UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

WYDZIAŁ: NAUKI O ŻYWNOŚCI

Dziedzina: nauki rolnicze

Dyscyplina: technologia żywności i żywienia

mgr inż. Aleksandra Purkiewicz

Rozprawa doktorska

Kształtowanie się zawartości wybranych związków biologicznie czynnych w żywności dla niemowląt

Content development of selected bioactive compounds in food for infants

Praca wykonana w Katedrze Towaroznawstwa i Badań Żywności

Promotor: dr hab. inż. Renata Pietrzak-Fiećko, prof. UWM

Olsztyn, 2025

Załącznik nr 3 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 03.03.2025 r.
(miejscowość, data)

mgr inż. Aleksandra Purkiewicz
(imię i nazwisko kandydata)

Technologia Żywności i Żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
o samodzielnym napisaniu rozprawy doktorskiej

Świadoma(-y) odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska pod tytułem **Kształtowanie się zawartości wybranych związków biologicznie czynnych w żywności dla niemowląt** została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie jest i nie była wcześniej podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Ponadto oświadczam, że treść rozprawy doktorskiej przedstawionej przez mnie do obrony, zawarta na przekazywanym nośniku elektronicznym, jest identyczna z jej wersją drukowaną.

W związku z powyższym oświadczam, że wyrażam zgodę na poddanie rozprawy doktorskiej procedurze antyplagiatowej.

Aleksandra Purkiewicz
(podpis kandydata)

Załącznik nr 2 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 03.03.2025 r.
(miejscowość, data)

Dr hab. inż. Renata Pietrzak-Fiećko, prof. UWM
(stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko
promotora/~~promotora pomocniczego~~*)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
promotora/~~promotora pomocniczego~~* rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Purkiewicz pod tytułem **Kształtowanie się zawartości wybranych związków biologicznie czynnych w żywności dla niemowląt** została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Renata Pietrzak-Fiećko
.....
(podpis promotora)

* *niepotrzebne skreślić*

Podziękowania

Pragnę wyrazić moją ogromną wdzięczność i szacunek dla ***Pani Promotor - dr hab. inż. Renaty Pietrzak-Fiećko, prof. UWM*** *za nieocenioną pomoc, wyrozumiałość i wsparcie, jakie otrzymałam podczas realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej. Dzięki ogromnemu doświadczeniu oraz wiedzy naukowej* ***Pani Profesor****, mogłam podjąć wiele wyzwań badawczych oraz ukształtować swój warsztat naukowy. Jestem wdzięczna za nieustanne motywowanie do pogłębiania wiedzy i mobilizację do ciągłego rozwoju.*

Serdecznie dziękuję mojej Rodzinie i Przyjaciołom za niezastąpione wsparcie, cierpliwość, wiarę i inspirację.

Informacja o finansowaniu badań

Finansowanie badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zostało pokryte w ramach środków finansowych przeznaczonych na działalność związaną z prowadzeniem badań naukowych lub prac rozwojowych i zadań z nimi związanych (dotacja MNiSW na badania statutowe; nr tematu: 17.610.008-110).

Finansowanie publikacji artykułów naukowych w formule otwartego dostępu zostało dofinansowane w ramach programu Ministra Edukacji i Nauki pod nazwą „Regionalna Inicjatywa Doskonałości" w latach 2019 - 2023, nr projektu 010/RID/2018/19, kwota finansowania 12.000.000 złotych (P1 i P2) oraz ze środków Ministra Nauki w ramach Programu „Regionalna Inicjatywa Doskonałości" (P3 i P4).

Wykaz artykułów naukowych stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej

Podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej stanowi cykl czterech artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach z listy czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych MEiN[1]:

P1. Purkiewicz, A., Pietrzak-Fiećko, R., Sörgel, F., Kinzig, M. (2022). Caffeine, Paraxanthine, Theophylline, and Theobromine Content in Human Milk. *Nutrients*, *14*(11), 2196; https://doi.org/10.3390/nu14112196.

IF[2]: 5.9; Punktacja MEiN$_{2022}$[3]: 140

Liczba cytowań (bez autocytowań): WoS[4] - 7; GS[5] – 14; RG[6] - 16

P2. Purkiewicz, A., Czaplicki, S., Pietrzak-Fiećko, R. (2022). The Occurrence of Squalene in Human Milk and Infant Formula. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(19), 12928. http://doi.org/10.3390/ijerph191912928.

IF[2]: 4.614; Punktacja MEiN$_{2022}$[3]: 140

Liczba cytowań (bez autocytowań): WoS[4] - 3; GS[5] – 6 ; RG[6] - 7

P3. Purkiewicz, A., Pietrzak-Fiećko, R. (2024). Changes in the Fatty Acid Profile of Lactating Women Living in Poland—A Comparison with the Fatty Acid Profile of Selected Infant Formulas. *Nutrients*, *16*(15), 2411; https://doi.org/10.3390/nu16152411.

[1] Ministerstwo Edukacji i Nauki

[2] Impact Factor według listy Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania

[3] Liczba punktów zgodnie z Komunikatami Ministra Edukacji i Nauki w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych zgodna z rokiem opublikowania

[4] Web of Science

[5] Google Scholar

[6] Research Gate

IF[2]: 4.8; Punktacja MEiN$_{2024}$[3]: 140

Liczba cytowań (bez autocytowań): WoS[4] - 0; GS[5] – 0; RG[6] - 0

P4. Purkiewicz, A., Mumtaz, W., Tońska, E., Pietrzak-Fiećko, R. (2024). Mineral Content in Initial and Follow-On Infant Formulas in Poland: Nutrient Adequacy and Comparison with Breast Milk. *Applied Sciences*, *14*(22), 10235; https://doi.org/10.3390/app142210235.

IF[2]: 2.5; Punktacja MEiN$_{2024}$[3]: 100

Liczba cytowań (bez autocytowań): WoS[4] - 0; GS[5] – 0; RG[6] – 0

Dodatkowe badania uzupełniające przygotowane do publikacji (DBU)

Analiza porównawcza profilu kwasów tłuszczowych i wskaźników jakości lipidów w specjalistycznych i konwencjonalnych preparatach dla niemowląt

Suma punktów MEiN: 520

Sumaryczny IF: 17.81

Spis treści

Wykaz skrótów 11
Streszczenie 13
Abstract 14
1. Wstęp 15
1.1. Złoty standard w żywieniu niemowląt 15
1.2. Skład mleka kobiecego 16
1.3. Czynniki wpływające na skład mleka kobiecego 17
1.4. Przeciwskazania do karmienia piersią 19
1.5. Preparaty zastępujące mleko kobiece 19
1.6. Biologicznie aktywne składniki mleka kobiecego będące przedmiotem rozprawy doktorskiej 20
1.6.1. Kwasy tłuszczowe 21
1.6.2. Skwalen 22
1.6.3. Składniki mineralne 23
1.6.4. Metyloksantyny 24
1.7. Charakterystyka problemu badawczego i uzasadnienie nowatorskiego charakteru badań 25
2. Cel badań 27
3. Hipotezy badawcze 28
4. Materiał badawczy 29
4.1. Mleko kobiece (HM) 29
4.2. Preparaty przeznaczone do żywienia niemowląt (IFs) 30
4.2.1. Selekcja próby 30
5. Metody badawcze 35
5.1. Doświadczenia analityczne 35
5.1.1. Ekstrakcja kofeiny (P1) 35
5.1.2. Oznaczenie zawartości metyloksantyn (P1) 35
5.1.3. Ekstrakcja tłuszczu (P2, P3, DBU) 36
5.1.4. Oznaczenie zawartości skwalenu (P2) 36
5.1.5. Oznaczenie profilu kwasów tłuszczowych (P3, DBU) 37
5.1.6. Oznaczenie zawartości składników mineralnych (P4) 37
5.2. Metody opisowe i obliczeniowe 38
5.2.1. Metoda 3-dniowego bieżącego notowania – zebranie danych dotyczących spożycia kofeiny (P1) 38
5.2.2. Określenie wskaźnika BMI (P2) 39
5.2.3. Pokrycie zapotrzebowania na składniki mineralne (P4) 39

5.2.4. Wskaźniki jakości lipidów (DBU) 40
5.3. Analiza statystyczna 41
6. Wyniki uzyskanych badań 42
6.1. Analiza metyloksantyn w mleku kobiecym (P1) 42
6.1.1. Spożycie kofeiny 42
6.1.2. Zawartość kofeiny i jej metabolitów w mleku kobiecym 45
6.1.3. Spożycie kofeiny a jej zawartość w mleku kobiecym 45
6.2. Analiza zawartości skwalenu w mleku kobiecym (HM) i preparatach do żywienia niemowląt (IFs) (P2) 46
6.2.1. Zawartość skwalenu w HM względem wybranych czynników 47
6.2.2. Zawartość skwalenu w IFs 47
6.3. Ocena profilu kwasów tłuszczowych mleka matki względem okresu laktacji i porównanie z profilem kwasów tłuszczowych preparatów do żywienia niemowląt (P3) 48
6.3.1. Profil kwasów tłuszczowych HM w odniesieniu do okresu laktacji 48
6.3.2. Porównanie profilu kwasów tłuszczowych w HM i IFs 48
6.3.3. Grupy kwasów tłuszczowych i relacje pomiędzy nimi w HM i IFs 49
6.3.4. Ocena relacji pomiędzy uzyskanymi wynikami – analizy wielowymiarowe 49
6.4. Dodatkowe badania uzupełniające przygotowane do publikacji (DBU) 50
6.4.1. Kwasy tłuszczowe w konwencjonalnych i specjalistycznych IFs 50
6.4.2. Ocena zgodności zawartości PUFA w IFs 51
6.4.3. Wskaźniki jakości lipidów badanych IFs 54
6.5. Zawartość składników mineralnych w preparatach do żywienia niemowląt i w mleku kobiecym (P4) 55
6.5.1. Zawartość składników mineralnych w IFs względem przeznaczenia żywieniowego. 55
6.5.2. Składniki mineralne w HM a okres laktacji. Porównanie składników mineralnych w HM i IFs. 56
6.5.3. Ocena zgodności zawartości składników mineralnych w IFs 56
6.5.4. Pokrycie zapotrzebowania na składniki mineralne po spożyciu IFs i HM 57
6.5.5. Ocena relacji pomiędzy uzyskanymi wynikami – analizy wielowymiarowe 58
7. Dyskusja wyników 59
7.1. Metyloksantyny w mleku kobiecym 59
7.2. Skwalen w mleku kobiecym 63
7.3. Kwasy tłuszczowe w żywności dla niemowląt 66
7.4. Dodatkowe badania uzupełniające przygotowane do publikacji (DBU) 69
7.4.1. Profil kwasów tłuszczowych w preparatach konwencjonalnych i specjalistycznych 69
7.4.2. Wskaźniki jakości lipidów 70
7.5. Składniki mineralne w żywności dla niemowląt 72
8. Podsumowanie i wnioski 77

9. Bibliografia 79
10. Spis tabel i rysunków 92
11. Pozostała działalność naukowa 93
12. Załączniki 106

Wykaz skrótów

AA/ C20:4 *n*6 – kwas arachidonowy

AI - wskaźnik aterogenności

ALA/C18:3 *n*3 – kwas α -linolenowy

BCFA – rozgałęzione kwasy tłuszczowe

BMI – wskaźnik masy ciała

C10:0 - kwas kaprynowy

C12:0 - kwas laurynowy

C14:0 - kwas mirystynowy

C18:1 *n*6 t - kwas petroselaidynowy

C18:1 *n*9 t - kwas elaidynowy

C8:0 - kwasu kaprylowy

Ca - wapń

CLA – sprzężony kwas linolowy

Cu – miedź

DFA - wskaźnik pożądanych kwasów tłuszczowych

DHA/C22:6 *n*3 – kwas dokozaheksaenowy

EFSA - Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności

EPA/C20:5 *n*3 – kwas eikozapentaenowy

Fe - żelazo

H/H - stosunek kwasów hipocholesterolemicznych do hipercholesterolemicznych

HM – mleko ludzkie/mleko matki/mleko kobiece

IFs - preparaty zastępujące HM/preparaty mlekozastępcze/preparaty dla niemowląt

K - potas

LA/C18:2 *n*6 – kwas linolowy

MCFA – średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe

Mg - magnez

Mn - mangan

MUFA – jednonienasycone kwasy tłuszczowe

Na - sód

OFA - wskaźnik kwasów tłuszczowych hipercholesterolemicznych

P - fosfor

PTGHiŻDz - Polskie Towarzystwo Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci

PUFA – wielonienasycone kwasy tłuszczowe

RA – kwas rumenowy

SFA – nasycone kwasy tłuszczowe

TFA – kwasy tłuszczowe trans

TI - wskaźnik trombogenności

VA – kwas wakcenowy

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia

Zn – cynk

Streszczenie

W mleku kobiecym (HM) zawartość związków biologicznie czynnych modulowana jest m.in. przez czynniki fizjologiczne, środowiskowe i żywieniowe, a w preparatach dla niemowląt (IFs) ich stężenie jest regulowane przez określone normy i zależy od rodzaju preparatu.

W przedstawionej pracy celem była ocena czynników determinujących zawartość wybranych związków biologicznie czynnych w HM i porównanie ich do składu IFs. Wykazano, że czynniki socjodemograficzne, w tym wiek i miejsce zamieszkania matek, determinowały wybory dotyczące spożycia kofeiny przez karmiące. Zawartość skwalenu, MCFA, DHA i AA oraz wybranych składników mineralnych w HM była zależna od okresu laktacji, natomiast dodatkowo, zawartość skwalenu zależała od BMI i wieku kobiet. Wykazano, że IFs posiadały odmienny profil kwasów tłuszczowych i składników mineralnych w porównaniu do HM. Odnotowano różnice pomiędzy składem IFs w zależności od rodzaju i przeznaczenia żywieniowego preparatu.

Skład HM ulega fizjologicznym zmianom, zależnym od okresu laktacji i indywidualnych potrzeb niemowlęcia. Należy podkreślić, że także czynniki modyfikowalne, w tym dieta, styl życia oraz niektóre wskaźniki antropometryczne mogą wpływać na zmiany składu HM. Analiza składu HM stanowi cenny zasób wiedzy w procesie opracowywania i optymalizacji receptur IFs, zapewniając możliwie najwierniejsze odtworzenie właściwości pokarmu matki.

Słowa kluczowe: mleko kobiece, preparaty dla niemowląt, związki biologicznie aktywne, okres laktacji, żywienie niemowląt

Abstract

In human milk (HM), the content of bioactive compounds is modulated by physiological, environmental and nutritional factors, and in infant formulas (IFs) it is regulated by specific standards and depends on the type of formula.

In the presented work, the aim was to evaluate the factors determining the content of selected bioactive compounds in HM and compare to the composition of IFs. It was shown that sociodemographic factors, including age and place of residence of mothers, determined the caffeine intake choices of nursing mothers. The content of squalene, MCFA, DHA and AA, as well as selected minerals in HMs was dependent on lactation period, while additionally, squalene content depended on BMI and age of women. It was shown that IFs had a different fatty acid and mineral profile compared to HMs. Differences were noted between the composition of IFs depending on the type and nutritional purpose of the formula.

The composition of HMs undergoes physiological changes, depending on the lactation period and the individual needs of the infant. It should be noted that also modifiable factors, including diet, lifestyle and some anthropometric indices can affect changes in HM composition. Analysis of HM composition is a valuable knowledge resource in the process of developing and optimizing IFs formulas, ensuring the most accurate reproduction of the properties of breast milk.

Keywords: human milk, infant formula, biologically active compounds, lactation period, infant nutrition

1. Wstęp

1.1. Złoty standard w żywieniu niemowląt

Mleko ludzkie (mleko matki, mleko kobiece, HM) stanowi dla urodzonego dziecka źródło pożywienia umożliwiające przetrwanie na wczesnym etapie życia. Stanowi ono wyjątkowo precyzyjnie skomponowany roztwór koloidalny białek, węglowodanów, lipidów, witamin, składników mineralnych oraz związków biologicznie czynnych (biologicznie aktywnych) (Kamińska-El-Hassan i in., 2017). O pokarmie kobiecym mówi się jako o substancji biologicznie czynnej, zawierającej szereg składników niezbędnych do prawidłowego rozwoju dziecka (Szajewska i in., 2021). Skład HM dynamicznie zmienia się w zależności od wielu czynników: stanu zdrowia kobiety, rasy, środowiska geograficznego, diety karmiących, okresu laktacji i innych. Organizm kobiety zaczyna przygotowywać się do produkcji pokarmu od drugiego trymestru ciąży w wyniku zwiększonej aktywności hormonów (prolaktyny i oksytocyny) (Hannan i in., 2023).

Powszechnie o HM mówi się jako o "złotym standardzie" w żywieniu niemowląt. Skład HM dostosowuje się indywidualnie do sytuacji i potrzeb dziecka oraz matki, zapewniając mu dostarczenie wszystkich składników pokarmowych w odpowiednich ilościach. Zarówno Światowa Organizacja Zdrowia (WHO), jak i Fundusz Narodów Zjednoczonych na rzecz Dzieci (UNICEF) zalecają rozpoczęcie karmienia piersią w ciągu pierwszych dwóch godzin po porodzie i kontynuowanie wyłącznego karmienia piersią do szóstego miesiąca życia niemowlęcia (Chong i in., 2022, Kim i Yi, 2020). Oznacza to, że w ciągu pierwszego pół roku życia dziecka, podawane jest mu wyłącznie mleko mamy, bez włączania innych płynów – wody czy soków. Polskie Towarzystwo Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci (PTGHiŻDz) podkreśla, że częściowe lub krótsze karmienie naturalne jest również korzystne dla rozwoju dziecka (Szajewska i in., 2021). Po ukończeniu przez niemowlę sześciu miesięcy sugeruje się kontynuowanie karmienia piersią wraz ze wzbogacaniem diety dziecka w pokarmy uzupełniające (Chong i in., 2022). Rekomendowane jest, aby kontynuować karmienie tak długo jak będzie to pożądane przez dziecko i matkę (Szajewska i in., 2021).

Głównym celem karmienia jest zaspokojenie potrzeb żywieniowych niemowlęcia na każdy ze składników odżywczych, celem zapewnienia mu właściwego rozwoju. Liczba karmień dziecka pokarmem matki zależy od wieku dziecka i wraz z nim zmniejsza się. W ciągu pierwszych sześciu miesięcy życia dziecko żąda pokarmu ok. 8-12 razy na dobę, a w ciągu

sześciu kolejnych miesięcy 6-8 razy na dobę. Ilość karmień stabilizuje się do około 3-6 razy na dobę w ciągu drugiego roku życia dziecka (Szajewska i in., 2021).

1.2. Skład mleka kobiecego

HM w swoim składzie zawiera składniki zarówno odżywcze, jak i nieodżywcze, wspomagające prawidłowy wzrost i rozwój immunologiczny młodego organizmu (Chong i in., 2022). Niemowlęctwo stanowi wyjątkowo wrażliwy okres, podczas którego dochodzi do intensywnego wzrostu i rozwoju organizmy dziecka, dlatego bardzo ważne jest aby w tym czasie dostarczać dziecku wszystkich niezbędnych składników pokarmowych (Martín-Rodríguez i in., 2022). Skład HM nie jest stały i zmienia się w zależności od wybranych czynników, jednak w przybliżeniu można przyjąć że składa się w 88-89% z wody, 1 % białka, 4% lipidów i 7% węglowodanów. Dominującym węglowodanem w HM jest disacharyd – laktoza, a w mniejszej ilości znajdują się także glukoza, galaktoza, laktuloza, oligosacharydy i niektóre polisacharydy. Około 30% białka HM stanowi kazeina, a 70% białka serwatkowe (głównie laktoferyna, α-laktoalbumina i immunoglobuliny). Tłuszcz stanowi około połowę całkowitej energii dostarczanej z HM a tym samym stanowi główne źródło energii dla niemowląt (Chong i in., 2022, Szyller i in., 2024). W przypadku witamin, HM zawiera ich odpowiednią ilość do wspierania prawidłowego wzrostu i rozwoju niemowlęcia, z wyjątkiem witamin K i D (Bakshi i in., 2023). W odróżnienia od mleka krowiego, HM zawiera mniejszą ilość białka i składników mineralnych oraz wyższą zawartość laktozy. W składzie białkowym HM odnotowuje się przede wszystkim niższy udział kazeiny (około osiem razy niższy). Podczas produkcji preparatów dla niemowląt stosunek białek serwatkowych do kazeiny (20:80) w mleku krowim należy zmodyfikować w taki sposób, aby naśladował stosunek tych białek w dojrzałym HM (60:40) (Masum i in. 2021).

Nazwa wydzielanego mleka jest zależna od fazy laktacji. Wyróżnia się trzy okresy laktacji: I – mleko początkowe (colostrum, siara) – wydzielane w pierwszych siedmiu dniach życia dziecka); II – mleko przejściowe (transitional milk) - wydzielane w drugim tygodniu po porodzie); III – mleko dojrzałe (mature milk) – wydzielane w kolejnych tygodniach po porodzie (>15 dnia). Niektórzy autorzy wyróżniają także mleko w okresie długotrwałej laktacji, zwane mlekiem późnym (late milk), które produkowane jest po 90 dniu po porodzie (Soyyılmaz i in., 2021). Skład mleka waha się w zależności od fazy laktacji, w szczególności jeśli chodzi o zawartość tłuszczu i białka. Siara zawiera większe zawartości białka i mniejsze tłuszczu, stąd

jej wartość energetyczna (56 kcal/100 ml) jest niższa w odróżnieniu od mleka dojrzałego (70 kcal/100 ml) (Zhang i in. 2022).

1.3.Czynniki wpływające na skład mleka kobiecego

Skład HM jest dynamiczny i zmienia się w zależności od wielu czynników. Aby w pełni scharakteryzować HM konieczne jest zrozumienie jakie czynniki modulują jego skład. Podaje się, że skład HM jest determinowany okresem laktacji, wskaźnikiem masy ciała (BMI), pochodzeniem etnicznym, miejscem zamieszkania, rasą, stylem życia oraz dietą (Ryoo i Mi Kang, 2022).

Okres laktacji ma istotny wpływ na poziom wybranych związków HM. Dynamika składu HM w zależności od stadium laktacji jest determinowana zmieniającymi się potrzebami żywieniowymi dziecka. Siara, w odróżnieniu od mleka przejściowego i dojrzałego ma inną konsystencję i barwę – jest gęstsza oraz zabarwiona na żółto. Colostrum jest bardziej skoncentrowane pod względem białka – zawiera więcej immunoglobulin niż mleko przejściowe i dojrzałe. Ponadto, colostrum jest bogatsze w laktoferynę, która jest białkiem o właściwościach przeciwbakteryjnych (Ostertag i Hinrichs, 2023). Bezpośrednio po urodzeniu, noworodek jest szczególnie narażony na mikroflorę patogenną, ze względu na nie w pełni niedojrzały system odpornościowy. Z tego względu, siara zawiera więcej składników o działaniu immunologicznym i przeciwzapalnym niż mleko przejściowe i dojrzałe, co umożliwia zapewnienie biernej immunizacji w pierwszych chwilach życia dziecka (Szyller i in., 2024). Wraz z postępem laktacji w HM rośnie stężenie laktozy, lipidów oraz wzrasta wartość energetyczna. Podstawową funkcją siary jest funkcja immunologiczna, a mleka dojrzałego - odżywcza (Szyller i in., 2024).

Wskazuje się, że na poziom niektórych składników wpływa dieta kobiet karmiących. Taką zależność podaje się przede wszystkim dla profilu kwasów tłuszczowych HM (Bzikowska-Jura i in., 2018) oraz niektórych witamin rozpuszczalnych w wodzie i tłuszczach (Petersohn i in., 2024). W ciągu ostatnich dziesięciu lat zaobserwowano korelacje pomiędzy rodzajem stosowanej diety a zawartością kwasów tłuszczowych nasyconych (SFA) (Kim i in., 2017, Liu i in., 2019, Armand i in., 2018), kwasów tłuszczowych jednonienasyconych (MUFA) (Aumeistere i in., 2019) i kwasów tłuszczowych wielonienasyconych (PUFA) (Kim i in., 2017, Armand i in., 2018). W literaturze przedmiotu najdokładniej zbadany jest wpływ rodzaju diety na poziom PUFA. Wielu badawczy potwierdza, że dieta bogata w źródła kwasów omega-3 (m.in. tłuste ryby morskie, orzechy, olej lniany) oraz omega-6 (olej słonecznikowy, olej

kukurydziany) wpływa na wyższe stężenia tych kwasów w mleku, zwłaszcza kwasu dokozaheksaenowego (DHA) i eikozapentaenowego (EPA) z rodziny PUFA *n*3 (Zielinska-Pukos i in., 2022). Wskazuje się także na zależności pomiędzy zawartością w HM kwasów tłuszczowych trans (TFA) a ich udziałem w diecie karmiących (Aumeistere i in., 2021). Czynniki socjodemograficzne, takie jak poziom wykształcenia, rodzaj wykonywanej pracy, miejsce zamieszkania czy wiek mają także pośredni wpływ na skład mleka kobiecego, ponieważ determinują one wybory żywieniowe kobiet (Samuel i in., 2020; Favara i in., 2025). Ponadto, na skład HM w różnorodny sposób może wpływać miejsce zamieszkania, ze względu na czynniki związane z dietą, środowiskiem czy stylem życia społeczeństwa. W regionach, w których łatwiej o dostępność ryb i owoców morza – Hiszpanii, Włoszech czy Turcji dieta kobiet jest bogatsza w PUFA, co przekłada się na jakość tłuszczu HM (Khor i in., 2021).

Stężenie niektórych składników w HM może zależeć od składu ciała (Bravi i in., 2016, Dror i in., 2018). Badania w tym kierunku w dalszym ciągu są ograniczone. W przeglądzie systematycznym Daniel i in. (2021) podają, że wskaźnik masy ciała (body mass index, BMI) kobiet karmiących nie ma wpływu na wartość energetyczną oraz zawartość białka w HM. Z drugiej strony, autorzy wskazali na pozytywny związek między BMI matek a zawartością tłuszczu w HM. Podaje się, że każde zwiększanie BMI o 1 kg/m^2 jest związany z 0.56 g/l wyższym stężeniem tłuszczu w HM. Przy różnicy BMI wynoszącej 5 kg/m^2 przełoży się to na 7.2% wyższy poziom tłuszczu w HM (Daniel i in., 2021). Lenghi i in. (2020) w przeglądzie systematycznym analizowali związek pomiędzy BMI a zawartością składników pokarmowych w HM i wykazali wyższą zawartość tłuszczu w mleku kobiet z nadwagą i otyłością niż w mleku kobiet o prawidłowej masie ciała. Pomimo że nie wskazuje się korelacji pomiędzy BMI kobiet karmiących a wartością energetyczną HM, to na podstawie pozytywnego związku pomiędzy BMI matek a zawartością tłuszczu w HM można byłoby postawić hipotezę, że mleko kobiet z nadwagą i otyłością będzie bardziej gęste energetycznie niż mleko kobiet z prawidłową masą ciała (Daniel i in., 2021). Jednak, potrzebne są dodatkowe badania skupiające się na wyjaśnieniu relacji pomiędzy BMI kobiet karmiących a wartością energetyczną HM.

Nasilone zmiany w składzie HM mogą wystąpić bezpośrednio po porodzie. Kobiety w tym czasie przystosowują się do nowej sytuacji i roli matki, jednocześnie często są narażone na stres, złą jakość snu, a w skrajnych przypadkach na depresję poporodową. Takie sytuacje wśród karmiących mogą negatywnie wpływać na stan odżywienia organizmu, a w konsekwencji na nieprawidłowy metabolizm składników odżywczych. Czynniki psychospołeczne matki oraz styl życia w okresie poporodowym mogą bezpośrednio lub pośrednio wpływać na kompozycję HM (Ja Ryoo i Mi Kang 2022).

1.4. Przeciwskazania do karmienia piersią

Według danych statystycznych, w Europie odsetek 25% kobiet karmi swoje dzieci wyłącznie piersią do ukończenia przez nie sześciu miesięcy. Podobną sytuację odnotowuje się w Stanach Zjednoczonych, gdzie, pomimo tego że przeszło 80% kobiet rozpoczyna karmienie piersią po porodzie, to jedynie około 25% z kontynuuje wyłącznie karmienie naturalne przez pierwsze pół roku życia dziecka (Szyller i in., 2024). HM stanowi pierwszy pokarm w życiu dziecka, który jest zoptymalizowany pod względem składu i bezpieczny do spożycia. Ponadto, karmienie naturalne przynosi wiele korzyści zarówno dla dziecka jak i dla matki, m.in. zmniejsza poziom stresu oraz sprzyja budowaniu więzi. Karmienie naturalne jest również korzystne z punktu widzenia środowiskowego i ekonomicznego (Rollins i in., 2016). Niektóre przyczyny medyczne lub fizjologicznie, m.in. zakażenie wirusem HIV, czynna, nieleczona gruźlica (w okresie prątkowania), przyjmowanie niektórych leków, ciężki stan kliniczny lub ciężka postać choroby psychicznej, uniemożliwiają dla matki karmienie naturalne. W przypadku występowania klasycznej galaktozemii lub wrodzonego niedoboru laktazy u dziecka, również stanowi to przeciwskazanie do karmienia naturalnego (Szajewska i in., 2016).

Na zaprzestanie karmienia naturalne wpływ mają także czynniki niewynikające ze stanu zdrowia kobiet, m.in. chęć szybszego powrotu do pracy i niemożność odciągania odpowiedniej ilości pokarmu dla dziecka wynikająca z intensywnego trybu życia; niechęć w karmieniu w miejscach publicznych; brak wsparcia ze strony personelu medycznego, doradców laktacyjnych oraz rodziny, szczególnie w przypadku kobiet niedoświadczonych w tematyce laktacji (Kebede i in., 2020). Wzmożona reklama i strategiczny marketing preparatów do żywienia niemowląt mogą przyczyniać się do zmniejszania inicjacji karmienia piersią oraz skracać czas jest trwania (Bakshi i in., 2023).

1.5. Preparaty zastępujące mleko kobiece

W sytuacji kiedy matka nie karmi swojego dziecka piersią, uzasadnione jest stosowanie preparatów zastępujących HM (preparatów mlekozastępczych/preparatów dla niemowląt, IFs), które służą jako odpowiednia alternatywa żywieniowa dla HM. Mimo że nie jest możliwe wyprodukowanie IF identycznego składem z HM, producenci poczynają znaczne postępy w ich produkcji i upodobnienia do pokarmu ludzkiego (Luo i in., 2023), m.in. poprzez wzbogacanie

(w oligosacharydy HM, probiotyki, PUFA) oraz modyfikacje niektórych składników (strukturyzacja lipidów, enzymatyczna interestryfikacja lipidów) (Goehring i in. 2016; Holst i in. 2023; Lagkouvardos i in. 2023; Nieto-Ruiz i in., 2020; Yuan i in. 2020). Komercyjne IFs, przeznaczone dla IFs, od 0 do 36 miesięcy definiują częściowy, a coraz częściej całkowity zamiennik HM na świecie (Bakshi i in., 2023). Wyróżniamy dwa podstawowe rodzaje: preparaty do początkowego żywienia niemowląt (oznaczone zwykle cyfrą "1" obok nazwy handlowej), które w pełni pokrywają potrzeby dziecka na wszystkie niezbędne składniki odżywcze do szóstego miesiąca życia; oraz preparaty do dalszego żywienia niemowląt (oznaczone zwykle cyfrą "2" obok nazwy handlowej) – dedykowane niemowlętom po szóstym miesiącu życia, wprowadzane do diety dziecka wraz z odpowiednimi pokarmami uzupełniającymi celem zaspokojenia wszystkich potrzeb żywieniowych (Szajewska 2016; M&C Saatchi World Services, 2022). Podstawowym materiałem bazowym do produkcji IFs jest mleko krowie, ze względu na jego niską cenę oraz łatwą dostępność (Bakshi i in., 2023). Mniej powszechne mleka przeznaczone do produkcji IFs stanowią mleko kozie, owcze oraz klaczy (Martyniak i in., 2022). Zazwyczaj, IFs dostępne są w trzech formach – sproszkowanej, płynnej i gotowej do spożycia, przy czym pierwsza z nich stanowi najtańszą i najczęściej wybieraną. Rynek IFs stale się poszerza a w 2021 roku odnotowano przychód około 38.17 miliarda dolarów (Bakshi i in., 2023).

Na rynku wyróżniamy konwencjonalne IFs, które stanowią produkt spożywczy przeznaczony wyłącznie dla niemowląt zdrowych, bez żadnych nietypowych problemów dietetycznych lub medycznych (Martyniak i in. 2022). Dostępne są także specjalistyczne IFs, definiowane jako żywność służąca do zaspokojenia szczególnych potrzeb żywieniowych niemowląt z różnymi problemami zdrowotnymi (Dispasquale i in. 2019) – mieszanki bezlaktozowe, hipoalergiczne oraz przeznaczone dla żywienia dzieci urodzonych przedwcześnie (Borschel i in. 2018).

1.6. Biologicznie aktywne składniki mleka kobiecego będące przedmiotem rozprawy doktorskiej

HM stanowi optymalne źródło pożywienia dla niemowląt, ponieważ dostarcza, oprócz podstawowych niezbędnych składników odżywczych, także czynniki bioaktywne, chroniące niemowlęta przed zakażeniami bakteryjnymi oraz stymulującymi ich układ odpornościowy (Meng i in., 2021). Zawartość związków biologicznie czynnych w HM zależy od szeregu

czynników, które mogą mieć charakter biologiczny, środowiskowy, dietetyczny oraz związany z trybem życia matki. Oprócz porównania składników bioaktywnych w IFs do HM, istotna jest także analiza czynników wpływających na ich zawartość, takich jak skład IF, jego rodzaj oraz przeznaczenie żywieniowe (Golan i Assaraf, 2020).

1.6.1. Kwasy tłuszczowe

Lipidy stanowią około 7% frakcji HM. Jego zawartość zmienia się wraz z okresem laktacji i jest największa w mleku dojrzałym. W porównaniu do innych składników pokarmowych, tłuszcz stanowi najbardziej zmienny składnik HM (Xi i in., 2023). W pierwszych miesiącach życia dziecka, tłuszcz pokrywa ponad 50% jego zapotrzebowania na energię (Ma i in., 2023). Lipidy HM stanowią w znacznej części triacyloglicerole (98.1-98.8%), fosfolipidy (0.28-0.80%) oraz sterole (0.25%-0.34%). Dominującymi kwasami tłuszczowymi w mleku matki są SFA i MUFA, a następnie PUFA *n*3 i *n*6 (Simon Sarkadi i in., 2022). Połowa kwasów tłuszczowych w mleku matki składa się z SFA, przy czym dominującym jest kwas palmitynowy (C16:0), stanowiący około 23% wszystkich kwasów tłuszczowych. Najwyższy udział w mleku matki ma kwas oleinowy (C18:1 *n*9), stanowiący około 36% udziału kwasów tłuszczowych (Khor i in., 2021). Tłuszcz jest składnikiem HM, które charakteryzuje się dużą zmiennością. Na jakość tłuszczu HM i skład kwasów tłuszczowych wpływają czynniki zewnętrzne, takie jak okres laktacji, wiek matki, czynniki społeczno-ekonomiczne, masa ciała i wzrost oraz utrwalone nawyki żywieniowe i styl życia kobiety (Miliku i in., 2019). HM ma zmienny skład, zwłaszcza w ciągu pierwszych dwóch miesięcy życia, aby dostosować się indywidualnie do zmieniających się potrzeb niemowlęcia.

W IFs źródłem tłuszczu jest mieszanka komercyjnych olejów roślinnych, których odpowiednio dobrana ilość oraz kompozycja ma jakościowo i ilościowo odpowiadać kompozycji lipidowej HM. Najpopularniejszymi olejami roślinnym, stosowanymi do produkcji IFs są: olej kokosowy, olej palmowy, olej sojowy oraz olej krokoszowy (Luo i in., 2023). Alternatywnie, IFs wzbogaca się olejami z organizmów jednokomórkowych – z alg *Crypthecodinium cohnii* oraz grzybów *Mortierella alpina*, celem wzbogacenia ich w DHA i AA (Finco i in. 2017). Z tego względu, jakość tłuszczu w IFs zależna jest od rodzaju i proporcji użytych olejów (Delplanque i in., 2015). Od 22 lutego 2020 roku, zgodnie z przepisami Unii Europejskiej (UE), obligatoryjne jest wzbogacanie IFs w DHA. Jest to część regulacji, która ma na celu zapewnienie odpowiedniego wsparcia dla rozwoju mózgu, układu nerwowego oraz wzroku u niemowląt (Rozporządzenie Delegowane Komisji (UE) 2016/127). Przepisy UE wymagają, aby każdy IF był wzbogacany w DHA w określonej ilości, która zgodnie

z rozporządzeniem (UE) nr 609/2013 wynosi minimum 0.3% energii. Oznacza to, że w 100 ml gotowego IF, DHA powinien występować w ilości około 20-30 mg. Wzbogacanie IFs w AA nie jest obowiązkowe, jednak wiele prac badawczych wskazuje na liczne role fizjologiczne tego kwasu, jednocześnie popierając ich dodatek do IFs. W tym przypadku, dodatek do IFs DHA oraz AA pozwala na lepsze odwzorowanie składu mleka matki pod względem PUFA (Tounian i in., 2021).

1.6.2. **Skwalen**

Jednym ze składników tłuszczu HM jest skwalen, węglowodór triterpenowy (C_30H_{50}) posiadający w swojej strukturze sześć podwójnych wiązań (Antoniewska i in., 2019). Jest niesteroidowym prekursorem cholesterolu; wchłaniany z jelita i syntetyzowany w tkance tłuszczowej, wątrobie i skórze. Skwalen stanowi 0.12% składu lipidowego HM, co stanowi około 2–6% całkowitego stężenia cholesterolu w mleku matki (Kallio i in., 1989). Najbogatszym źródłem skwalenu są wątroba rekina oraz dorsza (Rosales-Garcia i in., 2017). Należy on do związków powszechnie występujących w żywności pochodzenia roślinnego – głównie amarantusie oraz oliwie z oliwek. Poza olejami rybimi, inne rodzaje żywności pochodzenia zwierzęcego, jaja (żółtko), sery dojrzewające oraz mleko i jogurty, zawierają znacznie mniejsze ilości skwalenu (Czerwonka i in., 2024). Jednak, nawet jego niska zawartość w żywności wydaje się mieć istotne znaczenie ze względu na jego udokumentowane silne działanie antyoksydacyjne (Shimizu i in., 2018). Składnik ten korzystnie wpływa na układ odpornościowy i nabywanie naturalnej odporności człowieka, co umożliwia wsparcie słabo rozwiniętego układu odpornościowego dziecka. Ponadto, przy występowaniu odpowiedniej ilości skwalenu w diecie, może on pomagać w usuwaniu z organizmu substancji ksenobiotycznych, np. ksenobiotyków chlorowanych (Lozano-Grande i in., 2018). Badania prowadzone na pacjentach pediatrycznych wykazały, że skwalen pomaga w stymulacji enzymów detoksykacyjnych wątroby. Ponadto, spożycie skwalenu przez niemowlęta sprzyja u nich lepszemu rozwojowi neuromotorycznemu (Ronco i in., 2013). Skwalen jest syntetyzowany w organizmie człowieka, występuje naturalnie w skórze, tarczycy, węzłach chłonnych i śledzionie. Jego synteza w organizmie zmniejsza się wraz z wiekiem (Kallio i in., 1989). Do tej pory istnieją ograniczone badania dotyczące wpływu wybranych czynników na zawartość skwalenu w HM, które skupiały się wyłącznie na okresie laktacji (Kallio i in., 1989).

W HM zawartość cholesterolu wynosi 0.34-1.3% lipidów, natomiast IFs, wzbogacane w oleje roślinne, zawierają minimalną zawartość cholesterolu (1.11-2.08 mg/porcję)

(Maldonado-Pereira i in., 2023, Kilvington i in., 2021). IFs zawierają śladowe ilości skwalenu (0.036-0.082 mg/porcję) (Kilvington i in., 2021). Pomimo że IFs są projektowane tak, aby dostarczyć odpowiednich niezbędnych składników odżywczych, takich jak białka, tłuszcze i węglowodany, w ilościach zbliżonych do tych w HM (Martin i in., 2016), to pod względem niektórych unikalnych składników, m.in. skwalenu i innych prekursorów cholesterolu, IFs nie są bilansowane.

1.6.3. **Składniki mineralne**

Mikro- i makroelementy są kluczowymi składnikami HM, ponieważ odgrywają znaczącą role w prawidłowym rozwoju mózgu i układu nerwowego, układu kostnego oraz przemianach składników odżywczych (Dror i Allen, 2018). Niedobory składników mineralnych na wczesnym etapie rozwoju mogą negatywnie wpływać na funkcje poznawcze (Lockyer i in., 2021). HM zawiera ponad 20 składników mineralnych, spośród których wyróżnia się makroelementy, w tym: wapń (Ca), potas (K), magnez (Mg), sód (Na), fosfor (P), chlor (Cl), jod (I) i mikroelementy, w tym: żelazo (Fe), miedź (Cu), mangan (Mn), cynk (Zn), selen (Se), chrom (Cr), molibden (Mo). Na ich zawartość wpływ ma okres laktacji i odnotowuje się większe ich zawartości w siarze, które maleją w miarę postępu laktacji (Kim i Yi 2020). Uważa się, że w odróżnieniu od witamin (A, B_6, B_{12}, kwas foliowy), poziom większości składników mineralnych w HM nie zależy od sposobu żywienia matki oraz wdrażanej suplementacji i jest stosunkowo stabilny (Szyller i in., 2024). Istnieją pewne doniesienia wskazujące na związek pomiędzy ilością spożywanej energii a zawartością Zn w HM. Ponadto, dodatnią korelację wskazano pomiędzy spożyciem jaj a zawartością Se w HM (Bravi i in., 2016). Poziom niektórych składników mineralnych – Cu and Zn, jest wyższy w HM matek wcześniaków niż w HM matek dzieci urodzonych o czasie; odwrotną tendencję odnotowuje się dla Ca, którego poziom w HM matek wcześniaków jest niższy i stopniowo wzrasta wraz z laktacją (Yi i in., 2021). Podaje się, że niemowlęta karmione wyłącznie HM mają zapewnioną prawidłową podaż składników mineralnych (Moreno-Rojas i in., 2015). Jednak, ze względu na spadek większości z nich w miarę dojrzewania mleka, w niektórych przypadkach uzasadnione jest wdrożenie dodatkowej suplementacji. Bezpośrednio po porodzie i w pierwszym tygodniu życia dziecka, poziom Fe w HM kształtuje się na poziomie 1 mg/l, podczas pierwszego miesiąca maleje do 0.4-0.9 mg/l a w okresie 3-6 miesięcy po porodzie stabilizuje się do poziomu 0.1-0.3 mg/l (Szyller i in., 2024). Podczas pierwszych chwil życia noworodki wykorzystują rezerwy Fe zmagazynowane w wątrobie pozyskane podczas trzeciego trymestru ciąży (Dror i in., 2018).

W związku z tym, że stężenie Fe w HM nie jest wystarczająco wysokie do zaspokojenia potrzeb niemowląt, istotne jest wdrożenie suplementacji po 6 miesiącu życia. Jest to istotne ze względu na wysokie ryzyko niedoborów Fe w okresie intensywnego wzrostu niemowląt i wynikających z nich skutkach zdrowotnych (Lockyer i in., 2021).

IFs, mimo że projektowane są w sposób jak najbardziej oddający skład dla HM, to wskazuje się na występowanie różnic w zawartości wybranych składników mineralnych pomiędzy nimi a pokarmem naturalnym (Kwiecień i in., 2017). Każdy IFs ma inny profil mineralny w odniesieniu do HM. W mleku krowim, będącym produktem bazowym do produkcji konwencjonalnych IFs, zawartość każdego składnika mineralnego jest większa niż w HM, a ich biodostępność jest znacznie niższa (Lönnerdal i in., 2016). Dodatek wyższych ilości składników mineralnych do IFs ma na celu zmniejszyć ryzyko niedoborów pokarmowych u niemowląt, które mogłyby występować u niemowląt niekarmionych piersią, ze względu na nawet ponad dziesięć razy niższą biodostępność niektórych pierwiastków (w szczególności Fe) (Stoffel i in., 2024). Pomimo że badania w tym zakresie są dostępne i stosunkowo szeroko analizowane przez naukowców, to do tej pory pojawiło się niewiele badań włączających w materiał badawczy IFs specjalistyczne do żywienia niemowląt, w tym hydrolizaty białek mleka oraz preparaty aminokwasowe do żywienia niemowląt. Ze względu na specyfikę tych preparatów i stosowanie ich wyłącznie w uzasadnionych medycznie przypadkach, ich skład różni się w stosunku do IFs konwencjonalnych dla niemowląt (Rozporządzenie Delegowane Komisji (UE) 2016/128).

1.6.4. **Metyloksantyny**

Oprócz składników korzystnych dla niemowląt, do mleka matki mogą przedostawać się związki, które potencjalnie mogą mieć negatywny wpływ na zdrowie i rozwój dziecka. Grupę takich związków stanowią metyloksantyny, do których zalicza się kofeina i jej metabolity – paraksantyna, teofilina, teobromina – które kumulują się w HM, gdy są spożywane z pokarmem przez matkę karmiącą (Pawłowska-Muc i in., 2015). Po spożyciu kofeina jest szybko wchłaniana z przewodu pokarmowego, a po 30–120 min osiąga maksymalny poziom we krwi. Kofeina transportowana jest wraz z krwią do tkanek, następnie przenika przez barierę krew-mózg i przez łożysko przedostaje się do płodu, płynu owodniowego i mleka matki (Pawłowska-Muc i in., 2015). Nadmierne spożycie kawy przez kobiety karmiące piersią powoduje u niemowląt nudności i drażliwość, a także nerwowość, problemy ze snem i drgawki. Badacze podają, że objawy te u niemowląt znacząco zmniejszyły się po zmniejszeniu udziału pokarmów

zawierających kofeinę w codziennej diecie. Okres półtrwania kofeiny u niemowląt, zwłaszcza karmionych piersią, jest znacznie dłuższy niż u osób dorosłych, dlatego stwarza większe ryzyko dla niemowląt (McCreedy i in., 2018). Kobiety, w odróżnieniu od mężczyzn, stanowią znacznie większy odsetek osób spożywających napoje zawierające kofeinę. Zgodnie z zaleceniami Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA), kobiety w ciąży i karmiące powinny ograniczać spożycie kofeiny w ciągu dnia do ilości 250-300 mg (EFSA 2015). Na wybory żywieniowe, w tym na rodzaj i częstotliwość spożycia produktów żywnościowych zawierających metyloksantyny, mają wpływ czynniki socjodemograficzne, m.in. wiek oraz poziom wykształcenia (Malczyk i in., 2021; Reyes i Cornelis, 2018). Pomimo że dostępne są prace dotyczące wpływu spożywanych produktów żywnościowych na poziom kofeiny w HM, to istnieją ograniczone badania skupiające wpływ czynników socjodemograficznych determinujących te wybory żywieniowe.

1.7. Charakterystyka problemu badawczego i uzasadnienie nowatorskiego charakteru badań

Badania nad HM zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej przedstawiają charakterystykę mleka kobiet mieszkających w rejonie Warmii i Mazur. W literaturze naukowej istnieje ograniczona liczba badań dotyczących składu HM mieszkanek tego regionu. HM posiada dynamiczny skład, modulowany przez różne czynniki, w tym uwarunkowania środowiskowe i kulturowe. Badania nad składem HM mieszkanek Warmii i Mazur mogą stanowić podstawę do analizy jego składu pod względem regionalnych różnic w Polsce. Ze względu na ograniczone publikacje naukowe nad zawartością kofeiny i skwalenu w pokarmie ludzkim, badania te mogą stanowić punkt wyjścia do ewolucji badań nad HM w kontekście mniej powszechnych i rzadziej badanych przez naukowców składników bioaktywnych. Z kolei, analiza HM pod względem zawartości kwasów tłuszczowych i składników mineralnych pozwoliła na ocenę porównawczą obu rodzajów żywności dla niemowląt (HM i IFs), identyfikację różnic jakościowych i ilościowych w kontekście ich zawartości oraz wskazanie w jakim stopniu IFs odzwierciedlają fizjologiczny skład mleka matki pod względem tych składników. Tego rodzaju badania są istotne szczególnie ze względu na globalnie rozwijający się rynek preparatów przeznaczonych do żywienia niemowląt. Dynamiczny rozwój tego rodzaju żywności związany jest z usprawnianiem technologii produkcji i składu preparatów, które ma na celu odwzorowanie składu HM. Ocena składu kwasów tłuszczowych i składników

mineralnych w IFs umożliwia, oprócz monitorowania ich zgodności z aktualnymi standardami żywieniowymi, także identyfikację różnic w składzie pomiędzy produktami. W kontekście HM, znaczące jest, aby ukazać że jego skład zmienia się fizjologicznie i jest najbardziej korzystny dla niemowlęcia zarówno w początkowej fazie laktacji, jak i podczas karmienia długotrwałego. Jednak w niektórych przypadkach jest zależny od czynników indywidualnych, takich jak rodzaj stosowanej diety oraz masa ciała. Wyniki tego badania mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia wpływu różnych czynników na jakość HM, co ma bezpośredni wpływ na zdrowie niemowląt.

Wykorzystanie IFs jako materiału badawczego, oprócz porównania do składu HM, miało także na celu ukazanie kobietom, że preparaty te są komponowane w sposób jak najlepiej odwzorowujący skład HM, zabezpieczający potrzeby noworodka i niemowlęcia. Pomimo licznych korzyści zdrowotnych wynikających z karmienia naturalnego, wiele kobiet doświadcza trudności w karmieniu piersią, co często prowadzi do poczucia winy i frustracji związanego z przekonaniem, że karmiąc dziecko IF, jest ono niewłaściwie odżywione. Przedstawione badania nie mają na celu różnicowania HM i IFs w kategorii „lepsze" lub „gorsze", ale opierać się na zrozumieniu ich właściwości, ukazać podobieństwa i różnice pomiędzy nimi, a także przedstawić ewolucję IFs na przestrzeni lat. W niniejszej pracy pod uwagę wzięte zostały także specjalistyczne IFs, których badania pod względem zawartości składników mineralnych i kwasów tłuszczowych są ograniczone. Pomimo odgórnych wytycznych dotyczących komponowania IFs, nie zawsze standardy składu są zachowane, co może stanowić zagrożenie dla zdrowia niemowląt. Do tej pory powstało tylko kilka prac ukazujących składy preparatów specjalistycznych, a takie badania nad preparatami w Polsce nie zostały do tej pory prowadzone. Wyniki tego badania mogą dostarczyć cennych informacji na temat jakości i wartości odżywczej żywności dla niemowląt dostępnej na rynku. Istotne jest, aby produkty te były nie tylko bezpieczne, ale także odpowiednio skomponowane odżywczo, w tym w substancje biologicznie czynne, które wspomogą rozwój niemowląt w kluczowych okresach ich życia. W kontekście rosnącej liczby produktów na rynku, świadomość konsumentów na temat zawartości związków biologicznie czynnych jest niezbędna, aby podejmować świadome decyzje dotyczące wyboru najlepszej żywności dla niemowląt.

2. Cel badań

Celem głównym niniejszej rozprawy doktorskiej była analiza wybranych związków biologicznie czynnych w żywności dla niemowląt determinowanej wybranymi czynnikami.

Cel główny realizowano poprzez cele szczegółowe:

1) Analizę zawartości metyloksantyn w mleku kobiecym w zależności od wyborów żywieniowych determinowanych wiekiem, miejscem zamieszkania, poziomem wykształcenia kobiet oraz okresem laktacji.

2) Analizę zawartości skwalenu w mleku kobiecym względem okresu laktacji oraz wieku i wskaźnika BMI kobiet.

3) Określenie profilu kwasów tłuszczowych mleka kobiecego względem okresów laktacji i porównanie z profilem kwasów tłuszczowych preparatów do żywienia niemowląt.

4) Identyfikację składników mineralnych w preparatach do żywienia niemowląt w zależności od rodzaju i żywieniowego przeznaczenia preparatu i porównanie ich z zawartością w mleku kobiecym z różnych okresów laktacji.

5) Określenie zgodności zawartości składników mineralnych i poszczególnych kwasów tłuszczowych w preparatach do żywienia niemowląt w odniesieniu do wytycznych określających ich skład.

3. Hipotezy badawcze

W oparciu o przyjęte główny oraz szczegółowe cele pracy sformułowano następujące hipotezy badawcze:

H1 Zawartość kofeiny i jej metabolitów w mleku kobiecym jest zależna od wyborów żywieniowych determinowanych czynnikami socjodemograficznymi.

H2 Zawartość skwalenu, kofeiny, kwasów tłuszczowych i składników mineralnych w mleku kobiecym zależy od okresu laktacji.

H3 Skład i przeznaczenie preparatów zastępujących mleko kobiece ma wpływ na zawartość w nich składników mineralnych i profilu kwasów tłuszczowych.

4. Materiał badawczy

4.1. Mleko kobiece (HM)

Materiał badawczy stanowiły próbki HM zebrane od kobiet zamieszkujących rejon Warmii i Mazur. Udział kobiet w badaniu był określony kryteriami włączenia, które obejmowały dobry stan zdrowia kobiet (brak chorób), karmienie piersią dziecka oraz brak przeciwskazań medycznych do karmienia naturalnego. Kobiety zakwalifikowane do badania zostały poproszone o wypełnienie kwestionariusza zawierającego informacje dotyczące: wieku, masy i wysokości ciała, miejsca zamieszkania, rodzaju wykonywanej pracy, poziomu wykształcenia, rodzaju porodu (poród naturalny/cesarskie cięcie), ilości urodzonych dzieci, terminu porodu i daty poboru pokarmu oraz w wybranych przypadkach – danych dotyczących spożycia konkretnych rodzajów pokarmów. Każdy kwestionariusz posiadał kod, którym kobiety oznaczały zebrane próbki mleka (z wykorzystaniem markera transparentnego). Kobiety zostały poinstruowane o prawidłowej kolekcji próbek mleka. Mleko było odciągane przez kobiety przy użyciu własnych laktatorów lub zbierane z wykorzystaniem kolektorów pokarmu (w zależności od dostępności danych akcesoriów przez kobiety). Kobiety zostały poproszone o zebranie mleka do sterylnych polipropylenowych jednorazowych pojemników lub woreczków dedykowanych do przechowywania pokarmu. Pożądaną ilością mleka do badań była ilość 50-100 ml. Kobiety zostały poinstruowane o zbieraniu pokarmu bezpośrednio po zakończeniu karmienia dziecka. W przypadku, gdy wskazana ilość pokarmu nie była możliwa do zebrania podczas jednej sesji, odciągnięte mleko miało być zabezpieczone (szczelnie zamknięte) i umieszczone w warunkach chłodniczych (4 ± 1°C) i uzupełnione do wskazanej ilości w kolejnej sesji. W przypadku niemożności zebrania wskazanej ilości mleka, do badań wykorzystano próbki które zawierały co najmniej 40 ml mleka. Zebrane próbki mleka transportowano w warunkach chłodniczych (4 ± 1°C) i przechowywano w zamrażarce (Gorenje F6313V, Velenje, Słowenia) w temperaturze -30°C do czasu wykonania badan analitycznych.

W związku z praktykowanym przez kobiety karmieniem dziecka na żądanie (dostosowywanie się do potrzeb dziecka w kontekście częstotliwości karmienia, a nie zgodnie z ustalonym harmonogramem), uczestniczki nie były zobligowane do przestrzegania wyznaczonych godzin poboru próbek mleka, tylko dostosowywały je do potrzeb dziecka. Łącznie zebrano próbki mleka od 171 kobiet w wieku od 18 do 43 lat (średnia 29±6 lat), o masie ciała od 50 do 130 kg, (średnia 66.7±10.3 kg), wzroście od 1.46 do 1.78 m (średnia 1.66±0.06 m) i BMI od 18.6 do 46 kg/m^2 (24.5±3.6 kg/m^2). Łącznie przebadano 56 próbek

siary, 61 próbek mleka przejściowego i 96 próbek mleka dojrzałego. Uczestniczki zostały poproszone o podpisanie formularzu świadomej zgody na udział w badaniu. Zbieranie próbek mleka kobiecego oraz przeprowadzone badania zostały wykonane za zgodą Komisji Bioetycznej przy Wydziale Lekarskim Collegium Medicum Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (19/2023) oraz za zgodą Komisji Bioetycznej Medycznego Uniwersytetu w Białymstoku (R-I-003/22/2000).

4.2. Preparaty przeznaczone do żywienia niemowląt (IFs)

IFs zostały wykorzystane w trzech publikacjach **(P2, P3 i P4)**. W **publikacji P2** analizie poddano 3 konwencjonalne IFs do początkowego żywienia niemowląt a w **publikacji P3** 2 konwencjonalne IFs do następnego żywienia niemowląt. W **publikacji P4** analizowano 14 IFs, w tym 8 konwencjonalnych (przeznaczonych do żywienia niemowląt zdrowych) (w tym 4 do początkowego żywienia niemowląt i 4 do następnego żywienia niemowląt) i 6 specjalistycznych (przeznaczonych do żywienia niemowląt ze szczególnymi potrzebami żywieniowymi). Wszystkie IFs zostały zakupione w sklepach i aptekach w Olsztynie. Każdy z nich był zapakowany w tekturowe pudełko lub stalową/aluminiową puszkę i miał postać proszku. Ze względów etycznych oraz w trosce o ochronę marki, poszczególne próbki IFs zostały zakodowane, a tożsamość producentów pozostała nieujawniona. Każdy z rodzajów IFs wykorzystany do badań przygotowano zgodnie z instrukcją na opakowaniu, mieszając odpowiednią jego ilość z wodą dejonizowaną.

4.2.1. Selekcja próby

W **publikacji P2** i **P3** dobór IFs został przeprowadzony w oparciu na ich przeznaczenie względem wieku niemowląt (IFs do początkowego i następnego żywienia niemowląt). IFs były przeznaczone dla zdrowych niemowląt, nieposiadających przeciwskazań żywieniowych do ich spożycia.

W publikacji **P4** kryterium wyboru konwencjonalnych IFs był analogiczny jak w publikacji **P2** i **P3**. W przypadku specjalistycznych IFs, podczas wyboru kierowano się ich łatwą dostępnością w pobliskich sklepach i aptekach. W badaniach wykorzystano hydrolizaty o umiarkowanym i znacznym stopniu hydrolizy, preparat na bazie białka sojowego oraz preparaty oparte o mieszanki aminokwasów. Charakterystykę IFs wykorzystanych w poszczególnych publikacjach, z uwzględnieniem rodzaju, przeznaczenia, podstawowych wartości odżywczej i sposobu przygotowania przedstawiono w **Tabeli 1**.

Dodatkowe badania uzupełniające (DBU) nad zawartością kwasów tłuszczowych w IFs wykonano na ośmiu preparatach z Tabeli 1: C-A1, C-D1, C-A2, C-D2, S1, S3, S4 i S5, które w tabeli wyróżniono pogrubieniem.

Tabela 1. Charakterystyka preparatów dla niemowląt wykorzystanych w poszczególnych publikacjach rozprawy doktorskiej.

Lp.	Kod*	Przeznaczenie żywieniowe **	Opis produktu **	Podstawowa wartość odżywcza w 100g **	Sposób przygotowania 100 ml mleka **	Numer publikacji
1	A	Do początkowego żywienia niemowląt	Konwencjonalne na bazie mleka krowiego	E: 478 kcal, T 24.6 g (w tym SFA 11.9g, MUFA bd, PUFA bd), W 52.9.3 g (w tym S 52.2g), B 9.4g	13.8 g p. + 90 ml w.	
2	B	Do początkowego żywienia niemowląt	Konwencjonalne na bazie mleka krowiego	E: 496 kcal, T 24.4 g (w tym SFA 8.8g, MUFA 9.6 g, PUFA 5.2 g), W 57.8 g (w tym S 56.3g), B 9.6g	13.5 g p. + 90 ml w.	**P2**
3	C	Do początkowego żywienia niemowląt	Konwencjonalne na bazie mleka krowiego	E: 519 kcal, T 27.6 g (w tym SFA 2.5g, MUFA 17.8 g, PUFA 5 g), W 57.7 g (w tym S g), B 9.6g	12.9 g p. + 90 ml w.	
4	IF-I	Do następnego żywienia niemowląt	Konwencjonalne na bazie mleka krowiego	E: 482 kcal, T 25 g (w tym SFA 11g, MUFA 10 g, PUFA 4.2 g), W 51 g (w tym S 24g), B 11g	13.8 g p. + 90 ml w.	**P3**
5	IF-II	Do następnego żywienia niemowląt	Konwencjonalne na bazie mleka krowiego	E: 511 kcal, T 27.8 g (w tym SFA 12.4g, MUFA 11 g, PUFA 4.4 g), W 54.3 g (w tym S 23.1g), B 9.8g	12.9 g p. + 90 ml w.	
6	**C-A1**	Do początkowego żywienia niemowląt	Konwencjonalne na bazie mleka krowiego	E: 478 kcal, T 24.6 g (w tym SFA 11.6 g, MUFA 8 g, PUFA 3.6 g), W 52.9 g (w tym S 52.2 g), B 9.4g	13.8 g p. + 90 ml w.	
7	C-B1	Do początkowego żywienia niemowląt	Konwencjonalne na bazie mleka krowiego	E: 478 kcal, T 24.6 g (w tym SFA 8 g, MUFA 12.3 g, PUFA 4.3 g), W 52.9 g (w tym S 52.1 g), B 9.4g	13.8 g p. + 90 ml w.	
8	C-C1	Do początkowego żywienia niemowląt	Konwencjonalne na bazie mleka krowiego	E: 511 kcal, T 27.9 g (w tym SFA 11.6g, MUFA 12.4 g, PUFA 3.9 g), W 54.4 g (w tym S 54.5g), B 9.9g	12.9 g p. + 90 ml w.	**P4**
9	**C-D1**	Do początkowego żywienia niemowląt	Konwencjonalne na bazie mleka koziego, zawiera DHA	E: 511 kcal, T 26.4 g (w tym SFA 9.3 g, MUFA 12.4 g, PUFA 4.1 g), W 57.4 g (w tym S 57.4 g), B 10.1g	12.9 g p. + 90 ml w.	
10	**C-A2**	Do następnego żywienia niemowląt	Konwencjonalne na bazie mleka krowiego	E: 472 kcal, T 22.2 g (w tym SFA 10.4 g, MUFA 7.6g, PUFA 3.5 g), W 56.2 g (w tym S 55.6 g), B 9.7g	14.4 g p. + 90 ml w.	

11	C-B2	Do następnego żywienia niemowląt	Konwencjonalne na bazie mleka krowiego	E: 472 kcal, T 22.2 g (w tym SFA 6.9 g, MUFA 11.1 g, PUFA 3.5 g), W 56.9 g (w tym S 56.3 g), B 9.7g	14.4 g p. + 90 ml w.
12	C-C2	Do następnego żywienia niemowląt	Konwencjonalne na bazie mleka krowiego z dodatkiem probiotyków i prebiotyków	E: 507 kcal, T 27.6 g (w tym SFA 11.9 g, MUFA 11.9 g, PUFA 3.7 g), W 53.7 g (w tym S 53.7 g), B 9.7g	13.4 g p. + 90 ml w.
13	**C-D2**	Do następnego żywienia niemowląt	Konwencjonalne na bazie mleka koziego, zawiera DHA i AA	E: 511 kcal, T 26.4 g (w tym SFA 9.3 g, MUFA 12.4 g, PUFA 4.1 g), W 57.4 g (w tym S 57.4 g), B 10.1g	12.9 g p. + 90 ml w.
14	**S1**	Dietetyczne postępowanie w leczeniu zaburzeń żołądkowo-jelitowych, kolki niemowlęcej i zaparć. Kompletny pod względem odżywczym dla niemowląt do 6 miesiąca życia	Częściowa hydroliza białek mleka, co ułatwia trawienie i przyspiesza opróżnianie żołądka. Zawiera B-palmitynian i galaktooligosacharydy	E: 496 kcal, T 25.9 g (w tym SFA 13.3 g, MUFA 8.9 g, PUFA 3 g), W 51.1 g (w tym S 5.9 g), B 12.6g	13.5 g p. + 90 ml w.
15	S2	Dietetyczne postępowanie w leczeniu refluksu żołądkowo-przełykowego oraz zaburzeniach żołądkowo-jelitowych. Kompletny pod względem odżywczym dla niemowląt do 6 miesiąca życia.	Częściowa hydroliza białek mleka, co ułatwia trawienie. Zagęszczona formuła	E: 511 kcal, T 25.6 g (w tym SFA 9.3 g, MUFA 10.1 g, PUFA 5.4 g), W 59.7 g (w tym S 5.4 g), B 10.9g	12.9 g p. + 90 ml w.
16	**S3**	Dietetyczne postępowanie w nietolerancji na białka mleka krowiego, nietolerancji laktozy, galaktozemii i alergii na białka mleka krowiego. Kompletny pod względem odżywczym dla niemowląt do 6 miesiąca życia.	Na bazie białek soi	E: 489 kcal, T 23.4 g (w tym SFA 9.9 g, MUFA 9.2 g, PUFA 4.3 g), W 58.2 g (w tym S 5 g), B 11.3g	14.1 g p. + 90 ml w.
17	**S4**	Dietetyczne postępowanie w leczeniu alergii na białka mleka krowiego i innych alergiach pokarmowych (np. na białka soi), nietolerancji laktozy i wtórnej nietolerancji sacharozy. Przeznaczone do następnego żywienia niemowląt.	Hipoalergiczny, na bazie hydrolizatu kazeiny o wysokim stopniu hydrolizy, zawiera probiotyki	E: 504 kcal, T 25.2 g (w tym SFA 10.4 g, MUFA bd g, PUFA bd g), W 57 g (w tym S 25.9 g), B 12.4g	13.5 g p. + 90 ml w.
18	**S5**	Dietetyczne postępowanie u niemowląt od urodzenia do 12 miesięcy z alergią na białka mleka krowiego, z eozynofilowym zapaleniem przełyku i innymi wskazaniami, w których zaleca się stosowanie preparatów aminokwasowych.	Hipoalergiczny, odpowiedni jako jedyne źródło pożywienia dla niemowląt poniżej 12 miesięcy, zawiera LCPUFA, probiotyki i prebiotyki	E: 472 kcal, T 23.6 g (w tym SFA 10.4 g, MUFA 9 g, PUFA 3.8 g), W 50 g (w tym S 4.7 g), B 13.2g	14.4 g p. + 90 ml w.

19	S6	Dietetyczne postępowanie w leczeniu alergii na białka mleka krowiego i innych alergiach pokarmowych. Preparat na bazie aminokwasów. Kompletny pod względem odżywczym dla niemowląt do 6 miesiąca życia.	Hipoalergiczny, nie zawiera laktozy i białka mleka, dobrze przyswajalny i tolerowany	E: 504 kcal, T 25.9 g (w tym SFA 13.3 g, MUFA bd g, PUFA bd g), W 53.3 g (w tym S 0 g), B 13.3g	13.5 g p. + 90 ml w.

Skróty: E – wartość energetyczna, T – tłuszcz, SFA – nasycone kwasy tłuszczowe, MUFA – jednonienasycone kwasy tłuszczowe, PUFA – wielonienasycone kwasy tłuszczowe, W – węglowodany, S – cukry proste, B – białko, p. – proszek, w. – woda, bd – brak danych. Pogrubione nazwy kodów preparatów dla niemowląt zostały wykorzystane do dodatkowych badań nad zawartością kwasów tłuszczowych. * - podane kody IFs używane w poszczególnych publikacjach. Kody pogrubionych IFs zostały użyte w dodatkowych badaniach uzupełniających (DBU) nad zawartością kwasów tłuszczowych.

5. Metody badawcze

5.1. Doświadczenia analityczne

5.1.1. Ekstrakcja kofeiny (P1)

Próbki HM rozmrożono, wymieszano i podgrzano do temperatury 40 ± 1°C w celu homogenizacji. Do 21.5 ml próbki HM dodano wzorzec wewnętrzy kofeiny (150µl) (13C3, 300 ng/ml) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Próbki odwirowano (11000 obr./min.) a 1 ml beztłuszczowej cieczy zmieszano z 200 µl buforu amonowego (1M, pH2) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) i 4 ml chloroformu (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), następnie mieszano przez 10 minut i odwirowano ponownie (3000 obr./min.). Następnie, rozpuszczalnik organiczny odparowano z wykorzystaniem obrotowej wyparki próżniowej i ponownie rozpuszczono w 200 µl fazy ruchomej pod strumieniem N_2 w temperaturze 45°C. Ilość 20 µl każdej próbki została wykorzystana do analizy LC-MS/MS.

5.1.2. Oznaczenie zawartości metyloksantyn (P1)

Oznaczenia metyloksantyn dokonano z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Rozdziału chromatograficznego dokonano przy użyciu system HPLC wyposażonego w inteligentną pompę Hitachi L-6200 A (Merck, Darmstadt, Niemcy) wyposażonego w autosampler CTC CombiPAL (CTC ANALYTICS, Zwingen, Szwajcaria), z wykorzystaniem kolumny Phenomenex Aqua C18 (5µm x 50 x 4.6 mm) (Phenomenex, Aschaffenburg, Niemcy). Zastosowano elucję izokratyczną z fazą ruchomą składającą się z 0.1% kwasu mrówkowego (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) w wodzie (90%), metanolu (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) (5%) i tatrahydrofuranu (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) (5%). Detekcja została przeprowadzona przy użyciu spektrometru masowego SCIEX API 3000 z potrójnym kwadrupolem (Sciex, Concord, Ontario, Kanada) z jonizacją elektrorozpryskową. Jako gaz w systemie analiz LC-MS wykorzystani azot o wysokiej czystości. Spektrometr pracował w trybie jonów dodatnich w celu wykrycia: kofeiny (m/z 195 → 138), paraksantyny (m/z 181 → 124), teofiliny (m/z 181 → 124), teobrominy (m/z 181 → 138) i wzorca wewnętrznego (m/z 198 → 140). Zawartość metyloksantyn wyrażono w µg/ml HM.

5.1.3. **Ekstrakcja tłuszczu (P2, P3, DBU)**

Próbki HM rozmrożono, wymieszano i podgrzano do temperatury 40 ± 1°C w celu homogenizacji. Poszczególne IFs przygotowano zgodnie z proporcjami przedstawionymi w Tabeli 1. Ekstrakcję tłuszczu przeprowadzono ekstrakcyjno-wagową metodą Rose-Gottlieba (AOAC International, 2000). Do 10 g (± 0.01g) próbek HM/IF dodano 2ml 10% amoniaku (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) i 10 ml etanolu (Merck, Darmstadt, Niemcy), mieszając na każdym razem, Tłuszcz ekstrahowano mieszaniną eteru dietylowego (Merck, Darmstadt, Niemcy) i eteru naftowego (Merck, Darmstadt, Niemcy). Górną warstwę organiczną zebrano i przefiltrowano przez bezwodny siarczan sodu (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA). Z poszczególnych próbek odparowano rozpuszczalniki organiczne poprzez zatężanie ich z wykorzystaniem obrotowej wyparki próżniowej (Büchi Rotavapor R-200, Flawil, Szwajcaria).

5.1.4. **Oznaczenie zawartości skwalenu (P2)**

Zawartość skwalenu oznaczono techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) zgodnie ze zmodyfikowaną metodą oznaczania triacylogliceroli opisaną przez Czaplickiego i in. (2009). Próbkę HM/IF (200 mg) przeniesiono do 10 ml kolby miarowej, dodano n-heksan (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) i oczyszczono przez wirowanie. Analizę prowadzono z wykorzystaniem chromatografu cieczowego Agilent 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornia, USA) wyposażony w detektor DAD (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornia, USA). Rozdział chromatograficzny został przeprowadzony na kolumnie LiChrospher RP-18 (250 mm x 4.6 mm, 5 mm) w temperaturze 30°C (Merck, Darmstadt, Niemcy). Do elucji zastosowano układ gradientowy: A, acetonitryl (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA); B, alkohol izopropylowy (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA); C, heksan (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Do analizy ilościowej wykorzystano zewnętrzną krzywą kalibracyjną i standard skwalenu (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Krzywa kalibracyjna została opisana równaniem: *powierzchnia piku skwalenu = 27.23023 x ilość (mg/l) + 1.57784*, a liniowość potwierdzono współczynnikiem korelacji wynoszącym 0.9998. Granicę wykrywalności ustalono na 62.5 µg skwalenu na 100 g lipidów mleka. Granica oznaczalności wynosiła 208.3 µg/100 g lipidów mleka. Zawartość skwalenu w HM i IF wyrażono w mg/100 g tłuszczu.

5.1.5. **Oznaczenie profilu kwasów tłuszczowych (P3, DBU)**

Profil kwasów tłuszczowych analizowano z wykorzystaniem techniki chromatografii gazowej (GC). Estry metylowe kwasów tłuszczowych (FAME) przygotowano zgodnie ze standardową metodą Międzynarodowej Fereracji Mleczarskiej (International Dairy Federation, IDF), z wykorzystaniem roztworu wodorotlenku potasu (Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri, USA) w metanolu (Merck, Darmstadt, Niemcy) (ISO 1211:2011; ISO 15884:2002). Rozdział i ilościowe oznaczenie kwasów tłuszczowych wykonano przy użyciu chromatografu gazowego Hewlett-Packard 6890 (Palo Alto, Kalifornia, USA) z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID) i kolumną kapilarną Supelcowax 10 (długość – 100 m; średnica wewnętrzna – 0.25 mm; faza ciekła – Supelcowax 30; grubość filmu – 0.25 mm; temperatura: detektor = 250°C, kolumna = 195°C; gaz nośny – hel; szybkość przepływu – 1.5 ml/min) (Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). FAME zidentyfikowano na podstawie ich czasów retencji i porównano z czasami określonymi dla mieszaniny estrów metylowych kwasów tłuszczowych w standardowej mieszaninie Supelco 37 Component FAME (10 mg/ml w chlorku metylenu) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Do obliczenia procentowej zawartości kwasów tłuszczowych wykorzystano oprogramowanie G1701BA ChemStation B.01.00 (Agilent, Alpharetta, Georgia, USA). Poszczególne kwasy tłuszczowe wyrażono jako procent wagowy całkowitych FAME.

5.1.6. **Oznaczenie zawartości składników mineralnych (P4)**

Próbki HM rozmrożono, wymieszano i podgrzano do temperatury 40 ± 1°C w celu homogenizacji. Poszczególne IFs przygotowano zgodnie z proporcjami przedstawionymi w Tabeli 1. Mineralizację próbek przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną przez Whiteside i Miner (1984). Próbki HM/IFs (10g) odważono do tygli kwarcowych i suszono przez 12 godzin w suszarce laboratoryjnej (Memmert UF30, Schwabach, Niemcy) w temperaturze 60°C. Następnie, próbki zwęglano w piecu elektrycznym przez 8 godzin w temperaturze 480°C, a następnie umieszczono w piecu muflowym (Nabertherm GmbH, Lilienthal, Niemcy) w celu uzyskania biało-szarego popiołu, stopniowo zwiększając temperaturę od 100 do 500°C.

Popiół poddano dysocjacji termicznej z wykorzystaniem 1M HNO_3 (Merck, Darmstadt, Niemcy), przeniesiono do 25 ml kolb miarowych i uzupełniono wodą dejonizowaną. Jednocześnie przygotowano próbę odczynnikową. Stężenie poszczególnych składników mineralnych w otrzymanych mineralizatach oznaczano bezpośrednio lub po ich uprzednim rozcieńczeniu. Stężenie Cu, Mn, Fe, Zn, Ca i Mg mierzono techniką płomieniowej

spektrometrii absorbcji atomowej (AAS) (płomień acetylen-powietrze) z wykorzystaniem spektrometru absorbcji atomowej iCE 3000 SERIES-THERMO (Thermo-Scientific, Hemel Hempstead, Hertfordshire, UK) wyposażonego w stację danych GLITE, korekcję tła (lampa deuterowa) i odpowiednie lampy katodowe. Do oznaczenia zawartości Ca, do mineralizatów dodano 10% siedmiowodnego chlorku lantanu ($LaCl_3$ $7H_2O$) (Merck, Darmstadt, Niemcy), w ilości zapewniającej końcowe stężenie La^{3+} wynoszące 1%. Zawartość Na i K oznaczono z wykorzystaniem spektrometru pracującego w stanie emisyjnym. Zawartość P oznaczono metodą kolorymetryczną z wykorzystaniem molibdenianu amonu (VI) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), siarczanu sodu (IV) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) i hydrochinonu (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) przy użyciu spektrofotometru VIS 6000 (ThermoScientific, Madison, Wisconsin, USA). Średnią zawartość składników mineralnych wyrażono w 100 g IF (proszek) lub HM (płyn) jako średnią z trzech powtórzeń (z odchyleniem standardowym).

