



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ « ΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ »**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Προσδιορισμός των λιποδιαλυτών βιταμινών σε
βρεφικές και παιδικές τροφές με Υγρή
Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης**

**ΚΑΤΣΑ ΜΑΡΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2016



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ « ΧΗΜΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ »**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Προσδιορισμός των λιποδιαλυτών βιταμινών σε βρεφικές
και παιδικές τροφές με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής
Απόδοσης**

**ΚΑΤΣΑ ΜΑΡΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2016

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Προσδιορισμός των λιποδιαλυτών βιταμινών σε βρεφικές και παιδικές τροφές
με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης**

ΚΑΤΣΑ ΜΑΡΙΑ

A.M:51402

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Προεστός Χαράλαμπος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χ.Προεστός

Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

Π.Μαρκάκη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Ν.Θωμαΐδης

Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 11/10/2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία, ο σκοπός ήταν η ανάπτυξη μεθόδου για τον προσδιορισμό των λιποδιαλυτών βιταμινών για χρήση σε αναλύσεις ρουτίνας. Σκοπός της μεθόδου ήταν να είναι ακριβής, γρήγορη και μικρού κόστους. Έγινε εφαρμογή της σε πολύ συγκεκριμένη μήτρα, τις βρεφικές και παιδικές τροφές, που αποτελούν πολύ σημαντικό τρόφιμο για τις ευαίσθητες κατηγορίες καταναλωτών όπως τα βρέφη και τα παιδιά μικρής ηλικίας. Τα δείγματα που επιλέχθηκαν πωλούνται στην ελληνική αγορά από την εταιρία Γιώτης. Έγινε σύγκριση των αναλυτικών αποτελεσμάτων με αυτά που αναγράφονται στις ετικέτες των προϊόντων για τις βιταμίνες A, D, E και K. Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των βιταμινών πραγματοποιήθηκε με Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) και ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD). Πιο συγκεκριμένα, έγινε ανάπτυξη και βελτιστοποίηση του σταδίου σαπωνοποίησης, εκχύλισης και απομόνωσης των βιταμινών από το δείγμα όπου και μελετήθηκαν ενδεικτικά ο χρόνος σαπωνοποίησης, η χρήση αντιοξειδωτικών και ο αριθμός των εκχυλίσεων σε συνδυασμό με το χρόνο εκχύλισης. Η μέθοδος επικυρώθηκε ως προς την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των βιταμινών A και E. Αποδείχθηκε αξιόπιστη με αποτελέσματα εντός των επιτρεπόμενων ορίων και πλησίον των αναγραφόμενων τιμών στις ετικέτες των δειγμάτων. Παράλληλα παρουσιάζεται γρήγορη μέθοδος ανίχνευσης των βιταμινών όπου επιτυγχάνεται ο ποιοτικός προσδιορισμός τους παραλείποντας το στάδιο της σαπωνοποίησης (screening μέθοδος). Μελλοντικά οι μέθοδοι μπορούν να ερευνηθούν για τον προσδιορισμό όλων των λιποδιαλυτών βιταμινών σε άλλου είδους τρόφιμα όπως δημητριακά, κακάο, σοκολάτες.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Λιποδιαλυτές βιταμίνες

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: βιταμίνη A, βιταμίνη E, παιδικές τροφές, HPLC, σαπωνοποίηση

ABSTRACT

This study aimed at developing a method for the determination of fat-soluble vitamins to be used in routine analytical work. The purpose of the method was to be accurate, fast and inexpensive. It was applied in a very specific matrix and that was the infant formulas and baby foods which are very important for sensitive categories of consumers such as infants and young children. The samples selected were products sold commercially by the Yiotis company on the Greek market. A comparison was conducted between the analytical results of this method and those indicated on the labels of the products for vitamins A, D, E and K. The qualitative and quantitative determination of vitamins was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and diode array detector (DAD). More specifically, a development and optimization of the saponification step, extraction step and the isolation of the vitamins from the samples were realized and indicatively was studied the time saponification, the use of antioxidants and the number of extractions combined with the extraction time. The proposed method was validated as far as the detection and quantification of vitamins A and E are concerned. It was proved reliable with results into the permitted limits and close to the indications of sample's labels. At the same time is in this study a fast method for the qualitative determination of vitamins is presented omitting the step of saponification (screening method). In the future, these methods may be further researched towards the determination of all the fat-soluble vitamins on other foods such as cereals, cocoa, chocolate

SUBJECT AREA: Fat soluble vitamins

KEY WORDS: vitamin A, vitamin E, infant formulas, HPLC, saponification

Στην οικογένεια μου...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα ερευνητική μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε κατά τους μήνες Οκτώβριο 2015 έως Ιούνιο 2016 στο Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών σε συνεργασία με το Εργαστήριο Ενόργανης Ανάλυσης του Ποιοτικού Ελέγχου της εταιρίας ΓΙΩΤΗΣ.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω με ιδιαίτερη θερμότητα τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Προεστό Χαράλαμπο, Επίκουρο Καθηγητή του Ε.Κ.Π.Α για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη και την υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας ερευνητικής μεταπτυχιακής μελέτης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στο Δρ. Ευστράτιο Κωμαΐτη (ΓΙΩΤΗΣ) για την πολύτιμη γνώση που μου μετέδωσε, την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξή του, την προθυμία του να επιλύσει άμεσα τις όποιες απορίες είχα και τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε κατά την εκτέλεση τόσο του πειραματικού μέρους όσο και για τη συγγραφή της παρούσας ερευνητικής μεταπτυχιακής μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την εταιρία ΓΙΩΤΗΣ για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και την βοήθεια τους για την πραγματοποίηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήταν παράληψη να μην ευχαριστήσω τους γονείς μου για την ενθάρρυνση και την στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια μέχρι την ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ- ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	19
1.1 Τί είναι οι βιταμίνες;	19
1.1.1 Ο ρόλος των βιταμινών	19
1.2 Κατάταξη βιταμινών	20
1.2.1 Λιποδιαλυτές βιταμίνες.....	20
1.2.1.1 Βιταμίνη Α	21
1.2.1.2 Βιταμίνη D	23
1.2.1.3 Βιταμίνη Ε	26
1.2.1.4 Βιταμίνη Κ	29
1.2.2 Υδατοδιαλυτές βιταμίνες	31
1.2.2.1 Βιταμίνη C	31
1.2.2.2 Βιταμίνη B ₁ (θειαμίνη).....	34
1.2.2.3 Βιταμίνη B ₂ (Ριβοφλαβίνη)	36
1.2.2.4 Νιασίνη.....	38
1.2.2.5 Παντοθενικό οξύ	39
1.2.2.6 Βιταμίνη B ₆ (πυριδοξίνη)	41
1.2.2.7 Βιοτίνη (Βιταμίνη B ₇)	43
1.2.2.8 Φολικό οξύ (Βιταμίνη B ₉).....	44
1.2.2.9 Βιταμίνη B ₁₂ (Κυανοκοβαλαμίνη).....	47
1.3 Προσδιορισμός των λιποδιαλυτών βιταμινών	49
1.3.1 Είδη εκχύλισης	50
1.3.1.1 Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη	50
1.3.1.2 Εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (SFE)	53
1.3.1.3 Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE).....	54
1.3.2 Χρωματογραφικές τεχνικές.....	54

1.3.2.1 Υγροχρωματογραφία (LC)	54
1.3.2.2 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).....	59
1.3.2.3 Αεριοχρωματογραφία (GC)	60
1.4 Προσδιορισμός των λιποδιαλυτών βιταμινών σε παιδικές τροφές με HPLC	61
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	63
2.1 Εισαγωγή.....	63
2.2 Δείγματα που μελετήθηκαν	63
2.3 Γρήγορος προσδιορισμός των βιταμινών Α και Ε σε βρεφικές τροφές μέσω RP-HPLC	64
2.3.1 Αρχή μεθόδου	64
2.3.2 Πειραματική πορεία.....	65
2.3.3 Συσκευές και όργανα.....	66
2.3.4 Αντιδραστήρια και πρότυπες ουσίες	67
2.3.5 Χρωματογραφικές συνθήκες	67
2.3.6 Βελτιστοποίηση της μεθόδου	68
2.3.6.1 Μάζα δείγματος.....	68
2.3.6.2 Επίδραση αριθμού εκχυλίσεων	68
2.4 Προσδιορισμός των βιταμινών Α και Ε σε βρεφικές τροφές μέσω HPLC-UV	68
2.4.1 Αρχή μεθόδου	68
2.4.2 Πειραματική πορεία.....	69
2.4.3 Συσκευές και όργανα.....	71
2.4.4 Αντιδραστήρια και πρότυπες ουσίες	71
2.4.5 Χρωματογραφικές συνθήκες	72
2.4.6 Βελτιστοποίηση της μεθόδου	72
2.4.6.1 Μάζα δείγματος.....	72

