{g/mL}$ cinka prisotnega v obliki Zn-citrata. Iz navedenega sledi, da procesi v prebavnem traktu ne spremenijo kemijske oblike Zn-citrata. Glede na njegovo začetno koncentracijo, se le-ta zmanjša približno na polovico. Rezultati *in vitro* poskusa so torej potrdili, da Zn-citrat v človeškem mleku vzdrži spremembe pH v prebavnem traktu in da je cink tudi pri prehodu skozi tanko črevo prisoten v kemijski obliki, ki je biološko dostopna za dojenčka.

Rezultati *in vitro* poskusa, ki je simuliral prehod kravjega mleka skozi prebavila dojenčka so pokazali, da se je po nakisanju s HCl, koncentracija cinka prisotnega v LMM frakciji mleka znatno povečala, iz 0,005 na 1,3 $\mu\text{g/mL}$. Na osnovi porazdelitve cinkovih zvrsti po kromatografski ločbi smo ugotovili, da Zn^{2+} , ki se je sprostil pri pH 4 iz mlečnih kazeinov, ni tvoril kompleksa s citratom v mleku, saj je bil zadrževalni čas ene ure za tvorbo kompleksa Zn-citrata prekratek. Po dodatku $NaHCO_3$ (pH vzorca 7,2) se je koncentracija cinka v LMM frakciji le nekoliko znižala, na približno 1 $\mu\text{g/mL}$. Kromatografska ločba cinka je pokazala, da se je cink na koloni večinoma adsorbiral, delno pa ločil v razvlečenem kromatografskem vrhu med 8 in 10 min, kar nakazuje prisotnost cinkovih hidroksidov, ki so za dojenčka slabo biološko dostopne.

Na osnovi izsledkov diplomskega dela lahko zaključimo, da je biološka dostopnost cinka v človeškem mleku večja od tiste v živalskem, ker se ga bistveno večji delež nahaja v obliki Zn-citrata, ki vzdrži spremembe pH v prebavnem traktu dojenčka. Materino mleko je zato za otroka najboljši prehranski vir cinka.

6 SKLEPI

V diplomskem delu smo določali celotne koncentracije cinka v človeškem mleku, mleku živalskega in rastlinskega izvora in v nadomestnem mleku ter delež cinka v LMM frakciji mleka. Izvedli smo tudi preizkus biološke dostopnosti cinka, če dojenčka prehranjujemo s človeškim ali kravjim mlekom.

Celotne koncentracije cinka v človeškem mleku so kazale na veliko variabilnost. V mleku različnih mater v času dojenja 3 do 6 mesecev, je bila vsebnost cinka med 0,2 in 3,1 $\mu\text{g/mL}$. Kravje mleko slovenskih proizvajalcev je vsebovalo med 3,6 in 3,8 $\mu\text{g/mL}$ cinka, domače kravje mleko pa le 1,3 $\mu\text{g/mL}$, kar je najverjetneje povezano z daljšim časom laktacije. Najvišje koncentracije cinka v mleku živalskega izvora je vsebovalo ovčje mleko (8 $\mu\text{g/mL}$), najnižje pa kozje (med 2,4 in 3,3 $\mu\text{g/mL}$). V mleku rastlinskega izvora so bile koncentracije cinka nižje (1,9 $\mu\text{g/mL}$ v sojinem in 1,2 $\mu\text{g/mL}$ v riževem mleku). V nadomestnem mleku s slovenskega tržišča, pripravljenem na osnovi kravjega mleka, so se koncentracije cinka gibale med 4,2 do 7,1 $\mu\text{g/mL}$.

Ugotovili smo, da kljub visokim koncentracijam cinka v mleku živalskega izvora, njegove koncentracije v LMM frakciji predstavljajo le okoli 1 % celotne vsebnosti cinka. Vsebnost cinka v LMM frakciji človeškega mleka je bila okoli 25 %. Visok delež cinka v LMM frakciji mleka smo izmerili v sojinem (78 %) in riževem (25 %) mleku. V nadomestnem mleku na osnovi kravjega mleka, so se koncentracije cinka v LMM frakciji gibale med 0,5 do 1,3 %. Zaradi visokih celotnih koncentracij cinka pa dojenček, ki se hrani z nadomestnim mlekom, najverjetneje večinoma zadosti dnevne potrebe po cinku.