5.2. Metody opisowe i obliczeniowe

5.2.1. Metoda 3-dniowego bieżącego notowania – zebranie danych dotyczących spożycia kofeiny (P1)

Do określenia ilości oraz rodzajów spożytych przez kobiety produktów żywnościowych będących źródłem kofeiny wykorzystano metodą bieżącego notowania (Przysławski i in., 2013). Uczestniczki zostały poinstruowane o sposobie prowadzenia dzienniczka żywieniowego, uwzględniającego spożycie: kawy (rodzaju oraz typu kawy, ilości kawy potrzebnej do przygotowania napoju), herbaty (rodzaju, sposobu przygotowania, ilości herbaty potrzebnej do przygotowania napoju), czekolady (rodzaju, ilości spożytej jednorazowo) i napojów energetycznych (rodzaju, ilości zawartej kofeiny). W ocenie spożycia kofeiny nie uwzględniono spożycia suplementów diety oraz leków, które mogły dostarczać niewielkich ilości kofeiny. Do opisania spożytych ilości kobiety miały używać miar domowych: *łyżeczka, szklanka, filiżanka, kubek, kostka, torebka (herbaty).* Na podstawie dostarczonych danych oszacowano spożycie kofeiny.

5.2.2. **Określenie wskaźnika BMI (P2)**

Wskaźnik BMI ustalono na podstawie danych liczbowych dotyczących masy ciała i wysokości, które kobiety dostarczyły w kwestionariuszu. Do obliczenia wskaźnika BMI wykorzystano wzór (1) (WHO, 2025):

$$(1) \qquad BMI = \frac{\mathrm{W\,(kg)}}{\mathrm{H\,(m)^2}},$$

gdzie:

W – masa ciała (kg)

H – wysokość ciała (m)

Wartości wskaźnika BMI interpretowano zgodnie z klasyfikacją opracowaną przez WHO (WHO, 2025):

- BMI < 18.5 kg/m^2– niedowaga
- BMI 18.5 – 24.99 kg/m^2 – prawidłowa masa ciała
- BMI 25.0-29.99 kg/m^2 – nadwaga
- BMI ≥ 30 kg/m^2 - otyłość

5.2.3. **Pokrycie zapotrzebowania na składniki mineralne (P4)**

Dzienne spożycie każdego z IF i spożycie HM przez niemowlęta w wieku 1-6 miesięcy i 7-11 miesięcy oszacowano na podstawie informacji dotyczących dawkowania preparatu podanych na etykietach poszczególnych IFs i bazując na zaleceniach PTGHiŻDz (Szajewska i in., 2021) (Tabela S1, P4). Następnie oszacowano dzienne spożycie składników mineralnych (EDI) według wzoru (2) zastosowanego przez Almeida i in. (2022):

$$(2)\ EDI = \mathrm{CM\ x\ CD},$$

gdzie:

CM — średnie stężenie każdego składnika mineralnego (mg/100 g proszku; mg/100 ml mleka kobiecego).

CD — zalecana dzienna dawka IF według danych producenta (g)/zalecane dzienne spożycie HM (ml) według PTGHiŻDz.

Obliczenia pokrycia dziennego zapotrzebowania na wybrane składniki mineralne przeprowadzono, wykorzystując normy spożycia zawarte w Normach żywienia dla populacji

polskiej (Wojtasik i in., 2020; Rychlik i in., 2020). Do przeliczeń wykorzystano dwa rodzaje norm żywienia – Zalecane Dzienne Spożycie (RDA) i Wystarczające Spożycie (AI). Zapotrzebowanie na składniki mineralne przeliczono dla niemowląt w wieku 0–6 miesięcy oraz 7–11 miesięcy. U niemowląt w wieku 0–6 miesięcy zastosowano wyłącznie normę AI, a u niemowląt w wieku 7–11 miesięcy zarówno normy RDA, jak i AI.

5.2.4. **Wskaźniki jakości lipidów (DBU)**

Wskaźniki jakości lipidów obliczono na podstawie wzorów (3), (4), (5), (6) i (7) podanych przez Paszczyk i Tońską (2022) i Pietrzak-Fiećko i Kamelską-Sadowską (2020).

- Wskaźnik pożądanych kwasów tłuszczowych (DFA)

$$(3)\ \mathrm{DFA} = UFA + C18{:}0,$$

gdzie:

UFA – kwasy tłuszczowe nienasycone (MUFA + PUFA)

- Wskaźnik kwasów tłuszczowych hipercholesterolemicznych (OFA)

$$(4)\ \mathrm{OFA} = C12{:}0 + C14{:}0 + C16{:}0$$

- Wskaźnik aterogenności (AI)

$$(5)\ \mathrm{AI} = \frac{(\mathrm{C12{:}\,0} + (4\ \mathrm{x\ C14{:}0}) + \mathrm{C16{:}\,0})}{\mathrm{PUFA}\ n3 + \mathrm{PUFA}\ n6 + \mathrm{MUFA}}$$

- Wskaźnik trombogenności (TI)

$$(6)\ \mathrm{TI} = \frac{(\mathrm{C14{:}\,0} + \mathrm{C16{:}\,0} + \mathrm{C18{:}\,0})}{\left((0.5\ \mathrm{x\ C18{:}\,1}) + 0.5\ \mathrm{x\ suma\ innych\ MUFA}\right) + 0.5\ \mathrm{x\ PUFA}\ n6 + (3\ \mathrm{x\ PUFA}\ n3) + \frac{\mathrm{PUFA}\ n3}{\mathrm{PUFA}\ n6}}$$

- Stosunek zawartości kwasów hipocholesterolemicznych do hipercholesterolemicznych (H/H)

$$(7)\ \mathrm{H/H} = \frac{\mathrm{C18{:}\,1}\ n9 + \mathrm{C18{:}\,2}\ n6 + \mathrm{C18{:}\,3}\ n3}{\mathrm{C12{:}\,0} + \mathrm{C14{:}\,0} + \mathrm{C16{:}\,0}}$$

5.3. Analiza statystyczna

Wyniki wyrażono jako średnia ± odchylenie standardowe (SD) **(P1, P2, P3, P4)**. Ocenę spożycia produktów bogatych w kofeinę względem czynników grupujących oceniono z wykorzystaniem testu chi-kwadrat **(P1)**. Rozkład normalny sprawdzano testem Shapiro-Wilka, a jednorodność wariancji testem Levene'a. Gdy rozkład nie był normalny stosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa oraz test post hoc Dunna **(P1, P2, P3, P4)**, a przy normalności rozkładu stosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) i test Tukey'a **(P4)**. Testu nieparametrycznego użyto w ocenie danych ilościowych pomiędzy: zawartością metyloksantyn w HM względem miejsca zamieszkania, poziomu wykształcenia, wieku i okresu laktacji **(P1)**; zawartością skwalenu w HM względem wieku i okresu laktacji **(P2)**; profilem kwasów tłuszczowych w HM względem okresu laktacji oraz pomiędzy profilem kwasów tłuszczowych w HM i IFs **(P3)**; zawartością składników mineralnych w IFs i zawartością pomiędzy IFs i HM **(P4)**, a jednoczynnikową analizę wariancji w ocenie danych ilościowych pomiędzy zawartością składników mineralnych w IFs i zawartością pomiędzy IFs i HM **(P4)** oraz pomiędzy zawartością kwasów tłuszczowych i wskaźnikami jakości lipidów w konwencjonalnych i specjalistycznych IFs **(DBU)**. Porównanie zawartości składników mineralnych w HM z różnych okresów laktacji przeprowadzono za pomocą testu U Manna-Whitneya **(P4)**. Do oceny zróżnicowania profilu kwasów tłuszczowych pomiędzy HM z różnych okresów laktacji a IFs oraz wskazania kwasów tłuszczowych najbardziej determinujących te zróżnicowania wykorzystano analizę składowych głównych (PCA) i analizę skupień (CA) **(P3)**. W ocenie zróżnicowania poziomu składników mineralnych w IFs konwencjonalnych i specjalistycznych i HM z różnych okresów laktacji wykorzystano PCA **(P4)**. Do oceny związku pomiędzy spożyciem produktów bogatych w kofeinę a zawartością kofeiny w HM zastosowano korelację liniową Pearsona **(P1)**, a do oceny związku pomiędzy wskaźnikiem BMI a zawartością skwalenu w HM – korelację liniową Spearmana **(P2)**. Za poziom istotny przyjęto $p < 0.05$. Obliczenia statystyczne zostały wykonane w programie Excel (Microsoft 365, Redmond, Waszyngton, USA) i Statistica 13.1 (Statsoft Inc., Tulsa, Ohio, USA).

6. Wyniki uzyskanych badań

6.1. Analiza metyloksantyn w mleku kobiecym (P1)

Charakterystyka kobiet karmiących biorących udział w badaniu, z uwzględnieniem analizowanych czynników, została przedstawiona w tabeli **(P1 – Tabela 2)**.

6.1.1. Spożycie kofeiny

W **Tabeli 2** podsumowano informacje dotyczące spożycia napojów i żywności zawierających kofeinę przez kobiety karmiące, które zostały zebrane z zastosowaniem metody bieżącego notowania. Spośród produktów bogatych w kofeinę, kobiety spożywały kawę, herbatę w torebkach, herbatę liściastą oraz czekoladę mleczną i gorzką, natomiast żadna z respondentek nie spożywała napojów energetyzujących i innych napojów zawierających kofeinę. Na podstawie wywiadu żywieniowego kobiety zadeklarowały spożycie herbaty czarnej, zielonej, białej i naparów owocowych oraz kawy rozpuszczalnej i mielonej. Tabela uwzględnia spożycie produktów bogatych w kofeinę w zależności od miejsca zamieszkania kobiet (miasto – wieś), poziomu wykształcenia kobiet (średnie, wyższe), wieku (18-25 lat; 26-33 lat; 34-44 lat) oraz okresu laktacji (1 – siara, 2 – mleko przejściowe, 3 i 4 – mleko dojrzałe i późne). Na podstawie zebranych danych, wskazuje się, że wybrane czynniki grupujące miały wpływ na wybory żywieniowe kobiet karmiących. Więcej mieszkanek miast (58%) spożywało kawę częściej niż 2 razy dziennie. Wśród mieszkanek wsi najwyższy odsetek badanych spożywał kawę 1 raz dziennie (54%). Podobną tendencję odnotowano dla ilości kawy używanej do przygotowania napoju – wśród mieszkanek miast 45% badanych używało więcej niż 2 łyżeczek kawy do przygotowania napoju, a wśród mieszkanek wsi 37% badanych używało około 2 łyżeczek. Ponad 50% kobiet z wykształceniem średnim spożywało więcej niż 2 kawy dziennie, podczas gdy 50% kobiet z wykształceniem wyższym zadeklarowało jej spożycie 1 raz dziennie. W zależności od wieku, 65% kobiet w wieku 18-25 lat spożywało kawę 2 razy lub więcej niż 2 razy dziennie a prawie 70% kobiet w wieku 34-44 lata – więcej niż 2 razy dziennie. Najwyższy odsetek kobiet w 1 okresie laktacji (43%) spożywało kawę 1 raz dziennie, natomiast kobiety w późniejszych etapach laktacji spożywały kawę 2 razy dziennie (2 okres laktacji – 49%) i więcej niż 2 razy dziennie (3 i 4 okres laktacji – 47%). W przypadku ilości kawy potrzebnej do przygotowania napoju, najwięcej kobiet w 1 okresie laktacji stosowało 1 łyżeczkę lub mniej, a w pozostałych okresach laktacji – mniej niż 2 łyżeczki. Niezależnie od czynników grupujących, bardziej popularnym rodzajem spożywanej herbaty była herbata

w torebkach parzona mniej niż 10 minut. W zależności od miejsca zamieszkania, poziomu wykształcenia oraz okresu laktacji, respondentki spożywały częściej czekoladę mleczną. W spożyciu produktów zawierających kofeinę odnotowano znaczące różnice względem częstotliwości spożycia kawy a miejscem zamieszkania, poziomem wykształcenia, wiekiem i okresem laktacji ($p<0.05$). Ponadto, wiek oraz okres laktacji determinowały częstotliwość spożycia herbaty, a miejsce zamieszkania i poziom wykształcenia rodzaj spożywanej czekolady ($p<0.05$).

Tabela 2. Informacje dotyczące spożycia artykułów żywnościowych bogatych w kofeinę zebrane za pomocą metody bieżącego spożycia żywności.

Badany czynnik	Miejsce zamieszkania			Poziom wykształcenia			Wiek				Okres laktacji			
	miasto	wieś		średnie	wyższe		18-25	26-33	34-43		1	2	3 i 4	
	n=65 n;%	n=35 n;%	*p*	n=60 n;%	n=40 n;%	*p*	n=29 n;%	n=37 n;%	n=34; n;%	*P*	n=35 n;%	n=35 n;%	n=30 n;%	*p*
Częstotliwość spożycia kawy														
>2 razy dziennie	38;58	6;17		33;55	13;33		9;31	8;22	23;68		3;9	10;29	14;47	
2 razy dziennie	14;22	8;23	**0.0002**	17;28	5;14	**0.00026**	10;34	12;32	7;21	**0.00157**	11;31	17;48	12;40	**0.0012**
1 raz dziennie	8;12	19;54		6;10	19;48		8;28	12;32	4;12		15;43	7;20	4;13	
nie spożywam	5;8	2;6		4;7	3;8		2;7	5;14	-		6;17	1;3	-	
Ilość łyżeczek (5g) używana do przyrządzenia kawy														
> niż 2	29;45	13;26	> 0.05	17;28	6;15	> 0.05	9;31	8;22	17;50	>0.05	2;6	9;26	11;37	>0.05
2	21;32	9;37		26;43	19;48		12;41	14;38	12;35		10;28	17;48	14;47	
1 lub mniej	10;15	11;31		13;22	12;30		6;21	10;27	5;15		17;49	8;23	5;17	
nie spożywam	5;8	2;6		4;7	3;8		2;7	5;14	-		6;17	1;3	-	
Częstotliwość spożycia herbaty														
> 2 razy dziennie	27;42	14;40	> 005	25;42	14;35	> 0.05	7;24	9;24	19;56	**0.03079**	9;26	11;31	9;30	
2 razy dziennie	32;49	19;54		32;53	19;48		16;55	23;62	12;35		14;40	16;46	13;43	**0.0191**
1 raz dziennie	6;9	2;6		3;5	7;18		6;21	5;14	3;9		12;34	8;23	8;27	
Rodzaj spożywanej herbaty														
w torebkach	57;88	32;91	> 0.05	55;92	31;78	**0.0477**	25;86	28;76	22;85	> 0.05	31;89	27;77	24;80	**0.0291**
liściasta	8;12	3;9		5;8	9;22		4;14	9;24	12;15		4;11	8;23	6;20	
Czas parzenia herbaty														
krócej niż 10 minut	62;95	31;89	> 0.05	57;95	36;90	> 0.05	27;93	32;86	31;91	> 0.05	35;100	32;91	26;87	**0.0002**
dłużej niż 10 minut	3;5	4;11		3;5	4;10		2;7	5;14	3;9		-	3;9	4;13	
Częstotliwość spożycia czekolady														
więcej niż 3 kostki dziennie	-	-	**0.00079**	-	-	> 0.05	-	-	-	> 0.05	-	-	-	**0.0492**
3 lub mniej niż 3 kostki dziennie	58;89	21;60		47;78	32;80		21;72	27;73	31;91		23;66	30;86	26;87	
nie spożywam	7;11	14;40		13;22	8;20		8;28	10;27	3;9		12;34	5;14	4;13	
Rodzaj spożywanej czekolady														
gorzka	23;35	4;11	**0.00075**	7;12	15;38	**0.0078**	12;41	12;32	14;41	> 0.05	13;37	8;23	11;37	>0.05
mleczna	35;54	17;49		40;67	17;43		9;31	15;41	17;50		10;29	22;63	15;50	
nie spożywam	7;11	14;40		13;22	8;20		8;28	10;27	3;9		12;34	5;14	4;13	

p<0.05 został oznaczony pogrubioną czcionką

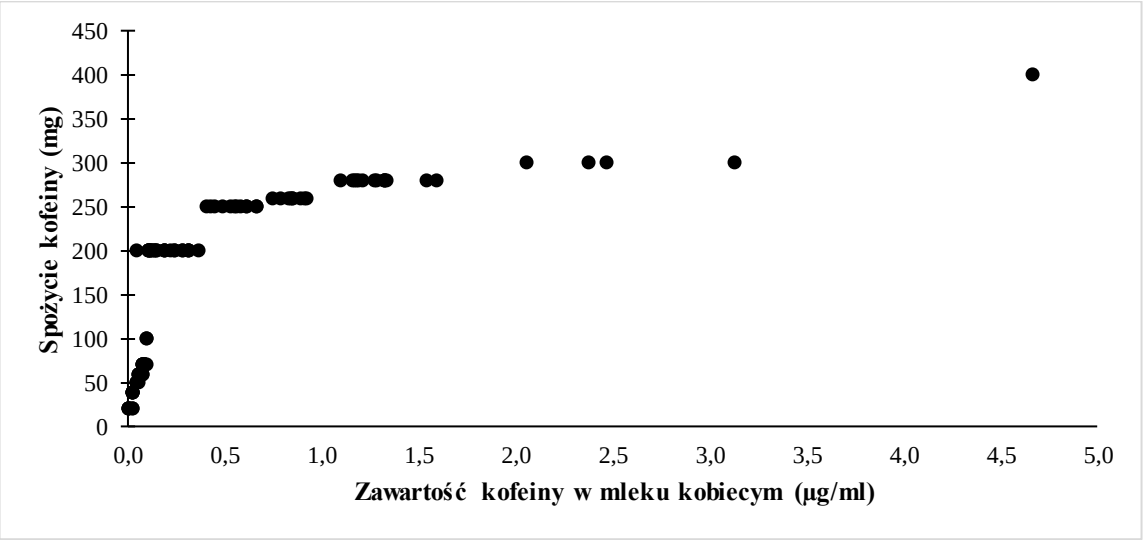
6.1.2. **Zawartość kofeiny i jej metabolitów w mleku kobiecym**

Na podstawie analizy wykazano, że kofeina albo jej metabolity występowały w każdej próbce HM. Dominującym metabolitem kofeiny była teobromina (0.399 ± 0.506 μg/ml), a w najniższym stężeniu występowała teofilina (0.026 ± 0.040 μg/ml). Pod względem miejsca zamieszkania, znacząco większe poziomy kofeiny i jej metabolitów odnotowano w HM kobiet zamieszkujących miasta (0.590 ± 0.114 μg/ml vs. 0.227 ± 0.012 μg/ml; 0.355 ± 0.098 μg/ml vs. 0.115 ± 0.055 μg/ml; 0.028 ± 0.012 μg/ml vs. 0.017 ± 0.010 μg/ml; 0.442 ± 0.088 μg/ml vs. 0.181 ± 0.062 μg/ml, kolejno dla kofeiny, paraksantyny, teofiliny i teobrominy). W odniesieniu do miejsca zamieszkania większe zawartości kofeiny i paraksantyny wykazano w HM kobiet z wykształceniem średnim ($p < 0.05$), a w przypadku teobrominy – w HM kobiet z wykształceniem wyższym ($p < 0.05$). Zawartość poszczególnych metyloksantyn w HM wahała się także w zależności od wieku kobiet. HM kobiet w wieku 34-44 lata zawierało najwyższe poziomy badanych związków, w tym ponad dwukrotnie wyższy poziom kofeiny niż w HM kobiet w wieku 26-33 lata. Ponadto, poziomy paraksantyny, teofiliny i teobrominy w HM w wieku 34-44 lat były od 1.5 do 3 razy wyższe niż w HM kobiet w wieku 18-25 lat i 26-33 lat. Największe ilości kofeiny zawierało HM kobiet w 3 i 4 okresie laktacji (0.794 ± 0.008 μg/ml) i były ponad dwukrotnie mniejsze niż w HM kobiet w 1 okresie laktacji (0.312 ± 0.167 μg/ml). Colostrum zawierało najniższe poziomy poszczególnych metabolitów kofeiny, a ich zawartość była 3 razy większa w mleku dojrzałym i późnym, w przypadku paraksantyny i teofiliny oraz 2 razy większa w przypadku teobrominy **(P1, Tabela 4)**.

6.1.3. **Spożycie kofeiny a jej zawartość w mleku kobiecym**

Na podstawie zebranych wywiadów żywieniowych oszacowano ilość spożytej kofeiny przez kobiety karmiące. Wśród spożywanych napojów i pokarmów zawierających kofeinę respondentki spożywały kawę rozpuszczalną i sypaną, herbatę (czarną, zieloną, białą, napary owocowe), czekoladę mleczną i gorzką. Zawartość spożywanej kofeiny określono na podstawie podanych przez kobiety miar domowych spożywanych produktów (np. jedna łyżeczka kawy, jedna saszetka herbaty, jedna kostka czekolady. Przybliżoną ilość spożytej kofeiny oszacowano na podstawie opinii naukowej na temat bezpieczeństwa kofeiny stworzonej przez panel EFSA (EFSA, 2015) oraz źródeł literaturowych (Malczyk i in., 2021; Mostafa, 2022). W próbkach HM zawartość kofeiny kształtowała się w szerokim przedziale: od 0 do 4.66 μg/ml.

Na **Rysunku 1** przedstawiono relację pomiędzy konsumpcją produktów bogatych w kofeinę a jej ilością w HM. Odnotowano silną zależność korelacyjną (r = 0.72) pomiędzy ilością spożytej kofeiny przez kobiety, a zawartością kofeiny w HM ($p < 0.05$).



Rysunek 1. Zależność pomiędzy spożyciem kofeiny a jej zawartością w mleku kobiecym (r = 0.72).

6.1.4. **Współzależności w występowaniu kofeiny i jej metabolitów**

Odnotowano silne zależności korelacyjne pomiędzy kofeiną a jej metabolitami. Największą liniowość odnotowano w przypadku korelacji pomiędzy kofeiną a paraksantyną (r = 0.92, $p < 0.05$). W zależności kofeina – teofilina i kofeina – teobromina, odnotowano większe rozproszenie punktów w obrębie linii prostej, co wskazuje na niższe zależności korelacyjne, jednak wciąż silne (r = 0.73 i r = 0.64) i istotne ($p < 0.05$) **(P1, Tabela 5, Rysunek 3)**.

6.2. Analiza zawartości skwalenu w mleku kobiecym (HM) i preparatach do żywienia niemowląt (IFs) (P2)

Charakterystyka kobiet karmiących biorących udział w badaniu, z uwzględnieniem analizowanych czynników, została przedstawiona w tabeli **(P2, Tabela 1)**.

6.2.1. **Zawartość skwalenu w HM względem wybranych czynników**

Spośród 100 próbek HM, skwalen oznaczono w 67 próbkach, a w 33 próbkach jego zawartość kształtowała się poniżej granicy wykrywalności wyznaczonej dla tego składnika (< 0.208 mg/100 g tłuszczu). Średnia zawartość skwalenu wynosiła 16.93 mg/100 g tłuszczu; jego zawartość była zróżnicowana i wahała się w zakresie 5.43-57.73 mg/100 g tłuszczu. W eksperymencie wykazano, że zawartość skwalenu w HM jest zależna od wieku kobiet. Odnotowano spadek zawartości skwalenu w HM wraz z wiekiem, przy czym wśród kobiet w wieku 18-25 lat zawartość tego związku kształtowała się na poziomie 24.64 mg/100 g tłuszczu, a w HM kobiet w wieku 34-42 zawartość ta była ponad dwukrotnie mniejsza (10.21 mg/100 g tłuszczu) ($p<0.05$) **(P2, Rysunek 1)**. Odnotowano tendencje malejącą w zawartości skwalenu w HM względem okresu laktacji kobiet karmiących. Podczas gdy próbki siary zawierały skwalen w ilości średnio 23.39 mg/100 g tłuszczu, to w miarę dojrzewania mleka jego zawartość malała, przez 14.91 mg/100 g tłuszczu w mleku przejściowym, do 10.71 mg/100 g tłuszczu w mleku dojrzałym ($p<0.05$) **(P2, Rysunek 2)**. Najniższe poziomy skwalenu zidentyfikowano w HM kobiet z niskim BMI, określonym jako *niedowaga* (BMI < 18.5 kg/m^2), natomiast najwyższe u kobiet z wyższym wskaźnikiem BMI, określonym jako *otyłość* (BMI > 30 kg/m^2). Odnotowano dodatnią zależność korelacyjną ($r = 0.78$) pomiędzy wskaźnikiem BMI kobiet karmiących a zawartością skwalenu w HM **(P2, Rysunek 3)**.

6.2.2. **Zawartość skwalenu w IFs**

Spośród trzech rodzajów IFs włączonych w badanie, w każdym z nich zawartość skwalenu była < 0.208 mg/100 g tłuszczu, co uniemożliwiało identyfikację tego składnika. Na podstawie danych literaturowych dotyczących zawartości cholesterolu w HM i IFs (Kamelska i in., 2011), zestawiono jego zawartości z zawartością tłuszczu i skwalenu. Pomimo stosunkowo podobnej zawartości tłuszczu pomiędzy HM (4 g/100 ml) i IFs (3.3-3.5 g/100ml), występowały znaczące różnice w zawartości cholesterolu i skwalenu. HM zawierało naturalnie występujący cholesterol i skwalen, natomiast IFs wyłącznie niewielkie ilości pochodzące z tłuszczu mlecznego (w przypadku IFs na bazie mleka krowiego) **(P2, Tabela 2)**.

6.3. Ocena profilu kwasów tłuszczowych mleka matki względem okresu laktacji i porównanie z profilem kwasów tłuszczowych preparatów do żywienia niemowląt (P3)

Charakterystyka kobiet karmiących biorących udział w badaniu, z uwzględnieniem analizowanych czynników, została przedstawiona w tabeli **(P3, Tabela S1 –** *Materiały suplementacyjne***).**

6.3.1. Profil kwasów tłuszczowych HM w odniesieniu do okresu laktacji

Spośród SFA, HM przejściowe i dojrzałe zawierało więcej kwasu kaprylowego (C8:0), kaprynowego (C10:0) i laurynowego (C12:0) niż siara, a dodatkowo HM dojrzałe więcej kwasu mirystynowego (C14:0) względem mleka przejściowego i colostrum ($p<0.05$). W przypadku MUFA, tylko zawartość kwasu erukowego (C22:1 *n*9) była zależna od okresu laktacji i zmniejszyła się o 40% w mleku dojrzałym w stosunku do siary ($p<0.05$). Siara była najbogatsza w kwas arachidonowy (C20:4 *n*6) oraz dokozaheksaenowy (C22:6 *n*3), których zawartość zmniejszała się w miarę postępu laktacji o 20% i 25% w mleku dojrzałym ($p<0.05$). Wraz z dojrzewaniem mleka odnotowano także wzrost kwasów linolowego (LA, C18:2 *n*6) i α-linolenowego (ALA, C18:3 *n*3), jednak nie był on znaczący ($p>0.05$) **(P3, Tabela 3)**.

6.3.2. Porównanie profilu kwasów tłuszczowych w HM i IFs

Odnotowano znaczące różnice w zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych pomiędzy HM a IFs. Całkowita suma średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych (MCFA) w IFs wyniosła 16.97% (IF-I) i 13.44% (IF-II), a znacząco większe zawartości odnotowano dla kwasu C8:0 i C12:0 względem HM z różnych okresów laktacji ($p<0.05$). Wystąpiły także duże różnice w stężeniu kwasu margarynowego (C17:0) oraz arachidowego (C20:0) pomiędzy IFs a HM (średnio 0.08% vs. 0.38% i średnio 0.04% vs. 0.31%). Spośród MUFA, w HM kwas oleinowy (C18:1 *n*9) stanowił około 30% udziału wszystkich kwasów tłuszczowych, z kolei w przypadku IFs były to wartości 37 i 35% dla IF-I i IF-II ($p<0.05$). IFs zawierały także większe zawartości LA i ALA. W przypadku ALA różnice w zawartości pomiędzy preparatami, ze znacząco wyższym udziałem IF-I ($p<0.05$). Odnotowano znaczące różnice w zawartości TFA i rozgałęzionych kwasów tłuszczowych (BCFA) pomiędzy HM i IFs. Podczas gdy BCFA były obecne w HM w 0.23-0.28%, to w IFs odnotowano tylko śladowe ilości tych kwasów.

W przypadku TFA, HM zawierało 5 rodzajów tych kwasów, a IFs jedynie niewielkie ilości kwasu petroselaidowego i elaidowego (C18:1 *n*6+*n*9 t) **(P3, Tabela 3)**.

6.3.3. Grupy kwasów tłuszczowych i relacje pomiędzy nimi w HM i IFs

W HM całościowy profil kwasów tłuszczowych różnił się w przypadku SFA i MUFA, z wyższą zawartością SFA w mleku przejściowym i dojrzałym oraz wyższą zawartością MUFA w siarze i mleku przejściowym ($p<0.05$). Zaobserwowano tendencję spadkową stosunku PUFA *n*6/*n*3 w stosunku do okresu laktacji, z wartości 6.84:1 w siarze do 6.55:1 w mleku dojrzałym. Znaczący spadek zaobserwowano także dla TFA, z 40% niższą zawartością w mleku przejściowym i dojrzałym w odniesieniu do siary ($p<0.05$). Sumarycznie, IFs zawierały więcej MUFA (IF-I) i PUFA, a mniej SFA, BCFA i TFA w porównaniu do HM ($p<0.05$). IF-I zawierał więcej MUFA, PUFA *n*3 i BCFA, a także mniej PUFA *n*6 w porównaniu do IF-II **(P3, Tabela 3)**.

6.3.4. Ocena relacji pomiędzy uzyskanymi wynikami – analizy wielowymiarowe

Analiza składowych głównych (PCA)

Na podstawie analizy PCA wskazano, że występowała dodatnia korelacja pomiędzy SFA (C6:0, C8:0, C12:0, C20:0) a MUFA i PUFA (C18:1 *n*9, C18:2 *n*6, C20:4 *n*6, C18:3 *n*3, C22:6 *n*3) oraz pomiędzy BCFA i TFA **(P3, Rysunek 1A)**. W **publikacji P3** na **Rysunku 1B** widoczne jest rozmieszczenie analizowanych przypadków (HM i IFs) względem siebie na płaszczyźnie głównych składowych. Wykazano, że profile kwasów tłuszczowych HM z różnych okresów laktacji różnią się względem siebie a profil kwasów tłuszczowych HM różni się od profilu kwasów tłuszczowych IFs. Na podstawie rozmieszczenia przypadków względem siebie wskazano, że najbardziej zbliżone względem siebie były IF-I i IF-II oraz mleko przejściowe i mleko dojrzałe, co wskazuje na podobieństwo profilów kwasów tłuszczowych w tych próbkach. Na podstawie przedstawionego w **P3 Rysunku 1A** można stwierdzić, że odmienny rozkład przypadku *colostrum* determinowany był zwiększoną zawartością kwasu wakcenowego (VA) i AA. Mleko przejściowe i dojrzałe wyróżniało się pod względem zawartości C14:0, C18:0, *iso*C16:0 i C14:1 *n*5, ze znaczącą różnicą wyłącznie w przypadku C14:0 w mleku dojrzałym. Rozmieszczenie wektorów wskazuje, że różnice w składzie

pomiędzy HM a IFs były determinowane w największym stopniu wyższą zawartością TFA i BCFA w HM.

Analiza skupień (CA)

W **P3** na **Rysunku 2** przedstawiono dendrogram klastrowy, wyznaczony metodą średniej ważonej par grupowych, wyznaczający na podstawie podobieństwa obiektów ich hierarchiczną strukturę grupowania, gdzie bliżej położone obiekty łączą się w klastry na podstawie ich wzajemnego podobieństwa, a kolejne poziomy dendrogramu odzwierciedlają stopniowe łączenie się klastrów w większe grupy. Na rysunku widoczny jest jeden główny klaster podzielony na dwa mniejsze klastry, w którym jeden reprezentuje wszystkie frakcje HM a drugi oba IFs. Wskazuje się na największe podobieństwo w profilu kwasów tłuszczowych pomiędzy mlekiem przejściowym i dojrzałym. Graficzna interpretacja wskazała na największe zróżnicowanie profilu kwasów tłuszczowych pomiędzy siarą a IF-I i IF-II.

6.4. Dodatkowe badania uzupełniające przygotowane do publikacji (DBU)

6.4.1. Kwasy tłuszczowe w konwencjonalnych i specjalistycznych IFs

W przedstawionej rozprawie doktorskiej rozszerzono badania and zawartością kwasów tłuszczowych w IFs poza te wykraczające z **publikacji P3**. Odnotowano różnice w zawartości poszczególnych kwasów w zależności od rodzaju IFs (**Tabela 3**). Preparat K-CM2 i S-PH wyróżniał się pod względem zawartości SFA, co było determinowane wyższą zawartością C14:0, C15:0 i C16:0 ($p<0.05$), natomiast K-GM2 – pod względem MUFA, ze znaczącą przewagą kwasu C18:1 *n*9 ($p<0.05$). Oba konwencjonalne preparaty do następnego żywienia niemowląt (K-CM2 i K-GM2) zawierały większe ilości wybranych krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) (C4:0) i MCFA (C8:0 i C10:0), niż odpowiadające im preparaty do początkowego żywienia niemowląt (K-CM1 i K-GM1). Preparaty na bazie mleka koziego (K-GM1 i K-GM2) zawierały mniejsze zawartości kwasu C16:1 *n*7 względem pozostałych IFs ($p<0.05$). Preparaty specjalistyczne cechowała mniejsza różnorodność kwasów tłuszczowych, .np. brak kwasów BCFA w S-S, S-FH, S-A, oraz mniejsza różnorodność TFA, w tym brak

sprzężonego kwasu linolowego (CLA) w trzech preparatach. Stosunek PUFA *n*6/PUFA *n*3 wahał się w zakresie od 5.50±0.27 w K-GM1 do 8.90±0.29 w S-PH. Średni stosunek PUFA *n*6/PUFA *n*3 w preparatach specjalistycznych był o dwie jednostki wyższy niż w preparatach konwencjonalnych (8.10 vs. 6.07).

6.4.2. **Ocena zgodności zawartości PUFA w IFs**

W **Tabeli 4** zestawiono procentową zawartość PUFA ogółem oraz poszczególnych PUFA (LA, ALA, AA, DHA, EPA) określoną przez producenta IFs (VL) oraz procentowe wartości tych kwasów wyznaczone eksperymentalnie (VM). Wskazane wartości procentowe podano dla siedmiu preparatów, ze względu na brak pełnych informacji na etykiecie preparatu S-FH, uniemożliwiających wykonanie niezbędnych obliczeń. Wykazano, że VM były wyższe o 20% lub więcej względem VL dla dwóch preparatów specjalistycznych – S-PH i S-S. W pierwszym z nich odnotowano o dwukrotnie wyższą zawartość AA oraz ponad 30% niższą zawartość DHA, natomiast w drugim IFS – o około 30% niższą zawartość DHA.

Tabela 3. Profil kwasów tłuszczowych w badanych konwencjonalnych i specjalistycznych IFs, %.

Kwasy tłuszczowe	K-CM1	K-CM2	K-GM1	K-GM2	S-PH	S-S	S-FH	S-A
C4:0	1.12±0.04^{c}	1.43±0.01^{b}	0.94±0.01^{d}	1.16±0.02^{c}	1.57±0.00^{a}	ND	ND	ND
C6:0	0.82±0.04^{c}	1.04±0.01^{b}	1.02±0.05^{b}	1.22±0.02^{a}	1.05±0.03^{b}	ND	ND	ND
C8:0	0.98±0.07^{d}	1.41±0.07^{b}	1.17±0.03^{c}	1.51±0.03^{b}	0.97±0.02^{d}	1.17±0.03^{c}	1.63±0.06^{a}	1.63±0.07^{a}
C10:0	0.19±0.01^{g}	2.45±0.06^{c}	4.37±0.03^{b}	5.39±0.03^{a}	2.09±0.06^{d}	1.00±0.02^{f}	1.43±0.07^{e}	1.82±0.21^{d}
C12:0	4.82±0.37^{c}	7.28±0.01^{b}	1.69±0.27^{d}	2.25±0.04^{d}	5.87±0.14^{c}	7.46±0.19^{b}	8.68±0.31^{a}	5.08±0.09^{c}
C14:0	6.28±0.10^{b}	8.08±0.05^{a}	4.28±0.27^{c}	5.13±0.14^{b}	7.51±0.43^{a}	3.09±0.29^{d}	4.44±0.03^{c}	3.95±0.60^{c}
C15:0	0.49±0.01^{b}	0.62±0.01^{a}	0.45±0.01^{b}	0.50±0.01^{b}	0.66±0.00^{a}	ND	0.04±0.00^{c}	ND
C16:0	18.30±0.38^{b}	20.68±0.12^{b}	22.89±0.55^{b}	15.63±1.67^{b}	27.99±0.73^{a}	25.94±2.70^{a}	21.81±0.55^{b}	28.67±2.73^{a}
C17:0	0.33±0.01^{b}	0.34±0.02^{b}	0.39±0.01^{a}	0.39±0.01^{a}	0.36±0.02^{b}	0.29±0.03^{b}	0.27±0.01^{b}	0.24±0.00^{c}
C18:0	6.11±0.34^{a}	5.99±0.06^{a}	6.28±0.06^{a}	5.46±0.34^{a}	6.08±0.07^{a}	3.56±0.14^{b}	3.90±0.05^{b}	3.16±0.02^{c}
C19:0	0.07±0.01^{b}	0.07±0.01^{b}	0.10±0.00^{a}	0.09±0.00^{a}	0.06±0.01^{b}	ND	ND	0.01±0.00^{c}
C20:0	0.21±0.00^{b}	0.19±0.00^{b}	0.27±0.02^{a}	0.25±0.01^{b}	0.22±0.00^{b}	0.32±0.00^{a}	0.31±0.02^{a}	0.25±0.01^{b}
C22:0	0.30±0.01^{c}	0.28±0.01^{c}	0.42±0.00^{b}	0.42±0.03^{b}	0.15±0.01^{e}	0.17±0.00^{e}	0.24±0.02^{d}	0.49±0.01^{a}
C24:0	0.15±0.00^{b}	0.12±0.00^{b}	0.22±0.03^{a}	0.17±0.00^{ab}	ND	0.14±0.00^{b}	ND	0.24±0.01^{a}
C14:1 *n*5	0.43±0.02^{b}	0.59±0.01^{a}	0.05±0.00^{c}	0.07±0.01^{c}	0.62±0.00^{a}	ND	ND	ND
C16:7 *n*7	0.89±0.02^{a}	1.06±0.00^{a}	0.51±0.00^{b}	0.50±0.00^{b}	1.06±0.03^{a}	1.20±0.05^{a}	1.02±0.03^{a}	1.13±0.11^{a}
C17:1 *n*9	0.12±0.01^{a}	0.12±0.01^{a}	0.18±0.02^{a}	0.16±0.01^{a}	0.14±0.02^{a}	0.16±0.02^{a}	0.13±0.00^{a}	0.05±0.01^{b}
C18:1 *n*9	32.32±1.82^{b}	29.43±0.32^{b}	35.58±0.47^{ab}	41.15±2.04^{a}	27.14±0.06^{b}	36.00±1.45^{ab}	34.84±0.94^{ab}	33.37±3.48^{b}
C20:1 *n*9	0.27±0.02^{b}	0.23±0.01^{b}	0.31±0.01^{a}	0.29±0.01^{ab}	0.26±0.01^{b}	0.30±0.01^{ab}	0.33±0.03^{a}	0.32±0.01^{a}
C18:2 *n*6 (LA)	14.33±1.50^{b}	12.57±0.01^{b}	11.99±0.57^{b}	11.91±0.52^{b}	10.23±0.12^{bc}	14.99±0.57^{ab}	16.92±0.08^{a}	14.83±0.17^{ab}
C18:3 *n*6	0.04±0.00^{a}	0.03±0.00^{a}	0.03±0.00^{a}	0.03±0.00^{a}	0.03±0.00^{a}	ND	0.03±0.00^{a}	0.04±0.00^{a}
C20:4 *n*6 (AA)	0.48±0.03^{a}	0.31±0.00^{b}	0.47±0.07^{a}	0.42±0.01^{ab}	0.39±0.01^{ab}	0.37±0.01^{b}	0.49±0.02^{a}	0.59±0.01^{a}
C18:3 *n*3 (ALA)	1.67±0.00^{a}	1.43±0.01^{b}	1.80±0.03^{a}	1.72±0.03^{a}	0.96±0.02^{c}	1.62±0.07^{a}	1.52±0.11^{ab}	1.54±0.02^{ab}
C20:5 *n*3 (EPA)	0.13±0.00^{a}	0.14±0.00^{a}	0.10±0.00^{b}	0.10±0.00^{b}	ND	0.10±0.00^{b}	0.09±0.01^{b}	ND
C22:6 *n*3 (DHA)	0.47±0.02^{b}	0.54±0.00^{a}	0.46±0.03^{b}	0.41±0.01^{b}	0.28±0.05^{c}	0.33±0.01^{bc}	0.43±0.01^{b}	0.56±0.03^{a}
*iso*C13:0	0.03±0.00^{b}	0.02±0.03^{b}	0.02±0.00^{b}	0.02±0.00^{b}	0.05±0.00^{a}	ND	ND	ND
*iso*C14:0	0.03±0.00^{a}	0.03±0.00^{a}	0.04±0.00^{a}	0.05±0.00^{a}	0.04±0.00^{a}	ND	ND	ND
*iso*C15:0	0.13±0.04^{a}	0.11±0.01^{a}	0.09±0.00^{a}	0.10±0.01^{a}	0.10±0.01^{a}	ND	ND	ND
*anteiso*C15:0	0.21±0.01^{a}	0.22±0.01^{a}	0.14±0.00^{a}	0.17±0.01^{a}	0.24±0.02^{a}	ND	ND	ND
*iso*C16:0	0.11±0.01^{a}	0.12±0.01^{a}	0.12±0.00^{a}	0.12±0.01^{a}	0.11±0.00^{a}	ND	ND	ND
C16:1 *t*6	0.17±0.00^{a}	0.17±0.01^{a}	0.20±0.02^{a}	0.17±0.00^{ab}	0.15±0.01^{a}	0.02±0.00^{b}	0.01±0.00^{b}	ND
C18:1 *t*6	0.11±0.01^{a}	0.09±0.00^{b}	0.09±0.00^{b}	0.06±0.00^{c}	0.10±0.00^{ab}	ND	ND	ND

C18:1 *t*9	0.07±0.00^{a}	0.08±0.00^{a}	ND	0.08±0.00^{a}	0.08±0.01^{a}	ND	ND	ND
C18:1 *t*11 (VA)	1.33±0.08^{a}	1.20±0.01^{a}	1.69±0.01^{a}	1.62±0.00^{a}	1.26±0.01^{a}	1.68±0.08^{a}	1.35±0.12^{a}	1.93±0.05^{a}
C18:2 *c*9*t*11 (RA, CLA)	0.21±0.02^{b}	0.19±0.01^{b}	0.31±0.00^{a}	0.30±0.01^{a}	0.21±0.01^{b}	ND	ND	ND
C18:2 *t*9*t*12	0.09±0.00^{a}	0.10±0.00^{a}	0.11±0.01^{a}	0.12±0.01^{a}	0.10±0.01^{a}	0.03±0.00^{b}	ND	0.05±0.00^{b}
C18:2 *t*11*t*15	0.08±0.01^{a}	0.07±0.00^{a}	0.08±0.00^{a}	0.10±0.00^{a}	0.08±0.01^{a}	0.03±0.00^{b}	0.02±0.00^{b}	0.03±0.00^{b}
SFA	40.68±2.80^{b}	50.48±0.02^{a}	44.9±0.31^{b}	40.11±1.78^{b}	55.12±0.26^{a}	43.14±2.22^{b}	42.75±0.72^{b}	45.54±3.50^{b}
MUFA	35.71±1.89^{b}	32.97±0.34^{b}	38.61±0.45^{ab}	44.10±2.01^{a}	30.81±0.06^{b}	39.36±1.44^{ab}	37.68±0.99^{ab}	36.80±3.52^{b}
PUFA	17.5±1.43^{a}	15.38±0.01^{ab}	15.35±0.65^{ab}	15.11±0.49^{b}	12.28±0.11^{c}	17.47±0.53^{a}	19.50±0.04^{a}	17.64±0.25^{a}
PUFA *n*6/PUFA *n*3	6.71±0.69^{ab}	6.29±0.04^{ab}	5.50±0.27^{c}	5.78±0.35^{b}	8.90±0.29^{a}	7.52±0.49^{a}	8.56±0.61^{a}	7.40±0.10^{a}
TFA	2.06±0.06^{b}	1.99±0.02^{b}	2.48±0.03^{a}	2.44±0.02^{a}	1.98±0.02^{b}	1.76±0.08^{b}	1.38±0.12^{c}	2.01±0.06^{b}
BCFA	0.50±0.04^{a}	0.50±0.01^{a}	0.41±0.01^{a}	0.45±0.02^{a}	0.54±0.00^{a}	ND	ND	ND

Skróty: IF – preparaty do żywienia niemowląt, SFA – nasycone kwasy tłuszczowe, MUFA – jednonienasycone kwasy tłuszczowe, PUFA – wielonienasycone kwasy tłuszczowe, TFA – kwasy tłuszczowe *trans*, BCFA – rozgałęzione kwasy tłuszczowe, ND – nie wykryto. Średnie wartości w wierszach oznaczone różnymi literami (a, b, c, d, e, f, g) różnią się istotnie przy $p<0.05$ (ANOVA, test Tukey'a). Średnie wartości oznaczone a, b, c, d, e, f, g określają różnice pomiędzy składem kwasów tłuszczowych w badanych IFs.

Tabela 4. Ocena zgodności zawartości PUFA ogółem oraz poszczególnych PUFA w IFs.

IFs	PUFA		LA		ALA		AA		DHA		EPA	
	VL	VM	VL	VM	VL	VM	VL	VM	VL	VM	VL	VM
K-CM1	15.63	17.50	14.00	14.33	1.72	1.67	0.52	0.48	0.52	0.47	0.11	0.13
K-CM2	16.13	15.38	13.71	12.57	1.68	1.43	0.29	0.31	0.55	0.54	0.12	0.14
K-GM1	15.92	15.35	12.01	11.88	1.59	1.80	0.48	0.47	0.48	0.46	BD	-
K-GM2	15.92	15.11	12.01	11.91	1.59	1.72	0.48	0.42	0.45	0.41	BD	-
S-PH	11.76	12.28	10.91	10.23	1.09	0.96	0.20	**0.39**	0.44	**0.28**	BD	-
S-S	18.18	17.47	14.85	14.99	1.66	1.62	BD	-	0.48	**0.33**	BD	-
S-A	16.18	17.64	13.09	14.83	1.32	1.54	0.50	0.59	0.50	0.56	BD	-

Skróty: IF – preparaty do żywienia niemowląt, PUFA – wielonienasycone kwasy tłuszczowe, LA – kwas linolowy, ALA – kwas α – linolenowy, AA – kwas arachidonowy, DHA – kwas dokozaheksaenowy, EPA – kwas eikozapentaenowy, VL – % kwasów tłuszczowych zadeklarowany przez producenta IFs, VM - % kwasów tłuszczowych oznaczonych w badaniach analitycznych, BD – brak danych. Wartości pogrubione oznaczają różnice 20 % lub większe w oznaczonych stężeniach kwasów tłuszczowych w stosunku d o tych podanych przez producenta.

6.4.3. **Wskaźniki jakości lipidów badanych IFs**

Na podstawie zawartości kwasów tłuszczowych w IFs, oszacowano w nich zawartość poszczególnych wskaźników jakości lipidów: DFA, OFA, AI, TI i H/H **(Tabela 5)**. Preparaty K-GM1 i K-GM2 posiadały najwyższy wskaźnik DFA i najniższy OFA. Preparat S-PH cechował się najwyższym wskaźnikiem AI i TI ($p<0.05$). Odnotowano duże wahania wskaźnika H/H – od 0.93 w S-PH do 2.38 w K-GM2.

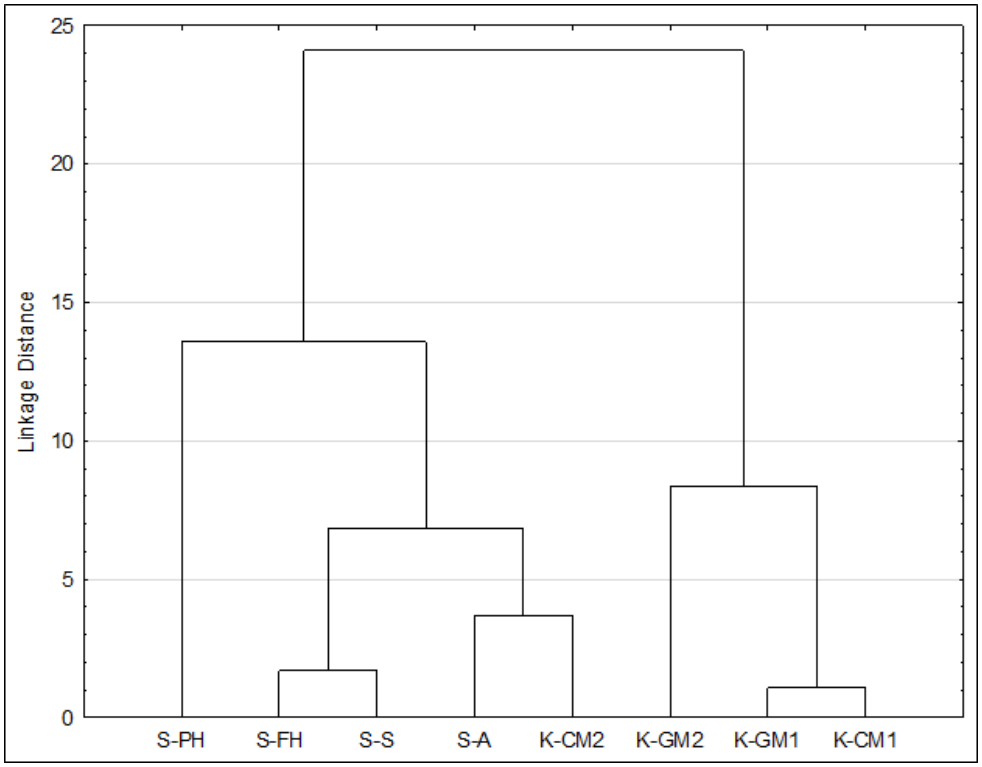
Tabela 5. Wskaźniki jakości lipidów oszacowane dla badanych konwencjonalnych i specjalistycznych IFs.

Wskaźniki jakości lipidów	K-CM1	K-CM2	K-GM1	K-GM2	S-PH	S-S	S-FH	S-A
DFA	59.32^{a}	54.34^{b}	60.24^{a}	64.67^{a}	49.17^{c}	60.39^{a}	61.08^{a}	57.6^{b}
OFA	29.4b^{c}	36.04^{b}	28.86^{bc}	23.01^{c}	41.37^{a}	36.49^{b}	34.93^{b}	37.7^{b}
AI	0.91^{b}	1.25^{ab}	0.77^{c}	0.65^{c}	1.48^{a}	0.81^{bc}	0.84^{bc}	0.91^{b}
TI	0.95^{b}	1.17^{b}	1.01^{b}	0.74^{c}	1.68^{a}	0.97^{b}	0.89^{bc}	1.10^{b}
H/H	1.64^{b}	1.21^{b}	1.71^{b}	2.38^{a}	0.93^{c}	1.44^{b}	1.53^{b}	1.32^{b}

Średnie wartości w wierszach oznaczone różnymi literami (a, b, c) różnią się istotnie przy $p<0.05$ (ANOVA, test Tukey'a). Średnie wartości oznaczone a, b, c określają różnice pomiędzy wskaźnikami jakości lipidów w badanych IFs.

Na dendrogramie hierarchicznej analizy skupień przedstawiono zmienność badanych IFs na podstawie oceny ich wskaźników jakości lipidów **(Rysunek 2)**. Na rysunku wyraźnie widać podział na dwa skupiska, w którym pierwszy gromadzi IFs specjalistyczne (S-PH, S-FH, S-S i S-A) wraz z jednym IF konwencjonalnym (K-CM2), a drugi skupia trzy IFs konwencjonalne (K-GM2, K-GM1 i K-CM1). Analiza wskazuje, że najbardziej podobne względem siebie są IFs S-PH i S-FH, a następnie IFs S-S i S-A, wyraźnie tworzące podklaster zawierający preparaty specjalistyczne (podklaster *S*). W stosunku do badanych zmiennych IF K-CM2 ma cechy bardziej zbliżone do grupy preparatów specjalistycznych. W drugim podklastrze, skupiającym preparaty konwencjonalne (podklaster *K*), wskazuje się na podobieństwo pomiędzy IFs K-GM2 i K-GM1, a w późniejszej odległości łączą się one z K-CM1. Oba podklastry łączą się w jeden wspólny klaster przy wyższych odległościach, co wskazuje badane IFs występujące w poszczególnych klastrach są od siebie różne pod kątem badanych zmiennych.

,



Rysunek 2. Dendrogram hierarchicznej analizy skupień dla wskaźników jakości lipidów w badanych IFs.

6.5. Zawartość składników mineralnych w preparatach do żywienia niemowląt i w mleku kobiecym (P4)

6.5.1. Zawartość składników mineralnych w IFs względem przeznaczenia żywieniowego

Średnia zawartość makroelementów (Ca, Mg, Na, K, P) i mikroelementów (Fe, Zn, Cu, Mn) w IFs była zmienna w zależności od rodzaju IF. Spośród makroelementów odnotowano najwyższe stężenia K i Ca, a spośród mikroelementów – Fe i Zn. W pojedynczych przypadkach odnotowano znaczące różnice w zawartości składników mineralnych względem rodzaju preparatu (IFs do żywienia początkowego vs. IFs do żywienia następnego). IF do początkowego żywienia niemowląt C-B1 zawierał większą ilość Mg względem pozostałych IFs do początkowego i względem IFs do następnego żywienia niemowląt, a IF C-D1 więcej K niż pozostałe IFs do początkowego i dwa spośród IFs do następnego żywienia niemowląt (C-A2 i C-B2) ($p<0.05$). Największą zmiennością charakteryzowała się zawartość Fe, która w IFs początkowych wahała się w zakresie od 2.94 ± 0.03 mg/100g proszku do 6.50 ± 0.14 mg/100

g proszku, a w IFs następnych od 2.98 ± 0.31 mg/100g proszku do 6.52 ± 0.36 mg/100g proszku. Odnotowano także różnice w zawartości wybranych składników mineralnych względem przeznaczenia żywieniowego preparatów (konwencjonalne vs. specjalistyczne). IF S1 zawierał więcej Ca, Mg, Mn, i wraz z IF S4 więcej Zn, względem pozostałych IFs specjalistycznych i względem wszystkich IFs konwencjonalnych ($p<0.05$). Z kolei, w IF S6 odnotowano większe zawartości Na i K niż w pozostałych IFs specjalistycznych i wszystkich IFs konwencjonalnych ($p<0.05$) **(P4, Tabela 2)**.

6.5.2. Składniki mineralne w HM a okres laktacji. Porównanie składników mineralnych w HM i IFs

HM zawierało najwyższą zawartość K i Ca spośród makroelementów oraz Zn i Fe spośród mikroelementów. Zawartość składników mineralnych w HM była zróżnicowana względem okresu laktacji. Zawartość Na, P, Fe i Zn była większa w siarze, a zawartość Mn w mleku przejściowym i dojrzałym ($p<0.05$). Największe różnice odnotowano dla Na i Zn, których w siarze było o 35% i 50% więcej niż w mleku przejściowym i dojrzałym.

Na podstawie badań wykazano, że każdy rodzaj IFs, bez względu na rodzaj i przeznaczenie żywieniowe, jest bogatszym źródłem Ca, K, P, Fe, Zn i Mn w porównaniu do HM z różnych okresów laktacji ($p<0.05$). Zawartość Ca w IFs była nawet o ponad 60% większa niż w HM, a zawartość P była nawet ponad 3 razy mniejsza niż w HM przejściowym i dojrzałym. W odniesieniu do specjalistycznych IFs, siara zawierała około 5 razy mniej Mn ($p<0.05$) **(P4, Tabela 3)**.

6.5.3. Ocena zgodności zawartości składników mineralnych w IFs

Analizując zgodność zawartości poszczególnych składników mineralnych względem wartości zadeklarowanych przez producenta oraz względem wymagań Komisji Europejskiej (Rozporządzenie Delegowane Komisji (UE) 2016/128), odnotowano pewne odchylenia od określonych norm. Spośród konwencjonalnych IFs, IF C-B1 przekraczał o 5% zalecaną zawartość Fe, a IF C-C1 posiadał o 14% niższą zawartość Na względem dolnego zakresu określonego wymaganiami (Rozporządzenie Delegowane Komisji (UE) 2016/128). Wśród IFs specjalistycznych odnotowano więcej odchyleń - w S5 zawartość Cu była o 40% większa względem wymagań. Niewielkie odchylenia odnotowano także dla Ca w S1 i K w S6.

Względem zgodności oznaczonych wartości składników mineralnych do wartości zadeklarowanych przez producenta, w konwencjonalnych IFs największe odchylenia

odnotowano dla Fe. IFs C-A1 i C-B1 zawierały o 40 i 70% więcej Fe względem wartości podanych na etykiecie, a IFs C-B2 i C-C2 o 50 i 20% mniej Fe względem wartości zadeklarowanych przez producenta. W IFs specjalistycznych największe odchylenia względem wartości umieszczonych na etykiecie odnotowano względem zawartości Mg. W IF S6 jego zawartość była o 30% mniejsza a w S1 25% większa niż wartości zadeklarowane przez producentów. Ponadto, IF S6 zawierał o 50% więcej K w stosunku do wartości na etykiecie **(P4, Tabela 5 i Tabela 6)**.

6.5.4. **Pokrycie zapotrzebowania na składniki mineralne po spożyciu IFs i HM**

Do obliczenia dziennego spożycia każdego z IF i HM przez niemowlęta w wieku 1-6 miesięcy i 7-11 wykorzystano informacje dotyczących dawkowania IF podane na etykietach poszczególnych IFs i bazując na zaleceniach PTGHiŻDz (Szajewska i in., 2021) **(P4, Tabela S1** – *Materiały suplementacyjne***)**. Obliczone, na podstawie dziennego spożycia IFs/HM oraz oznaczonych składników mineralnych, wartości szacowanego dziennego spożycia (EDI) zestawiono w publikacji **P4** w **Tabeli S2** (*Materiały suplementacyjne*), wykorzystując polskie normy dotyczące spożycia poszczególnych składników mineralnych przez niemowlęta w wieku 0-6 miesięcy i 7-11 miesięcy **(P4, Tabela S3 –** *Materiały suplementacyjne***)**.

Wykazano, że oszacowane pokrycie zapotrzebowania na składniki mineralne w IFs do początkowego żywienia niemowląt przekraczało wartości określone w Normach żywienia dla populacji Polski. Pokrycie zapotrzebowania po spożyciu dziennej porcji IFs C-A1 i C-B1 przekraczało ustalone normy na Fe nawet o 25-krotnie, a w C-D1 na Mn nawet 18-krotnie. Po spożyciu całodziennej porcji każdego z IFs do następnego żywienia niemowląt (z wyjątkiem C-D2) odnotowano przekroczenie zalecanego dziennego spożycia na Ca, Zn, Cu i P, przy czym największe odchylenia odnotowano dla Ca (nawet o 126%). IFs do następnego żywienia niemowląt w najmniejszym stopniu pokrywały zapotrzebowanie na Mg (od 30 do 50%), Na (31-41%) i Mn (5-6%). W specjalistycznych IFs odnotowano największe wahania w pokryciu zapotrzebowania na poszczególne składniki mineralne. Dla Mg pokrycie zapotrzebowania oscylowało pomiędzy 22% po spożyciu S1 do 180% po spożyciu S3. Podobnie jak w konwencjonalnych IFs do początkowego żywienia niemowląt, po spożyciu dziennej porcji IFs specjalistycznych, pokrycie zapotrzebowania na Fe było przekroczone nawet 24-krotnie (w S5) **(P4, Rysunek 1 A-H)**.

6.5.5. **Ocena relacji pomiędzy uzyskanymi wynikami – analizy wielowymiarowe**

Struktura zmienności zawartości składników mineralnych w HM i IFs została wyjaśniona z zastosowaniem PCA. Dystrybucja przypadków *colostrum (C)* oraz *mleko przejściowe/mleko dojrzałe (TM/MM)* była wyraźnie oddalona od wszystkich analizowanych IFs. IFs S1 i S6 wyróżniały się wyższą zawartością Na, K i Mn w porównaniu do innych IFs, co graficznie pokazuje ich rozmieszczenie po przeciwnej stronie wykresu w odniesieniu do innych specjalistycznych IFs. Najbardziej skupione względem siebie były przypadki reprezentujące IFs konwencjonalne do początkowego i następnego żywienia niemowląt, co wskazuje w tych badaniach na podobny profil składników mineralnych tych IFs **(P4, Rysunek 2 A-B)**.

7. Dyskusja wyników

7.1. Metyloksantyny w mleku kobiecym

Prawidłowe żywienie niemowląt ma kluczowe znaczenie dla ich prawidłowego rozwoju fizycznego i psychicznego. Oprócz korzystnych składników bioaktywnych, do HM przedostają się także związki, które mogą wywierać potencjalnie negatywny wpływ na zdrowie i rozwój dziecka, m.in. kofeina oraz pozostałości pestycydów chloroorganicznych (Calvaresi i in., 2016, Witczak i in., 2021). W **publikacji P1** wykazano, że mleko matek zawierało metyloksantny – kofeinę i jej metabolity (paraksantynę, teofilinę i teobrominę). Kofeina, biologicznie aktywny składnik kawy, wykazuje działanie pobudzające oraz ma pozytywny wpływ na aspekt zdrowotny, poprzez działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne (Makiso i in., 2023). Z drugiej strony, spożywając ją w nadmiarze można doświadczyć negatywnego jej wpływu na zdrowie (wzrost ciśnienia krwi, tachykardię, choroby sercowo-naczyniowe) (Planning Committee for a Workshop on Potential Health Hazards Associated with Consumption of Caffeine in Food and Dietary Supplements, 2014). W ostatnim czasie nie ukazały się prace obejmujące analizę poziomu kofeiny i jej metabolitów w HM, a ostatnie badania w tym zakresie zostały przedstawione w ubiegłym wieku (Tyrala i Dodson, 1979; Resman i in., 1977), jednak nie ma aktualnie innych badan obejmujących analizę metyloksantyn w grupie kobiet karmiących z Polski. Spożycie kofeiny podczas karmienia piersią jest tematem wzbudzającym zainteresowanie zarówno matek jak i osób zawodowo związanych z opieką and noworodkami i niemowlętami (Błaszczyk i in., 2024). Kofeina ma zdolność przenikania przez barierę krew-mózg i łożysko, a także przenika do płynu owodniowego oraz mleka (Tomaszewski i in., 2016). W związku ze zmniejszoną aktywnością cytochromu P450 u małych dzieci (odpowiedzialnego za metabolizm kofeiny) oraz ze znacząco wyższym okresem półtrwania kofeiny u noworodków (ok. 80 godzin) w porównaniu do osób dorosłych (2.5-5 godzin), istnieje ryzyko narażenia na toksyczne jej działanie przy nadużywaniu przez matkę karmiącą (Błaszczyk i in., 2024). Głównym celem w **publikacji P1** była ocena zawartości metyloksantyn w HM w zależności od wyborów żywieniowych determinowanych czynnikami socjodemograficznymi (wiekiem, miejscem zamieszkania i poziomem wykształcenia) oraz okresem laktacji. Wskazuje się, że urbanizacja przyczynia się do zmian wzorca spożycia żywności, głównie ze względu na odmienny styl życia; np. diety matek karmiących mieszkających w miastach są bardziej zróżnicowane (Błaszczyk i in., 2024; Shumayla i in., 2022). Około 80% populacji świata

spożywa kawę każdego dnia (Samoggia i in., 2021). W miastach bardziej popularyzuje się picie kawy, a związane jest to głównie z szybszym tempem życia w mieście, łatwiejszą dostępnością kawiarni i punktów gastronomicznych oraz szeroko rozwiniętą kulturą picia kawy (Ferreira i in., 2021; Viartasiwi i Trihartono, 2020). Tendencję tę zaobserwowano wśród kobiet karmiących (p=0.0002), gdzie prawie 60% mieszkanek miast spożywało kawę częściej niż 2 razy dziennie, natomiast połowa mieszkanek obszarów wiejskich spożywała kawę tylko 1 raz dziennie. W obszarach miejskich kawiarnie coraz częściej przyjmują szerszy zakres ról, poza przestrzenią konsumpcji stanowią także miejsce spotkań, nawiązywania kontaktów i budowania społeczności (Ferreira i in., 2021). Ponadto, wskazuje się, że mieszkańcy obszarów miejskich są bardziej mobilni, mniej związani z miejscami, w których mieszkają mając przy tym większą potrzebę więzi społecznych (Ferreira i in., 2021). W kontekście kobiet karmiących, popularyzacja picia kawy w mieście może być także uzasadniona większą otwartością przestrzeni publicznej na karmienie piersią – zwłaszcza kawiarni i restauracji – identyfikujących się jako "Breastfeeding Welcome" (Grant i in., 2022).

Spośród metabolitów kofeiny występujących w HM w największej ilości oznaczono teobrominę. Stanowi ona główny związek aktywny w czekoladzie i w przeciwieństwie do kofeiny na słabszy wpływ na ośrodkowy układ nerwowy (Nehlig, 2013). Pomimo że głównym metabolitem kofeiny jest paraksantyna (Szlapinski i in., 2023), większa ilość teobrominy może być uwarunkowana spożyciem czekolady przez kobiety karmiące. Podwyższona ilość czekolady w diecie karmiącej może powodować drażliwość u dziecka (Drugs and Lactation Database, 2024). Większa zawartość teobrominy z mleku kobiet zamieszkujących obszary miejskie może być determinowana większą dostępnością produktów z kakao, obejmującą szeroką ofertę lokalów oferujących przekąski i desery czekoladowe, atrakcyjne napoje czekoladowe, bądź kawę z dodatkiem czekolady (Ahmad i in., 2022; Ferreira i in., 2021, Pozos-Brewer, 2015), co przekładało się na częstszą konsumpcję czekolady wśród mieszkanek miast (p=0.00079).

Według danych literaturowych, spożycie kofeiny jest zależne od wieku. Verster i Koenig (2018) wykazali, że osoby po 30. roku życia spożywają większe ilości kawy. W niniejszych badaniach również wykazano, że w mleku kobiet powyżej 34 roku życia odnotowano największe ilości kofeiny i jej metabolitów i wiązało się to z większą ilością konsumowanych kaw w ciągu dnia (więcej niż 2 razy dziennie) (p=0.00157). Uzasadnienie związku pomiędzy wiekiem a spożyciem kawy można rozpatrywać w silniej utrwalonych nawykach żywieniowych dnia codziennego kobiet po 34 roku życia, które mogą być determinowane m.in. dłuższym stażem pracy i funkcjonowaniem w trybie wymagającym wysokiej efektywności,

kiedy często kawa spożywana jest jako wsparcie przeciwko nadmiernemu zmęczeniu (Hirani i in., 2024). Kofeina blokuje receptory adenozynowe (A1 i A2A) w ośrodkowym układzie nerwowym, przeciwdziałając przy tym uczuciu senności (Planning Committee for a Workshop on Potential Health Hazards Associated with Consumption of Caffeine in Food and Dietary Supplements i in., 2014). Liberman i in. (2019) podaje, że młodzi dorośli (20-24 lata) spożywają znacznie mniejsze ilości kofeiny niż osoby starsze. Powiązuje się to ze wzrostem wymagań życiowych, w tym obowiązków zawodowych, rodzinnych i wyższą ekspozycją na czynniki stresowe (Liberman i in., 2019). Niemniej jednak, ze względu na rosnącą popularność produktów zawierających kofeinę, niezbędne są dalsze obserwacje dotyczące jej spożycia przez młodsze populacje.

Spożycie kofeiny może pośrednio zależeć od poziomu wykształcenia; wykonywany zawód może determinować ilość spożycia napojów zawierających kofeinę. Wykonujący zawody prawnicze bądź zarządcze spożywają większe ilości kofeiny ze względu na charakter pracy i konieczność wzmożonego wysiłku umysłowego (Liberman i in., 2019). Wskazuje się także, że większe ilości kofeiny są spożywane przez pracowników biurowych, ze względu na łatwą kofeiny i dogodne warunki jej spożycia (Liberman i in., 2019). Należy podkreślić, że z każdym rokiem rośnie liczba matek, które chcą kontynuować pracę po urodzeniu dziecka, a coraz częściej popularyzowana jest koncepcja *równowagi między życiem zawodowym a prywatnym* (Yan, 2022). Według Amer i in. (2023), to w miejscu pracy spożywa się największe ilości kawy, w związku z czym kobiety wcześnie powracające do pracy mogą spożywać większe ilości kofeiny. Podczas pracy, kawa jest chętnie spożywana w celu poprawy sprawności fizycznej i umysłowej (funkcjonalne korzyści picia kawy) oraz celem nawiązywania kontaktów ze współpracownikami, ułatwiając integrację społeczną (Czarniecka-Skubina i in., 2021). Z drugiej strony, osoby wykształcone mogą posiadać wyższą świadomość żywieniową (Sandri i in., 2024) oraz mieć lepszy dostęp do informacji dotyczących potencjalnych skutków ubocznych nadmiernego spożycia kofeiny, a tym samym ograniczać jej spożycie. W przedstawionych badaniach poziom wykształcenia determinował ilość spożywanej kawy dziennie ($p=0.00026$), której większe ilości spożywały kobiety z wykształceniem średnim.

Wskazano, że wybory żywieniowe dotyczące spożycia kofeiny były zależne od okresu laktacji, a w miarę dojrzewania mleka rosła a nim zawartość kofeiny i jej metabolitów ($p<0.05$). Okres laktacji determinował częstotliwość spożycia kawy ($p=0.0012$), herbaty ($p=0.0191$) oraz czekolady ($p=0.0492$). Siara stanowi pierwszy pokarm noworodka, ma unikalny skład i nazywana jest “mlekiem odpornościowym” (Munblit i in., 2016). Wskazuje się, że

bezpośrednio po porodzie kobiety zwracają większą uwagę na jakość spożywanych posiłków i przestrzeganie zaleceń dietetycznych (Olagnero i in., 2018), co w tym przypadku może przekładać się na zmniejszoną konsumpcję produktów zawierających kofeinę. Znaczący wzrost zawartości kofeiny w mleku przejściowym i dojrzałym można umotywować większą chęcią spożywania kofeiny jako środka przeciwdziałającemu zmęczeniu. Kobiety po porodzie są narażone na zwiększone ryzyko występowania depresji, tzw. depresji poporodowej. Niektóre badania wskazują na występowanie korelacji pomiędzy umiarkowanym spożyciem kofeiny a zmniejszonym ryzykiem depresji, jednak takie badania na kobietach karmiących są w dalszym ciągu ograniczone (Wang i in., 2023). Kofeina może wpływać na poziom neuroprzekaźników – dopaminy, noradrenaliny czy serotoniny, poprawiając przy tym nastrój i zmniejszając uczucie zmęczenia. Nie mniej jednak, w badaniu Wang i in. (2023) wskazano, że kobiety które karmią dłużej (około 6 miesięcy) częściej sięgają po kawę w kontekście ochronnego działania kofeiny w depresji. Obserwuje się także zależność pomiędzy czasem karmienia piersią a ilością spożywanej kofeiny – im kobiety dłużej karmią piersią, tym więcej spożywają kofeiny (Lisowska i in., 2023).

Mediana dziennego spożycia kofeiny przez kobiety karmiące wyniosła 200 mg, natomiast w wynikach przedstawionych przez Lisowską i in. (2023) - 193.7 mg. Trzeba rozważyć niedoszacowanie obliczonych wartości spożytej kofeiny w metodzie bieżącego notowania, wynikającej m.in. z podawania mniejszych porcji spożytej kofeiny niż porcje rzeczywiste oraz braku dostatecznej świadomości na temat źródeł kofeiny w produktach żywnościowych (m.in. w słodyczach i niektórych napojach, np. typu cola) (Malczyk i in., 2021). Głównym źródłem kofeiny w diecie Polek były kawa oraz czarna herbata, natomiast całkowicie wykluczone zostały napoje energetyczne, co jest zgodne z wynikami przedstawionymi przez Lisowską i in. (2023). Zgodnie z zaleceniami WHO, rekomendowane spożycie kofeiny podczas karmienia piersią wynosi 300 mg, co przekłada się na około 2-3 porcje kawy (Verster i Koenig, 2018). Największa zawartość kofeiny w mleku kobiet wynosiła około ponad 4 µg/ml, jednak u ponad 80% kobiet jej stężenie nie przekraczało 1µg/ml. W tym badaniu nie nakładano na kobiety obowiązku poboru mleka w ściśle określonych warunkach czasowych, ale w momencie potrzeby jedzenia wykazanej przez dziecko. Nie monitorowano również czasu spożycia żywności i napojów zawierających kofeinę, a zawartość kofeiny oceniano wyłącznie na podstawie całodziennego spożycia. Podaje się, że dostarczając 35–336 mg kofeiny, niemowlę spożywa ją wraz z mlekiem w ilości około 1.3–3.1 mg. Zgodnie z literaturą, drażliwość i problemy ze snem obserwowano u niemowląt, których matki spożywały około 10 filiżanek kawy dziennie (Temple i in., 2017). Żadna z kobiet biorących udział w tym badaniu nie wypiła

takiej ilości kawy, jednak kilka karmiących kobiet (n=5.5%) spożywało większe całkowite dawki kofeiny dziennie — od ponad 300 mg/dzień do nawet 400 mg/dzień — niż zalecane przez WHO (do 250–300 mg/dzień).

7.2. Skwalen w mleku kobiecym

W **publikacji P2** skupiono się na identyfikacji skwalenu w HM i komercyjnych IFs dostępnych na rynku. Skwalen jest lipidowym składnikiem, który nie stanowi szerokiego przedmiotu badan and mlekiem matki. Pomimo niewielkich ilości tego składnika w HM (2-6% stężenia cholesterolu) (Kallio i in., 1989), składnik ten wykazuje silne działanie przeciwzapalne i antyoksydacyjne (Micera i in., 2020). Nadrzędnym celem w **publikacji P2** była ocena zawartości skwalenu w HM względem wieku karmiących, wskaźnika BMI i okresu laktacji. Punktem wyjścia w rozważaniach dotyczących zależności pomiędzy wiekiem kobiet karmiących a zawartością skwalenu w HM był naturalny ubytek skwalenu z organizmu człowieka wraz z wiekiem. Do 25 roku życia składnik ten jest produkowany w największych ilościach w organizmie. Wraz ze zmniejszaniem się skwalenu w organizmie rośnie narażenie organizmu na stres oksydacyjny (Du Preez, 2007). Noworodki posiadają najwyższy poziom skwalenu we krwi, a pomiędzy 30 a 40 rokiem życia zasoby skwalenu w organizmie ludzkim znacząco się zmniejszają (Tjan, 2001). W niniejszej pracy wskazano, że wiek kobiet determinował skład HM pod względem zawartości skwalenu, z największą jego ilością w mleku kobiet w wieku 18-25 lat i ponad dwa razy niższą w mleku kobiet 34-42 lata ($p<0.05$). W dostępnej literaturze nie ma jednoznacznych badan wskazujących na zależność pomiędzy zawartością skwalenu w krwi matki i w HM, jednak wskazuje się na występowanie zmian w jego ilości względem okresu ciąży (spadek pomiędzy pierwszym a trzecim trymestrem) (Laitinen i in., 2008). Ponadto, wraz z wiekiem zmniejszeniu ulega aktywność enzymów szlaku kwasu mewalonowego, podczas którego w reakcji biosyntezy cholesterolu, powstaje skwalen (Gohil i in., 2019; Tonini i in., 2020). Ze względu na ograniczone badania dotyczące zależności pomiędzy zawartością skwalenu w HM względem wieku, korzystne byłoby wykonanie podobnych badań na szerszej grupie respondentów, w celu uzyskania większej reprezentatywności wyników.