2.4.6.2 Όγκος προστιθέμενου θερμού νερού για ομογενοποίηση IF.....	73
2.4.6.3 Όγκος ομογενοποιημένου δείγματος 10% w/v	74
2.4.6.4 Επίδραση προσθήκης ασκορβικού οξέος	74
2.4.6.5 Χρόνος σαπωνοποίησης	75
2.4.6.6 Επίδραση του αριθμού εκχυλίσεων και χρόνου μαγνητικής ανάδευσης	76
2.4.6.7 Χρήση αντιοξειδωτικών-Διερεύνηση ρόλου BHT	77
2.4.6.8 Επίδραση της ποσότητας πετρελαϊκού αιθέρα στην εκχύλιση	78
2.3.6.9 Συγκέντρωση BHT	79
2.4.6.10 Όγκος διαλύτη ανασύστασης	79
2.4.6.11 Επιλογή κατάλληλων σκευών	79
2.4.7 Βέλτιστη πειραματική πορεία	81
2.4.8 Προσθήκη πρότυπης ένωσης σε δείγμα	83
2.5 Μέθοδος με χρήση α-αμυλάσης	83
2.5.1 Πειραματική πορεία.....	83
2.5.2 Προσθήκη πρότυπης ένωσης στο δείγμα	85
2.6 Μέθοδος σάρωσης (screening method)	85
2.6.1 Πειραματική πορεία.....	86
2.6.2 Προσθήκη πρότυπης ένωσης σε δείγμα	86
2.7 Επικύρωση μεθόδου με πρότυπο υλικό αναφοράς SRM 1849a	87
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	89
3.1 Γρήγορος προσδιορισμός των βιταμινών Α και Ε σε βρεφικές τροφές μέσω RP-HPLC	89
3.1.1 Αποτελέσματα βελτιστοποίησης μεθόδου	89
3.1.1.1 Μάζα δείγματος.....	89
3.1.1.2 Επίδραση αριθμού εκχυλίσεων	89

3.2	Προσδιορισμός των βιταμινών Α και Ε σε βρεφικές τροφές μέσω HPLC-UV.....	91
3.2.1	Πρότυπα βιταμινών	91
3.2.2	Αποτελέσματα βελτιστοποίησης μεθόδου	93
3.2.2.1	Μάζα δείγματος.....	93
3.2.2.2	Όγκος προστιθέμενου θερμού νερού για ομογενοποίηση IF.....	94
3.2.2.3	Όγκος ομογενοποιημένου δείγματος 10% w/v	95
3.2.2.4	Επίδραση προσθήκης ασκορβικού οξέος	96
3.2.2.5	Χρόνος σαπωνοποίησης	98
3.2.2.6	Επίδραση του αριθμού εκχυλίσεων και του χρόνου μαγνητικής ανάδευσης	100
3.2.2.7	Χρήση αντιοξειδωτικών-Διερεύνηση ρόλου BHT	102
3.2.2.8	Επίδραση της ποσότητας πετρελαϊκού αιθέρα στην εκχύλιση	104
3.2.2.9	Συγκέντρωση BHT	106
3.2.2.10	Επίδραση του όγκου διαλύτη ανασύστασης	107
3.2.2.11	Επιλογή κατάλληλων σκευών	108
3.2.3	Προσθήκη πρότυπης ένωσης σε δείγμα	110
3.3	Μέθοδος με χρήση α-αμυλάσης (ενζυμική υδρόλυση).....	116
3.3.1	Αποτελέσματα μεθόδου με χρήση α-αμυλάσης.....	116
3.3.2	Προσθήκη πρότυπης ένωσης σε δείγμα με α-αμυλάση	118
3.4	Μέθοδος σάρωσης(screening method)	122
3.4.1	Αποτελέσματα μεθόδου	122
3.4.2	Προσθήκη πρότυπης ένωσης σε δείγμα απουσία α-αμυλάσης.....	124
3.4.3	Προσθήκη πρότυπης ένωσης σε δείγμα παρουσία α-αμυλάσης.....	127
3.5	Αποτελέσματα πρότυπου υλικού αναφοράς SRM 1849a	130
3.6	Συμπεράσματα	132

3.6.1	Γρήγορος προσδιορισμός των βιταμινών Α και Ε σε βρεφικές τροφές μέσω RP-HPLC	132
3.6.2	Προσδιορισμός των βιταμινών Α και Ε σε βρεφικές τροφές μέσω HPLC-UV	132
4.	ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑ.....	134
5.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	135
6.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	137
7.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	138
8.	ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	140

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Διάγραμμα πειραματικής πορείας προσδιορισμού λιποδιαλυτών βιταμινών σε IF	66
Σχήμα 2: Αντίδραση σαπωνοποίησης του οξικού εστέρα της ρετινόλης.....	69
Σχήμα 3: Αντίδραση σαπωνοποίησης του οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης....	69
Σχήμα 4: Διάγραμμα πειραματικής πορείας προσδιορισμού λιποδιαλυτών βιταμινών σε IF με σαπωνοποίηση χωρίς χρήση α-αμυλάσης.	70
Σχήμα 5: Μάζα δείγματος.	73
Σχήμα 6: Όγκος ομογενοποιημένου δείγματος.	74
Σχήμα 7: Χρόνος σαπωνοποίησης..	76
Σχήμα 8: Αριθμός εκχυλίσεων σε συσχέτιση με τον χρόνο εκχύλισης.	77
Σχήμα 9: Χρήση αντιοξειδωτικών.	78
Σχήμα 10: Όγκος πετρελαϊκού αιθέρα.	78
Σχήμα 11: Συγκέντρωση δ/τος BHT.....	79
Σχήμα 12:Επιλεχθείσα βελτιστοποιημένη πειραματική πορεία προσδιορισμού λιποδιαλυτών βιταμινών σε IF με σαπωνοποίηση χωρίς χρήση α-αμυλάσης.....	82
Σχήμα 13: Πειραματική πορεία προσδιορισμού λιποδιαλυτών βιταμινών σε IF με σαπωνοποίηση και με χρήση α-αμυλάσης.	84
Σχήμα 14: Πειραματική πορεία προσδιορισμού λιποδιαλυτών βιταμινών σε IF χωρίς σαπωνοποίηση.....	86

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Δομή ρετινόλης	21
Εικόνα 2: Δομή β-καροτενίου.....	22
Εικόνα 3: Δομές βιταμινών D ₂ (α) και D ₃ (β)	24
Εικόνα 4: Δομές της βιταμίνης Ε.....	27
Εικόνα 5: Δομές της βιταμίνης Κ.....	29
Εικόνα 6: Δομή L-ασκορβικού οξέος.....	32
Εικόνα 7: Δομή θειαμίνης.....	34
Εικόνα 8: Δομή ριβοφλαβίνης	37
Εικόνα 9: Δομές νικοτινικού οξέος και νικοτινιανιδίου	38
Εικόνα 10: Δομή παντοθενικού οξέος.....	40
Εικόνα 11: Δομές πυριδοξίνης.....	41
Εικόνα 12: Δομή βιοτίνης.....	43
Εικόνα 13: Δομή φολικού οξέος.....	44
Εικόνα 14: Δομή κυανοκοβαλαμίνης.....	47
Εικόνα 15: Αναλυθέντα δείγματα	64
Εικόνα 16: Οξειδωση ασκορβικού οξέος.....	75
Εικόνα 17: Χρωματογράφημα δείγματος με μία εκχύλιση.....	90
Εικόνα 18: Χρωματογράφημα δείγματος με τρεις εκχυλίσεις	90
Εικόνα 19: Πρότυπο διάλυμα ρετινόλης, οξικού εστέρα της ρετινόλης και παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης 100 ppm στα 325 nm	91
Εικόνα 20: Πρότυπο διάλυμα της α-τοκοφερόλης και οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης 100ppm στα 292 nm	92
Εικόνα 21: Πρότυπο διάλυμα της χολεκαλσιφερόλης και της εργοκαλσιφερόλης 2000ppm στα 264 nm	92
Εικόνα 22: Πρότυπο διάλυμα της φυλλοκινόνης 100ppm στα 244 nm	92
Εικόνα 23: Χρωματογράφημα με την χρήση αιθανολικού διαλύματος -0,2% w/v ασκορβικό οξύ ημέρας.....	97
Εικόνα 24: Χρωματογράφημα με την χρήση παλιού αιθανολικού διαλύματος -0,2% w/v ασκορβικό οξύ	97
Εικόνα 25: Χρωματογράφημα δείγματος που υπέστη μερική σαπωνοποίηση	98
Εικόνα 26: Χρωματογράφημα δείγματος που υπέστη πλήρη σαπωνοποίηση	98
Εικόνα 27: Εκχύλιση δείγματος με 1600μl πετρελαϊκού αιθέρα	104
Εικόνα 28: Πρότυπο διάλυμα ρετινόλης και οξικού εστέρα της ρετινόλης 100 ppm...	111
Εικόνα 29: Χρωματογράφημα προσθήκης ρετινόλης και οξικού εστέρα της ρετινόλης ίδιας συγκεντρώσεως(5ppm).....	112
Εικόνα 30: Χρωματογράφημα δείγματος χωρίς σαπωνοποίηση	123

Εικόνα 31: Χρωματογράφημα δείγματος χωρίς SRM 1849a	131
---	-----

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Περιεχόμενες βιταμίνες στο SRM 1849a.....	87
Πίνακας 2: Χρόνος έκλουσης βιταμινών	91
Πίνακας 3: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης της μάζας για την βιταμίνη Α	93
Πίνακας 4: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης της μάζας για την βιταμίνη Ε... ..	94
Πίνακας 5: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης όγκου προστιθέμενου νερού για την βιταμίνη Α	94
Πίνακας 6: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης όγκου προστι-θέμενου νερού για την βιταμίνη Ε	95
Πίνακας 7: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης όγκου δείγματος για την βιταμίνη Α	96
Πίνακας 8: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης όγκου δείγματος για την βιταμίνη Ε	96
Πίνακας 9: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης ασκορβικού οξέος για την βιταμίνη Α	97
Πίνακας 10: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης ασκορβικού οξέος για την βιταμίνη Ε	98
Πίνακας 11: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης χρόνου σαπωνο-ποίησης για την βιταμίνη Α	99
Πίνακας 12: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης χρόνου σαπωνο-ποίησης για την βιταμίνη Ε	100
Πίνακας 13: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης αριθμού και χρόνου εκχύλισης για την βιταμίνη Α	101
Πίνακας 14: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης αριθμού και χρόνου εκχύλισης για την βιταμίνη Ε	102
Πίνακας 15: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης BHT για την βιταμίνη Α ..	103
Πίνακας 16: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης BHT για την βιταμίνη Ε ..	103
Πίνακας 17: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης όγκου πετρελαϊκού αιθέρα για την βιταμίνη Α	105
Πίνακας 18: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης όγκου πετρελαϊκού αιθέρα για την βιταμίνη Ε	105
Πίνακας 19: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης συγκέντρωσης BHT για την βιταμίνη Α	106
Πίνακας 20: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης συγκέντρωσης BHT για την βιταμίνη Ε	106
Πίνακας 21: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης όγκου διαλύτη ανασύστασης για την βιταμίνη Α	107