Z *in vitro* poskusom smo ocenili biološko dostopnost cinka iz človeškega in kravjega mleka. Z nakisnjem s HCl na pH 3 do 4 smo simulirali pH v želodcu, nato pa smo z dodatkom NaHCO_3 pH dvignili na vrednost 7,2 do 8 in s tem simulirali pogoje v tankem črevesu. Upoštevali smo tudi zadrževalni čas hrane v prebavilih dojenčka.

Pokazali smo, da se je pri pogojih nizkega pH, ki je simuliral stanje v želodcu, cink iz človeškega in kravjega mleka, ki je vezan na proteine, delno sprostil v obliki Zn^{2+} ionov. V kratkem zadrževalnem času (približno 1 uro, kot naj bi trajala prebava v želodcu), sproščeni Zn^{2+} ne bi mogel tvoriti kompleksa s citratom, ker je tvorba Zn-citrata kinetično dolgotrajen proces. Pri dvigu pH, ki je simuliral pogoje v tankem črevesu, se je cink v človeškem mleku delno oboril. Približno polovica Zn-citrata prisotnega v mleku, je v roku ene ure, kot bi bila potrebna za prehod preko tankega črevesa, ostala v obliki Zn-citrata. V kravjem mleku se je cink pri enakih pogojih, večinoma oboril, delež, ki je ostal v obliki hidrokso zvrsti, pa je za dojenčka slabo biološko dostopen.

Zaključimo lahko, da je biološka dostopnost cinka v človeškem mleku bistveno večja kot v kravjem, saj velik delež Zn-citrata v človeškem mleku vzdrži spremembe pH v prebavnem traktu dojenčka. Zato je materino mleko za dojenčka najboljši prehranski vir cinka.

7 POVZETEK

Cink je esencialen mikronutrient, potreben za rast in razvoj vseh živih bitij. Novorojenček dobi zadostne količine cinka z materinim mlekom. Kadar mati ne more dojiti, hranimo novorojenčka z nadomestnim mlekom ali mlekom živalskega oziroma rastlinskega izvora.

V diplomskem delu smo določali celotne koncentracije cinka v človeškem mleku, mleku živalskega in rastlinskega izvora in v nadomestnem mleku. Mleku smo najprej odstranili maščobo in vsebnost cinka določili s FAAS. Ker je biološka dostopnost cinka za dojenčka odvisna od deleža, ki je v mleku prisoten v obliki kompleksov cinka z LMM ligandi, smo v vzorcih mleka določili tudi vsebnost cinka v LMM frakciji. Mleko brez maščobe smo mikroultrafiltrirali (MWCO 3000 Da) in cink določili s FAAS.

Celotne koncentracije cinka v mleku treh različnih mater (čas dojenja 3 do 6 mesecev) so se zelo razlikovale. Vsebnost cinka se je gibala med 0,2 in 3,1 $\mu\text{g/mL}$. O veliki variabilnosti vsebnosti cinka v človeškem mleku poročajo tudi drugi številni raziskovalci.

V kravjem mleku slovenskih proizvajalcev smo določili med 3,6 in 3,8 $\mu\text{g/mL}$ cinka, nižjo vrednost cinka (1,3 $\mu\text{g/mL}$) je imelo domače kravje mleko, kar je morebiti povezano z daljšim časom laktacije. Koncentracije cinka v kravjem mleku so podobne, kot jih poročajo raziskovalci v znanstveni literaturi.

V mleku živalskega izvora smo najvišje koncentracije cinka določili v ovčjem (8 $\mu\text{g/mL}$), najnižje pa v kozjem mleku (med 2,4 in 3,3 $\mu\text{g/mL}$). Podobna opažanja poročajo tudi drugi raziskovalci.