Zgodnie z dostępną literaturą, wskazuje się, że stężenie skwalenu w HM jest zależne od okresu laktacji. Zaobserwowano dwukrotny spadek skwalenu w mleku dojrzałym w odniesieniu do siary ($p<0.05$). Kallio i in. (1989) w badaniach wykazali, że stężenie skwalenu rosło między 2 a 6 miesiącem laktacji (z 9.4 do 12.0 μmol/l), natomiast między 6 a 9 miesiącem

laktacji zmalało (z 12.0 do 11.0 μmol/l). Z kolei Laitinen i in. (2008) podaje, że stężenie skwalenu w HM zmalało między pierwszym a trzecim trymestrem ciąży (o ponad 3 jednostki), a po porodzie znów wzrosło. U dzieci badanych matek oszacowano stężenie skwalenu w surowicy i wykazano, że nastąpił spadek jego poziomu między 1 a 6 miesiącem życia (z 36.5 do 27.2 10^2 mmol/mmol cholesterolu). Spadek zawartości skwalenu w HM w miarę dojrzewania mleka może być uzasadniony fizjologicznie zmieniającym się składem. Siara nazywana jest mlekiem odpornościowym, ze względu na bogactwo składników bioaktywnych i czynników stymulujących układ immunologiczny (m.in. oligosacharydów HM, immuboglobulin, laktoferyny, leukocytów) niemowlęcia, których stężenie w miarę dojrzewania HM maleje (Garofoli i in., 2023). Skwalen jest silnym antyoksydantem, chroniącym komórki przed stresem oksydacyjnym, a w literaturze wskazuje się, że stymuluje również pracę układu odpornościowego (Lozano-Grande i in., 2018). Jego większa zwartość w siarze może być związana z fizjologicznie wyższym stężeniem związków bioaktywnych w siarze, jednak badania nad zawartością skwalenu w HM są ograniczone i konieczne jest zbadanie kolejnych zależności warunkujących jego występowanie. Innej zależności można upatrywać się w kontekście zawartości cholesterolu w HM, którego zawartość zmniejsza się w miarę dojrzewania mleka, z 200 mg/l w siarze do około 120 mg/l w mleku dojrzałym. Największy spadek zawartości cholesterolu obserwuje się w pierwszym miesiącu laktacji a następnie ma on tendencję do stabilizacji (Yang i in., 2022a). Prekursory cholesterolu w surowicy wykazują dodatnią korelację z szybkością syntezy cholesterolu, jednak w przypadku skwalenu związek ten jest kontrowersyjny (Rajaratnam i in., 2000). Wyższy poziom skwalenu w siarze może pełnić funkcję ochronną w pierwszych dniach życia dziecka, a jego obniżanie się w miarę dojrzewania HM może być fizjologiczne, związane z naturalnym spadkiem stężenia niektórych składników. Ekspozycja na wysokie dawki cholesterolu w okresie noworodkowym sprzyja skutecznej regulacji poziomu cholesterolu w późniejszym życiu dziecka (Donda i Maheshwari, 2022). Ponadto, zawartość tłuszczu w HM zmniejsza się wraz z postępem laktacji, następuje wzrost średnicy kuleczek tłuszczowych przy jednoczesnym spadku liczby kuleczek. W konsekwencji, zmniejszeniu całkowitej powierzchni kuleczek tłuszczowych towarzyszy zmniejszony poziom cholesterolu w HM (całkowita ilość cholesterolu w HM zależy od sumarycznej powierzchni kuleczek tłuszczowych) (Yang i in., 2022a). Należy podkreślić, że skwalen naturalnie występuje w produktach żywnościowych, takich jak olej z wątroby rekina, oliwa z oliwek czy amarantus (Popa i in., 2015), i jego zawartość w diecie może wpływać na jego poziom w HM (Relas i in., 2000), jednak w diecie kobiet karmiących nie występowały

wskazane produkty, dlatego nie rozważano analizy związku jego zawartości w powiązaniu do diety.

W ostatnim etapie **publikacji P2** zawartość skwalenu analizowano względem wskaźnika BMI badanych kobiet, odnotowując dodatnią korelację pomiędzy omawianymi wskaźnikami (r=0.74). Zależność pomiędzy zawartością skwalenu w HM a BMI kobiet nie jest jednoznaczna i ze względu na szereg złożonych mechanizmów metabolicznych i indywidualnych, do tej pory w literaturze nie analizowano wskazanej relacji. Wskazuje się, że kobiety otyłe mają wyższą całkowitą zawartość tłuszczu w mleku (Ross i in., 2024), co może także sprzyjać wyższej koncentracji skwalenu jako składnika frakcji lipidowej. Tkanka tłuszczowa syntetyzuje i magazynuje duże ilości skwalenu, a jego transport odbywa się głównie za pośrednictwem lipoprotein bogatych w trójglicerydy (chylomikrony, lipoproteiny o bardzo małej gęstości, VLDL). W związku z tym, kobiety z wyższym BMI i poziomem tkanki tłuszczowej i wyższym poziomem krążących lipoprotein, mogą posiadać większe zawartości skwalenu we krwi i w mleku. Szybkie zmiany składu ciała, determinowane nadwagą i otyłością, mają wpływ na metabolizm cholesterolu. Miettinen i in. (2014) wskazali na zwiększoną syntezę cholesterolu u kobiet otyłych z BMI > 30 kg/m^2. Dlatego u osób z nadmierną masą ciała dystrybucja skwalenu jest większa, co może generować potrzebę większego zapotrzebowania na ten związek. Z drugiej strony, można spekulować, że wyższy poziom cholesterolu u kobiet otyłych może przyczyniać się do większego zużycia skwalenu w szlaku biosyntezy steroli, co może wpływać na zmniejszenie jego poziomu w HM. Ze względu na niejednoznaczne wyniki badań dostępne w literaturze i ograniczone badania nad zawartością skwalenu w HM, konieczne byłoby wykonanie dodatkowych analiz, uwzględniających większą ilość próbek.

W badanych IFs do żywienia niemowląt zawartość skwalenu była mniejsza od dolnej granicy wykrywalności tego składnika w tłuszczu mlecznym (<0.208 mg/100 g tłuszczu). Zasadniczą różnicą w składzie HM i IFs jest frakcja lipidowa, w tym obecność długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (LCPUFA), cholesterolu i jego prekursorów czy alkilogliceroli (Zielińska-Tomaszewska i in., 2019). Podczas gdy IFs są wzbogacane w PUFA (Rozporządzenie Delegowane Komisji (UE) 2016/128), to do tej pory nie stosuje się fortyfikacji skwalenem. Zwracając uwagę na cholesterol, w HM występuje go znacznie więcej (10-23 mg/100ml) niż we wskazanych IFs (0.4-6.7 mg/100 ml) (Kamelska i in., 2011). W związku ze znacznie niższą zawartością cholesterolu w IFs, można się spodziewać, że zawartość skwalenu będzie kształtować się na niskim poziomie.

7.3. Kwasy tłuszczowe w żywności dla niemowląt

Tłuszcz stanowi składnik HM charakteryzujący się dużą zmiennością. Jego skład determinowany jest wieloma czynnikami zewnętrznymi (Miliku i in., 2019). W **publikacji P3** analizowano zmienność profilu kwasów tłuszczowych HM w zależności od okresu laktacji oraz porównywano ze składem IFs do następnego żywienia niemowląt. W miarę postępu laktacji zaobserwowano tendencje do zwiększania się zawartości MCFA (C8:0, C10:0 i C12:0). Skład MCFA w HM zmienia się w trakcie laktacji, a przy czym w siarze występuje mniejsza ilość niż w mleku przejściowym i dojrzałym, co może być przypisane niedojrzałemu metabolizmowi gruczołu mlekowego lub zahamowanej zdolności biosyntezy we wczesnej laktacji (Yuan i in., 2022). W badanych IFs odnotowano znacząco większe zawartości MCFA względem HM ($p<0.05$), a różnica ta jest głównie wyjaśniona różnymi źródłami tłuszczu stosowanymi w produkcji mieszanek dla niemowląt, w tym dodatkiem oleju kokosowego i palmowego, które zawierają duże ilości MCFA (Delplanque i in., 2015). Ich dodatek do IFs jest uzasadniony, MCFA w przeciwieństwie do długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (LCFA) są łatwiej wchłaniane i stanowią bardziej dostępne źródło energii dla niemowląt (Yuan i in., 2022). W przypadku SFA, istnieją wytyczne dotyczące komponowania IFs pod względem C12:0 i C14:0, których całkowita zawartość nie powinna przekraczać 20% ilości wszystkich kwasów tłuszczowych (Sánchez-Hernández i in., 2019). Spośród SFA, HM wyróżniało się na tle IFs pod względem zawartości BCFA ($p<0.05$). Zawartość BCFA w HM istotnie zależy od diety, zwłaszcza od spożycia produktów mlecznych i wołowiny (Ran-Ressler i in., 2014). Głównym ograniczeniem tego badania jest brak informacji na temat bieżącego i zwyczajowego spożycia pokarmów przez kobiety karmiące piersią. Według statystyk, w Polsce odnotowuje się tendencję spadkową w spożyciu mleka i przetworów mlecznych (Milk Consumption by Country, 2024), co pośrednio może wpływać na niższy poziom BCFA w mleku Polek w odróżnieniu od mieszkanek innych krajów (Dingess i in., 2017). Śladowe ilości BCFA w IFs związane są z ograniczonym dodawaniem ich do IFs przez producentów żywności, wynikającymi ze skomplikowanej i czasochłonnej procedury pozyskiwania tych kwasów z rodzimych surowców. Ze względu na to, że BCFA, zarówno w formie *izo*, jak i *anteizo*, mają udokumentowaną aktywność przeciwnowotworową, a ich potencjał przeciwnowotworowy może być silniejszy niż ten wykazywany przez CLA, ich dodatek do IFs mógłby przynieść korzyści zdrowotne niemowlętom, zwłaszcza tym urodzonym przedwcześnie i o niskiej masie urodzeniowej (Wang i in., 2020).

Spośród MUFA odnotowano, że IFs posiadały wyższy poziom C18:1 *n*9, czego wynikiem jest wysoki udział olejów roślinnych (rzepakowego, słonecznikowego, palmowego, kokosowego) będących bogatym źródłem tego kwasu (Wu i in., 2023). Pomimo że większość MUFA pozostaje stabilna w trakcie laktacji, to poziom niektórych kwasów (eikozenowy, erukowy) mogą zmniejszać się w miarę dojrzewania mleka (Floris i in., 2020). Zaobserwowano o 40% niższą zawartość C22:1 *n*9 w mleku dojrzałym w odniesieniu do siary ($p>0.05$). Zawartość MUFA mających więcej niż 18 atomów węgla (kwas erukowy, eikozenowy, nerwowy) zmniejsza się w miarę postępu laktacji. MUFA o krótszych łańcuchach mogą być endogennie przekształcane w kwasy o dłuższych łańcuchach. Ponieważ szlaki metaboliczne u niemowląt w pierwszych dniach życia mogą nie być w pełni ukształtowane i funkcjonalne, ważne jest wczesne przystawienie dziecka do piersi, celem dostarczenia siary bogatej w MUFA o dłuższych łańcuchach (Moltó-Puigmartí i in., 2011).

Unikalne właściwości bioaktywne PUFA obecne w HM mają ważny wpływ na kształtowanie układu nerwowego i odpornościowego niemowlęcia. Organizm ludzki nie jest w stanie wytwarzać kwasów PUFA, dlatego muszą być one dostarczone wraz z pożywieniem (Bousset-Alféres i in., 2022). Właściwa podaż PUFA we wczesnym etapie rozwoju dziecka jest bardzo istotna ze względu na intensywnie rozwijający się system nerwowy (Xu i in., 2023). Okres laktacji determinował zawartość PUFA – AA i DHA, przy czym zawartość obu z nich malała w miarę dojrzewania mleka ($p<0.05$). Wyższy poziom tych kwasów w siarze wynika z konieczności dostarczania ich noworodkom w pierwszych chwilach życia. AA i DHA mogą być syntetyzowane z LA i ALA, jednak mechanizmy te są ograniczone u niemowląt. W miarę wzrostu i dojrzewania niemowląt ich zdolność do syntezy AA i DHA poprawia się, a poziom tych kwasów w mleku stopniowo maleje (Yang i in., 2022b). Zgodnie z rozporządzeniem Unii Europejskiej, od lutego 2020 r. producenci IFs są zobowiązani do wzbogacania je w DHA w ilości 20–50 mg/100 kcal (ok. 0.33–1% wszystkich kwasów tłuszczowych) (Bocquet i in., 2020; Tounian i in., 2021). Obowiązkowe wzbogacanie IFs w DHA zapewnia adekwatne jego spożycie również u niemowląt niekarmionych piersią. Rozporządzenie regulujące zawartość DHA, nie narzuca na producentów żywności wzbogacania IFs w AA (Koletzko i in., 2020). W 2023 roku przeprowadzono rewizję Kodeksu Żywnościowego z podkreśleniem, że poziom AA w IFs powinien być co najmniej taki sam jak poziom DHA (Codex Alimentarius, 2023).

Martysiak-Żurowska i in. (2021) podają, że wśród karmiących kobiet na standardowej diecie bez ograniczania mleka i produktów mlecznych, poziomy kwasu rumenowego (RA) wahały się od 0.32 do 0.57%, podczas gdy wśród kobiet na diecie ubogiej w nabiał wynosiły 0.14–0.33%. Zgodnie z powyższym, można przyjąć, że dieta kobiet karmiących nie była bogata

w produkty mleczne. W przeprowadzonym badaniu brak zastosowanych informacji na temat diet badanych karmiących kobiet uniemożliwia właściwą interpretację zawartości RA w HM. Spośród TFA, które powstają podczas przemysłowego uwodornienia olejów roślinnych, zidentyfikowano C18:1 *n*6 t i C18:1 *n*9 t — które wyrażono jako sumę. Ich zawartość pozostała stała w HM i wynosiła średnio 0.5%. Bousset-Alféres i in. (2022) stwierdzili, że poziomy C18:1 *n*9 t wahały się od 1.334% w siarze do 0.585% w mleku dojrzałym; jednak C18:1 *n*6 t nie wykryto. IF zawierały jedynie niewielkie ilości kwasów C18:1 *n*6 t i C18:1 *n*9 t (0.08% i 0.15%). Jest to związane z faktem, że tłuszcz w mleku modyfikowanym dla niemowląt pochodzi wyłącznie z olejów roślinnych (palmowego, rzepakowego, kokosowego, słonecznikowego). Martysiak-Żurowska (2021) zidentyfikowała śladowe ilości kwasu RA i VA w mleku modyfikowanym dla niemowląt. Obecność niewielkich ilości RA i VA jest związana z obecnością odtłuszczonego mleka krowiego w IFs, które mogą zawierać śladowe ilości tych związków (Tounian 2021). Analiza PCA wykazała, że podobnie jak BCFA, TFA miały znaczący wpływ na różnice w składzie HM i IFs.

Dendrogram ukazujący analizę skupień badanych przypadków potwierdził, że okres laktacji wpływa na profil kwasów tłuszczowych HM poprzez wyraźnie wydzielenie siary od mleka przejściowego i dojrzałego. Tak jak wykazano w PCA, kierunek tych zmian był determinowany głównie wyższą zawartością VA i AA w colostrum oraz C14:0 w mleku przejściowym i dojrzałym ($p<0.05$). Większa ilość VA w siarze może być determinowana dietą kobiet karmiących jeszcze z czasu ciąży. W trzecim trymestrze ciąży organizm kobiety mobilizuje zapasy tłuszczu. W związku z tym, że produkcja siary zaczyna się jeszcze przed porodem, to jej skład lipidowy jest zależny od metabolizmu tłuszczowego końcowego etapu ciąży (Liu i in., 2024). Nie analizowano jednak zależności *profil kwasów tłuszczowych HM a dieta*, dlatego konieczna byłaby dodatkowa analiza skupiająca się na tej relacji. Noworodek po urodzeniu nie ma jeszcze w pełni rozwiniętej zdolności do syntezy AA z LA, stąd fizjologicznie większe wartości AA występują w siarze, stanowiącej pierwszy pokarm dziecka karmionego piersią (Yang i in., 2022b). Z kolei, większa zawartość C14:0 w mleku przejściowym i dojrzałym związana jest z fizjologią laktacji i nie w pełni aktywnymi mechanizmami biosyntezy tłuszczów i wynikającą z tego niższą zawartość kwasów tłuszczowych C8:0 – C14:0 w siarze (Yuan i in., 2022).

7.4. Dodatkowe badania uzupełniające przygotowane do publikacji (DBU)

7.4.1. Profil kwasów tłuszczowych w preparatach konwencjonalnych i specjalistycznych

Przeznaczenie żywieniowe preparatu oraz skład IFs mogą różnicować profil kwasów tłuszczowych IFs. Większa zawartość wybranych SFA – C6:0 i C10:0 w preparatach na bazie mleka koziego wynika z większej zawartości tych kwasów w mleku kozim względem mleka krowiego (Markiewicz-Keszycka i in., 2013). Kwasy z grup SCFA i MCFA są łatwiej uwalniane i wchłaniane w przewodzie pokarmowym niemowlęcia, co przyczynia się do większej strawności tłuszczu mleka koziego w porównaniu z tłuszczem mleka krowiego i klasyfikuje preparaty kozie jako lepiej trawione przez niemowlęta. Wskazuje się także, że mleko krowie zawiera większe zawartości C16:0 (Gallier i in., 2020), jednak w analizowanym materiale badawczym nie odnotowano różnic statystycznych. Stężenie C16:0 w analizowanych IFs wahało się w szerokim zakresie, co zależne jest od dodatku oleju palmowego. Preparaty S-PH, S-S oraz S-A zawierały najwyższą zawartość C16:0 ($p<0.05$), co było zależne od obecności w składzie oleju palmowego lub oleiny palmowej. W preparatach konwencjonalnych na bazie mleka krowiego i koziego, olej palmowy nie był dodawany ze względu na naturalne jego występowanie w mleku (Gallier i in., 2020). Należy także podkreślić, że w IFs konwencjonalnych na bazie mleka krowiego i koziego obecny jest naturalnie występujący kwas palmitynowy w pozycji *sn*-2, natomiast w IFs z dodatkiem wyłącznie oleju palmowego nie poddanego enzymatycznej modyfikacji, C16:0 znajduje się w pozycji *sn*-1,3. W HM nawet 70% C16:0 występuje w pozycji *sn*-2, dlatego dąży się do upodabniania frakcji tłuszczowej IF do HM poprzez modyfikacje lipidów (Da Silva i Ferdaus, 2024). Większa zawartość C18:1 *n*9 w IFs na bazie mleka koziego wynika z dodatku do nich różnorodnych olejów będących źródłem tego kwasu: wysokooleinowy olej słonecznikowy, olej słonecznikowy, olej rzepakowy (Mendonça i in., 2017).

W Rozporządzeniu Komisji Europejskiej (Rozporządzenie Delegowane Komisji (UE) 2016/128) znajdują się wytyczne dotyczące zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych. Rozporządzenie wskazuje, że zawartość TFA nie powinna przekraczać 3%, natomiast w badanych IFs wartości tych kwasów wahały się w zakresie 1.38-2.48%. Najwięcej TFA oznaczono w preparatach kozich, co wynikało z wysokiego udziału z nich kwasu VA oraz CLA. W przypadku PUFA, zarówno mleko krowie jak i mleko kozie, w porównaniu do HM,

zawierają znacznie mniejsze ilości kwasów z tej grupy. Z tego względu, podczas komponowania IFs, producenci są zobligowani przestrzegać określonych zakresów w zawartości poszczególnych PUFA. Zgodnie z normami, od 2020 roku DHA w IFs powinno być dodawane w ilości 20–50 mg/100 kcal, co stanowi ok. 0.33–1% wszystkich kwasów tłuszczowych. Preparat S-PH zawierał o 0.05% niższą zawartość DHA w stosunku do wymaganego dolnego poziomu tego kwasu w IFs. Zawartość AA nie powinna przekraczać 1%, co jest zgodne z przeprowadzonymi badaniami (Bocquet i in., 2020; Tounian i in., 2021, (Rozporządzenie Delegowane Komisji (UE) 2016/128). Z drugiej strony, kolejnym kryterium dotyczącym AA jest jego dodatek w ilości co najmniej takiej jaka występuje kwasu DHA (Koletzko i in., 2020), co nie zostało spełnione w preparacie S-PH, w którym zawartość AA i DHA wynosiła 0.39% i 0.28%. Z kolei, oznaczona zawartość DHA w preparacie S-S była o ponad 20% mniejsza niż wartość zadeklarowana przez producenta. Konieczne są okresowe kontrole zawartości poszczególnych składników IFs i weryfikacja stosowania się producentów do określonych norm dotyczących składu. Jednak w przedstawionych badaniach, w pierwszej kolejności konieczna byłaby weryfikacja poziomów DHA i AA w przedstawionych IFs, biorąc pod uwagę więcej partii produktu do badań, w celu weryfikacji uzyskanych odchyleń od norm.

7.4.2. **Wskaźniki jakości lipidów**

W literaturze przedmiotu istnieje ograniczona ilość badań obejmująca wskaźniki jakości lipidów w IFs. Jakość lipidów w produktach żywnościowych oceniana jest poprzez szczegółową analizę profilu kwasów tłuszczowych oraz na podstawie wzajemnych stosunków wybranych kwasów względem siebie. Zawartość pożądanych/hipocholesterolemicznych kwasów tłuszczowych (DFA) definiowana jest jako suma MUFA, PUFA i C18:0 (Paszczyk i Tońska, 2022). Najniższa wartość wskaźnika DFA w preparacie S-PH wynikała z najmniejszej zawartości MUFA i PUFA względem pozostałych IFs. Najwyższe poziomy DFA odnotowano w IFs na bazie mleka koziego (K-GM1, K-GM2), które wzbogacone były w olej rybi i olej z *Mortierella alpina*, będącymi źródłem kwasów DHA i AA (Kuratko i in., 2013), a także w IFs specjalistycznych – na bazie białka sojowego (S-S) oraz w IFs poddanemu pełnej hydrolizie białka (S-FH), co było determinowane obecnością w nich olejów z mikroalg *Schizochytrium sp.* (EFSA Panel on Nutrition i in., 2023). Wskazuje się, że w porównaniu z innymi kwasami tłuszczowymi, C12:0 i C14:0 mają działanie zwiększające poziom całkowitego cholesterolu (Ruiz-Núñez i in., 2016). Wysoki poziom OFA w S-PH wynikał ze znacząco najwyższego stężenia zarówno C14:0 jak i C16:0, co determinował przede wszystkim z wysoki udziału oleju

palmowego i oleiny palmowej w ich składzie. Pomimo dość szerokiego przedziału wartości wskaźnika OFA (23.01-41.37), suma C12:0 i C14:0 w badanych IFs jest właściwa nie przekracza ustalonej prawnie ustalonej wartości 20%.

Wskaźniki AI i TI uwzględniają potencjalny wpływ poszczególnych kwasów tłuszczowych na rozwój zmian miażdżycowych (AI) oraz ryzyko powstawania zakrzepów (TI). Wskaźnik AI opisuje zależność pomiędzy głównymi SFA a MUFA i PUFA, natomiast wskaźnik TI bada zależność pomiędzy kwasami z grupy prozakrzepowej (wybrane SFA) do kwasów przeciwzakrzepowych (MUFA i PUFA) (Paszczyk i Tońska, 2022). Uważa się, że mniejsze wartości obu wskaźników są korzystniejsze dla zdrowia układu sercowo-naczyniowego. Preparat S-PH posiadał najwyższą wartość wskaźnika (AI=1.48), co związane było ze znacząco wyższą zawartością kwasów C12:0, C14:0 i C16:0 (41.37%), w porównaniu do pozostałych IFs (23.01-37.30%) oraz statystycznie najniższym stężeniem PUFA. Ten sam preparat cechował się najwyższą wartością wskaźnika TI (TI=1.68), podobnie ze względu na najwyższą zawartość SFA - C14:0, C16:0 i C18:0 (41.58%), w porównaniu do pozostałych IFs (26.22-35.78%), a także niższą zawartość MUFA i PUFA. Pomimo standaryzacji IFs i określonych norm składu, których producenci zobligowani są przestrzegać, dodatek rożnych proporcji olejów roślinnych do IFs wpływa na końcowe stężenia SFA, MUFA i PUFA, co determinuje wartości analizowanych wskaźników jakości lipidów. W kontekście IFs, producenci nie są zobowiązani do raportowania i deklarowania wartości AI i TI; kluczowe jest przestrzeganie wymogów dotyczących kompozycji kwasów tłuszczowych określonych Rozporządzeniem Komisji (UE) (Rozporządzenie Delegowane Komisji (UE) 2016/128), które określa minimalne i maksymalne poziomy zawartości tłuszczu i wybranych kwasów tłuszczowych. Ostatnim analizowanym wskaźnikiem był H/H, określający związek między kwasami tłuszczowymi hipocholesterolemicznymi (C18:1 *n*9, PUFA) a kwasami tłuszczowymi hipercholesterolemicznymi (C12:0, C14:0 i C16:0) (Paszczyk i Tońska, 2022). Preparat kozi K-GM2 cechował się najwyższą wartością wskaźnika H/H, co wskazuje na wyższy udział kwasów tłuszczowych hipocholesterolemicznych, w przypadku tego preparatu wyższą zawartością C18:1 *n*9 ($p<0.05$) (determinowaną dodatkiem wysokoleinowego oleju słonecznikowego) oraz najniższą sumą kwasów C12:0, C14:0 i C16:0 (23.01%).

Wskaźniki jakości lipidów mogą być przydatnym narzędziem w ocenie ogólnej jakości tłuszczu produktów żywnościowych, jednak w kontekście IFs podstawowym kryterium w zapewnieniu jakości jest przestrzeganie określonych standardów dotyczących składu.

7.5. Składniki mineralne w żywności dla niemowląt

Składniki mineralne ze względu na wywoływanie efektu farmakologicznego, klasyfikuje się jako związki bioaktywne (Hamzalıoğlu i in., 2016). W **publikacji 4** oceniano zawartość składników mineralnych w konwencjonalnych i specjalistycznych IFs. Odnotowano tylko pojedyncze istotne zależności w ilości składników mineralnych pomiędzy preparatami do początkowego i następnego żywienia niemowląt (dla Mg i Fe). Wykazano jednak, że przeznaczenie IFs wpływało na profil składników mineralnych. Preparat oparty na wolnych aminokwasach (S6) zawierał więcej Na i K. Preparaty bazujące na częściowo zhydrolizowanym białku, stosowane m.in. w nietolerancji laktozy, zawierają większe ilości Na i K w składzie; taką zależność odnotowano dla IF S1 który zawierał więcej K niż pozostałe 60% badanych IFs. Nietolerancja laktozy i inne nadwrażliwości pokarmowe mogą prowadzić do biegunek, powodujących utratę wody i elektrolitów (Xue i in., 2020), stąd możliwe większe ilości tych składników. W preparatach na bazie białka sojowego wskazuje się na zwiększone występowanie P i Ca, ze względu na zaburzone wchłanianie składników mineralnych spowodowane przez obecne w tych preparatach fityniany (Vandenplas i in., 2014), jednak w badanym preparacie sojowym różnice te nie były znaczące ($p>0.05$). Preparat oparty na całkowitej hydrolizie białka (S4) zawierał większe ilości Fe, jednak zgodnie z określonymi standardami, normy na Fe w specjalistycznych IFs dla niemowląt są zbliżone do tych w IFs konwencjonalnych, z niższą dolną granicą zawartości Fe (Rozporządzenie Delegowane Komisji (UE) 2016/128). Większa zawartość Zn w dwóch hydrolizatach białkowych (S1 i S4) związana jest z Rozporządzeniem Komisji Europejskiej z 2015 roku regulującym komponowanie specjalistycznych IFs, z którego wynika, że Zn może występować w większych ilościach w odróżnieniu do konwencjonalnych IFs. Hydrolizaty białkowe dostosowywane są do potrzeb niemowląt z alergiami pokarmowymi lub innymi problemami ze strony układu pokarmowego. Niemowlęta z problemami trawiennymi mogą mieć zaburzoną absorpcję Zn, a dodatkowa ilość w IFs może pomóc zapewnić jego odpowiednią podaż (Parlak i in., 2023).

Zmiany zawartości składników mineralnych w HM w czasie związane ze zmieniającymi się potrzebami żywieniowymi niemowlęcia, a monitorowanie tych zmian jest kluczowe w komponowaniu składu IFs (Ren i in., 2024; Zhao i in., 2014). Zawartość Na, P, Fe i Zn była większa w siarze, a zawartość Mn – w mleku przejściowym i dojrzałym ($p<0.05$). Różnice w zawartości składników mineralnych pomiędzy mlekiem z różnych okresów laktacji wynikają z fizjologicznych zmian składu HM związanym ze zmieniającymi się potrzebami noworodka i niemowlęcia. Większa ilość Na w colostrum niż w mleku dojrzałym związana jest ze

stopniowym zamknięciem połączeń ścisłych między komórkami nabłonka gruczołu mlekowego. W pierwszych dniach laktacji, połączenia te są jeszcze otwarte albo częściowo przepuszczalne, co ułatwia przenikanie jonów sodu i chlorku z osocza do siary. Wraz z postępem laktacji, ścisłe połączenia zamykają się, tym samym ograniczając przepuszczalność dla elektrolitów. Podczas dojrzewania HM, jego objętość rośnie, a tym samym składniki obecne w siarze ulegają rozcieńczeniu ze względu ma zwiększony napływ wody do pęcherzyków mlekowych (Lawrence, 2021). Spadek stężenia Fe wraz z postępem laktacji związany jest ze zmniejszającą się zawartością białka, z którym łączy się większość Fe (Wei i in., 2020). W przypadku Zn, obserwuje się logarytmiczny fizjologiczny spadek jego zawartości w HM, a najszybciej jego stężenie zmniejsza się w pierwszych dniach po porodzie (Rios-Leyvraz i Yao, 2023).

Różnice w zawartości składników mineralnych pomiędzy HM a IFs wynikają z różnic w biodostępności. Niższa biodostępność poszczególnych mikro- i makroelementów w IFs wynika z obecności soli nieorganicznych, które dodawane są podczas produkcji; ich obecność może prowadzić do wytrącania się składników mineralnych podczas trawienia. Ponadto, obecność innych substancji antyodżywczych może prowadzić do zmniejszonej rozpuszczalności niektórych pierwiastków (Moraes i in., 2021). W **publikacji 4** wykazano, że zawartość Ca, K, P, Fe i Zn była większa we wszystkich rodzajach IFs w porównaniu do wszystkich frakcji HM ($p<0.05$). Na podstawie dostępnej literatury wskazuje się, że biodostępność Ca z HM wynosi 60% (Kwiecień i in., 2017), natomiast w IFs może wahać się w zakresie 3-24%, w zależności od rodzaju preparatu (Moraes i in., 2021). Podobnie w przypadku Fe, biodostępność z HM wynosi około 50%, a z IFs 12% lub mniej (El Safy i in., 2016). Inne źródła podają, że biodostępność Fe z HM jest średnio 10 razy większa niż z IFs (Stoffel i in., 2024). W przypadku Zn, większa a iloilość tego składnika dodawana do IFs wynika także z upośledzonej zdolności niedojrzałego układu pokarmowego niemowlęcia do jego wchłaniania, a także związana jest z wyższym ryzkiem wystąpienia niedoborów Zn wśród niemowląt. Podczas gdy niedobory Zn są prawie nieistniejące w populacji dorosłych, odsetek ten wynosi aż 50% wśród niemowląt (Yasuda i in., 2016). Zawartość pierwiastków śladowych, takich jak Fe czy Zn, w IFs może być nawet kilkadziesiąt razy większa niż w HM. Takie wzbogacenie wynika z konieczności uwzględnienia biodostępności składników mineralnych oraz kompensacji ich potencjalnych strat zachodzących w procesie przechowywania i przygotowywania produktu do spożycia (Mandiá i in., 2021; Molska i in., 2014). Konieczna jest kontynuacja badań, aby uzyskane wyniki badań przeanalizować w kontekście biodostępności składników mineralnych w poszczególnych IFs.

Producenci IFs są zobligowani przestrzegać standardów określonych w Rozporządzeniu Komisji Europejskiej (Rozporządzenie Delegowane Komisji (UE) 2016/128) które regulują minimalne i maksymalne poziomy poszczególnych składników mineralnych, zarówno w IFs konwencjonalnych jak i specjalistycznych. Największe odchylenia zawartości składników mineralnych względem tych zadeklarowanych przez producenta odnotowano dla Fe; w dziewięciu różnych IFs, spośród czternastu analizowanych, odnotowano odchylenia 20% lub większe. Z drugiej strony zawartość Fe we wszystkich badanych IF (oprócz C-B1) mieściła się w zakresie określonym przez Komisję Europejską (0.3–1.3 mg/100 kcal — początkowe IF; 0.6–2 mg/100 kcal — następne IF; 0.45–2 mg/100 kcal — specjalistyczne IF (Rozporządzenie Delegowane Komisji (UE) 2016/128). W pojedynczych przypadkach występowały odchylenia w zawartości Mn i Cu względem tych podanych na etykiecie o 20% lub więcej. Almeida i in. (2022) donoszą, że w jednym z IF oznaczona zawartość Mn była aż o 87% mniejsza niż na etykiecie. Duże odchylenia w Mn i Cu można uzasadnić niskimi gęstościami tych pierwiastków w IF; tak małe wartości mogą być bardziej podatne na duże wahania ilościowe (Da Silva i in., 2013). W literaturze również występują badania, które wskazują na zmienną wahania składników mineralnych względem zawartości podanej na etykiecie przez producenta, dlatego istnieje potrzeba okresowego monitorowania ich zawartości w IF i sprawdzania zgodności z ustalonymi normami.

Jednym z celów **publikacji P4** była ocena dziennego pokrycia zapotrzebowania na składniki mineralne, które wykonano w oparciu o zalecane dzienne wartości spożycia HM określone przez PTGHiŻDz (Szajewska i in., 2021), informacje na etykietach dotyczące rekomendowanych ilości spożycia IFs oraz referencyjne wartości spożycia poszczególnych składników mineralnych określone przez Normy żywienia dla populacji Polski (2020). Ze względu na znaczące różnice w zapotrzebowaniu na poszczególne składniki mineralne pomiędzy niemowlętami do szóstego miesiąca i po szóstym miesiącu, odnotowano znaczące różnice w szacowanym pokryciu zapotrzebowania pomiędzy IFs do początkowego i następnego żywienia niemowląt. Preparaty do początkowego żywienia niemowląt i większość preparatów specjalistycznych przekraczały zapotrzebowanie na wszystkie składniki mineralne. Jak wspomniano wcześniej, większe ilości poszczególnych składników mineralnych w IFs wynikają z ich niższej biodostępności względem HM (Moraes i in., 2021). IFs mogą mieć nawet sześciokrotnie wyższe poziomy Ca niż w HM; chociaż biodostępność Ca z IF jest znacznie niższa, istnieje ryzyko przekroczenia dziennego spożycia tego pierwiastka, co w konsekwencji może upośledzać wchłanianie innych składników mineralnych — Mg, Fe i Zn (Molska i in., 2014). Preparaty następne wprowadzane po 6 miesiącu życia mogą być niedoborowe

w wybrane składniki mineralne, ale należy wziąć pod uwagę, że po 6 miesiącu życia dieta niemowląt jest uzupełniania w dodatkowe pokarmy stanowiące podstawę rozszerzania diety (Antoniou i in., 2022). W grudniu 2024 roku nastąpiła nowelizacja Norm Żywienia, w której wyłączono normy dla niemowląt w pierwszych 6 miesiącach życia. Zgodnie z zapisem, zarówno WHO jak i PTGHiŻDz rekomendują wyłączne karmienie piersią przez pierwsze 6 miesięcy życia, z podkreśleniem, że ilość pobieranego jednorazowo pokarmu i liczba karmień zależą od indywidualnego zapotrzebowania dziecka (Rychlik i in., 2024). Według EFSA (2017) wśród niemowląt poniżej 6 miesiąca życia zapotrzebowanie na energie i poszczególne składniki odżywcze uznaje się za równe podaży zawartej w HM. W związku z tym, w najnowszych Normach Żywienia nie zaproponowano zalecanych dziennych ilości spożycia składników odżywczych dla tej grupy wiekowej, uznając, ze są one równe podaży z HM. W przypadku niemowląt niekarmionych HM, odpowiednie wytyczne dotyczące spożywanych ilości zostały określone przez Szajewską i in. (2021), natomiast kompozycja IFs regulowana jest odpowiednim rozporządzeniem Komisji Europejskiej (Rozporządzenie Delegowane Komisji (UE) 2016/128). Rezygnacja z określonych norm znacznie upraszcza podejście do żywienia niemowląt do 6 miesiąca życia. W **publikacji P4** wskazano, że niemowlęta mogą otrzymywać większe ilości składników odżywczych niż przewidywały to dostępne wcześniej normy EAR i RDA. Z tego względu, poprzednie normy mogły prowadzić do błędnej interpretacji, sugerującej że niemowlęta poniżej 6 miesiąca życia muszą spożywać konkretne ilości składników odżywczych. W rzeczywistości, różnice w składzie HM, ustabilizowane prawnie wytyczne dotyczące komponowania IFs oraz zmienne zapotrzebowanie niemowląt na składniki odżywcze sprawiają, że sztywno określone normy były mało praktyczne. Podczas analizy wyników **publikacji P4** opierano się na dostępnych w tamtym czasie normach z 2020 roku, które obejmowały normy na składniki mineralne dla niemowląt do 6 miesiąca życia.

Publikacje wchodzące w skład niniejszej rozprawy doktorskiej poruszały szeroką tematykę czynników warunkujących stężenie związków biologicznie czynnych w żywności dla niemowląt. Przedstawione badania są istotne nie tylko z perspektywy naukowej, opartej na zrozumieniu biologii laktacji, ale również praktycznej – rozwijające aktualną wiedzę dotyczącą żywności dla niemowląt opartej na aktualnych wytycznych w kontekście fizjologicznym oraz technologicznym. Jak przedstawiono, skład mleka kobiecego zależy od wielu czynników, w tym fizjologicznych oraz indywidualnych, a badanie czynników warunkujących ich skład dostarcza kompleksowej wiedzy o biologii laktacji, umożliwia indywidualizację opieki perinatalnej oraz wspiera działania z zakresu profilaktyki żywieniowej kobiet karmiących. W kontekście bezpieczeństwa składu mleka kobiecego, szczególne znaczenie miała analiza

zawartości metyloksantyn. Przestrzeganie zaleceń dotyczących spożycia kofeiny podczas karmienia piersią jest znaczące w kontekście bezpieczeństwa zdrowotnego niemowlęcia oraz jakości laktacji. Z przeprowadzonych badań wynika, że utrwalone nawyki żywieniowe warunkują spożycie produktów bogatych w kofeinę, dlatego znacząca jest edukacja i budowanie świadomości żywieniowej, a także promowanie prawidłowych nawyków żywieniowych w okresie laktacji. Skwalen, jako związek o właściwościach przeciwutleniających i immunomodulujących, pełni ważną rolę w organizmie niemowlęcia, dlatego identyfikacja czynników wpływających na jego zawartość w mleku kobiecym miała istotne znaczenie w kontekście optymalizacji żywienia naturalnego oraz zrozumienia jakie czynniki mogą mieć wpływ na jego występowanie. Analiza zawartości kwasów tłuszczowych i składników mineralnych pokazała jak mleko kobiece zmienia się w czasie w związku z dojrzewaniem pokarmu ludzkiego oraz w zależności od zmieniających się potrzeb niemowlęcia. Porównanie ich z zawartości z zawartością preparatów zastępujących mleko kobiece umożliwia opracowywanie i standaryzację preparatów dla niemowląt tak, aby w jak największym stopniu przypominały skład pokarmu matki.

8. Podsumowanie i wnioski

Przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej badania potwierdziły postawione hipotezy badawcze, wskazujące że zawartość metyloksantyn, skwalenu, kwasów tłuszczowych i składników mineralnych w żywności dla niemowląt (w mleku kobiecym i preparatach zastępujących mleko kobiece) zależna jest od wybranych czynników determinujących.

Odnosząc się do treści postawionych hipotez badawczych i na podstawie przeprowadzonych badań, sformułowano następujące wnioski:

1. Czynniki socjodemograficzne, w tym wiek, poziom wykształcenia i miejsce zamieszkania kobiet, a także okres laktacji, determinowały wybory żywieniowe związane ze spożyciem produktów bogatych w kofeinę, co przekładało się na zawartość kofeiny i jej metabolitów w mleku kobiecym.
2. Wraz z wiekiem oraz w miarę postępu laktacji zawartość skwalenu w mleku kobiecym zmniejszała się, natomiast wraz ze wzrostem BMI kobiet, jego zawartość rosła, co sugeruje, że jego stężenie jest regulowane zarówno przez czynniki fizjologiczne, jak i metaboliczne.
3. Zawartość kwasu kaprynowego, laurynowego, mirystynowego, erukowego, arachidonowego i dokozaheksaenowego w mleku kobiecym była zależna od okresu laktacji, co wskazuje na dynamiczny charakter składu lipidowego mleka matki. Zmiany stężeń tych kwasów odwzorowują fizjologiczne mechanizmy adaptacyjne, które związane są z dostosowaniem profilu tłuszczowego do zmieniających się potrzeb niemowlęcia.
4. Różnice w profilu kwasów tłuszczowych pomiędzy mlekiem kobiecym a preparatami zastępującymi mleko kobiece były w największym stopniu zależne od odmiennej zawartości TFA i BCFA pomiędzy obydwoma rodzajami żywności dla niemowląt. Kwasy z tych grup stanowią naturalny komponent profilu lipidowego mleka matki, podczas gdy ich obecność w preparatach mlekozastępczych dla niemowląt jest nieobecna lub występuje w niewielkich ilościach.
5. Przeznaczenie żywieniowe preparatów dla niemowląt determinowało zawartość składników mineralnych, a w wybranych preparatach specjalistycznych do żywienia niemowląt odnotowano większe zawartości Ca, Mg, Mn, Zn, Na i K, co wynika zarówno z dostosowywania ich składu do specyficznych potrzeb żywieniowych

określonych grup niemowląt oraz z konieczności spełnienia norm określonych przez krajowe i międzynarodowe wytyczne.

6. Zawartość wybranych składników mineralnych – Na, P, Fe i Zn, była większa w siarze niż w przejściowym i dojrzałym mleku kobiecym, co związane jest z fizjologiczną zmianą składu mineralnego pokarmu matki wraz z dojrzewaniem mleka. Zawartość Ca, K, P, Fe i Mn była większa w preparatach dla niemowląt w porównaniu do mleka kobiecego, co determinowane jest koniecznością kompensacji niższej biodostępności składników mineralnych z preparatów mlekozastępczych.
7. Jakość tłuszczu w preparatach do żywienia niemowląt, determinowana wskaźnikami jakości lipidów, w preparatach konwencjonalnych i specjalistycznych różniła się, co zależne było od dodatku olejów roślinnych i końcowych stężeń i proporcji poszczególnych kwasów tłuszczowych.

W świetle uzyskanych wyników znaczące jest kontynuowanie badań nad czynnikami warunkującymi skład żywności dla niemowląt. Bardziej dogłębna analiza czynników determinujących skład mleka kobiecego, m.in. wpływ diety karmiących, zamieszkiwany region, kultura danego kraju, a także czynniki metaboliczne czy genetyczne, umożliwią kompleksowe zrozumienie mechanizmów regulujących wartość odżywczą pokarmu matki i będą punktem wyjścia do technologicznego ulepszania i optymalizacji składu preparatów mlekozastępczych dla niemowląt.

9. Bibliografia

Ahmad, H., Sumarti, E., Sriwulandari, Y.A. (2022). Cafe as a Representation of the Lifestyle of the Urban Community. *Technium Social Sciences Journal*, *33*(1), 569-576. http://doi.org/10.47577/tssj.v33i1.6851.

Almeida, C.C., Baião, D.d.S., Rodrigues, P.A., Saint'Pierre, T.D., Hauser-Davis, R.A., Leandro, K.C., Paschoalin, V.M.F., Costa, M.P.d., Conte-Junior, C.A. (2022). Macrominerals and trace minerals in commercial infant formulas marketed in brazil: compliance with established minimum and maximum requirements, label statements, and estimated daily intake. *Frontiers in Nutrition*, *9*, 857698. http://doi.org/10.3389/fnut.2022.857698.

Amer, S.A., Alamri, F.A., Alradini, F.A., Alenezi, M.A., Shah, J., Fagehy, A.A., Shajeri, G.M., Abdullah, D.M., Zaitoun, N.A., Elsayed, M. (2023). Caffeine addiction and determinants of caffeine consumption among health care providers: a descriptive national study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *27*, 3230-3242.

Antoniewska, A., Adamska, A., Rutkowska, J., Zielińska, M. (2017). Olej z nasion dyni jako źródło cennych składników w diecie człowieka. *Problemy Higieny i Epidemiologii*, *98*, 17–22.

Antoniou, E., Dagla, M., Iliadou, M., Palaska, E., Orovou, E. (2022). Early introduction of solid foods in infant's nutrition and long-term effects on childhood: a systematic review. *International Journal of Innovative Research in Medical Science*, *7*, 777–785. https://doi.org/10.23958/ijirms/vol07-i12/1584.

AOAC International. (2000). *Gravimetric method (Rose-Gottlieb).* W: Official methods of analysis of AOAC International (17th ed., Method No. 905.02). AOAC International.

Armand, M, Bernard, JY, Forhan, A, Heude, B, Charles, MA. (2018). Maternal nutritional determinants of colostrum fatty acids in the EDEN mother-child cohort. *Clinical Nutrition*, *37*(6), 2127–2136. http://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.10.007.

Aumeistere, L, Ciproviča, I, Zavadska, D, Andersons, J, Volkovs, V, and Ceļmalniece, K. (2019). Impact of maternal diet on human milk composition among lactating women in Latvia. *Medicina*, *55*(5), 173. http://doi.org/10.3390/medicina55050173.

Aumeistere, L., Beluško, A., Ciprovica, I., Zavadska, D. (2021). Trans Fatty Acids in Human Milk in Latvia: Association with Dietary Habits during the Lactation Period. *Nutrients*, *13*(9). http://doi.org/10.3390/nu13092967.

Bakshi, S., Paswan, V.K., Yadav S.P., Bhinchhar, B.K., Kharkwal, S., Rose, H., Kanetkar, P., Kumar, V., Al.-Zamani, Z.A.S., Bunkar, D.S. (2023). A comprehensive review on infant formula: nutritional and functional constituents, recent trends in processing and its impact on infants' gut microbiota. *Frontiers in Nutrition*, *10*, 1194679. http://doi.org/10.3389/fnut.2023.1194679.

Błaszczyk, A., Zaremba, B., Gładyś-Jakubczyk, A., Tabak, J., Wesołowski, M., Michalska, A. (2024). Can a mother drink coffee while breastfeeding? Awareness of the diet of breastfeeding mothers. Survey and review of the latest recommendations. *Medical Research Journal*, *9*(3), 290-294. http://doi.org/10.5603/mrj.100809.

Bocquet, A., Briend, A., Chouraqui, J.-P., Darmaun, D., Feillet, F., Frelut, M.-L., Guimber, D., Hankard, R., Lapillonne, A., Peretti, N., Roze, J.-C., Siemoni, U., Turck, D., Dupont, C., Comité de Nutrition de la Société Française de Pédiatrie (CN-SFP). (2020). The new European regulatory framework for infant and follow-on formulas: Comments from the Committee of Nutrition of the French Society of Pediatrics (CN-SFP). *Archives de Pédiatrie, 27*(7), 351–353. https://doi.org/10.1016/j.arcped.2020.09.002.

Borschel, M.W., Baggs, G.E., Oliver, J.S. (2018). Comparison of growth of healthy term infants fedextensively hydrolyzed protein- and amino acid-based infant formulas. *Nutrients*, *10*(3), 289. https://doi.org/10.3390/nu10030289.

Bousset-Alféres, C.M., Chávez-Servín, J.L., Vázquez-Landaverde, P.A., Betancourt-López, C.A., Del Carmen Caamaño, M., Ferriz-Martínez, R.A., Chávez-Alabat, E.F., Lovatón-Cabrera, M.G., De la Torre-Carbot, K. (2022). Content of industrially produced trans fatty acids in breast milk: An observational study. *Food Science & Nutrition, 10*(8), 2568–2581. http://doi.org/10.1002/fsn3.2862.

Bravi F, Wiens F, Decarli A, Dal Pont A, Agostoni C, Ferraroni M. (2016). Impact of maternal nutrition on breast-milk composition: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *104*(3), 646–662. http://doi.org/10.3945/ajcn.115.120881.

Bzikowska-Juram A., Czerwonogrodzka-Senczyna, A., Olędzka, G., Szostak-Węgierek D., Weker H., Wesołowska A. (2018). Maternal nutrition and body composition during breastfeeding: association with human milk composition. *Nutrients*, *10*(10), 1379. http://doi.org/10.3390/nu10101379.

Calvaresi, V., Escuder, D., Minutillo, A., Bastons-Compta, A., García-Alga, O., Rosa, C., Alonso, P., Pacifici, R., Pichini, S. (2016). Transfer of Nicotine, Cotinine and Caffeine Into Breast Milk in a Smoker Mother Consuming Caffeinated Drinks. *Journal of Analytical Toxicology*, *40*(6), 473–477. https://doi.org/10.1093/jat/bkw034.

Chong, H.-Y., Tan, L.T.-H., Law, J.W.-F., Hong, K.-W., Ratnasingam V., Ab Mutalib N.-S., Lee L.-H., Letchumanan, V. (2022). Exploring the Potential of Human Milk and Formula Milk on Infants' Gut and Health. *Nutrients*, *14*(17), 3554; https://doi.org/10.3390/nu14173554.

Codex Alimentarius. *Standard for Follow-Up Formula for Older Infants and Product for Young Children. CXS 156-1987.* Pobrane z https://www.isdi.org/wp-content/uploads/2020/04/CXS-156-1987.pdf (11.02.2025)

Czaplicki, S., Zadernowski, R., Ogrodowska, D. (2009). Triacyloglicerols from viper bugloss (*Echium vulgare* L.) seeds. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *111*(12), 1266-1269. http://doi.org/10.1002/ejlt.200900073.

Czarniecka-Skubina, E., Pielak, M., Sałek, P., Korzeniowska-Ginter, R., Owczarek, T. (2021). Consumer Choices and Habits Related to Coffee Consumption by Poles. *International Journal of Environmental Reserach and Public Health*, *18*(8), 3948. http://doi.org/10.3390/ijerph18083948.

Czerwonka M., Białek A., Bobrowska-Korczak B. (2024). A novel method for the determination of squalene, cholesterol and their oxidation products in food of animal origin by GC-TOF/MS. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(5), 2807. http://doi.org/10.3390/ijms25052807.

Da Silva, S.V., Mattanna, P., Bizzi, C.A., Dos Santos Richards, N.S.P., Barin, J.S. (2013). Evaluation of the mineral content of infant formulas consumed in Brazil. *Journal of Dairy Science*, *96*, 3498–3505. http://doi.org/10.3168/jds.2012-6268.

Da Silva, C., Ferdaus, J.Md. (2024). Technological Advances in Infant Formula Ingredients. W: R.M. Barría (red.), *Infant Nutrition and Feeding* (s.1-18). Londyn: IntechOpen. http://doi.org/10.5772/intechopen.110595.

Delplanque, B., Gibson, R., Koletzko, B., Lapillonne, A., Strandvik, B. (2015). Lipid Quality in Infant Nutrition: Current Knowledge and Future Opportunities. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *61*(1), 8–17. https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000818.

Dingess, K.A., Valentine, C.J., Ollberding, N.J., Davidson, B.S., Woo, J.G., Summer, S., Peng, Y.M., Guerrero, M.L., Ruiz-Palacios, G.M., Ran-Ressler, R.R., McMahon, R.J., Brenna, J.T., Morrow, A.L. (2017). Branched-chain fatty acid composition of human milk and the

impact of maternal diet: The Global Exploration of Human Milk (GEHM) Study. *The American Journal of Clinical Nutrition, 105*(1), 177–184. https://doi.org/10.3945/ajcn.116.132464.

Dipasquale, V., Serra, G., Corsello, G., Romano, C. (2019). Standard and specialized infant formulas in Europe: Making, marketing, and health outcomes. *Nutrition in Clinical Practice*, *35*(2), 273–281. http://doi.org/10.1002/ncp.10261.

Donda, K., Maheshwari, A. (2022). Human Milk Lipids Induce Important Metabolic and Epigenetic Changes in Neonates. *Clinics in Perinatology*, *49*(2) 331-353. http://doi.org/10.1016/j.clp.2022.02.006.

Dror, D.K., Allen, L.H. (2018). Overview of nutrients in human milk. *Advances in Nutrition*, *9*(Suppl 1), 278–294. http://doi.org/10.1093/advances/nmy022.

Drugs and Lactation Database. Chocolate. Pobrane z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532500/ (5.02.2025)

Du Preez, H. (2007). Squalene—Antioxidant of the future. *South African Journal of Natural Medicine, 33*, 106–112.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergie. (2015). Scientific Opinion on the safety of caffeine. *EFSA Journal*, *13*(5), 4102, 120. http://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4102.

EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA), Turck, D., Bohn, T., Castenmiller, J., De Henauw, S., Hirsch-Ernst, K.I., Maciuk, A., Mangelsdorf, I., McArdle, H.J., Naska, A., Pelaez, C., Pentieva, K., Siani, A., Thies, F., Tsabouri, S., Vinceti, M., Aguilera-Gómez, M., Cubadda, F., Frenzel, T., Heinonen, M., Maradona, M.P., Marchelli, R., Neuhäuser-Berthold, M., Poulsen, M., Schlatter, J.R., Siskos, A., Van Loveren, H., Turla, E., Knutsen, H.K. (2023). Safety of oil from Schizochytrium sp. (strain CABIO-A-2) for use in infant and follow-on formula as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal*, *21*(12), e8415. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8415.

El Safy, U.R., Fathy, M.M., Hassan, T.H., Zakaria, M., Kader Al Malky, M.A., Arafa, M., El Sayed, H., Al Ghobashy, A., Zaho, B., Wahab, A.A., Hosam, M. (2016). Effect of breastfeeding versus infant formula on iron status of infants with beta thalassemia major. *International Breastfeeding Journal*, *12*(1), 18. http://doi.org/10.1186/s13006-017-0111-3.

European Food Safety Authority (EFSA). (2017). Dietary Reference Values for nutrients. Summary report. *EFSA supporting publication,* e15121. http://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.e15121.

Favara, G., Maugeri, A., Barchitta, M., Lanza, E., San Lio, R.M., Agodi, A. (2025). Maternal Lifestyle Factors Affecting Breast Milk Composition and Infant Health: A Systematic Review. Nutrients, *17*(1), 62. https://doi.org/10.3390/nu17010062.

Ferreira, J., Ferreira, C., Bos, E. (2021). Spaces of consumption, connection, and community: Exploring the role of the coffee shop in urban lives. *Geoforum*, *119*, 21-20. https://doi.org/10.1016/j.geoforum.2020.12.024.

Finco A.M.O., Mamani, L.G.D., De Carvalho, J.C., Pereira, G.V.M., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C.R. (2017). Technological trends and market perspectives for production of microbial oils rich in omega-3. *Critical Reviews in Biotechnology*, *37*(5), 656-671. https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1213221.

Floris, L.M., Stahl, B., Abrahamse-Berkeveld, M., Teller, I.C. (2020). Human milk fatty acid profile across lactational stages after term and preterm delivery: A pooled data analysis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 156, 102023. http://doi.org/10.1016/j.plefa.2019.102023.

Gallier, S., Tolenaars, L., Prosser, C. (2020). Whole Goat Milk as a Source of Fat and Milk Fat Globule Membrane in Infant Formula. *Nutrients, 12*(11), 3486. http://doi.org/10.3390/nu12113486.

Garofoli, F., Civardi, E., Pisoni, C., Angelini, M., Ghirardello, S.(2023). Anti-Inflammatory and Anti-Allergic Properties of Colostrum from Mothers of Full-Term and Preterm Babies: The Importance of Maternal Lactation in the First Days. *Nutrients*, *15*(19), 4249. https://doi.org/10.3390/nu15194249.

Goehring, K.C., Marriage, B.J., Oliver, J.S., Wilder, J.A., Barrett, E.G., Buck, R.H. (2016). Similar to those who are breastfed, infants fed a formula containing 2′-fucosyllactose have lower inflammatory cytokines in a randomized controlled trial. *The Journal of Nutrition*, *146*(12), 2559–2566. http://doi.org/10.3945/jn.116.236919.

Gohil, N.; Bhattacharjee, G., Khambhati, K., Braddick, D., Singh, V. (2019). Engineering Strategies in Microorganisms for the Enhanced Production of Squalene: Advances, Challenges and Opportunities. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00050.

Golan, Y., Assaraf, Y.G. (2020). Genetic and Physiological Factors Affecting Human Milk Production and Composition. *Nutrients*, *12*(5), 1500. http://doi.org/10.3390/nu12051500.

Grant, A., Pell, B., Copeland, L., Brown, A., Ellis, R., Morris, D., Williams, D., Phillips, R. (2022). Views and experience of breastfeeding in public: A qualitative systematic review. *Maternal & Child Nutrition*, *18*(4), e13407. https://doi.org/10.1111/mcn.13407.

Hamzalıoğlu, A., Gökmen, V. (2016). Interaction between Bioactive Carbonyl Compounds and Asparagine and Impact on Acrylamide. W: V. Gökmen (red.), *Acrylamide in Food* (s. 355-376), Cambridge, MA: Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802832-2.00018-8.

Hannan, F.M., Elajnaf, T., Vandenberg, L.N., Kennedy, S.H., Thakker, R.V. (2023). Hormonal regulation of mammary gland development and lactation. *Nature Reviews Endocrinology*, *19*(1), 46–61. https://doi.org/10.1038/s41574-022-00742-y.

Hirani, S.A.A., Souter, A.R. (2024). Effects of Caffeine on Breastfeeding Mothers and Infants: A Scoping Review. Clinical Lactation, *15*(3-4). http://doi.org/10.1891/CL-2023-0036.

Holst, A.Q., Myers, P., Rodríguez-García, P., Hermes, G.D.A., Melsaether, C., Baker, A., Jensen, S.R., Parschat, K. (2023). Infant formula supplemented with five human milk oligosaccharides shifts the fecal microbiome of formula-fed infants closer to that of breastfed infants. *Nutrients*, *15*(14), 3087. http://doi.org/10.3390/nu15143087.

International Organization for Standardization. (2002). *Milkfat — Preparation of fatty acid methyl esters* (ISO Standard No. 15884:2002, IDF 182:2002). ISO.

International Organization for Standardization. (2011). *Milk — Determination of fat content — Gravimetric method (Reference method)* (ISO Standard No. 1211:2011). ISO.

Ryoo, C.J., Mi Kang, N. (2022). Maternal factors affecting the macronutrient composition of transistional human milk. *International Journal of Environmental Reserach and Public Health*, *19*(6), 3308. http://doi.org/10.3390/ijerph19063308.

Kallio, M.J.T., Siimes, M.A., Perheentupa, J., Salmenperä, L., Miettinen, T.A. (1989). Cholesterol and its precursors in human milk during prolonged exclusive breast-feeding. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *50*(4), 782–785. http://doi.org/10.1093/ajcn/50.4.782.

Kamelska, A.M., Pietrzak-Fiećko, R., Bryl, K. (2011). Zawartość cholesterolu jako determinanta jakości żywności dla niemowląt. *Zeszyty Naukowe/Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu*, *196*, 38–44.

Kamińska-El-Hassan E., Mikulska A., Wójtowicz J., Witkowska-Zimny M. (2017). Komponenty komórkowe mleka kobiecego. *Postępy Nauk Medycznych*, *9*, 493-499.

Kebede, T., Woldemichael, K., Jarso, H., Bekele, B.B. (2020). Exclusive breastfeeding cessation and associated factors among employed mothers in Dukem town, Central Ethiopia. *International Breastfeeding Journal*, *15*(6). https://doi.org/10.1186/s13006-019-0250-9.

Khor, G. L., Tan, S. S., Stoutjesdijk, E., Ng, K. W. T., Khouw, I., Bragt, M., Schaafsma, A., Dijck-Brouwer, D. A. J., Muskiet, F. A. J. (2021). Temporal changes in breast milk fatty acids contents: A case study of malay breastfeeding women. *Nutrients*, *13*(1), 1–13. https://doi.org/10.3390/nu13010101.

Kilvington, A., Barnaba, C., Rajasekaran, S., Laurens, L.M.L., Medina-Meza, I.G. (2021). Lipid profiling and dietary assessment of infant formulas reveal high intakes of major cholesterol oxidative product (7-ketocholesterol). *Food Chemistry*, *354*, 129529. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129529.

Kim S.Y., Yi, S.Y. (2020). Components of human breast milk: from macronutrient to microbiome and microRNA. *Clinical and Experimental Pediatrics, 63*(8), 301-309. http://doi.org/10.3345/cep.2020.00059.

Kim, H, Kang, S, Jung, BM, Yi, H, Jung, JA, and Chang, N. (2017). Breast milk fatty acid composition and fatty acid intake of lactating mothers in South Korea. *British Journal of Nutrition*, *117*(4), 556–561. http://doi.org/10.1017/S0007114517000253.

Koletzko, B., Bergmann, K., Thomas Brenna, J., Calder, P.C., Campoy, C., Clandinin, M.T., Colombo, J., Daly, M., Decsi, T., Demmelmair, H., Domellöf, M., FilderMis, N., Gonzalez-Casanova, I., Van Goudoever, J.B., Hadjipanayis, A., Hernell, O., Lapillonne, A., Mader, S., Martin, C.R., Matthäus, V., Ramakrishan, U., Smuts, C.M., Strain, S.J.J., Tanjung, C., Tounian, P., Carlson, S.E., on behalf of the European Academy of Paediatrics and the Child Health Foundation. (2020). Should formula for infants provide arachidonic acid along with DHA? A position paper of the European Academy of Paediatrics and the Child Health Foundation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *111*(1), 10–16. https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz252.

Komisja Europejska. *Rozporządzenie Delegowane Komisji 2016/128 z dnia 25 września 2015 roku Uzupełniające Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 609/2013 w Odniesieniu do Szczegółowych Wymogów Dotyczących Składu Preparatów do Początkowego Żywienia Niemowląt. Dz.U. L25 z 2.2.2016.* Pobrane z https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R0128&from=SL (9.02.2025)

Kuratko, C., Abril, J.R., Hoffman, J.P., Salem, N. (2013). Enrichment of infant formula with omega-3 fatty acids. W: C. Jacobsen, N. Skall Nielsen, A. Frisenfeldt Horn, A.-D. Moltke Sørensen (red.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Food Enrichment with Omega-3 Fatty Acids* (s. 353-386). Sawston, UK: Woodhead Publishing.

Kwiecień, M., Winiarska-Mieczan, A., Samolińska, W., Kiczorowska, B., Rusinek-Prystupa, E. (2017). The content of magnesium, calcium, sodium and potassium in infant formulas. *Journal of Elementology, 22*(1), 339–347. http://doi.org/10.5601/jelem.2016.21.1.1083.

Lagkouvardos, I., Intze, E., Schaubeck, M., Rooney, J.P.K., Hecht, C., Piloquet, H., Clavel, T. (2023). Early life gut microbiota profiles linked to synbiotic formula effects: A randomized clinical trial in European infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *117*(2), 326–339. http://doi.org/10.1016/j.ajcnut.2022.11.012.

Laitinen, K., Isolauri, E., Kaipiainen, L., Gylling, H., Miettinen, T.A. (2008). Plant stanol ester spreads as components of a balanced diet for pregnant and breast-feeding women:

Evaluation of clinical safety. *British Journal of Nutrition*, *101*(12), 1797–1804. http://doi.org/10.1017/S0007114508133608.

Lawrence, R. (2021). Biochemistry of Human Milk. W: R.A. Lawrence, R.M. Lawrence (red.). *Breastfeeding A Guide for the Medical Profession* (s. 93-144). Elsevier. https://doi.org/10.1016/C2018-0-02113-1.

Liberman, H.R., Agarwal, S., Fulgoni, V.L. (2019). Daily Patterns of Caffeine Intake and the Association of Intake with Multiple Sociodemographic and Lifestyle Factors in US Adults Based on the NHANES 2007–2012 Surveys. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, *119*(1), 106-114. https://doi.org/10.1016/j.jand.2018.08.152.

Lisowska, A., Kasiak, P., Rząca, M. (2023). Assessment of caffeine intake in groups of pregnant and breastfeeding women: A cross-sectional analysis. *Clinical Nutrition ESPEN*, *57*, 151-157. https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2023.06.041.

Liu, Q., Liu, Y., Yang, D., Liu, Y., Qiao, W., Hou, J., Wang, Y., Zhang, M., Yang, K., Fan, X, Li, Z., Zhao, J., Chen, L. (2024). Effects of excessive body fat on colostrum lipid patterns: overweight/obese vs. normal weight mothers. *Food Science and Human Wellness*, *13*(6), 3708-3717. https://doi.org/10.26599/FSHW.2024.9250193.

Liu, Y, Liu, X, and Wang, L. (2019). The investigation of fatty acid composition of breast milk and its relationship with dietary fatty acid intake in 5 regions of China. *Medicine*, *98*(24), e15855. http://doi.org/10.1097/MD.0000000000015855.

Lockyer, F., McCann, S., Moore, S.E. (2021). Breast Milk Micronutrients and Infant Neurodevelopmental Outcomes: A Systematic Review. *Nutrients*, *13*(11), 3848. http://doi.org/10.3390/nu13113848.

Lönnerdal, B., Georgieff, M.K., Hernell, O. (2016). Developmental physiology of iron absorption, homeostasis and metabolism in the healthy term infant. *The Journal of Pediatrics*, *167*(4 Suppl), 8–14. http://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.07.014.

Lozano-Grande M.A., Gorinstein S., Esoitia-Rangel E., Davila-Ortiz G., Martinez-Ayala A.L. (2018). Plant sources, extraction methods, and uses of squalene. *International Journal of Agronomy*, *1*, 1829160. http://doi.org/10.1155/2018/1829160.

Luo, G., Zhu, Y., Ni, D., Chen, J., Zhang, W., Mu, W. (2023). Infant formulae – Key components, nutritional value, and new perspectives. *Food Chemistry*, *424*, 136393. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136393.

Ma, Q., Zhang, X., Li, X., Liu, L., Lu, S., Hao, D., Bora, A.F.M., K., K.J.E.-K., Xu, Y., Liu, W., Li, J. (2023). Novel trends and challenges in fat modification of next-generation infant formula: Considering the structure of milk fat globules to improve lipid digestion and metabolism of infants. *Food Research International*, *174*(P1), 113574. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113574.

Makiso, M.U., Tola, Y.B., Ogah, O., Endale, F.L. (2023). Bioactive compounds in coffee and their role in lowering the risk of major public health consequences: A review. *Food Science & Nutrition*, *12*(2), 734-764. http://doi.org/10.1002/fsn3.3848.

Malczyk, E., Wyka, J., Malczyk, A., Larma, K. (2021). Assessment Of Caffeine Intake with Food by Polish Females and Males. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, *72*(3), 273-280. https://doi.org/10.32394/rpzh.2021.0171.

Maldonado-Pereira, L., Barnaba C., Medina-Meza I.G. (2023). Dietary exposure assessment of infant formula and baby foods' oxidized lipids in the US population. *Food and Chemical Toxicology*, *172*, 113552. https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113552.

Mandiá, N., Bermejo-Barrera, P., Herbello, P., López-Suárez, O., Fraga, J.M., Fernández-Pérez, C., Couce, M.L. (2021). Human milk concentrations of minerals, essential and

toxic trace elements and association with selective medical, social, demographic and environmental factors. *Nutrients, 13*(6), 1885. http://doi.org/10.3390/nu13061885.

Markiewicz-Keszycka, M., Czyżak-Runowska, G., Lipińska, P., Wójtowski, J. (2013). Fatty Acid Profile of Milk - A Review. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 57*(2), 135. http://doi.org/10.2478/bvip-2013-0026.

Martin, C.R., Ling, P.-R., Blackburn, G.L. (2016). Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula. *Nutrients*, *8*(5), 279. http://doi.org/10.3390/nu8050279.

Martín-Rodríguez, A., Bustamante-Sánchez, Á., Martínez-Guardado, I., Navarro-Jiménez, E., Plata-SanJuan, E., Tornero-Aguilera, J.F., Clemente-Suárez, V.J. (2022). Infancy Dietary Patterns, Development, and Health: An Extensive Narrative Review. *Children (Basel)*, *9*(7), 1072. http://doi.org/10.3390/children9071072.

Martysiak-Żurowska, D., Kiełbratowska, B., Szlagatys-Sidorkiewicz, A. (2021). The content of conjugated linoleic acid and vaccenic acid in the breast milk of women from Gdansk and the surrounding district, as well as in, infant formulas and follow-up formulas. nutritional recommendation for nursing women. *Journal of Mother and Child, 22*(2), 128–134. http://doi.org/10.34763/devperiodmed.20182202.128134.

Maryniak, N.Z., Sancho, A.I., Hansen, E.B., Bøgh, K.L. (2022). Alternatives to cow's milk-based infant formulas in the prevention and management of cow's milk allergy. *Foods*, *11*(7), 926. http://doi.org/10.3390/foods11070926.

Masum, A.K.M., Chandrapala, J., Huppertz, T., Adhikari, B., Zisu, B. (2021). Production and characterization of infant milk formula powders: a review. *Drying Technology*, *39*(11), 1492–1512. http://doi.org/10.1080/07373937.2020.1767645.

McCreedy, A., Bird, S., Brown, L.J., Shaw-Stewart, J., Chen, Y.-F. (2018). Effects of maternal caffeine consumption on the breastfed child: A systematic review. *Swiss Medical Weekly*, *148*(3940), 14665. http://doi.org/10.4414/smw.2018.14665.

Mendonça, M.A., Araújo, W.M.C., Borgo, L.A., Alencar, E.R. (2017). Lipid profile of different infant formulas for infants. *PLoS One*, *12*(6), e0177812. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0177812.

Meng, F., Uniacke-Lowe, T., Ryan, A.C., Kelly, A.L. (2021). The composition and physico-chemical properties of human milk: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *112*, 608-621. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.040.

M&C Saatchi World Services. (2022). Multi-country study examining the impact of marketing of breast-milk substitutes on infant feeding decisions and practices: Commissioned report (WHO/UHL/MCA/22.01). *World Health Organization & United Nations Children's Fund (UNICEF)*. Pobrane z: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/354094/WHO-UHL-MCA-22.01-eng.pdf (27.02.2025)

Micera, M., Botto, A., Geddo, F., Antoniotti, S., Bertea, C.M., Levi, R., Gallo, M.P., Querio, G. (2020). Squalene: More than a Step toward Sterols. *Antioxidants*, *9*(8), 688. https://doi.org/10.3390/antiox9080688.

Miettinen, H.E., Rono, K., Koivusalo, S., Stach-Lempinen, B., Poyhonen-Alho, M., Eriksson, J.G., Hiltunen, T.P., Gylling, H. (2014). Elevated serum squalene and cholesterol synthesis markers in pregnant obese women with gestational diabetes mellitus. *Journal of Lipid Research, 55*(12), 2644–2654. http://doi.org/10.1194/jlr.P049510.

Miliku, K., Duan, Q. L., Moraes, T. J., Becker, A. B., Mandhane, P. J., Turvey, S. E., Lefebvre, D. L., Sears, M. R., Subbarao, P., Field, C. J., Azad, M. B. (2019). Human milk fatty acid composition is associated with dietary, genetic, sociodemographic, and environmental factors in the CHILD Cohort Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, *110*(6), 1370–1383. https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz229.

Milk Consumption by Country 2024. Pobrane z: https://worldpopulationreview.com/country-rankings/milk-consumption-by-country (10.02.2025)

Molska, A., Gutowska, I., Baranowska-Bosiacka, I., Nocen, I., Chlubek, D. (2014). The content of elements in infant formulas and drinks against mineral requirements of children. *Biological Trace Element Research*, *158*, 422–427. http://doi.org/10.1007/s12011-014-9947-1.

Moltó-Puigmartí, C., Castellote, A.I., Carbonell-Estrany, X., López-Sabater, M.C. (2011). Differences in fat content and fatty acid proportions among colostrum, transitional, and mature milk from women delivering very preterm, preterm, and term infants. *Clinical Nutrition*, *30*(1), 116–123. http://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.07.013.

Moraes, M.R., Da Silva, E.N., Sanches, V.L., Cadore, S., Godoy, H.T. (2021). Bioaccessibility of some minerals in infant formulas. *International Journal of Food Science & Technology*, *59*(5), 2004–2012. http://doi.org/10.1007/s13197-021-05215-0.

Moreno-Rojas, R., Cañal-Ruiz, C., Amaro-López, M.A., Cámara-Martos, F. (2015). Probabilistic assessment of the intake of mineral and trace elements by consumption of infant formulas and processed cereal-based food in Spain. *CyTA - Journal of Food*, *13*(2), 243–252. https://doi.org/10.1080/19476337.2014.946094.

Mostafa, H.S. (2022). Assessment of the caffeine-containing beverages available in the local markets, and development of a real energy drink based on the date fruit. *Food Science and Technology*, *42*(1), e51820. https://doi.org/10.1590/fst.51820.

Munblit, D., Treneva, M., Peroni, D.G., Colicino, S., Chow, L., Dissanayeke, S., Abrol, P., Sheth, S., Pampura, A., Boner, A.L., Warner, J.O. (2016). Colostrum and mature human milk of women from London, Moscow, and Werona: Determinants of immune composition. *Nutrients*, *8*(11), 695. http://doi.org/10.3390/nu8110695.

Nehlig, A. (2013). The neuroprotective effects of cocoa flavanol and its influence on cognitive performance. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *75*(3), 716-727. http://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04378.x.

Nieto-Ruiz, A., Diéguez, E., Sepúlveda-Valbuena, N., Herrmann, F., Cerdó, T., López-Torrecillas, F., De-Castellar, R., Jiménez, J., Pérez-García, M., Miranda, M.T., Catena, A., García-Santos, J.A., Bermúdez, M.G., Campoy, C. (2020). The effects of an Infant formula enriched with milk fat globule membrane, long-chain polyunsaturated fatty acids and synbiotics on child behavior up to 2.5 years old: The COGNIS Ssudy. *Nutrients*, *12*(12), 3825. http://doi.org/10.3390/nu12123825.

Olagnero, G., Barretto, L., Wiedemann, A., Terraza, R., Poy, M.S., López, L. (2018). Maternal understanding regardins women nutrition during breastfeeding. *Health, 10*(12), 1661–1672. http://doi.org/10.4236/health.2018.1012125.

Ostertag, F., Hinrichs, J. (2023). Enrichment of Lactoferrin and Immunoglobulin G from Acid Whey by Cross-Flow Filtration. *Foods*, *12*(11), 2163. https://doi.org/10.3390/foods12112163.

Parlak Z., Gürel, D.İ., Soyer, Ö, Şekerel, B.E., Şahiner, Ü.M. (2023). Nutritional risks in children with food allergy. *Turkish Journal of Medical Sciences, 54*(4), 845-858. http://doi.org/10.55730/1300-0144.5648.

Paszczyk, B., Tońska, E. (2022). Fatty acid content, lipid quality indices, and mineral composition of cow milk and yogurts produced with different starter cultures enriched with *Bifidobacterium bifidum*. *Applied Sciences*, *12*(13), 6558. https://doi.org/10.3390/app12136558.

Pawłowska-Muc, A.K., Łepecka-Klusek, C., Stadnicka, G., Pilewska-Kozak, A.B. (2015). Używki w ciąży—Kofeina. *Journal of Education, Health and Sport, 5*(6), 395–406. http://doi.org/10.5281/zenodo.18817.

Petersohn, I., Hellinga, A.H., Van Lee, L., Keukens, N., Bont, L., Hettinga, K.A., Feskens, E.J.M., Brouwer-Brolsma, E.M. (2024). Maternal diet and human milk composition: an updated systematic review. *Frontiers in Nutrition*, *10*, 1320560. https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1320560.

Pietrzak-Fiećko, R., Kamelska-Sadowska, A.M. (2020). The comparision of nutritional value of human milk with other mammals' milk. *Nutrients*, *12*(5), 1404. http://doi.org/10.3390/nu12051404.

Planning Committee for a Workshop on Potential Health Hazards Associated with Consumption of Caffeine in Food and Dietary Supplements, Food and Nutrition Board, Board on Health Sciences Policy; Institute of Medicine. (2014). *Caffeine in Food and Dietary Supplements: Examining Safety: Workshop Summary*. Waszyngton: National Academies Press (US). http://doi.org/10.17226/18607.

Popa, O., Băbeanu, N.E., Popa, I., Niță, S., Dinu-Pârvu, C.E. (2015). Methods for Obtaining and Determination of Squalene from Natural Sources. *Biochemistry Research International, 2015*(1), 367202. https://doi.org/10.1155/2015/367202.

Pozos-Brewer, R. (2015). Coffee Shops: Exploring Urban Sociability and Social Class in the Intersection of Public and Private Space. Pobrane z https://scholarship.tricolib.brynmawr.edu/server/api/core/bitstreams/737dc7c8-ee19-4473-bd58-3661db7ae1b7/content (19.02.2025)

Przysławski, J., Borawska, M., Biernat, J. (2013). Metody badań sposobu żywienia ludzi dorosłych. W: A. Gronowska-Senger (red.), *Przewodnik metodyczny badań sposobu żywienia* (s. 89-95). Warszawa: Komitet Nauki o Żywieniu Człowieka Polskiej Akademii Nauk.