Πίνακας 22: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης όγκου διαλύτη ανασύστασης για την βιταμίνη Ε	107
Πίνακας 23: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης υάλινων σκευών για την βιταμίνη Α	109
Πίνακας 24: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης υάλινων σκευών για την βιταμίνη Ε	109
Πίνακας 25: Προσθήκη ρετινόλης	110
Πίνακας 26: Συγκριτικός πίνακας σήματος για πρότυπο διάλυμα βιταμίνης Α.....	111
Πίνακας 27: Συγκριτικός πίνακας σήματος προσθήκης για την βιταμίνη Α.....	112
Πίνακας 28: Συγκεντρωτικός πίνακας Προσθήκη οξικού εστέρα της ρετινόλης	113
Πίνακας 29: Προσθήκη παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης	113
Πίνακας 30: Προσθήκη α-τοκοφερόλης	115
Πίνακας 31: Προσθήκη οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης	116
Πίνακας 32: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης α-αμυλάσης για την βιταμίνη Α	117
Πίνακας 33: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης α-αμυλάσης για την βιταμίνη Ε	118
Πίνακας 34: Προσθήκη ρετινόλης παρουσία α-αμυλάσης	118
Πίνακας 35: Προσθήκη οξικού εστέρα της ρετινόλης παρουσία α-αμυλάσης	119
Πίνακας 36: Προσθήκη παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης παρουσία α-αμυλάσης	120
Πίνακας 37: Προσθήκη α-τοκοφερόλης παρουσία α-αμυλάσης.....	121
Πίνακας 38: Προσθήκη οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης παρουσία α-αμυλάσης.....	122
Πίνακας 39: Χρόνος έκλουσης βιταμινών με και χωρίς σαπωνοποίηση	123
Πίνακας 40: Αποτελέσματα Screening μεθόδου	124
Πίνακας 41: Προσθήκη ρετινόλης(screening μέθοδος)	124
Πίνακας 42: Προσθήκη οξικού εστέρα της ρετινόλης(screening μέθοδος).....	125
Πίνακας 43: Προσθήκη α-τοκοφερόλης (screening μέθοδος)	126
Πίνακας 44: Προσθήκη οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης(screening μέθοδος)	127
Πίνακας 45: Προσθήκη ρετινόλης παρουσία α-αμυλάσης(screening μέθοδος)	128
Πίνακας 46: Προσθήκη α-τοκοφερόλης παρουσία α-αμυλάσης(screening μέθοδος)...128	
Πίνακας 47: Προσθήκη οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης παρουσία α-αμυλάσης (screening μέθοδος)	129
Πίνακας 48: Αποτελέσματα SRM 1849α για την βιταμίνη Α.....	131
Πίνακας 49: Αποτελέσματα SRM 1849α για την βιταμίνη Ε.....	131

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μια αλματώδης εξέλιξη στην ανάπτυξη των μεθόδων παραγωγής & επεξεργασίας των τροφίμων και στην πιστοποίηση των κανόνων ασφαλείας. Η Ε.Ε. έχει θεσμοθετήσει κανόνες για την διασφάλιση της ασφάλειας σε παρασκευάσματα για βρέφη (infant formulae), παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας (follow-on formulae) και παιδικές τροφές για βρέφη και παιδιά μικρής ηλικίας (baby foods for infants and young children).

Τα παρασκευάσματα για βρέφη αποτελούν την κύρια πηγή τροφοδοσίας τους μετά το γάλα και κατά συνέπεια πρέπει να είναι σε θέση να παρέχουν όλα τα απαραίτητα δομικά στοιχεία για την οικοδόμηση και ανάπτυξη του σώματος, την αντικατάσταση των συνεχών απωλειών και την απαιτούμενη ενέργεια. Σημαντικό διατροφικό στοιχείο αποτελούν οι βιταμίνες, πρόσθετες θρεπτικές ουσίες απαραίτητες στη βρεφική διατροφή. Είναι αναγκαίες σε σχετικά μικρές ποσότητες για τη διατήρηση της ζωής και την καλή υγεία και παρατεταμένη έλλειψη τους μπορεί να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα υγείας.

Η βιταμίνη Α και Ε είναι δύο από πιο σημαντικές λιποδιαλυτές βιταμίνες, οι οποίες πρέπει να παρέχονται με τη διατροφή, επειδή δεν μπορούν να συντεθούν μέσα στο σώμα. Η βιταμίνη Α είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική όραση, την ανάπτυξη, την κυτταρική διαφοροποίηση και την εύρυθμη λειτουργία του δέρματος και των βλεννογόνων. Η βιταμίνη Ε χρησιμεύει ως ένα ισχυρό βιολογικό αντιοξειδωτικό που προστατεύει τα πολύ-ακόρεστα λιπαρά οξέα από τις ελεύθερες ρίζες. Οι πιο συχνές μορφές της βιταμίνης Α και Ε που προστίθενται στα βρεφικά παρασκευάσματα είναι η οξική ή παλμιτική ρετινόλη και η οξική α-τοκοφερόλη σε ποσότητες που να καλύπτουν τις ανάγκες των βρεφών και των παιδιών μικρής ηλικίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ- ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

1.1 Τί είναι οι βιταμίνες;

Η λέξη «βιταμίνη» προέρχεται από τη λατινική λέξη «vita», η οποία σημαίνει ζωή και τη λέξη «αμίνη» η οποία είναι μία ένωση του αζώτου. Στην πραγματικότητα η λέξη «βιταμίνη» εισήχθη από τον πολωνό βιοχημικό Casimir Funk το 1912, ο οποίος απομόνωσε μια ενεργή χημικά ένωση που αντιδρούσε αμίνη. Αργότερα, διαπιστώθηκε ότι οι περισσότερες βιταμίνες δεν είναι αμίνες αλλά η λέξη «βιταμίνη» διατηρήθηκε.¹

Οι βιταμίνες είναι οργανικές ουσίες που βρίσκονται φυσικά στις τροφές και διαφέρουν ως προς τις ιδιότητες μεταξύ τους. Το μόνο κοινό χαρακτηριστικό τους είναι ότι είναι αναγκαίες σε σχετικά μικρές ποσότητες για τη διατήρηση της ζωής και την καλή υγεία.² Δεν μπορούν να παραχθούν από τον ίδιο τον οργανισμό αλλά είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη, τη συντήρηση και τον μεταβολισμό. Όταν δεν προσλαμβάνονται σε επαρκείς ποσότητες, διαταράσσουν τον μεταβολισμό με αποτέλεσμα την εμφάνιση διαφόρων συμπτωμάτων, ασθενειών και μερικές φορές μπορούν να προκαλέσουν μέχρι και το θάνατο.³

1.1.1 Ο ρόλος των βιταμινών

Οι βιταμίνες αποτελούν ύψιστης σημασίας συστατικά των τροφίμων και παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην διατροφή του ανθρώπου. Είναι πολύ ευαίσθητες, ασταθείς και ευαλλοίωτες ενώσεις υπό ορισμένες συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης, με αποτέλεσμα πολλές φορές οι τιμές τους μειώνονται σημαντικά. Γι' αυτό το λόγο απαιτείται ειδική μεταχείριση για την διατήρησή τους στο τελικό προϊόν και προστίθενται οι συνθετικές βιταμίνες για να αντισταθμίσουν τις τυχόν απώλειες.⁴ Οι βιταμίνες δεν είναι πηγή θερμίδων και δεν συνεισφέρουν ουσιαστικά στη μάζα του σώματος, ρυθμίζουν όμως χημικές αντιδράσεις κατά τις οποίες τα βασικά διατροφικά στοιχεία (λίπη, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες) μετατρέπονται σε ενέργεια και ζωικούς ιστούς. Έτσι, οι κυριότερες λειτουργίες των βιταμινών εντός του οργανισμού είναι ως:

- Συνένζυμα
- Βιολογικά αντιοξειδωτικά

- Συμπαράγοντες μείωσης οξειδωτικών αντιδράσεων του μεταβολισμού
- Ορμόνες⁵

Λειτουργούν ως ένζυμα καταλύοντας βιοχημικές αντιδράσεις για την κανονική λειτουργία των κυττάρων και των ιστών. Έλλειψη τους από τον οργανισμό οδηγεί σε υποβιταμίνωση, μια κατάσταση κατά την οποία τα επίπεδα των βιταμινών είναι ανεπαρκή για τον μεταβολισμό. Μπορεί να είναι αποτέλεσμα μακροχρόνιου υποσιτισμού και συνδέεται με συνθήκες κακουχίας, καθυστέρηση της ανάπτυξης στα παιδιά .Η αβιταμίνωση είναι ακόμη πιο σοβαρή κατάσταση έλλειψης βιταμινών. Σήμερα στις δυτικές κοινωνίες σπάνια συμβαίνει, ακόμη και η υποβιταμίνωση με κλινικά συμπτώματα έλλειψης.¹

1.2 Κατάταξη βιταμινών

Σήμερα έχουν βρεθεί 13 βιταμίνες: A, C, D, E, K και οκτώ βιταμίνες του συμπλέγματος B. Οι βιταμίνες αυτές χωρίζονται σε δυο κύριες κατηγορίες με βάση τη διαλυτότητά τους σε λίπος ή νερό.