Nižje koncentracije cinka je vsebovalo mleko rastlinskega izvora (1,9 $\mu\text{g/mL}$ sojino in 1,2 $\mu\text{g/mL}$ riževo).

V nadomestnem mleku s slovenskega tržišča, pripravljenem na osnovi kravjega mleka, so celotne koncentracije cinka visoke, med 4,2 do 7,1 $\mu\text{g/mL}$. Podobne koncentracije so določili tudi drugi raziskovalci v različnih državah po svetu.

Čeprav so koncentracije cinka v mleku živalskega izvora visoke, so njegove koncentracije v LMM frakciji nizke, okoli 1 % celotne vsebnosti cinka. Iz tega lahko zaključimo, da je cink v mleku živalskega izvora za človeka manj dostopen. O podobnih ugotovitvah poročajo tudi drugi raziskovalci v znanstveni literaturi.

Vsebnost cinka v LMM frakciji človeškega mleka je bila okoli 25 %, kar je v skladu z našimi predhodnimi raziskavami.

Visok delež cinka v LMM frakciji mleka se nahaja v sojinem (78 %) in riževem (25 %) mleku.

V nadomestnem mleku na osnovi kravjega mleka, se v LMM frakciji nahaja med 0,5 in 1,3 % cinka. Ker so celotne koncentracije cinka v nadomestnem mleku zelo visoke, dojenček z uživanjem nadomestnega mleka najverjetneje večinoma zadosti dnevne potrebe po cinku.

Rezultati številnih raziskav so pokazali, da je cink v človeškem mleku za dojenčka biološko bolj dostopen kot cink v kravjem mleku. V kravjem mleku je cink vezan pretežno na α -kazein, v človeškem mleku pa je velik delež cinka (25 %) prisoten v obliki Zn-citrata, ki je biološko bolj dostopna oblika cinka.

V diplomskem delu smo z *in vitro* poskusom ocenili biološko dostopnost cinka iz človeškega in kravjega mleka tako, da smo simulirali pH v želodcu (nakisanje na pH 3 do 4 s HCl) in tankem črevesu (dvig pH na 7,2 - 8 z NaHCO₃) in upoštevali zadrževalni čas hrane v prebavilih dojenčka (ena ura v želodcu in ena ura v tankem črevesu).

S speciacijsko analizo s CIM DEAE monolitno kromatografijo in FAAS detekcijo ločenih cinkovih zvrsti ter identifikacijo liganda z ESI-MS-MS, smo ugotovili, da se po nakisanju s HCl, cink vezan na proteine delno sprosti v obliki Zn²⁺ ionov in se njegova koncentracija v LMM frakciji, tako v človeškem kot v kravjem mleku, poveča. Sproščeni cink v kratkem času zadrževanja v želodcu zaradi počasne tvorbe kompleksa z razpoložljivim citratom prisotnim v mleku ne more tvoriti Zn-citrata. Po dodatku NaHCO₃, s katerim smo simulirali procese v tankem črevesu, se je pH vzorca pri človeškem in kravjem mleku dvignil na rahlo alkalne vrednosti. Rezultati speciacijske analize so potrdili, da se je cink v LMM frakciji človeškega mleka delno oboril, večinoma pa ostal v obliki Zn-citrata. V kravjem mleku se je cink večinoma oboril, oziroma delno ostal prisoten v obliki hidrokso zvrsti.

Pomemben izsledek *in vitro* poskusa je, da Zn-citrat v človeškem mleku vzdrži spremembe pH v prebavnem traktu in ostane tudi pri prehodu skozi tanko črevo prisoten v kemijski zvrsti Zn-citrata, ki je biološko dostopna oblika za dojenčka.

V kravjem mleku se cink pri prehodu skozi prebavni trakt večinoma obori, delež, ki ostane v obliki hidrokso zvrsti, pa je za dojenčka slabo biološko dostopen.

Biološka dostopnost cinka v človeškem mleku je večja kot v živalskem, saj se bistveno večji delež cinka nahaja v obliki Zn-citrata, ki vzdrži spremembe pH v prebavnem traktu dojenčka. Zato lahko zaključimo, da je materino mleko za dojenčka najboljši prehranski vir cinka.