Rajaratnam, R., Gylling, H., Miettinen, T. (2000). Independent association of serum squalene and noncholesterol sterols with coronary artery disease in postmenopausal women. *Journal of the American College of Cardiology*, *35* (5) 1185–1191. https://doi.org/10.1016/S0735-1097(00)00527-1.

Ran-Ressler, R.R., Bae, S.E., Lawrence, P., Wang, D.H., Brenna, T. (2014). Branched-chain fatty acid content of foods and estimated intake in the USA. *British Journal of Nutrition, 112*(4), 565–572. http://doi.org/10.1017/S0007114514001081.

Relas, H., Gylling, H., Miettinen, T.A. (2000). Dietary squalene increases cholesterol synthesis measured with serum non-cholesterol sterols after a single oral dose in humans. *Atherosclerosis*, *152*(2), 377-383. http://doi.org/10.1016/s0021-9150(99)00478-5.

Ren, Q., Li, K., Li, J., Liu, Y., Chen, Y., Xu, Y., Xie, Q. (2024). Longitudinal changes in human milk minerals and vitamins in the Chinese population: A scoping review. *Nutrients, 16*(11), 1710. https://doi.org/10.3390/nu16111710.

Resman, B.H., Blumenthal, H.P., Jusko, W.J. (1977). Breast milk distribution of theobromine from chocolate. *The Journal of Pediatrics*, *91*(3), 477-480. https://doi.org/10.1016/S0022-3476(77)81329-2.

Reyes, C.M., Cornelis, M.C. (2018). Caffeine in the Diet: Country-Level Consumptionand Guidelines. *Nutrients*, *10*(11), 1772. http://doi.org/10.3390/nu10111772.

Rios-Leyvraz,. M., Yao, Q. (2023). Calcium, zinc, and vitamin D in breast milk: a systematic review and meta-analysis. *International Breastfeeding Journal*, *18*, 27. https://doi.org/10.1186/s13006-023-00564-2.

Rollins, N.C., Bhandari, N., Hajeebhoy, N., Horton, S., Lutter, C.K., Martines, J.C., Piwoz, E., Richter, L.M., Victoria, C.G., The Lancet Breastfeeding Series Group. (2016). Why

invest, and what it will take to improve breastfeeding practices? *The Lancet*, *387*(10017), 491–504. http://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01044-2.

Ronco A.L., De Stefani E., Ronco A. (2013). Squalene: a multi-task link in the crossroads of cancer and aging. *Functional Foods in Health and Disease*, *3*(12), 462-476. http://doi.org/10.31989/ffhd.v3i12.30.

Rosales-Garcia, T., Martinez, C.J., Ortiz, G.D. (2017). Squalene Extraction: Biological Sources and Extraction Methods. *International Journal of Environment Agriculture and Biotechnology*, *2*(4), 1662-1670. http://doi.org/10.22161/ijeab/2.4.26.

Ross, M.G., Kavasery, M.P., Cervantes, M.K., Han, G., Horta, B., Coca, K.P., Costa, S.O., Desai, M. (2024). High-Fat, High-Calorie Breast Milk in Women with Overweight or Obesity and Its Association with Maternal Serum Insulin Concentration and Triglycerides Levels. *Children*, *11*(2), 141. https://doi.org/10.3390/children11020141.

Rozporządzenie Delegowane Komisji (UE) 2016/127. Pobrane z https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R0127 (22.01.2025).

Ruiz-Núñez, B., Dijck-Brouwer, D.A.J., Muskiet, F.A.J. (2016). The relation of saturated fatty acids with low-grade inflammation and cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *36*, 1-20. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.12.007.

Rychlik E., Woźniak A., Stoś K., Mojska H. (2024). Wprowadzenie. W: E. Rychlik, K. Stoś, A. Woźniak, H. Mojska (red.), *Normy żywienia dla populacji Polski* (s.15). Warszawa: Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Instytut Badawczy.

Rychlik, E., Woźniak, A., Jarosz, M. (2020). Woda i elektrolity. W: M. Jarosz, E. Rychlik, K. Stoś, J. Charzewska (red.). *Normy żywienia dla populacji Polski i ich zastosowanie* (s. 316-345). Warszawa: Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego—Państwowy Zakład Higieny.

Samoggia, A., Rezzaghi, T. (2021). The Consumption of Caffeine-Containing Products to Enhance Sports Performance: An Application of an Extended Model of the Theory of Planned Behavior. *Nutrients*, *13*(12), 344. http://doi.org/10.3390/nu13020344.

Samuel, T.M., Zhou, Q., Giuffrida, F., Munblit, D., Verhasselt, V., Thakkar, S.K. (2020). Nutritional and Non-nutritional Composition of Human Milk Is Modulated by Maternal, Infant, and Methodological Factors. *Frontiers in Nutrition*, *7*, 576133. http://doi.org/10.3389/fnut.2020.576133.

Sandri, E., Pardo, J., Larumbe, E.C., Olmedo, G., Falcó, A. (2024). Analysis of the influence of educational level on the nutritional status and lifestyle habits of the young Spanish population. Frontiers in Public Health, 12, 1341420. http://doi.org/10.3389/fpubh.2024.1341420.

Sánchez-Hernández, S., Estaban-Muñoz, A., Giménez-Martínez, R., Aguilar-Cordero, M.J., Miralles-Buraglia, B., Olalla-Hrrera, M. (2019). Comparison of Changes in the Fatty Acid Profile of Human Milk of Spanish Lactating Women during the First Month of Lactation Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. A Comparison with Infant Formulas. *Nutrients, 11*(12), 3055. http://doi.org/10.3390/nu11123055.

Shimizu, N., Ito J., Kato S., Otoki Y., Goto M., Eitsuka T., Miyazawa T., Nakagawa K. (2018). Oxidation of squalene by singlet oxygen and free radicals results in different compositions of squalene monohydroperoxide isomers. *Scientific Reports*, *8*, 9116. http://doi.org/10.1038/s41598-018-27455-5.

Shumayla, S., Irfan, E.M., Kathuria, N., Rathi, S.K., Srivastava, S., Mehra, S. (2022). Minimum dietary diversity and associated factors among lactating mothers in Haryana, India: a

community based cross-sectional study. *BMC Pediatrics*, *22*(1), 525. http://doi.org/10.1186/s12887-022-03588-5.

Simon Sarkadi, L., Zhang, M., Muránszky, G., Vass, R. A., Matsyura, O., Benes, E., & Vari, S. G. (2022). Fatty Acid Composition of Milk from Mothers with Normal Weight, Obesity, or Gestational Diabetes. *Life, 12*(7). https://doi.org/10.3390/life12071093

Soyyılmaz, B., Mikš, M.H., Röhrig, C.H., Matwiejuk, M., Meszaros-Matwiejuk, A., Vigsnæs, L.K. (2021). The Mean of Milk: A Review of Human Milk Oligosaccharide Concentrations throughout Lactation. *Nutrients*, *13*(8), 2737. https://doi.org/10.3390/nu13082737.

Stoffel, N.U., Cepeda-López, A.C., Zeder, C., Herter-Aeberli, I., Zimmermann, M.B. (2024). Measurement of iron absorption and iron gains from birth to 6 months in breastfed and formula-fed infants using iron isotope dilution. *Science Advances, 10*(28), eado4262. http://doi.org/10.1126/sciadv.ado4262.

Szajewska H. (2023). Wybory mają znaczenie. O czym warto wiedzieć, wybierając mleko dla niemowląt? *Standardy Medyczne/Pediatria*, *20*, 642-654.

Szajewska H., Horvath A., Rybak A., Socha P. (2016). Karmienie piersią. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci. *Standardy Medyczne/Pediatria*, *13*, 9-24.

Szajewska, H., Socha, P., Horvath, A., Rybak, A., Zalewski, B.M., Nehring-Gugalska, M., Mojska, H., Czerwionka-Szaflarska, M., Gajewska, D., Helwich, E., Jackowska, T., Książyk, J., Lauterbach, R., Olczak-Kowalczyk, D., Weker, H. (2021). Zasady żywienia zdrowych niemowląt. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci. *Standardy Medyczne/Pediatria*, *18*, 805-822. http://doi.org/10.17444/SMP2021.18.02.

Szlapinski, A.K., Charrette, A., Guthrie, N., Hilmas, C.J. (2023). Paraxanthine safety and comparison to caffeine. *Frontiers in Toxiocology*, *5*, 1117729. http://doi.org/:10.3389/ftox.2023.1117729.

Szyller, H., Antosz, K., Batko, J., Mytych, A., Dziedziak, M., Wrześniewska, M., Braksator, J., Pytrus, T. (2024). Bioactive Components of Human Milk and Their Impact on Child's Health and Development, Literature Review. *Nutrients*, *16*(10), 1487; https://doi.org/10.3390/nu16101487.

Temple, J.L., Bernard, C., Liphultz, S.E., Czachor, J.D., Westphal., J.A., Mestre, M.A. (2017). The Safety of Ingested Caffeine: A Comprehensive Review. *Frontiers in Psychiatry*, *8*, 80. http://doi.org/10.3389/fpsyt.2017.00080.

Tjan T.S.L. (2001). Squalene the miraculous essential omega 2 oil. Secrets from the sea, published on-line Natural Sources for Health. *Science for Life*. Pobrane z https://www.medicinacomplementar.com.br/biblioteca/pdfs/Cancer/esqualeno-no-cancer-squalene.pdf. (17.02.2025)

Tomaszewski, M., Burdan, F., Olchowik, G., Tomaszewska, M. (2016). The effects of caffeine administered at different temperatures on foetal development. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *23*(1), 148-152. https://doi.org/10.5604/12321966.1196871.

Tonini, C., Segatto, M., Pallottini, V. (2020). Impact of Sex and Age on the Mevalonate Pathway in the Brain: A Focus on Effects Induced by Maternal Exposure to Exogenous Compounds. *Metabolites*, *10*(8), 304. http://doi.org/10.3390/metabo10080304.

Tounian, P., Bellaïche, M., Legrand, P. (2021). ARA or no ARA in infant formulae, that is the question. *Archives de Pédiatrie, 28*(1), 69–74. http://doi.org/10.1016/j.arcped.2020.10.001.

Tyrala, E.E., Dodson, W.E. (1979). Caffeine secretion into breast milk. *Archives of Disease in Childhood*, *54*(10), 787-800. http://doi.org/10.1136/adc.54.10.787.

Vandenplas, Y., Gutierrez Cavtrellon, P., Rivas, R., Jimenez Gutiérrez, C., Diaz Garcia, L., Estevez Jimenez, J., Anzo, A., Hegar, B., Alarcon, P. (2014). Safety of soya-based infant formulas in children. *British Journal of Nutrition*, *111*(8), 1340–1360. http://doi.org/10.1017/S0007114513003942.

Verster, J.C., Koenig, J. (2018). Caffeine intake and its sources: A review of national representative studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *58*(8), 1250-1259, http://doi.org/10.1080/10408398.2016.1247252.

Viartisiwi, N., Trihartono, A. (2020). Café in small towns: A picture of the weakening social engagement. *Archives*, *15*, e151687. http://doi.org/10.25186/cs.v15i.1687.

Wang, X., Wang, X., Chen, Y., Jin, W., Jin, Q., Wang, X. (2020). Enrichment of branched chain fatty acids from lanolin via urea complexation for infant formula use. *LWT-Food Science and Technology*, *117*, 108627. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108627.

Wang, Y., Wang, Z., Gui, P. Zhang, B., Xie, Y. (2023). Coffee and caffeine intake and depression in postpartum women: A cross-sectional study from the National Health and Nutrition Examination Survey 2007–2018. *Frontiers in Psychology*, *14*, 1134522. http://doi.org/10.3389/fpsyg.2023.1134522.

Wei, M., Deng, Z., Liu, B., Fan, Y., Liu, R., Li, J. (2020). Investigation of amino acids and minerals in Chinese breast milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(10), 3920-3931. http://doi.org/10.1002/jsfa.10434.

Whiteside P., Miner B. (1984). *Pye Unicam Atomic Absorption Data Book*; Pye Unicam Ltd.: Cambridge, UK.

Witczak, A., Pohoryło, A., Abdel-Gawad, H. (2021). Endocrine-Disrupting Organochlorine Pesticides in Human Breast Milk: Changes during Lactation. *Nutrients*, *13*, 229. 229. https://doi.org/10.3390/nu13010229.

Wojtasik, A., Woźniak, A., Stoś, K., Jarosz, M. (2020). Składniki mineralne. W: M. Jarosz, E. Rychlik, K. Stoś, J. Charzewska (red.). *Normy żywienia dla populacji Polski i ich zastosowanie* (s. 273-315). Warszawa: Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego—Państwowy Zakład Higieny.

World Health Organization (WHO) (2025). Pobrane z: https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/topic-details/GHO/body-mass-index (17.03.2025)

Wu, D., Zhang, L., Zhang, Y., Shi, J., Tan, C.P., Zheng, Z., Liu, Y. (2023). Lipid Profiles of Human Milk and Infant Formulas: A Comparative Lipidomics Study. *Foods*, *12*(3), 600. https://doi.org/10.3390/foods12030600.

Xi, Q., Liu, W., Zeng, T., Chen, X., Luo, T., Deng, Z. (2023). Effect of Different Dietary Patterns on Macronutrient Composition in Human Breast Milk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, *15*(3), 485. http://doi.org/10.3390/nu15030485.

Xu, W.-H., Chen, Y.-R., Tian, H.-M., Chen, Y.-F., Gong, J.-Y., Yu, H.-T., Liu, G.-L., Xie, L. (2023). Effects of dietary PUFA patterns and FADS genotype on breast milk PUFAs in Chinese lactating mothers. Genes & Nutrition, *18*, 16. https://doi.org/10.1186/s12263-023-00735-0.

Xue, H., Zhang, M., Ma, J., Chen, T., Wang, F., Tang, X. (2020). Lactose-Induced Chronic Diarrhea Results From Abnormal Luminal Microbial Fermentation and Disorder of Ion

Transport in the Colon. *Frontiers in Physiology*, *11*, 877. http://doi.org/10.3389/fphys.2020.00877.

Yan, Y. (2022). Work-Life Balance Issues of Women in Returning to Work due to Childbirth—Using TEM Analysis. *Open Journal of Social Sciences*, *10*, 487-497. http://doi.org/10.4236/jss.2022.104035.

Yang, Z., Jiang, R., Li, H., Wang, J., Duan, Y., Pang. X., Jiang, S., Bi, Y., Zhang, H., Wang, S., Lönnerdal, B., Lai, J., Yin, S. (2022a). Human milk cholesterol is associated with lactation stage and maternal plasma cholesterol in Chinese populations. *Pediatric Research*, *91*, 970-976. https://doi.org/10.1038/s41390-021-01440-7.

Yang, Y., Li, G., Li, F., Xu, F., Hu, P., Xie, Z., Lu, X., Ding, Y., Wang, Z. (2022b). Impact of DHA from Algal Oil on the Breast Milk DHA Levels of Lactating Women: A Randomized Controlled Trial in China. *Nutrients*, *14*(16), 3410. http://doi.org/10.3390/nu14163410.

Yasuda, H., Tsatsui, T. (2016). Infants and elderlies are susceptible to zinc deficiency. *Scientific Reports*, *6*, 21850. https://doi.org/10.1038/srep21850.

Yi, D.Y., Kim, S.Y. (2021). Human Breast Milk Composition and Function in Human Health: From Nutritional Components to Microbiome and MicroRNAs. *Nutrients*, *13*(9), 3094. https://doi.org/10.3390/nu13093094.

Yuan, T., Wang, L., Jin, J., Mi, L., Pang, J., Liu, Z., Gong, J., Sun, C., Li, J., Wei, W., Jin, Q., Wang, X. (2022). Role Medium-Chain Fatty Acids in the Lipid Metabolism of Infants. *Frontiers in Nutrition*, *9*, 804880. http://doi.org/10.3389/fnut.2022.804880.

Yuan, T., Wei, W., Wang, X., Jin, Q. (2020). Biosynthesis of structured lipids enriched with medium and long-chain triacylglycerols for human milk fat substitute. *LWT – Food Science and Technology*, *128*(7), 109255. http://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109255.

Zhang, Y, Zhang, X, Mi, L, Li, C, Zhang, Y, Bi, R, Pang, J, Li, Y. (2022). Comparative Proteomic Analysis of Proteins in Breast Milk during Different Lactation Periods. *Nutrients*, *14*(17), 3648. https://doi.org/10.3390/nu14173648.

Zhao, A., Ning, Y., Zhang, Y., Yang, X., Wang, J., Li, W., Wang, P. (2014). Mineral compositions in breast milk of healthy Chinese lactating women in urban areas and its associated factors. *Chinese Medical Journal*, *127*(14), 2643–2648.

Zielinska-Pukos, M.A., Bryś, J., Wesolowska, A., Hamulka, J. (2022). Breastmilk PUFA strongly associated with maternal dietary intake but not anthropometric parameters and breastmilk carotenoids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *186*, 102505. https://doi.org/10.1016/j.plefa.2022.102505.

Zielińska-Tomaszewska, J., Bukowska, B., Tomaszewski, K. (2019). Tłuszcze—Wielcy sprzymierzeńcy zdrowia (cd.). *Food Forum*, 6, 1–5.

10. Spis tabel i rysunków

Spis tabel

Tabela 1. Charakterystyka preparatów dla niemowląt wykorzystanych w poszczególnych publikacjach rozprawy doktorskiej.

Tabela 2. Informacje dotyczące spożycia artykułów żywnościowych bogatych w kofeinę zebrane za pomocą metody bieżącego spożycia żywności.

Tabela 3. Profil kwasów tłuszczowych w badanych konwencjonalnych i specjalistycznych IFs, %.

Tabela 4. Ocena zgodności zawartości PUFA ogółem oraz poszczególnych PUFA w IFs.

Tabela 5. Wskaźniki jakości lipidów oszacowane dla badanych konwencjonalnych i specjalistycznych IFs.

Spis rysunków

Rysunek 1. Zależność pomiędzy spożyciem kofeiny a jej zawartością w mleku kobiecym (r = 0.72).

Rysunek 2. Dendrogram hierarchicznej analizy skupień dla wskaźników jakości lipidów w badanych IFs.

11. Pozostała działalność naukowa

Artykuły opublikowane w recenzowanych czasopismach znajdujących się w wykazie MNiSW/MEiN

1. **Purkiewicz, A.**, Wiśniewski, P., Tańska, M., Pietrzak-Fiećko, R. (2024). Effect of the Storage Conditions on the Microbiological Quality and Selected Bioactive Compound Content in Fruit Mousses for Infants and Young Children. *Applied Sciences*, *14*(23), 11347; https://doi.org/10.3390/app142311347. ($MEiN_{2024}$=100, IF=2.5)
2. **Purkiewicz, A.**, Gul, F.H., Pietrzak-Fiećko, R. (2024). The Utilization of Vegetable Powders for Bread Enrichment—The Effect on the Content of Selected Minerals, Total Phenolic and Flavonoid Content, and the Coverage of Daily Requirements in the Human Diet. *Applied Sciences*, *14*(21), 10022. https://doi.org/10.3390/app142110022. ($MEiN_{2024}$=100, IF=2.5)
3. Tańska, M., Browarek, J., Ruszkowska, M., **Purkiewicz, A.** (2024). Comparative Study on the Incorporation of Lesser Mealworm (*Alphitobius diaperinus*) and House Cricket (*Acheta domesticus*) Powders into Shortbread Cookies: Effects on Physical, Chemical and Sensory Properties. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, *74*(3), 280-292. https://doi.org/10.31883/pjfns/192341. ($MEiN_{2024}$=100, IF=2.3)
4. Karabulut, G., **Purkiewicz A.**, Goksen, G. (2024). Recent developments and challenges in algal protein and peptide extraction strategies, functional and technological properties, bioaccessibility, and commercial applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *23*(3), e13372. https://doi.org/10.1111/1541-4337.13372. ($MEiN_{2024}$=200, IF=12.0)
5. **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R. (2024). Determination of the Fatty Acid Profile and Lipid Quality Indices in Selected Infant Formulas. *Molecules*, *29*(9), 2044. https://doi.org/10.3390/molecules29092044. ($MEiN_{2024}$=140, IF=4.2)
6. **Purkiewicz, A.**, Stasiewicz, M., Nowakowski, J.J., Pietrzak-Fiećko, R. (2023). The Influence of the Lactation Period and the Type of Milk on the Content of Amino Acids and Minerals in Human Milk and Infant Formulas. *Foods*, *12*(19), 3674. https://doi.org/10.3390/foods12193674. ($MEiN_{2023}$=140, IF=4.7)
7. Łuczyńska, J., Pietrzak-Fiećko, R., **Purkiewicz A.**, Łuczyński, M.J. (2022). Assessment of Fish Quality Based on the Content of Heavy Metals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(4), 2307. https://doi.org/10.3390/ijerph19042307. ($MEiN_{2022}$=140, IF=4.614)
8. Zakrzewski, A., **Purkiewicz, A.**, Jakuć, P., Wiśniewski, P., Sawicki, T., Chajęcka-Wierzchowska, W., Tańska, M. (2022). Effectiveness of various solvent-produced thyme (Thymus vulgaris) extracts in inhibiting the growth of Listeria monocytogenes in frozen vegetables. *NFS Journal*, *29*, 26-34. https://doi.org/10.1016/j.nfs.2022.09.004. ($MEiN_{2022}$ =140)
9. **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R. (2021). Antioxidant Properties of Fruit and Vegetable Whey Beverages and Fruit and Vegetable Mousses. *Molecules*, *26*(11), 3126. https://doi.org/10.3390/molecules26113126. ($MEiN_{2021}$=140, IF=4.927)

10. **Purkiewicz, A.**, Kamelska-Sadowska, A.M., Ciborska, J., Mikulska, J., Pietrzak-Fiećko, R. (2021). Risk Factors for Eating Disorders and Perception of Body in Young Adults Associated with Sex. *Nutrients*, *13*(8), 2819. https://doi.org/10.3390/nu13082819. ($MEiN_{2021}$=140, IF=6.706)
11. **Purkiewicz, A.**, Ciborska, J., Tańska, M., Narwojsz, A., Starowicz, M., Przybyłowicz, K.E., Sawicki, T. (2020). The Impact of the Method Extraction and Different Carrot Variety on the Carotenoid Profile, Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of Juices. *Plants*, *9*(12), 1759. https://doi.org/10.3390/plants9121759. ($MEiN_{2020}$=70, IF=3.935)

Artykuły opublikowane w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż znajdujące się w wykazie MNiSW/MEiN

1. **Purkiewicz, A.** (2025). Alergia na białka mleka krowiego – rodzaje, występowanie, objawy i leczenie. *Przegląd Mleczarski*, *1*, 30-35. ($MEiN_{2024}$=5)
2. **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R., Klepacka J. Mleko i jego wyroby w diecie kobiet ciężarnych – aspekt żywieniowy i zdrowotny. SUP-RIM Sieć badawcza uczelni przyrodniczych na rzecz rozwoju polskiego sektora mleczarskiego – projekt badawczy. Sieć Uczelni Przyrodniczych – Rozwój Innowacyjnego Mleczarstwa.
3. **Purkiewicz, A.** (2024). Wzbogacanie mleka i produktów mleczarskich w wybrane składniki odżywcze. *Przegląd Mleczarski*, *6*, 38-43. ($MEiN_{2024}$=5)
4. **Purkiewicz, A.** (2023). Wpływ żywienia krów na jakość mleka. *Przegląd Mleczarski*, *2*, 35-40. ($MEiN_{2023}$=40)
5. **Purkiewicz, A.** (2023). Sery dojrzewające – wartość odżywcza i potencjał prozdrowotny. *Przegląd Mleczarski*, *9*, 47. ($MEiN_{2023}$=40)
6. Złotkowska, K., **Purkiewicz, A.** (2023). Innowacyjne opakowania w przemyśle mleczarskim. *Przegląd Mleczarski*, *12*. ($MEiN_{2023}$=40)
7. Złotkowska, K., **Purkiewicz, A.** (2022). Dodatki do żywności - znaczenie i bezpieczeństwo stosowania. *Przegląd Mleczarski*, *9*, 23-30. ($MEiN_{2022}$=5)
8. Lisińska, K., **Purkiewicz, A.** (2022). Mleko i produkty mleczarskie w diecie kobiet ciężarnych - aspekt żywieniowy. *Przegląd Mleczarski*, *2*, 15-18. ($MEiN_{2022}$=5)
9. Lisińska, K., **Purkiewicz, A.** (2022). Mleko i produkty mleczne jako źródło antyoksydantów. *Przegląd Mleczarski*, *5*, 38-44. ($MEiN_{2022}$=5)
10. **Purkiewicz, A.**, Ciborska, J. (2021). Wartość odżywcza mleka i jego przetworów - istotny element świadomości żywieniowej konsumenta. *Przegląd Mleczarski*, *9*, 3-8. ($MEiN_{2021}$=5)
11. **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R. (2020). Mleko ssaków jako źródło makroskładników mineralnych w diecie człowieka. *Przegląd Mleczarski*, *9*, 7-15. ($MEiN_{2020}$=5)
12. **Purkiewicz, A**., Jakuć, P., Ciborska, J. (2020). Wartość odżywcza i zastosowanie mąk z warzyw w przemyśle zbożowym i piekarskim. *Przegląd Zbożowo-Młynarski*, *64*(6), 20-23. ($MEiN_{2020}$=5)

13. **Purkiewicz, A.**, Ciborska, J. (2020). Mikrokapsułkowanie składników żywności aspekty technologiczne i żywieniowe. *Przemysł Spożywczy*, *74*(5), 15-17. http://doi.org/10.15199/65.2020.5.3. ($MEiN_{2020}$=20)
14. **Purkiewicz, A.**, Ciborska, J. (2019). Mleko i napoje roślinne w żywieniu - czy zawsze alternatywnie? *Przegląd Mleczarski*, *7*, 3-8. ($MEiN_{2019}$=5)

Rozdziały w monografiach pokonferencyjnych

1. Prostko, P., **Purkiewicz A.** (2023). Novel Food w odpowiedzi na potrzeby konsumenta. Poszerzamy horyzonty. Tom 39 / Red. nauk. Renata Matysik-Pejas, Małgorzata Bogusz, Paweł Dziekański, Piotr Rachwał, Mateusz Weiland Network Solutions, Słupsk, s. 77-85. ISBN: 978-83-63216-91-7 ($MEiN_{2023}$=5)
2. **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R. (2022). Zaburzenia odżywiania kobiet w ciąży. Kalejdoskop naukowy. Red. Anna Cieślińska, Dominika Rozmus, Wydawnictwo Naukowe FNCE, 2022, Poznań, s. 7-19. ISBN: 978-83-67372-18-3 ($MEiN_{2022}$=20)
3. Mikulska, J., **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R. (2022). Wpływ czynników kulturowych na manifestowanie się u młodzieży zaburzeń żywieniowych pod postacią anoreksji psychicznej – praca przeglądowa. Kalejdoskop naukowy. Red. Anna Cieślińska, Dominika Rozmus, Wydawnictwo Naukowe FNCE, Poznań, s. 72-82, ISBN: 978-83-67372-18-3 ($MEiN_{2022}$=20)
4. **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R. (2022). Zmiany w sposobie postrzegania karmienia naturalnego na przestrzeni lat. Redakcja naukowa: Monika Beszterda-Buszczak, Monika Przeor, Wyd. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Poznań, s. 85-94. http://doi.org/10.17306/m.978-83-67112-29-1. ISBN: 978-83-67112-27-7 ($MEiN_{2022}$=20)
5. Jakuć, P., **Purkiewicz, A.**, Zakrzewski, A., Wiśniewski, P. (2021). Zawartość związków fenolowych i aktywność przeciwutleniająca ekstraktów z tymianku (*Thymus vulgaris L.*) otrzymanych za pomocą różnych rozpuszczalników. Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce, Nauki przyrodnicze. Fauna i flora., Red. Dr Jędrzej Nyćkowiak, dr hab. Jacek Leśny, prof. UPWR. Wyd. Młodzi Naukowcy, Poznań, s. 98-104. ISBN: 978-83-66392-91-5 ($MEiN_{2021}$=5)
6. Zakrzewski, A., Wiśniewski, P., **Purkiewicz, A.**, Jakuć, P. (2021). Zdolność tworzenia biofilmu przez pałeczki *Listeria monocytogenes* izolowane z warzyw mrożonych. Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce, Nauki przyrodnicze. Fauna i flora., Red. Dr Jędrzej Nyćkowiak, dr hab. Jacek Leśny, prof. UPWR. Wyd. Młodzi Naukowcy, Poznań, s. 138-144. ISBN: 978-83-66392-91-5 ($MEiN_{2021}$=5)
7. Marcinkowska, W., **Purkiewicz, A.**, Jagłowski, S. (2021). Porównanie właściwości antyoksydacyjnych wybranych ziół. Aktualne problemy badawcze. Nauki społeczne i humanistyczne. Tom 2. Red. Aneta Cierechowicz, Aleksandra Cichowska, Marta Chelińska, Wydawnictwo Naukowe FNCE, Poznań, s. 517-526. ISBN: 9788366800717. ($MEiN_{2021}$=20)
8. **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R., Radzymińska, M. (2020). Zachowania żywieniowe kobiet w ciąży z województwa warmińsko-mazurskiego. Bezpieczeństwo

żywności, Red. Aneta Ocieczek, Wyd. Uniwersytet Morski w Gdyni, Gdynia, s. 74-85. ISBN: 978-83-7421-343-1 ($MEiN_{2020}$=20)

9. **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R. (2020). Analiza zawartości wybranych związków chloroorganicznych obniżających jakość zdrowotną żywności dla niemowląt. Bezpieczeństwo żywności, Red. Aneta Ocieczek, Wyd. Uniwersytet Morski w Gdyni, Gdynia. ISBN: 978-83-7421-343-1 ($MEiN_{2020}$=20)
10. **Purkiewicz, A.**, Wierzbicka, G. (2020). Korzyści i kontrowersje dotyczące GMO w żywności i żywieniu człowieka. Człowiek a środowisko, Red. Ryszard Górecki, Wyd. Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Olsztyn, s. 217-224. ISBN: 978-83-8100-252-3 ($MEiN_{2020}$=20)
11. **Purkiewicz, A.** (2020). Spożycie polifenoli z dietą, aktywność fizyczna a wartości parametrów kąta fazowego. Ekologia żywności, środowiska i zdrowia człowieka, Red. prof. dr hab. inż. Marzena Mogielnicka-Brzozowska, prof. UWM, Wydawnictwo Naukowe FNCE, Poznań, s. 358-368. ISBN: 978-83-66264-54-0 ($MEiN_{2020}$=20)

<u>Doniesienia na konferencjach naukowych międzynarodowych/zagranicznych</u>

1. **Purkiewicz, A.**, Mumtaz, W., Tońska, E, Pietrzak-Fiećko, R. Heavy metal content of infant formulas in relation to specified standards. International Congress MindInnFood'24: Looking into Food Safety, Innovation, Sustainability and Entrepreneur. Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Valencia, 29-30.10.2024 (online)
2. **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R. Zawartość kwasów tłuszczowych trans w mleku dla niemowląt. XXVIII Sesja Naukowa Sekcji Młodej Kadry Naukowej oraz XIth International Session of Young Scientific Staff : Żywność wobec wyzwań współczesnego świata : Food in the face of the challenges of the modern world : książka streszczeń, Gdańsk 16-17.05.2024
3. **Purkiewicz, A.**, Goksen, G., Tańska, M., Pietrzak-Fiećko, R., Łozowicka, B., Kaczyński, P. Buffalo Worm (*Alphitobius diaperinus*) Larvae Powder as a Promising Alternative Source of Nutrients for Food Applications. 6th ISEKI-FOOD E-Conference : Food production based on food safety, sustainable development and circular economy. 22-24.11.2023 (online)
4. **Purkiewicz, A.**, Goksen, G., Tańska, M., Gałgowska, M., Pietrzak-Fiećko, R. The Influence of Ultrasonic Extraction on the Phenolic Compounds' Content in the *Sparassis Crispa* Edible Mushroom. 6th ISEKI-FOOD E-Conference : Food production based on food safety, sustainable development and circular economy. 22-24.11.2023 (online)
5. **Purkiewicz, A.**, Marat, N., Demir, D., Ozay, Y., Goksen, G. Smart film production by including biaoctive compounds. 9th International IFS and Contemporary Mathematics and Engineering Conference, July 08-11, 2023 Tarsus, Mersin, Turkey.
6. **Purkiewicz, A.**, Szajkowska, K., Nowakowski, J.J., Pietrzak-Fiećko, R. The influence of the lactation period and the type of modified milk on the content of essential amino

acids in human milk and infant formula. 9th International IFS and Contemporary Mathematics and Engineering Conference, July 08-11, 2023 Tarsus, Mersin, Turkey.

7. Marat, N., **Purkiewicz, A.**, Demir, D., Ozay, Y., Goksen, G. Active packaging films incorporated with essential oils in nanoemulsion formulation. 9th International IFS and Contemporary Mathematics and Engineering Conference, July 08-11, 2023 Tarsus, Mersin, Turkey
8. **Purkiewicz, A.**, Tańska, M., Pietrzak-Fiećko, R. Wpływ procesu przechowywania na kształtowanie się wybranych związków bioaktywnych w musach owocowych przeznaczonych do żywienia niemowląt i małych dzieci. XXVII Sesja Sekcji Młodej Kadry Naukowej oraz Xth International Session of Young Scientific Staff : Rozwój Nauk o Żywności. Zrównoważona przyszłość : Food Science Development. Sustainable Future, Warszawa 11-12.05.2023
9. **Purkiewicz, A.**, Browarek, J. Sensory evaluation of edible insect products among students of culinary schools. XXVII Sesja Sekcji Młodej Kadry Naukowej oraz Xth International Session of Young Scientific Staff : Rozwój Nauk o Żywności. Zrównoważona przyszłość : Food Science Development. Sustainable Future, Warszawa 11-12.05.2023
10. Browarek, J., **Purkiewicz, A.** Bread with insect powder - sensory assessment among students of culinary schools. XXVII Sesja Sekcji Młodej Kadry Naukowej oraz Xth International Session of Young Scientific Staff : Rozwój Nauk o Żywności. Zrównoważona przyszłość : Food Science Development. Sustainable Future, Warszawa 11-12.05.2023
11. **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R., Sörgel F., Kinzig, M. The content of caffeine and its metabolites in breast milk depending on the lactation period. 5th International European Conference on Interdisciplinary Scientific Research , January 2022, Valencia, Spain (online)
12. **Purkiewicz, A.**, Czaplicki, S., Pietrzak-Fiećko, R. Body Mass Index (BMI) as a factor influencing the squalene content in breast milk. PROTEINA – International Conference of Food Technology and Biology, Biochemistry and Biotechnology Sciences. 13.08.2022 (online)
13. **Purkiewicz, A**., Ozturk Kerimoglu, B., Mora, L., Pietrzak-Fiećko, R. Health Properties of Animal-Related Protein Hydrolysates. EURO ASIA 9th International Congress of Applied Sciences, 11-12.08.2021, Erzurum, Turkey (online)

Doniesienia na konferencjach naukowych krajowych

1. **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R. Assessment of the implementation of dietary recommendations regarding the intake of selected minerals in infants fed with human milk and infant formulas. IV Międzynarodowa Multidyscyplinarna Konferencja Doktorantów Uniwersytetu Szczecińskiego. T. 1, Szczecin, 19-21 czerwca 2024. (online)

2. Kaczmarczyk, M., **Purkiewicz, A.** Badanie wiedzy na temat zrównoważonego rozwoju, alternatywnych źródeł białka orz diety planetarnej wśród młodzieży. Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn. ALFA I OMEGA CZ. XV - Nauki Interdyscyplinarne, Kraków 06-07.06.2024 r. (online)
3. **Purkiewicz, A.**, Kaczmarczyk, M. Ocena akceptowalności wybranych produktów mięsnych oraz ich odpowiedników wśród uczniów szkoły średniej w Olsztynie. Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn. ALFA I OMEGA CZ. XV - Nauki Interdyscyplinarne, Kraków 06-07.06.2024 r. (online)
4. Andrzejewski, S., **Purkiewicz, A.**, Kaczmarczyk, M., Fabczak, W. Alternatywne źródła białka w praktyce - warsztaty kulinarne. Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn: "COGITO CZ. XIV" Nauki Interdyscyplinarne. Kraków 01-02 sierpnia 2024 r. (online)
5. Prostko, P., **Purkiewicz, A.** Novel Food w odpowiedzi na potrzeby konsumenta. Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn. "ALFA I OMEGA CZ. XIII 14-15.12.2023", Kraków (online)
6. **Purkiewicz, A.**, Marat, N., Demir, D., Ozay, Y., Goksen, G. Jadalne opakowanie inteligentne - wybrane właściwości oraz możliwości wykorzystania na rynku spożywczym. XX Konferencja Naukowa Młodych Badaczy. Bezpieczeństwo i jakość żywności, Olsztyn, 22 listopada 2023
7. **Purkiewicz, A.**, Zduńczyk, W., Pietrzak-Fiećko, R. Owady jadalne jako źródło białka – aspekt dietetyczny i poznawczy. I Ogólnopolska Konferencja Krajowa „Forum Młodych Naukowców", Bydgoszcz, 31.03.2023 (online)
8. **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R. Psychologia karmienia piersią. Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa „ROGO III". 12.02.2022 (online)
9. **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R. Porównanie właściwości antyoksydacyjnych przecierów owocowo-warzywnych. XIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2021 „Interdyscyplinarność kluczem do sukcesu". 25-28.03.2021 (online)
10. **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R. Assessment of the sensory quality of the designed date-based snack with increased oil content. National Scientific Conference „Science and Young Researchers" – 5th edition, 05.06.2021 (online)
11. **Purkiewicz, A.**, Czaplicki, S., Pietrzak-Fiećko, R. Skwalen w żywności dla niemowląt. 51. Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych w Olsztynie pt. „Seminarium innowacyjnych rozwiązań w dobie pandemii", 15-16 września 2022 (III miejsce)
12. **Purkiewicz, A.**, Czaplicki, S., Pietrzak-Fiećko, R. Kształtowanie się zawartości skwalenu w mleku kobiecym w zależności od wieku matek karmiących. XIX Konferencja Naukowa Młodych Badaczy. Bezpieczeństwo i jakość żywności, Olsztyn 2022
13. **Purkiewicz, A**., Pietrzak-Fiećko, R. Owady jadalne jako alternatywne źródło pełnowartościowego białka. VIII Ogólnopolska Sesja Studenckich Kół Naukowych w Szczecinie, 1-3 grudnia 2022, Szczecin (online)
14. **Purkiewicz, A.**, Mikulska, J., Pietrzak-Fiećko, R. Biologicznie aktywne składniki mleka kobiecego. Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa „COGITO II", 28.09.2021 (online)

15. **Purkiewicz, A.**, Prostko, P., Lisińska, K. Żywność jako źródło antyoksydantów. Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa „COGITO II", 28.09.2021 (online)
16. Mikulska, J., **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R. Wpływ *Helicobacter pylori* na powstawanie chorób żołądka. Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa „COGITO II", 28.09.2021 (online)
17. Marcinkowska, W., **Purkiewicz, A.**, Jagłowski, S. Porównanie właściwości antyoksydacyjnych wybranych ziół. 50. Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych w Olsztynie : "Seminarium Obrazowania Studenckiej Myśli Naukowej". T. 3, Aktualne problemy badawcze : nauki biomedyczne, techniczne, społeczne i humanistyczne, Olsztyn, 15-16.09.2021 (II miejsce)
18. **Purkiewicz, A.** Wpływ czynników socjoekonomicznych na kształtowanie się zawartości kofeiny w mleku kobiecym. 50. Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych w Olsztynie : "Seminarium Obrazowania Studenckiej Myśli Naukowej". T. 3, Aktualne problemy badawcze : nauki biomedyczne, techniczne, społeczne i humanistyczne, Olsztyn, 15-16.09.2021
19. **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R. Kształtowanie się zawartości metali ciężkich w pieczywie pszennym. XVIII Konferencja Naukowa Młodych Badaczy. Bezpieczeństwo i jakość żywności, Olsztyn, 28 września 2021
20. **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R. Zaburzenia odżywiania kobiet w ciąży. Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa „ROGO". 18.09.2021 (online)
21. Mikulska, J., **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R. Wpływ czynników kulturowych na manifestowanie się u młodzieży zaburzeń żywieniowych pod postacią anoreksji psychicznej. Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa „ROGO". 18.09.2021 (online)
22. **Purkiewicz, A.**, Pucer, J. Analiza dostępnych na rynku produktów żywnościowych przeznaczonych do żywienia niemowląt i małych dzieci. Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa „MIRATIO", 16.10.2021 (online)
23. Pucer, J., **Purkiewicz, A.** Suplementacja kobiet podczas ciąży. Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa „MIRATIO", 16.10.2021 (online)
24. Mikulska, J., **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R. Wpływ czynników społeczno-kulturowych na powstawanie bulimii psychicznej (bulimia nervosa) – praca przeglądowa. Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa „MIRATIO", 16.10.2021 (online)
25. **Purkiewicz, A**., Ciborska, J. Mikrokapsułkowanie składników żywności. Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa „AMPLIO", 27.11.2021 (online)
26. **Purkiewicz, A.**, Lisińska, K. Lipidy w żywności i żywieniu człowieka. Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa „AMPLIO", 27.11.2021 (online)
27. **Purkiewicz, A.**, Ciborska, J. Świadomość żywieniowa wybranej grupy populacyjnej dotycząca przeciwutleniaczy w żywności. Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna „OMNIBUS CZ. IV". 22.08.2020 (online)
28. **Purkiewicz, A.**, Pietrzak-Fiećko, R. Comparision of selected minerals content in milk for infants. 1 st Scientific Symmer School on-line, 8.08.2020

29. **Purkiewicz, A.** Spożycie polifenoli z dietą, aktywność fizyczna a wartości parametrów kąta fazowego. XLIX Międzynarodowe Seminarium Kół Naukowych w Olsztynie „Koła Naukowe – Szkołą Twórczego Działania". 24-25.09.2020

Staże naukowe i wyjazdy badawcze zagraniczne i krajowe

1. **Tarsus University, Tarsus, Turkey** - staż naukowy w ramach programu Erasmus+ (28.05.2023-1.08.2023)
2. **Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Białymstoku** - wyjazd badawczy (13.03.2023-17.03.2023)
3. **Instituto de Agroquimica y Tecnologia de Alimentos, Valencia, Spain** - Staż naukowy w ramach programu PROM – Międzynarodowa wymiana stypendialna doktorantów i kadry akademickiej (6.07.2021-24.07.2021)
4. **Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie**, Zakład Chemii i Biodynamiki Żywności – staż naukowy (6.09.2023-8.10.2023)
5. **Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie**, Zakład Biologicznych Funkcji Żywności – staż naukowy (3-28.02.2020)
6. **Wizyta studyjna w wybranych zakładach przemysłu spożywczego na terenie Polski i Niemiec** (Gea Westfalia Separator Group GmbH w Oelde, Browar Pott's Brauerei GmbH w Oelde, GEA Farm Technologies GmbH w Boenen, Hochschule w Offenburgu, SM MLECZ w Wolsztynie) w ramach projektu pn. „Program Rozwojowy Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie" współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (24-30.11.2019)

Udział w projektach

1. Projekt pt. *„FermentEco: Zdrowotne i ekologiczne aspekty żywności fermentowanej"*, realizowany w ramach konkursu grantowego Akademia Fundacji BOŚ. Projekt realizowany na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie (marzec-sierpień 2025), funkcja: kierownik
2. Projekt pn. *„Sieć badawcza uczelni przyrodniczych na rzecz rozwoju polskiego sektora mleczarskiego – projekt badawczy"* (MEiN/2023/DPI/2875)– wykonanie zadań: Optymalizacja/ określenie parametrów/ badanie/ i projektowanie metody oznaczania zawartości wybranych ksenoestrogenów, m.in. insektycydów chloroorganicznych oraz polichlorowanych bifenyli z zastosowaniem techniki chromatografii gazowej (GC) oraz jej zastosowanie w ocenie zawartości tych związków w analizowanych produktach mleczarskich. oraz Dodatek owadów jadalnych, spiruliny, chlorelli i innych mikro- i makroalg do różnych przetworów mleczarskich (luty 2025 – obecnie), funkcja: wykonawca
3. Projekt pt. *„Popularyzacja alternatywnych źródeł białka i szerzenie świadomości na temat zrównoważonego rozwoju wśród młodzieży"*, realizowany w ramach konkursu

grantowego Akademia Fundacji BOŚ. Projekt realizowany na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie (marzec-sierpień 2024), funkcja: kierownik

4. Projekt pt. *„Świadomość, stan wiedzy i zainteresowanie spożyciem, czyli owady jadalne jako alternatywne źródło białka – badanie zainteresowania wśród młodzieży szkoły gastronomicznej”*, realizowany w ramach konkursu „Zdobądź Grant z FUniP” organizowanym przez Forum Uniwersytetów Polskich. Projekt realizowany na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie (10-12.2022), funkcja: główny wykonawca
5. Projekt pt. *„Eat Green, Behave Clean and Build the Dream!”*, realizowany w ramach programu Erasmus^{+} Młodzież, akcja Wymiana młodzieży. Projekt realizowany w NINA APS, Belluno, Włochy (4-8.05.2022), funkcja: uczestnik projektu.
6. Projekt pt. *„Ekstrakty tymianku właściwego (Thymus vulgaris) jako alternatywa dla konserwantów w walce z patogenami Listeria monocytogenes w mrożonkach warzywnych”*, realizowany w ramach konkursu „Grant Rektora – Edycja III”. Projekt realizowany na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie (wrzesień 2020-grudzień 2020), funkcja: wykonawca

Recenzje artykułów naukowych

1. *Annals of Agricultural Science* (Elsevier)
2. *Total Environment Advances* (Elsevier)
3. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (Wiley)
4. *Molecular Nutrition and Food Reserach* (Wiley)
5. *Archiv der Pharmazie* (Wiley)
6. *Scientific Reports* (Springer Nature)
7. *Discover Chemistry* (Springer Nature)
8. *Discover Food* (Springer Nature)
9. *An International Journal of Marine Sciences* (Springer Nature)
10. *BMC Public Health* (Springer Nature)
11. *Exploration of Food and Foodomics* (Open Exploration)

Nagrody, wyróżnienia i stypendia

1. Nagroda za najlepsze sprawozdanie w ramach konkursu „Akademia Fundacji BOŚ” i przyznanie środków na realizację projektu naukowego w 2025 roku.
2. Nagroda Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie za działalność społeczną 2024
3. Stypendium Naukowe Marszałka Województwa Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie 2024
4. Stypendium Naukowe Marszałka Województwa Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie 2023

5. Stypendium Naukowe Marszałka Województwa Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie 2022
6. Gratulacje Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie w związku ze zwycięstwem wydarzenia „Dni Świadomości Żywieniowej" w plebiscycie „Pro Juvenes" (2022)
7. Gratulacje Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie w związku ze zwycięstwem wydarzenia „Dni Świadomości Żywieniowej" w plebiscycie „Pro Juvenes" (2021)
8. Nagroda Tetra Pak dla najlepszego absolwenta Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (2020)
9. Dyplom uznania Dziekana Wydziału Nauki o Żywności za ukończenie studiów I stopnia z wyróżnieniem (2019)
10. Stypendium Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie dla najlepszych studentów w roku akademickim 2019/2020
11. Stypendium Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie dla najlepszych studentów w roku akademickim 2017/2018

Udział w organizacjach studenckich i towarzystwach naukowych

1. 10.2024 – obecnie - Wiceprzewodnicząca Koła Naukowego Żywienia i Profilaktyki Żywieniowej Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
2. 10.2018-10.2024 - Przewodnicząca Koła Naukowego Żywienia i Profilaktyki Żywieniowej Wydziału Nauki o żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie:
3. 2022 – obecnie - Członkini Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności
4. 2022 – obecnie – Członkini Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego
5. 2020-2021 – członkini Koła Naukowego Technologów Przetwórstwa Surowców Roślinnych Wydziału Nauki o Żywności Uniwersytety Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
6. 2019/2020, 2021/2022, 2022/2023 – przedstawicielka Wydziału Nauki o Żywności w Radzie Kół Naukowych w Olsztynie

Szkolenia i kursy

1. Kurs pn. „Analiza sensoryczna – podstawy teoretyczne i warsztaty praktyczne" (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie) (2024)
2. Szkolenie „The Fundamentals of Chromatography" (Alison) (2024)
3. Szkolenie „Żywienie dzieci we wczesnym okresie życia w kontekście profilaktyki trudności karmienia", Centrum Szkoleń Dietetyki Klinicznej (2021)

4. Kurs pt. „Toksyczne Oddziaływanie Pierwiastków na Organizm – Wpływ na Metabolizm Człowieka" (FoodForum, Uniqskills) (2021)
5. Warsztaty z oprogramowania do projektowania bryłowego SOLIDWORKS (w ramach projektu pn. „Program Rozwojowy Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie" współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego) (2019)
6. Szkolenie „Prince2 Foundation" Certificate in Project Management (2017)

Działalność organizacyjna i dodatkowa

1. Przygotowanie i poprowadzenie otwartych warsztatów popularnonaukowych podczas wydarzenia *NaukoweLove 2025.Pikantnie* organizowanego przez Centrum Nauki Experyment w Gdyni (reprezentacja Wydziału i Koła Naukowego) (2025)
2. Organizacja Dni Świadomości Żywieniowej" (siedem edycji: I- 12-18.12.2020; II- 18-25.04.2021; III- 10-15.12.2021; IV- 6-8.05.2022; V- 14-16.10.2022; VI- 1-3.12.2023; VII- 22-24.11.2024) (online)
3. Nagroda Pro Juvenes w kategorii „Studenckie inicjatywy prozdrowotne" dla wydarzenia „Dni Świadomości Żywieniowej" (rok akademicki 2021/2022 i 2022/2023); nominacja do nagrody w kategorii „Studenckie inicjatywy prozdrowotne" w roku akademickim 2024/2025
4. Promowanie wydziału oraz koła naukowego w mediach (Radio UWM FM, Radio ESKA Olsztyn, Radio Olsztyn, Melo Radio, Program Trzeci Polskiego Radia, TVP3 Olsztyn, Wiadomości Uniwersyteckie UWM, Akademia Ciekawości)
5. Prowadzenie warsztatów i wykładów:
   - warsztaty dla uczniów Liceum Ogólnokształcącego Nr 1 im. J. Bażyńskiego w Ostródzie podczas Dni Otwartych dla Uczelni – Festiwalu Sztuki (2025)
   - warsztaty pt. „Napoje energetyzujące – warto czy nie warto?" prowadzone dla uczniów Liceum Ogólnokształcącego im. Feliksa Nowowiejskiego w Braniewie (2024)
   - warsztaty pt. „Napoje energetyzujące – warto czy nie warto?" prowadzone dla uczniów Zespołu Szkół Zawodowych im. J. Liszewskiego w Braniewie
   - warsztaty pt. „Zdrowe żywienie w pigułce" dla uczniów klas IV w Szkole Podstawowej nr 12 w Olsztynie (2024)
   - warsztaty dla uczniów Liceum Ogólnokształcącego Nr 1 im. J. Bażyńskiego w Ostródzie podczas Dni Otwartych dla Uczelni – Festiwalu Sztuki (2024)
   - warsztaty „Napoje energetyzujące – warto czy nie warto?" dla młodzieży pierwszych klas warszawskiego liceum ogólnokształcącego, organizowanych przez firmę KUMA CAMP we współpracy z Fundacją ŻAK (2023)
   - warsztaty w ramach szkolnej kampanii „Energetykom mówimy stanowcze NIE" prowadzone dla uczniów Zespołu Szkół nr 6 im. Macieja Rataja w Ełku (2023)
   - warsztaty w ramach szkolnej kampanii „Energetykom mówimy stanowcze NIE" prowadzone dla uczniów II Liceum Ogólnokształcącego im. Jana Pawła II w Działdowie (2023)

- prowadzenie szkoleń na zlecenie Białostockiej Fundacji Kształcenia Kadr dla uczniów z kierunku technik żywienia i usług gastronomicznych Zespołu Szkół Ogólnokształcących w Czyżewie (listopad-grudzień 2022)
- prowadzenie warsztatów „Go AgriTech" w Mławie i Olsztynie w ramach sesji *Zainspiruj się!* (listopad, grudzień 2022)
- wykład pt. „Liofilizaty warzyw jako dodatek podnoszący wartość żywieniową pieczywa pszennego" w ramach zaproszenia na konferencję WaMa Smart Lab „ŻYWNOŚĆ WYSOKIEJ JAKOŚCI" w Olsztynie – wyzwania i potrzeby" (2022)
- warsztaty dla uczniów szkół podstawowych w Kuźni Społecznej w Olsztynie w ramach zorganizowanych przez Bank Żywności w Olsztynie obchodów Światowego Dnia Żywności (2022)
- prelekcja pt. „Cudowna nowa żywność" dla uczniów Zespołu Szkół Centrum Kształcenia Rolniczego w Dobrocinie (2022)
- prelekcja pt. „Cudowna nowa żywność" dla uczniów Katolickiego Liceum Ogólnokształcącego w Lidzbarku Warmińskim (2022)
- prelekcja pt. „O zaburzeniach odżywiania słów kilka" dla uczniów I Liceum Ogólnokształcącego im. Adama Mickiewicza w Olsztynie (2022)
- prelekcja pt. „Owady jadalne jako novel food" dla uczniów II Liceum Ogólnokształcącego im. Jana Pawła II w Działdowie (2022)
- prelekcja pt. „Cudowna nowa żywność" dla uczniów Zespołu Szkół Gastronomiczno-Spożywczych w Olsztynie (2021)
- zajęcia dotyczące zdrowego żywienia wśród uczniów Katolickiej Szkoły Podstawowej im. Świętej Rodziny w Olsztynie (2020)
- prowadzenie konsultacji żywieniowej pt. „Ideał piękna – prawidłowa czy wymarzona masa ciała" w ramach 17. Olsztyńskich Dni Nauki i Sztuki Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (2019)
- warsztaty edukacyjne dla uczniów Szkoły Podstawowej nr 30 w Olsztynie (2019)
- zajęcia edukacyjne dla dzieci z Przedszkola Miejskiego nr 40 im. Żaczka w Olsztynie (2019)

6. Aktywny udział w organizacji wydziałowych i uniwersyteckich wydarzeń kulturalnych i społecznych (Dzień Otwarty UWM, Student EXPO UWM, Olsztyński Salon Maturzystów, Olsztyńskie Dni Nauki i Sztuki, Kortowski Mikołaj, Mikołajki z NOŻ-ami, Ognisko Kół Naukowych Wydziału Nauki o Żywności)
7. Czynny udział w Dniach Nauki i Sztuki w Olsztynie
8. Udział w akcji „Zdrowie pod kontrolą" organizowaną przez olsztyński oddział IFMSA (listopad 2022, maj 2022, kwiecień 2024, listopad 2024)
9. Czynny udział w przygotowaniu Międzynarodowej Konferencji Naukowej pt. Wpływ środowiska na życie i zdrowie człowieka" organizowanej przez Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Uniwersytet w Białymstoku i Wyższą Szkołę Policji w Szczytnie (2019)
10. Prowadzenie badań biometrycznych w Katedrze Żywienia Człowieka Wydziału Nauki o Żywności UWM w Olsztynie, dla uczniów Technikum żywienia i usług gastronomicznych z ZSCKR w Dobrocinie (2019)

11. Pomoc w organizacji eliminacji okręgowych Olimpiady Wiedzy i Umiejętności Rolniczych w Olsztynie w Katedrze Żywienia Człowieka Wydziału Nauki o Żywności UWM w Olsztynie (2019)
12. Udział w pracach organizacyjnych w ramach ogólnopolskiego projektu edukacyjnego „ABC zdrowego żywienia" w Katedrze Żywienia Człowieka Wydziału Nauki o Żywności UWM w Olsztynie (2017)

Zestawienie zbiorcze dorobku naukowego

Publikacje naukowe			
	Liczba publikacji	Punkty[7]	IF[8]
Artykuły w czasopismach			
Czasopisma z wykazu MEiN[9]*	19	2050	66.19
Czasopisma spoza wykazu MEiN	11	65	-
Rozdziały w monografiach pokonferencyjnych			
Monografie z wykazu MEiN[10]	8	160	-
Monografie spoza wykazu MEiN	3	15	-
SUMA	41	2290	66.19
Konferencje naukowe			
Doniesienia na konferencjach krajowych	13		
Doniesienia na konferencjach międzynarodowych/zagranicznych	29		
Staże naukowe i wyjazdy badawcze			
Staże krajowe	2		
Staże zagraniczne	2		
Wyjazdy badawcze	1		
Pozostała aktywność naukowa			
Uczestnictwo w projektach badawczych	6		
Wykonane recenzje artykułów naukowych	11		
Udział w organizacjach studenckich i towarzystwach naukowych	6		
Wskaźniki biometryczne dorobku naukowego wg Web of Science			
Liczba cytowań (bez autocytowań)	100		
H - index	7		

[7] Liczba punktów zgodnie z Komunikatami Ministra Edukacji i Nauki w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych zgodna z rokiem opublikowania
[8] Impact Factor według listy Journal Citation Reports (JCR) zgodnie z rokiem opublikowania
[9] Wykaz czasopism zgodny z Komunikatami Ministra Edukacji i Nauki w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych zgodny z rokiem opublikowania
[10] Wykaz zgodny z Komunikatami Ministra Edukacji i Nauki w sprawie wydawnictw publikujących recenzowane monografie naukowe
*W tym 4 artykuły wchodzące w cykl publikacji rozprawy doktorskiej

12. Załączniki

Pełne teksty publikacji stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej oraz oświadczenia współautorów

Lista załączników:

1. **Załącznik 1**: Pełny tekst publikacji P1 wraz z oświadczeniami współautorów.
2. **Załącznik 2**: Pełny tekst publikacji P2 wraz z oświadczeniami współautorów.
3. **Załącznik 3**: Pełny tekst publikacji P3 wraz z oświadczeniami współautorów.
4. **Załącznik 4:** Pełny tekst publikacji P4 wraz z oświadczeniami współautorów.

Załącznik 1

Publikacja P1

Purkiewicz, A., Pietrzak-Fiećko, R., Sörgel, F., Kinzig, M. (2022). Caffeine, Paraxanthine, Theophylline, and Theobromine Content in Human Milk. *Nutrients*, *14*(11), 2196; https://doi.org/10.3390/nu14112196.

nutrients

MDPI

Article

Caffeine, Paraxanthine, Theophylline, and Theobromine Content in Human Milk

Aleksandra Purkiewicz [1], Renata Pietrzak-Fiećko [1,*], Fritz Sörgel [2,3] and Martina Kinzig [2]

[1] Department of Commodity Science and Food Analysis, Faculty of Food Sciences, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 1 Cieszyński Square, 10-726 Olsztyn, Poland; aleksandra.purkiewicz@uwm.edu.pl
[2] Institute for Biomedical and Pharmaceutical Research, 90562 Nürnberg-Heroldsberg, Germany; ibmp@osn.de (F.S.); kinzig@ibmp.osn.de (M.K.)
[3] Institute of Pharmacology, Faculty of Medicine, University Duisburg-Essen, 45117 Essen, Germany
* Correspondence: renap@uwm.edu.pl

Abstract: This study aimed to assess the content of caffeine and its metabolites—paraxanthine, theophylline, and theobromine—in breast milk according to selected factors. Samples of human milk were collected from 100 women living in the east–northeast region of Poland. Information on the consumption of beverages and foods containing caffeine was collected using a 3 day food record. The determination of caffeine and its metabolite content was performed using liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS/MS). This study research showed that more caffeine was found in the milk of women living in cities, with secondary education, aged 34–43, and also in milk from the 3rd and 4th lactation periods ($p \leq 0.05$). Factors such as place of residence, level of education, age, and stage of lactation influenced the nutritional choices of breastfeeding women, which had an impact on the level of caffeine and its metabolites in breast milk. A positive correlation was found between the consumption of caffeine with food and drinks and its level in human milk.

Keywords: methylxanthines; breast milk analysis; lactation; caffeine metabolites

check for updates

Citation: Purkiewicz, A.; Pietrzak-Fiećko, R.; Sörgel, F.; Kinzig, M. Caffeine, Paraxanthine, Theophylline, and Theobromine Content in Human Milk. *Nutrients* **2022**, *14*, 2196. https://doi.org/10.3390/nu14112196

Academic Editor: Francisco J. Pérez-Cano

Received: 31 March 2022
Accepted: 23 May 2022
Published: 25 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Human milk is a natural and superior food for infants, requiring the optimal composition to meet their nutritional needs early on in life and providing associated immunological and psychological benefits. It is known that breastfeeding reduces child mortality and has health benefits that extend into adulthood. Many global bodies, including the American Academy of Pediatrics (AAP), the American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG), and the World Health Organization (WHO), recommend breastfeeding infants for at least the first 6 months of life and continuing breastfeeding with appropriate complementary foods to at least until 2 years of age [1,2].

Proper nutrition in early life is imperative for the physical and mental development of the child; moreover, bioactive compounds contained in breast milk are essential for the child's development and protect the young against diseases. The composition of breast milk is determined by stage of lactation, the mother's heart health and factors such as diet, race and geographical environment [3]. On the other hand, in addition to ingredients that are beneficial to infants, compounds that potentially have a negative impact on the baby's health and development can pass into breast milk. A group of such compounds are methylxanthines, including caffeine and its metabolites—paraxanthine, theophylline, theobromine—which accumulate in breast milk when consumed in food by the nursing mother [4,5]. On consuming caffeine, it is quickly absorbed from the gastrointestinal tract; and after 30–120 min, it reaches maximum level in the blood. Caffeine is transported in blood to the tissues. It crosses the blood–brain barrier and passes through the placenta to the fetus, amniotic fluid, and breast milk [5]. Excessive consumption of caffeine by a nursing mother can negatively affect a breastfed infant. Too high a dose of caffeine

in the child's body causes muscle tremors and increased muscle tension. Excess coffee consumption by nursing women causes nausea and irritability among infants, as well as nervousness, sleep problems, and convulsions. Researchers report that these symptoms in infants significantly decreased after reducing the share of caffeinated foods in the daily diet. The half-life of caffeine in infants, especially breastfed, is much longer than in an adult, and therefore poses a greater risk to infants [6].

Caffeine is metabolized in the liver and approximately 2% of caffeine is excreted in the urine in unchanged form, while its decomposition produces paraxanthine, theobromine, and theophylline, and the final metabolite is 1methyl uric acid [5,7,8]. The metabolism of caffeine is shown in Figure 1. Paraxanthine constitutes approximately 72% of caffeine metabolites, and theophylline and theobromine constitute 10 and 5%, respectively [8,9]. Theobromine is a metabolite of caffeine; moreover, it is the main methylxanthine contained in cocoa [10]. The ratio of caffeine to theobromine in cocoa is 1:5 [11]. Therefore, the presence of theobromine in the daily diet is determined to a greater extent by cocoa consumption than by coffee or tea.

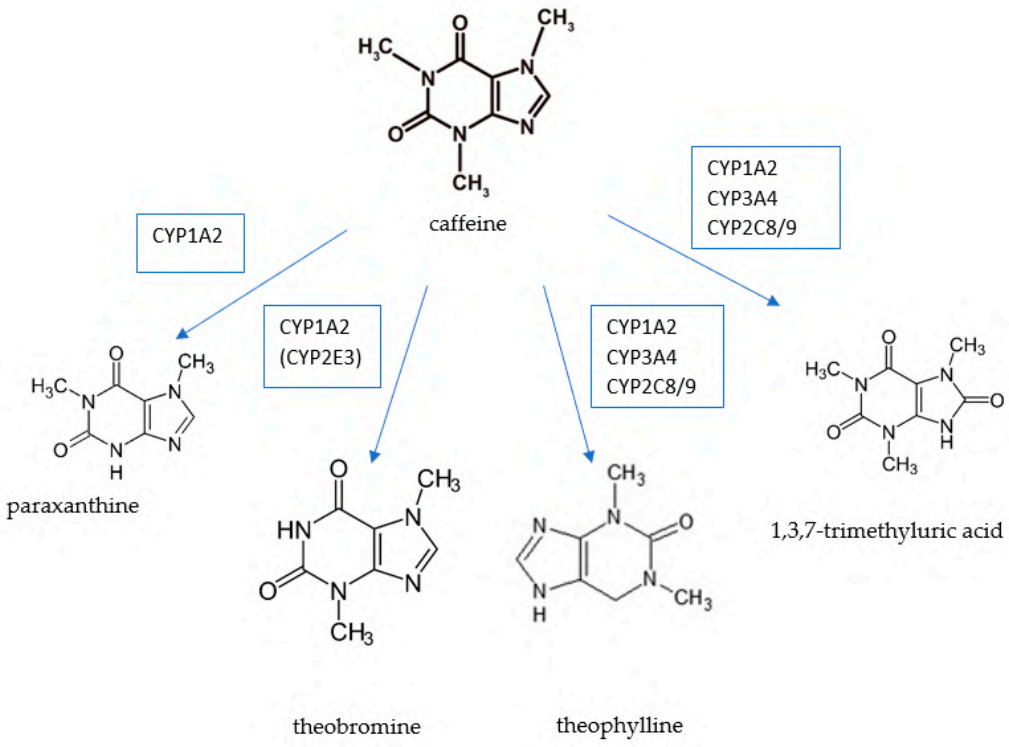


Figure 1. Caffeine metabolism. Source: own elaboration based on: [12].

Caffeine is a chemical compound found in beverages: coffee, tea, and energy drinks; and in food: chocolate, cocoa, and sweets [13,14]. Energy drinks and instant coffee contain the most caffeine in an average serving. In terms of tea, leaf tea, both black and green, contains more caffeine. Levels of caffeine are over 3-fold higher in dark chocolate than in milk chocolate [15] (Table 1). It is recommended that both pregnant and lactating women limit caffeine consumption to 250–300 mg per day in order to avoid complications to the child's health [16,17].

Nutrition specialists emphasize that food choices are the result of many factors—physical (geographical location, season, level of economic development, and city development level), social (social class, level of education, and religion), and psychological (nutritional needs, psychophysical state, and physiological state). Malczyk [18] reports that women are the highest consumers of caffeine. Moreover, significantly more caffeine is recorded in the diet of people aged over 30 and living in rural areas. Rehm et al. [19] report that the consumption of caffeine, including coffee and tea, is dependent on race/ethnicity,

level of education, and economic status. More caffeine-rich beverages are consumed by older age groups with higher incomes. Most of the available literature on caffeine consumption by nursing women focuses on its effects on infant health, but only a few authors have investigated the content of methylxanthines in human milk to date. The novelty of the undertaken research is determined by the analysis of the content of caffeine and its metabolites according to selected factors. Although the composition of macronutrients such as protein or carbohydrate in human milk is physiologically conditioned, the composition of trace compounds in human milk including caffeine is an individual matter and may depend on many predisposing factors. Based on the available literature, it was assumed that the level of dietary caffeine intake by lactating women influences content of caffeine and its metabolites in breast milk; dietary caffeine intake in lactating mothers is influenced by demographic factors such as educational attainment and rural/urban living. The aim of this study was to perform a comprehensive assessment of the contents of caffeine and its metabolites in breast milk according to level of education, place of residence, age, and stage of lactation.

Table 1. Caffeine content in different beverages and food products. Source: own elaboration based on: [15].

Source of Beverage/Food	Volume/Weight	Caffeine Content [mg]
ground coffee	150 mL	60
instant coffee	150 mL	66
black tea	250 mL	
bags		31
leaf		43
green tea	250 mL	
bags		34
leaf		41
cacao	250 mL	5
Coca-Cola	250 mL	25
energy drinks	250 mL	80
bitter chocolate	100 g	67
milk chocolate	100 g	21

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Chloroform, formic acid, methanol, ammonium formate, tetrahydrofuran and the internal standard solution of caffeine were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Materials

The experimental material included human milk. Samples of human milk were collected from 100 women living in the east-northeast region of Poland. The nursing women participating in this study did not suffer from any diseases and did not take any medications during this study. All women had experienced a natural delivery. In each of the women, delivery proceeded without complications for the health of the mother and child. Milk samples were collected from women aged 18–43 years. The characteristics of the studied population are presented in Table 2. The breastfeeding population was divided into age categories (18–25 years old, 26–33 years old, and 34–44 years old); level of education—higher (at least bachelor studies) and secondary (general or technical secondary school); place of residence—city (>30,000 inhabitants) and village (<30,000 inhabitants); and stage of lactation (1st—colostrum: breast milk until a few days after birth; 2nd—foremilk: breast milk until two weeks after birth; 3rd and 4th: hindmilk—breast milk from 4 weeks of breastfeeding). Nursing women were asked to monitor food and drink consumption using a 3 day food record [20]. The nutritional interview was conducted by correspondence; it consisted in collecting information on 3 day consumption of food and drinks including household measures. The women in this study were instructed on how to keep a food

record, and the method used to obtain intake data was as reproducible as possible. Food and drink intake data were discussed with the women and clarified if there were gaps or ambiguities in the record. On this basis, information was collected on the types and amounts of food products containing caffeine consumed by women, which are presented in Table 3. Among the sources of caffeine, women consumed coffee, tea, and dark and milk chocolate. Women did not indicate energy drinks as part of their diet. Based on previous studies, it has been shown that the level of caffeine in human milk is the highest 60 min after consuming a beverage or a food product containing caffeine [21]. Due to on-demand feeding, it would be difficult to schedule a certain amount of time to consume a caffeinated product and collect the milk within a strict time to maximize the level of caffeine. Therefore, during this research, women were asked to collect milk immediately after feeding. Caffeine is rapidly metabolized in the liver to metabolites that remain in the body long after consumption of caffeinated foods. Caffeine and its metabolites are constantly in the body, so regular coffee consumption contributes to the maintenance of levels of caffeine in milk [22–24]. The women collected milk by themselves into previously sterilized dark-glass bottles. The women collected milk samples immediately after feeding the baby. Each of the women used an electronic breast pump to collect milk samples. Women collected milk samples with volumes ranging from 50 to 100 mL. Milk samples were collected from the women every day in the evening, stored in special containers maintaining the temperature, and then frozen and stored at a temperature of −30 °C.

2.3. Sample Extraction

Human milk samples were thawed and vigorously mixed. To 21.5 mL of a human milk sample, 150 µL of internal standard solution (13C3-caffeine, 300 ng/mL) was added. After centrifugation (11.000 rpm, 10 min) 1 mL of the fat-free liquid was mixed with 200 µL ammonium format buffer (1 M, pH 2) and 4 mL chloroform, mixed for 10 min, and centrifuged (3000 rpm, 10 min). The organic solvent was evaporated and redissolved using 200 µL of mobile phase under a stream of N2 at 45 °C. A volume of 20 µL of each sample was injected into the LC–MS/MS.

Table 2. Characteristics of the studied breastfeeding women.

Factors	***n* = 100**
Age, year	
18–25	29
26–33	37
34–44	34
Education	
Secondary	60
Higher	40
Place of residence	
City	65
Village	35
Stage of lactation	
1st	35
2nd	35
3rd and 4th	30

Table 3. Information on the consumption of food products and beverages rich in caffeine collected using a 3 day food record.

	Place of Resident		**Level of Education**		**Age**			**Stage of Lactation**			***p***
Factor	**City**	**Village**	**Secondary**	**Higher**	**18–25**	**26–33**	**34–44**	**1st**	**2nd**	**3rd–4th**	
	***n* = 65** ***n*;%**	***n* = 35** ***n*;%**	***n* = 60** ***n*;%**	***n* = 40** ***n*;%**	***n* = 29** ***n*;%**	***n* = 37** ***n*;%**	***n* = 34** ***n*;%**	***n* = 35** ***n*;%**	***n* = 35** ***n*;%**	***n* = 30** ***n*;%**	
Coffee consumption *											
>than 2 times a day	38;58	6;17	33;55	13;33	9;31	8;22	23;68	3;9	10;29	14;47	
2 times a day	14;22	8;23	17;28	5;13	10;34	12;32	7;21	11;31	17;49	12;40	**0.0012**
1 time a day	8;12	19;54	6;10	19;48	8;28	12;32	4;12	15;43	7;20	4;13	
I don't consume coffee	5;8	2;6	4;7	3;8	2;7	5;14	-	6;17	1;3	-	
Number of teaspoons (5 g) used for making coffee											
>than 2	29;45	9;26	17;28	6;15	9;31	8;22	17;50	2;6	9;26	11;37	
<than 2	21;32	13;37	26;43	19;48	12;41	14;38	12;35	15;43	17;49	14;47	0.5451
1 or less	10;15	11;31	13;22	12;30	6;21	10;27	5;15	17;49	8;23	5;17	
I don't consume coffee	5;8	2;6	4;7	3;8	2;7	5;14	-	6;17	1;3	-	
Tea consumption **											
>than 2 times a day	27;42	14;40	25;42	14;35	7;24	9;24	19;56	9;26	11;31	9;30	
2 times a day	32;49	19;54	32;53	19;48	16;55	23;62	12;35	14;40	16;46	13;43	**0.0191**
1 time a day	6;9	2;6	3;5	7;18	6;21	5;14	3;9	12;34	8;23	8;27	
The type of tea consumed											
bags	57;88	32;91	55;92	31;78	25;86	28;76	29;85	31;89	27;77	24;80	**0.0291**
leaf	8;12	3;9	5;8	9;23	4;14	9;24	5;15	4;11	8;23	6;20	
Tea brewing time											
<than 10 min	62;95	31;89	57;95	36;90	27;93	32;86	31;91	35;100	32;91	26;87	**0.0002**
>than 10 min	3;5	4;11	3;5	4;10	2;7	5;14	3;9	-	3;9	4;13	
Chocolate consumption ***											
>than 3 cubes a day	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3 or less than 3 cubes a day	58;89	21;60	47;78	32;80	21;72	27;73	31;91	23;66	30;86	26;87	**0.0492**
I don't consume chocolate	7;11	14;40	13;22	8;20	8;28	10;27	3;9	12;34	5;14	4;13	
The type of chocolate consumed											
bitter (70% cocoa and more)	23;35	4;11	7;12	15;38	12;41	12;32	14;41	13;37	8;23	11;37	
milk (less than 70% cocoa)	35;54	17;49	40;67	17;43	9;31	15;41	17;50	10;29	22;63	15;50	0.8192
I don't consume chocolate	7;11	14;40	13;22	8;20	8;28	10;27	3;9	12;34	5;14	4;13	

* A portion of coffee—200 mL. ** A portion of tea—250 mL. *** 1 cube of chocolate = 5 g. $p < 0.05$ was indicated by using bold.

2.4. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry

The chromatographic system consisted of a binary LC pump (L-6200A Intelligent Pump) and an Autosampler (CTC Combi Pal) set to +4 °C. The separation was achieved on a Phenomenex Aqua C18 column (5 µm, 50 × 4.6 mm) using isocratic elution at ambient temperature with 0.1% formic acid in water (90%), methanol (5%) and tetrahydrofuran (5%). Detection was performed using a SCIEX API 3000 triple quadrupole mass spectrometer equipped with a turbo ion spray interface (SCIEX, Concord, ON, Canada). High-purity nitrogen gas was used as a nebulizer, curtain, auxiliary, and collision gas. The spectrometer was operated in the positive ion mode for the detection of caffeine (m/z 195 → 138), paraxanthine (m/z 181 → 124), theophylline (m/z 181 → 124), theobromine (m/z 181 → 138), and the internal standard (m/z 198 → 140). Data acquisition was performed using RAD (version 2.6, PE Sciex, Thornhill, ON, Canada) and data processing using MacQuan (version 1.6, Perkin Elmer, Toronto, ON, Canada, 1991–1998). The precision of the spiked quality control samples for all compounds was below 10%, with an accuracy between 85% and 115%.

2.5. Statistical Analysis

The values were expressed as the mean ± standard deviation (SD). Normal distribution was tested with the Shapiro–Wilk test and the homogeneity of variance with the Levene test. Statistical analysis showed that the distribution was not normal and the variance was

not homogeneous; therefore, comparison of the collected quantitative data between the distinguished groups, by place of residence, level of education, age, and stage of lactation, was performed using the non-parametric Kruskal–Wallis test and Dunn's post hoc test. Linear Pearson's correlation coefficients were calculated to show the relationships between obtained data. The level of significance was assumed at $\alpha \leq 0.05$. Statistical analysis was performed using Statistica 13.1 (Statsoft Inc., Tulsa, OH, USA).