Στην πρώτη κατηγορία κατατάσσονται οι λιποδιαλυτές βιταμίνες A, D, E και K. Εκχυλίζονται από τα τρόφιμα μαζί με το λίπος από το οποίο θα διαχωριστούν πριν από κάθε ανάλυση.

Στην δεύτερη κατηγορία κατατάσσονται οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες ,η βιταμίνη C και οι βιταμίνες του συμπλέγματος B(B₁,B₂,B₆,B₁₂, νιασίνη, βιοτίνη, παντοθενικό οξύ, φυλλικό οξύ).⁶

1.2.1 Λιποδιαλυτές βιταμίνες

Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες παρουσιάζουν τα εξής χαρακτηριστικά:

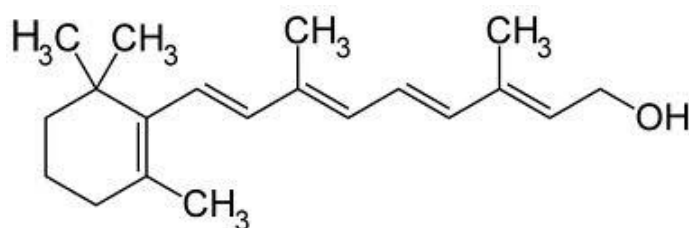
- Κατά την πέψη απορροφώνται μαζί με το λίπος.
- Δεν απεκκρίνονται με τα ούρα.
- Αποθηκεύονται στο σώμα και έτσι δεν είναι απαραίτητη η καθημερινή πρόσληψη τους, οπότε και η έλλειψη τους είναι δύσκολη.

Η απορρόφηση τους στο έντερο εξαρτάται από την απορρόφηση λιπιδίων, απαιτώντας την παρουσία της χολής και το σχηματισμό μικκυλίων. Ορισμένη ποσότητα του λίπους στη διατροφή είναι απαραίτητη για επαρκή απορρόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών.^{1,2}

Ο προσδιορισμός τους είναι δύσκολος λόγω της πολυπλοκότητας των μητρών των τροφίμων και της αυξημένης ευαισθησίας τους στη θερμοκρασία, το φως, το οξυγόνο και το ακραίο pH.⁷ Για την αποφυγή οξειδωτικής υποβάθμισης τους, πρέπει να προστίθενται στην αρχή των αναλυτικών διαδικασιών αντιοξειδωτικά.⁸ Κατά την εκχύλιση χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες συνήθως σε μεγάλες ποσότητες, οι οποίοι είναι επικίνδυνοι για την υγεία και για το περιβάλλον.⁹

1.2.1.1 Βιταμίνη Α

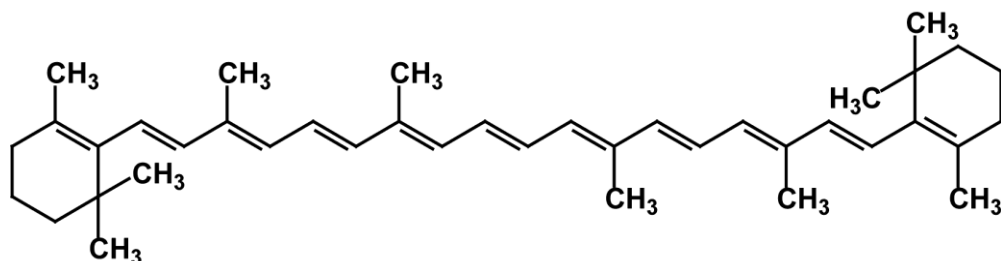
Η βιταμίνη Α είναι αλκοόλη που απαντάται στη φύση κυρίως στη μορφή των εστέρων λιπαρών οξέων κυρίως με παλμιτικό και στεατικό οξύ. Έχει τρεις κύριες μορφές: ρετινόλη, ρετινάλη και το ρετινοϊκό οξύ. Η βασική χημική μορφή στα τρόφιμα είναι η ρετινόλη και βρίσκεται μόνο σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Ο συντακτικός τύπος του Σχήματος 1 τον ακόρεστο χαρακτήρα της βιταμίνης Α. Η all-trans βιταμίνη Α είναι η πιο ενεργή βιολογικώς μορφή. Το 13-cis ισομερές είναι γνωστό ως νεοβιταμίνη Α. Η συνθετική βιταμίνη Α διατίθεται στο εμπόριο ως άλας του παλμιτικού και του οξικού οξέος με μορφή διαλυμάτων ελαίου ως σταθεροποιημένες σκόνες ή υδατικά γαλακτώματα.¹⁰



Εικόνα 1: Δομή ρετινόλης

Ορισμένα καροτενοειδή, και κυρίως το β-καροτένιο βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα λαχανικά και κυρίως στα πράσινα, κίτρινα και φυλλώδη λαχανικά (καρότα, σπανάκι, πιπεριές, πάπρικα, τομάτες), στα φρούτα, και σε ορισμένα έλαια και μπορούν να μετατραπούν στο σώμα σε κάποιο βαθμό σε ρετινόλη. Το β-καροτένιο καλείται και προβιταμίνη Α και έχει υψηλή δραστηριότητα βιταμίνης Α. Μόνο ένα μικρό μέρος του λαμβανόμενου β-καροτένιο (πιθανώς λιγότερο από ένα έκτο) μπορεί να μετατραπεί σε ρετινόλη και για το λόγο αυτό η

βιταμίνη Α εκφράζεται σαν ισοδύναμο ρετινόλης (1 RE=1 μg ρετινόλης, 6 μg β-καροτένιο και 12 μg άλλων καροτενοειδών).¹¹ Ο οργανισμός το χρησιμοποιεί και ως αντιοξειδωτικό.^{1,12} Άλλες προβιταμίνες είναι το α- και το γ-καροτένιο και η κρυπτοξανθίνη.



Εικόνα 2 :Δομή β-καροτενίου

Το β-καροτένιο και άλλα μικροθρεπτικά στοιχεία συμμετέχουν στην εξουδετέρωση οξειδωτικών αντιδράσεων λαμβάνοντας μέρος σε διάφορα στάδια της καρκινογένεσης. Αυξημένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών πλούσιων σε καροτενοειδή μπορεί να μειώσει τους ουροποιητικούς δείκτες των οξειδωμένων λιπιδίων και του DNA σε υγιείς ανθρώπους.¹³ Επιπλέον, το β-καροτένιο και τα άλλα καροτενοειδή είναι εξαιρετικοί *in vitro* καταστολείς του ελεύθερου οξυγόνου και μπορούν να το δεσμεύσουν προστατεύοντας έτσι τα λιπίδια από την υπεροξειδωση αποδεικνύοντας τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του.¹⁴

Η βιταμίνη Α παίζει ρόλο στον οπτικό κύκλο. Η 11-*cis* ρετινάλη έχει αντιστρεπτή σχέση με την ρετινόλη για την λειτουργία του οπτικού κύκλου. Ο αμφιβληστροειδής χιτώνας περιέχει δυο κύτταρα φωτοδέκτες. Τα κώνια που είναι υπεύθυνα για την χρωματική όραση περιέχουν χρωστικές (κυανοψίνη, ερυθροψίνη) που είναι σύμπλοκα ρετιναλδεΐδης με κάποια οψίνη σε και τα ραβδία που είναι υπεύθυνα για την όραση σε χαμηλό φωτισμό τα οποία περιέχουν ροδοψίνη, σύμπλοκο οψίνης με 11-*cis* ρετινάλη. Με την επίδραση φωτονίου στον αμφιβληστροειδή χιτώνα η ροδοψίνη ισομερίζεται σε *trans*-ρετινάλη και οψίνη. Η *trans*-ρετινάλη ισομερίζεται μερικώς σε 11-*cis* ρετινάλη, επανασυνδέεται με οψίνη για το σχηματισμό της ροδοψίνης. Χρειάζεται σταθερή προμήθεια από την διατροφή ώστε να αναγεννηθεί πλήρως η ροδοψίνη.