8 VIRI

- Almaas H., Cases A-L., Devold T. G., Holm H., Langsrud T., Aabakken L., Aadnoey T., Vegarud G. E. 2006. In Vitro Digestion of Bovine and Caprine Milk by Human Gastric and Duodenal Enzymes. *International Dairy Journal*, 16: 961–968
- Ballard O., Morrow A. L. 2013. Human Milk Composition Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60, 1: 49-74
- Barłowska J., Sz wajkowska M., Litwinczuk Z., Król J. 2011. Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10: 291-302
- Baticz O., Tömösközi S., Vida L. 2002. Concentrations of citrate and ketone bodies in cow's raw milk. *Periodica Polytechnica: Chemical Engineering*, 46: 93-104
- Bernd H., Bernd R, Christian B., Craig L. B. 1988. Oxalate, Citrate, and Sulfate Concentration in Human Milk Compared with Formula Preparations: Influence on Urinary Anion Excretion. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 27: 383-386
- Bhatia J., Greer F. 2009. Committee on Nutrition. Use of Soy Protein-Based Formulas in Infant Feeding. *Pediatrics*, 121: 1062-1068
- Blakeborough P., Gurr M. I. 1986. Digestion of the Zinc in Human Milk, Cow's Milk and a Commercial Baby Food: Some Implications for Human Infant Nutrition. *British Journal of Nutrition*, 55: 209-217
- Brätter P., Negretti de Brätter V. E., Recknagel S., Brunetto R. 1997. Maternal Selenium Status Influences the Concentration and Binding Pattern of Zinc in Human Milk. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 11: 203-209
- Caroli S., Alimonti A., Coni E., Petrucci F., Senofonte O., Violante N. 1994. The assesment of reference values for elements in human biological tissues and fluids: A systematic review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 24: 363-398
- Chasapis C. T., Loutidou A. C., Siliopoulou C. A., Stefanidou, M. E. 2012. Zinc and Human Health: An Update. *Archives in Toxicology*, 86, 4: 521-534
- Cousins R. J., Smith K. T. 1980. Zinc-binding properties of bovine and human milk in vitro: influence of changes in zinc content. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 33: 1083-1087

- De la Flor St. Remy R. R., Fernández Sánchez M. L., López Sastre J. B., Sanz-Medel A. 2004. Multielemental distribution patterns in premature human milk whey and pre-term formula milk whey by size-exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry with octopole reaction cell. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19: 1104-1110
- Dorea J. G. 2000. Zinc in Human Milk. *Nutrition Research*, 20, 11: 1645-1687
- Dufner-Beattie J., Kuo Y-M., Gitschier J., Andrews G. K. 2004. The Adaptive Response to Dietary Zinc in Mice Involves the Differential Cellular Localization and Zinc Regulation of the Zinc Transporters ZIP4 and ZIP5. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 47: 49082-49090
- Frausto da Silva J. J. R., Williams R. J. P. 2001. *The biological chemistry of the elements: The inorganic chemistry of life*. 2nd ed. Oxford, University Press: 575 str.
- Hambraeus L. 1984. Human Milk Composition. *Nutritional Abstracts and Reviews in Clinical Nutrition*, 54, 4: 219-236
- Harzer G., Kauer H. 1982. Binding of zinc to caseins. *American Journal of Clinical Nutrition*, 35: 981-987
- Hur S. J., Lim B. O, Decker E. A., McClements D. J. 2011. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 135: 1-12
- Haug A., Høstmark A. T., Harstad O. M. 2007. Bovine Milk in Human Nutrition. *Lipids in Health and Disease*, 6, 25: 1-16
- Hurley S. L., Duncan J. K., Sloan M. V., Eckhart C. D. 1977. Zinc-binding ligand in milk and intestine: A role in neonatal nutrition? *Proceedings of the National Academy of Sciences, Medical Sciences*, 74: 3547-3549
- Jenness R. 1979. The Composition of Human Milk. *Seminars in Perinatology* 3, 3: 225-239
- Kellner R., Mermet J. M., Otto M., Valcarcel M., Wider H. M. 2004. *Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science*. 2nd ed. Ulm, Ebner and Spiegel: 1181 str.
- Khaghani S., Ezzatpanah H., Mazhari N., Givianrad H. M., Mirmiranpour H., Sadrabadi F.S. 2010. Zinc and copper concentrations in human milk and infant formulas. *Iranian Journal of Pediatrics*, 20: 53-57