3. Results

3.1. The Content of Caffeine, Paraxanthine, Theobromine, and Theophylline in Breast Milk According to Selected Factors

Table 3 summarizes the consumption of beverages and food containing caffeine by lactating women, collected using a 3 day food record. The amount and type of consumed beverages and food containing caffeine varied according to the selected factors—place of residence, level of education, age, and stage of lactation. City dwellers consumed more coffee and a higher percentage of women prepared a larger amount of coffee. Moreover, a higher percentage of women consumed dark chocolate. Women with secondary education consumed more coffee, and women with higher education limited their consumption. Among respondents aged 18–25, coffee was consumed twice a day, while almost 70% of respondents aged 34–44 consumed coffee more than twice a day. A total of 40% of women in the 1st lactation period consumed coffee once a day, while 17% of women declared that they do not consume coffee. Most coffee was consumed by women in the 3rd–4th period of lactation—almost 50% of them consumed coffee more than twice a day. Table 4 presents the content of caffeine and its metabolites—paraxanthine, theophylline, and theobromine—in breast milk according to selected factors, place of residence, level of education, age, and stage of lactation.

Table 4. The content of caffeine, paraxanthine, theophylline, and theobromine in breast milk according to selected factors.

Factors	Compounds			
	Caffeine [μg/mL]	**Paraxanthine [μg/mL]**	**Theophylline [μg/mL]**	**Theobromine [μg/mL]**
Place of residence				
urban areas	0.590 ± 0.114^{a}	0.355 ± 0.098^{a}	0.028 ± 0.012^{a}	0.442 ± 0.088^{a}
rural areas	0.227 ± 0.012^{b}	0.115 ± 0.055^{b}	0.017 ± 0.010^{b}	0.181 ± 0.062^{b}
Level of education				
secondary	0.673 ± 0.032^{a}	0.426 ± 0.021^{a}	0.026 ± 0.009^{a}	0.368 ± 0.012^{b}
higher	0.545 ± 0.055^{b}	0.331 ± 0.037^{b}	0.029 ± 0.004^{a}	0.442 ± 0.076^{a}
Age (years)				
18–25	0.485 ± 0.022^{b}	0.303 ± 0.189^{b}	0.019 ± 0.001^{b}	0.278 ± 0.119^{c}
26–33	0.353 ± 0.087^{c}	0.190 ± 0.027^{c}	0.016 ± 0.012^{b}	0.313 ± 0.078^{b}
34–44	0.838 ± 0.065^{a}	0.505 ± 0.071^{a}	0.048 ± 0.033^{a}	0.630 ± 0.014^{a}
Stage of lactation				
1st	0.312 ± 0.167^{c}	0.169 ± 0.057^{b}	0.013 ± 0.009^{b}	0.243 ± 0.082^{b}
2nd	0.698 ± 0.095^{b}	0.427 ± 0.032^{a}	0.038 ± 0.011^{a}	0.537 ± 0.021^{a}
3rd–4th	0.794 ± 0.008^{a}	0.472 ± 0.022^{a}	0.0410 ± 0.055^{a}	0.544 ± 0.059^{a}

Explanation: means with different letters (^{a,b,c}) in the columns are significantly different ($p < 0.05$).

The content of caffeine and its metabolites was identified in each of the human milk samples. The dominant metabolite of caffeine in the milk samples was theobromine, while the lowest levels were identified for theophylline ($p < 0.05$).

In terms of place of residence, significantly higher levels of caffeine and its metabolites were noticed among women living in cities. Levels of caffeine, paraxanthine, theophylline, and theobromine in the milk of city dwellers were, respectively, 2.5-, 3-, 1.5-, and 2.5-fold higher compared to women living in villages.

In terms of level of education among lactating women, results varied according to chemical compound. Higher levels of caffeine and paraxanthine were found in the milk of breastfeeding women with secondary education ($p < 0.05$), while higher levels of theophylline and theobromine were recorded in the milk of women with higher education. The content of caffeine and its metabolites was also analyzed in terms of age. In terms of the age range, the content of a given chemical compound differed significantly. The milk of women aged 34–44 years contained the highest levels of caffeine and its metabolites; levels of caffeine were 2-fold higher than in women aged 18–25 and 26–33 years. Further, levels of paraxanthine, theophylline, and theobromine in the milk of women aged 34–44 years were, respectively, more than 1.5-, 2.5-, and 2-fold higher than in the milk of women aged 18–25; and more than 2.5-, 3- and 2-fold higher than in the milk of women aged 26–33 years.

In the tested samples, the content of individual methylxanthines was compared according to stage of lactation. In terms of caffeine content, the highest amounts were noticed in milk from the 3rd and 4th lactation periods. The biggest differences in caffeine content in milk when comparing stage of lactation were noted in the 1st lactation period compared to the 3rd and 4th lactation periods—the levels were 2.5-fold higher in the latter ($p < 0.05$). In the 3rd and 4th stage of lactation, the caffeine content in breast milk was 2.5 times higher than in the first stage of lactation ($p < 0.05$). In terms of paraxanthine, theophylline and theobromine, there were no differences in the content of these compounds in milk from the 2nd, 3rd, and 4th lactation periods.

3.2. The Relationship between Caffeine Consumption and Caffeine Content in Human Milk

Figure 2 shows the correlation between the consumption of caffeine in food and beverages and its level in human milk. A strong positive correlation ($r = 0.72$) was demonstrated between the effect of caffeine consumption on the content of this methylxanthine in human milk, with significance at $p < 0.05$.

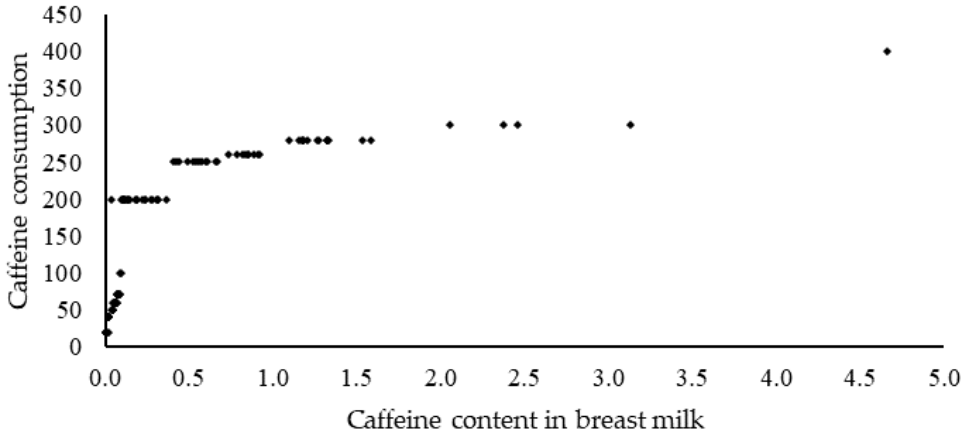


Figure 2. Correlation coefficients (r) calculated for the relationship between caffeine consumption and caffeine content inhuman milk (Correlation: $r = 0.72$).

3.3. Association between Obtained Data

Table 5 shows the correlation between the content of caffeine and individual metabolites—paraxanthine, theophylline, and theobromine in breast milk.

Table 5. Correlation coefficients (r) calculated for the relationships between the content of caffeine and its metabolites (r marked by * are statistically significant at $p < 0.05$).

	Paraxanthine	**Theophylline**	**Theobromine**
Caffeine	0.92 *	0.73 *	0.64 *

There was a very strong positive correlation between caffeine and paraxanthine content ($r = 0.92$), significant at $p < 0.05$. There was a directly proportional relationship between the content of caffeine and theobromine. The correlation relationships between caffeine and theophylline and caffeine and theobromine were strongly positive ($r = 0.73$ and 0.64), significant at $p < 0.05$.

Figure 3 shows the distribution of the content of individual caffeine metabolites versus caffeine content. In terms of paraxanthine, it was observed that points clustered about the straight line, suggesting a linear relationship. The correlation plots of theophylline and theobromine show more dispersed points, hence the lower correlation coefficients.

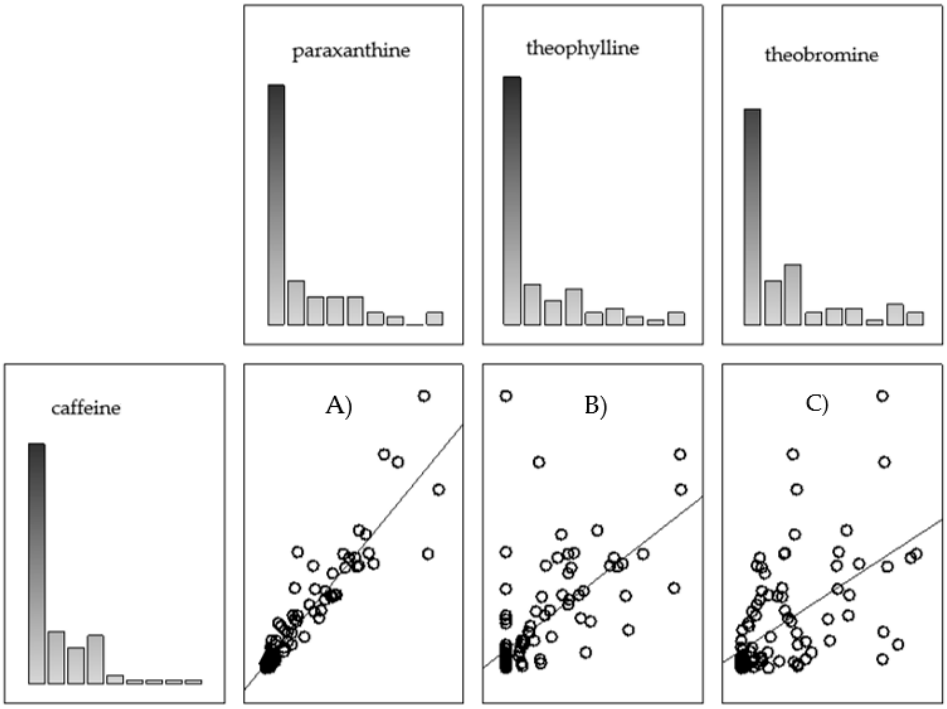


Figure 3. Graphical correlation coefficients (*r*) calculated for the relationship between caffeine content and the content of its metabolites—paraxanthine (**A**), theophylline (**B**), and theobromine (**C**).

4. Discussion

The World Health Organization (WHO) states that lifestyle is the main factor in living a healthy life and ensuring a good quality of life [25,26]. Among the many factors influencing the composition of breast milk, time of day, stage of lactation, mother's diet, and socioeconomic and demographic conditions can be mentioned [27,28]. Urbanization contributes to changes in the pattern of food consumption, mainly due to different lifestyles. Bo et al. [29] found that the economic status of nursing mothers contributed to their fluctuating fruit consumption. Studies by other authors have shown that the diets of nursing mothers living in cities were more varied [30]. Place of residence significantly influences consumption; especially of stimulant food products, including coffee. Norms for caffeine consumption by nursing women vary—the World Health Organization recommends that caffeine consumption should not exceed 300 mg. In turn, the European Food Safety Authority and the UK National Health Service (NHS) report that the habitual consumption of caffeine by nursing mothers should not exceed 200 mg [6]. In the studies conducted, higher levels of caffeine and its metabolites were identified in the milk of women living in urban areas compared to inhabitants of rural areas. According to the data collected using a 3 day food record, it was observed that almost 60% of urban residents consumed coffee more than 2 times a day, while over 50% of rural residents consumed coffee only once daily. The difference is in lifestyles. It is reported that city dwellers often prefer to drink beverages that contain caffeine, which is a direct result of their fast pace of life, where

coffee acts as a means of treating excessive fatigue. Moreover, urban areas have several cafes, confectioneries, and restaurants with numerous attractive caffeinated drinks, which may attract several consumers [31,32]. High theobromine content may be caused by the consumption of chocolate in the diet of lactating women. The United States Department of Agriculture (USDA) report confirms that city dwellers consume more caffeine (along with coffee and tea) due to the faster pace of life and more hectic lifestyles [33].

Education is an important factor in promoting health awareness. it is reported that knowledge determines nutritional behavior; especially in chronically ill people as well as pregnant and lactating women [34]. Food choices depend on many factors, including level of education [35]. It is reported that people with a higher education make more informed food choices and are more likely to know current dietary recommendations [36]. In the studies conducted, the milk of women with higher education showed lower levels of caffeine and each of the metabolites, which may suggest that women with higher education are more aware of nutrition during feeding. According to the collected data, more than half of women with secondary education consumed coffee more than twice a day. In addition, almost 30% of them prepared coffee with more than two teaspoons, which may contribute to the higher content of caffeine and its metabolites in the milk of women with secondary education compared to women with higher education. Almost 50% of women with higher education consumed coffee once a day and 50% of breastfeeding women prepared coffee with less than 2 teaspoons. It can be assumed that women with higher education may be more aware of the potential risk to the baby of excessively high caffeine consumption during feeding. Lawrence [37] reports that poorer eating habits correlate with a lower socioeconomic status. Among the socioeconomic factors, level of education is particularly important as it is the strongest derivative to good health. It has been proven that more educated people are more likely to engage in a healthy lifestyle, and such behavior has also been proven among pregnant and lactating women too [38].

Due to possible health complications for the baby, caffeine consumption should be limited during pregnancy and lactation [15,39]. McCreedy et al. [6] report that the consumption of chocolate and coffee by nursing mothers was associated with the occurrence of increased infant colic, as well as skin problems, including atopic dermatitis. The administration of a dose of 10 mg/kg of caffeine to an infant may cause respiratory distress, hyperactivity, hyperglycemia, hypertension, tachycardia, or hematuria. Newborns metabolize caffeine more slowly as compared to adults, and regular caffeine intake may maintain a high level of caffeine in the child's body [40]. Other studies indicate that the administration of caffeine to newborns may negatively affect the skeletal system and induces osteoblast apoptosis. This results in a delay in the structural reconstruction of the tibial metaphysis and causes swelling of the mitochondria in osteoblasts [41]. In addition, caffeine abuse by a nursing mother may be associated with future weight problems in the baby. According to the literature, excessive exposure to caffeine is associated with a higher risk of obesity in children in later years [42]. The surveyed nursing women declared a different amount of caffeinated drinks consumed during the day. Some of them followed the WHO recommendations and maintained a frequency of less than 2–3 servings a day, but a significant proportion of women included larger amounts of these products in their diet. It is reported that pregnant and lactating women pay more attention to their diets and most follow dietary recommendations. Surveys of pregnant women conducted by Jarosz et al. [43] found that women consumed an average of 91 mg of caffeine per day. Only approximately 2% of them consumed levels of caffeine above the WHO dose of 300 g. Moreover, the main source of caffeine in the diet of pregnant women was black tea, not coffee. Referring to data recorded using a 3 day food record, coffee consumption by lactating women varied according to selected factors. The highest coffee consumption (more than 2 cups per day) was among urban dwellers, with secondary education, aged 34–44 years. Caffeine intake among these women ranged from 200 to as much as 400 mg/day. However, in most cases, total caffeine intake did not exceed the WHO recommended intake (250–300 mg). Tyrala and Dodson [40] studied the level of caffeine in blood serum after consumption—it ranged between 2.39

and 4.05 µg/mL at 2 h. The level of caffeine in milk was 1.1 µg/mL after 30 min and 1.43 µg/mL after 60 min. The milk of the studied women contained significantly lower levels of caffeine, and the highest identified amount was approximately 1 µg/mL, which indicates that the studied women did not abuse caffeine-containing food products.

Pregnant and lactating women do not have to give up caffeine consumption completely—the Food and Drug Administration placed caffeine in group B, which means that the substance can be used during pregnancy and breastfeeding only when necessary. The consumption of agents in group B should be minimized and, in addition to caffeinated foods, they include medications [44]. On the other hand, the Australian Drug Evaluation Committee placed caffeine in category C—it can be used by pregnant and lactating women when the benefit of the mother exceeds the potential risk to the child [41].

Verster and Koenig [16] report that coffee consumption is proportional to age and emphasize that people aged over 30 consume significantly greater amounts of caffeinated beverages, especially coffee. The highest level of caffeine and its metabolites was recorded in the milk of women aged 34–44 ($p \leq 0.05$). Almost 70% of women aged 34–44 consumed coffee more than twice a day; moreover, half of these women prepared coffee with more than 2 teaspoons. Furthermore, tea consumption was more popular in this age group, with over 50% of women tea it more than twice a day. Other studies indicate that people in this age category consume more caffeine than young adults (20–24 years old), and one of the reasons for this is the greater levels of stress and more responsibilities in people of this age [45]. Jarosz et al. [43] also indicate that caffeine consumption increases with the age of pregnant and lactating women. The milk of lactating women aged 34–44 years contained more than 2 fold higher levels of theobromine, which may be contributed to by the fact that the highest percentage of women in this age declared consuming chocolate during the day, and 41% of breastfeeding women at this age preferred dark chocolate, which contains more theobromine than milk chocolate [46].

The studies conducted showed significant differences in the content of caffeine and its metabolites according to stage of lactation. The smallest levels of tested compounds were recorded in milk from the first lactation period. Colostrum is the first food of a newborn baby and has a unique composition, including immunological factors, which is why it is called "immune milk" [47]. During this period, mothers pay special attention to their diet, wanting provide the best milk to their baby. A high percentage of breastfeeding women pay special attention to adherence to dietary recommendations, especially in terms of the proper consumption of vegetables and fruits, whole grains, and regular meals [48]. Reports in the literature confirm that women pay special attention to their diet directly after childbirth if they decide to breastfeed their child [49]. In subsequent stages of lactation, when transitional and mature milk are formed [50], the content of caffeine and its metabolites was significantly higher than in the 1st lactation period. This may be due to the higher consumption of caffeinated drinks as an anti-fatigue measure. During the analysis of 3 day food records, it was found that women in the 1st lactation period restricted coffee consumption most—43% of them consumed coffee once a day, and 17% of them completely excluded coffee.

In the undertaken studies, the milk sample was not collected under strictly defined time conditions, but at the moment when the child needed food. The level of caffeine in milk fluctuates over time, peaking approximately 2 h after consuming a caffeinated product. It is not recommended to drink caffeinated beverages, including coffee and tea, immediately before feeding the baby, because that is when the level of caffeine in milk is at its highest [21]. It has also been shown that after 120 min, the level of caffeine in breast milk decreases. These results were obtained after women consumed 150 mg of caffeine. It has been shown that a double dose of caffeine (300 mg) causes a 2-fold increase in the level of caffeine in blood serum and breast milk. In this study, the timing of intake of caffeinated foods and beverages was not monitored, and caffeine content was assessed on the basis of whole-day habitual intake, without taking into account the highest level of caffeine in milk. Therefore, levels of caffeine milk may have varied according to the time interval between

consumption of caffeine-containing foods or beverages and breastfeeding. Bojarowicz and Przygoda [41] report that by supplying the mother's body with 35–336 mg of caffeine, the infant consumes its mother's milk at an amount of approximately 1.3–3.1 mg. According to the literature, irritability and sleep problems were observed in infants whose mothers consumed approximately 10 cups of coffee a day [21]. None of the women in this study consumed these amounts of coffee; however, according to data collected by using 3 day food records, several breastfeeding women consumed higher total levels of caffeine per day—from more than 300 mg/day to as much as 400 mg/day—than levels recommended by the WHO (up to 250–300 mg/day). In addition to caffeine, each woman's milk also contained certain levels of its metabolites, paraxanthine, theophylline, and theobromine. In the examined samples of human milk, the highest levels of a metabolite were identified for theobromine, which ranged from 56% to 88% of all caffeine metabolites. Theobromine is a metabolite of caffeine, and it is also the main active compound in chocolate. Theobromine, in contrast to caffeine, has a weaker effect on the central nervous system—it only moderately raises alertness and also has a relaxing effect on muscles. Although paraxanthine is the main metabolite of caffeine, the highest levels of a metabolite in the milk of the studied women were determined for theobromine, due to chocolate consumption. It was reported that a low consumption of chocolate by nursing mothers did not adversely affect the infant, but including more cocoa in the diet affected the infant. It has been shown that a daily amount of 250 g of cocoa and chocolate in the diet of pregnant and lactating women caused irritability in the child, and the symptoms began to decrease after restricting the consumption of chocolate [51]. Paraxanthine, which is the main metabolite of caffeine, increases lipolysis; therefore coffee is considered a dietary component that indirectly reduces body fat [52]. In addition, theophylline is widely used in chronic obstructive pulmonary disease and asthma treatment due to its effect on the respiratory system [53]. Caffeine, when not consumed in excess, has a beneficial effect on the body—it increases mental activity, improves mood and concentration, and prevents diseases (e.g., type 2 diabetes and Alzheimer's disease), but this substance contains several compounds with a pharmacological effect and should be limited by people suffering from cardiovascular and gastrointestinal diseases as well as by pregnant and lactating women [22,54]. In terms of caffeine, its peak levels in breast milk are recorded approximately 1 h after its consumption; but in terms of its metabolites, other relationships have been found. The highest levels of paraxanthine are recorded 5–10 h after consuming caffeine-containing products, and that of theophylline and theobromine within 10 to 15 h [21].

When analyzing caffeine content in milk, it should be emphasized that the metabolism, clearance, and pharmacokinetics of caffeine depend on many factors that may affect the final content of caffeine and its metabolites in breast milk. One of the key factors is a genetic variation that affects the body's response to caffeine. Some pregnant women may be more sensitive to its effects—they metabolize caffeine more slowly. There is also a group of people who metabolize caffeine quickly, based on the higher content of enzymes responsible for the metabolism of caffeine [55]. This factor was not analyzed in the undertaken studies, and it may affect the final results of the studies. Most drugs and active substances do not pass into the milk of lactating women in amounts that are dangerous for the baby. On the other hand, it is not without reason that an upper maximum dose that should be consumed by pregnant women (250–300 day mg/day) has been established. Regular consumption of caffeine, especially coffee, may reduce the iron content in breast milk, which has a negative effect on the nutritional value of breast milk. Moreover, chronic consumption of beverages and foods containing caffeine may lead, especially in the neonatal period, too levels of caffeine and its metabolites that are too high in the plasma of infants [56]. Research by Sasaki et al. [56] shows that women who consume more than 300 mg of caffeine a day during pregnancy are more likely to give birth to children with a low body weight compared to women who consume safe doses of caffeine. Wesselink et al. [57] showed in their studies that excessive consumption of caffeine in the pre-conception period may cause fertility disorders in both

women and men, while Hoeven et al. [58] indicate a higher risk of cardiovascular disease in women who abuse caffeine-containing products during pregnancy.

Lastly, even though the vast majority of women follow the WHO recommendations and consume safe levels of caffeine during pregnancy and breastfeeding, there is still a percentage of women who abuse this active substance. In spite of growing nutritional awareness and compliance with nutritional recommendations during lactation, some women still do not follow the recommendations. Stage of lactation, just like the time of pregnancy, has a significant impact on the development and shaping of the baby's body. Breast milk is the most recommended food for babies due to its unique composition. According to research, more and more breastfeeding women pay attention to a balanced diet and restrict the consumption of products that may have a potentially negative effect on the baby. Scientific societies clearly state that during feeding, the consumption of products containing caffeine should be limited [6,59,60]. The most common reason for consuming caffeine is chronic fatigue and stress that accompany a nursing mother, especially in the first months of a child's life. The starting point for encouraging young mothers to reduce caffeine consumption is awareness raising related to nutrition during pregnancy and lactation in terms of possible health complications related to caffeine abuse. Today, nutritional programs or coaching applications offer methods of self-management of nutrition and lifestyle, which greatly facilitate the rational planning of meals for young mothers [61,62].

This study has certain limitations. Women fed their babies on demand, so levels of caffeine were not monitored following specific consumption of caffeinated food or drink. Therefore, because caffeine consumption was intermittent, the determined correlation coefficient between caffeine consumption and caffeine levels in breast milk may have been disturbed. The time between caffeine consumption and breastfeeding may have varied for each mother, therefore the plateau is reached extremely rapidly with caffeine consumption. However, during this study, the greatest possible consideration was given to the comfort of the mother and child, and therefore no modifications were made to the manner and frequency of feeding infants. The level of caffeine may also be affected by medications taken, and although the surveyed women declared that they do not take any medications constantly, temporary painkillers may react with caffeine, intensifying its effect. The rate of caffeine metabolism depends, among other things, on the condition of the liver, which is influenced by the amount of medicines consumed. In this study, we only included women who do not take medicine on a regular basis, but did not monitor their use of other medicines or dietary supplements, which can also affect liver function. There are some limitations related to food intake monitored by a 3 day food record in this study. The women declared the amount of milk and dark chocolate in their diet, but did not provide information about the possible consumption of other chocolate products (cakes and cookies). Consumption of cocoa-rich products can significantly affect levels of caffeine and theobromine in milk. Despite verification of the women's dietary records, data on consumption of such products may have been underreported. Another aspect that may be considered a limitation of this study is the sample size of only 100 breastfeeding women, which was caused by the difficulty in recruiting women willing to test or insufficient amounts of milk to collect samples.

5. Conclusions

Stage of lactation is associated with diet among nursing woman as well as the exclusion or restriction of selected substances. Scientific societies indicate that caffeine during pregnancy and lactation can be consumed without adversely affecting the baby at a limited amount of 250–300 mg per day. The studies conducted show that selected factors, such as place of residence, level of education, age, and stage of lactation, have an impact on the content of caffeine and its metabolites in breast milk. In this study, higher levels of caffeine were found in the milk of women living in cities, with secondary education and age (34–44 years old). Moreover, the highest levels of caffeine were found in mature milk in the 3rd and 4th lactation periods. In addition to the studied factors determining the

formation of caffeine and its metabolites in breast milk, its content may also be influenced by genetic variation, body physiology and diet during pregnancy and lactation. The choices and nutritional awareness of breastfeeding women depend to some extent on the mothers' level of education, place of residence, age, and stage of lactation. According to the current knowledge, a moderate caffeine content in the diet of nursing mothers should not endanger infants. However, it is recommended to limit the consumption of caffeinated beverages and foods to avoid possible adverse effects on the child.

Author Contributions: Conceptualization, A.P. and R.P.-F.; methodology, F.S. and M.K.; validation, F.S. and M.K.; formal analysis, R.P.-F., F.S. and M.K.; investigation, A.P. and R.P.-F.; resources, A.P.; writing—original draft preparation, A.P.; writing—review and editing, A.P., R.P.-F., F.S. and M.K.; visualization, A.P.; supervision, R.P.-F.; funding acquisition, R.P.-F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project was financially supported by the Minister of Education and Science under the program entitled "Regional Initiative of Excellence" for the years 2019–2022, Project No. 010/RID/2018/19; amount of funding 12.000.000 PLN.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (the Bioethics Committee) of the Medical University of Bialystok (No. R-I-003/22/2000).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in this study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on reasonable request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to thank the respondents group who made this study possible by donating breast milk samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Butts, C.A.; Hedderley, D.I.; Herath, T.D.; Paturi, G.; Glyn-Jones, S.; Wiens, F.; Stahl, B.; Gopal, P. Human milk composition and dietary intakes of breastfeeding omen of different ethnicity from the Manawatu-Wanganui Region of New Zeland. *Nutrients* **2018**, *10*, 1231. [CrossRef]
2. Karcz, K.; Lehman, I.; Królak-Olejnik, B. Foods to Avoid While Breastfeeding? Experiences and Opinions of Polish Mothers and Healthcare Providers. *Nutrients* **2020**, *12*, 1644. [CrossRef] [PubMed]
3. Gila-Diaz, A.; Arribas, S.M.; Algara, A.; Martin-Cabrejas, M.; López de Pablo, A.L.; Saenz dr Pipaón, M.S.; Ramiro-Cortijo, D. A review of bioactive factors in human breastmilk: A Focus on prematurity. *Nutrients* **2019**, *11*, 1307. [CrossRef] [PubMed]
4. Mahr, G.; Sörgel, F.; Granneman, G.R.; Kinzig, M.; Muth, P.; Patterson, K.; Fuhr, U.; Nickel, P.; Stephan, U. Effects of temafloxacin and ciprofloxacin on the pharmacokinetics of caffeine. *Clin. Pharm.* **1992**, *22*, 90–97. [CrossRef] [PubMed]
5. Pawłowska-Muc, A.K.; Łepecka-Klusek, C.; Stadnicka, G.; Pilewska-Kozak, A.B. Używki w ciąży—Kofeina. *J. Educ. Health Sport* **2015**, *5*, 395–406.
6. McCreedy, A.; Bird, S.; Brown, L.J.; Shaw-Stewart, J.; Chen, Y.-F. Effects of maternal caffeine consumption on the breastfed child: A systematic review. *Swiss Med. Wkly.* **2018**, *148*, 14665. [CrossRef]
7. Jetter, A.; Kinzig, M.; Rodamer, M. Phenotyping of N-acetyltransferase type 2 and xanthine oxidase with caffeine: When should urine samples be collected? *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2009**, *65*, 411–417. [CrossRef]
8. Domingues e Paula, T.M.; Lioe Teh Shang, F.; Chiarini-Garcia, H.; Radicchi Campos Lobato de Almeida, F. Caffeine Intake during Pregnancy: What Are the Real Evidences? *J. Pharm. Pharmacol.* **2017**, *5*, 249–260.
9. Monteiro, J.P.; Alves, M.G.; Oliveira, P.F.; Silva, B.M. Structure-bioactivity relationships of methylxanthines: Trying to make sense of all the promises and the drawbacks. *Molecules* **2016**, *21*, 974. [CrossRef]
10. Mladenovic, K.; Root, Y.; Ramanathan, D. UHPLC-HRMS analysis of theobromine in theobroma cacao and its products. *J. Nutr. Food Sci.* **2018**, *8*, 6. [CrossRef]
11. Cova, I.; Leta, V.; Mariani, C.; Pantoni, L.; Pomati, S. Exploring cocoa properties: Is theobromine a cognitive modulator? *Psychopharmacology* **2019**, *236*, 561–572. [CrossRef]
12. Available online: https://www.sciencedirect.com/topics/nursing-and-health-professions/paraxanthine (accessed on 12 May 2022).
13. Wilson, C. The clinical toxicology of caffeine: A review and case study. *Toxicol. Rep.* **2018**, *5*, 1140–1152. [CrossRef]
14. Del Coso, J.; Salinero, J.J.; Lara, B. Effects of caffeine and coffee on human functioning. *Nutrients* **2020**, *12*, 125. [CrossRef]

15. Błaszczyk-Bębenek, E.; Piórecka, B.; Kopytko, M.; Chadzińska, Z.; Jagielski, P.; Schlegel-Zawadzka, M. Evaluation of caffeine consumption among pregnant women from southern Poland. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2018**, *15*, 2373. [CrossRef]
16. Verster, J.C.; Koenig, J. Spożycie kofeiny i jej źródła: Przegląd krajowych badań reprezentatywnych. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *58*, 1250–1259. [CrossRef]
17. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the safety of caffeine. *EFSA J.* **2015**, *13*, 4102. Available online: https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4102.13.02.2022 (accessed on 25 October 2021).
18. Malczyk, E.; Wyka, J.; Malczyk, A.; Larma, K. Assessment of caffeine intake with food by polish females and males. *Rocz. Panstw. Zakl. Hig.* **2021**, *72*, 273–280. [CrossRef]
19. Rehm, C.D.; Ratliff, J.C.; Riedt, C.S.; Drewnowski, A. Coffee consumption among adults in the United States by demographic variables and purchase location: Analyses of nhanes 2011–2016 data. *Nutrients* **2020**, *12*, 2463. [CrossRef]
20. Ortega, R.M.; Pérez-Rodrigo, C.; López-Sobaler, A.M. Dietary assessment methods: Dietary records. *Nutr. Hosp.* **2015**, *31* (Suppl. 3), 38–45. [CrossRef]
21. Available online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK501467/ (accessed on 25 October 2021).
22. Rodak, K.; Kokot, I.; Kratz, E.M. Caffeine as a factor influencing the functioning of the human body—Friend or foe? *Nutrients* **2021**, *13*, 3088. [CrossRef]
23. Geraghty, S.R.; McNamara, K.; Kwiek, J.; Rogers, L.; Klebanoff, M.A.; Augustine, M.; Keim, S.A. Tobacco metabolites and caffeine in human milk purchased via the internet. *Breastfeed. Med.* **2015**, *10*, 419–424. [CrossRef]
24. Iacovou, M.; Sevilla, A. Infant feeding: The effects of scheduled vs. on-demand feeding on mothers' wellbeing and children's cognitive development. *Eur. J. Public Health* **2013**, *23*, 13–19. [CrossRef]
25. Farhud, D.D. Impact of lifestyle on health. *Iran. J. Public Health* **2015**, *44*, 1442–1444.
26. Pop, L.-M.; Iorga, M.; Sipos, L.-R.; Iurcov, R. Gender differences in healthy lifestyle, body consciousness, and the use of social networks among medical students. *Medicina* **2021**, *57*, 648. [CrossRef]
27. Samuel, T.M.; Zhou, Q.; Giuffrida, F.; Verhasselt, V.; Thakkar, S.K. Nutritional and non-nutritional composition of human milk is modulated by maternal, infant, and methodological factors. *Front. Nutr.* **2020**, *7*, 576133. [CrossRef]
28. Chung, M.-Y. Factors affecting human milk composition. *Pediatr. Neonatol.* **2014**, *55*, 421–422. [CrossRef]
29. Bo, L.G.; Lin, Q.; Ping, O.; Xian, X.R. Analysis on dietary survey and influencing factors of wet nurses during puerperal period. *Chin. J. Matern. Child. Health* **2015**, *30*, 3029–3031.
30. Wang, B.Z.; Sun, Y.J.; Zhang, H. Analysis of breast milk composition and it's impactors. *Ningxia Med. J.* **2016**, *38*, 758–760.
31. Levin, K.A. Urban-rural differences in adolescent eating behaviour: A multilevel cross-sectional study of 15-year-olds in Scotland. *Public Health Nutr.* **2014**, *17*, 1776–1785. [CrossRef] [PubMed]
32. Viartasiwi, N.; Trihartono, A. Café in small towns: A picture of the weakening social engagement. *Coffee Sci.* **2020**, *15*, e151687. Available online: http://www.coffeescience.ufla.br/index.php/Coffeescience/article/view/1687 (accessed on 30 March 2022). [CrossRef]
33. Gehlhar, M.; Coyle, W. Global food consumption and impacts on trade patterns. In *Changing Structures of Global Food Consumption and Trade*; Regmi, A., Ed.; ERS WRS 01-1; USDA, ERS: Washington, DC, USA, 2001; pp. 1–13.
34. Fallah, F.; Pourabbas, A.; Delpisheh, A.; Veisani, Y.; Shadnoush, M. Effects of nutrition education on levels of nutritional awareness of pregnant women in Western Iran. *Int. J. Endocrinol. Metab.* **2013**, *11*, 175–178. [CrossRef]
35. Korwin-Szymanowska, A.; Tuszyńska, L. Zachowania żywieniowe jako nieodłączny element edukacji żywieniowej—Raport z badan. In *Znaczenie Racjonalnego Żywienia W Edukacji Zdrowotnej*; Wolska-Adamczyk, A., Ed.; WSIiZ: Warszawa, Poland, 2015; pp. 23–38.
36. Szczepańska, E.; Brończyk-Puzoń, A. Ocena Nawyków żywieniowych pacjentów z otyłością, zakwalifikowanych do zabiegu bariatrycznego. *Med. Ogólna Nauki Zdrowiu* **2014**, *20*, 330–334. [CrossRef]
37. Lawrence, E.M. Why do college graduates behave more healthfully than those who are less educated? *J. Health Soc. Behav.* **2017**, *58*, 291–306. [CrossRef]
38. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2013**, *62*, 326–330.
39. Turnbull, D.; Rodricks, J.V.; Mariano, G.F.; Chowdhury, F. Caffeine and cardiovascular health. *Regul. Toxicol. Pharm.* **2017**, *89*, 165–185. [CrossRef]
40. Tyrala, E.E.; Dodson, W.E. Caffeine secretion into breast milk. *Arch. Dis. Child.* **1979**, *54*, 787–789. [CrossRef]
41. Bojarowicz, H.; Przygoda, M.; Kofeina, C.I. Powszechność stosowania kofeiny oraz jej działanie na organizm. *Probl. Hig. Epidemiol.* **2012**, *93*, 8–13.
42. Papadopoulou, E.; Botton, J.; Brantsæter, A.-L.; Haugen, M.; Alexander, J.; Meltzer, H.M.; Bacelis, J.; Elfin, A.; Jacobsson, B.; Sengpiel, V. Maternal caffeine intake during pregnancy and childhood growth and overweight: Results from a large Norwegian prospective observational cohort study. *BMJ Open* **2018**, *8*, e018895. [CrossRef]
43. Jarosz, M.; Wierzejska, R.; Siuba, M. Maternal caffeine intake and its effect on pregnancy outcomes. *Eur. J. Obstet. Gynecol.* **2011**, *160*, 156–160. [CrossRef]
44. Calvaresi, V.; Escuder, D.; Minutillo, A.; Bastons-Compta, A.; Garcia-Algar, O.; Alonso, C.R.P.; Pacifici, R.; Pichini, S. Transfer of nicotine, cotinine and caffeine into breast milk in a smoker mother consuming caffeinated drinks. *J. Anal. Toxicol.* **2016**, *40*, 473–477. [CrossRef]

45. Liberman, H.R.; Agarwal, S.; Fulgoni, V.L. Daily patterns of caffeine intake and the association of intake with multiple sociodemographic and lifestyle factors in us adults based on the NHANES 2007–2012 surveys. *J. Acad. Nutr. Diet.* **2019**, *119*, 106–114. [CrossRef]
46. Meng, C.C.; Jalil, A.M.; Ismail, A. Phenolic and theobromine contents of commercial dark, milk and white chocolates on the Malaysian market. *Molecules* **2009**, *14*, 200–209. [CrossRef] [PubMed]
47. Munblit, D.; Treneva, M.; Peroni, D.G.; Colicino, S.; Chow, L.; Dissanayeke, S.; Abrol, P.; Sheth, S.; Pampura, A.; Boner, A.L.; et al. Colostrum and mature human milk of women from London, Moscow, and Werona: Determinants of immune composition. *Nutrients* **2016**, *8*, 695. [CrossRef]
48. Olagnero, G.; Barretto, L.; Wiedemann, A.; Terraza, R.; Poy, M.S.; López, L. Maternal understanding regardins women nutrition during breastfeeding. *Health* **2018**, *10*, 1661–1672. [CrossRef]
49. Radzyminski, S.; Callister, L.C. Mother's beliefs, attitudes, and decision making related to infant feeding choices. *J. Perinat. Educ.* **2016**, *25*, 18–28. [CrossRef] [PubMed]
50. Czosnykowska-Łukacka, M.; Królak-Olejnik, B.; Orczyk-Pawiłowicz, M. Breast milk macronutrient components in prolonged lactation. *Nutrients* **2018**, *10*, 1893. [CrossRef]
51. Cambria, S.; Manganaro, R.; Mami, C.; Marseglia, L.; Gemelli, M. Hyperexcitability syndrome in a newborn infant of chocoholic mother. *Am. J. Perinatol.* **2006**, *23*, 421–422. [CrossRef]
52. Available online: https://www.sciencedirect.com/topics/earth-and-planetary-sciences/caffeine (accessed on 30 March 2022).
53. Barcelos, R.P.; Lima, F.D.; Carvalho, N.R.; Bresciani, G.; Royes, L.F.F. Caffeine effects on systemic metabolism, oxidative-inflammatory pathways, and exercise performance. *Nutr. Res.* **2020**, *80*, 1–17. [CrossRef]
54. Temple, J.L.; Bernard, C.; Lipshultz, S.E.; Czachor, J.D.; Westphal, J.A.; Mestre, M.A. The safety of ingested caffeine: A comprehensive review. *Front. Psychiatry* **2017**, *8*, 80. [CrossRef]
55. Nehlig, A.; Alexander, S.P. Variation in caffeine metabolism. *Pharmacol. Rev.* **2018**, *70*, 384–411. [CrossRef]
56. Sasaki, S.; Limpar, M.; Sata, F.; Kobayashi, S.; Kishi, R. Interaction between maternal caffeine intake during pregnancy and CYP1A2 C164A polymorphism affects infant birth size in the Hokkaido study. *Pediatr. Res.* **2017**, *82*, 19–28. [CrossRef]
57. Wesselink, A.K.; Wise, L.A.; Rothman, K.J.; Hahn, K.A.; Mikkelsen, E.M.; Mahalingaiah, S.; Hatch, E.E. Caffeine and caffeinated beverage consumption and fecundability in a preconception cohort. *Reprod. Toxicol.* **2016**, *62*, 39–45. [CrossRef]
58. van der Hoeven, T.; Browne, J.L.; Uiterwaal, C.; van der Ent, C.K.; Grobbee, D.E.; Dalmeijer, G.W. Antenatal coffee and tea consumption and the effect on birth outcome and hypertensive pregnancy disorders. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0177619. [CrossRef]
59. Jouanne, M.; Oddoux, S.; Noël, A.; Voisin-Chiret, A.S. Nutrient requirements during pregnancy and lactation. *Nutrients* **2021**, *13*, 692. [CrossRef]
60. Fewtrell, M.S.; Mohd Shukri, N.H.; Wells, J.C.K. 'Optimising' breastfeeding: What can we learn from evolutionary, comparative and anthropological aspects of lactation? *BMC Med.* **2020**, *18*, 4. [CrossRef]
61. Tedder, J. The roadmap to breastfeeding success: Teaching child development to extend breastfeeding duration. *J. Perinat. Educ.* **2015**, *24*, 239–248. [CrossRef]
62. Available online: https://www.unicef.org/media/48046/file/UNICEF_Breastfeeding_A_Mothers_Gift_for_Every_Child.pdf (accessed on 7 February 2022).

Załącznik nr 4 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 03.03.2025 r.
(miejscowość, data)

mgr inż. Aleksandra Purkiewicz
(imię i nazwisko kandydata)
Technologia Żywności i Żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem Caffeine, Paraxanthine, Theophylline, and Theobromine Content in Human Milk (Purkiewicz Aleksandra. Pietrzak-Fiećko Renata, Fritz Sörgel, Martina Kinzig, 2022, Caffeine, Paraxanthine, Theophylline, and Theobromine Content in Human Milk, Nutrients, 14(11), 2196, https://doi.org/10.3390/nu14112196) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu celu i hipotezy badań, uczestnictwie w przygotowaniu próbek do badań, zestawieniu, opracowaniu i interpretacji wyników pracy, analizie statystycznej, samodzielnym przygotowaniu manuskryptu oraz weryfikacji i udzieleniu odpowiedzi na otrzymane recenzje w czasopiśmie.

Aleksandra Purkiewicz
(podpis kandydata)

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 2 do
Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Dr hab. inż. Renata Pietrzak-Fiećko, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem Caffeine, Paraxanthine, Theophylline, and Theobromine Content in Human Milk (Purkiewicz Aleksandra. Pietrzak-Fiećko Renata, Fritz Sörgel, Martina Kinzig, 2022, Caffeine, Paraxanthine, Theophylline, and Theobromine Content in Human Milk, Nutrients, 14(11), 2196, https://doi.org/10.3390/nu14112196) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji badań weryfikacji postawionych hipotez, uczestnictwie w przygotowaniu próbek do badań, weryfikacji napisanego manuskryptu oraz organizacji środków finansowych do opublikowania artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Aleksandrę Purkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Aleksandry Purkiewicz polegający na: opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu celu i hipotezy badań, przygotowaniu próbek do badań i uczestnictwie w części eksperymentalnej, zestawieniu, opracowaniu i interpretacji wyników pracy, wykonaniu analizy statystycznej, samodzielnym przygotowaniu manuskryptu oraz weryfikacji i udzieleniu odpowiedzi na otrzymane recenzje w czasopiśmie.

Renata Pietrzak-Fiećko

podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 2
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 25.03.2024 r.
(miejscowość, data)

Professor Dr. Fritz Sörgel
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem ... Caffeine, Paraxanthine, Theophylline, and Theobromine Content in Human Milk.... (Purkiewicz Aleksandra, Pietrzak-Fiećko Renata, Fritz Sörgel, Martina Kinzig, 2022, Caffeine, Paraxanthine, Theophylline, and Theobromine Content in Human Milk, Nutrients, 14(11), 2196, https://doi.org/10.3390/nu14112196) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: ...przygotowaniu i walidacji metody badawczej, wykonywaniu części eksperymentalnej oraz współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje w czasopiśmie.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez ...mgr inż. Aleksandrę Purkiewicz.... jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata .....mgr inż. Aleksandry Purkiewicz..... polegający na: opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu celu i hipotezy badań, uczestnictwie w przygotowaniu próbek do badań, zestawieniu, opracowaniu i interpretacji wyników pracy, analizie statystycznej, samodzielnym przygotowaniu manuskryptu oraz weryfikacji i udzieleniu odpowiedzi na otrzymane recenzje w czasopiśmie.

.....
podpis

IBMP
Institut für Biomedizinische und
Pharmazeutische Forschung
Paul-Ehrlich-Str. 19
90562 Nürnberg-Heroldsberg

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 2
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 25.03.2024 r.
(miejscowość, data)

Dr. Martina Kinzig
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem … Caffeine, Paraxanthine, Theophylline, and Theobromine Content in Human Milk.... (Purkiewicz Aleksandra, Pietrzak-Fiećko Renata, Fritz Sörgel, Martina Kinzig, 2022, Caffeine, Paraxanthine, Theophylline, and Theobromine Content in Human Milk, Nutrients, 14(11), 2196, https://doi.org/10.3390/nu14112196) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: ...przygotowaniu i walidacji metody badawczej, wykonywaniu części eksperymentalnej oraz współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje w czasopiśmie.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez …mgr inż. Aleksandrę Purkiewicz.... jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata .....mgr inż. Aleksandry Purkiewicz…….....
polegający na: opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu celu i hipotezy badań, uczestnictwie w przygotowaniu próbek do badań, zestawieniu, opracowaniu i interpretacji wyników pracy, analizie statystycznej, samodzielnym przygotowaniu manuskryptu oraz weryfikacji i udzieleniu odpowiedzi na otrzymane recenzje w czasopiśmie.

.....
podpis

Załącznik 2

Publikacja P2

Purkiewicz, A., Czaplicki, S., Pietrzak-Fiećko, R. (2022). The Occurrence of Squalene in Human Milk and Infant Formula. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(19), 12928. http://doi.org/10.3390/ijerph191912928.

.

International Journal of
Environmental Research and Public Health

MDPI

Article

The Occurrence of Squalene in Human Milk and Infant Formula

Aleksandra Purkiewicz [1], Sylwester Czaplicki [2] and Renata Pietrzak-Fiećko [1,*]

[1] Department of Commodity Science and Food Analysis, Faculty of Food Sciences, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Cieszyński 1 Sq, 10-719 Olsztyn, Poland
[2] Department of Food Plant Chemistry and Processing, Faculty of Food Sciences, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Cieszyński 1 Sq, 10-719 Olsztyn, Poland
* Correspondence: renap@uwm.edu.pl

Abstract: (1) Background: The aim of the conducted research was to analyze the squalene content in infants' food. (2) Methods: The experimental material included human milk collected from 100 women from Poland and three different infant formulas. The breast milk fat was extracted according to the Rose–Gottlieb method (AOAC), while the squalene content was determined using the high-performance liquid chromatography (HPLC) method. (3) Results: The highest amount of squalene was identified in the milk of women aged 18–25 ($p < 0.05$), and its content in milk decreased with the age of lactating women. Moreover, the greatest amount of squalene was identified in milk from the first lactation period (colostrum), while in mature milk, its content was more than two times lower. There was a correlation between breastfeeding BMI and the squalene content in milk (r = 0.78). (4) Conclusions: The conducted research shows that the level of squalene in human milk depends on physiological factors such as the lactation period and individual factors (age, BMI). The results of the conducted research indicate that breast milk is richer in squalene than modified milk. This study shows the importance of breastfeeding and indicates the superiority of breast milk over infant formulas.

Keywords: squalene content; bioactive ingredients; breastfeeding; lactation

check for updates

Citation: Purkiewicz, A.; Czaplicki, S.; Pietrzak-Fiećko, R. The Occurrence of Squalene in Human Milk and Infant Formula. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 12928. https://doi.org/10.3390/ijerph191912928

Academic Editor: Paul B. Tchounwou

Received: 26 August 2022
Accepted: 6 October 2022
Published: 9 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Mother's milk is considered the gold standard in infant nutrition; due to its unique composition that adapts individually to the needs of the child, it is highly recommended that babies be fed only the mother's milk until the child is at least 6 months old [1,2]. Such a position is recommended by, amongst others, the American Academy of Pediatricians (AAP) and the American Academy of Family Physicians (AAFP), who emphasize that breastfeeding reduces the risk of disease later in life [3]. Gregg et al. [4] indicate that lactation is the period in which the baby's health is largely dependent on the mother's milk, and its ingredients influence the baby's metabolic programming. In addition to the appropriate amount of energy and nutrients needed for the proper growth of a young organism, it also contains several functional ingredients with a bioactive effect [5]. These ingredients significantly affect the health of the newborn, stimulate the immune system, and protect against infections in the body [6]. Among the bioactive components of human milk are proteins, oligosaccharides, polyunsaturated fatty acids (PUFA), fat-soluble vitamins, hormones, and growth factors or probiotics [7]. Lipids play a special role in the development of a young organism. During the first month of life, a newborn child derives energy from fats at the level of about 50%. Therefore, during this period, in addition to the source of energy, lipids are a very important building function of the brain and nervous system [8]. An important component of human milk is squalene [9]. Squalene is a triterpene hydrocarbon ($C_{30}H_{50}$) with six double bonds in its structure [9]. It is a non-steroidal cholesterol precursor; it is absorbed from the intestine and synthesized in adipose tissue, liver, and skin [10]. This

relationship in the human body is responsible for several processes. Squalene is synthesized into acetyl-CoA, is a precursor of biologically important compounds, stimulates the immune system, and protects the skin against UV radiation [9]. Squalene is reported to have several bioactive properties, including antioxidant, anti-cancer, and anti-atherosclerotic properties [11,12].

Piesiewicz [13] reports that squalene constitutes 0.12% of the lipid composition of human milk, which is about 2–6% of the total cholesterol concentration in breast milk [14]. Squalene is necessary for the development of the body's immunity [15]. This is important for both the mother and the baby in terms of the health-promoting properties of squalene. This component has a beneficial effect on the immune system and the acquisition of natural human immunity, which enables the support of the underdeveloped immune system of the child. In addition, it acts as an antidote in the body by removing poisons, mainly xenobiotics, which are sometimes found in breast milk fat. Many poisons can dissolve into squalene and thus are removed from the body along with feces [13].

The human body synthesizes some amounts of squalene on its own. This ingredient plays a significant role in the human body—100 g of sebum contains about 30 mg of squalene. It is also found in the skin (14.8 mg/100 g), thyroid gland (5.5 mg/100 g), lymph glands (5.2 mg/100 g), the inner layer of arteries (4.0 mg/100 g), and the spleen (3.0 mg/100 g) [13]. High levels of squalene are also found where the infection-fighting white blood cells are formed. In addition, squalene is a precursor to cholesterol, steroid hormones, vitamin D3, and bile acids, which are essential compounds for human health [16]. The richest source of squalene is shark liver, which contains up to 70% of this compound. Sources of squalene among food products include vegetable oils such as amaranth (6300 mg/100 g) and olive oil (685.5 mg/100 g), corn (27.9 mg/100 g), parmesan cheese (9.6 mg/100 g), and butter (6.1 mg/100 g) [13].

So far, it has been shown that squalene is an important component that determines the proper development of a child. Despite the proven presence of squalene in human milk, only a few authors have undertaken a study of the content of this component in breast milk. Moreover, there are no studies to indicate the content of squalene in modified milk in the presently available literature. The literature shows a relationship between the decline in squalene synthesis with age and its variable content in milk depending on the lactation period [14,17]. A novelty in the undertaken research is the analysis of the squalene content in relation to age, lactation period, and BMI in human milk. This research aimed to analyze the squalene content in human milk and infant formulas.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Ethyl alcohol, ammonia, diethyl ether, hexane, acetonitrile, isopropyl alcohol, anhydrous sodium sulfate, and squalene standard were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Research Material

The research material consisted of samples of human milk and modified milk from three producers. Samples of human milk were collected from 100 women who are natives and presently live in the east–northeast region of Poland. The inclusion criteria for the study included the proper health of women, no contraindications to breastfeeding, and easy delivery. The surveyed women were asked to complete a questionnaire containing questions about personal data (first name, surname, age, place of residence), body weight and height, current diseases, medications used frequently, and information on pregnancy and lactation (type of childbirth, date of birth of the child, date of milk sampling, child's sex, weight and height of the child, and the number of children born). Based on a nutritional interview with women, none of them included the characteristic food products that are sources of squalene (amaranth, olive oil, fish oils). The study group included women aged 18–44 years. The breastfeeding population was organized

into age categories (18–25 years old, 26–33 years old, and 34–44 years old), by stages of lactation (1st—colostrum: breast milk until a few days after birth, 2nd—foremilk: breast milk until two weeks after birth, 3rd and 4th: hindmilk—breast milk from 4 weeks of breastfeeding), and BMI (<18.5 kg/m^2—underweight; 18.5–24.99 kg/m^2—normal weight; 25.0–29.99 kg/m^2—overweight; >30 kg/m^2—obese) [18]). The characteristics of the studied population group are presented in Table 1. The milk samples (50 to 100 mL) were collected from each woman using electronic breast pumps immediately after breastfeeding into sterile glass bottles. If it was not possible to collect the right amount of milk during one breastfeeding session (50 to 100 mL), the women were asked to store the milk in a tightly closed container in the refrigerator (4 ± 1 °C), and to refill it during the next breastfeeding session. The milk samples were stored in special containers maintaining the temperature, and then frozen and stored at a temperature of −30 °C. The research material also included modified milk from three producers intended for the initial feeding of infants. Modified milk was purchased on the Olsztyn market. Each of the milk samples was milk modified on the basis of cow's milk. The tested modified milks were characterized by a similar energy value and nutritional value. The modified milk was prepared for analytical tests in accordance with the instructions on the manufacturer's packaging.

Table 1. Characteristics of the studied breastfeeding women.

Factors	*n* = 100
Age, year	
18–25	32
26–33	39
34–44	29
Stage of lactation	
1st	33
2nd	39
3rd and 4th	28
BMI, kg/m^2	
<18.5 (underweight)	9
18.5–24.99 (normal weight)	52
25.0–29.99 (overweight)	34
>30 (obese)	5

2.3. Sample Extraction

The human milk samples were removed from the freezer, thawed, and mixed rapidly. The tested breast milk samples were heated to 40 ± 1 °C. A process of fat extraction from the breast milk was performed according to the Rose–Gottlieb method [19]. Approximately 10 g of milk (weighed with an accuracy of 0.01 g) was added to 2 mL of 10% ammonia and 10 mL of ethyl alcohol, each time gently mixing. From the mixture prepared in this process, the fat was extracted with diethyl ether and hexane in an amount of 25 mL each. The upper organic layer was collected and then dried by filtration through anhydrous sodium sulfate. The organic solvents were evaporated using a rotary evaporator. A double extraction of milk fat was used.

2.4. Determination of Squalene Content Using High-Performance Liquid Chromatography Method (HPLC)

The determination of the squalene content in the sample was carried out using the high-performance liquid chromatography (HPLC) technique according to the method developed as a result of the modification of the procedure for the determination of triacylglycerols described by Czaplicki et al. [20].

A sample of the women's milk fat (about 200 mg) was transferred into a 10 mL volumetric flask, filled up with n-hexane, and purified by spinning. The analysis was carried out using a 1200 series liquid chromatograph manufactured by Agilent Technologies

(Palo Alto, CA, USA), equipped with a DAD detector (set at 218 nm) from the same manufacturer. Chromatographic separations were conducted on a Merck LiChrospher RP-18 column, 250 mm × 4.6 mm, 5 mm, at 30 °C. A gradient system was used for elution: A, acetonitrile; B, isopropyl alcohol; C, hexane. The elution profile was 0–12 min, 20–22% B and 10–12% C in A (linear gradient), 12–15 min 22–25% B and 12–25% C in A (linear gradient), 15–20 min, 25% B and 25% C in A (isocratic), 20–25 min, 25–20% B and 25–10% C in A (linear gradient). The mobile phase flow rate was 1 mL/min.

The external calibration curve was used for quantitative analysis. The squalene standard was supplied by Sigma-Aldrich. The calibration curve is described by an equation: squalene peak area = 27.23023 × amount (mg/L) + 1.57784 with linearity proved by a correlation coefficient 0.9997. The detection limit for the method was determined as 62.5 µg/100 g of milk lipids and the quantitation limit was 208.3 µg/100 g of milk lipids.

2.5. Statistical Analysis

Descriptive statistics were used to characterize the studied population group. The obtained results were presented as mean ± standard deviation (SD). The normal distribution was determined with the Shapiro–Wilk test, while the homogeneity of variance was determined with Levene's test. The studied distribution was not normal and the variance was not homogeneous, thus, non-parametric tests were used for the analyses. The Kruskal–Wallis and Dunn's post hoc test compared the quantitative data between the distinguished groups by age and stage of lactation. Linear Spearman's correlation coefficients were calculated to show the relationships between BMI (body mass index) and the content of squalene in the breast milk samples. The significance level was $\alpha \leq 0.05$. The program Statistica 13.1 (Statsoft Inc., Tulsa, OH, USA) was used for the statistical analysis.

3. Results

The squalene content was determined in the tested samples of human milk and modified milk from selected producers. The results of the squalene content in the tested samples are summarized in the graphs (Figures 1–3) and Table 2.

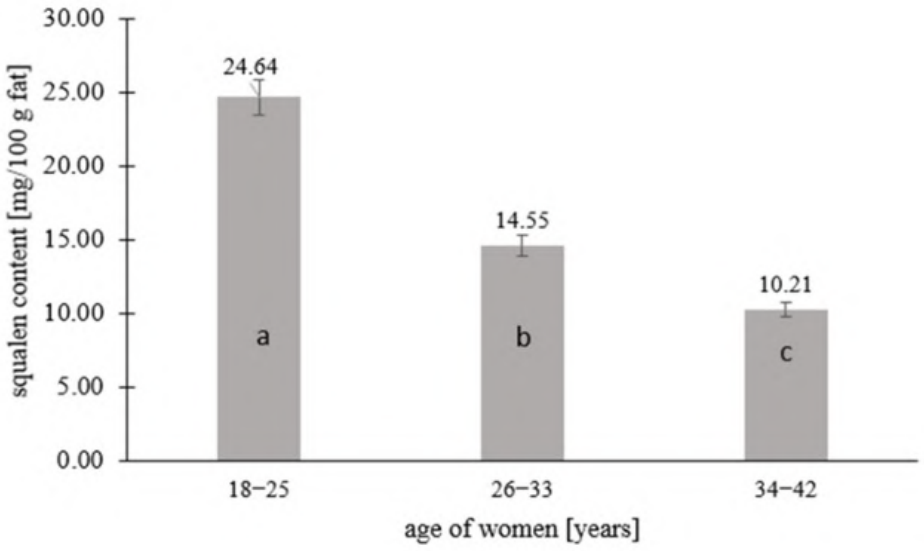


Figure 1. Squalene content in human milk in relation to the age of lactating women. Means followed by a different letter (a, b, c) are significantly different ($p < 0.05$).

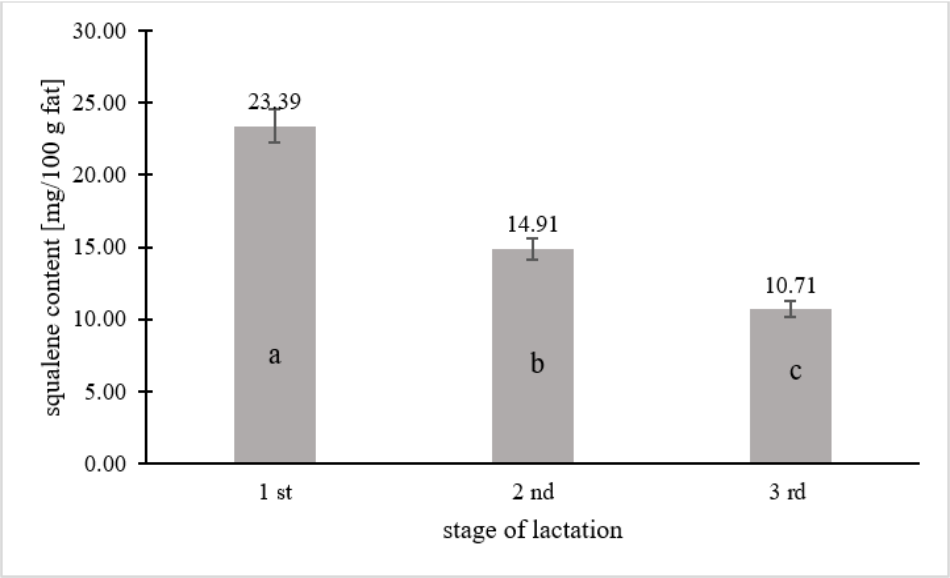


Figure 2. Squalene content in breast milk in relation to the lactation period. Means followed by a different letter (a, b, c) are significantly different ($p < 0.05$).

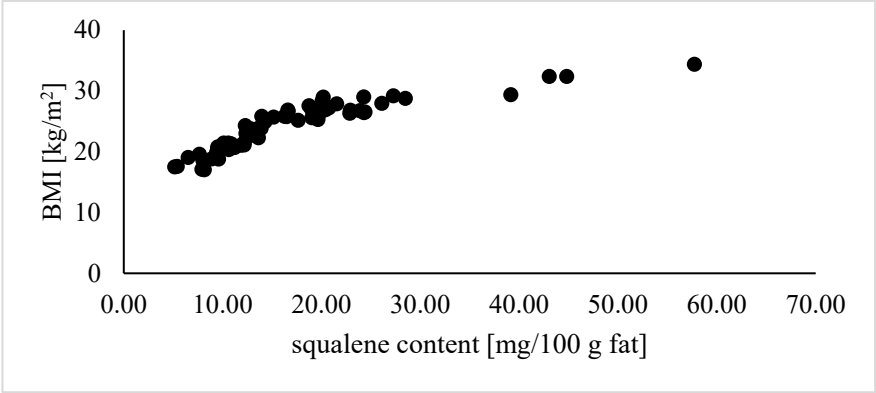


Figure 3. Correlation coefficients (r) calculated for the relationship between the BMI of lactating women and squalene content in human milk (correlation: r = 0.78).

Table 2. Average content of fat, cholesterol, and squalene in human milk and formula milk of selected producers.

Sample		Fat (g/100 mL) Mean (Range)	Cholesterol (mg/100 mL) Mean (Range)	Squalene (mg/100 g Fat) Mean (Range)
Human milk		4.0 (3.0–5.0)	16.50 (10.0–23.0)	16.93 (5.43–57.73)
Infant formula	A	3.4 (3.2–3.6)	2.48 (1.1–6.7)	<0.208
	B	3.3 (3.1–3.5)	5.45 (4.6–6.5)	<0.208
	C	3.5 (3.2–3.7)	0.93 (0.4–1.3)	<0.208

Source: own study based on Kamelska et al. [21] and own research.

Squalene was quantified in 67% of the human milk samples (n = 67), while 33% contained <0.208 mg squalene per 100 g fat, which is the limit of quantification of the tested component. Figures 1–3 and Table 2 take into account the squalene content in the milk samples of 67% of the women, in which its content could be analytically determined. Figure 1 shows the squalene content in the human milk samples as a function of the age of the women. There were significant differences in the squalene content by age. The highest

content of squalene was found in the milk of women aged 18–25 ($p \leq 0.05$) and lowered with the age of women. The milk of women aged 26–33 years contained 1.7 times less squalene than the milk of women aged 18–25, while the milk of women aged 34–42 years contained almost 2.5 times less ($p \leq 0.05$). Significant differences in the content of squalene in human milk according to the lactation period were also noted. According to the research, the milk from the first lactation period contained the most squalene, while the milk from the third lactation period had the least ($p \leq 0.05$). The milk from the first lactation period contained 1.5 and more than 2 times the squalene than the milk from the second and third lactation periods, respectively.

In Figure 3, the relationship between the content of squalene in breast milk and the BMI of the studied women was analyzed. It was shown that as the BMI increased, the women's milk contained more squalene. The lowest squalene content was recorded in the milk samples of underweight women (BMI < 18.5 kg/m^2), while the highest was found among obese women (BMI > 30 kg/m^2). There was a significant correlation between the BMI of breastfeeding women and the content of squalene in breast milk (r = 0.78).

Table 2 shows the average content of fat, cholesterol, and squalene in human milk and the modified milk of selected producers. The human milk contained an average of 4 g of fat per 100 mL, while the fat content of formula milk ranged from 3.1 to 3.7 g/100 mL. In the case of cholesterol, based on the literature data, it has been shown that its content in human milk is, on average, 16.5 mg/100 mL, while in modified milk A, B, and C it is successively almost 7, 3, and almost 18 times lower, respectively. The cholesterol content in human milk and infant formulas correlated with the content of squalene. A higher squalene content in breast milk results in a higher cholesterol content. The average level of squalene in breast milk was 17 mg/100 g fat, while the modified milk contained only traces of squalene (<0.208 mg/100 g fat); in the case of cholesterol, the breast milk contained values several times higher than the modified milk.

4. Discussion

This research presents the level of squalene in baby food—human milk and formula—and shows the influence of selected factors (age of breastfeeding women, lactation period, BMI) on the level of squalene in breast milk.

The course of a normal pregnancy is associated with an increased level of cholesterol in the blood serum in women, therefore the level of cholesterol precursors, namely, squalene, desmosterol, and lanosterol, during lactation are also at a higher level [22]. Pregnancy and lactation are closely related to increased cholesterol synthesis, which is essential for the proper development of the newborn [23]. Of the breast milk samples tested, 67% of them contained squalene, while 33% of the milk samples contained <0.208 mg squalene per 100 g fat, which is considered to be below the limit of detection. The squalene content varies according to many factors. The group of 33% of women whose milk samples did not contain squalene mainly consisted of women over 30 with a BMI within the normal range. However, in almost 20 women, the BMI value was at the lower limit of the norm (18.5–19.2 kg/m^2). Consequently, for the percentage of lactating women whose milk samples did not contain a measurable amount of squalene, it was not possible to determine the exact squalene content in these samples. The amount of squalene in the body also changes with age. This ingredient is produced in the greatest amounts until the age of 25. After this time, its concentration gradually decreases and the body is more exposed to oxidative stress [17]. With age, the production of squalene in the body decreases, and at the same time, the demand for it begins to increase. Newborn babies have the highest level of squalene, and after the age of 30, their production begins to drop rapidly [24]. Since a positive correlation has been demonstrated between the presence of squalene in the blood serum of the mother and the infant and its presence in the mother's milk, it's assumed that with the age of lactating women, consequently the content of squalene in the mother's milk also decreases. Even though squalene is present in breast milk in small amounts, it has a strong effect on free oxygen radicals, thus stimulating the immune system [25]. Pertaining to infants and

young children, an important function of squalene is its detoxifying function, including the ability to bind and block pesticides, xenobiotics, dioxins, and other poisons that pass from the contaminated environment into the body and then into breast milk.

The composition of breast milk varies during the lactation period, mainly in terms of dry matter, non-fat dry matter, fat, and protein [26]. Differences in the composition of breast milk concerning the lactation period are particularly noticeable in the fat fraction of milk. In addition to the total content of fat, its composition also changes. One of the components of the fat fraction of milk—the amount of which depends on the lactation period—is squalene. Kallio et al. [14] showed that the concentration of squalene increased between the second and sixth month of lactation (from 9.4 to 12.0 μmol/L), while it decreased between the sixth and ninth month of lactation (from 12.0 to 11.0 μmol/L). In turn, Laitinen et al. [27] reported that the concentration of squalene in breast milk decreased between the first and third trimester of pregnancy (by more than three units), and increased again after delivery. Moreover, serum squalene levels were also assessed in the children of the mothers studied and it was shown that the level of squalene decreased between 1 and 6 months of age (from 36.5 to 27.2 mmol/mmol cholesterol). Mothers in different periods of lactation participated in the study. The greatest amount of squalene was contained in colostrum (first lactation period), and its content was more than two times lower in mature milk (third lactation period).

In the conducted research, an analysis of the relationship between squalene level in breast milk and BMI was undertaken. Miettinen et al. (2014) indicated increased cholesterol synthesis among obese women with BMI > 30 kg/m^2. In the studies undertaken, along with the increase in the BMI of the lactating women, an increased presence of squalene in the breast milk was also observed. Squalene is one of the precursors of cholesterol, and obesity in pregnancy and lactation is often associated with elevated markers of serum cholesterol synthesis, and because the fat components including squalene can penetrate breast milk [15], its increased presence in the blood may also result in its increased content in breast milk. Overweight and obesity very often correlate with an increased level of adipose tissue. Adipose tissue synthesizes and stores large amounts of squalene, and squalene is transported in triglyceride-rich lipoproteins. Consequently, a higher BMI may lead to higher levels of squalene in breast milk. Moreover, it should be emphasized that overweight and obesity, and rapid changes in body weight, have an impact on cholesterol metabolism [10]. Therefore, in people with excess body weight, the squalene distribution is higher and the body may generate a need for a higher squalene requirement [28]. In the group of studied women, the level of squalene in milk increased with an increase in BMI, which may indicate its higher synthesis in people with excess body weight.

Another subject of the research was the modified milk of various producers, intended for the initial feeding of infants. Formula milk mixtures were created as an alternative to mother's milk. More attention is paid to the fact that the composition of the modified milk resembles mother's milk as much as possible, but despite the improved production technology, the fortification of milk with some bioactive ingredients is impossible [29]. The critical difference between the composition of human milk and modified milk is the fat fraction. A unique ingredient in breast milk is long-chain polyunsaturated fatty acids, including docosahexaenoic acid (DHA), necessary for the proper development of the brain, nervous system, and eyesight of the child [30]. While the fortification of modified milk with DHA has been mandatory in the European Union since 2020 [31], there is still a lot of emphasis on the advantages of possible long breastfeeding. This is because modified milk is enriched with artificial omega-3 fatty acids, and does not contain alkylglycerols and squalene, which can support the infant's immune system, fighting not only against infections, but also protecting against various chronic diseases [15]. In the tested modified milk from different producers, the squalene content was lower than the lower detection limit of this component in milk fat. Based on the tested samples of infant formula, it was found that they were not a rich source of squalene. However, for a more detailed analysis, it would be necessary to test more samples of modified milk from different producers in order

to reach a clear conclusion on the squalene content in infant formula. Fat is an ingredient from which a newborn obtains energy at the level of about 50%, so it is extremely important to provide infants with the best-composed food. Breast milk adapts individually to the needs of the child. Moreover, unlike modified milk, it contains immune bodies that shape the immature immune system. Polyunsaturated fatty acids and squalene are components that pass from the mother's body into breast milk. Therefore, breastfeeding ensures that an adequate level of such compounds is available for the child during infancy and early age. Moreover, it prevents deficiencies and the resulting autoimmune disorders (rheumatoid arthritis, psoriasis, Hashimoto's disease, and type 1 diabetes) [15]. An important component of breast milk is cholesterol. It is present in very little or no form in the formula, hence the absence of squalene and other cholesterol precursors. For a newborn child, contact with cholesterol from the mother's milk is extremely important because it teaches the child's body to properly manage it and avoid metabolic problems later in life [32].

Omega-3 fatty acids, squalene, and alkylglycerols can pass into breast milk. At the stage of pregnancy and breastfeeding, an appropriate diet is particularly important as it will determine the correct level of these compounds for the child's body [15]. The levels of squalene in the breast milk of lactating women, differing in terms of age, lactation period, and BMI, did not result from a varied diet. Even though squalene can be supplemented with the diet, the women did not receive dietary recommendations regarding the inclusion of squalene-rich products in their diet, such as olive oil, shark liver oil, or amaranth [33], and did not take dietary supplements containing squalene.

Given that the many bioactive ingredients in modified milk do not include squalene, it is recommended that infants be fed exclusively with mother's milk up to the age of 6 months, and continue to be given it at least until the age of 24 months. This method of feeding infants ensures that the child is provided with all of the necessary nutrients and ensures the best development of the young organism. It should be emphasized that despite squalene having proven health-promoting properties, there is still little research on the content of this nutrient in breast milk and its health-promoting properties on a child. The conducted studies have shown that the content of squalene in breast milk varies depending on the mother's age, lactation period, and body weight and its relation to body height (BMI). Although the majority of breast milk samples contained squalene, 33% of them still contained squalene to an unmeasurable value (below the lower limit of detection of squalene in fat). Although the World Health Organization recommends breastfeeding as long as possible and emphasizes the high nutritional value of mother's milk due to the unique composition (the content of proteins, polyunsaturated fatty acids, oligosaccharides, immune factors, enzymes, and hormones), so far, no unambiguous standards have been established regarding the content of cholesterol precursors, including squalene, in breast milk and the resulting pro-health properties.

5. Conclusions

Breastfeeding allows you to provide the young body with a number of nutrients necessary for the proper functioning of the body. More squalene was identified in women aged 18–25 compared to older mothers, and in colostrum compared to foremilk and hindmilk. Finally, a relationship between the content of squalene in milk and BMI has been demonstrated: the squalene content increased with BMI growth. The tested samples of modified milk did not contain any measurable content of squalene. In the study, a third of the human milk samples, like the samples of infant formula, contained squalene at the level of <0.208 mg/kg fat. Nevertheless, on the basis of the research carried out, breast milk can be considered a better source of squalene compared to modified milk.