Είναι αναγκαία για τη διατήρηση υγιούς δέρματος και άλλων επιφανειακών ιστών καθώς και για την επαρκή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Συμβάλλει στην σύνθεση γλυκοπρωτεϊνών για τη ρύθμιση της φυσιολογικής ανάπτυξης του επιθηλίου και την έκκριση βλέννας.⁸

Η βιταμίνη Α αποθηκεύεται στο ήπαρ σε σημαντικές ποσότητες. Τροφές πλούσιες σε βιταμίνη Α είναι το συκώτι, τα νεφρά, τα ιχθυέλαια , ο κρόκος αυγού και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Το β-καροτένιο βρίσκεται κυρίως στα καρότα και στα σκούρα φυλλώδη λαχανικά. Επεξεργασμένα τρόφιμα όπως η μαργαρίνη μπορεί να είναι ενισχυμένα με τη βιταμίνη Α.^{1,8,9}

Για θεραπευτικούς σκοπούς χρησιμοποιούνται τα συνθετικά ρετινοειδή δεδομένου ότι η βιταμίνη Α είναι πολύ τοξική από μόνη της. Τα συνθετικά ρετινοειδή είναι παράγωγα του ρετινοϊκού οξέος και παρουσιάζουν πολύ χαμηλότερη τοξικότητα. Χρησιμοποιούνται για την θεραπεία της ακμής ευρέως ,για την θεραπεία της ψωρίασης και άλλων ανωμαλιών.⁸

Έλλειψη της βιταμίνης μπορεί να έχει ως συνέπεια τη νυκταλωπία και άλλες σοβαρές βλάβες στο μάτι (π.χ. ξηροφθαλμία) μέχρι και πλήρη τύφλωση. Μπορεί να οδηγήσει σε αναιμία εξαιτίας της αδυναμίας του σιδήρου να μετακινηθεί στο ήπαρ καθώς η βιταμίνη Α είναι αναγκαία για την σύνθεση της τρανσφερίνης ,πρωτεΐνης-μεταφορέα του σιδήρου. Τέλος, η έλλειψη της έχει σαν αποτέλεσμα μεγαλύτερη ευαισθησία σε μολύνσεις και καρκίνο.^{1,8,9} Δεδομένου ότι η βιταμίνη Α αποθηκεύεται στο ήπαρ, μπορεί να χρειαστούν έως και 2 χρόνια για να εμφανιστούν τα σημάδια της ανεπάρκειας. Έλλειψη της βιταμίνης Α είναι σπάνια. Εμφανίζεται πιο συχνά στις αναπτυσσόμενες χώρες και συνήθως οφείλεται στον υποσιτισμό.¹⁵

Υπερβολική πρόσληψη βιταμίνης Α προκαλεί περισσότερα προβλήματα από ότι η έλλειψη της. Είναι δύσκολο να επιτευχθεί μόνο από την κατανάλωση τροφίμων αλλά είναι εφικτό με την χρήση πολυβιταμινούχων συμπληρωμάτων που περιέχουν υψηλές δόσεις βιταμίνης Α. Στις εγκυμονούσες γυναίκες μπορεί να έχει τερατογόνες επιδράσεις στους απογόνους. Η τοξικότητα της προκαλεί μη φυσιολογική ανάπτυξη των οστών, φολιδωτή ξηροδερμία και προβλήματα στα δόντια, πονοκέφαλο, ναυτία και απώλεια της όρεξης. Σημάδια σοβαρής υπερβιταμίνωσης κατά τη διάρκεια μιας σύντομης χρονικής περιόδου προκαλούν ζάλη, θολή όραση και επιβραδύνουν την ανάπτυξη. Παρόλα αυτά δεν υπάρχουν σημάδια τοξικότητας από υψηλά επίπεδα πρόσληψης καροτενοειδών.^{1,8,11}

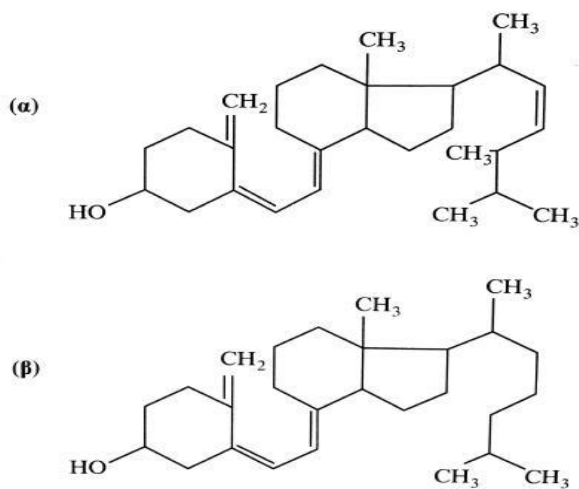
1.2.1.2 Βιταμίνη D

Η βιταμίνη εμφανίζεται σε διάφορες μορφές. Οι πιο σημαντικές είναι η βιταμίνη D₂ (εργοκαλσιφερόλη) η βιταμίνη D₃ (χοληκαλσιφερόλη). Οι πρόδρομες ενώσεις των

βιταμινών D₃ και D₂ αντίστοιχα είναι δύο στερόλες, η 7-δευδροχοληστερόλη και η εργοστερόλη. Οι βιταμίνες αυτές απαιτούν περαιτέρω μεταβολισμό για να μετατραπούν τελικά στην ενεργή τους μορφή, την καλσιτριόλη με ακτινοβολία με υπεριώδες φως.³

Η βιταμίνη D₃ (χοληκαλσιφερόλη) μπορεί να συντεθεί στο δέρμα από την 7-δευδροκαλσιφερόλη κατά την έκθεση του στο υπεριώδες φως UV (280 ± 310 nm) . Δέκα έως δεκαπέντε λεπτά έκθεσης στον ήλιο χωρίς αντηλιακό στα χέρια, και το πρόσωπο, δύο φορές την εβδομάδα είναι αρκετά για να λάβει ικανοποιητική βιταμίνη D ο οργανισμός. Η βιταμίνη D₃ είναι παρούσα μόνο σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Πλούσιες πηγές είναι τα ηπατέλαια των ψαριών και σε μικρότερο βαθμό την βρίσκουμε στον κρόκο του αυγού, το συκώτι, το βούτυρο και το γάλα. Σε πολλές χώρες οι μαργαρίνες είναι ενισχυμένες με βιταμίνη D.^{2,12}

Η βιταμίνη D₂ (εργοκαλσιφερόλη) μπορεί να ληφθεί με υπεριώδη ακτινοβολία της εργοστερόλης σε ζυμομύκητες καθώς δεν υπάρχει έτοιμη στην φύση. Πλούσιες πηγές προβιταμίνης D₂ αποτελούν οι ζύμες, ,το λάχανο, τα μανιτάρια, το σπανάκι και το έλαιο σιταριού.^{2,13}



Εικόνα 3 :Δομές βιταμινών D₂ (α) και D₃ (β)

Στους ανθρώπους οι βιταμίνες D₂ και D₃ έχουν παρόμοια βιολογική δραστηριότητα, ενώ οι προβιταμίνες τους δεν έχουν καμία βιολογική δράση εκτός εάν ακτινοβοληθούν και μετατραπούν σε βιταμίνες.² Στο σώμα, η βιταμίνη D υφίσταται δυο υδροξυλιώσεις: υδροξυλιώνεται στο ήπαρ σε 25-υδροξύχοληκαλσιφερόλη και στη συνέχεια στα νεφρά σε 1,25-υδροξύχοληκαλσιφερόλη, γνωστή και ως καλσιτριόλη. Αυτός ο μεταβολίτης είναι η

βιολογικά δραστική μορφή της βιταμίνης D και είναι στην πραγματικότητα μια ορμόνη. Παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του ασβεστίου και στο ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς συμβάλει στην κυτταρική διαφοροποίηση.¹ Η βιταμίνη D παίζει ρόλο και στην εναπόθεση αλάτων στα οστά και τα δόντια διατηρώντας τις κατάλληλες συγκεντρώσεις ασβεστίου και ιόντων φωσφόρου στο αίμα, τα οποία εξασφαλίζουν την κανονική ανοργανοποίηση των οστών και των δοντιών.¹⁴

Η διατήρηση της ομοιοστασίας του ασβεστίου επιτυγχάνεται μέσω της 1α,25- (OH) D μαζί με της παραθυρορμόνης (PTH), που ρυθμίζουν τα επίπεδα των ιόντων ασβεστίου και φωσφόρου στο πλάσμα του αίματος. Όταν τα επίπεδα ασβεστίου του ορού μειώνονται, εκκρίνεται η παραθυρορμόνη από τον παραθυρεοειδή αδένα και ενεργοποιεί το νεφρικό ένζυμο 25-OH-D-1-α-υδροξυλάση προκειμένου να παραχθούν μεγαλύτερα ποσά της 1α,25-(OH)₂ D. Η αύξηση της 1α,25- (OH)₂ D λόγω της αύξησης της παραθυρορμόνης προκαλεί την ταχύτερη μεταφορά ασβεστίου στο έντερο, στα οστά και στα νεφρά. Ο μηχανισμός αυτός είναι υπεύθυνος για την επαναφορά του ασβεστίου του αίματος εντός φυσιολογικών ορίων, και κατά συνέπεια την αναστολή της έκκρισης της παραθυρορμόνης. Έτσι, η ανεπάρκεια της βιταμίνης D έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της ομοιόστασης του ασβεστίου και αυξημένες τιμές της παραθυρορμόνης. Οι διατροφολόγοι θα πρέπει να δίνουν ιδιαίτερη σημασία στις τιμές των 25 -(OH) D και παραθυρορμόνης προκειμένου να γνωρίζουν κατά πόσο η βιταμίνη D είναι επαρκής στον οργανισμό. Αυτό ισχύει λόγω του ότι η 25-(OH)D αποτελεί πρόδρομο της 1α,25- (OH)₂ D.¹⁵

Κίνδυνο εμφάνισης έλλειψης βιταμίνης D εμφανίζουν τα άτομα με:

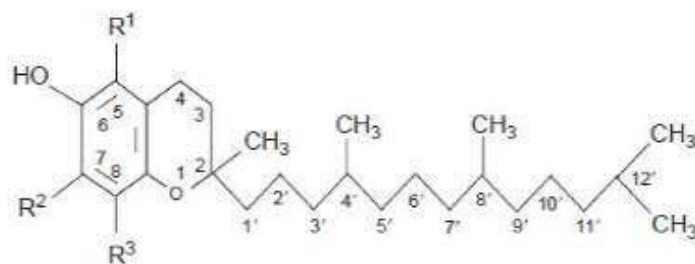
- a. μη επαρκή πρόσληψη ή απορρόφηση από τον γαστρεντερικό σωλήνα,
- b. ελαττωμένη έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία,
- c. νεφρική ή ηπατική δυσλειτουργία και παχυσαρκία: εμφανίζουν μειωμένη ικανότητα να απορροφούν ή και να χρησιμοποιούν την βιταμίνη D από αποθήκες λίπους.
- d. σκουρόχρωμο δέρμα: συνθέτουν λιγότερη βιταμίνη D κατά την έκθεση στο φως του ήλιου σε σχέση με τα άτομα με ελαφρά χρώση του δέρματος.
- e. προχωρημένης ηλικία: έχουν μειωμένη ικανότητα να συνθέτουν βιταμίνη D κατά την έκθεση τους στο φως του ήλιου, και είναι επίσης πιο πιθανό να παραμένουν σε εσωτερικούς χώρους και να φοράνε αντηλιακό το οποίο σύνθεση μπλοκ της βιταμίνης D και
- f. θηλάζοντα βρέφη: Οι απαιτήσεις σε βιταμίνη D δεν μπορούν να καλυφτούν αποκλειστικά από το μητρικό γάλα καθώς παρέχει μόνο περίπου 25 IU/L.^{12,16}

Έλλειψη βιταμίνης D οδηγεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου στο αίμα και διαταραχές των οστών, που εκδηλώνονται ως ραχίτιδα(αδυναμία οστέωσης των οστών) στα παιδιά και οστεομαλάκυνση(απασβέστωση των οστών), και οστεοπόρωση (απώλεια της οστικής μάζας) στους ενήλικες. Η ανεπάρκεια σε βιταμίνης D έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο συνηθισμένων καρκίνων, αυτοάνοσων νοσημάτων, υπέρτασης, και μολυσματικών ασθενειών. Υψηλές απαιτήσεις σε βιταμίνη D υπάρχουν κατά τη διάρκεια των περιόδων ανάπτυξης των οστών και κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και γαλουχίας. Επίσης, οι ηλικιωμένοι άνθρωποι μπορεί να χρειάζονται υψηλότερη πρόσληψη επίπεδα βιταμίνης D.

Υπερβολική πρόσληψη της βιταμίνης D μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα .Οι υψηλές δόσεις συμπληρωμάτων βιταμίνης D σε συνδυασμό με μεγάλες ποσότητες εμπλουτισμένων τροφίμων μπορεί να προκαλέσουν συσσώρευση της βιταμίνης στο ήπαρ με εμφανή συμπτώματα δηλητηρίασης. Σημάδια τοξικότητας από βιταμίνη D περιλαμβάνουν περίσσεια ασβεστίου στο αίμα, επιβράδυνση σωματικής ανάπτυξης, μειωμένη όρεξη, ναυτία και έμετο.^{1,12}

1.2.1.3 Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E αναγνωρίστηκε χημικά τη δεκαετία του 1930 και ονομάστηκε τοκοφερόλη από το ελληνική λέξη τόκος (γέννηση) και το «φέρειν» (φέρω). ¹⁷Δεν είναι ένα ενιαίο μόριο αλλά ένα σύμπλεγμα 8 διαφορετικών ενώσεων που διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες: τις τοκοφερόλες και τις τοκοτριενόλες. Έτσι ,υπάρχουν οι α-,β-, γ-, δ- τοκοφερόλες και οι α-, β-, γ-, δ- τοκοτριενόλες όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα.¹⁸Από τις τοκοφερόλες η πιο δραστική είναι η α-τοκοφερόλη.



	R ¹	R ²	R ³
α-τοκοφερόλη	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β-τοκοφερόλη	CH ₃	H	CH ₃
γ-τοκοφερόλη	H	CH ₃	CH ₃
δ-τοκοφερόλη	H	H	CH ₃

Εικόνα 4 :Δομές της βιταμίνης E

Η κυρίαρχη λειτουργία της βιταμίνης E είναι ως φυσικό αντιοξειδωτικό προστατεύοντας τις κυτταρικές μεμβράνες από την οξείδωση. Η βιταμίνη E δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες εμποδίζοντας την οξείδωση ακόρεστων λιπαρών οξέων, καροτενοειδών και του ασκορβικού οξέος. Η βιταμίνη C συμπληρώνει τη δράση της βιταμίνης E και δρώντας συνεργιστικά. Άλλα θρεπτικά συστατικά με αντιοξειδωτικές λειτουργίες είναι το σελήνιο και διάφορα καροτενοειδή.¹

Η βιταμίνη E μπορεί επίσης να εμποδίσει τον σχηματισμό καρκινογόνων νιτροζαμινών που σχηματίζονται στο στομάχι από τα νιτρώδη των τροφίμων και συμβάλλει στην προστασία κατά του καρκίνου ενισχύοντας την ανοσολογική λειτουργία του οργανισμού.¹⁹ Μία άλλη σημαντική ιδιότητα της βιταμίνης E είναι ότι δεν συμβάλλει μόνο στην σταθεροποίηση των μεμβρανικών δομών, αλλά σταθεροποιεί και άλλους ενεργούς παράγοντες (π.χ. βιταμίνη A, ένζυμα, ορμόνες) ενάντια στην οξείδωση.⁹

Η απορρόφηση της βιταμίνης E λαμβάνει χώρα στο λεπτό έντερο μέσω παθητικής απορρόφησης και έτσι δεν απαιτούνται πρωτεϊνικοί φορείς. Ο βαθμός απορρόφησης εξαρτάται από την ποσότητα του λίπους που απορροφάται. Το ποσοστό της απορρόφησης της α-τοκοφερόλης μειώνεται όσο αυξάνεται η πρόσληψη βιταμίνης E. Συνήθως απορροφάται 50%- 70% της βιταμίνης E που καταναλώνεται από τα τρόφιμα ενώ η απορρόφηση από φαρμακευτικά σκευάσματα φτάνει το 10%.²⁰

Ο συνδυασμός της υψηλής πρόσληψης PUFA και τα χαμηλά επίπεδα της βιταμίνης E συνέβαλε στην ανάπτυξη αιμολυτικής αναιμίας, θρομβοκυττάρωσης, οιδήματος και

ερυθροκυττάρωσης. Δεδομένης αυτής της αλληλεξάρτηση μεταξύ της βιταμίνης E και των φωσφολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών, διαπιστώνεται ότι η απαίτηση για α-τοκοφερόλη είναι ανάλογη με την ποσότητα PUFA που καταναλώνεται καθώς οι τοκοφερόλες (a, b, c και d) είναι φυσικά αντιοξειδωτικά τα οποία αναστέλλουν ειδικά την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρά οξέα (PUFA) όπως το λινελαϊκό (LA, C18: 2, n-6), λινολενικό (ALA, C18: 3, n- 3), αραχιδονικό (AA, C20: 4, n- 6), το εικοσιπεντανοϊκό (EPA, C20: 5, n- 3) και εικοσαεξανοϊκό οξέα (DHA, C22: 6, n-3).^{20,21}

Η βιταμίνη E σχετίζεται επιπλέον με την θεωρία για την αιτιολογία της αθηροσκλήρωσης και της καρδιαγγειακής νόσου όπου η οξείδωση των σωματιδίων LDL διαδραματίζει βασικό ρόλο. Τα σωματίδια LDL δεν είναι πλούσια μόνο σε χοληστερόλη, αλλά και σε περίπου 1300 μόρια της RH, τα οποία είναι πολύ ευαίσθητα στην οξείδωση. Έχει βρεθεί ότι η βιταμίνη E αποτελεί το πιο ισχυρό αντιοξειδωτικό έναντι της οξείδωσης των σωματιδίων LDL: κάθε σωματίδιο LDL προστατεύεται από α-τοκοφερόλη.¹⁸

Σημαντικές διαιτητικές πηγές της βιταμίνης E είναι τα φυτικά έλαια και ξηροί καρποί, μαργαρίνη, πράσινα φυλλώδη λαχανικά, φύτρο σιταριού, ολικής άλεσης δημητριακά, προϊόντα δημητριακών και ο κρόκος του αυγού. Σε περίπτωση υψηλής πρόσληψης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων αυξάνονται οι απαιτήσεις σε βιταμίνες E.³

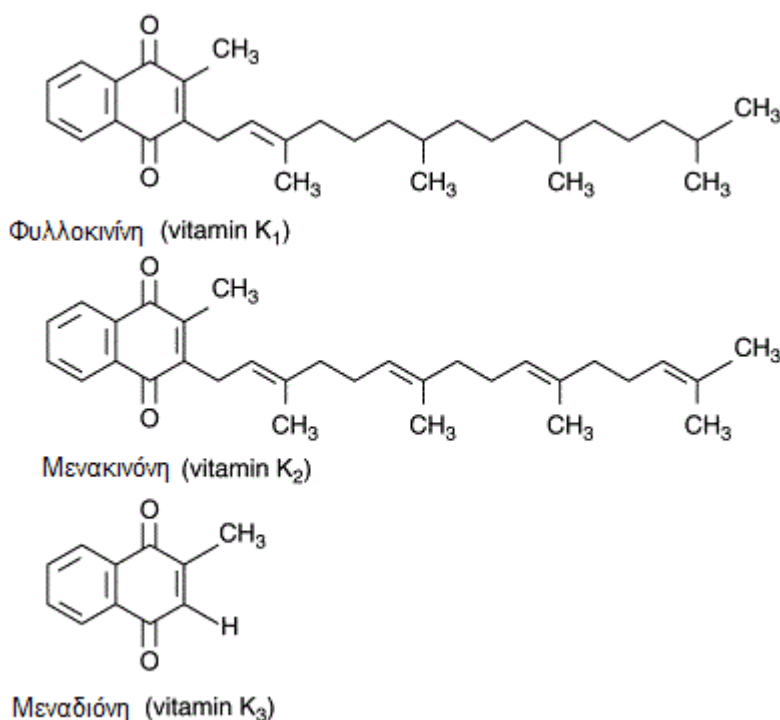
Η Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη (ΣΗΠ) για τη βιταμίνη E βασίζεται στην α-τοκοφερόλη, όπου 1 mg α-τοκοφερόλης ισούται με 1.5 διεθνείς μονάδες (IU). Η κατανάλωση βιταμίνης E σε μεγαλύτερες από τις αναδεδειγμένες ποσότητες δεν οδηγεί σε οποιαδήποτε πρόσθετα οφέλη.¹²