- Krebs N. F. 2013. Zinc Homeostasis, Whole Body. V: Encyclopedia of Metalloproteins. Kretsinger R. H., Uversky V. N., Permyakov E. A. (eds.) New York, Springer Science+Business Media: 2428-2432
- Kondyli E., Svarnas C., Samelis J., Katsiari M.C. 2012. Chemical composition and microbiological quality of ewe and goat milk of native Greek breeds. *Small Ruminant Research* 103, 2–3: 194–199
- Krachler M., Rossipal E., Irgolic K. J. 1998. Trace elements in formulas based on cow and soy milk and in Austrian cow milk determined by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Biological Trace Elements Research*, 65: 53-74
- Leotsinidis M., Alexopoulos A., Kostopoulou-Farri E. 2005. Toxic and essential trace elements in human milk from Greek lactating women: Association with dietary habits and other factors. *Chemosphere*, 61: 238-247
- Lönnerdal B. 2003. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77: 1537S–43S
- Lucas A., Morley R., Cole T. J., Gore S. M. 1994. A Randomised Multicentre Study of Human Milk Versus Formula and Later Development in Preterm Infants. *Archives of Disease in Childhood*, 70: F141-F146
- Lucock M. 2007. *Molecular Nutrition and Genomics: Nutrition and Ascent of Humankind* 1st ed. Wiley and Sons, United States of America: 140 str.
- Luo Y., Zhang B., Chen M., Wang J., Zhang X., Gao W-Y., Huang J-F., Fu W-L. 2010. Rapid and simultaneous determination of essential minerals and trace elements in human milk by improved flame atomic absorption spectroscopy (FAAS) with microwave digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 9396-9400
- Martin M. T., Jacobs F. A., Brushmiller J. G. 1984. Identification of Copper and Zinc-binding Ligands in Human and Bovine Milk. *Journal of Nutrition* 114, 5: 869-879
- McKinstry P. J., Indyk H. E., Kim N. D. 1999. The determination of major and minor elements in milk and infant formula by slurry nebulisation and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). *Food Chemistry*, 65: 245-252
- Milačič R., Ajlec D., Zuliani T., Žigon D., Ščančar J. 2012. Determination of Zn-citrate in human milk by CIM monolithic chromatography with atomic and mass spectrometry detection. *Talanta*, 101: 203-210
- Miniello V. L., Moro G. E., Tarantino M., Natile M., Granieri L., Armenio L. 2003. Soy-based formulas and phyto-oestrogens: a safety profile. *Acta Paediatrica*, 91, 441: 93-110