Author Contributions: Conceptualization, A.P.; methodology, S.C. and R.P.-F.; validation, S.C. and R.P.-F.; formal analysis, A.P. and S.C.; investigation, A.P.; resources, A.P.; writing—original draft preparation, A.P.; writing—review and editing, S.C. and R.P.-F.; visualization, A.P.; supervision, R.P.-F.; funding acquisition, R.P.-F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project was financially supported by the Minister of Education and Science under the program entitled "Regional Initiative of Excellence" for the years 2019–2023, Project No. 010/RID/2018/19, amount of funding 12.000.000 PLN.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (the Bioethics Committee) of the Medical University of Bialystok (No. R-I-003/22/2000).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in this study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on reasonable request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Del Ciampo, L.A.; Del Ciampo, R.L. Breastfeeding and the benefits of lactation for women's health. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* **2018**, *40*, 354–359. [CrossRef] [PubMed]
2. Purkiewicz, A.; Pietrzak-Fiećko, R.; Sörgel, F.; Kinzig, M. Caffeine, Paraxanthine, Theophylline, and Theobromine Content in Human Milk. *Nutrients* **2022**, *14*, 2196. [CrossRef]
3. Borowitz, S.M. First Bites—Why, When, and What Solid Foods to Feed Infants. *Front. Pediatr.* **2021**, *9*, 654171. [CrossRef]
4. Gregg, B.; Ellsworth, L.; Pavela, G.; Shah, K.; Berger, P.K.; Isganaitis, E.; VanOmen, S.; Demerath, E.W.; Fields, D.A. Bioactive compounds in mothers milk affecting offspring outcomes: A narrative review. *Pediatr. Obes.* **2022**, *17*, e12892. [CrossRef] [PubMed]
5. Gila-Diaz, A.; Arribas, S.M.; Algara, A.; Martin-Cabrejas, M.; López de Pablo, A.L.; Saenz dr Pipaón, M.S.; Ramiro-Cortijo, D. A review of bioactive factors in human breastmilk: A Focus on prematurity. *Nutrients* **2019**, *11*, 1307. [CrossRef] [PubMed]
6. Schaefer, E.; Demmelmair, H.; Horak, J.; Holdt, L.; Grote, V.; Maar, K.; Neuhofer, C.; Teupser, D.; Thiel, N.; Goeckeler-Leopold, E.; et al. Multiple micronutrients, lutein, and docosahexaenoic acid supplementation during lactation: A randomized controlled trial. *Nutrients* **2020**, *12*, 3849. [CrossRef]
7. Kim, S.Y.; Yi, D.Y. Components of human breast milk: From macronutrient to microbiome and microRNA. *Clin. Exp. Pediatr.* **2020**, *63*, 301–309. [CrossRef] [PubMed]
8. Lauritzen, L.; Brambilla, P.; Mazzocchi, A.; Harslof, L.B.S.; Ciappolino, V.; Agostoni, C. DHA effects in brain development and function. *Nutrients* **2016**, *8*, 6. [CrossRef]
9. Antoniewska, A.; Adamska, A.; Rutkowska, J.; Zielińska, M. Olej z nasion dyni jako źródło cennych składników w diecie człowieka. *Probl. Hig. Epidemiol.* **2017**, *98*, 17–22.
10. Miettinen, H.E.; Rono, K.; Koivusalo, S.; Stach-Lempinen, B.; Poyhonen-Alho, M.; Eriksson, J.G.; Hiltunen, T.P.; Gylling, H. Elevated serum squalene and cholesterol synthesis markers in pregnant obese women with gestational diabetes mellitus. *J. Lipid Res.* **2014**, *55*, 2644–2654. [CrossRef]
11. Ebrahimi, M.; Farhadian, N.; Amiri, A.R.; Hataminia, F.; Soflaei, S.S.; Karimi, M. Evaluating the efficacy of extracted squalene from seed oil in the form of microemulsion for the treatment of COVID-19: A clinical study. *J. Med. Virol.* **2022**, *94*, 119–130. [CrossRef] [PubMed]
12. Czaplicki, S.; Tańska, M.; Ogrodowska, D. Improving the stability of cold-pressed oils by their enrichment in sea-buckthorn oil. *Pol. J. Nat. Sci.* **2016**, *31*, 621–635.
13. Piesiewicz, H. Co nieco o skwalenie. *Przegl. Piek. Cuk.* **2006**, *2*, 8–10.
14. Kallio, M.J.T.; Siimes, M.A.; Perheentupa, J.; Salmenperä, L.; Miettinen, T.A. Cholesterol and its precursors in human milk during prolonged exclusive breast-feeding. *Am. J. Clin. Nutr.* **1989**, *50*, 782–785. [CrossRef] [PubMed]
15. Zielińska-Tomaszewska, J.; Bukowska, B.; Tomaszewski, K. Tłuszcze—Wielcy sprzymierzeńcy zdrowia (cd.). *Food Forum* **2019**, *6*, 1–5.
16. Huang, J.; Zhou, S.; Ping, J.; Pan, X.; Liang, G.; Xu, D.; Kou, H.; Bao, C.; Wang, H. Role of P53-dependent Placental Apoptosis in the Reproductive and Developmental Toxicities of Caffeine in Rodents. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2012**, *39*, 357–363. [CrossRef]
17. Du Preez, H. Squalene—Antioxidant of the future. *S. Afr. J. Nat. Med.* **2007**, *33*, 106–112.
18. Lorem, G.F.; Schirmer, H.; Emaus, N. What is the impact of underweight on selfreported health trajectories and mortality rates: A cohort study. *Health Qual. Life Outcomes* **2017**, *15*, 191. [CrossRef]
19. AOAC. Gravimetric Method (RöseGottlieb). In *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th ed.; Method Nr 905.02; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA, 2000.
20. Czaplicki, S.; Zadernowski, R.; Ogrodowska, D. Triacyloglycerols from viper bugloss (*Echium vulgare L.*) seeds. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2009**, *111*, 1266–1269. [CrossRef]
21. Kamelska, A.M.; Pietrzak-Fiećko, R.; Bryl, K. Zawartość cholesterolu jako determinanta jakości żywności dla niemowląt. *Zesz. Nauk. Uniw. Ekon. Pozn.* **2011**, *196*, 38–44.
22. Perrine, C.G.; Nelson, J.M.; Corbelli, J.; Scanlon, K.S. Lactation and Maternal Cardio-Metabolic Health. *Annu. Rev. Nutr.* **2016**, *36*, 627–645. [CrossRef] [PubMed]

23. Van Brakel, L.; Thijs, C.; Mensink, R.P.; Lütjohann, D.; Plat, J. Non-Cholesterol Sterols in Breast Milk and Risk of Allergic Outcomes in the First Two Years of Life. *Nutrients* **2022**, *14*, 766. [CrossRef] [PubMed]
24. Rahma, A.; Lane, M.E. Skin barrier function in infants: Update and outlook. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 433. [CrossRef] [PubMed]
25. Ronco, A.L.; De Stefani, E.; Ronco, A. Squalene: A multi-task link in the crossroads of cancer and aging. *J. Funct. Food Health Dis.* **2013**, *3*, 462–476. [CrossRef]
26. Kiboi, W.; Kimiywe, J.; Chege, P.; Robert, S. Longitudinal Changes of Human Milk Nutrient Content in the First 6 Months of Lactation. *World J. Nutr. Health* **2020**, *8*, 1–6. [CrossRef]
27. Laitinen, K.; Isolauri, E.; Kaipiainen, L.; Gylling, H.; Miettinen, T.A. Plant stanol ester spreads as components of a balanced diet for pregnant and breast-feeding women: Evaluation of clinical safety. *Br. J. Nutr.* **2008**, *101*, 1797–1804. [CrossRef]
28. Dietary Reference Values for Nutrients—Summary Report. Available online: https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/2017_09_DRVs_summary_report.pdf (accessed on 19 July 2022).
29. Pina-Rodriguez, A.M.; Akoh, C.C. Synthesis and Characterization of a Structured Lipid from Amaranth Oil as a Partial Fat Substitute in Milk-Based Infant Formula. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6748–6756. [CrossRef]
30. Bzikowska-Jura, A.; Czerwonogrodzka-Senczyna, A.; Jasińska-Melon, E.; Mojska, H.; Olędzka, G.; Wesołowska, A.; Szostak-Węgierek, D. The Concentration of Omega-3 Fatty Acids in Human Milk is Related to their Habitual but Not Current Intake. *Nutrients* **2019**, *11*, 1585. [CrossRef]
31. Komisja Europejska. Rozporządzenie Delegowane Komisji 2016/12 z dnia 25 września 2015 roku Uzupełniające Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 609/2013 w Odniesieniu do Szczegółowych Wymogów Dotyczących Składu Preparatów do Początkowego Żywienia Niemowląt. Dz.U. *L25 z 2.2.2016.* Available online: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R0128&from=SL (accessed on 11 July 2022).
32. Skidan, I.N.; Kaznacheev, K.S.; Gulyaev, A.E. Cholesterol—An essential component of infant milk formula? *Vopr. Pitan.* **2016**, *85*, 118–130.
33. Lozano-Grande, M.A.; Gorinstein, S.; Espitia-Rangel, E.; Dávila-Ortiz, G.; Martínez-Ayala, A.L. Plant Sources, Extraction Methods, and Uses of Squalene. *Int. J. Agron.* **2018**, *2018*, 1829160. [CrossRef]

Załącznik nr 4 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 03.03.2025 r.
(miejscowość, data)

mgr inż. Aleksandra Purkiewicz
(imię i nazwisko kandydata)
Technologia Żywności i Żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem The Occurrence of Squalene in Human Milk and Infant Formula (Purkiewicz Aleksandra, Czaplicki Sylwester, Pietrzak-Fiećko Renata, 2022, The Occurrence of Squalene in Human Milk and Infant Formula, International Journal of Environmental Research and Public Health, 19(19), 12928, https://doi.org/10.3390/ijerph191912928) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu celu i hipotezy badań, przygotowaniu próbek do badań i uczestnictwie w części eksperymentalnej, zestawieniu, opracowaniu i interpretacji wyników pracy, wykonaniu analizy statystycznej, samodzielnym przygotowaniu manuskryptu oraz weryfikacji i udzieleniu odpowiedzi na otrzymane recenzje w czasopiśmie.

Aleksandra Purkiewicz
(podpis kandydata)

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 2 do
Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Dr hab. inż. Sylwester Czaplicki, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia żywności i żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem … The Occurrence of Squalene in Human Milk and Infant Formula.... (Purkiewicz Aleksandra, Czaplicki Sylwester, Pietrzak-Fiećko Renata, 2022, The Occurrence of Squalene in Human Milk and Infant Formula, International Journal of Environmental Research and Public Health, 19(19), 12928, https://doi.org/10.3390/ijerph191912928) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: ...przygotowaniu i walidacji metody badawczej, wykonywaniu części eksperymentalnej, weryfikacji napisanego manuskryptu, oraz współudziale w przygotowaniu odpowiedzi na recenzje w czasopiśmie.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez …mgr inż. Aleksandrę Purkiewicz.... jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata .....mgr inż. Aleksandry Purkiewicz……..... polegający na: opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu celu i hipotezy badań, przygotowaniu próbek do badań i uczestnictwie w części eksperymentalnej, zestawieniu, opracowaniu i interpretacji wyników pracy, wykonaniu analizy statystycznej, samodzielnym przygotowaniu manuskryptu oraz weryfikacji i udzieleniu odpowiedzi na otrzymane recenzje w czasopiśmie.

.....

podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 2 do
Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Dr hab. inż. Renata Pietrzak-Fiećko, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem The Occurrence of Squalene in Human Milk and Infant Formula (Purkiewicz Aleksandra, Czaplicki Sylwester, Pietrzak-Fiećko Renata, 2022, The Occurrence of Squalene in Human Milk and Infant Formula, International Journal of Environmental Research and Public Health, 19(19), 12928, https://doi.org/10.3390/ijerph191912928) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: przygotowaniu i walidacji metody badawczej, uczestnictwie w wykonywaniu części eksperymentalnej, weryfikacji napisanego manuskryptu oraz organizacji środków finansowych do opublikowania artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Aleksandrę Purkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Aleksandry Purkiewicz polegający na: opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu celu i hipotezy badań, przygotowaniu próbek do badań i uczestnictwie w części eksperymentalnej, zestawieniu, opracowaniu i interpretacji wyników pracy, wykonaniu analizy statystycznej, samodzielnym przygotowaniu manuskryptu oraz weryfikacji i udzieleniu odpowiedzi na otrzymane recenzje w czasopiśmie.

Renata Pietrzak-Fiećko .....

podpis

Załącznik 3

Publikacja P3

Purkiewicz A., Pietrzak-Fiećko R. (2024). Changes in the Fatty Acid Profile of Lactating Women Living in Poland—A Comparison with the Fatty Acid Profile of Selected Infant Formulas. *Nutrients*, *16*(15), 2411; https://doi.org/10.3390/nu16152411.

.

nutrients

MDPI

Article

Changes in the Fatty Acid Profile of Lactating Women Living in Poland—A Comparison with the Fatty Acid Profile of Selected Infant Formulas

Aleksandra Purkiewicz * and Renata Pietrzak-Fiećko

Department of Commodity Science and Food Analysis, Faculty of Food Science, University of Warmia and Mazury, Plac Cieszyński 1, 10-718 Olsztyn, Poland; renap@uwm.edu.pl
* Correspondence: aleksandra.purkiewicz@uwm.edu.pl

Abstract: The present study examined the fatty acid content of human milk from Polish women living in the Warmia and Mazury region with regard to different lactation periods and compared it with the fatty acid content of selected infant formulas. The analysis included samples of breast milk—colostrum (n = 21), transitional milk (n = 26), and mature milk (n = 22). Fat was extracted using the Rose-Gottlieb method, and the fatty acid profile was determined by gas chromatography with a flame ionization detector (FID). The proportion of SFAs (saturated fatty acids) > MUFAs (monounsaturated fatty acids) > PUFAs (polyunsaturated fatty acids) was determined in each fraction of breast milk and infant formula. Palmitic, oleic, and linoleic acids predominated in breast milk and infant formulas. Colostrum contained lower contents of selected SFAs (caprylic, capric, lauric) and higher contents of selected MUFAs (ercucic) and PUFAs (arachidonic and docosahexaenoic) ($p < 0.05$) relative to transitional and mature milk. Infant formulas were distinguished from human milk in terms of their SFA (caproic, caprylic, lauric, arachidic), MUFA (oleic), and PUFA (linoleic, α-linoleic) content. It should be noted that infant formulas contained significantly lower trans fatty acid (TFA) content—more than thirty-six and more than nineteen times lower than in human milk. Furthermore, human milk contained branched-chain fatty acids (BCFAs) at 0.23–0.28%, while infant formulas contained only trace amounts of these acids. The average ratio of n-6 to n-3 fatty acids for human milk was 6.59:1 and was close to the worldwide ratio of 6.53 ± 1.72:1. Both principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA) indicated significant differences in the fatty acid profile relative to lactation and a different profile of infant formulas relative to breast milk.

Keywords: human milk composition; food for infants; fatty acid profile; breastfeeding; lactation period

check for updates

Citation: Purkiewicz, A.; Pietrzak-Fiećko, R. Changes in the Fatty Acid Profile of Lactating Women Living in Poland—A Comparison with the Fatty Acid Profile of Selected Infant Formulas. *Nutrients* **2024**, *16*, 2411. https://doi.org/10.3390/nu16152411

Academic Editor: Chiara Peila

Received: 26 June 2024
Revised: 17 July 2024
Accepted: 22 July 2024
Published: 25 July 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Human breast milk is the optimal dietary source of nutrients for infants. Its composition is adapted to the needs of the child in terms of all the nutrients, bioactive compounds, as well as immune factors that are essential for the development of the young organism [1]. The infant period is critical for the proper development of organs and tissues; therefore, nutrition is crucial at this stage. According to the recommendations of the World Health Organization (WHO), it is recommended that breast milk should be the only source of nutrition for the first six months of a child's life. Natural feeding should be continued until 24 months of age, with the addition of appropriate complementary foods [2].

The predominant component of breast milk is water (87–88%), and the remaining components include solids: carbohydrates (7%), lipids (3.8%), and proteins (1%) [3]. The most notable of these are lipids, which provide about 50% of the baby's energy during infancy [2]. During lactation, the fat content of breast milk can vary from 3.5 to 4.5%. Breast milk fat consists of 98% triacylglycerols (TAGs), with the remainder consisting of phospholipids and cholesterol [4]. The dominant fatty acids in breast milk are saturated fatty acids (SFAs) and monounsaturated fatty acids (MUFAs), followed by omega-3 (n-3)

and omega-6 (*n*-6) polyunsaturated fatty acids (PUFAs) [5]. Half of the fatty acids in breast milk consist of SFAs, with palmitic acid (C16:0) being the dominant one, accounting for about 23% of all fatty acids. In contrast, the highest proportion in breast milk is oleic acid (C18:1 *n*-9), accounting for about 36% of the proportion of fatty acids [6].

Essential fatty acids, including linoleic acid (18:2 *n*-6; LA) and α-linolenic acid (C18:3 *n*-3; ALA), are particularly important in infant development. These acids are precursors to physiologically important polyunsaturated metabolites, including arachidonic acid (C20:4 *n*-6; AA), eicosapentaenoic acid (C20:5 *n*-3; EPA) as well as docosahexaenoic acid (C22:6 *n*-3; DHA). Particular focus in infant development should be on DHA, which can accumulate in the membrane lipids of the brain and retina during the perinatal period, where it is responsible for the formation of visual acuity and the motor system of newborns [7]. It has been indicated that the intake of long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs) in the diet is associated with improved neurocognitive development and growth in infants, particularly in premature infants with low fat reserves [2]. Most commonly, breast milk is deficient in EPA and DHA, which are naturally sourced from fish, seafood, and seaweed [8]. A special relationship is noted between low maternal intake of DHA and its reduced concentration in breast milk. Low fish consumption among lactating mothers may be the reason for the deficiency of this acid in infants. DHA insufficiency may increase the risk of central nervous system dysfunction and impair the development of cognitive functions and visual processes [9].

Fat is one of the components of breast milk and is characterized by high variability. The quality of breast milk fat and its fatty acid composition is influenced by external factors such as the lactation period, the mother's age, socioeconomic factors, body weight and height, and the woman's established eating habits and lifestyle [10]. Breast milk is variable in composition during the first two months of life to adapt individually to the changing needs of the infant. Immediately after birth, colostrum is secreted, and its main function is in immunity [11]. Gila Diaz et al. [12] reported that colostrum contains a variety of bioactive compounds that stimulate the development and maturation of the infant's immune system. After 7–10 days postpartum, the transitional milk is formed, which contains higher concentrations of energy and nutrients as the infant's nutritional needs increase. It is reported that milk after 4–6 weeks postpartum is considered mature milk, and its composition remains unchanged until the end of lactation [6].

Infant formulas are alternative foods for infants and young children that are used when the mother is unable or chooses not to breastfeed [13,14]. The production of infant formula is very restrictive, and manufacturers must follow a series of standards to ensure that the composition of the final product covers all the nutritional needs of infants [15]. Over the past few decades, manufacturers have continuously improved the composition of infant formula to resemble breast milk to the highest possible degree [16]. Despite technological advances, large differences in the fatty acid composition of infant formula compared with breast milk, particularly of ALA, EPA, DHA, and AA, are still indicated [16]. Considering the high variability of the lipid fraction of breast milk, it is difficult to establish optimal target levels of fatty acids when developing infant mixtures [17].

The variability in the fatty acid profile of breast milk and infant formula has been a topic frequently discussed by researchers in recent times [18–20]. There are limited studies in the literature on the impact of lactation on the fatty acid profile among Polish women living in the Warmia and Mazury region. Accordingly, the aim of this study was to:

(1) Determine the differences between the fatty acid profile of colostrum, transitional milk, and mature milk of Polish women living in the Warmia and Mazury region;
(2) Compare the fatty acid profile of breast milk from different periods of lactation with that of commercially available infant formulas in Poland;
(3) Determine, using multivariate methods, which fatty acids are most responsible for the differences indicated between breast milk samples from different lactation periods and between breast milk and infant formulas.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Ammonia, potassium hydroxide, and sodium sulfate were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Methyl and ethyl alcohol, diethyl ether, and petroleum ether were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Milk Sample Collection

The study material involved maternal milk samples from three different stages of lactation (colostrum, transitional milk, mature milk) and two types of follow-on infant formulas. Samples of milk were obtained from 100 women living in north-eastern Poland in the Warmian–Masurian province. The opportunity to participate in the study was made available after meeting the following inclusion criteria: (1) good health; (2) breastfeeding the child and having no contraindications to natural feeding; (3) having undergone childbirth without complications. Breastfeeding women were required to fill out a questionnaire containing data on their age, place of residence, weight and height, past illnesses, and medications they have been taking. The second part of the questionnaire concerned data on pregnancy and breastfeeding (date and type of delivery, month of milk sample collection, date of milk sample collection). Women participating in the study gave written informed consent to participate. The characteristics of the study group of women are shown in Table S1.

Milk samples of 50–100 mL were collected from study participants using electric breast pumps or milk collectors immediately after breastfeeding. All mothers included in the study were informed in advance about proper milk storage (tightly closed tube, refrigerated conditions). When it was not possible to collect an adequate amount of milk during one feeding, women replenished the milk during the next feeding by refilling the same tubes. The milk samples prepared by the women were transported and stored in a Gorenje F6313W freezer (Velenje, Slovenia) at −30 °C in sterile tubes until analytical testing. Of the 100 study participants, 69 women provided sufficient amounts of milk. The study material gathered was categorized by lactation period as the criterion and included 21 colostrum samples, 26 transitional milk samples, and 22 mature milk samples. In addition, this study took into account two types of commercial follow-on infant formulas (for feeding infants older than 6 months) purchased in the Olsztyn market. Each infant formula was composed of cow's milk and was in the form of a powder, which was mixed with water according to the instructions on the package. Table 1 summarizes the nutritional value and preparation of the infant formulas analyzed. The indicated information was obtained from the original packaging of the products. Table 2 shows the content of saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids in 100 mL of ready-to-eat infant formula, expressed as % of total fatty acids. Calculations were made based on Table 1, using the information for the preparation of 100 mL of both kinds of milk.

Table 1. The nutritional value of the infant formulas studied.

Nutritional Value in 100 g of Powder *	IF-I	IF-II
Energy (kcal)	482	511
Fat (g), of which	25	27.8
Saturated fatty acids (g)	11	12.4
Monounsaturated fatty acids (g)	10	11
Polyunsaturated fatty acids (g)	4.2	4.4
Carbohydrates (g), of which	51	54.3
Sugars (g)	24	23.1
Protein (g)	11	9.8
Preparation of 100 mL of milk	13.8 g of powder + 90 mL of water	12.8 g of powder + 100 mL of water

Abbreviations: IF-I, IF-II—infant formulas from different manufacturers. * Data were obtained from the labels of individual infant formulas.

Table 2. Content of SFAs, MUFAs, and PUFAs in 100 mL of tested ready-to-eat infant formulas and as % of total fatty acids.

Group of Fatty Acids	IF-I		IF-II	
	In 100 mL of the Prepared Milk *	% of Total Fatty Acids	In 100 mL of Prepared Milk	% of Total Fatty Acids
Saturated fatty acids	1.52	43.65	1.59	44.60
Monounsaturated fatty acids	1.38	39.68	1.41	39.57
Polyunsaturated fatty acids	0.58	16.67	0.56	15.83

* Calculations were made based on data from Table 1, using information for the preparation of 100 mL of infant formula. Abbreviations: IF-I, IF-II—infant formulas from different manufacturers.

2.3. Fat Extraction

Human milk samples were removed from the freezer, defrosted, and quickly mixed. They were then heated to 40 ± 1 °C for homogenization. The individual infant formulas were prepared according to the instructions on the package, as shown in Table 1 (the appropriate amount of powder was added to the correct amount of water). Fat from breast milk was extracted using the Rose-Gottlieb method [21]. For the weighed samples of human milk and infant formula (approximately 10 g was weighed to the nearest 0.01 g), 2 mL of 10% ammonia and 10 mL of ethanol were added, stirring gently each time. The fat was extracted from the prepared mixture with in 25 mL each of diethyl ether and petroleum ether. The upper organic layer was collected and then filtered through anhydrous sodium sulfate. Subsequently, using a rotary evaporator, the organic solvents were evaporated from the samples. Double extraction of milk fat was utilized.

2.4. Determination of the Fatty Acid Profile Using Gas Chromatography (GC)

The fatty acids of all types were converted into the appropriate fatty acid methyl esters (FAMEs) following the International Dairy Federation (IDF)'s standard method (2002) [21], utilizing a methanol solution of potassium hydroxide (KOH) [22]. The methyl esters obtained in the process were analyzed using the gas chromatography (GC) method. Chromatographic separation was carried out using a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph (Palo Alto, CA, USA) with a flame ionization detector (FID) and a Supelcowax 10 capillary column (length—100 m; inner diameter—0.25 mm; liquid phase—Supelcowax 30; film thickness—0.25 mm; temperature: detector = 250 °C, dispenser = 230 °C, column = 195 °C; carrier gas—helium; flow rate—1.5 mL/min) (Supelco, Sigma-Aldrich subsidiary, St. Louis, MO, USA). The fatty acid methyl esters were identified based on their retention times and were compared with those specified for the mixture of fatty acid methyl esters in a standard mixture of Supelco 37 Component FAME (10 mg/mL in methylene chloride). The G1701BA ChemStation B.01.00 software (Agilent, Alpharetta, GA, USA) was utilized to calculate the percentage of fatty acids. Individual fatty acids were expressed as a weight percentage of total FAMEs.

2.5. Statistical Analysis

The data obtained were presented as the mean ± standard deviation (SD). The distributions of the studied variables in the samples were tested against a normal distribution using the Shapiro–Wilk test, and the homogeneity of variance was tested using Levene's test. The tested distribution was not normal, and the variance was not homogeneous; therefore, non-parametric tests were used. The quantitative data collected between the distinguished groups (fatty acids in breast milk with regard to lactation and fatty acids in selected infant formulas) were compared using the non-parametric Kruskal–Wallis test. Principal component analysis (PCA) and cluster analysis (CA) were also carried out to show differences between breast milk samples according to the lactation period and to determine which fatty acids most determined these changes. The level of significance was assumed at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using Statistica 13.1 (Statsoft Inc., Tulsa, OH, USA).

3. Results

3.1. Fatty Acid Profiles

The fatty acid composition is shown in Table 3. A total of 29 fatty acids were detected in HM and IF, including ten saturated fatty acids (SFAs), six monounsaturated fatty acids (MUFAs), five polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (including three from the omega-3 family and two from the omega-6 family), three branched-chain fatty acids (BCFAs), and five trans fatty acids (TFAs).

Table 3. Content of saturated fatty acids (SFAs), monounsaturated fatty acids (MUFAs), polyunsaturated *n*-3 and *n*-6 fatty acids (PUFAs *n*-3 and *n*-6), branched-chain fatty acids (BCFAs) and trans fatty acids (TFAs) in human milk according to lactation period and in selected infant formulas. The total SFA, MUFA, and PUFA content and the ratio of selected fatty acids in breast milk and infant formulas (%) are shown.

Fatty Acid	Common Name	Colostrum	Transitional Milk	Mature Milk	IF-I	IF-II
C6:0	Caproic	ND	0.03 ± 0.05 ^{b}	0.01 ± 0.05 ^{b}	0.21 ± 0.02 ^{a}	0.17 ± 0.00 ^{a}
C8:0	Caprylic	0.08 ± 0.06 ^{c}	0.26 ± 0.19 ^{b}	0.33 ± 0.32 ^{b}	2.25 ± 0.20 ^{a}	1.78 ± 0.00 ^{a}
C10:0	Capric	0.92 ± 0.40 ^{b}	1.65 ± 0.63 ^{a}	2.06 ± 1.04 ^{a}	1.77 ± 0.13 ^{a}	1.40 ± 0.01 ^{a}
C12:0	Lauric	3.99 ± 1.69 ^{c}	5.99 ± 2.94 ^{b}	6.09 ± 2.30 ^{b}	12.95 ± 0.41 ^{a}	10.26 ± 0.06 ^{a}
C14:0	Myristic	5.94 ± 1.52 ^{b}	7.43 ± 2.47 ^{b}	9.21 ± 2.22 ^{a}	5.38 ± 0.05 ^{b}	4.47 ± 0.02 ^{b}
C15:0	Pentadecylic	0.36 ± 0.17 ^{a}	0.40 ± 0.17 ^{a}	0.40 ± 0.18 ^{a}	0.06 ± 0.00 ^{b}	0.04 ± 0.00 ^{b}
C16:0	Palmitic	28.10 ± 6.06 ^{a}	29.24 ± 6.14 ^{a}	26.58 ± 8.75 ^{a}	18.82 ± 0.17 ^{a}	21.68 ± 1.44 ^{a}
C17:0	Margaric	0.36 ± 0.11 ^{a}	0.39 ± 0.11 ^{a}	0.38 ± 0.15 ^{a}	0.07 ± 0.00 ^{b}	0.09 ± 0.00 ^{b}
C18:0	Stearic	6.72 ± 1.55 ^{a}	7.13 ± 2.03 ^{a}	7.58 ± 2.01 ^{a}	3.17 ± 0.02 ^{b}	3.88 ± 0.10 ^{b}
C20:0	Arachidic	0.03 ± 0.08 ^{b}	0.02 ± 0.04 ^{b}	0.07 ± 0.09 ^{b}	0.33 ± 0.00 ^{a}	0.29 ± 0.01 ^{a}
C14:1 *n*5	Myristoleic	0.14 ± 0.10 ^{a}	0.17 ± 0.06 ^{a}	0.17 ± 0.09 ^{a}	0.02 ± 0.00 ^{b}	0.03 ± 0.02 ^{b}
C16:1 *n*7	Palmitoleic	1.90 ± 0.66 ^{a}	2.43 ± 3.53 ^{a}	1.89 ± 0.76 ^{a}	0.20 ± 0.01 ^{b}	0.16 ± 0.00 ^{b}
C17:1 *n*9	cis-10-Heptadecenoic acid	0.14 ± 0.03 ^{a}	0.13 ± 0.03 ^{a}	0.15 ± 0.05 ^{a}	0.04 ± 0.01 ^{b}	0.03 ± 0.00 ^{b}
C18:1 *n*9	Oleic	31.46 ± 6.35 ^{b}	30.05 ± 4.83 ^{b}	29.18 ± 8.19 ^{b}	37.34 ± 0.14 ^{a}	35.10 ± 0.20 ^{a}
C20:1 *n*9	Eicosenoic	0.46 ± 0.36 ^{a}	0.40 ± 0.36 ^{a}	0.39 ± 0.25 ^{a}	0.43 ± 0.00 ^{a}	0.15 ± 0.01 ^{b}
C22:1 *n*9	Ercucic	0.14 ± 0.04 ^{a}	0.09 ± 0.16 ^{b}	0.10 ± 0.19 ^{b}	ND	ND
C18:2 *n*6	Linoleic (LA)	8.49 ± 1.77 ^{b}	8.59 ± 1.86 ^{b}	8.83 ± 2.58 ^{b}	12.76 ± 0.21 ^{a}	16.62 ± 0.07 ^{a}
C20:4 *n*6	Arachidonic (AA)	0.61 ± 0.18 ^{a}	0.52 ± 0.22 ^{b}	0.47 ± 0.28 ^{b}	0.52 ± 0.11 ^{b}	0.49 ± 0.07 ^{b}
C18:3 *n*3	α-linoleic (ALA)	0.72 ± 0.52 ^{c}	0.84 ± 0.69 ^{c}	0.94 ± 0.60 ^{c}	2.11 ± 0.03 ^{a}	1.55 ± 0.01 ^{b}
C20:5 *n*3	Eicosapentaenoic (EPA)	0.17 ± 0.21 ^{a}	0.18 ± 0.26 ^{a}	0.15 ± 0.28 ^{a}	0.03 ± 0.01 ^{b}	0.04 ± 0.02 ^{b}
C22:6 *n*3	Docosahexaenoic (DHA)	0.44 ± 0.14 ^{a}	0.41 ± 0.04 ^{b}	0.33 ± 0.06 ^{b}	0.42 ± 0.10 ^{a}	0.45 ± 0.07 ^{a}
iso C15:0	Isopentadecylic	0.06 ± 0.03 ^{a}	0.07 ± 0.03 ^{a}	0.07 ± 0.04 ^{a}	ND	ND
anteiso C15:0	Anteisopentadecylic	0.10 ± 0.07 ^{a}	0.12 ± 0.06 ^{a}	0.10 ± 0.07 ^{a}	ND	0.01 ± 0.00 ^{b}
iso C16:0	Isopalmitic	0.07 ± 0.05 ^{a}	0.09 ± 0.05 ^{a}	0.08 ± 0.04 ^{a}	0.06 ± 0.00 ^{a}	ND
C18:1 *n*6+*n*9 *t*	Petroselaidic and Elaidic	0.56 ± 0.29 ^{a}	0.45 ± 0.23 ^{a}	0.49 ± 0.25 ^{a}	0.08 ± 0.02 ^{b}	0.15 ± 0.02 ^{b}
C18:1 *t*11	Vaccenic (VA)	2.99 ± 4.19 ^{a}	1.74 ± 0.98 ^{a}	1.52 ± 1.26 ^{a}	ND	ND
C18:2 *c*9*t*11	Rumenic (RA)	0.21 ± 0.43 ^{a}	0.13 ± 0.11 ^{b}	0.18 ± 0.29 ^{a}	ND	ND
C16:1 *t*7	Palmitelaidic	0.10 ± 0.05 ^{a}	0.10 ± 0.06 ^{a}	0.09 ± 0.07 ^{a}	ND	ND
	SFAs	46.50 ^{b}	52.54 ^{a}	52.71 ^{a}	45.01 ^{b}	44.06 ^{b}
	MUFAs	34.24 ^{b}	33.27 ^{b}	31.88 ^{c}	38.03 ^{a}	35.47 ^{b}
	PUFAs; *n*6	9.10 ^{c}	9.11 ^{c}	9.30 ^{c}	13.28 ^{b}	17.11 ^{a}
	PUFAs; *n*3	1.33 ^{c}	1.43 ^{c}	1.42 ^{c}	2.56 ^{a}	2.04 ^{b}
	BCFAs	0.23 ^{a}	0.28 ^{a}	0.25 ^{a}	0.06 ^{b}	0.01 ^{c}
	TFAs	3.86 ^{a}	2.42 ^{b}	2.28 ^{b}	0.08 ^{c}	0.15 ^{c}
	PUFA *n*6:PUFA *n*3	6.84:1	6.37:1	6.55:1	5.19:1	8.39:1
	DHA:LA	0.05:1	0.05:1	0.04:1	0.03:1	0.03:1
	DHA:AA	0.72:1	0.79:1	0.70:1	0.81:1	0.92:1
	LA:ALA	11.79:1	10.23:1	9.39:1	6.05:1	10.72:1

Abbreviations: IF-I, IF-II—infant formulas from different manufacturers, SFAs—saturated fatty acids, MUFAs—monounsaturated fatty acids, PUFAs—polyunsaturated fatty acids, BCFAs—branched-chain fatty acids, TFAs—trans fatty acids, DHA—docosahexaenoic acid, LA—linoleic acid, AA—arachidonic acid, ALA—α-linoleic acid, ND—non detected. Means with different letters (a, b, c) are significantly different at $p < 0.05$. Means a, b, c specify differences between fatty acid composition in human milk depending on the lactation period and between breast milk from different lactation periods and infant formulas from two producers.

3.1.1. Saturated Fatty Acids (SFAs)

In both breast milk and infant formula, one acid from the short-chain fatty acid (SCFA) group (with 4–6 carbon atoms)—caproic acid (C6:0)—was detected. Its value was at the level of 0.03% and 0.01% in transitional and mature milk, respectively. In infant formulas, its content was significantly higher—0.21% and 0.17% in IF-I and IF-II, respectively ($p < 0.05$).

Among medium-chain fatty acids (MCFAs), caprylic (C8:0), capric (C10:0), and lauric (C12:0) acids were identified. In breast milk, total MCFAs were 4.99%, 7.90%, and 8.48% in colostrum, transitional milk, and mature milk, respectively. In contrast, the MCFA content in infant formula was 16.97% in IF-I and 13.44% in IF-II, respectively. These values are on average about two to three times higher than in breast milk at different stages of lactation.

Of the SFAs, the predominant acid in breast milk and infant formula was palmitic acid (C16:0), with contents of 28.10%, 29.24%, and 26.58%, respectively, in colostrum, transitional, and mature milk. In the present study, there was a decrease in C16:0 in mature milk relative to colostrum. The reported decline oscillated at around 6%. The percentage of C16:0 in infant formulas varied from one manufacturer to another. In IF-I the content was 18.82%, and in IF-II it was 21.68%. Compared with breast milk, the C16:0 content in infant formulas was about 30% lower.

The second highest percentage of fatty acids in breast milk was myristic acid (C14:0) (5.94%—colostrum; 7.43%—transitional milk; 9.21%—mature milk), the amount of which increased significantly as the milk matured ($p < 0.05$). On average, infant formulas reported 30% and 40% lower C14:0 content relative to breast milk. The third dominant SFA in the milk studied was stearic acid (C18:0). There was a slight increase in its concentration as lactation progressed (6.72%, 7.13%, and 7.58% in colostrum, transitional milk, and mature milk). Infant formulas contained about two times lower C18:0 than human milk ($p < 0.05$). Of the other SFAs, pentadecylic acid (C15:0) (0.36–0.40% in HM and 0.04–0.06% in IFs), margaric acid (C17:0) (0.36–0.39% in HM and 0.07–0.09% in IFs) and arachidic acid (C20:0) (0.02–0.07% in HM and 0.29–0.33% in IFs) were present in lower amounts in the kinds of milk studied ($p < 0.05$).

3.1.2. Monounsaturated Fatty Acids (MUFAs)

There were five MUFAs identified in breast milk and infant formula—myristoleic (C14:1 *n*-5), palmitoleic (C16:1 *n*-7), heptadecenoic (C17:1 *n*-9), oleic (C18:1 *n*-9), eicosenoic (C20:1 *n*-9) and ercucic (C22:1 *n*-9) acid.

The C18:1 *n*-9 was the most prevalent, accounting for about 30% of the proportion of all fatty acids in both colostrum, transitional, and mature milk. For both types of infant formulas, the content of oleic acid was higher than in breast milk ($p < 0.05$) and was at about 37% and 35% of the proportion of total fatty acids in IF-I and IF-II, respectively.

The content of erucic acid was dependent on the lactation period and decreased by 40% in mature milk relative to colostrum ($p < 0.05$). In contrast, the content of C14:1 *n*-5 was constant throughout lactation. A slight increase in C16:1 *n*-7 was observed in the study, the amount of which was 22% higher in transitional milk relative to colostrum and mature milk. In addition to higher C18:1 *n*-9 contents, the content of other MUFAs was significantly lower in both IFs than in human milk.

3.1.3. Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs)

Among the fatty acids studied, there were differences in the PUFA content in different fractions of breast milk. The dominant *n*-3 PUFA in breast milk was ALA. Its content increased as lactation progressed: from 0.72% in colostrum to 0.94% in mature milk. An increasing trend was also noted for the most abundant acid in the PUFA *n*-6 group, LA—its content increased with as lactation progressed, from 8.49% in colostrum to 8.83% in mature milk. It should be noted that in the study conducted for both ALA and LA, there was an insignificant increase in their levels relative to the lactation period ($p > 0.05$).

For other PUFA *n*-3 and *n*-6 acids, there was a significant decrease in DHA as lactation progressed. Relative to colostrum versus mature milk, its concentration decreased by 25%. In the case of AA, its level also decreased as lactation progressed, from 0.61% in colostrum to 0.47% in mature milk. EPA was stable regardless of the lactation period, and its level ranged from 0.15% to 0.18%.

The PUFA profile in infant formulas differed from breast milk, especially in terms of the LA, ALA, and EPA content. The content of ALA in infant formulas differed from one producer to another. IF-I contained about 30% more ALA compared with IF-II. In both types of infant formula, the content of this acid was significantly higher than in breast milk ($p < 0.05$). A similar trend was noted for LA, with a higher amount observed in infant formulas ($p < 0.05$). Based on the study, it was observed that among omega-3 fatty acids, the level of EPA was significantly higher in breast milk (0.17% in colostrum, 0.18% in transitional milk, and 0.15% in mature milk) than in infant formula (0.03% and 0.04% in IF-I and IF-II, respectively). The two types of infant formulas contained similar DHA content, which was at the same level as the DHA in colostrum. On the other hand, both types of infant formula contained about 27–36% more DHA than mature milk ($p < 0.05$). In addition, infant formulas had similar levels of AA, with the same amount in transitional and mature milk. The AA content in both types of infant formulas was higher than the marked DHA levels.

3.1.4. Branched-Chain Fatty Acids (BCFAs)

The study identified three fatty acids from the BCFA group—isopentadecylic acid (*iso* C15:0), anteisopentadecylic acid (*anteiso* C15:0), and isopalmitic acid (*iso* C16:0). The content of these acids was constant in breast milk, and the predominant acid was *anteiso* C15:0 (0.10–0.12%).

While HM contained the highest amounts of *anteiso* C15:0, IF-II contained only trace amounts of this acid. The second most abundant BCFA in HM was *iso* C16:0 (0.07–0.09%), which was found in 0.06% in IF-I. Both IFs did not contain *iso* C15:0 in their composition.

3.1.5. Trans Fatty Acids (TFAs)

There were five types of trans fatty acids identified in milk samples—petroselaidic and elaidic (C18:1 *n*6+*n*9 *t*) acid; vaccenic acid (C18:1 *t*11, VA); conjugated linoleic acid (CLA), a *trans* isomer of linoleic acid; rumenic acid (C18:2 *c*9*t*11, RA); and palmitelaidic acid (C16:1 *t*7).

The predominant TFA in breast milk was VA, with levels of 2.99%, 1.74%, and 1.52% in colostrum, transitional milk, and mature milk, respectively. Each fraction of breast milk contained RA, but the values varied depending on the lactation period. The average RA content was 0.21% in colostrum, and 0.13% and 0.18% in transitional and mature milk, respectively. The level of RA was shown to be significantly lower in transitional milk ($p < 0.05$). Of the other TFAs, petroselaidic and elaidic acid were identified, which totaled 0.56% in colostrum, 0.45% in transitional milk, and 0.49% in mature milk. In the study conducted, the lowest amounts of palmitelaidic acid were identified in the tested milk samples.

Significantly lower contents of selected TFAs were identified in infant formulas. The detected TFAs were petroselaidic and elaidic acid, accounting for 0.08% and 0.15% of all fatty acids in IF-I and IF-II, respectively. Infant formulas did not contain any other acids from the TFA group.

3.2. The Average Content of SFAs, MUFAs, PUFAs, BCFAs, and TFAs, and the Relationship between Selected Fatty Acids

3.2.1. Human Milk

Both colostrum, transitional milk, and mature milk were richest in SFAs (46.50%; 52.54%; 52.71%, respectively) and MUFAs (34.24%; 33.27%; 31.88%, respectively), followed by PUFAs (10.43%; 10.54%; 10.72%, respectively). The total SFA concentration increased

from 46.50% in colostrum to 52.71% in mature milk. MUFA concentrations remained stable in colostrum and transitional milk (34.24% and 33.27%, respectively), while they decreased in mature milk to 31.88%. ($p < 0.05$). On the other hand, there was an increase in PUFA *n*-3 from 1.33% in colostrum to 1.42% in mature milk, although it was not a significant growth. A downward trend in the PUFA *n*-6:*n*-3 ratio was observed during lactation. The highest ratio was observed in colostrum (6:84:1), followed by a significant decrease in transitional and mature milk (6.37:1 and 6:55:1, respectively). In the case of TFAs, there was a significant decrease in these acids as lactation progressed. While colostrum contained 3.86% TFAs, transitional and mature milk contained about 40% less of these acids.

In the present study, the ratio of PUFA *n*-3 acids or PUFA *n*-3 acids to PUFA *n*-6 acids was evaluated. The relationship between DHA and LA was 0.05:1 in colostrum and transitional milk and 0.04:1 in mature milk. Another important post-experimental function is the balance between DHA and AA. In the studies conducted, it ranged from 0.70:1 in mature milk to 0.79:1 in transitional milk. The third fatty acid ratio assessed was the ratio between LA and ALA. In the study, the value decreased as the milk matured, from 11.79:1 in colostrum to 9.39:1 in mature milk.

3.2.2. Infant Formulas

Infant formulas contained the same acid proportions as human milk - the highest percentage of SFA and the lowest PUFA. IF-I contained significantly more MUFAs compared with breast milk from different lactation periods ($p < 0.05$). Significant differences were found between PUFA percentages. IF-I samples contained almost 20% less PUFAs, including more than 20% less *n*-6 PUFA, compared to IF-II. The TFA content was 0.08% in IF-I and 0.15% in IF-II.

Based on information from the labels of infant formulas, the percentage of fatty acid groups was calculated: SFAs, MUFAs, and PUFAs in each of the formulas (Table 2). In the study conducted, the sum of SFAs was 45.01% and 44.06% in IF-I and IF-II, respectively. Based on the calculated values, the manufacturer declared the presence of SFAs at 43.65% and 44.60% in IF-I and IF-II, respectively. In the studies conducted, the content of BCFAs (classified as SFAs) was reported separately, and when the labeled SFAs and BCFAs were added together, values of 45.07% and 44.07% in IF-I and IF-II were obtained. In the case of MUFAs, the identified values in IF-I and IF-II were 38.03% and 35.47%, respectively, and 38.11% and 35.62% after taking into account selected TFAs (C18:1 *n*6+*n*9 *t*) counted as MUFAs. The manufacturer declared MUFA levels of 39.68% and 39.57%, which were higher than those determined by the authors by about 1% and 4%, respectively. The last group of fatty acids—PUFAs—was present in IF-I and IF-II in the amount of 15.84% and 19.15%, while the values indicated by the manufacturer were 16.67% and 15.83%. In this case, the marked values were lower than those declared by the manufacturer by 1% in IF-I and exceeded the values by more than 3% in IF-II. The ratio of LA:ALA in infant formulas ranged from 6:05:1 for IF-I to 10.72:1 in IF-II. On the other hand, the ratio of DHA:AA acids was 0.81:1 and 0.92 in IF-I and IF-II, respectively. In contrast, the ratio of DHA:LA acids in infant formula was 0.03:1 in both IF-I and IF-II.

3.3. Associations between Obtained Data—Multivariate Analysis

3.3.1. Principal Component Analysis (PCA)

Principal component analysis (PCA) was used to explain the structure of variation in the collected data on the fatty acid profile of breast milk from different periods of lactation (colostrum, transitional milk, mature milk) and to compare it with the structure of variation in infant formulas. The PCA was conducted among all the breast milk samples tested, and the variables included various fatty acids (C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C14:1 *n*-5, C16:1 *n*-7, C17:1 *n*-9, C18:1 *n*-9, C20:1 *n*-9, C22:1 *n*-9, C18:2 *n*-6, C20:4 *n*-6, C18:3 *n*-3, C20:5 *n*-3, C22:6 *n*-3, *iso* C15:0, *anteiso* C15:0, *iso* C16:0, C18:1 *n*6+*n*9 *t*, C18:1 *t*11, C18:2 *c*9*t*11, C16:1 *t*7). Two principal components described 91.57% of the variance. Figure 1A presents the relationships between individual fatty acids and the

resulting principal components. All variables, except C10:0, C20:4 *n*-6, and C22:6 *n*-3, were transferred to a greater extent by PC1. Based on the PCA analysis, a positive correlation was found between selected SFAs (C6:0, C8:0, C12:0, C20:0) and acids from the MUFA and PUFA groups (C18:1 *n*-9, C18:2 *n*-6, C20:4 *n*-6, C18:3 *n*-3, C22:6 *n*-6). Strongly positively correlated acids were found between the BCFA and TFA groups. On the other hand, there was a strongly negative correlation between PUFAs (C18:2 *n*-6, C18:3 *n*-3) and selected MUFAs (C14:1 *n*-5, C16:1 *n*-7, C20:1 *n*-9), SFAs (C14:0, C16:0, C17:0, C18:0), and TFAs (C18:1 *n*6+*n*9 *t*, C18:1 *t*11, C18:2 *c*9*t*11, C16:1 *t*7).

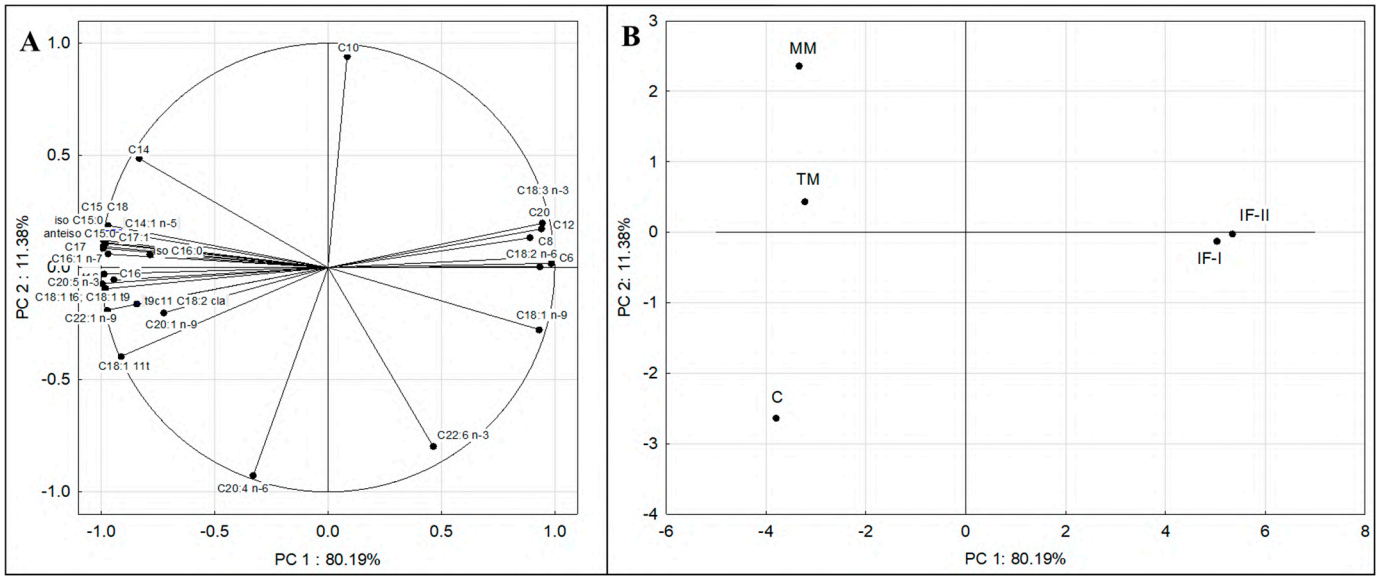


Figure 1. The principal component plot showing variations in the selected fatty acids (C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C14:1 *n*-5, C16:1 *n*-7, C17:1 *n*-9, C18:1 *n*-9, C20:1 *n*-9, C22:1 *n*-9, C18:3 *n*-3, C20:5 *n*-3, C22:6 *n*-3, C18:2 *n*-6, C20:4 *n*-6, *iso* C15:0, *anteiso* C15:0, *iso* C16:0, C18:1 *n*6+*n*9 *t*, C18:1 *t*11, C18:2 *c*9*t*11, C16:1 *t*7) of the analyzed infant formulas and human milk samples (**A**) and the score plot of the analyzed human milk samples from different lactation periods and selected infant formulas (**B**). Explanations: C—colostrum, TM—transitional milk, MM—mature milk; IF-I, IF-II—infant formulas from different manufacturers.

Figure 1B shows a plot of points in the principal component plane that shows the similarities and differences between the fatty acid profiles of human milk from three lactation periods and two types of follow-on infant formulas. The arrangement of the analyzed cases around each other indicates that human milk from different lactation periods had different fatty acid profiles and differed from the profiles of selected infant formulas. The figure shows that among the breast milk fractions, the transitional milk (TM) and mature milk (MM) samples are the most similar in terms of fatty acid content. It was observed that C significantly differs from TM and MM on the graph, which indicates a particular variability in the fatty acid profile between colostrum and transitional and mature milk. Infant formulas (IF-I and IF-II) were on the opposite side of the graph, which indicates their different fatty acid profiles concerning human milk from each lactation period. The graph shows that of the breast milk fractions, the transition milk (TM) and mature milk (MM) samples are the most similar in terms of fatty acid content.

The distribution of cases in Figure 1A can be attributed to the different fatty acid profiles of individual infant milk samples. The distribution of case C, clearly separated from TM and MM, is the result of increased TFA content, mainly of VA and also AA. Based on the graph, the separation of TM and MM was the effect of the presence of higher amounts of C14:0, C18:0, *iso* C16:0, and C14:1 *n*-5 in them. In the case of C14:0, the difference in content was significant (for mature milk), but the content of the other acids mentioned above did not differ significantly. In the case of infant formulas, IF-I was differentiated

mainly in terms of C18:1 *n*-9, while for IF-II, it was by C18:2 *n*-6. The differences in composition between infant formula and human milk explain the much higher amounts of TFAs and BCFAs contained in human milk.

3.3.2. Cluster Analysis (CA)

Cluster analysis (CA) was also used to assess the variation in fatty acid profiles in human milk from different lactation periods and selected infant formulas. Based on the content of individual fatty acids (C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C14:1 *n*-5, C16:1 *n*-7, C17:1 *n*-9, C18:1 *n*-9, C20:1 *n*-9, C22:1 *n*-9, C18:2 *n*-6, C20:4 *n*-6, C18:3 *n*-3, C20:5 *n*-3, C22:6 *n*-3, *iso* C15:0, *anteiso* C15:0, *iso* 16:0, C18:1 *n*6+*n*9 *t*, C18:1 *t*11, C18:2 *c*9*t*11, C16:1 *t*7), a cluster dendrogram was constructed. It was determined by the weighted pair–group average method, and distances were measured using the Euclidean distance formula method. In the CA analysis, similar objects are combined into clusters. The vertical scale of the dendrogram shows the distance or dissimilarity; small values indicate that they are in the same cluster. The dendrogram in Figure 2 shows one main cluster divided into smaller clusters. One subgroup contains all the fractions of human milk and the other, the infant formulas. The results of the cluster analysis confirmed the results of the principal component analysis. The figure indicates that the most similar in terms of fatty acid composition are the mature milk and transitional milk samples and, to a lesser extent, they are similar to colostrum. The dendrogram indicates different fatty acid profiles between human milk and infant formulas. The colostrum samples were most diverse relative to IF-I and IF-II.

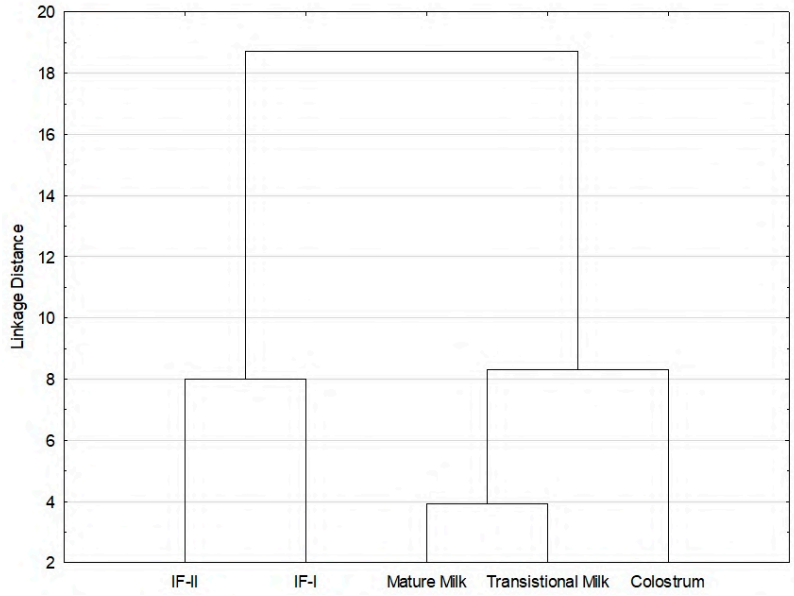


Figure 2. Cluster analysis (CA) of the fatty acid profile in studied human milk from different lactation periods and infant formulas. Abbreviations: IF-I, IF-II—infant formulas from different manufacturers.

4. Discussion

4.1. Fatty Acid Profiles

Breast milk undergoes dynamic compositional changes in terms of selected external factors [3]. The study examined changes in the fatty acid profile of human milk samples of women from the Warmia and Mazury region with regard to lactation periods. The results obtained were compared with two types of follow-on feeding infant formulas to show the similarities and differences between the two study materials. Based on the study, there is a significant impact of the lactation period on the quantitative changes in selected fatty acids over time.

4.1.1. Saturated Fatty Acids (SFAs)

Short-chain fatty acids (SCFAs) include acids containing one to six carbon atoms. This group of acids includes the following: formic (C1:0), acetic (C2:0), propionic (C3:0), butyric (C4:0), valeric (C5:0), and caproic (C6:0) acids. They play an important role in the infant's body: first of all, they are substrates of glucose, cholesterol, and lipid metabolism; in addition, they are responsible for maintaining the metabolic balance and controlling inflammation [23]. Khor et al. [6] detected significantly higher amounts of C6:0—0.11% and 0.13% in transitional and mature milk—than the authors in this study (0.03% and 0.01%). Infant formulas contained significantly higher amounts of C6:0, which was attributed to the higher amount of this acid in cow's milk, on which the infant formulas were based, than in breast milk (1% vs. 0.1%) [24].

In the study, total MCFAs (C8:0, C10:0, and C12:0) increased from 4.99% in colostrum to 8.48% in mature milk. In the study by Floris et al. [2], these acids were 4.06%, 7.61%, and 8% in colostrum, transitional milk, and mature milk, confirming the trend of increasing MCFAs in breast milk as lactation progresses. In the case of C10:0 and C12:0, similar conclusions were reached by Giuffrida et al. [19]. The MCFA content in infant formulas was significantly higher than in breast milk (16.97% in IF-I and 13.44% in IF-II), and this difference is mainly explained by the different fat sources used in infant formula production, including the addition of coconut and palm oils, which contain high amounts of MCFAs [25]. MCFAs provide an essential source of energy for infants. Unlike long-chain fatty acids (LCFAs), they are absorbed and oxidized more easily to produce energy. Their addition to infant formulas may promote better lipid absorption [26]. In addition, these acids have antiviral, antimicrobial, and modulatory effects on the intestinal microflora, especially in early infancy [26]. Infant formulas contained significantly higher contents of SCFAs (0.21% and 0.17% in IF-I and IF-II) and MCFAs (16.97% and 13.44% in IF-I and IF-II) relative to breast milk ($p < 0.05$). The acids in these groups are commonly included in infant formulas as they can be directly absorbed through the portal vein and are a fast source of energy for infants [27]. In the case of lauric and myristic acids, it is recommended that their total content in infant formulas should not exceed 20% of total fatty acids; in this example, amounting to 18.33% and 14.73% in IF-I and IF-II, respectively. It is reported that too high a supply of these acids raises the plasma levels of total cholesterol and low-density lipoprotein (LDL), which is associated with an increased risk of cardiovascular disease [17].

Palmitic acid predominated in the human milk and infant formulas studied. The C16:0 content decreased slightly as lactation progressed, similar to the study by Floris et al. [2]. It is reported that the C16:0 content of human milk is constant and independent of the lactation period [2]. In contrast, the C16:0 content in infant formulas was lower than in human milk. In the Wu et al. [28] study, one of the infant formulas contained 29.21% of this acid, while the other contained 10.08%. In this case, it was justified by the addition of 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol (OPO), which contains significant amounts of C16:0. In the case of C16:0 acid in infant formulas, it is important to consider the form in which the acid occurs. In breast milk, palmitic acid is found in the *sn*-2 position [18,29]. On the other hand, C16:0 is mainly found in infant formulas in the *sn*-1 or *sn*-3 position. It has been indicated that C16:0 acid in the *sn*-2 position promotes better absorption of calcium and fat and reduces the risk of skeletal problems in breast-fed infants [18,29]. For this reason, triglycerides in infant formula are increasingly being modified and enriched with palmitic acid in the *sn*-2 position, which enables better calcium and fat absorption in newborns [30].

Changes in C14:0 content were observed relative to maturing milk, with the content increasing from 5.94% in colostrum to 9.21% in mature milk. The same trend was noted by Bousset-Alféres et al. [30] and Giuffrida et al. [19]. In the case of stearic acid, only a slight, insignificant increase in its amount relative to the duration of lactation was observed, as in the Floris et al. [2] and Wu et al. [28] studies. Giuffrida et al. [19] report that C18:0 levels are non-variable throughout lactation. Concerning C18:0 in infant formulas, the values obtained in these studies were lower than those reported in the literature [16,28].

4.1.2. Monounsaturated Fatty Acids (MUFAs)

The content of C18:1 *n*-9 in breast milk comprised more than 90% MUFAs, which is in line with studies presented by other authors [20,31]. A slightly higher (35.56%) oleic acid content than in the presented study was shown by Wu et al. [28]. In a study by Sánchez-Hernández et al. [17], C18:1 *n*-9 levels were 34%, 32%, and 50% higher in colostrum, transitional, and mature milk, respectively. This may be explained by the practice of the Mediterranean diet in Spain and the widespread consumption of olive oil. The C18:1 *n*-9 content is reported to be stable throughout lactation. In the present study, there were no significant differences in the content of this acid relative to the lactation period, similar to that found by Floris et al. [2]. In addition to providing energy reserves, oleic acid controls the synthesis of medium-chain fatty acids and serves important transport and metabolic functions [17]. In infant formulas, the C18:1 *n*-9 content was higher, which may be explained by the high proportion of vegetable oils (canola, sunflower, palm, and coconut) used in their production, which are excellent sources of C18:1 *n*-9 acid [28].

The content of other MUFAs in breast milk was 2.70–3.22%, while in infant formulas, it was 0.37–0.69%. Most MUFAs remain stable during lactation; however, the levels of some acids (eisosenoic, ercucic) may decrease as the milk matures [2]. Such a trend in the study was noted for ercucic acid, whose content decreased by 40%. A decreasing trend for changes in the content of this acid was also observed in the studies by Bousset-Alféres et al. [30] (1.78%—colostrum, 0.82%—transitional milk, 0.76%—mature milk) and Moltó-Puigmarti [32] (0.27% colostrum, 0.12%—transitional milk, 0.10%—mature milk). The content of C14:1 *n*-5 was constant throughout lactation, as in the Sánchez-Hernández et al. [17] study. In the studies conducted, there was an increase in C16:1 *n*-7 acid, the amount of which was 22% higher in transitional milk relative to colostrum and mature milk. A similar trend was noted by Khor et al. [6]. In addition to higher C18:1 *n*-9 contents, the content of other MUFAs was significantly lower in both IFs than in human milk. It has been reported that the content of MUFAs having more than 18 carbon atoms (ercucic, eicosenoic, nervonic acids) decreases as lactation progresses. MUFAs with shorter chains can be endogenously converted into longer-chain acids. As the infant's metabolic pathways in the first days of life may not be completely formed and functional, it is important to provide colostrum to the infant to supply MUFAs with longer chains [32]. It should be noted that these fatty acids have a very important metabolic function, taking part in the biosynthesis of myelin and stimulating the development of the infant's nervous system [30].

4.1.3. Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs)

Human Milk

For PUFAs, there was a significant effect of the lactation period on the levels of selected acids, as reported by Sanchez Hernandez et al. [17] and Zou et al. [33]. The content of ALA slightly increased as lactation progressed, similar to studies by Nilsson et al. [34] and Giuffrida et al. [19]. The detected level of this acid was more than twice as high as in the study by Khor et al. [6]. In contrast, Giuffrida et al. [19] detected the same amounts of ALA in mature milk as in our study. As lactation progressed, an increase in the most abundant acid in the PUFA group—LA—was observed. However, relative to the study by Sanchez-Hernandez et al. [17], who observed a 3% increase in LA relative to colostrum vs. mature milk, in our study, this increase was only about 0.34%. Bousset-Alféres et al. [30] noted a similar increasing trend in LA as lactation progressed, although its content was more than 50% higher in each fraction of breast milk. LA and ALA are classified as essential fatty acids (EFAs) because, in contrast to other fatty acids, the human body is unable to produce them, and they must be supplied to the body from the diet. These acids play a significant role in the development of the young body. According to an EFSA report [35], infants consuming inadequate amounts of LA from birth had clinical evidence of deficiency of this acid, manifested in growth deficiencies and dermatological problems, among others. When adequate amounts of ALA are not provided, deficiency symptoms mainly include neurological and behavioral problems.

Adequate PUFA levels in breast milk significantly affect fetal development, primarily on nervous system formation [36]. During the first six months of life, the most dynamic development occurs in the child's nervous system. The intensity of metabolic processes increases to such a degree that meeting the baby's needs is a major challenge for women. An adequate supply of LA, ALA, DHA, and AA is necessary during this time [37]. Linoleic acid is a precursor of arachidonic acid, while α-linolenic acid is a precursor of docosahexaenoic acid; therefore, their presence is extremely important in the synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs). In general, our study reported slightly lower values of α-linolenic acid (about 0.7–0.9%) and linoleic acid (about 8–9%) compared with other research results (1.0–1.40%—ALA; 8–11%—LA) [6,34,38]. It should be noted that the PUFA content of breast milk is largely determined by external factors, including the diet of the nursing woman [36]. According to several available studies, a correlation is indicated between the LA and ALA content in human milk and the consumption of vegetable oils and marine fish [6,39]. Isesele et al. [40] report that obese women have higher levels of LA in milk than women with a normal BMI. LA, as a precursor of AA, is converted to it through enzymatic reactions (involving delta-6-desaturase, elongase, and delta-5-desaturase). Obesity correlates with increased delta-6-desaturase activity; therefore, obese women may have higher levels of AA in breast milk in addition to higher levels of LA.

LCPUFAs (AA, EPA, and DHA) represent a small percentage of the composition of breast milk; however, they have a significant impact on the development of the newborn. They promote the development of the nervous system, stimulate cognitive function, and ensure normal somatic development [5]. DHA content decreased with lactation, with higher content in colostrum and decreasing levels in transitional and mature milk. A decreasing trend for DHA was also noted by Nilsson et al. [34], who observed a 50% decrease in this acid with the progression of lactation, while Bousset-Alféres et al. [30] noted a 66% decrease. Other conclusions were reached by Khor et al. [6], who indicated a slight increase in DHA relative to lactation, with its highest level in mature milk. The global level of DHA in breast milk is 0.37 ± 0.11%, and its level can vary from 0.18% to as much as 1% of all fatty acids. DHA content in breast milk is linearly correlated with the proportion of this acid in the diet of nursing mothers. A higher intake of fish and seafood will result in higher levels of DHA in milk [41]. It is crucial to consume adequate amounts of fish, seafood, and fish oil, and to use an appropriate supplementation dose (200 mg of DHA daily; if fish consumption is low, higher supplementation, such as 400–600 mg, should be considered) [42]. Koletzko [43] states that "*breastfeeding women need to achieve a daily DHA intake of at least 200 mg to provide milk with a DHA content of at least 0.3%, which is required for a fully breastfed infant to achieve a daily supply of about 100 mg DHA / day considered desirable to meet metabolic needs*". In the context of the fatty acid profile in breast milk, in addition to the dietary aspect, an important factor is the BMI. Hua et al. [44] showed that women with an increased BMI (overweight or obese) had lower proportions of PUFAs in their milk, including ALA, EPA, DHA, and higher ratios of AA/EPA and *n*6-*n*3. The effect of BMI on the fatty acid profile of breast milk is closely related to diet, as a higher intake of highly processed foods may modify fatty acid metabolism, thereby resulting in lower levels of circulating *n*-3 fatty acids and higher levels of *n*-6 fatty acids [45].

Colostrum similarly contained higher levels of AA in contrast to transitional and mature milk. The same trend was observed by Sanchez-Hernandez et al. [17] and Giuffrida et al. [19]. However, the AA content in our study was lower than that identified by Moltó-Puigmartí et al. [32] (0.61% vs. 0.92%—colostrum; 0.52% vs. 0.62%—transitional milk; 0.47% vs. 0.49%—mature milk). Regardless of the level, both studies showed a similar trend of decreasing AA content as the milk matured. It should be noted that the average AA content in the milk samples tested, 0.53%, was close to the global level of 0.46% [46].

LCPUFAs are important for many cellular processes, including normal growth, regulation of inflammation, and neurological development [18]. DHA performs important functions in the proper maturation of a baby's nervous system; hence, adequate amounts of DHA are essential for the young body during the initial feedings [6]. AA also participates

in the formation of the infant's nervous system and is closely linked to intelligence and the formation of visual processes [47]. As was reported previously, AA and DHA can be synthesized from LA and ALA, however, these mechanisms are limited in infants. As infants grow and mature, their ability to synthesize AA and DHA improves, and thus the levels of such acids in milk gradually decrease [48]. Therefore, higher levels of AA and DHA in colostrum may be associated with benefits to the newborn and the delivery of adequate levels of these acids. In the presented study, the higher levels of AA and DHA in colostrum relative to mature milk can be justified by the need for a higher intake of these acids by newborns due to their reduced synthesis from LA and ALA in the first moments of life.

Infant Formulas

Over the past few decades, numerous studies have been conducted to make infant formulas as similar as possible to breast milk, especially in terms of the content of selected PUFAs—linoleic and α-linolenic acids [6]. The content of LA and ALA in infant formulas was significantly higher than in human milk (14.69% vs. 8.64% —LA; 1.83% vs. 0.83%—ALA). According to the guidelines, linoleic acid in infant formulas should be present in an amount of 7–20% of the fatty acid proportion. This amount of LA is adequate to cover the need for this ingredient, while a higher content may be associated with effects that influence lipoprotein metabolism, immune function, and levels of oxidative stress [16]. In the case of ALA, its level should not exceed 2% in IFs [15]. It is reported that the level of this acid is higher than in breast milk. This is mainly related to regulations on composing infant formulas in terms of PUFA content. The level of ALA in human milk can fluctuate depending on the mother's race, her origin, and the proportion of individual sources of fat in the diet, so it is difficult to establish reference values for this acid [17,49].

Essential fatty acids (EFAs) are among the compounds that the body is unable to synthesize on its own due to the lack of selected enzymes (desaturase and hydrogenase) [16]. There were significant changes observed in the amount of LCPUFAs in infant formulas relative to human milk for both EPA, DHA, and AA. While EPA levels were lower in both types of infant formulas, DHA and AA levels varied relative to human milk depending on the selected lactation periods. The DHA content in both types of infant formulas was similar to colostrum and transitional milk, although it differed from the level of this acid in mature milk. In addition, the level of DHA in both types of IFs was similar, based on regulations determining the addition of DHA to IFs. According to a European Union regulation, from February 2020, manufacturers of infant formulas are required to contain DHA in milk in an amount of 20–50 mg/100 kcal (about 0.33–1% of total fatty acids) [50,51]. The infant formulas tested met the standards for DHA acid content. It is reported that these values are often higher than the average content of DHA in breast milk, and such results were also obtained in other conducted studies [52]. It should be noted that DHA is not directly synthesized in the human body; therefore, the infant must receive adequate amounts of it in breast milk [53]. However, AA and DHA can be produced endogenously with LA and ALA acids. On the other hand, this synthesis in newborns is limited due to the immaturity of the body and enzymatic processes. Therefore, newborns need to be supplied with AA and DHA immediately after birth. For breastfeeding women, giving colostrum to the newborn will fully meet the need for DHA [3]. Mandatory enrichment of infant formulas with DHA ensures that non-breastfed infants will also be provided with adequate amounts of this acid.

AA levels were similar in both types of infant formulas. According to European standards, the level of AA must not exceed 1% of total fatty acids [54]. Since 2020, manufacturers have been obliged to add DHA in strictly defined amounts to infant formulas; however, the regulation does not provide requirements for the amount of AA [55]. The Codex Alimentarius revision on the 2023 aspect of the Standard for Follow-Up Formula for Older Infants and Products for Young Children [56] includes recommendations for the addition of arachidonic acid to infant formulas. According to the regulation, if the follow-on

infant formula contains DHA, the level of AA should be at least in the same amount as the amount of DHA; such a relationship was noted in the presented study. According to Koletzko et al. [55], providing high doses of DHA without sustainable amounts of AA can negatively affect infants in terms of non-optimal neurodevelopment and development of the immune system.

4.1.4. Branched-Chain Fatty Acids (BCFAs)

Branched-chain fatty acids (BCFAs) are among the SFAs that have one or more methyl branches in the carbon chain. These acids are designated as *iso* or *anteiso*, depending on the presence of an isopropyl or isobutyl group [57]. In the study conducted, the predominant acid was *anteiso* C15:0, with a level of about 0.11% of the proportion of all fatty acids. Its content was significantly lower than in the study of Dingess et al. [57]. The authors identified the content of this acid at 0.56–1.91%, depending on the origin of the women. The content of BCFAs in breast milk significantly depends on the diet, especially on the consumption of dairy products and beef [58]. Dingess et al. [57] report that in a study conducted, women from Cincinnati (USA) consumed significantly more dairy products, which translated into higher levels of *anteiso* C15:0 (1.91%) in breast milk compared with women from Mexico (1.34%) and Shanghai (0.56%). A major limitation of this study is the lack of information on the current and habitual food intake of lactating women. However, according to statistics, milk consumption in Poland is much lower than in the United States (US), and there is still a decreasing trend in their consumption [59].

Infant formulas contained only trace amounts of BCFAs. Currently, manufacturers do not undertake to add BCFAs to infant formulas due to the complicated and time-consuming procedure of obtaining these acids from native raw materials. Wang et al. [60] attempted to enrich infant formulas with selected BCFAs from lanolin. The authors' results indicated that the prepared concentrate had a similar composition and type of BCFAs to human milk fat and could be used to enrich infant formulas. It is reported that BCFAs, both *iso* and *anteiso* forms, have documented anticancer activity, and their anticancer potential may be stronger even than conjugated linoleic acid (CLA) [60]. In addition, Lucas and Cole [61] and Mcguire and Anthony [62] indicated that infants fed breast milk were less likely to be at risk for necrotizing enterocolitis (NEC). In contrast, Ran-Ressler et al. [63] reported that BCFAs can significantly reduce the incidence of NEC. Therefore, the addition of BCFAs to infant formulas could provide health benefits for infants, especially for babies born prematurely and having a low birth weight [60].

4.1.5. Trans Fatty Acids (TFAs)

The content of TFAs is largely determined by the diet of lactating women. Individual TFAs can derive from two sources: natural (via biohydrogenation in the rumen), found in meat, milk, and milk products (vaccenic acid, rumenic acid), and from industrial production (via frying, grilling, hydrogenation of oils) such as in confectionery, bakery products, and French fries (elaidic acid, linoelaidic acid) [64].

Maternal milk was dominated by VA, whose content decreased from 2.99% in colostrum to 1.52% in mature milk. De Souza Santos da Costa et al. [65] indicate much lower VA values—0.76% in colostrum and 0.67% in mature milk. Similarly, Martysiak-Żurowska [66] presents a much lower range of VA content in breast milk (0.34–1.03%). The VA content of breast milk is largely determined by diet, especially the consumption of products rich in meat and meat products [64]. It can be assumed that the higher VA content in the studied group of women is a result of its higher intake. In addition, the observed decline in VA as lactation progresses may also be explained by changes in the diets of lactating women; in this example, by the reduced consumption of meat and its products.

Conjugated linoleic acids (CLAs) are an intermediate product of the hydrogenation of PUFAs—LA and ALA—in the digestive tract of ruminants [66]. The most common CLA is rumenic acid (RA) (C18:2 *cis*-9-*trans*-11), which represents more than 93% of the total CLAs present in ruminant milk [67]. CLA is one of the few animal-derived compounds

that exhibits potent biological activity and anticancer properties [68]. In this study, RA concentrations in colostrum and mature milk were the same; however, they decreased in the transitional milk fraction. It is reported that the presence of CLAs in the human organism is associated with the consumption of selected food products [66]. Martysiak-Żurowska et al. [66] reported that among lactating women on a standard diet without limiting milk and dairy products, RA levels ranged from 0.32–0.57%, while they were 0.14–0.33% among women on a dairy-poor diet. In the study conducted, the lack of applied information on the diets of the lactating women studied prevents a proper interpretation of the RA content in breast milk. Of the TFAs that are formed during the industrial hydrogenation of vegetable oils, two acids were identified—petroselaidic and elaidic acid—which were expressed as a sum. Their content remained constant in breast milk and averaged 0.5%. Bousset-Alféres et al. [30] found elaidic acid levels ranging from 1.334% in colostrum and 0.585% in mature milk; however, petroselaidic acid was not detected. The lowest amounts of palmitelaidic acid were detected in the milk of the women studied. In a study by De Souza Santos da Costa et al. [65], trans isomers of C16:1 acid also accounted for the lowest percentage in tested milk samples.

Infant formulas were poor in TFAs compared with breast milk. Of the five TFAs abundant in maternal milk, IFs contained only small amounts of petroselaidic and elaidic acids (0.08% and 0.15%). This is related to the fact that the fat in infant formulas comes exclusively from vegetable oils (palm, canola, coconut, sunflower). Martysiak-Żurowska [66] identified trace amounts of RA and VA in infant formulas. The presence of small amounts of RA and VA is related to the presence of nonfat cows' milk in infant formulas, which may contain trace amounts of these compounds [51].

4.2. The Average Content of SFAs, MUFAs, PUFAs, BCFAs, and TFAs, and the Relationship between Selected Fatty Acids

4.2.1. Human Milk

The results of each fatty acid group can be ordered as SFA > MUFA > PUFA, similar to the study by Bahreynian et al. [69]. In contrast, Wu et al. [28] indicated that breast milk was the richest in MUFAs, while Zhang et al. [70] pointed to PUFAs as comprising the highest percentage. These differences can be attributed to several factors, which primarily include individual variability, maternal dietary habits, geographic region, cultural differences, or socioeconomic factors [69]. Similar to the study by Khor et al. [6], our study observed an increase in SFA content in colostrum relative to mature milk. SFA content in the milk of lactating women worldwide ranges from 35.0–54.5% [70]. The average SFA content in the milk of Polish women is 43.6%, while it is much lower among residents of Greece (35.5%), Turkey (30.8%), or African countries (Nigeria—27.5%, Israel—33.1%, Democratic Republic of Congo (28.7%). Mediterranean countries (Greece, Turkey) popularize the Mediterranean diet, in which the consumption of red meat is reduced in favor of seafood, while countries such as Poland, Germany, and Hungary are among those where the consumption of meat and its products is relatively high [10]. There are indications of possible correlations between the consumption of cholesterol-rich products and SFA levels in human milk [71,72]. Di Maso et al. [73] report that adherence to Mediterranean dietary recommendations, including the consumption of high amounts of fish and seafood and reducing the proportion of fatty dairy products in the diet, are associated with lower levels of SFAs, especially C16:0 and C18:0, in breast milk. Another study found a weak positive correlation between the consumption of high-fat dairy products and SFA levels in maternal milk [74].

The MUFA content was constant in colostrum and transitional milk; however, it decreased significantly in mature milk, as in the study by Khor et al. [6]. This is related, on the one hand, to decreasing levels of MUFAs containing more than 18 carbon atoms (ercucic, eicosenoic). On the other hand, the type of diet consumed may also affect total MUFA levels in human milk, although to a significantly lesser extent than for PUFAs [75]. There are associations between olive oil and seafood consumption and MUFA levels in breast milk [76,77]. On the other hand, PUFA *n*-3 content increased as lactation progressed.