Η ανεπάρκεια βιταμίνης E είναι σπάνια. Η πιο κοινή αιτία της έλλειψης βιταμίνης E είναι η μη σωστή απορρόφηση που οφείλεται σε διαταραχές της γαστρεντερικής οδού ή του ήπατος και σχετίζεται με την πέψη ή απορρόφηση των λιπιδίων. Επιπλέον εμφανίζεται ανεπάρκεια βιταμίνης E σε πρόωρα βρέφη διότι ο πλακούντας δεν μεταβιβάζει την α-τοκοφερόλη στο έμβρυο σε επαρκείς ποσότητες. Αυτή η ευαισθησία έχει σαν αποτελέσματα την ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων και την εμφάνιση αιμολυτικής αναιμίας, η οποία είναι αναστρέψιμη με χορήγηση βιταμίνης E ως θεραπεία. Διαιτητική έλλειψη βιταμίνης E σπάνια συμβαίνει σε μεγαλύτερα βρέφη, παιδιά ή ενήλικες στις ανεπτυγμένες και στις περισσότερες αναπτυσσόμενες χώρες, λόγω της ευρείας διάδοσης της βιταμίνης στα τρόφιμα.¹⁸

Η βιταμίνη Ε που λαμβάνονται από τα τρόφιμα συνήθως δεν συνιστά κίνδυνο τοξικότητας. Υπερβολικές δόσεις βιταμίνης ίσως προκαλέσουν κεφαλαλγίες, κόπωση και διάρροια.²²

1.2.1.4 Βιταμίνη Κ

Η βιταμίνη Κ εμφανίζεται με μια σειρά διαφορετικών μορφών (K₁, K₂, K₃). Όλες ανήκουν στις ναφθοκινόνες που διαφέρουν στις πλευρικές τους αλυσίδες.²



Εικόνα 5 :Δομές της βιταμίνης Κ

Η βιταμίνη K₁ ονομάζεται φυλλοκινόνη. Είναι η κύρια διαιτητική πηγή της βιταμίνης και την βρίσκουμε κυρίως στα πράσινα φυλλώδη λαχανικά.

Η βιταμίνη K₂ ονομάζεται μενακινόνη. Μεγάλα ποσά της σχηματίζονται στο παχύ έντερο από τα βακτήρια που βρίσκονται εκεί. Την βρίσκουμε σε μέτριες ποσότητες σε διάφορα ζωικά τρόφιμα που βασίζονται υποστεί ζύμωση.²³

Η βιταμίνη K₃ ονομάζεται μεναδιόνη (2-μεθυλο-1,4-ναφθοκινόνη). Είναι ένα συνθετικό προϊόν και έχει περίπου διπλάσια δραστηριότητα από την φυσικά απαντώμενη K.³

Πλούσιες πηγές βιταμίνης Κ αποτελούν το σπανάκι, το κουνουπίδι, το λάχανο και το μπρόκολο, τα μπιζέλια, τα δημητριακά και ορισμένα έλαια, συμπεριλαμβανομένου του σογιέλαιου, βαμβακέλαιου και ελαιόλαδου. Οι ζωικές τροφές περιέχουν περιορισμένες ποσότητες βιταμίνης Κ.¹²

Η βιταμίνη Κ είναι σταθερή κατά την θέρμανση αλλά οξειδώνεται εύκολα με παρουσία φωτός και αλκανίων.³ Λειτουργεί ως συνένζυμο για βιταμίνη - καρβοξυλάση, ένα ένζυμο που απαιτείται για τη σύνθεση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πήξη του αίματος και στο μεταβολισμό των οστών, καθώς και άλλων ποικίλων φυσιολογικών λειτουργιών.^{12,23}

Η προθρομβίνη (παράγοντας πήξης II) είναι γλυκοπρωτεΐνη που εξαρτάται από την βιταμίνη Κ στο πλάσμα και εμπλέκεται άμεσα στην πήξη του αίματος. Ορισμένα αντιπηκτικά που χρησιμοποιούνται κυρίως στην Ευρώπη ανταγωνίζονται την δραστικότητα της βιταμίνης Κ, και με τη σειρά τους, της προθρομβίνης.²⁴ Για το λόγο αυτό, τα άτομα που λαμβάνουν τα αντιπηκτικά πρέπει να προσλαμβάνουν σταθερή ποσότητα βιταμίνης Κ. Η οστεοκαλσίνη είναι μια άλλη πρωτεΐνη εξαρτώμενη από βιταμίνη Κ που είναι παρούσα στα οστά και μπορεί να εμπλέκεται στην ανοργανοποίηση των οστών.²⁵

Όπως και οι άλλες λιποδιαλυτές βιταμίνες, η βιταμίνη Κ ενσωματώνεται στα μικκύλια αναμειγνύεται μέσω της χολής και των παγκρεατικών ενζύμων. Απορροφάται από εντερικά κύτταρα του λεπτού εντέρου. Από εκεί, η βιταμίνη Κ έχει ενσωματώνεται στα χυλομικρά και μεταφέρεται στο ήπαρ.²⁶ Η βιταμίνη Κ είναι παρούσα στο ήπαρ και σε άλλους ιστούς του σώματος, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου, της καρδιάς, του παγκρέατος και των οστών.^{27,28}

Η έλλειψη βιταμίνης Κ σχετίζεται με την μειωμένη δραστικότητα της προθρομβίνης στο αίμα.^{28,29} Έτσι, η αιμορραγία είναι κλασικό σύμπτωμα της ανεπάρκειας της βιταμίνης Κ, αν και συμβαίνει μόνο σε σοβαρές περιπτώσεις. Επειδή η βιταμίνη Κ απαιτείται για την καρβοξυλίωση της οστεοκαλσίνης στα οστά, έλλειψη της βιταμίνης Κ ενδέχεται επίσης να μειώσει την ανοργανοποίηση των οστών και να συμβάλλει στην οστεοπόρωση.³⁰ Σημαντική έλλειψη βιταμίνης Κ σε ενήλικες είναι πολύ σπάνια και συνήθως περιορίζεται σε άτομα με διαταραχές κακής απορρόφησης ή που λαμβάνουν φάρμακα που παρεμβαίνουν στον μεταβολισμό της βιταμίνης Κ. Σε υγιείς ανθρώπους που καταναλώνουν ποικιλία τροφίμων είναι σχεδόν αδύνατο.^{28,29}

Η έλλειψη βιταμίνης Κ σε νεογέννητα βρέφη εγκυμονεί τον κίνδυνο της αιμορραγικής νόσου του και γι' αυτό το τα νεογέννητα πρέπει να λαμβάνουν συμπληρωματική βιταμίνη

Κ. Τα νεογέννητα και τα βρέφη λαμβάνουν φυλλοκινόνη(βιταμίνη Κ₁) μέσω του μητρικού γάλακτος αλλά σε περιορισμένη ποσότητα καθώς είναι φτωχό σε βιταμίνη Κ. Η χρήση των μενακινόνης(βιταμίνη Κ₂) είναι αδύνατη επειδή τα εντερικά βακτήρια σε βρέφη που θηλάζουν δεν μπορούν να την συνθέσουν. Επομένως, τα βρέφη πρέπει να την λαμβάνουν συμπληρωματικά από την διατροφή από τον 5^ο μήνα και μετά όπου το μητρικό γάλα δεν επαρκεί για να καλύψει τις ανάγκες του βρέφους.³¹

Αν και δεν υπάρχει ανώτερο ανεκτό επίπεδο πρόσληψης ,οι υπερβολικές ποσότητες μπορεί να προκαλέσουν τη διάσπαση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και ηπατική βλάβη. Άτομα που λαμβάνουν αντιπηκτικά φάρμακα θα πρέπει να μετριάσουν την πρόσληψη τροφών με βιταμίνη Κ, επειδή η περίσσεια της βιταμίνης Κ μπορεί να αλλάξει φορές την πήξη του αίματος.¹²

1.2.2 Υδατοδιαλυτές βιταμίνες

Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες παρουσιάζουν τα εξής χαρακτηριστικά:

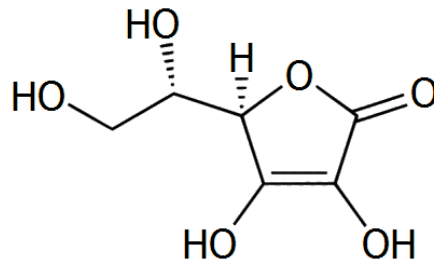
- Απορροφούνται εύκολα.
- Οποιαδήποτε περίσσεια τους απεκκρίνεται με τα ούρα.
- Δεν αποθηκεύονται στο σώμα και έτσι είναι απαραίτητη η καθημερινή πρόσληψη τους καθώς η έλλειψη τους δεν είναι δύσκολη.²

Ο προσδιορισμός τους είναι πιο εύκολος από ότι των λιποδιαλυτών βιταμινών αλλά παρουσιάζουν κι αυτές ευαισθησία στη θερμοκρασία, το φως, το οξυγόνο και το ακραίο pH.