- Oberleas D., Prasad A. S. 1969. Adequacy of trace minerals in bovine milk, for human consumption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 22: 196-199
- Park Y. W., Juárez M., Ramos M., Haenlein G. F. W. 2007. Physico-chemical Characteristics of Goat and Sheep Milk. *Small Ruminant Research*, 68, 1-2: 88–113
- Perales S., Barbera R., Lagarda M. J., Farre R. 2006. Bioavailability of zinc from infant foods by in vitro methods (solubility, dialyzability and uptake and transport by Caco-2 cells). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 971-978
- Plessi M., Bertell, D., Monzani A. 1997. Determination of aluminium and zinc in infant formulas and infant foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10: 36-42
- Powell K. J., Pettit L. D. 1997. IUPAC Stability Constants Database (1997), Academic Software, Otley, United Kingdom.
- Prasad A. S. 2013. Zinc Deficiency. V: *Encyclopedia of Metalloproteins*. Kretsinger R. H., Uversky V. N., Permyakov E. A. (eds.) New York, Springer Science+Business Media: 2412-2420
- Prentice A. 1996. Constituent of human milk. *Food Nutrition Bulletin*, 17: 1-10
- Raynal-Ljutovac K., Lagriffoul G., Paccard P., Guilleta I., Chilliard Y. 2008 Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research* 79, 1: 57–72
- Ruby M. V., Davis A., Schoof R., Eberle S., Sellstone, C. M. 1996. Estimation of Lead and Arsenic Bioavailability Using a Physiologically Based Extraction Test. *Environmental Science and Technology*, 30: 422-430
- Schönfeldt H. C., Hall N. G., Smit L. E. 2012. The need for Country Specific Composition Data on Milk. *Food Research International*, 47, 2: 207-209
- Solis C., Isaac-Olive K., Mireles A., Vidal-Hernandez M. 2009. Determination of trace metals in cow's milk from waste water irrigated areas in Central Mexico by chemical treatment coupled to PIXE. *Microchemical Journal*, 91: 9-12
- Solomons N. W. 1982. Biological availability of zinc in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 35: 1048-1075
- Srinivas S., Prakash V. 2011. Interaction of Zn(II) with bovine milk α -casein: structure and function study. *Journal of Food Biochemistry*, 35: 1311-1326
- Suturović Z., Kravić S., Milanović S., Đurović A., Brezo T. 2014. Determination of heavy metals in milk and fermented milk products by potentiometric stripping analysis with constant inverse current in the analytical step. *Food Chemistry*, 155: 120-125

Blatnik Konc M. Ugotavljanje kemijske zvrsti cinka v različnih vzorcih mleka.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2016

Tapiero H., Dew K. D. 2003. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 57: 339-411

Tripathi R. M., Raghunath R., Sastry V. N., Krishnamoorthy T. M. 1999. Daily Intake of Heavy Metals by Infants through Milk and Milk Products. *The Science of The Total Environment*, 227, 2: 229-235

ZAHVALA

Zahvaljujem se celotnemu oddelku za Analizno kemijo okolja, Odseka za znanosti o okolju na Institutu »Jožef Stefan«, kjer sem opravljala eksperimentalni del diplomske naloge. Predvsem bi se zahvalila Dejanu Ajlecu univ. dipl. kem., za praktično usposabljanje v laboratoriju in za odgovore na vsa moja nešteta vprašanja tekom uvajanja.

Iskrena hvala so-mentorju prof. dr. Janezu Ščančarju za vso pomoč pri eksperimentalnem delu, tolmačenju rezultatov in pisanju diplomske naloge. Hvala za vse vaše nasvete, razlage, čas, ki ste mi jih dobrodušno namenili tekom celotnega opravljanja diplomskega dela in pisanja diplomske naloge.

Hvala dr. Dušanu Žigonu za masnospektrometrične analize.

Za nasvete in strokovno pomoč se iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. Kristini Sepčič. Hvala tudi za vaše vzpodbudne besede in bodrilne nasmeh.

Zahvaljujem se recenzentki, doc. dr. Damjani Drobne za kritičen pregled diplome, koristne nasvete in popravke. Najlepša hvala predsedniku komisije, prof. dr. Petru Mačku za pregled, koristne popravke diplome in dostopnost.

Iskrena hvala tudi prof. dr. Radmili Milačič, za vaš čas, nasvete in dobronamerne opomine, ki so mi dali energijo, tudi takrat, ko sem že skoraj obupala nad končanjem študija.

Hvala prijateljicam, ki ste mi stale ob strani, me učile kritičnega razmišljanja in ob najbolj nemogočih urah odgovarjale na moja vprašanja. Hvala Poloni za pomoč pri prevajanju v angleščino. Hvala Jasni, Alenki, Idi, Tei, Lei, Lari,... za čudovita doživetja v naravi, hvala, ker mi stojite ob strani tudi ko je najtežje.

Hvala staršem, ker ste mi omogočili študij. Hvala za vso vašo potrpežljivost, podporo in razumevanje. Vem, ni vam bilo lahko.

Hvala Mihi. Brez tebe mi ne bi uspelo. In hvala Boru – ker me vsak dan učiš modrosti življenja.