Changes in the content of ALA and DHA can be explained primarily by women's dietary habits. In countries where the Mediterranean diet is popularized (Spain, Croatia, Turkey), based on products containing significant amounts of omega-3 fatty acids (fish, seafood), the levels of PUFA in breast milk are higher (18.4–26.9%) than in Central and Eastern European and Scandinavian countries (11.9–15.5%). A decrease in the PUFA *n*-6 to *n*-3 ratio to 6.55:1 in mature milk was observed as lactation progressed. As reported in the literature, the ratio of PUFA *n*-6:*n*-3 in breast milk varies depending on the woman's origin. According to published results, it was higher in Asian countries (China—12.5:1; Malaysia—10.1:1) than in North America (Canada—6.5:1; United States—7.6:1) [6]. The average PUFA *n*-6:*n*-3 ratio obtained in the study for Polish women (6.59:1) is similar to the average ratio (6.53 ± 1.72:1) reported for 55 countries worldwide [2]. The lower PUFA *n*-6:*n*-3 ratio indicates a higher intake of oily marine fish and fish oil supplements during pregnancy and lactation, and thus the formation of higher PUFA *n*-3 levels in milk [26]. In contrast, Nishmura et al. [78] and Silva et al. [79] suggest that the high consumption of vegetable oil (especially soybean oil) promotes a higher PUFA *n*-6:*n*-3 ratio, reaching values above 10:1. According to data from the Food and Nutrition Institute, fish consumption in Poland is at a low level in contrast to other European countries [80]. The European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture (EUMOFA) reports that despite the increasing trend of fish consumption in Poland, it is still low (14.26 kg/per capita/year) [81]. The mothers' BMI is directly related to diet. Hua et al. [44] report that overweight and obese women were more likely to consume processed foods, which may cause modifications in fatty acid metabolism. This leads to the occurrence of reduced PUFA *n*-3 levels, elevated PUFA *n*-6 levels, and atrophic changes in the PUFA *n*-6:*n*-3 fatty acid ratio.

The level of TFAs in breast milk is largely justified by the diet of nursing mothers, and therefore there is no specific level of occurrence of this group of acids. In this case, colostrum contained the most TFAs (3.86%), and their content significantly decreased in transition and mature milk by about 40%. Bousset-Alféres et al. [30] also noted a decline in total TFA content as lactation progressed. Since most of the available studies on TFA content in breast milk focus on mature milk, it is difficult to compare colostrum with mature milk. Studies have identified higher amounts of TFA in colostrum in female residents of Brazil (3.86% vs. 2.46%) [65] and also in Spain (3.86% vs. 0.45%) [32]. Similar results were found for mature milk—TFA content was higher than among women from Canada (2.28% vs. 1.90%) [82], China (2.28% vs. 0.77%) [83], and the United States (2.28% vs. 1.09%) [84]. However, women living in Croatia or Chilehad more TFAs in mature milk than milk from surveyed Polish women (2.28% vs. 2.30%; 2.28% vs. 3.28%,respectively) [65,85]. TFAs do not undergo de novo synthesis in the human body; therefore, their only source is dietary food products. A diet rich in dairy and meat products correlates primarily with increased amounts of VA and RA in breast milk. On the other hand, the intake of products containing hydrogenated vegetable oils leads to a higher proportion of TFAs (petroselaidic, elaidic) from industrial sources. The total TFA content of breast milk is affected by both the intake of TFAs from dairy and meat products and those from hydrogenated oils [86]. Mojska et al. [87] report that among Polish mothers, consumption of only bakery and confectionery products containing substantial amounts of industrially produced TFAs significantly increased the total amount of TFAs in breast milk. The source of TFAs in the diet of lactating women is of major importance. Excess TFAs from industrial sources can negatively affect the conversion of LA and ALA into AA and DHA. In contrast, VA and RA can modulate the infant's immune system and are associated with a lower risk of allergies [88].

The ratios of individual PUFA *n*-3 to PUFA *n*-6 fatty acids are important in the composition of breast milk. DHA levels in breast milk were found to have a positive correlation with the intelligence quotient. In contrast, a negative correlation has been found between LA levels and the intelligence quotient. Consequently, one of the important fatty acid ratios in breast milk is the relationship between DHA and LA [51]. The ratios of these acids obtained in this study (0.05:1—C and TM; 0.04:1—MM) reached slightly higher values

than those obtained by Aumeistere et al. [39] (0.03:1) and Lassek and Gaulin [89] (0.027:1). Another important post-experimental function is the balance between DHA and AA, which fluctuates between 0.70–0.79:1 in this case. Milk from Korean women had a higher ratio of DHA:AA (1.30:1), while milk from Pakistani women had a two times lower ratio of these acids (0.42:1) [90]. A decrease in the LA to ALA ratio was observed as the milk matured. The values recommended by the Nutrition Committee of ESPGHAN (European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition) for the ratio of these acids are 5–15:1, indicating that the determined values are within international recommendations [91,92]. Therefore, the ratio of LA to ALA acids obtained indicates the correct proportion of these acids in the diet of the women studied. Because of the low ALA content in the milk of Pakistani women, the ratio of LA:ALA in their milk was 35:1.

The composition of breast milk is so changeable that the fatty acid content can fluctuate within the same country. The average SFA content in the milk of Polish women from the Warmia and Mazury region obtained in our study was 50.58%, while Ćwiek et al. [93] report that in the West Pomeranian region of Poland, the average content of SFA in women's milk is about 40%. On the other hand, in the Pomeranian region, women's milk contained about 42% SFAs throughout lactation (from the 2nd to the 90th day of lactation) [94]. A similar content of SFAs was reported among women living in the region of central Poland (Mazovia Province) [53]. In connection with the higher level of SFAs in the milk of women in the Warmia and Mazury region, a correspondingly lower level of PUFAs (10.56%) was noted compared with milk from women from the West Pomeranian (17.64%) [93], Pomeranian (11.67%—averaged content from 2 to 90 days of lactation) [94], and Mazovian (15.13%) regions [53]. Differences in PUFA levels in breast milk within different regions of Poland may be explained by different feeding styles. Based on Polish statistics from the Social Surveys Department in 2018 [95], fish consumption in the West Pomeranian region was the highest in Poland (0.33 kg/per capita/month) and exceeded the national average consumption (0.28 kg/per capita/month).

4.2.2. Infant Formulas

The infant formulas showed the same fatty acid proportion: SFA > MUFA > PUFA. The varying levels of MUFAs observed in infant formulas may be related to the different oils and fats (e.g., canola, coconut) and their proportions added at the production stage [25]. A similar situation was observed for the PUFA content, where IF-I contained higher amounts of *n*-6 PUFAs. Despite the presence of the same proportion of fatty acids in both types of infant formulas (SFA > MUFA > PUFA), a particular variability in the PUFA profile was reported, which may be mainly caused by the different sources of fat used in the production of each infant formula [28]. Increasingly, oils derived from unconventional sources, such as single-celled organisms, are being used as ingredients in infant formula. Among these oils, the most common are those extracted from *Mortierella alpina* or *Schizochytrium* sp., which are distinguished by their high content of PUFA *n*-3 and PUFA *n*-6 [25]. The TFA content of infant formulas was in line with The European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (ESPGHAN) recommendations for infant formulas (addition of no more than 3% of total fatty acids) [96]. The small amounts of TFAs in infant formula are a result of the presence of these acids in cow's milk, from which the tested products were produced.

Based on calculations of the content of each fatty acid group (SFA, MUFA, PUFA) declared on the manufacturer's label, the SFA content was the most similar to the results of our tests. The manufacturer declared the presence of SFAs at the level of 43.65% and 44.60% in IF-I and IF-II, while in our research, these values were 45.07% and 44.07%. It should be noted that the reported SFA values determined by the authors take into account BCFAs—*iso* 15, *anteiso* 15, *iso* 16—which are included in SFAs [57]. Slightly larger deviations were observed in the sum of MUFAs. According to the manufacturer, the sum of these acids in IF-I and IF-II was 39.68% and 39.57%, respectively, while the authors showed the presence of these acids in amounts of 38.11% and 35.62% after relativizing the geometric

isomers of monounsaturated fatty acids present, taking into account a double bond in the trans configuration (C18:1 *n*6+*n*9 *t*) [97]. In this case, 4% lower amounts of MUFAs were identified in IF-II than that declared by the manufacturer. A similar situation was observed in IF-I in the total PUFAs reported by the manufacturer (16.67%) and determined by the authors (15.84%). This may be due to the specificity of the equipment and the accuracy of the method, as well as to the fact that selected MUFA and PUFA acids were not identified. Some researchers have identified in infant formulas acids such as nervonic (C24:1 *n*-9), γ-linolenic (C18:3 *n*-6), and dihomo-γ-linolenic acid (C20:3 *n*-6), [28,98], which were not identified in the study conducted. These acids may have been present in the infant formulas tested, slightly affecting the differences in the content of claimed and labeled MUFAs and PUFAs.

As mentioned previously, the composition of PUFAs in infant formulas depends on the type of oils they contain, which are added during their manufacture. Due to the different ratios of LA and ALA, the obtained ratio of these acids in IFs was also staggered (6:05:1 vs. 10.72:1). Both counted ratios met established standards. To ensure that infant formulas are most similar to human milk, manufacturers must use appropriate mixes of vegetable oils containing LA and ALA acids to reach an appropriate ratio in the range of 5:1 to 15:1 [99]. In current infant formula composition recommendations, it is stated that high LA/ALA ratios should be avoided due to the reduced conversion of ALA to *n*-3 LCPUFA. In addition, the presence of excessively high LA levels in IFs may promote the transformation of LA to AA and oxidized lipids with pro-inflammatory functions, which may adversely influence immunity and the development of infants' cognitive and metabolic functions [100]. The ratio of DHA:AA acids was 0.81:1 and 0.92 in IF-I and IF-II, respectively. According to Codex Alimentarius recommendations [56], the addition of AA in infant formulas should occur in a concentration at least equal to that of DHA, and the infant formulas tested met these standards. It is crucial to maintain the appropriate ratio of DHA and AA, as the supply of only one can lead to negative health effects in infants, limiting proper growth and affecting the immune system [55]. The DHA:LA ratio in infant formulas was similar to those obtained in mature breast milk. Based on the results of Chen et al. [27], the DHA:LA ratio was calculated, and the values obtained were lower than in our study (0.01:1–0.02:1).

4.3. Associations between Obtained Data—Multivariate Analysis (Principal Component Analysis and Cluster Analysis)

The use of PCA is designed to reduce the original set of variables to the smallest set of uncorrelated components, which represents most of the information found in the original variables. With a larger number of variables, this method enables effective interpretation of the relationships within the data [101]. The position of cases in the plot is an indication of the different fatty acid profiles of breast milk fractions. The available data allow the grouping and differentiation of fatty acid profiles of individual milk from each other. Colostrum differed in composition relative to transitional and mature milk, as evidenced by the opposite position of cases on the plot. Cases of infant formulas were on the opposite side of the score plot, as evidenced by their different fatty acid profiles relative to human milk. The difference in colostrum is largely determined by the higher presence of VA and AA. According to the study, VA and AA levels were highest in colostrum. The different profiles in infant formulas were largely determined by higher amounts of C18:1 *n*-9 (IF-I) and C18:2 *n*-6 (IF-II), as well as TFAs and BCFAs.

The use of CA is to arrange objects into groups in a way that shows the degree of association of objects from the same or different groups [102]. The dendrogram shows the mutual similarity and differences in individual milk samples with regard to the fatty acids present. Similarly, as described in the results section, the fractions of breast milk varied, with colostrum differing most significantly. This confirms that the lactation period has a significant effect on the fatty acid profile. On the other hand, infant formulas were on the

other side of the cluster on the dendrogram, as evidenced by their different lipid profiles relative to human milk.

Multivariate methods are an effective tool for studying the relationship between the fatty composition of different fractions of breast milk and infant formulas, as also presented by other authors [5,10,103].

4.4. Limitations and Strengths of the Study

A limitation of the present study is the lack of analysis of the current/habitual dietary intake of lactating women. Because more than 50% of the women surveyed provided incomplete (or no) data on their current intake, the authors were unable to undertake an analysis of the correlation between the fatty acid profile and the diet of nursing mothers. Similarly, in the case of medications or dietary supplements taken, the women did not provide complete data on the type of preparation and the proportion of each ingredient. Such information would be valuable for analyzing the effects of individual medications/dietary supplements on fatty acid levels. In particular, medications or supplements with added DHA or EPA could significantly affect the levels of these acids in breast milk. In addition, the specific time of milk sampling was not specified, because of the on-demand feeding of children. Out of concern for the comfort of mother and child, women were asked to collect milk at a convenient time, after feeding their child. Another limitation is the size of the group of women (n = 69) with milk samples analyzed. A larger number of milk samples analyzed would have increased the representativeness of the results obtained.

A strength of this study is the analysis of fatty acid composition among women living in the Warmia and Mazury region. There are studies available in the literature on the fatty acid profile of Polish women from the West Pomeranian Region of Poland [93], the Pomeranian Region [94], or the Mazovia region [53]. Although some authors have studied the milk of mothers from the north-eastern region of Poland, there is a gap in the literature regarding the formation of specific fatty acid groups concerning lactation periods. In addition, the work is distinguished by the use of multivariate statistics, which allowed the determination of which fatty acids contribute most to the different fatty acid profiles between maternal milk from different lactation periods, between selected infant formulas, and between breast milk and infant formulas.

The authors plan to continue their research on the breast milk lipidome. In future studies, the authors plan to focus on analyzing the food intake of breastfeeding women and to reliably assess the impact of their habitual diet on the breast milk lipidome. In addition, given the limitations in the literature regarding the fatty acid profile of specialty infant formulas (including foods for special infant use), the authors intend to analyze these products to complete the data on the lipid profile of infant formulas.

5. Conclusions

The present research was designed to evaluate the variability in the fatty acids in the milk of women from the Warmia and Mazury region from different periods of lactation. The results were then compared with selected formulas for follow-on infant feeding. The predominant fatty acids in breast milk were palmitic acid (about 28%), oleic acid (about 30%), and linoleic acid (about 8.60%). Of the fatty acids, those that were lactation-dependent were C8:0, C10:0, C12:0, and C14:0, which increased as lactation progressed, and C22:1 n-9, C20:4 n-6, and C22:6 n-3, which decreased as the milk matured ($p < 0.05$). The average ratio of PUFA n-6 to PUFA n-3 acids for the three lactation periods was 6.59:1, similar to the global average ratio of 6.53 $\pm$ 1.72:1. The fatty acid composition of the infant formulas differed, especially in containing higher amounts of PUFA n-3 PUFA n-6, and TFAs and lower BCFAs. Principal component analysis showed that colostrum differed the most from transitional and mature milk, with higher amounts of vaccenic and arachidonic acid. In contrast, infant formula samples differ in composition from human milk primarily due to significantly lower levels of TFAs and BCFAs.

In further research, it will be important to investigate the influence of current or habitual food consumption on the formation of the fatty acid profile in the milk of mothers from the Warmia and Mazury region. In addition, it is planned to analyze more infant formulas, taking into account those intended for specialized infant nutrition.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu16152411/s1, Table S1: Characteristics of the women studied.

Author Contributions: Conceptualization, A.P.; methodology, A.P. and R.P.-F.; validation, A.P. and R.P.-F.; formal analysis, A.P. and R.P.-F., investigation, A.P.; resources, A.P. and R.P.-F.; data curation, A.P.; writing—original draft preparation, A.P.; writing—review and editing, R.P.-F.; visualization, A.P.; supervision, R.P.-F.; funding acquisition, R.P.-F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Minister of Science under "the Regional Initiative of Excellence Program".

Institutional Review Board Statement: This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee at the Faculty of Medicine of the Collegium Medicum of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn (No. 19/2023). Approval date: 29 June 2023. Written informed consent was obtained from all study participants.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data is contained within the article and Supplementary Materials.

Acknowledgments: The authors express great appreciation to the group of women who participated in the study and who provided a milk sample for testing, making this study possible.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

AA	arachidonic acid
ALA	α-linoleic acid
BCFA	branched-chain fatty acid
C	colostrum
C10:0	capric acid
C12:0	lauric acid
C14:0	myristic acid
C14:1 *n*-5	myristoleic acid
C15:0	pentadecylic acid
C16:0	palmitic acid
C16:1 *n*-7	palmitoleic acid
C16:1 *t*7	palmitelaidic acid
C17:0	margaric acid
C18:0	stearic acid
C18:1 *n*6+*n*9 *t*	petroselaidic and elaidic acids
C18:1 *n*-9	oleic acid
C18:1 *t*11	vaccenic acid
C18:2 *c*9*t*11	rumenic acid
C18:2 *n*-6	linoleic acid
C18:3 *n*-3	α-linoleic acid
C20:0	arachidic acid
C20:1 *n*-9	eicosenoic acid
C20:4 *n*-6	arachidonic acid
C20:5 *n*-3	eicosapentaenoic acid
C22:1 *n*-9	ercucic acid
C22:6 *n*-3	docosahexaenoic acid

C6:0	caproic acid
C8:0	caprylic acid
CA	cluster analysis
CLA	conjugated linoleic acid
DHA	docosahexaenoic acid
EPA	eicosapentaenoic acid
HM	human milk
IF	infant formula
iso C15:0	isopentadecylic acid
iso C16:0	isopalmitic acid
LA	linoleic acid
LCPUFA	long-chain polyunsaturated fatty acid
MCFA	medium-chain fatty acid
MM	mature milk
MUFA	monounsaturated fatty acid
PCA	principal component analysis
PUFA *n*-3	polyunsaturated fatty acid *n*-3
PUFA *n*-6	polyunsaturated fatty acid *n*-6
RA	rumenic acid
SCFA	short-chain fatty acid
SFA	saturated fatty acid
TFA	trans fatty acid
TM	transitional milk
VA	vaccenic acid

References

1. Siziba, L.P.; Lorenz, L.; Stahl, B.; Mank, M.; Marosvölgyi, T.; Decsi, T.; Rothenbacher, D.; Genuneit, J. Changes in human milk fatty acid composition during lactation: The ulm SPATZ health study. *Nutrients* **2019**, *11*, 2842. [CrossRef]
2. Floris, L.M.; Stahl, B.; Abrahamse-Berkeveld, M.; Teller, I.C. Human milk fatty acid profile across lactational stages after term and preterm delivery: A pooled data analysis. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2020**, *156*, 102023. [CrossRef]
3. Kim, S.Y.; Yi, D.Y. Components of human breast milk: From macronutrient to microbiome and microRNA. *Clin. Exp. Pediatr.* **2020**, *63*, 301–309. [CrossRef]
4. Kiprop, V.J.; Girard, A.W.; Gogo, L.A.; Omwamba, M.N.; Mahungu, S.M. Determination of the Fatty Acid Profile of Breast Milk from Nursing Mothers in Bungoma County, Kenya. *Food Nutr. Sci.* **2016**, *07*, 661–670. [CrossRef]
5. Sarkadi, S.L.; Zhang, M.; Muránszky, G.; Vass, R.A.; Matsyura, O.; Benes, E.; Vari, S.G. Fatty Acid Composition of Milk from Mothers with Normal Weight, Obesity, or Gestational Diabetes. *Life* **2022**, *12*, 1093. [CrossRef]
6. Khor, G.L.; Tan, S.S.; Stoutjesdijk, E.; Kock, W.T.N.; Khouw, I.; Bragt, M.; Schaafsma, A.; Dijck-Brouwer, D.A.J.; Muskiet, F.A.J. Temporal Changes in Breast Milk Fatty Acids Contents: A Case Study of Malay Breastfeeding Women. *Nutrients* **2021**, *13*, 101. [CrossRef]
7. Innis, S.M. Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. *Am. J. Clin. Nutr.* **2014**, *99*, 734S–741S. [CrossRef] [PubMed]
8. Kim, H.; Kang, S.; Jung, B.M.; Yi, H.; Jung, J.A.; Chang, N. Breast milk fatty acid composition and fatty acid intake of lactating mothers in South Korea. *Br. J. Nutr.* **2017**, *117*, 556–561. [CrossRef]
9. Muskiet, F.A.J.; Van Goor, S.A.; Kuipers, R.S.; Velzing-Aarts, F.V.; Smit, E.N.; Bouwstra, H.; Janneke Dijck-Brouwer, D.A.; Rudy Boersma, E.; Hadders-Algra, M. Long-chain polyunsaturated fatty acids in maternal and infant nutrition. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2006**, *75*, 135–144. [CrossRef] [PubMed]
10. Miliku, K.; Duan, Q.L.; Moraes, T.J.; Becker, A.B.; Mandhane, P.J.; Turvey, S.E.; Lefebvre, D.L.; Sears, M.R.; Subbarao, P.; Field, C.J.; et al. Human milk fatty acid composition is associated with dietary, genetic, sociodemographic, and environmental factors in the CHILD Cohort Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2019**, *110*, 1370–1383. [CrossRef] [PubMed]
11. Gidrewicz, D.A.; Fenton, T.R. A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. *BMC Pediatr.* **2014**, *14*, 216. [CrossRef] [PubMed]
12. Gila-Diaz, A.; Arribas, S.M.; Algara, A.; Martín-Cabrejas, M.A.; Pablo, Á.L.L.; De Pipaón, M.S.; Ramiro-Cortijo, D. A review of bioactive factors in human breastmilk: A focus on prematurity. *Nutrients* **2019**, *11*, 1307. [CrossRef] [PubMed]
13. Maryniak, N.Z.; Sancho, A.I.; Hansen, E.B.; Bøgh, K.L. Alternatives to Cow's Milk-Based Infant Formulas in the Prevention and Management of Cow's Milk Allergy. *Foods* **2022**, *11*, 926. [CrossRef] [PubMed]
14. Purkiewicz, A.; Stasiewicz, M.; Nowakowski, J.J.; Pietrzak-Fiećko, R. The Influence of the Lactation Period and the Type of Milk on the Content of Amino Acids and Minerals in Human Milk and Infant Formulas. *Foods* **2023**, *12*, 3674. [CrossRef]
15. Commission Delegated Regulation (EU) 2016/ 127—of 25 September 2015—Supplementing Regulation (EU) No 609/ 2013 of the European Parliament and of the Council as Regards the Specific Compositional and Information Requirements for Infant

Formula and Follow-on Formula and as Regards Requirements on Information Relating to Infant and Young Child Feeding. Available online: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_del/2016/127/oj (accessed on 21 July 2024).
16. Mendonca, M.A.; Araujo, W.M.C.; Borgo, L.A.; Alencar, E.D.R. Lipid profile of different infant formulas for infants. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0177812. [CrossRef] [PubMed]
17. Sánchez-Hernández, S.; Estaban-Muñoz, A.; Giménez-Martínez, R.; Aguilar-Cordero, M.J.; Miralles-Buraglia, B.; Olalla-Hrrera, M. A Comparison of Changes in the Fatty Acid Profile of Human Milk of Spanish Lactating Women during the First Month of Lactation Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. A Comparison with Infant Formulas. *Nutrients* **2019**, *11*, 3055. [CrossRef] [PubMed]
18. Ramiro-Cortijo, D.; Singh, P.; Liu, Y.; Medina-Morales, E.; Yakah, W.; Freedman, S.D.; Martin, C.R. Breast milk lipids and fatty acids in regulating neonatal intestinal development and protecting against intestinal injury. *Nutrients* **2020**, *12*, 534. [CrossRef] [PubMed]
19. Giuffrida, F.; Fleith, M.; Goyer, A.; Samuel, T.M.; Elmelegy-Masserey, I.; Fontannaz, P.; Cruz-Hernandez, C.; Thakkar, S.K.; Monnard, C.; De Castro, C.A.; et al. Human milk fatty acid composition and its association with maternal blood and adipose tissue fatty acid content in a cohort of women from Europe. *Eur. J. Nutr.* **2022**, *61*, 2167–2182. [CrossRef] [PubMed]
20. Jiang, J.; Wu, K.; Yu, Z.; Ren, Y.; Zhao, Y.; Jiang, Y.; Xu, X.; Li, W.; Jin, Y.; Yuan, J.; et al. Changes in fatty acid composition of human milk over lactation stages and relationship with dietary intake in Chinese women. *Food Funct.* **2016**, *7*, 3154–3162. [CrossRef]
21. *ISO PN-EN ISO 1211:2011*; Milk-Determination of Fat Content-Gravimetric Method (Reference Method). ISO: Geneva, Switzerland, 2011.
22. *ISO 15884:2002 (IDF 182:2002)*; Milkfat: Preparation of Fatty Acid Methyl Esters. ISO: Geneva, Switzerland, 2002.
23. Barman, M.; Gio-Batta, M.; Andreux, L.; Stråvik, M.; Saalman, R.; Fristedt, R.; Rabe, H.; Sandin, A.; Wold, A.E.; Sandberg, A.-S. Short-chain fatty acids (SCFA) in infants' plasma and corresponding mother's milk and plasma in relation to subsequent sensitisation and atopic disease. *eBioMedicine* **2024**, *101*, 104999. [CrossRef]
24. German, J.B.; Dillard, C.J. Saturated Fats: A Perspective from Lactation and Milk Composition. *Lipids* **2010**, *45*, 915–923. [CrossRef] [PubMed]
25. Purkiewicz, A.; Pietrzak-Fiećko, R. Determination of the Fatty Acid Profile and Lipid Quality Indices in Selected Infant Formulas. *Molecules* **2024**, *29*, 2044. [CrossRef] [PubMed]
26. Yuan, T.; Wang, L.; Jin, J.; Mi, L.; Pang, J.; Liu, Z.; Gong, J.; Sun, C.; Li, J.; Wei, W.; et al. Role Medium-Chain Fatty Acids in the Lipid Metabolism of Infants. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 804880. [CrossRef] [PubMed]
27. Chen, Y.; Zhang, X.; Li, D.; Yi, H.; Xu, T.; Li, S.; Zhang, L. Fatty acid and triacylglycerol comparison of infant formulas on the Chinese market. *Int. Dairy J.* **2019**, *95*, 35–43. [CrossRef]
28. Wu, D.; Zhang, L.; Zhang, Y.; Shi, J.; Tan, C.P.; Zheng, Z.; Liu, Y. Lipid Profiles of Human Milk and Infant Formulas: A Comparative Lipidomics Study. *Foods* **2023**, *12*, 600. [CrossRef] [PubMed]
29. Béghin, L.; Marchandise, X.; Lien, E.; Bricout, M.; Bernet, J.P.; Lienhardt, J.F.; Jeannerot, F.; Menet, V.; Requillart, J.C.; Marx, J.; et al. Growth, stool consistency and bone mineral content in healthy term infants fed sn-2-palmitate-enriched starter infant formula: A randomized, double-blind, multicentre clinical trial. *Clin. Nutr.* **2019**, *38*, 1023–1030. [CrossRef] [PubMed]
30. Bousset-Alféres, C.M.; Chávez-Servín, J.L.; Vázquez-Landaverde, P.A.; Betancourt-López, C.A.; Del Carmen Caamaño, M.; Ferriz-Martínez, R.A.; Chávez-Alabat, E.F.; Lovatón-Cabrera, M.G.; De la Torre-Carbot, K. Content of industrially produced trans fatty acids in breast milk: An observational study. *Food Sci. Nutr.* **2022**, *10*, 2568–2581. [CrossRef] [PubMed]
31. Qi, C.; Sun, J.; Xia, Y.; Yu, R.; Wei, W.; Xiang, J.; Jin, Q.; Xiao, H.; Wang, X. Fatty Acid Profile and the sn-2 Position Distribution in Triacylglycerols of Breast Milk during Different Lactation Stages. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 3118–3126. [CrossRef] [PubMed]
32. Moltó-Puigmartí, C.; Castellote, A.I.; Carbonell-Estrany, X.; López-Sabater, M.C. Differences in fat content and fatty acid proportions among colostrum, transitional, and mature milk from women delivering very preterm, preterm, and term infants. *Clin. Nutr.* **2011**, *30*, 116–123. [CrossRef]
33. Zou, L.; Pande, G.; Akoh, C.C. Infant Formula Fat Analogs and Human Milk Fat: New Focus on Infant Developmental Needs. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2016**, *7*, 139–165. [CrossRef]
34. Nilsson, A.; Löfqvist, C.; Najm, S.; Hellgren, G.; Sävman, K.; Andersson, M.X.; Smith, L.E.H.; Hellström, A. Long-chain polyunsaturated fatty acids decline rapidly in milk from mothers delivering extremely preterm indicating the need for supplementation. *Acta Paediatr.* **2018**, *107*, 1020–1027. [CrossRef] [PubMed]
35. Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. ALA and LA and growth and development of children. Scientific substantiation of a health claim related to α-linolenic acid and linoleic acid and growth and development of children pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/20061. *EFSA J.* **2008**, *783*, 1–9. Available online: https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2008.783 (accessed on 11 July 2024).
36. Xu, W.-H.; Chen, Y.-R.; Tian, H.-M.; Chen, Y.-F.; Gong, J.-Y.; Yu, H.-T.; Liu, G.-L.; Xie, L. Effects of dietary PUFA patterns and FADS genotype on breast milk PUFAs in Chinese lactating mothers. *Genes Nutr.* **2023**, *18*, 16. [CrossRef] [PubMed]
37. Bobiński, R.; Bobińska, J. Fatty acids of human milk—A review. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2020**, *92*, 3–4. [CrossRef] [PubMed]
38. Meng, F.; Uniacke-Lowe, T.; Lanfranchi, E.; Meehan, G.; O'Shea, C.-A.; Dennehy, T.; Ryan, A.C.; Stanton, C.; Kelly, A.L. A longitudinal study of fatty acid profiles, macronutrient levels, and plasmin activity in human milk. *Front. Nutr.* **2023**, *10*, 1172613. [CrossRef] [PubMed]

39. Aumeistere, L.; Ciproviča, I.; Zavadska, D.; Volkovs, V. Fish intake reflects on DHA level in breast milk among lactating women in Latvia. *Int. Breastfeed. J.* **2018**, *13*, 33. [CrossRef] [PubMed]
40. Isesele, P.; Enstad, S.; Huong, P.; Thomas, R.; Wagner, C.L.; Sen, S.; Cheema, S.K. Breast Milk from Non-Obese Women with a High Omega-6 to Omega-3 Fatty Acid Ratio, but Not from Women with Obesity, Increases Lipogenic Gene Expression in 3T3-L1 Preadipocytes, Suggesting Adipocyte Dysfunction. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1129. [CrossRef] [PubMed]
41. Decsi, T.; Marosvölgyi, T.; Szabo, É. Docosahexaenoic Acid in Formulas for Term Infants: The Way from Pioneer Idea to Mandatory Dietary Recommendation. *Life* **2023**, *13*, 1326. [CrossRef] [PubMed]
42. Juber, B.A.; Jackson, K.H.; Johnson, K.B.; Harris, W.S.; Baack, M.L. Breast milk DHA levels may increase after informing women: A community-based cohort study from South Dakota USA. *Int. Breastfeed. J.* **2017**, *12*, 7. [CrossRef]
43. Koletzko, B. Human milk lipids. *Ann. Nutr. Metab.* **2017**, *69*, 28–40. [CrossRef]
44. Hua, M.-C.; Su, H.-M.; Yao, T.-C.; Liao, S.-L.; Tsai, M.-H.; Su, K.-W.; Chen, L.-C.; Lai, S.-H.; Chiu, C.-Y.; Yeh, K.-W.; et al. The association between human milk fatty acid composition in mothers with an elevated body mass index and infant growth changes. *Clin. Nutr.* **2024**, *43*, 203–210. [CrossRef]
45. Amaral, Y.; Silva, L.; Soares, F.; Marano, D.; Nehab, S.; Abranches, A.; Costa, A.C.; Moreira, M.E. What Are the Maternal Factors that Potentially Intervenes in the Nutritional Composition of Human Milk? *Nutrients* **2021**, *13*, 1587. [CrossRef] [PubMed]
46. Fu, Y.; Liu, X.; Zhou, B.; Jiang, A.C.; Chai, L. An updated review of worldwide levels of docosahexaenoic and arachidonic acid in human breast milk by region. *Public Health Nutr.* **2016**, *19*, 2675–2687. [CrossRef]
47. Forsyth, S.; Gautier, S.; Salem, N. Dietary Intakes of Arachidonic Acid and Docosahexaenoic Acid in Early Life—With a Special Focus on Complementary Feeding in Developing Countries. *Ann. Nutr. Metab.* **2017**, *70*, 217–227. [CrossRef]
48. Yang, Y.; Li, G.; Li, F.; Xu, F.; Hu, P.; Xie, Z.; Lu, X.; Ding, Y.; Wang, Z. Impact of DHA from Algal Oil on the Breast Milk DHA Levels of Lactating Women: A Randomized Controlled Trial in China. *Nutrients* **2022**, *14*, 3410. [CrossRef] [PubMed]
49. Tarar, O.M.; Ahmed, K.M.; Nishtar, N.A.; Achakzai, A.B.K.; Gulzar, Y.; Delles, C.; Al-Jawaldeh, A. Understanding the complexities of prevalence of trans fat and its control in food supply in Pakistan. *J. Clin. Hypertens.* **2020**, *22*, 1338–1346. [CrossRef] [PubMed]
50. Bocquet, A.; Briend, A.; Chouraqui, J.-P.; Darmaun, D.; Feillet, F.; Frelut, M.-L.; Guimber, D.; Hankard, R.; Lapillonne, A.; Peretti, N.; et al. The new European regulatory framework for infant and follow-on formulas: Comments from the Committee of Nutrition of the French Society of Pediatrics (CN-SFP). *Arch. Pediatr.* **2020**, *27*, 351–353. [CrossRef] [PubMed]
51. Tounian, P.; Bellaïche, M.; Legrand, P. ARA or no ARA in infant formulae, that is the question. *Arch. Pediatr.* **2021**, *28*, 69–74. [CrossRef]
52. Delplanque, B.; Gibson, R.; Koletzko, B.; Lapillonne, A.; Strandvik, B. Lipid Quality in Infant Nutrition: Current Knowledge and Future Opportunities. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2015**, *61*, 8–17. [CrossRef]
53. Bzikowska-Jura, A.; Czerwonogrodzka-Senczyna, A.; Jasińska-Melon, E.; Mojska, H.; Olêdzka, G.; Węgierek, A.; Szostak-Wêgierek, D. The concentration of omega-3 fatty acids in human milk is related to their habitual but not current intake. *Nutrients* **2019**, *11*, 1585. [CrossRef]
54. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the essential composition of infant and follow-on formulae. *EFSA J.* **2014**, *12*, 3760. [CrossRef]
55. Koletzko, B.; Bergmann, K.; Thomas Brenna, J.; Calder, P.C.; Campoy, C.; Clandinin, M.T.; Colombo, J.; Daly, M.; Decsi, T.; on behalf of the European Academy of Paediatrics and the Child Health Foundation; et al. Should formula for infants provide arachidonic acid along with DHA? A position paper of the European Academy of Paediatrics and the Child Health Foundation. *Am. J. Clin. Nutr.* **2020**, *111*, 10–16. [CrossRef] [PubMed]
56. Codex Alimentarius. Standard for Follow-Up Formula for Older Infants and Product for Young Children. CXS 156-1987. Adopted in 1987. Amended in 1989, 2011, 2017. Revised in 2023. Available online: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS+156-1987%252FCXS_156e.pdf (accessed on 11 July 2024).
57. Dingess, K.A.; Valentine, C.J.; Ollberding, N.J.; Davidson, B.S.; Woo, J.G.; Summer, S.; Peng, Y.M.; Guerrero, M.L.; Ruiz-Palacios, G.M.; Ran-Ressler, R.R.; et al. Branched-chain fatty acid composition of human milk and the impact of maternal diet: The Global Exploration of Human Milk (GEHM) Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2017**, *105*, 177–184. [CrossRef] [PubMed]
58. Ran-Ressler, R.R.; Bae, S.E.; Lawrence, P.; Wang, D.H.; Brenna, T. Branched-chain fatty acid content of foods and estimated intake in the USA. *Br. J. Nutr.* **2014**, *112*, 565–572. [CrossRef] [PubMed]
59. Available online: https://worldpopulationreview.com/country-rankings/milk-consumption-by-country (accessed on 20 June 2024).
60. Wang, X.; Wang, X.; Chen, Y.; Jin, W.; Jin, Q.; Wang, X. Enrichment of branched chain fatty acids from lanolin via urea complexation for infant formula use. *LWT-Food Sci. Technol.* **2020**, *117*, 108627. [CrossRef]
61. Lucas, A.; Cole, T.J. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet* **1990**, *336*, 1519–1523. [CrossRef]
62. McGuire, W.; Anthony, M.Y. Donor human milk versus formula for preventing necrotising enterocolitis in preterm infants: Systematic review. *Arch. Dis. Child* **2003**, *88*, 11F–14F. [CrossRef]
63. Ran-Ressler, R.R.; Khailova, L.; Arganbright, K.M.; Adkins-Rieck, C.K.; Jouni, Z.E.; Koren, O.; Ley, R.E.; Brenna, T.; Dvorak, B. Branched Chain Fatty Acids Reduce the Incidence of Necrotizing Enterocolitis and Alter Gastrointestinal Microbial Ecology in a Neonatal Rat Model. *PLoS ONE* **2021**, *6*, e29032. [CrossRef]

64. Aumeistere, L.; Beluško, A.; Ciproviča, I.; Zavadska, D. Trans Fatty Acids in Human Milk in Latvia: Association with Dietary Habits during the Lactation Period. *Nutrients* **2021**, *13*, 2967. [CrossRef]
65. De Souza Santos da Costa, R.; Da Silva Santos, F.; De Barros Mucci, D.; De Souza, T.V.; De Carvalho Sardinha, F.L.; Moutinho de Miranda Chaves, C.R.; das Graças Tavares do Carmo, M. *trans* Fatty Acids in Colostrum, Mature Milk and Diet of Lactating Adolescents. *Lipids* **2016**, *51*, 1363–1373. [CrossRef]
66. Martysiak-Żurowska, D.; Kiełbratowska, B.; Szlagatys-Sidorkiewicz, A. The content of conjugated linoleic acid and vaccenic acid in the breast milk of women from Gdansk and the surrounding district, as well as in, infant formulas and follow-up formulas. nutritional recommendation for nursing women. *J. Mother Child* **2021**, *22*, 128–134. [CrossRef] [PubMed]
67. Van Hekken, D.L.; Tunick, M.H.; Tomasula, P.M. Impact of processing on the healthy fatty acids in milk and other dairy products. *Dairy Funct. Foods Res.* **2017**, *3*, 113–122.
68. Dachev, M.; Bryndová, J.; Jakubek, M.; Moučka, Z.; Urban, M. The effects of conjugated linoleic acids on cancer. *Processes* **2021**, *9*, 454. [CrossRef]
69. Bahreynian, M.; Feizi, A.; Kelishadi, R. Is fatty acid composition of breast milk different in various populations? A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2020**, *71*, 909–920. [CrossRef] [PubMed]
70. Zhang, X.; Liu, L.; Wang, L.; Pan, Y.; Hao, X.; Zhang, G.; Li, X.; Hussain, M. Comparative Lipidomics Analysis of Human Milk and Infant Formulas Using UHPLC-Q-TOF-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 1146–1155. [CrossRef]
71. Halimah, S.N.; Roosita, K.; Briawan, D.; Dewi, M. The Association Between Saturated Fatty Acids (SFAs) Level in Dietary and Blood During Pregnancy and SFAs Level in Breast Milk of Postpartum Mothers. *Int. J. Sci. Basic Appl. Res.* **2021**, *60*, 93–104.
72. Petersohn, I.; Hellinga, A.H.; Van Lee, L.; Keukens, N.; Bont, L.; Hettinga, K.A.; Feskens, E.J.M.; Brouwer-Brolsma, E.M. Maternal diet and human milk composition: An updated systematic review. *Front. Nutr.* **2023**, *10*, 1320560. [CrossRef] [PubMed]
73. Di Maso, M.; Bravi, F.; Ferraroni, M.; Agostoni, C.; Eussen, S.R.B.M.; Decsi, T.; Quitadamo, P.A.; Tonetto, P.; Peila, C.; Profeti, C.; et al. Adherence to Mediterranean diet of breastfeeding mothers and fatty acids composition of their human milk: Results from the Italian MEDIDIET Study. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 891376. [CrossRef]
74. Makela, J.; Linderborg, K.; Niinikoski, H.; Yang, B.; Lagstrom, H. Breast milk fatty acid composition differs between overweight and normal weight of women: The STEPS Study. *Eur. J. Nutr.* **2012**, *52*, 727–737. [CrossRef]
75. Guesnet, P.; Marmonier, C.; Boyer, C.; Delplanque, B. Impact of maternal dietary lipids on human health. *OCL Oilseeds Fats Crop. Lipids* **2018**, *25*, D302. [CrossRef]
76. Krešić, G.; Dujmović, M.; Mandić, M.L.; Delaš, I. Relationship between Mediterranean diet and breast milk farty acid profile: A study in breastfeeding women in Croatia. *Dairy Sci. Technol.* **2013**, *93*, 287–301. [CrossRef]
77. Jagodic, M.; Tratnik, J.S.; Potočnik, D.; Mazej, D.; Ogrinc, N.; Horvat, M. Dietary habits of Slovenian inland and coastal primiparous women and fatty acid composition of their human milk samples. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *141*, 111299. [CrossRef]
78. Nishimura, R.Y.; De Castro, G.S.F.; Junior, A.A.J.; Sartorelli, D.S. Breast milk fatty acid composition of women living far from the coastal area in Brazil. *J. Pediatr.* **2013**, *89*, 263–268. [CrossRef]
79. Silva, M.H.L.; Silva, M.T.C.; Brandão, S.C.C.; Gomes, J.C.; Peternelli, L.A.; Franceschini, S.C.C. Fatty acid composition of mature breast milk in Brazilian women. *Food Chem.* **2005**, *93*, 297–303. [CrossRef]
80. Utri-Khodadady, Z.; Skolmowska, D.; Głąbska, D. Determinants of Fish Intake and Complying with Fish Consumption Recommendations—A Nationwide Cross-Sectional Study among Secondary School Students in Poland. *Nutrients* **2024**, *16*, 853. [CrossRef] [PubMed]
81. Available online: https://aquaculture.ec.europa.eu/country-information/poland (accessed on 18 June 2024).
82. Ratnayake, W.N.; Swist, E.; Zoka, R.; Gagnon, C.; Lillycrop, W.; Pantazapoulos, P. Mandatory trans fat labeling regulations and nationwide product reformulations to reduce trans fatty acid content in foods contributed to lowered concentrations of trans fat in Canadian women's breast milk samples collected in 2009–2011. *Am. J. Clin. Nutr.* **2014**, *100*, 1036–1040. [CrossRef] [PubMed]
83. Deng, L.; Zou, Q.; Liu, B.; Ye, W.; Zhuo, C.; Chen, L.I.; Deng, Z.-Y.; Fan, Y.-W.; Li, J. Fatty acid positional distribution in colostrum and mature milk of women living in Inner Mongolia, North Jiangsu and Guangxi of China. *Food Funct.* **2018**, *9*, 4234–4245. [CrossRef]
84. Perrin, M.T.; Pawlak, R.; Dean, L.L.; Christis, A.; Friend, L. A cross-sectional study of fatty acids and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in human milk from lactating women following vegan, vegetarian, and omnivore diets. *Eur. J. Nutr.* **2018**, *58*, 2401–2410. [CrossRef]
85. Krešić, G.; Dujmović, M.; Mandić, M.L.; Delaš, I. Dietary and breast milk trans fatty acids seen in Croatian breastfeeding women from Adriatic region. *J. Food Nutr. Res.* **2013**, *52*, 156–163.
86. Hatem, O.; Kaçar, Ö.F.; Kaçar, H.K.; Szentpéteri, J.L.; Marosvölgyi, T.; Szabó, E. Trans isomeric fatty acids in human milk and their role in infant health and development. *Front Nutr.* **2024**, *11*, 1379772. [CrossRef]
87. Mojska, H.; Socha, P.; Socha, J.; Soplińska, E.; Jaroszewska-Balicka, W.; Szponar, L. Trans fatty acids in human milk in Poland and their association with breastfeeding mothers' diets. *Acta Paediatr.* **2003**, *92*, 1381–1387. [CrossRef] [PubMed]
88. Chisaguano, A.M.; Montes, R.; Castellote, A.I.; Morales, E.; Júlvez, J.; Vioque, J.; Sunyer, J.; López-Sabater, M.C. Elaidic, vaccenic, and rumenic acid status during pregnancy: Association with maternal plasmatic LC-PUFAs and atopic manifestations in infants. *Pediatr. Res.* **2014**, *76*, 470–476. [CrossRef] [PubMed]
89. Lassek, W.D.; Gaulin, S.J.C. Linoleic and docosahexaenoic acids in human milk have opposite relationships with cognitive test performance in a sample of 28 countries. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **2014**, *91*, 195–201. [CrossRef]

90. Nguyen, M.T.T.; Kim, J.; Seo, N.; Lee, A.H.; Kim, Y.-K.; Jung, J.A.; Li, D.; To, X.H.M.; Huynh, K.T.N.; Le, T.V.; et al. Comprehensive analysis of fatty acids in human milk of four Asian countries. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 6496–6507. [CrossRef] [PubMed]
91. Yakes, E.A.; Arsenault, J.E.; Islam, M.M.; Hossain, M.B.; Ahmed, T.; German, B.; Gillies, L.A.; Rahman, A.S.; Drake, C.; Jamil, K.M.; et al. Intakes and breast-milk concentrations of essential fatty acids are low among Bangladeshi women with 24–48-month-old children. *Br. J. Nutr.* **2011**, *105*, 1660–1670. [CrossRef] [PubMed]
92. Wu, W.; Balter, A.; Vodsky, V.; Odetallh, Y.; Ben-Dror, G.; Zhang, Y.; Zhao, A. Chinese Breast Milk Fat Composition and Its Associated Dietary Factors: A Pilot Study on Lactating Mothers in Beijing. *Front. Nutr.* **2021**, *8*, 606950. [CrossRef]
93. Ćwiek, D.; Zimny, M.; Szymoniak, K.; Czechowska, K.; Sipak-Szmigiel, O. Assessment of Fatty Acid Content in the Milk of Women from the West Pomeranian Region of Poland with Regard to Supplementation and the Amount of Adipose Tissue. *Nutrients* **2023**, *15*, 1110. [CrossRef]
94. Martysiak-Żurowska, D.; Żóralska, K.; Zagierski, M.; Szlagatys-Sidorkiewicz, A. Fatty acid composition in breast milk of women from Gdansk and the surrounding district in the course of lactation. *Med. Wieku Rozw.* **2011**, *15*, 167–177.
95. *Household Budget Survey in 2018*; Statistics Poland, Social Surveys Department: Warsaw, Poland, 2019; p. 227.
96. Koletzko, B.; Baker, S.; Cleghorn, G.; Neto, U.F.; Gopalan, S.; Hernell, O.; Hock, Q.S.; Jirapinyo, P.; Lonnerdal, B.; Pencharz, P.; et al. Global Standard for the Composition of Infant Formula: Recommendations of an ESPGHAN Coordinated International Expert Group. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2005**, *41*, 584–599. [CrossRef]
97. Jasińska-Melon, E.; Mojska, H.; Stoś, K. Trans Fatty Acids Content in Whole-Day Diets Intended for Pregnant and Breastfeeding Women in Gynaecological and Obstetric Wards: Findings from the Study under the "Mum's Diet" Pilot Program in Poland. *Nutrients* **2022**, *14*, 3360. [CrossRef]
98. Yu, J.; Yuan, T.; Zhang, X.; Jin, Q.; Wei, W.; Wang, X. Quantification of Nervonic Acid in Human Milk in the First 30 Days of Lactation: Influence of Lactation Stages and Comparison with Infant Formulae. *Nutrients* **2019**, *11*, 1892. [CrossRef] [PubMed]
99. Delplanque, B.; Du, Q.; Martin, J.-C.; Guesnet, P. Lipids for infant formulas. *OCL Oilseeds Fats Crop. Lipids* **2018**, *25*, D305. [CrossRef]
100. Einerhand, A.W.C.; Mi, W.; Haandrikman, A.; Sheng, X.-Y.; Calder, P.C. The Impact of Linoleic Acid on Infant Health in the Absence or Presence of DHA in Infant Formulas. *Nutrients* **2023**, *15*, 2187. [CrossRef] [PubMed]
101. StatSoft Electronic Statistics Textbook. Principal Components and Factor Analysis. Available online: https://www.statsoft.pl/textbook/stathome_stat.html?https://www.statsoft.pl/textbook/stfacan.html (accessed on 13 July 2024).
102. StatSoft Electronic Statistics Textbook. Cluster Analysis. Available online: https://www.statsoft.pl/textbook/stathome_stat.html?https://www.statsoft.pl/textbook/stcluan.html (accessed on 13 July 2024).
103. Zhang, M.; Sarkadi, L.S.; Üveges, M.; Tormási, J.; Benes, E.; Vass, R.A.; Vari, S.G. Gas chromatographic determination of fatty acid composition in breast milk of mothers with different health conditions. *Acta Aliment.* **2022**, *51*, 625–635. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Table S1. Characteristic of the women studied.

Factors	Mean±SD
Age, years	30.69±6.38
Body weight, kg	67.64±9.05
Body height, m	1.65±0.06
BMI, kg/m^2	24.99±3.20
Characteristic	*n*=69
Characteristics of BMI	
Normal body weight	*n*=31
Overweight and obese	*n*=38
Stage of lactation	
1	*n*=21
2	*n*=26
3	*n*=22

Załącznik nr 4 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 03.03.2025 r.
(miejscowość, data)

mgr inż. Aleksandra Purkiewicz
(imię i nazwisko kandydata)
Technologia Żywności i Żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem Changes in the Fatty Acid Profile of Lactating Women Living in Poland – A Comparision with the Fatty Acid Profile of Selected Infant Formulas (Purkiewicz Aleksandra. Pietrzak-Fiećko Renata, 2024, Changes in the Fatty Acid Profile of Lactating Women Living in Poland – A Comparision with the Fatty Acid Profile of Selected Infant Formulas, Nutrients, 16(15), 2411, https://doi.org/10.3390/nu16152411) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu celu i hipotezy badań, doborze metodologii do badań, przygotowaniu próbek do badań i wykonaniu w części eksperymentalnej, zestawieniu, opracowaniu i interpretacji wyników pracy, wykonaniu analizy statystycznej, samodzielnym przygotowaniu manuskryptu oraz weryfikacji i udzieleniu odpowiedzi na otrzymane recenzje w czasopiśmie.

Aleksandra Purkiewicz
(podpis kandydata)

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 2 do
Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Dr hab. inż. Renata Pietrzak-Fiećko, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE

współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem Changes in the Fatty Acid Profile of Lactating Women Living in Poland – A Comparision with the Fatty Acid Profile of Selected Infant Formulas (Purkiewicz Aleksandra. Pietrzak-Fiećko Renata, 2024, Changes in the Fatty Acid Profile of Lactating Women Living in Poland – A Comparision with the Fatty Acid Profile of Selected Infant Formulas, Nutrients, 16(15), 2411, https://doi.org/10.3390/nu16152411) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: doborze i walidacji metodologii do badań, uczestnictwie w wykonaniu części eksperymentalnej, weryfikacji napisanego manuskryptu oraz organizacji środków finansowych do opublikowania artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Aleksandrę Purkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Aleksandry Purkiewicz polegający na: opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu celu i hipotezy badań, doborze metodologii do badań, przygotowaniu próbek do badań i wykonaniu w części eksperymentalnej, zestawieniu, opracowaniu i interpretacji wyników pracy, wykonaniu analizy statystycznej, samodzielnym przygotowaniu manuskryptu oraz weryfikacji i udzieleniu odpowiedzi na otrzymane recenzje w czasopiśmie.

Renata Pietrzak-Fiećko

podpis

Załącznik 4

Publikacja P4

Purkiewicz, A., Mumtaz, W., Tońska, E., Pietrzak-Fiećko, R. (2024). Mineral Content in Initial and Follow-On Infant Formulas in Poland: Nutrient Adequacy and Comparison with Breast Milk. *Applied Sciences*, *14*(22), 10235; https://doi.org/10.3390/app142210235.

.

applied sciences

MDPI

Article

Mineral Content in Initial and Follow-On Infant Formulas in Poland: Nutrient Adequacy and Comparison with Breast Milk

Aleksandra Purkiewicz, Wajeeha Mumtaz, Elżbieta Tońska and Renata Pietrzak-Fiećko *

Department of Commodity Science and Food Analysis, Faculty of Food Sciences, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, 10-719 Olsztyn, Poland; aleksandra.purkiewicz@uwm.edu.pl (A.P.); wajeeha.mumtaz@student.uwm.edu.pl (W.M.); elzbieta.tonska@uwm.edu.pl (E.T.)
* Correspondence: renap@uwm.edu.pl

Abstract: In the present study, the content of selected micro- and macrominerals in conventional and specialist infant formulas (IFs) available on the Polish market was assessed and compared with breast milk from different periods of lactation. The content of minerals was assessed against established standards, compared to label guidelines, and the estimated coverage of daily requirements for selected minerals among infants. The study material consisted of fourteen types of initial, follow-on, and specialist IFs. Minerals—Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, and Mn were determined by the atomic absorption spectroscopy (AAS) method and P—by colorimetric method. The specialist formula S1 stood out in terms of Ca, Mg, and Mn, and S6 in terms of Na and K compared to other IFs ($p < 0.05$). Human milk contained lower contents of each element relative to all infant formulas. Regarding the European Commission's recommendations, most types of IFs met standards for mineral content. In 12 IFs, the marked Fe content was lower than that declared by the manufacturer, and the difference ranged from 5 to more than 50%. All of the initial and five specialist IFs covered the need for all minerals among infants, while follow-on reported coverage lower than standards for Mg, Na, K, Fe, and Mn. Infant foods should be strictly controlled, and periodic checks on the determination of levels of selected ingredients in IFs are recommended to obtain products that resemble human food to the highest possible degree.

Keywords: infant formulas; processed food for infants; minerals; infant nutrition

check for updates

Citation: Purkiewicz, A.; Mumtaz, W.; Tońska, E.; Pietrzak-Fiećko, R. Mineral Content in Initial and Follow-On Infant Formulas in Poland: Nutrient Adequacy and Comparison with Breast Milk. *Appl. Sci.* **2024**, *14*, 10235. https://doi.org/10.3390/app142210235

Academic Editor: Nikolay D. Menkov

Received: 6 October 2024
Revised: 29 October 2024
Accepted: 6 November 2024
Published: 7 November 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Human breast milk (HM) is essential for the normal growth and development of an infant and is an essential source of nutrition from the first days of life. Accordingly, the World Health Organization (WHO) recommends exclusively breastfeeding infants for at least six months of a child's life and continuing until the twenty-fourth month and beyond, along with complementary foods [1]. Breast milk is a unique source of nutrition for infants due to its specific composition, which adapts to the baby's needs. HM provides adequate amounts of all essential nutrients, including protein, fats, and carbohydrates, as well as vitamins and minerals [2]. The main micro- and macrominerals in HM include sodium (Na), potassium (K), chlorine (Cl), calcium (Ca), magnesium (Mg), phosphorus (P), iron (Fe), zinc (Zn), copper (Cu), manganese (Mn), iodine (I), fluorine (F), selenium (Se), chromium (Cr), molybdenum (Mo) and cobalt (Co). Minerals make up 4% of human body weight, and an adequate supply of them by infants is particularly important, as each has specific functions in the intensely forming body [3]. The concentrations of minerals undergo temporary changes in HM, which is related to the changing needs of the growing child [4]. The mineral content of HM depends on the lactation period. Kim and Yi [5] reported that colostrum contains the highest contents of minerals, including Fe, Cu, and Zn. With the maturation of milk and the formation of transitional and mature milk, mineral content decreases. P content reaches its highest value in early transitional

milk, while Mg may undergo slight decreasing or increasing changes even during the first six months of lactation [6]. In situations where the mother is unable to breastfeed her baby, IFs, which are designed to imitate human food by their composition, become an alternative to HM. IFs belong to ultra-processed foods, which, unlike conventional processed foods, are unique and essential for infants who are not breastfed [7]. Cow's milk is not a suitable food for infants; therefore, IF needs to undergo appropriate technological changes to meet the criteria and be safe for the young body [3]. Advanced processing techniques during the production of milk for infants are essential for the production of specialist formulas, which require the use of enzymatic hydrolysis or high-pressure techniques [8]. In recent years, numerous studies have been conducted on IFs to make them most similar to HM [9]. These studies are mainly concerned with the addition of HM-specific ingredients to IFs [5] and the modification of some ingredients [10]. Goehring et al. [11] and Holst et al. [12] enriched IFs in breast milk oligosaccharides, including 2′-fucosyllactose, Lagkouvardos et al. [13] in probiotics, while Nieto-Ruiz et al. [14] did so in long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), milk fat globule membrane (MFGM) components, synbiotics, gangliosides, sialic acid, and nucleotides. Another commonly used modification method is lipid structuring to mimic the fat fraction of IFs in breast milk. Yuan et al. [15] used enzymatic interesterification to obtain structured lipids that contain medium- and long-chain triacylglycerols (MLCTs) and palmitic acid at the *sn*-2 position (*sn*-2 16:0) for enrichment of infant formulas. It is indicated that the presence of MLCTs and *sn*-2 16:0 is important for the absorption and metabolism of lipids in infant nutrition. Various types of IFs are available on the market, designed for healthy infants (conventional IFs) and dedicated to infants with special nutritional needs, such as milk protein allergy, lactose intolerance, and phenylketonuria (specialist IFs) [16]. The different types of IFs vary in their content of bioactive compounds, including micro- and macronutrients. Conventional IFs represent a food product designed exclusively for healthy infants without any unusual dietary or medical problems. These IFs are mostly based on cow's milk for economic reasons and easy availability. Other less common milk that are the base for IFs include goat's, sheep's, or mare's milk [17]. In contrast, specialist IFs are defined as foods produced to meet the special nutritional needs of infants with given disorders, diseases, and medical conditions [16]. These include milk for infants born prematurely, lactose-free formulas, hypoallergenic formulas based on partial or extensive protein hydrolysis, and amino acid blends used for infants with food allergies to milk proteins and other gastrointestinal conditions [18]. However, in lactose intolerance and galactosemia, soy protein-based IFs are an alternative for consumption [19]. Each type of milk available for IFs has a different mineral profile concerning breast milk. In cow's milk, the content of each mineral is higher than in HM, and their bioavailability is much lower. Fe in IFs based on cow's milk has a low bioavailability due to the higher content of casein, which can bind Fe cations; hence, its content in IFs is much higher than in HM [20].

The mineral composition of IFs has been widely studied by other authors [3,21,22]. However, there are few papers available in the literature that focus on assessing the amount of minerals in IFs available in Poland concerning the standards of the European Commission's Regulation on specific compositional and information requirements for initial and follow-on IFs. This study is also distinguished by the inclusion of specialist IFs for infants with special nutritional needs in the study material. Accordingly, the purpose of the present study was:

(1) To evaluate the content of selected micro- and macrominerals in conventional initial, follow-on, and specialist IFs available on the Polish market.
(2) To compare the content of micro- and macrominerals in infant formulas to the content in breast milk.
(3) Evaluation of the content of mineral components about the values declared by the manufacturer on the label and the recommendations of the European Commission on the composition of IFs.

(4) Analysis of coverage of the demand for selected minerals after consumption of a daily serving of IF and comparison with breast milk.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Selection

The present study analyzed IFs available at various commercial stores and pharmacies in Olsztyn (Poland). Each IF was packaged in a cardboard box or can and took the form of a powder. The selection of IFs in this study was conducted by reviewing the market in Olsztyn stores and pharmacies. In selecting IFs, the authors were primarily guided by the easy availability of specialist formulas, which may be difficult to access. Regarding their composition and purpose, the study material was divided into three categories: (1) initial IFs (intended for infants aged 0–6 months), (2) follow-on IFs (intended for infants aged 6–12 months), and (3) specialist IFs (intended for feeding children with special nutritional needs). A total of fourteen types of IFs were analyzed—four each of initial and follow-on and six of specialists. The samples were coded accordingly, while the manufacturers of each brand were not disclosed. Samples C-A1–C-D1 represent conventional initial IFs, C-A2–C-D2—conventional follow-on IFs and S1–S6—specialist IFs. The selected conventional formulas are designed for feeding healthy infants and are nutritionally complete up to the age of 6 months (initial IFs) or can be consumed with appropriate complementary formulas after 6 months of age (follow-on IFs). Among the specialist IFs, six formulas are designed to feed infants with special nutritional needs. Formulas S1 and S2 are products prepared using partial enzymatic hydrolysis dedicated to infants with gastrointestinal disorders or lactose intolerance. Formula S4 is an extensive hydrolyzed product for infants diagnosed with cow's milk protein allergy. Formula S3 is based on soy protein and is intended mainly for lactose intolerance, galactosemia, and during elimination of cow's milk protein from the diet. The products S5 and S6 belong to the group of amino acid-based formulas, which contain only individual amino acids and none of the protein and peptide fragments. They are used in severe forms of food allergy to milk proteins when the use of extensively hydrolyzed formulas is not effective [23]. Table 1 presents descriptions of the tested formulas, including composition and nutritional purpose.

2.2. Breast Milk Samples

Breast milk was collected from 30 women in the Warmian–Masurian region (Northeastern Poland). To participate in the study, women were required to meet the inclusion criteria, which included good health, breastfeeding their child, and having no contraindications to natural feeding. Women qualified for the study were asked to complete a questionnaire containing information on weight and height, age, place of residence, type of childbirth attended, and date of milk sample collection. The mean age of the women studied was 30.77 $\pm$ 6.31 years; mean height and weight: 165.43 $\pm$ 4.61 cm and 66.82 $\pm$ 8.60 kg; place of residence: n = 19 urban, n = 11 rural. The women gave informed consent to take part in the study.

Women were instructed to obtain a milk sample of 50–100 mL utilizing electric breast pumps or milk collectors shortly after breastfeeding. Milk samples were gathered in sterile tubes or designated breast milk storage bags. Women were educated on the appropriate storage of breast milk (sealed container, refrigerated settings). The milk samples were collected from a single feeding, or, if that was not possible, the mothers supplemented the milk during the subsequent feeding. The samples were thereafter transferred and preserved in a Gorenje F6313W freezer (Velenje, Slovenia) at -30 °C within sterile tubes or bags intended for breastmilk storage until analytical examination. A total of 46 samples of breast milk were analyzed, which were divided according to the criterion of the lactation period. Part of the women included in the study provided more than one sample of mature milk; therefore, the number of milk samples is larger than the number of women involved in this study. The study material included 16 colostrum and 30 samples of transitional mature milk. The mature milk samples were collected between 1 and 6 months postpartum.

Table 1. Characteristics of the analyzed infant formulas, including their purpose and composition.

No	Code	Use	Description of the Product
1	C-A1	Initial IF for infants from birth to 6 months of age.	Conventional IF based on cow's milk
2	C-B1		Conventional IF based on cow's milk
3	C-C1		Conventional IF based on cow's milk
4	C-D1		Based on goat's milk, contains DHA
5	C-A2	Follow-on IF for infants 6–12 months.	Conventional IF based on cow's milk
6	C-B2		Conventional IF based on cow's milk
7	C-C2		Conventional IF based on cow's milk with added probiotics and prebiotics
8	C-D2		Based on goat's milk, contains DHA and AA
9	S1	For the dietary treatment of gastrointestinal disorders, infant colic, and constipation. Nutritionally complete for infants up to 6 months of age.	Milk proteins are partially hydrolyzed for easier digestion and faster gastric emptying. Contains B-palmitate and galactooligosaccharides
10	S2	For the dietary management of gastrointestinal reflux and urination and gastrointestinal disorders. Nutritionally complete for infants up to 6 months of age.	Milk proteins are partially hydrolyzed for easier digestion. Thickened formula
11	S3	For dietary treatment of cow's milk intolerance, lactose intolerance, galactosemia, or cow's milk protein allergy. Nutritionally complete for infants up to 6 months of age.	Based on soy proteins
12	S4	Milk substitute for the dietary treatment of cow's milk protein allergy and other food allergies (e.g., soy protein), lactose intolerance, and secondary sucrose intolerance. Intended for infants over 6 months of age.	Hypoallergenic; based on casein hydrolysate with a high degree of hydrolysis; contains probiotics
13	S5	For the dietary management of infants from birth from 0 to 12 months of age with cow's milk allergy, multiple food protein allergy, eosinophilic esophagitis, and other indications where an amino acid-based blend is recommended.	Hypoallergenic, suitable as the only source of food for infants under 1 year of age, contains LCPUFA, contains probiotics and prebiotics
14	S6	For dietary management of cow's milk protein allergy and multiple food allergies; amino acid-based blend. Nutritionally complete for infants up to 6 months of age.	Hypoallergenic, lactose and milk protein free, good digestibility and tolerability

Abbreviations: C-A1, C-B1, C-C1, C-D1—initial IFs; C-A2, C-B2, C-C2, C-D2—follow-on IFs; S1, S2, S3, S4, S5, S6—specialist IFs.

2.3. Sample Preparation and Mineral Determination

Mineralization of the samples was carried out according to the method described by Whiteside and Miner [24]. Each type of IF was prepared according to the instructions on the package, mixing the appropriate amount of formula with deionized water. Human milk samples were thawed, dynamically mixed, and heated to 40 ± 1 °C for homogenization. Milk samples (10 g) were weighed into quartz crucibles and dried in a laboratory dryer (Memmert UF30, Schwabach, Germany) for 8–12 h at 60 °C. Then, the samples were carbonized in an electric oven for 8 h at 480 °C and subsequently placed in a muffle furnace (Nabertherm GmbH, Lilienthal, Germany) to obtain white-grey ash, gradually increasing the temperature from 100 to 500 °C.

The ashes were thermally dissociated with 1M HNO_3 (Merck, Darmstadt, Germany), transported to 25 mL volumetric flasks, and diluted with deionized water. The reagent samples were prepared concurrently. The concentrations of individual minerals were ascertained in the resultant minerals, either immediately or via dilution. The concentrations of Cu, Mn, Fe, Zn, Ca, and Mg were measured using flame atomic absorption spectroscopy (AAS) with an acetylene–air flame. Analyses were conducted utilizing an iCE 3000 SERIES-THERMO atomic absorption spectrometer (Thermo-Scientific, Hemel Hempstead, Hertfordshire, United Kingdom) supplied with a GLITE data station, background correction (deuterium lamp), and suitable cathode-ray tubes. To estimate the calcium content, 10% lanthanum chloride heptahydrate ($LaCl_3 \cdot 7H_2O$, Merck, Darmstadt, Germany) was included in a quantity yielding a final La^{3+} concentration of 1%.

The concentrations of sodium and potassium were determined using the emission method utilizing an acetylene–air flame. Analyses were conducted with an iCE 3000 SERIES-THERMO atomic absorption spectrometer outfitted with a GLITE data station and working in an emission system.

The concentration of phosphorus was detected by a colorimetric technique involving ammonium molybdate (VI) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), sodium sulfate (IV) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), and hydroquinone (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Measurements were conducted utilizing a VIS 6000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Madison, WI, USA).

The average mineral content was expressed as the mean of three replications with a standard deviation of 100 g of IF (powder) or human milk (liquid).

2.4. Evaluation of Compliance with the Content of the Marked Minerals in Infant Formulas

Evaluation of the compatibility of the content of individual micro- and macrominerals was carried out by comparing the marked values of individual elements with the data declared by manufacturers and included on the labels of IFs. In addition, it was assessed whether the values fell within the criteria for the content of micro- and macrominerals in IFs set by the European Commission [25].

2.5. Estimated Daily Mineral Intake After Consumption of Infant Formulas and Breast Milk

The daily intake of minerals from individual IFs was calculated by considering the concentration of elements in the formulas and the manufacturers' recommended daily intake of milk. The number of milliliters of breast milk consumed by infants was estimated based on the recommendations of the Polish Society for Paediatrics Gastroenterology, Hepatology and Nutrition [26]. Then, the estimated daily intake of minerals (EDI) was calculated according to the Equation (1) used by Almeida et al. [3].

$$EDI = CM \times CD, \quad (1)$$

where:

CM—the average concentration of each micro- and macromineral (mg/100 g powder; mg/100 mL breast milk).

CD—the recommended amount of intake of IFs per day according to the manufacturer's data/recommended intake of breast milk per day by the Polish Society for Paediatrics Gastroenterology, Hepatology and Nutrition.

Calculations of coverage of daily requirements for selected minerals were conducted using the intake standards included in the norms of nutrition for the Polish population [27,28]. Two indicators—Recommended Daily Allowance (RDA) and Adequate Intake (AI)—were used for conversion. Mineral requirements were recalculated for infants aged 0–6 months and 7–11 months. Among infants aged 0–6 months, only AI was used, and among infants aged 7–11 months, both RDA and AI.

2.6. Statistical Analysis

Values were expressed as mean ± standard deviation (SD). The distributions of the studied variables in the samples were tested against a normal distribution using the Shapiro–Wilk test and homogeneity of variance was tested using Levene's test. Comparison of the quantitative data collected between the distinguished groups (mineral content of IFs and HM) was carried out using Kruskal–Wallis and Dunn's non-parametric post hoc tests and one-way analysis of variance (ANOVA) using Tukey's test (when the conditions of normal distribution were met). Comparisons of mineral content between colostrum, transitional, and mature milk were performed using the Mann–Whitney U test. Principal Component Analysis (PCA) was used to determine the differences between the mineral content of individual IFs and HM. The significance level was set at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using the Statistica 13.1 package (Statsoft Inc., Tulsa, OH, USA).

3. Results

3.1. Mineral Content of Infant Formulas

The average contents of macrominerals (Ca, Mg, Na, K, P) and microminerals (Fe, Zn, Cu, Mn) in IFs were variable depending on the type of milk. Table 2 summarizes the content of the individual minerals in the IFs powders. The highest concentrations of K and Ca among macronutrients and Fe and Zn among micronutrients were recorded in the studied milk. No statistical differences were observed between initial and follow-on kinds of milk among Ca, Na, P, Zn, Cu, and Mn. For Mg, the C-B1 milk contained significantly more of it than the other initial IFs and all follow-on IFs ($p < 0.05$). In contrast, CD-1 milk stood out in terms of K content compared to other initial IFs and differed significantly from that in follow-on formulas (C-A2 and C-B2). The selected specialist IFs were distinguished in terms of elements compared to conventional formulas. In general, sample S1 contained the highest content of Ca, Mg, Mn, and, together with formula S4, Zn. In the case of Ca and Mg, these values were even two times higher than in the formulas for initial and follow-on ($p < 0.05$). In contrast, the Mn content in S1 was up to nine times higher than in the initial formulas and up to six times higher than in the follow-on formulas. The S6 formula contained a significantly higher Na content compared to the other IFs ($p < 0.05$). For Zn, the initial and follow-on formulas and selected specialist IFs (S2, S3, S5, and S6) contained the same amounts of this element. In contrast, S1 and S4 stood out from the other IFs in terms of Zn content and contained about 40% more Zn than the initial and follow-on IFs and more than 30% more than the other specialist IFs. Of the IFs tested, Fe content was the most variable in terms of quantity. The selected IFs—C-B1, C-A2, and S4 contained the highest Fe contents, distinguishing them from the other IFs. These formulas contained over twice as much Fe as the IFs with the lowest Fe content (C-C1 and C-B2).

Table 2. The average content of macro- and microminerals in conventional and specialist infant formulas.

IFs	Macrominerals [mg/100 g]					Microminerals [mg/100 g]			
	Ca	Mg	Na	K	P	Fe	Zn	Cu	Mn
Initial IFs									
C-A1	399.67 ± 12.16 ^{b}	28.76 ± 0.42 ^{c}	130.71 ± 3.43 ^{b}	562.86 ± 14.20 ^{c}	269.50 ± 7.78 ^{a}	5.26 ± 0.22 ^{b}	3.98 ± 0.00 ^{b}	0.39 ± 0.01 ^{b}	0.03 ± 0.00 ^{c}
C-B1	379.55 ± 1.86 ^{b}	45.76 ± 0.39 ^{b}	148.27 ± 1.10 ^{b}	597.30 ± 1.34 ^{c}	374.50 ± 9.19 ^{a}	6.50 ± 0.14 ^{a}	3.49 ± 0.13 ^{b}	0.36 ± 0.01 ^{b}	0.02 ± 0.00 ^{c}
C-C1	326.58 ± 21.97 ^{b}	34.81 ± 1.78 ^{c}	110.23 ± 0.93 ^{b}	568.92 ± 5.58 ^{c}	219.96 ± 9.59 ^{a}	2.94 ± 0.03 ^{d}	3.94 ± 0.39 ^{b}	0.37 ± 0.00 ^{b}	0.04 ± 0.00 ^{c}
C-D1	433.5 ± 4.15 ^{b}	30.47 ± 0.22 ^{c}	151.01 ± 0.20 ^{b}	651.60 ± 1.47 ^{b}	312.50 ± 0.71 ^{a}	4.40 ± 0.03 ^{c}	4.10 ± 0.03 ^{b}	0.40 ± 0.00 ^{b}	0.05 ± 0.00 ^{c}
Follow-on IFs									
C-A2	453.92 ± 0.92 ^{b}	37.80 ± 0.22 ^{c}	129.07 ± 3.81 ^{b}	543.26 ± 8.80 ^{c}	340.00 ± 4.24 ^{a}	6.52 ± 0.36 ^{a}	3.21 ± 0.02 ^{b}	0.30 ± 0.00 ^{b}	0.03 ± 0.00 ^{c}
C-B2	447.5 ± 30.78 ^{b}	36.78 ± 1.38 ^{c}	135.15 ± 4.12 ^{b}	516.24 ± 11.96 ^{c}	300.00 ± 8.49 ^{a}	2.98 ± 0.31 ^{d}	3.60 ± 0.14 ^{b}	0.36 ± 0.00 ^{b}	0.03 ± 0.00 ^{c}
C-C2	518.82 ± 6.29 ^{b}	36.11 ± 0.32 ^{c}	135.41 ± 0.20 ^{b}	652.27 ± 2.28 ^{b}	335.00 ± 0.00 ^{a}	4.17 ± 0.11 ^{c}	3.59 ± 0.03 ^{b}	0.37 ± 0.02 ^{b}	0.03 ± 0.00 ^{c}
C-D2	466.27 ± 4.34 ^{b}	30.28 ± 0.08 ^{c}	153.01 ± 0.21^{b}	678.53 ± 2.39 ^{b}	337.00 ± 7.07 ^{a}	5.26 ± 0.22 ^{b}	4.11 ± 0.02 ^{b}	0.40 ± 0.00 ^{b}	0.05 ± 0.00 ^{c}
Specialist IFs									
S1	737.25 ± 39.15 ^{a}	61.99 ± 0.26 ^{a}	211.18 ± 8.32 ^{b}	699.40 ± 7.52 ^{b}	319.50 ± 16.26 ^{a}	5.11 ± 0.14 ^{b}	6.68 ± 0.23 ^{a}	0.41 ± 0.01 ^{b}	0.19 ± 0.01 ^{a}
S2	379.80 ± 2.62 ^{b}	32.67 ± 0.32 ^{c}	164.66 ± 3.01 ^{b}	508.35 ± 4.73 ^{c}	303.00 ± 5.66 ^{a}	3.93 ± 0.05 ^{c}	3.88 ± 0.00 ^{b}	0.34 ± 0.01 ^{b}	0.04 ± 0.00 ^{c}
S3	565.25 ± 27.79 ^{b}	47.79 ± 0.46 ^{b}	167.31 ± 0.64 ^{b}	592.83 ± 2.23 ^{c}	383.00 ± 8.49 ^{a}	5.31 ± 0.03 ^{b}	4.45 ± 0.04 ^{b}	0.41 ± 0.02 ^{b}	0.14 ± 0.00 ^{b}
S4	595.65 ± 2.99 ^{b}	48.23 ± 0.38 ^{b}	165.04 ± 2.16 ^{b}	690.84 ± 0.42 ^{b}	341.50 ± 2.12 ^{a}	6.50 ± 0.14 ^{a}	6.46 ± 0.09 ^{a}	0.43 ± 0.00 ^{b}	0.12 ± 0.00 ^{b}
S5	469.57 ± 40.82 ^{b}	37.80 ± 4.90 ^{c}	156.4 ± 10.32 ^{b}	467.66 ± 17.28 ^{c}	321.00 ± 32.53 ^{a}	5.40 ± 0.37 ^{b}	4.50 ± 0.93 ^{b}	0.64 ± 0.04 ^{a}	0.03 ± 0.00 ^{c}
S6	605.82 ± 4.45 ^{b}	33.92 ± 0.01 ^{c}	257.86 ± 0.78 ^{a}	808.07 ± 4.84 ^{a}	389.00 ± 1.41 ^{a}	3.96 ± 0.11 ^{c}	3.86 ± 0.04 ^{b}	0.34 ± 0.00 ^{b}	0.09 ± 0.00 ^{b}

The results of each mineral content are presented as mean ± standard deviation (n = 3). Abbreviations: Ca—calcium, Mg—magnesium, Na—sodium, K—potassium, P—phosphorus, Fe—iron, Zn—zinc, Cu—copper, Mn—manganese, IFs—IFs. Means with different letters (a,b,c,d) are significantly different at $p < 0.05$. Means a,b,c,d specify differences in mineral composition between different types of IFs.

3.2. Mineral Components in Breast Milk

Table 3 shows the mineral content of breast milk—in colostrum, transitional and mature milk. Of the macrominerals, breast milk contained the highest amounts of K and Ca (60.78 ± 12.75 mg/100 mL, 27.75 ± 5.34 mg/100 mL—colostrum; 51.45 ± 6.79 mg/100 mL, 25.97 ± 4.46 mg/100 mL—transitional and mature milk), and among microminerals—Zn and Fe (0.34 ± 0.09 mg/100 mL, 0.32 ± 0.15 mg/100 mL—colostrum; 0.16 ± 0.08 mg/100 mL, 0.22 ± 0.10 mg/100 mL—transitional and mature milk). Based on the present study, the lactation period was shown to significantly affect Na, P, Fe, Zn, and Mn content. There were 35%, 15%, 50%, and 30% higher Na, P, Zn, and Fe contents in colostrum compared to transitional and mature milk ($p < 0.05$). Although there was no statistical relationship, colostrum also contained more Ca, Mg, K, and Cu. On the other hand, transitional and mature milk contained higher Mn content ($p < 0.05$). As the milk matured, the Mn content increased by about 30%.

3.3. Comparison of Mineral Content Between Different Types of Infant Formulas and Breast Milk

Table 3 summarizes the average macro- and microminerals content of the initial, follow-on, and specialist IFs tested. Based on the results, it is concluded that each type of IF is a richer source of Ca, K, P, Fe, Zn, and Mn than breast milk from different lactation periods (colostrum, transitional, and mature milk). The Ca content in IFs was even more than 60% higher than in breast milk. The P content in IFs reached a value up to three and a half times higher than in transitional and mature milk. In contrast, in the case of Fe, transitional and mature milk contained more than three times less of this element than the individual IFs. Large differences were noted in Mn content, with breast milk having more than five times less of it than specialist IFs. The Cu content of colostrum was the same as in all IFs; however, transitional and mature milk showed a lower content of this element.

3.4. Evaluation of Compliance with the Content of Determined Mineral Components in Infant Formulas

Tables 4 and 5 show the compliance of the concentrations of minerals determined in this study of IFs with the values declared by the manufacturers and the applicable regulations according to the European Commission Regulation [25]. Table 4 shows the assessment of the compliance of minerals in initial and follow-on IFs, and Table 5 in specialist IFs.

3.4.1. Conventional Initial and Follow-On Infant Formulas

Compared to the European Commission's mineral content range, of the initial IFs, only C-B1 exceeded the recommended Fe content by about 5%, whereas in C-C1, the labeled Na value was 14% lower than the range of values set by European standards. The contents of the other minerals were within the specified ranges in the other IFs. The largest deviation in the mineral content assessment determined and declared by the IF manufacturers was recorded for Fe. In C-C1 and C-D1, the marked Fe values were 23 and 13% lower than the labeled values. On the other hand, in C-A1 and C-B1, about 40 and 70% more Fe was identified than the manufacturer declared on the label. For Ca, there have been deviations from labeled values in the range of 5–20%. For other minerals, C-A1 showed almost 30% lower and almost 40% higher Mg and Mn contents relative to label specifications. In addition, in C-B1, the marked p value was more than 50% higher than that declared by the manufacturer.

In follow-on IFs, all the marked mineral values were within the range specified by the European Commission [15,25]. As in the initial IFs, the greatest deviations from the mineral values marked and declared by the manufacturer were recorded in the Fe content. In C-B2 and C-C2, the marked Fe values were about 50%, and in C-D2, more than 20% lower than those declared by the manufacturer. The smallest deviations were recorded for Zn (up to 9%) and Cu (up to 15%). The determined Mg contents were 15–23% lower than those declared by the manufacturers.

Table 3. The average mineral content of infant formulas and breast milk from different lactation periods, mg/100 mL.

Type of Milk	Macrominerals [mg/100 mL]					Microminerals [mg/100 mL]			
	Ca	Mg	Na	K	P	Fe	Zn	Cu	Mn
Initial IFs	51.40 ± 6.36 [a]	4.68 ± 1.20 [b]	18.05 ± 2.74 [b]	79.39 ± 4.83 [a]	39.39 ± 9.63 [a]	0.69 ± 0.22 [a]	0.54 ± 0.065 [a]	0.053 ± 0.005 [a]	0.006 ± 0.004 [a]
Follow-on IFs	64.87 ± 3.84 [a]	4.87 ± 0.69 [b]	18.98 ± 0.75 [b]	77.32 ± 7.75 [a]	45.13 ± 2.66 [a]	0.65 ± 0.22 [a]	0.50 ± 0.03 [a]	0.049 ± 0.004 [a]	0.005 ± 0.001 [a]
Specialist IFs	76.77 ± 16.01 [a]	6.54 ± 1.60 [a]	25.925.62 [a]	85.89 ± 17.13 [a]	46.64 ± 5.80 [a]	0.73 ± 0.18 [a]	0.69 ± 0.18 [a]	0.060 ± 0.017 [a]	0.014 ± 0.010 [a]
Colostrum [1]	27.75 ± 5.34 [b]	3.43 ± 0.65 [b]	22.37 ± 6.33 [b]*	60.78 ± 12.75 [b]	14.91 ± 2.03 [b]*	0.32 ± 0.15 [b]*	0.34 ± 0.09 [b]*	0.04 ± 0.02 [a]	0.002 ± 0.001 [b]
Transitional and mature milk [2]	25.97 ± 4.46 [b]	2.94 ± 0.59 [b]	14.64 ± 8.40 [b]	51.45 ± 6.79 [b]	12.67 ± 1.15 [b]	0.22 ± 0.10 [b]	0.16 ± 0.08 [c]	0.030 ± 0.01 [b]	0.003 ± 0.001 [a]*

The results of each mineral content are presented as mean ± standard deviation (n = 3 for IFs, n = 16 for colostrum, n = 30 for transitional and mature milk). Abbreviations: Ca—calcium, Mg—magnesium, Na—sodium, K—potassium, P—phosphorus, Fe—iron, Zn—zinc, Cu—copper, Mn—manganese; IFs—IFs. Means in columns with different letters (a,b,c), significantly differ at $p < 0.05$. Means a,b,c, specify differences in mineral composition between initial IFs, follow-on IFs, specialist IFs, and HM (colostrum and transitional/mature milk). The values marked with * for colostrum and transitional/maternal milk indicate differences in mineral content between the various fractions of breast milk. [1] Colostrum included samples from the first five days postpartum. [2] Transitional milk included samples collected from 7 to 14 days postpartum. Mature milk included milk from 1 to 6 months of lactation.

Table 4. The mineral content of initial and follow-on infant formulas expressed in mg/100 kcal and the corresponding value declared on the label by the manufacturer, and the minimum and maximum levels recommended by applicable regulations.

Minerals	Initial IFs (mg/100 kcal)									
	Values Recommended by Commission Delegated Regulation		C-A1		C-B1		C-C1		C-D1	
	Min.	Max.	VL	VM	VL	VM	VL	VM	VL	VM
Ca	50	140	90.91	83.57	87.88	79.36	77.27	63.83	80.3	84.73
Mg	5	15	8.18	**6.01**	10	9.57	6.82	6.8	6.97	5.96
Na	25	60	33.18	27.33	33.48	31	30.3	**21.54**	28.79	29.52
K	80	160	112.12	117.69	125.76	124.89	100	111.2	106.06	**127.36**
P	25	90	62.12	56.35	50	**78.30**	45.45	42.99	59.09	61.08
Fe	0.3	1.3	0.8	**1.1**	0.8	**1.36**	0.76	**0.59**	0.98	0.86
Zn	0.5	1	0.73	0.83	0.73	0.73	0.76	0.77	0.74	0.8
Cu	0.06	0.1	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.08
Mn	0.001	0.1	0.0045	**0.0062**	0.0045	0.0042	0.009	0.008	0.013	**0.0097**
Minerals	**Follow-On IFs**									
	Values Recommended by Commission Delegated Regulation		C-A2		C-B2		C-C2		C-D2	
	Min.	Max.	VL	VM	VL	VM	VL	VM	VL	VM
Ca	50	140	105.88	96.12	107.35	94.76	113.24	102.24	89.39	91.13
Mg	5	15	10.44	**8**	10	**7.79**	9.26	**7.12**	6.97	5.92
Na	25	60	33.82	27.68	34.71	28.62	29.41	26.68	28.79	29.91
K	80	160	114.71	119.19	123.53	109.32	129.41	128.54	106.06	132.62
P	25	90	73.53	72	73.53	63.53	64.71	66.01	66.67	65.87
Fe	0.6	2	1.47	1.38	1.47	**0.64**	1.47	**0.82**	1.35	**1.03**
Zn	0.5	1	0.74	0.68	0.74	0.76	0.74	0.71	0.74	0.8
Cu	0.06	0.1	0.07	0.06	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.08
Mn	0.001	0.1	0.007	0.0064	0.007	0.006	0.01	0.01	0.01	0.0097

Abbreviations: VL—value labeled; VM—value marked; Ca—calcium, Mg—magnesium, Na—sodium, K—potassium, P—phosphorus, Fe—iron, Zn—zinc, Cu—copper, Mn—manganese. Declared values labeled were treated as 100% of the individual mineral content. Values in bold indicate greater than 20% differences in marked mineral concentrations relative to those declared by the manufacturer.

Table 5. The mineral content of specialist infant formulas expressed in mg/100 kcal and the corresponding value declared on the label by the manufacturer, and the minimum and maximum levels recommended by applicable regulations.

Minerals	Specialist IFs (mg/100 kcal)													
	Values Recommended by Commission Delegated Regulation		S1		S2		S3		S4		S5		S6	
	Min.	Max.	VL	VM	VL	VM	VL	VM	VL	VM	VL	VM	VL	VM
Ca	50	140	148.36	148.55	78.79	74.23	114.49	115.51	119.12	118.25	116.47	99.44	123.53	120.27
Mg	5	15	10	**12.49**	8.94	**6.39**	12.32	**9.77**	11.91	9.58	10.59	**8**	10	**6.73**
Na	25	60	46.42	46.34	32.58	32.18	40.87	34.19	35.29	32.77	44.26	**33.12**	50	51.19
K	80	160	144.03	144.07	108.33	99.36	127.68	121.14	138.24	137.15	110.12	99.03	108.82	**160.43**
P	30	100	62.54	64.38	62.12	59.27	81.74	78.27	69.12	67.8	75.81	67.98	79.41	77.23
Fe	0.45	2	1.39	**1.03**	0.98	**0.77**	1.23	1.09	1.59	1.29	1.51	**1.14**	1.03	**0.79**
Zn	0.75	1.25	1.42	1.35	0.77	0.76	0.91	0.91	1.09	1.28	1.1	0.95	0.74	0.77
Cu	0.06	0.1	0.09	0.08	0.08	0.07	0.07	0.08	0.07	**0.09**	0.08	**0.14**	0.07	0.07
Mn	0.001	0.1	0.044	0.038	0	0.01	0.057	0.028	0.03	**0.023**	0.009	**0.006**	0.0205	0.018

Abbreviations: VA—value labeled; VM—value marked; Ca—calcium, Mg—magnesium, Na—sodium, K—potassium, P—phosphorus, Fe—iron, Zn—zinc, Cu—copper, Mn—manganese. Declared values labeled were treated as 100% of the individual mineral content. Values in bold indicate greater than 20% differences in marked mineral concentrations relative to those declared by the manufacturer.

3.4.2. Specialist Infant Formulas

Specialist IFs had the most deviations in terms of compliance with mineral content in IFs against the recommendations set by the European Commission [15,25]. In S1, the Ca content specified by the manufacturer and determined in the study was slightly higher than the upper value for this element set by the European Commission. In the same formula, the Zn content determined and declared by the manufacturer was exceeded by 8 and 14%. The determined Cu content in formula S5 was 40% higher than the statutory upper limit for this element in specialist IFs. In addition, formula S6 slightly exceeded the determined K content relative to the statutory maximum value. Concerning the compliance of the mineral content marked and declared by the manufacturer, the greatest deviations were recorded for Mg, which was more than 30% lower in S6 than the value on the label, compared to almost 25% higher in S1. The large deviations were reported at S6 for K, which exceeded its declared amount by nearly 50%. The greatest mineral content compliance was recorded for P (deviations of up to 10%).

3.5. Daily Coverage of Mineral Requirements After Consumption of Infant Formulas and Human Milk

Figure 1A–H shows the daily coverage values for each mineral requirement after ingestion of a set daily portion of IF and a portion of breast milk. The daily intake of each IF and breast milk by infants aged 1–6 months and 6–11 months was calculated based on the information concerning formula dosage provided on the IF labels and the recommendations of the Polish Society for Paediatrics Gastroenterology, Hepatology and Nutrition [26] (Table S1). The average intakes of IFs and HM for two groups were used for the calculations: infants aged 1–6 months and infants aged 7–11 months. Then, the EDI was calculated, considering the daily intake of IF and breast milk and the determined mineral contents (Table S2). The average content of macro- and microminerals in colostrum, transitional, and mature milk was used to calculate the EDI for minerals in breast milk. Table S3 summarizes the Polish dietary standards for mineral intake of infants aged 0–6 months and 7–11 months, which were used to calculate the coverage of individual elements.

3.5.1. Conventional Initial and Follow-On and Specialist Infant Formulas

The coverage of mineral requirements in initial IFs exceeded the values determined by the established norms of nutrition for the Polish population. The highest values were determined for Fe, where the coverage of the requirement after the consumption of a daily portion of the formula exceeded the established norms for this element by up to 20–25 times in C-A1 and C-B1. For Mn, in C-D1, the values exceeded the standard by up to 18 times the set standards. Among the initial IFs, the whole-day intake of formula C-B1 covered the standard for Mg, Na, and P to the greatest extent. In the case of Na, formulas C-A1, C-B1, and C-D1 exceeded the coverage of the daily requirement for this element by 28, 46, and 42%, while in formula C-C1, the coverage of the requirement for Na was only 89%. Large differences were observed in the coverage of P requirements between C-B1 and C-C1. In the first mentioned formulas, the proportion of P exceeded the daily requirement by almost three times, while in the second, the standard for this macronutrient was exceeded by only 40%. The standard for Zn was exceeded by more than 100% in C-A1, C-B1, and C-D1, while in C-C1, it was exceeded by about 30%.

Follow-on IFs, intended for infants after six months of age, covered the requirements for selected minerals at a significantly lower rate than initial ones. After consuming the recommended daily portion of each milk, there was an excess of the recommended daily intake for Ca, Zn, Cu, and P (except C-D2), with the highest being for Ca (by up to 126% in C-B2). The daily requirement for Mg was met by about half after consumption of C-A2, C-B2, and C-C2, while it was met by about 30% after consumption of C-D2. Large deviations were noted for Fe, where the requirement coverage after whole-day intake ranged from 27% in C-B2 to 60% in C-A2. The intake of all follow-on IFs covered the daily requirement for Mn (5–6%) and Na (31–41%) to the lowest extent.

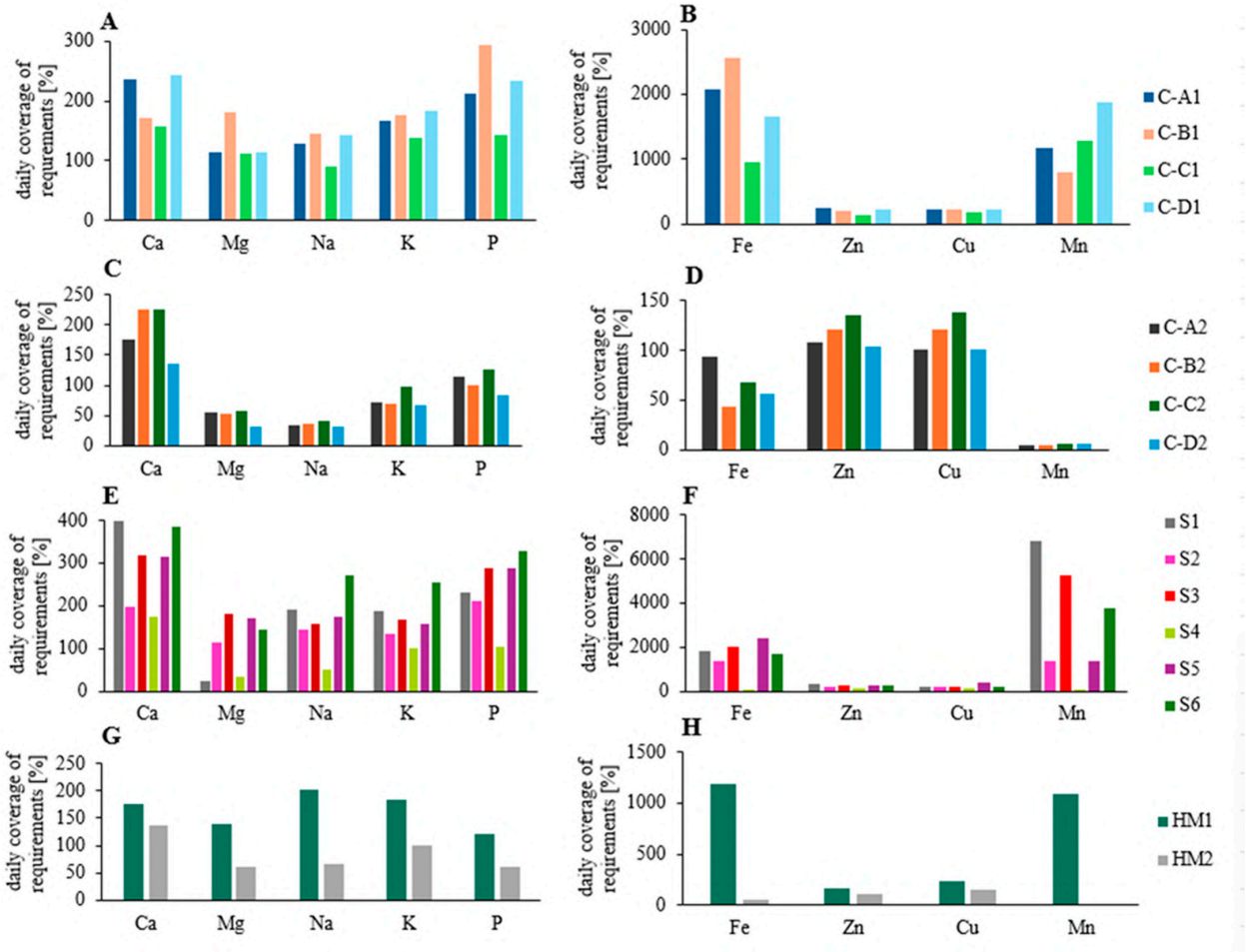


Figure 1. The coverage values of the daily mineral requirements after the daily intake of each IF and breast milk, %; (**A**) macrominerals in initial IFs, (**B**) microminerals in follow-on IFs, (**C**) macrominerals in follow-on IFs, (**D**) microminerals in follow-on IFs, (**E**) macrominerals in specialist IFs, (**F**) microminerals in specialist IFs, (**G**) macrominerals in human milk for infants aged 0–6 months, (**H**) microminerals in human milk for infants aged 7–11 months. Abbreviations: Ca—calcium, Mg—magnesium, Na—sodium, K—potassium, P—phosphorus, Fe—iron, Zn—zinc, Cu—copper, Mn—manganese.

Specialist IFs showed the greatest variations in estimated coverage of selected minerals after consumption of the recommended daily portion. The daily intake of Ca was exceeded by up to four times in S1 and S6. In contrast, Mg coverage ranged from 22% in the S1 formula to 180% in the S3 formula. As in the conventional initial IFs, there was high coverage of Fe requirements, which exceeded standards by up to twenty-four times in S5. Of the specialist IFs, the standout formula in terms of Fe requirement coverage was S4 meeting Fe demand by only 47%. In general, the most deviating estimated requirement coverage values were recorded for Mn.

3.5.2. Human Milk

Coverage of selected minerals after consuming a whole-day portion of breast milk varied according to the age of the infants. For infants aged 0–6 months, the coverage of Fe requirements after consuming breast milk exceeded the value specified in the nutrition standards by eleven times. In contrast, for infants aged 7–11 months, breast milk intake covered Fe requirements by only 33%. For infants 0–6 months, a whole day serving of breast milk exceeded the standard for Mn ten times, while for older infants, Mn coverage was only 6%. Breast milk covered the requirements for Mg, Na, and P by 140, 203, and 121%

for infants aged 0–6 months, while for older infants the requirements for these elements were covered by 61–67%.

3.6. Principal Component Analysis (PCA)

PCA was used to explain the structure of variation in the collected data on the content of macro- and microminerals in IFs (initial, follow-on, and specialist) and compare it with the structure of variation in breast milk from different lactation periods (colostrum, transitional milk, mature milk). The analysis of variability was conducted among all samples analyzed, and the variables included individual minerals (Ca, Mg, Na, K, P, Fe, Zn, Cu, Mn). PC1 and PC2 explained 63.82% and 11.88% of the total variance in the data, respectively (75.7% overall). Figure 2A shows the relationships occurring between the individual minerals and the resulting principal components. All variables were more highly transferred by PC1. Figure 2B shows a plot of points in the principal component plane, showing the variation in mineral content of the different IFs and individual fractions of breast milk. The distribution of cases relative to each other indicates that there are differences between the mineral composition of IF and HM. The distribution of cases C and TM/MM (breast milk) is clearly separated from all IFs. The formulas S1 and S6 were on the opposite side of the graph in contrast to the other specialist IFs, which indicates the occurrence of differences in the content of individual minerals. Figure 1 indicates that formulas S1 and S6 contained higher levels of Na, K, and Mn relative to the other IFs. The separation of case S5 from the other specialist IFs is a result of the higher Cu content. Figure 2B clearly shows the concentration of cases representing initial and follow-on IFs, indicating the occurrence of a similar mineral profile for these formulas.

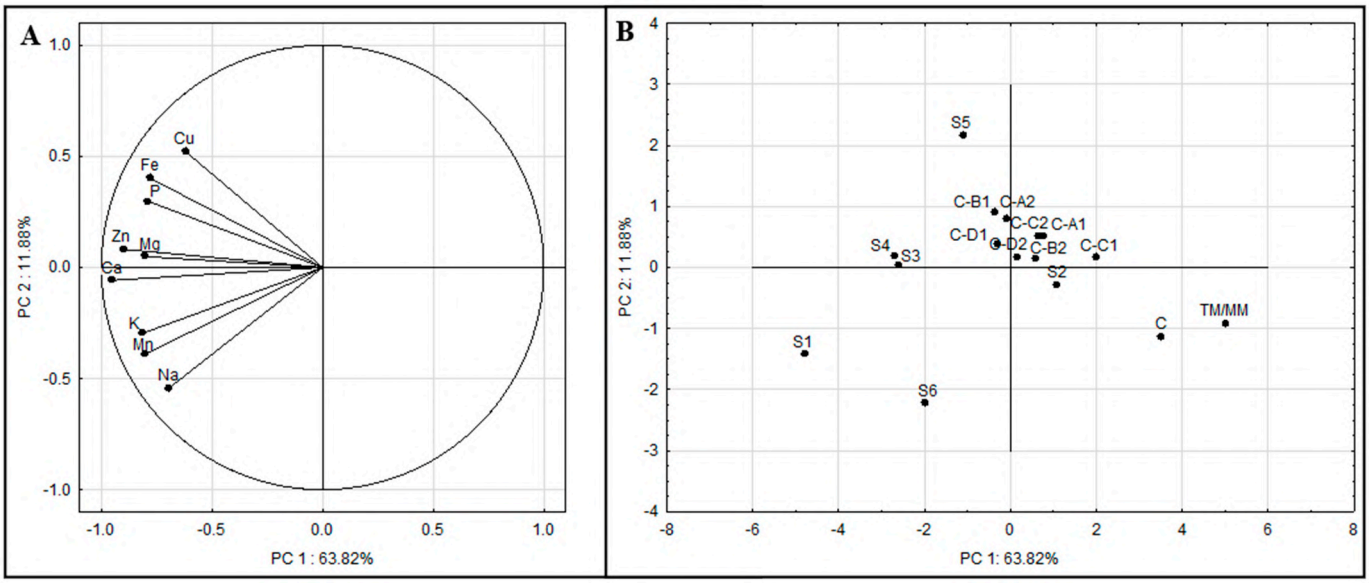


Figure 2. The principal component plot showing variations in the selected minerals (Ca, Mg, Na, K, P, Fe, Zn, Cu, Mn) of the analyzed initial, follow-on, and specialist IFs and human milk samples (**A**) and the score plot of the analyzed IFs and HM from different lactation periods (**B**). Abbreviations: Ca—calcium, Mg—magnesium, Na—sodium, K—potassium, P—phosphorus, Fe—iron, Zn—zinc, Cu—copper, Mn—manganese; C-A1, C-B1, C-C1, C-D1—initial IFs; C-A2, C-B2, C-C2, C-D2—follow-on infant formulas; S1, S2, S3, S4, S5, S6—specialist infant IFs; C—colostrum, TM/MM—transitional/mature milk.

4. Discussion

HM is the optimal source of nutrition for infants, and it is reported that breastfeeding has several health benefits [29]. Nevertheless, there is still a percentage of up to 50% of infants under 6 months of age who are not exclusively breastfed due to child or maternal

health reasons, work-related aspects, or lack of willingness to feed naturally [30,31]. The best and completely safe alternative to HM are IFs, which are developed based on cow's milk or the milk of other animals [3]. IFs belong to processed foods, which, through appropriate modifications, have been adapted to the needs of infants and young children of different ages [32]. Depending on the technological process used, different types of IFs are produced [32], both for feeding infants and healthy children (conventional IFs) and those requiring special nutritional needs, because of allergies to milk proteins, phenylketonuria, or galactosemia (specialist IFs) [16]. The manufacturers attempt to make the composition of IFs like HM, however, for macro- and microminerals, these compounds differ primarily in bioavailability. Therefore, the present study evaluated the mineral content of available conventional and specialist IFs and compared it with that of HM.

4.1. Mineral Content of Infant Formulas

4.1.1. Conventional Initial and Follow-On Infant Formulas

Among the macrominerals in the formulas studied, K content was highest, followed by Ca, P, Na, and Mg. In turn, the micromineral content was highest for Fe, followed by Zn, Cu, and Mn. The contents of selected minerals in initial and follow-on IFs determined in this study were like those determined by Almeida et al. [3]: Ca—250.1 ± 33.8–586.2 ± 9.7 mg/100 g; P—250.4 ± 8.1–380.9 ± 5.5 mg/100 g; Zn—2.935 ± 0.647–4.307 ± 0.351 mg/100 g. In the study of these authors, Mg content was in a wider range (31.6 ± 1.8–61.4 ± 1.0 mg/100 g) than the values obtained in the present study (28.76 ± 0.42–45.76 ± 0.39 mg/100 g). In the study by Moraes et al., 2021 [33], the variation in Na (173.8–307.7 mg/100 g) and K (467.2–895.3 mg/100 g) content in conventional IFs was much higher than those in our research. Moreover, in the initial and follow-on formulas, the lower value of the range of the determined Fe content was lower (2.94 ± 0.03–6.52 ± 0.36 mg/100 g) than in the studies of Almeida et al. [3] (5.205 ± 0.213–8.310 ± 0.214 mg/100 g) and Moraes et al. [33] (6.3 mg/100 g). In the case of Fe, its content can range from 0.07 to 9.77 mg/100 g in IFs for infants aged 0–6 months and 0.03–11.97 mg/100 g for infants aged 0–12 months [34]. The elemental content of IFs may vary depending on the intended audience to which the product is dedicated. In the present study, no significant differences were found between the mineral content of initial and follow-on IFs. Single correlations were noted—the C-B1 formula stood out in terms of Mg content compared to follow-on IFs. Also, the C-D1 formula contained higher amounts of K relative to the other initial and the two follow-on IFs (C-A2 and C-B2).

4.1.2. Specialist Infant Formulas

Until now, there have been only a few studies available on the mineral content of specialist IFs. The most common type of specialist IF is the lactose-free formula used when there is frequent diarrhea in the child. These formulas do not contain lactose in the composition, and the main carbohydrate source is maltodextrin [35]. Hong [35] reports that the Fe content in this type of IF is reduced to inhibit the growth of pathogenic intestinal bacteria. In addition, these formulas contain more electrolytes (Na, K) to prevent dehydration caused by diarrhea. Among the specialist IFs that contained partially hydrolyzed cow's milk protein in the formulation (S1, S2), formula S1, intended for gastrointestinal disorders, contained the highest Na and K content. On the other hand, it should be noted that excessive Na intake in IF) can lead to blood pressure problems in infancy and later in adolescence [36]. Conversely, excess K can result in hyperkalemia [37]. Furthermore, excessive sodium intake during infancy can impair sodium metabolism and potentially cause kidney damage [38]. Soy-based formulas are designed for infants who are intolerant to milk protein or have galactosemia or lactose digestion problems [39]. As in formulas designed for lactose intolerance, the carbohydrate source is maltodextrin. However, unlike these formulas, in IFs based on soy protein, the Fe content is not reduced, and thus, the risk of Fe deficiency is lower [35]. Soy-based IFs contain about 1.5% phytates, which can impair mineral absorption. IFs produced today based on soy protein are reported to contain P and Ca in concentrations about 20% higher than conventional IFs. Formula S3, based on

soy protein, contained about 47 and 30% more Ca and P than conventional initial IFs and 20 and 17% more compared to follow-on IFs [40]. It should be emphasized that phytic phosphorus found in plant materials (including soybeans) is not well digested and has a lower bioavailability than that derived from milk [33,41]. This is also the reason that soy-based IF can be supplemented with higher amounts of P. In a study by Moraes et al. [33], soy-based formula had the lowest bioavailability of Fe and Zn. The presence of certain anti-nutritional substances in soy, such as phytates and phenols, can lead to the formation of insoluble complexes that precipitate during intestinal digestion, reducing the absorption of Fe and Zn. Therefore, soy-based formulas are often additionally enriched with these elements to ensure that their levels do not deviate from the norm [35]. In our study, the Fe and Zn content of the S3 formula did not differ from that of the other IFs (it was the same as or lower than that of the other IFs).

Another popular type of specialist formula is protein hydrolysates, designed for infants who cannot digest milk proteins or have severe lactose intolerance. Such formulas are easily digestible and have low antigenicity due to the use of milk protein hydrolysis. To produce formulas based on protein hydrolysates, partial or extensive hydrolysis is used [35]. Of the IFs tested, two IFs with a moderate degree of hydrolysis (S1, S2) and one with a high degree of hydrolysis (S4) were evaluated. Of these formulas, IF S1 had a higher Ca and Mg content relative to S2 and S4. In contrast, the S4 formula had a higher Fe content than the other two discussed. In addition, both S1 and S4 were characterized by higher K content than S2. In severe hypersensitivity to milk proteins or the infant's unacceptability of formulas based on milk protein hydrolysates, amino acid mixtures based on synthetic free amino acids are used [42]. In the study presented here, two IFs based on free amino acids (S5 and S6) were analyzed. The S6 formula stood out from other specialist IFs in terms of Na and K content. Due to the limited amount of research considering the literature on specialist IFs in terms of their chemical composition, including mineral content, the discussion in this area is limited.

4.2. Comparison of Mineral Content in Different Types of IFs and Human Milk from Different Lactation Periods

4.2.1. Differences in Mineral Content of Human Milk Relative to the Lactation Period

Temporal changes in the concentration of minerals in HM are related to the changing nutritional needs of the infant. The content of macro- and microminerals and their mutual proportions significantly affect their absorption and utilization by the child's body [4]. Monitoring changes in the mineral composition of HM is crucial in composing IFs to have similar nutritional and functional properties [43]. Similarly, as reported by Sun et al. [44], the mineral content of breast milk was as follows: K > Ca >> Na > Mg. The changes in the mineral content of HM according to the lactation period were similar to the results reported in previous similar studies, but some differences were noted in the present study.

The Ca content in colostrum and transitional/mature milk was 27.75 ± 5.34 mg/100 mL and 25.97 ± 4.46 mg/100 mL, indicating values similar to those in the study by Mandiá et al. [45] (24.536 mg/100 mL—colostrum; 28.08—transitional and mature milk. This study observed a decrease in P content as milk matures. P concentration is highest in early transitional milk and decreases as lactation progresses [6]. Mg content varied slightly with the lactation stage, as reported by Ren et al. [4]. According to the literature, the concentration of Mg in breast milk ranges from 1 to 5 mg/100 mL, with a median of 3 mg/100 mL [6]. The concentration of Mg in breast milk is rather stable; however, some researchers report a slight increase or decrease in Mg during the first six months of lactation [6]. As for Na, according to WHO and the European Food Safety Authority (EFSA), the Na content in breast milk ranges from 6–17 mg/100 mL and 14–16 mg/100 mL, respectively [46]. In the present study, Na values were exceeded in colostrum relative to available standards. The Na content in our study decreased as lactation progressed, reaching a value 35% lower in transitional and mature milk than in colostrum, as in the

work of Mandiá et al. [45]. It should be noted that the level of electrolytes, especially Na, in breast milk can be dependent on external factors, including emotional stress [46].

Among microminerals, significant differences between mineral content and lactation period were noted for Fe, Zn, and Mn. In our study, there was a decrease in Fe content relative to the lactation period, similar to that reported by Kim and Yi [5]. Fe content reaches a maximum level in colostrum and gradually decreases as the milk matures during the first year of lactation [47]. A Chinese cohort study indicated a decrease in Zn in breast milk as lactation progressed [43], while Sun et al. [44] observed a 34% decrease in this element. In the study presented here, as much as a 50% decrease in Zn content was observed relative to the lactation period. The decline in Zn levels from colostrum to mature milk can reach as much as 4 mg per day in the first few days postpartum, decreasing to approximately 0.7 mg per day during the first six months of lactation [48]. Molska et al. [49] report that the concentration of Zn in breast milk after three weeks of lactation is only 36–54% of the initial concentration, and after three months—only 20%. In the case of Mn, a higher amount was recorded in transitional and mature milk, the opposite of the study by Mandiá et al. [45]. Differences in changes in the mineral composition of breast milk may depend on the individual variability of women and factors such as age and body mass index (BMI) [6].

4.2.2. Comparison of Mineral Content in Human Milk and Infant Formulas

This study reported differences in mineral content between HM and IFs. The levels of some minerals in IFs may be significantly higher than those in HM due to differences in bioavailability [21]. The higher bioavailability of minerals from HM is due to the presence of enzymes (amylase and lipase) that aid digestion. IFs are enriched with selected inorganic salts during production, which can lead to the precipitation of elements during digestion, and the presence of other anti-nutrients can also lead to reduced solubility of some elements [33]. Calcium content in HM was two to three times lower than in IFs. The highest differences in Ca content were noted between HM and specialist IFs. The significantly higher amount of Ca in IFs is associated with lower Ca absorption by infants compared to HM. Kwiecień et al. [21] report that Ca bioavailability from formulas is about 38%, while from breast milk, it is almost 60%. In contrast, Moraes et al. [33] found that the bioavailability of Ca from IFs ranged from 3 to 24%, with the exception of milk intended for premature infants, which showed a value of 43%. Among macrominerals, significant differences in content between HM and IFs were also noted for P and K, and in both cases, the levels of these minerals were higher in IFs. The content of these nutrients in IFs is tightly regulated, as excess levels of these compounds taken in with the diet must be excreted in the urine, which can strain an infant's immature kidneys and increase the risk of dehydration [3].

It was reported that Zn content in IFs was up to four times higher than in transitional and mature milk. The lower Zn content in IFs is related to the reduced bioavailability of this element in them. While the bioavailability of Zn from HM reaches about 50% [48], in cow's milk, which is the basis for the production of IFs, it reaches about 26% [50]. The higher bioavailability of Zn from HM compared to cow's milk is partly explained by the different chemical composition of the two milks, particularly the different casein-to-whey protein ratios. By adjusting the ratio of these proteins to a value of 40:60 (as in HM), the absorption of Zn from cow's milk can be significantly increased [50]. Whereas Zn deficiencies are almost non-existent in the adult population, the percentage is as high as 50% among infants [51]. Considering the lower bioavailability of Zn from IFs and the impaired ability of the infant's not fully mature gastrointestinal system to absorb the elements, the risk of Zn deficiency among infants is higher [51]. To prevent Zn deficiencies in infants' diets, it is reasonable to add higher amounts of this element to IFs. A similar trend was noted for Fe—its content in breast milk was even more than three times lower than in the IFs analyzed. This is also due to differences in the bioavailability of this element—from breast milk, it is about 50%, while in IFs, it is about 12% or less [52]. Other sources report that Fe

bioavailability from IFs can be as low as 4–7% [5], and Fe bioavailability from breast milk is more than 10 times higher than from IFs [53]. During the first few months, the infant utilizes Fe reserves accumulated in the body; however, in the later months of life, it is reasonable to provide it with solid foods or to include supplementation [5]. Mandiá et al. [45] report that trace elements, including Fe and Zn, in IFs can be found in concentrations up to 50 times higher than in breast milk. During the production process of IFs, it is important to consider the loss of trace elements during storage. In addition, the bioavailability of minerals in IFs is significantly lower than in HM [49].

4.3. Evaluation of the Compliance of Marked Mineral Content in Infant Formulas

As previously discussed, the levels of some minerals in IFs can be significantly higher than in breast milk due to the lower bioavailability of macro- and microminerals [21]. The evaluation of the compatibility of the mineral composition of IFs with the manufacturer's claims has previously been assessed by several researchers. Consumers expect the content of individual minerals in IFs to maintain a certain standard and be able to provide the right amount to infants [3]. Kwiecień et al. [21] and Witczak and Januszewska [54] determined lower Ca contents relative to label information. In our study, large differences were noted between determined and declared Mg levels. The marked values in all formulas (except S1) were lower than those declared by the manufacturer, and the differences were up to 30%. Almeida et al. [3] observed lower Mg contents relative to the label in three initial and three follow-on formulations; however, the differences were less than 20%. The greatest differences in the marked and labeled values of IFs were noted for Fe. In two initial formulas (C-A1, C-B1), the values were about 40 and 70% higher in contrast to the values declared by the manufacturer. In the follow-on IFs, the Fe content was lower than that on the product's labels, and in three of them, C-B2, C-C2, and C-D2, the differences were greater than 20%, including in two formulas reaching about 50%. On the other hand, the Fe content of all IFs tested (except C-B1) was within the range specified by the European Commission (0.3–1.3 mg/100 kcal—initial IFs; 0.6–2 mg/100 kcal—follow-on IFs; 0.45–2 mg/100 kcal—specialist IFs [25]. Almeida et al. [3] also indicated differences in Fe content between the determined and declared values; however, they reached a lower range than in our study. Such large differences in Fe content may also have been due to the different test methods for mineral determination used in this study, including the sampling method, affecting measurement uncertainty [55]. In most of the IFs, the determined Mn content was lower than declared by the manufacturer on the label (except for C-A1, C-C2, and S2); however, it was within the range of values specified by European Union regulations. On the other hand, Astolfi et al. [56] indicated lower than legislated Mn levels in IFs. Only in one formula (C-A1) did the Mn values exceed the concentration difference by more than 20% from the manufacturer's declared value. Almeida et al. [3] report that in one of the IFs, the determined Mn content was up to 87% lower than on the label. In two specialist IFs (S4 and S5), experimental Cu values exceeded those declared by the manufacturer by more than 20%. The large deviations in Mn and Cu can be justified by the low densities of these elements in the IFs; such small values may be more susceptible to large variations in the content of these elements in the formulas [57].

Deviations in mineral content from the standards recommended by the European Commission were noted in several specialist IFs. In S1, Ca values, both value labeled and value marked, were slightly higher (by about 5–6%) than the range of standards. This situation was also observed for Zn in S1 and S4 (for value marked). Composing specialist IFs can be difficult due to different values of standards for selected minerals, including higher P or Zn content [35].

It should be noted that differences in mineral content between the value marked and that declared by the manufacturer can also result from the type of water used to prepare a given formula [58]. In the present study, deionized water was used for the preparation of each IF to avoid the presence of minerals found in water and to obtain the most reliable results. The labels of some of the IFs do not specify what type of water should be used for

their preparation, and only in a few is it clarified to use cooled boiled water. We also do not know under what conditions the studies of the IFs were performed and which method and reagents were used. It should be noted that a major limitation of this study is the analysis of minerals in a single product batch. In order to verify the accuracy of the mineral content indicated in individual IFs against the label information, it would be necessary to carry out additional tests on other batches of products. Nevertheless, despite differences in the content of some minerals in the values marked and included on the IFs' labels, most of the values remain within the range of those specified by the European Commission.

4.4. Daily Coverage of Mineral Requirements After Consumption of Infant Formulas and Human Milk

Based on the recommended intake values of IFs on the labels and the recommended daily intake values of HM obtained from the recommendations of the Polish Society for Paediatrics Gastroenterology, Hepatology and Nutrition [26], the total daily mineral intake of infants was calculated and compared to the Polish reference intake values. The present study verified whether the intake of IF and breast milk would exceed the values set by the standards.

Comparing the whole-day intake values of minerals from individual IFs with the reference values recommended by specific standards [27,28], it was identified that all types of initial IFs and special IFs (except S4) exceeded the contents of tested minerals. Almeida et al. [3] indicated that initial IFs contained higher amounts of Ca, Mg, Na, P, Fe, Zn, Cu, and Mn than those specified by standards. IFs can have up to six times higher levels of Ca than in breast milk. Although the bioavailability of Ca from IFs is significantly lower, there is a risk of exceeding the daily intake of this element. Consequently, this can impair the absorption of other minerals—Mg, Fe, and Zn [49]. Considering the lower bioavailability of Ca from IFs, EFSA recommends a Ca intake of 700 mg per day, considering infants up to 6 months of age [33]. Almeida et al. [3] report that Zn concentrations in IFs (initial and follow-on) exceeded the upper level (UL) values (4 and 5 mg/day for infants 0–6 and 7–12 months). On the other hand, our study reported that only Ca, P (except C-D2), Zn, and Cu were exceeded after a full daily intake of follow-on IFs. In both our study and that of Almeida et al. [3], it was observed that in all follow-on formulas, the content of Mn and Na was lower than that specified by the norms of nutrition for the Polish population [27,28]. While initial IFs are sufficient to meet an infant's whole-day mineral needs, follow-on formulas introduced after 6 months of age may be deficient in selected macro- and microminerals. It must be considered that after 6 months of age, solid foods are introduced to infants as a dietary supplement to essential nutrients [59]. Therefore, even if the whole-day intake of selected follow-on IFs does not cover the need for selected minerals, it should be considered that infants in this age group also receive minerals from other food sources [3].

Our study reported the highest estimated coverage of Fe requirements, which in initial and specialist IFs (except S4) reached up to 25 times the value set by nutrition standards for the Polish population [27,28]. For follow-on IFs, the values ranged from 27 to 60%. The differences in the realization of the daily requirement for Fe between initial and follow-on IFs are attributable to differences in standards for this nutrient for infants relative to age. While the Fe requirement for infants aged 7–11 months was 11 mg/day, it was 0.3 mg/day for infants up to six months [Table S3]. Fe content in IFs ranges as high as 8–14 mg/L. Due to concerns about the low bioavailability of Fe and the risk of deficiency among infants, IFs contain significantly higher contents of this element [60]. Björmsjö et al. [60] reduced the Fe content of IFs from 8 to 2 mg/L and provided such a mixture to infants to control serum Fe levels. The authors' results indicate that reducing Fe in IF to 2 mg/L does not significantly affect the incidence of Fe deficiency.

Pinana et al. [61] indicate that the Fe content of IFs can cover the daily Fe requirement by 947%, even though the Fe content is within the range of regulatory standards. Excess Fe, like deficiency, can have negative effects on the infant's body, including those related to impaired absorption of other minerals and pro-oxidant effects [62]. It is reasonable to

add higher amounts of minerals to IFs due to their much lower bioavailability compared to HM [3]. However, when comparing the realization values of daily standards for selected minerals between initial IFs and HM, significantly elevated values are found. As reported by Pinana et al. [61], despite the compliance of the content of individual minerals in IFs relative to standards, it would be necessary to re-evaluate and possibly improve the proportion of individual macro- and microminerals. It would be advisable to consider the occurrence of possible negative health effects resulting from the consumption of excessive minerals.

The obtained values of daily realization of norms for individual minerals could be referred to as upper levels (UL). This indicator defines the highest biologically tolerable level of habitual intake of a given ingredient from all sources (food, drinking water, intake of dietary supplements) that does not cause negative health effects [63]. However, none of the minerals analyzed in the dietary standards for the Polish population were defined in the UL index. The 2024 EFSA report on established UL levels also does not provide these values for infants [64]. The reason for this is that there is not enough research on the harmful effects after ingestion of selected elements. In addition, setting this level for Fe can be problematic due to the poor correlation between intake of this element and selected biochemical indicators of Fe nutritional status in the body, as well as between Fe reserves in the body and adverse effects occurring [63]. On the other hand, EFSA, at the request of the European Commission, has defined safe levels of intake for Fe and Mn, defining the highest levels of elemental intake for which there is reasonable certainty regarding the absence of adverse effects [64]. These values are 5 mg/day for Fe for infants 4–6 months and 7–11 months [65] and for Mn—2 mg/day for infants aged 4–12 months [66]. Based on the stated safe intake levels for Fe, selected IFs—C-A1, C-B1, C-A2, S1, S3, S4, S5, and S6, exceeded the specified daily content of this element. However, these standards were set for infants aged 4–6 months without considering infants aged 1–3 months. In our study, the daily intake of each IF was calculated for two age groups: infants aged 1–6 months and 7–11 months. Therefore, the UL values set by EFSA cannot be directly used in our study.

4.5. Strengths and Limitations

A strength of the present study is the inclusion of specialist IFs in the study material. According to our knowledge, there are few studies on the mineral content of Polish specialist IFs. In addition, few authors have comprehensively evaluated Polish IFs in terms of the compliance of mineral components against specific standards. On the other hand, a limitation of the study is that the analysis of the mineral content was only carried out on one batch of the product. To verify the mineral incompatibilities noted, it would be necessary to repeat the tests using a different batch of individual IFs.

In the present study, a limitation could be the lack of information on the current and habitual intake of lactating women concerning the mineral content of HM. The studies on dietary intake's influence on breast milk's mineral composition are inconclusive. Available studies show that a mother's dietary intake does not affect the Ca, Zn, and Fe content of her milk [45,48,67]. On the other hand, Zielinska-Pukos et al. [68] report that following a Mediterranean diet during the first month of lactation resulted in higher levels of Ca and Zn in milk. Keikha et al. [69], in a systematic review of intervention studies, indicated that there are inconclusive studies on the effect of supplementation on Zn content. In addition, they reported that Fe supplementation did not affect its levels in the milk but increased lactoferrin levels in the milk. It is indicated that the type of food consumed and the supplementation used only affect the levels of iodine, selenium, and mercury in breast milk [4,30], which were not analyzed in this study.

It should also be emphasized that the present study only quantifies the mineral content of IFs and HM; however, its bioavailability was not investigated. As stated earlier during the discussion of results, the bioavailability of minerals from IFs is significantly lower than that from HM. Therefore, future studies would be required to consider the bioavailability of each mineral and investigate the extent to which they are absorbed by the infant's body.

5. Conclusions

The present study determined the content of selected macro- and microminerals in fourteen IFs available in Poland, including initial, follow-on, and specialist, and compared their content with breast milk. In addition, the marked values of minerals were related to the values declared by manufacturers on labels and to the European Commission's recommendations. The daily coverage of mineral requirements after consumption of IFs and HM was also calculated. Our findings indicate differences between selected minerals depending on the type of milk. Selected specialist IFs contained more Ca, Mg, Na, K, Zn, and Cu relative to conventional IFs. Breast milk contained significantly lower levels of each element relative to IFs; up to four times lower values were recorded for Ca, P, Fe, and Zn. Specialist IFs showed deviations in the amounts of Na, Zn, Cu, and K from the standards set by the European Commission, which in the case of Cu were up to 40% higher. The mineral content of the initial and specialist IFs (except S4) exceeded the daily requirement for all elements. To the highest degree, values exceeded the standard for Fe, reaching up to 24 times higher than the nutritional standards for the Polish population. This study also noted deviations for minerals from the marked and labeled values, especially for Mg, Fe, Cu, and Mn, where the values reached more than 20%. The composition of IF is strictly controlled and must comply with established guidelines. However, there is a need for periodic monitoring of mineral content in IFs and checking for compliance with established standards.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/app142210235/s1, Table S1: Estimated daily intake of infant formula and breast milk. Table S2: Estimated daily intake (EDI) values for selected minerals in individual infant formulas and human milk, mg/day. Table S3: Daily mineral requirements for infants defined by the nutrition standards for the Polish population, mg/day.

Author Contributions: Conceptualization, A.P.; methodology, A.P., R.P.-F., and E.T.; validation, E.T., formal analysis, A.P., W.M., and E.T.; investigation, A.P.; resources, A.P. and R.P.-F.; data curation, A.P.; writing—original draft preparation, A.P.; writing—review and editing, R.P.-F.; visualization, A.P.; supervision, R.P.-F.; funding acquisition, R.P.-F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Minister of Science under "the Regional Initiative of Excellence Program".

Institutional Review Board Statement: This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee at the Faculty of Medicine of the Collegium Medicum of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn (No. 19/2023). Approval date: 29 June 2023. Written informed consent was obtained from all study participants.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in article and Supplementary Materials.

Acknowledgments: The authors express great appreciation to the group of women who participated in the study and who provided a milk sample for testing, making this study possible.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Gavine, A.; Shinwell, S.C.; Buchanan, P.; Wade, A.; Lynn, F.; Marshall, J.; Cumming, S.E.; Dare, S.; McFadden, A. Support for healthy breastfeeding mothers with healthy term babies. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2022**, *2022*, CD001141. [CrossRef]
2. Moreno-Rojas, R.; Cañal-Ruiz, C.; Amaro-López, M.A.; Cámara-Martos, F. Probabilistic assessment of the intake of mineral and trace elements by consumption of infant formulas and processed cereal-based food in Spain. *CyTA J. Food* **2015**, *13*, 243–252. [CrossRef]
3. Almeida, C.C.; Baião, D.d.S.; Rodrigues, P.A.; Saint'Pierre, T.D.; Hauser-Davis, R.A.; Leandro, K.C.; Paschoalin, V.M.F.; Costa, M.P.d.; Conte-Junior, C.A. Macrominerals and trace minerals in commercial infant formulas marketed in Brazil: Compliance with established minimum and maximum requirements, label statements, and estimated daily intake. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 857698. [CrossRef] [PubMed]

4. Ren, Q.; Li, K.; Li, J.; Liu, Y.; Chen, Y.; Xu, Y.; Xie, Q. Longitudinal changes in human milk minerals and vitamins in the Chinese population: A scoping review. *Nutrients* **2024**, *16*, 1710. [CrossRef]
5. Kim, S.Y.; Yi, D.Y. Components of human breast milk: From macronutrient to microbiome and microRNA. *Clin. Exp. Pediatr.* **2020**, *63*, 301–309. [CrossRef]
6. Dror, D.K.; Allen, L.H. Overview of nutrients in human milk. *Adv. Nutr.* **2018**, *9*, 278S–294S. [CrossRef]
7. Dunford, E.; Popkin, B.M. Ultra-processed food for infants and toddlers; dynamics of supply and demand. *Bull. World Health Organ.* **2023**, *101*, 358–360. [CrossRef]
8. Jiang, Y.J.; Guo, M. Processing technology for infant formula. In *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*; Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; Guo, M., Ed.; Woodhead Publishing: Sawston, UK, 2014; pp. 211–229.
9. Fabiano, V.; Indrio, F.; Verduci, E.; Calcaterra, V.; Pop, T.L.; Mari, A.; Zuccotti, G.V.; Cokugras, F.C.; Pettoello-Mantovani, M.; Goulet, O. Term infant formulas influencing gut microbiota: An overview. *Nutrients* **2021**, *13*, 4200. [CrossRef]
10. Purkiewicz, A.; Pietrzak-Fiećko, R. Changes in the fatty acid profile of lactating women living in Poland-a comparison with the fatty acid profile of selected infant formulas. *Nutrients* **2024**, *16*, 2411. [CrossRef]
11. Goehring, K.C.; Marriage, B.J.; Oliver, J.S.; Wilder, J.A.; Barrett, E.G.; Buck, R.H. Similar to those who are breastfed, infants fed a formula containing 2′-fucosyllactose have lower inflammatory cytokines in a randomized controlled trial. *J. Nutr.* **2016**, *146*, 2559–2566. [CrossRef]
12. Holst, A.Q.; Myers, P.; Rodríguez-García, P.; Hermes, G.D.A.; Melsaether, C.; Baker, A.; Jensen, S.R.; Parschat, K. Infant formula supplemented with five human milk oligosaccharides shifts the fecal microbiome of formula-fed infants closer to that of breastfed infants. *Nutrients* **2023**, *15*, 3087. [CrossRef]
13. Lagkouvardos, I.; Intze, E.; Schaubeck, M.; Rooney, J.P.K.; Hecht, C.; Piloquet, H.; Clavel, T. Early life gut microbiota profiles linked to synbiotic formula effects: A randomized clinical trial in European infants. *Am. J. Clin. Nutr.* **2023**, *117*, 326–339. [CrossRef] [PubMed]
14. Nieto-Ruiz, A.; Diéguez, E.; Sepúlveda-Valbuena, N.; Herrmann, F.; Cerdó, T.; López-Torrecillas, F.; De-Castellar, R.; Jiménez, J.; Pérez-García, M.; Miranda, M.T.; et al. The effects of an Infant formula enriched with milk fat globule membrane, long-chain polyunsaturated fatty acids and synbiotics on child behavior up to 2.5 years old: The COGNIS Ssudy. *Nutrients* **2020**, *12*, 3825. [CrossRef] [PubMed]
15. Yuan, T.; Wei, W.; Wang, X.; Jin, Q. Biosynthesis of structured lipids enriched with medium and long-chain triacylglycerols for human milk fat substitute. *LWT* **2020**, *128*, 109255. [CrossRef]
16. Dipasquale, V.; Serra, G.; Corsello, G.; Romano, C. Standard and specialized infant formulas in Europe: Making, marketing, and health outcomes. *Nutr. Clin. Pract.* **2019**, *35*, 273–281. [CrossRef]
17. Maryniak, N.Z.; Sancho, A.I.; Hansen, E.B.; Bøgh, K.L. Alternatives to cow's milk-based infant formulas in the prevention and management of cow's milk allergy. *Foods* **2022**, *11*, 926. [CrossRef]
18. Borschel, M.W.; Baggs, G.E.; Oliver, J.S. Comparison of growth of healthy term infants fedextensively hydrolyzed protein- and amino acid-based infant formulas. *Nutrients* **2018**, *10*, 289. [CrossRef]
19. Vandenplas, Y.; Hegar, B. Benefit and Challenge of Soy plant-based formula in infants and children. *World Nutr. J.* **2020**, *4*, 1. [CrossRef]
20. Lönnerdal, B.; Georgieff, M.K.; Hernell, O. Developmental physiology of iron absorption, homeostasis and metabolism in the healthy term infant. *J. Pediatr.* **2016**, *167*, S8–S14. [CrossRef]
21. Kwiecień, M.; Winiarska-Mieczan, A.; Samolińska, W.; Kiczorowska, B.; Rusinek-Prystupa, E. The content of magnesium, calcium, sodium and potassium in infant formulas. *J. Elem.* **2017**, *22*, 339–347. [CrossRef]
22. Pacquette, L.H.; Thompson, J.J. Minerals and trace elements in milk, milk products, infant formula, and adult/pediatric nutritional formula, ICP-MS method: Collaborative study, AOAC final action 2015.06, ISO/DIS $_{21424}$, IDF $_{243}$. *J. AOAC Int.* **2018**, *101*, 536–561. [CrossRef] [PubMed]
23. Vanderhoof, J.; Moore, N.; De Boissieu, D. Evaluation of an Amino AcidBased Formula in Infants Not Responding to Extensively Hydrolyzed Protein Formula. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2016**, *63*, 531–533. [CrossRef] [PubMed]
24. Whiteside, P.; Miner, B. *Pye Unicam Atomic Absorption Data Book*; Pye Unicam Ltd.: Cambridge, UK, 1984.
25. Rozporządzenie Delegowane Komisji (UE) 2016/127. Available online: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32016R0127 (accessed on 28 September 2024).
26. Szajewska, H.; Socha, P.; Horvath, A.; Rybak, A.; Zalewski, B.M.; Nehring-Gugulska, M.; Mojska, H.; Czerwionka-Szaflarska, M.; Gajewska, D.; Helwich, E.; et al. Zasady żywienia zdrowych niemowląt. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci. *Stand. Med. Pediatr.* **2021**, *18*, 7–24. [CrossRef]
27. Wojtasik, A.; Woźniak, A.; Stoś, K.; Jarosz, M. Składniki mineralne. In *Normy żywienia dla populacji Polski i ich zastosowanie*; Jarosz, M., Rychlik, E., Stoś, K., Charzewska, J., Eds.; Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego—Państwowy Zakład Higieny: Warsaw, Poland, 2020; pp. 273–315.
28. Rychlik, E.; Woźniak, A.; Jarosz, M. Woda i elektrolity. In *Normy żywienia dla populacji Polski i ich zastosowanie*; Jarosz, M., Rychlik, E., Stoś, K., Charzewska, J., Eds.; Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego—Państwowy Zakład Higieny: Warsaw, Poland, 2020; pp. 316–345.
29. Lyons, K.E.; Ryan, C.A.; Dempsey, E.M.; Ross, R.P.; Stanton, C. Breast milk, a source of beneficial microbes and associated benefits for infant health. *Nutrients* **2020**, *12*, 1039. [CrossRef] [PubMed]

30. World Health Organization. Breastfeeding. Available online: https://www.who.int/health-topics/breastfeeding (accessed on 4 September 2024).
31. Hoang, T.N.G.; Do, T.T.D.; Nguyen, L.V.; Nguyen, T.T.N.; Thu, T.P.; Nguyen, T.M.D.; Trinh, T.D.L.; Tran, T.T.N.; Le, T.M.H.; Nguyen, T.T.V.; et al. Prevalence of exclusive breastfeeding for the first six months of an infant's life and associated factors in a low–middle income country. *Int. Breastfeed. J.* **2023**, *18*, 47. [CrossRef]
32. Bakshi, S.; Paswan, V.K.; Yadav, S.P.; Bhinchhar, B.K.; Kharkwal, S.; Rose, H.; Kanetkar, P.; Kumar, V.; Al-Zamani, Z.A.; Bunkar, D.S. A comprehensive review on infant formula: Nutritional and functional constituents, recent trends in processing and its impact on infants' gut microbiota. *Front. Nutr.* **2023**, *10*, 1194679. [CrossRef]
33. Moraes, M.R.; Da Silva, E.N.; Sanches, V.L.; Cadore, S.; Godoy, H.T. Bioaccessibility of some minerals in infant formulas. *J. Food Sci. Technol.* **2021**, *59*, 2004–2012. [CrossRef]
34. Alfaris, N.A.; Alothman, Z.A.; Aldayel, T.S.; Wabaidur, S.M.; Altamimi, J.Z. Evaluation and comparison of the nutritional and mineral content of milk formula in the Saudi Arabia market. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 851229. [CrossRef]
35. Hong, S.J. Types of special infant formulas marketed in Korea and their indications. *Pediatr. Gastroenterol. Hepatol. Nutr.* **2018**, *21*, 155–162. [CrossRef]
36. Oliveira Da Camara, A.; Gomes Rodrigues, L.; Da Silva Ferreira, T.; Gadas de Moraes, O.M. Sodium found in processed cow milk and estimated intake by infants. *J. Pediatr.* **2021**, *97*, 665–669. [CrossRef]
37. Chen, D.; Zong, J.; Huang, Z.; Liu, J.; Li, Q. Real-time analysis of potassium in infant formula powder by data-driven laser-induced breakdown spectroscopy. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 325. [CrossRef] [PubMed]
38. Emmerik, N.E.; De Jong, F.; Van Elburg, R.M. Dietary intake of sodium during infancy and the cardiovascular consequences later in life: A scoping review. *Ann. Nutr. Metab.* **2020**, *76*, 114–121. [CrossRef] [PubMed]
39. Verduci, E.; DiProfio, E.; Cerrato, L.; Nuzzi, G.; Riva, L.; Vizzari, G.; D'Auria, E.; Gianni, M.L.; Zuccotti, G.; Peroni, D. Use of soy-based formulas and cow's milk allergy: Lights and shadows. *Front. Pediatr.* **2020**, *8*, 591988. [CrossRef] [PubMed]
40. Vandenplas, Y.; Gutierrez Cavtrellon, P.; Rivas, R.; Jimenez Gutiérrez, C.; Diaz Garcia, L.; Estevez Jimenez, J.; Anzo, A.; Hegar, B.; Alarcon, P. Safety of soya-based infant formulas in children. *Br. J. Nutr.* **2014**, *111*, 1340–1360. [CrossRef] [PubMed]
41. Gomez Gomez, B.; Perez-Corona, T.; Madrid, Y. Availability of zinc from infant formula by in vitro methods (solubility and dialyzability) and size-exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 9405–9414. [CrossRef]
42. Ribes-Koninckx, C.; Amil-Dias, J.; Espin, B.; Molina, M.; Segarra, O.; Diaz-Martin, J.J. The use of amino acid formulas in pediatric patients with allergy to cow's milk proteins: Recommendations from a group of experts. *Front. Pediatr.* **2023**, *11*, 1110380. [CrossRef]
43. Zhao, A.; Ning, Y.; Zhang, Y.; Yang, X.; Wang, J.; Li, W.; Wang, P. Mineral compositions in breast milk of healthy Chinese lactating women in urban areas and its associated factors. *Chin. Med. J.* **2014**, *127*, 2643–2648. [CrossRef]
44. Sun, H.; Xie, Q.; Zhou, Y.; Liu, Y.; Pan, J.; Xu, Y.; Jiang, S.; Li, K. An investigation of association between human milk mineral patterns and infant growth. *Front. Nutr.* **2024**, *11*, 1387956. [CrossRef]
45. Mandiá, N.; Bermejo-Barrera, P.; Herbello, P.; López-Suárez, O.; Fraga, J.M.; Fernández-Pérez, C.; Couce, M.L. Human milk concentrations of minerals, essential and toxic trace elements and association with selective medical, social, demographic and environmental factors. *Nutrients* **2021**, *13*, 1885. [CrossRef]
46. Sánchez, C.; Fente, C.; Barreiro, R.; López-Racamonde, O.; Cepeda, A.; Regal, P. Association between breast milk mineral content and maternal adherence to healthy dietary patterns in Spain: A transversal study. *Foods* **2020**, *9*, 659. [CrossRef]
47. Bzikowska-Jura, A.; Sobieraj, P.; Michalska-Kacymirow, M.; Wesołowska, A. Investigation of iron and zinc concentrations in human milk in correlation to maternal factors: An observational pilot study in Poland. *Nutrients* **2021**, *13*, 303. [CrossRef] [PubMed]
48. Aumeistere, L.; Ciproviča, I.; Zavadska, D.; Bavrins, K.; Borisova, A. Zinc content in breast milk and its association with maternal diet. *Nutrients* **2018**, *10*, 1438. [CrossRef] [PubMed]
49. Molska, A.; Gutowska, I.; Baranowska-Bosiacka, I.; Nocen, I.; Chlubek, D. The content of elements in infant formulas and drinks against mineral requirements of children. *Biol. Trace Elem. Res.* **2014**, *158*, 422–427. [CrossRef] [PubMed]
50. Shkembi, B.; Huppertz, T. Influence of dairy products on bioavailability of zinc from other food products: A review of complementarity at a meal level. *Nutrients* **2021**, *13*, 4253. [CrossRef]
51. Yasuda, H.; Tsatsui, T. Infants and elderlies are susceptible to zinc deficiency. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21850. [CrossRef]
52. Roshdy El Safy, U.; Fathy, M.M.; Hassan, T.H.; Zakaria, M.; Kader Al Malky, M.A.; Arafa, M.; El Sayed, H.; Al Ghobashy, A.; Zaho, B.; Wahab, A.A.; et al. Effect of breastfeeding versus infant formula on iron status of infants with beta thalassemia major. *Int. Breastfeed. J.* **2016**, *12*, 18. [CrossRef]
53. Stoffel, N.U.; Cepeda-López, A.C.; Zeder, C.; Herter-Aeberli, I.; Zimmermann, M.B. Measurement of iron absorption and iron gains from birth to 6 months in breastfed and formula-fed infants using iron isotope dilution. *Sci. Adv.* **2024**, *10*, eado4262. [CrossRef]
54. Witczak, A.; Januszewska, A. The content of selected mineral nutrients in infant and follow-on formulae available at retail stores in Szczecin. *Rocz. PZH* **2011**, *62*, 257–262.
55. Jenkins, A.; Murthy, D.; Rangan, A. Monitoring the mineral content of plant foods in food composition databases. *Dietetics* **2024**, *3*, 235–248. [CrossRef]
56. Astolfi, M.L.; Marotta, D.; Cammalleri, V.; Marconi, E.; Antonucci, A.; Avino, P.; Canepari, S.; Vitali, M.; Protano, C. Determination of 40 elements in powdered infant formulas and related risk assessment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 5073. [CrossRef]

57. Da Silva, S.V.; Mattanna, P.; Bizzi, C.A.; Dos Santos Richards, N.S.P.; Barin, J.S. Evaluation of the mineral content of infant formulas consumed in Brazil. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 3498–3505. [CrossRef] [PubMed]
58. Rudnicka, A.; Hozyasz, K.K. Choice of water in healthy baby nutrition—Practical aspects. *Pediatr. Med. Rodz.* **2018**, *14*, 33–46. [CrossRef]
59. Antoniou, E.; Dagla, M.; Iliadou, M.; Palaska, E.; Orovou, E. Early introduction of solid foods in infant's nutrition and long-term effects on childhood: A systematic review. *Int. J. Innov. Res. Med. Sci.* **2022**, *7*, 777–785. [CrossRef]
60. Björmsjö, M.; Hernell, O.; Lönnerdal, B.; Berglund, S.K. Reducing iron content in infant formula from 8 to 2 mg/L does not increase the risk of iron deficiency at 4 or 6 months of age: A randomized controlled trial. *Nutrients* **2021**, *13*, 3. [CrossRef]
61. Pinana, C.J.; Pons, N.A.; Carretero, C.B.; Val, V.A. Nutritional composition of infant milk formulas. Level of compliance in their manufacture and adequacy of nutritional needs. *An. Pediatr.* **2015**, *83*, 417–429.
62. Lönnerdal, B. Excess iron intake as a factor in growth, infections, and development of infants and young children. *Am. J. Clin. Nutr.* **2017**, *106* (Suppl. 6), 1681S–1687S. [CrossRef]
63. Woźniak, A.; Stoś, K.; Ołtarzewski, M. Górne tolerowane poziomy spożycia witamin i składników mineralnych. In *Normy żywienia dla populacji Polski i ich zastosowanie*; Jarosz, M., Rychlik, E., Stoś, K., Charzewska, J., Eds.; Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego—Państwowy Zakład Higieny: Warsaw, Poland, 2020; pp. 346–376.
64. Overview on Tolerable Upper Intake Levels as Derived by the Scientific Committee on Food (SCF) and the EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Available online: https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/2024-05/ul-summary-report.pdf (accessed on 29 September 2024).
65. EFSA NDA Panel. Scientific opinion on the tolerable upper intake level for iron. *EFSA J.* **2024**, *22*, 8819. [CrossRef]
66. EFSA NDA Panel. Scientific opinion on the tolerable upper intake level for manganese. *EFSA J.* **2023**, *21*, 8413. [CrossRef]
67. Dumrongwongsiri, O.; Chongviriyaphan, N.; Chatvutinun, S.; Phoonlabdacha, P.; Sangcakul, A.; Siripinyanond, A.; Suthutvoravut, U. Dietary intake and milk micronutrient levels in lactating women with full and partial breastfeeding. *Matern. Child Health J.* **2021**, *25*, 991–997. [CrossRef]
68. Zielinska-Pukos, M.A.; Michalska-Kacymirow, M.; Kurek, E.; Bulska, E.; Grabowicz-Chądrzyńska, I.; Wesołowska, A.; Hamulka, J. Breastmilk mineral composition among well-educated mothers from Central Poland—Associations with maternal dietary intake, dietary patterns and infant psychomotor development. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2024**, *83*, 127393. [CrossRef]
69. Keikha, M.; Shayan-Moghadam, R.; Bahreynian, M.; Kelishadi, R. minerals in breast milk and the diet of breastfeeding women. *Int. Breastfeed. J.* **2021**, *16*, 1. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Table S1. Estimated daily intake of infant formula and breast milk.

Type of milk	Daily intake of IFs (g of powder) /HM (ml of milk)
C-A1	117.88
C-B1	117.88
C-C1	96.75
C-D1	103.2
C-A2	100.8
C-B2	100.8
C-C2	112.5
C-D2	75.25
S1	108
S2	104.81
S3	112.8
S4	78.75
S5	134.51
S6	126.75
HM1	1316.67
HM2	1330

Abbreviations: Ifs – infant formulas; HM – human milk; C-A1, C-A2, C-A3, C-A4 – first-feeding infants formulas; C-A2, C-B2, C-C2, C-D2 – follow-on infant formulas; S1, S2, S3, S4, S5, S6 – specialized infant formulas; HM1 - human milk consumed by infants aged 0-6 months; H2 - human milk consumed by infants 7-11 months.

Table S2. Estimated Daily Intake (EDI) values for selected minerals in individual infant formulas and human milk, mg/day.

Type of milk	Ca	Mg	Na	K	P	Fe	Zn	Cu	Mn
C-A1	471.11	33.90	154.07	663.47	317.67	6.20	4.69	0.46	0.04
C-B1	447.39	53.94	174.77	704.07	441.44	7.66	4.11	0.42	0.02
C-C1	315.97	33.68	106.65	550.43	212.81	2.84	3.81	0.36	0.04
C-D1	487.69	34.28	169.89	733.05	351.56	4.95	4.61	0.45	0.06
C-A2	457.55	38.10	130.10	547.61	342.72	6.57	3.24	0.30	0.03
C-B2	451.08	37.07	136.23	520.37	302.40	3.00	3.63	0.36	0.03
C-C2	583.67	40.62	152.34	733.80	376.88	4.69	4.04	0.42	0.03
C-D2	350.87	22.79	115.14	510.59	253.59	3.96	3.09	0.30	0.04
S1	796.23	6.70	228.07	755.35	345.06	5.52	7.21	0.44	0.21
S2	398.08	34.24	172.58	532.81	317.58	4.12	4.07	0.36	0.04
S3	637.60	53.91	188.73	668.71	432.02	5.99	5.02	0.46	0.16
S4	451.55	24.31	186.50	748.41	307.91	5.13	3.40	0.35	0.06
S5	631.60	50.84	210.37	629.03	431.77	7.26	6.05	0.86	0.04
S6	767.88	42.99	326.84	1024.23	493.06	5.02	4.89	0.43	0.11
HM1	353.66	41.94	243.65	738.85	181.57	3.56	3.29	0.46	0.03
HM2	357.24	42.36	246.12	746.33	183.41	3.59	3.33	0.47	0.03

Abbreviations: Na – sodium, K – potassium, Ca – calcium, Mg – magnesium, P – phosphorus, Fe – iron, Zn – zinc, Cu – copper, Mn – manganese; C-A1, C-A2, C-A3, C-A4 – first-feeding infants formulas; C-A2, C-B2, C-C2, C-D2 – follow-on infant formulas; S1, S2, S3, S4, S5, S6 – specialized infant formulas; HM1 - human milk consumed by infants aged 0-6 months; HM2 - human milk consumed by infants 7-11 months.

Table S3. Daily mineral requirements for infants defined by the nutrition standards for the Polish population, mg/day.

Age	Zn			Cu	Mn	Ca	P	Mg	Fe			Na	K
	EAR	RDA	AI	AI	AI	AI	AI	AI	EAR	RDA	AI	AI	AI
0-6 months	-	-	2	0.2	0.003	200	150	30	0.3	-	-	120	400
7-11 months	2.5	3	-	0.3	0.6	260	300	70	-	7	11	370	750

Abbreviations: Na – sodium, K – potassium, Ca – calcium, Mg – magnesium, P – phosphorus, Fe – iron, Zn – zinc, Cu – copper, Mn – manganese, EAR - estimated average requirement, RDA - recommended daily allowance, AI - adequate intake.

Załącznik nr 4 do Załącznika nr 1
do Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 03.03.2025 r.
(miejscowość, data)

mgr inż. Aleksandra Purkiewicz
(imię i nazwisko kandydata)
Technologia Żywności i Żywienia
(dyscyplina naukowa)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
autora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że w pracy pod tytułem Mineral Content in Initial and Follow-on Infant Formulas in Poland: Nutrient Adequacy and Comparison with Breast Milk (Purkiewicz Aleksandra, Mumtaz Wajeeha, Tońska Elżbieta, Pietrzak-Fiećko Renata, 2024, Mineral Content in Initial and Follow-on Infant Formulas in Poland: Nutrient Adequacy and Comparison with Breast Milk, Applied Sciences, 14, 10235; https://doi.org/10.3390/app142210235) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu celu i hipotezy badań, współudziale w przygotowaniu metodologii badań, przygotowaniu próbek do badań i uczestnictwie w części eksperymentalnej, zestawieniu, opracowaniu i interpretacji wyników pracy, samodzielnym przygotowaniu manuskryptu, weryfikacji i udzieleniu odpowiedzi na otrzymane recenzje w czasopiśmie.

Aleksandra Purkiewicz
(podpis kandydata)

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 2 do
Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 25.02.2025r
(miejscowość, data)

MSc. Wajeeha Mumtaz
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem Mineral Content in Initial and Follow-on Infant Formulas in Poland: Nutrient Adequacy and Comparison with Breast Milk (Purkiewicz Aleksandra, Mumtaz Wajeeha, Tońska Elżbieta, Pietrzak-Fiećko Renata, 2024, Mineral Content in Initial and Follow-on Infant Formulas in Poland: Nutrient Adequacy and Comparison with Breast Milk, Applied Sciences, 14, 10235; https://doi.org/10.3390/app142210235) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: uczestnictwie w części eksperymentalnej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Aleksandrę Purkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Aleksandry Purkiewicz polegający na: opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu celu i hipotezy badań, współudziale w przygotowaniu metodologii badań, przygotowaniu próbek do badań i uczestnictwie w części eksperymentalnej, zestawieniu, opracowaniu i interpretacji wyników pracy, samodzielnym przygotowaniu manuskryptu, weryfikacji i udzieleniu odpowiedzi na otrzymane recenzje w czasopiśmie.

.....
podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 2 do
Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 25.02.2025r
(miejscowość, data)

Dr inż. Elżbieta Tońska
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem Mineral Content in Initial and Follow-on Infant Formulas in Poland: Nutrient Adequacy and Comparison with Breast Milk (Purkiewicz Aleksandra, Mumtaz Wajeeha, Tońska Elżbieta, Pietrzak-Fiećko Renata, 2024, Mineral Content in Initial and Follow-on Infant Formulas in Poland: Nutrient Adequacy and Comparison with Breast Milk, Applied Sciences, 14, 10235; https://doi.org/10.3390/app142210235) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: współudziale w opracowaniu metodologii i jej walidacji i uczestnictwie w części eksperymentalnej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Aleksandrę Purkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Aleksandry Purkiewicz polegający na: opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu celu i hipotezy badań, współudziale w przygotowaniu metodologii badań, przygotowaniu próbek do badań i uczestnictwie w części eksperymentalnej, zestawieniu, opracowaniu i interpretacji wyników pracy, samodzielnym przygotowaniu manuskryptu, weryfikacji i udzieleniu odpowiedzi na otrzymane recenzje w czasopiśmie.

Elżbieta Tońska

podpis

Załącznik nr 5 do Załącznika nr 2 do
Uchwały Nr 362
Senatu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
z dnia 27 czerwca 2023 roku
wprowadzającej procedurę postępowania
w sprawie nadania stopnia doktora

Olsztyn, 25.02.202r
(miejscowość, data)

Dr hab. inż. Renata Pietrzak-Fiećko, prof. UWM
(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Technologia Żywności i Żywienia
Prof. dr hab. inż. Anna Iwaniak
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem Mineral Content in Initial and Follow-on Infant Formulas in Poland: Nutrient Adequacy and Comparison with Breast Milk (Purkiewicz Aleksandra, Mumtaz Wajeeha, Tońska Elżbieta, Pietrzak-Fiećko Renata, 2024, Mineral Content in Initial and Follow-on Infant Formulas in Poland: Nutrient Adequacy and Comparison with Breast Milk, Applied Sciences, 14, 10235; https://doi.org/10.3390/app142210235) mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: współudziale w opracowaniu metodologii, uczestnictwie w części eksperymentalnej, weryfikacji napisanego manuskryptu oraz organizacji środków finansowych do opublikowania artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Aleksandrę Purkiewicz jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydata mgr inż. Aleksandry Purkiewicz polegający na: opracowaniu koncepcji badań, opracowaniu celu i hipotezy badań, współudziale w przygotowaniu metodologii badań, przygotowaniu próbek do badań i uczestnictwie w części eksperymentalnej, zestawieniu, opracowaniu i interpretacji wyników pracy, samodzielnym przygotowaniu manuskryptu, weryfikacji i udzieleniu odpowiedzi na otrzymane recenzje w czasopiśmie.

Renata Pietrzak-Fiećko

podpis