2

1.2.2.1 Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C, επίσης γνωστή και ως το L-ασκορβικό οξύ, είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη που την βρίσκουμε φυσικά σε ορισμένα τρόφιμα ή προστίθεται σε άλλα. Είναι διαθέσιμη και ως διαιτητικό συμπλήρωμα.³² Οι άνθρωποι και οι πίθηκοι σε αντίθεση με τα περισσότερα ζώα (θηλαστικά), δεν είναι σε θέση να την συνθέσουν στους ιστούς τους.¹



Εικόνα 6:Δομή L-ασκορβικού οξέος

Η βιταμίνη C είναι απαραίτητη για τη βιοσύνθεση ορισμένων νευροδιαβιβαστών και του κολλαγόνου, ένα βασικό συστατικό του συνδετικού ιστού, το οποίο παίζει έναν ζωτικό ρόλο στην επούλωση των πληγών. Συμμετέχει επίσης και στο μεταβολισμό των πρωτεϊνών, στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και βελτιώνει την απορρόφηση του σιδήρου.^{32,33}

Επιπλέον, αποτελεί ένα σημαντικό φυσικό αντιοξειδωτικό και ο ρόλος του είναι διπλός:

- a. συμβάλλει άμεσα στην συλλογή υποπροϊόντων, ειδικά δραστικών στοιχείων οξυγόνου (ROS) και υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων
- b. διευκολύνει την αναγέννηση των α-τοκοφερολών (βιταμίνη E).³⁴

Η πρόσληψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων με βιταμίνη C και E μπορεί να ενισχύσει τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό και να μειώσει την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Αυτό συμβαίνει επειδή τα αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις που μάχονται ενάντια στην δράση των ελευθέρων ριζών και της αλυσιδωτής οξειδωτικής βλάβης που προκαλούν.³⁵ Έρευνες εξετάζουν εάν η βιταμίνη C, περιορίζει τις βλαβερές συνέπειες των ελευθέρων ριζών και κατά πόσο μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη ή στην καθυστέρηση της ανάπτυξης ορισμένων μορφών καρκίνου, των καρδιαγγειακών παθήσεων, και άλλων ασθενειών.³⁶ Ωστόσο, αναφέρονται ορισμένες περιπτώσεις που τα αντιοξειδωτικά συμπληρώματα ασκορβικού οξέος και α-τοκοφερόλης είτε προσλαμβάνονται ξεχωριστά είτε σε συνδυασμό δεν δρουν ενάντια στις ελεύθερες ρίζες αλλά αντιθέτως εμφανίζουν μια προοξειδωτική δραστηριότητα.^{35,37,38}

Το ασκορβικό οξύ χρησιμοποιείται από την βιομηχανία τροφίμων ως συστατικό με πολλαπλές λειτουργικές ιδιότητες. Χρησιμοποιείται ευρέως για την πρόληψη της ενζυμικής αμαύρωσης στα φρούτα, την αναστολή της διάβρωσης των κονσέρβων αναψυκτικών, την

προστασία του χρώματος και της γεύσης, την βελτίωση της ζύμης στα ψημένα στο φούρνο τρόφιμα. Υπό μορφή εστέρα του παλμιτικού οξέος και αποτελεί αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό σε συστήματα λιπιδίων. Τέλος, αναστέλλει την οξειδωση των φαινολικών συστατικών σε κινόνες.³

Η συνολική περιεκτικότητα του σώματος σε βιταμίνη C κυμαίνεται από 300 mg (περιοχή κοντά σκορβούτο) έως περίπου 2 g. Υψηλά επίπεδα της βιταμίνης C διατηρούνται στα κύτταρα και στους ιστούς αλλά είναι υψηλότερα σε λευκά αιμοσφαίρια, μάτια, επινεφρίδια, υπόφυση και εγκέφαλο. Σχετικά χαμηλά επίπεδα της βιταμίνης C βρίσκονται σε εξωκυτταρικά υγρά, όπως το πλάσμα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια και το σάλιο.³⁶ Πρακτικά δεν αποθηκεύεται στο οργανισμό αλλά σε περιπτώσεις πολύ πλούσιας διατροφής σε βιταμίνη C αποθηκεύονται στο ήπαρ μέχρι και 1500 mg, τα οποία τα χρησιμοποιεί ο οργανισμός σε περίπτωση έλλειψης με ημερήσια ταχύτητα 3% για να καλύψει τις ανάγκες του.⁸

Φρούτα και λαχανικά είναι οι καλύτερες πηγές βιταμίνης C και ακολουθούν τα εσπεριδοειδή, οι τομάτες, ο χυμός ντομάτας, οι πατάτες, οι κόκκινες και οι πράσινες πιπεριές, τα ακτινίδια, το μπρόκολο, οι φράουλες, τα λαχανάκια Βρυξελλών, και το πεπόνι. Η περιεκτικότητα σε βιταμίνη C των τροφίμων μπορεί να μειωθεί με την παρατεταμένη αποθήκευση και το μαγείρεμα επειδή το ασκορβικό οξύ είναι πολύ ευαίσθητο και καταστρέφεται από τη θερμότητα. Στον ατμό ή στο φούρνο μικροκυμάτων μπορεί να μειωθούν οι απώλειες. Ευτυχώς, πολλές από τις καλύτερες πηγές τροφίμων βιταμίνης C, όπως φρούτα και λαχανικά, συνήθως καταναλώνονται ωμά.^{22,39,40}

Οξεία ανεπάρκεια βιταμίνης C οδηγεί σε σκορβούτο. Η ανάπτυξη του σκορβούτου ποικίλλει, ανάλογα με τις αποθήκες του οργανισμού στη βιταμίνη. Τα σημάδια μπορεί να εμφανιστούν μέσα σε 1 μήνα από την ελάχιστη ή μηδενική πρόσληψη βιταμίνης C (κάτω από 10 mg / ημέρα).^{39,41,42,43} Τα αρχικά συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνουν κόπωση, αδιαθεσία, και φλεγμονή των ούλων.^{33,36} Όσο προχωράει η έλλειψη βιταμίνης C δημιουργούνται προβλήματα όρασης, αποδυναμώνονται οι συνδετικοί ιστοί προκαλώντας πόνος στις αρθρώσεις, κακή εππούλωση των πληγών, υπερκεράτωση, κατάθλιψη, καθώς αιμορραγία των ούλων, χαλάρωση ή την απώλεια των δοντιών που οφείλεται στην ευθραυστότητα των τριχοειδών. Η σιδηροπενική αναιμία μπορεί επίσης να είναι αποτέλεσμα της αυξημένης αιμορραγίας και της μειωμένης απορρόφησης του σιδήρου. Εάν δεν υπάρξει θεραπεία, το σκορβούτο είναι θανατηφόρα ασθένεια.^{32,33,36,39,40,44}

Σήμερα, ανεπάρκεια βιταμίνης C και σκορβούτο είναι σπάνιες στις αναπτυγμένες χώρες αλλά μπορεί να εξακολουθούν να εμφανίζονται σε άτομα με περιορισμένη ποικιλία τροφίμων.⁴⁰

Η υπερβολική πρόσληψη βιταμίνης είναι δύσκολο να προκαλέσει τοξικές παρενέργειες καθώς η βιταμίνη απεκκρίνεται ταχέως με τα ούρα.¹ Τα πιο κοινά συμπτώματα είναι διάρροια, ναυτία, κοιλιακές κράμπες, και άλλες γαστρεντερικές διαταραχές, λόγω της οσμωτικής επίδρασης της μη απορροφημένης βιταμίνης C στην γαστρεντερική οδό.^{36,40}

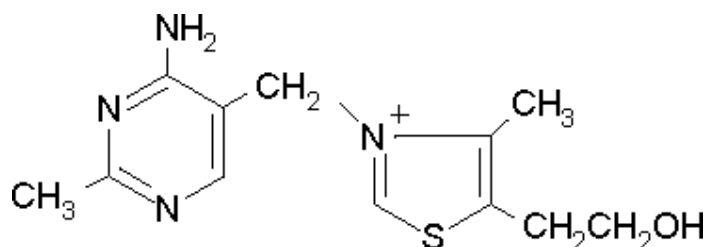
Σύμπλεγμα βιταμινών B

Η ομάδα των βιταμινών B αποτελείται από 8 βιταμίνες που έχουν παραπλήσια δράση. Κάποιες είναι περισσότερο διαλυτές στο νερό και κάποιες άλλες λιγότερο. Συμβάλουν στην απελευθέρωση ενέργειας από τις τροφές. Συχνά απαντώνται όλες μαζί στα τρόφιμα. Καλές πηγές είναι τα προϊόντα δημητριακών, η μαγιά, τα φασόλια, τα όσπρια, το κρέας, το γάλα, τα γαλακτοκομικά προϊόντα και τα λαχανικά.

Το σύμπλεγμα των βιταμινών B αποτελείται από τις εξής βιταμίνες: B₁ (θειαμίνη), B₂(ριβοφλαβίνη), B₃(νιασίνη), B₅ (παντοθενικό οξύ), B₆(πυριδοξίνη), B₇(βιοτίνη), B₁₁(φολικό οξύ) και B₁₂(κοβαλαμίνη).²

1.2.2.2 Βιταμίνη B₁ (θειαμίνη)

Η θειαμίνη είναι συστατικό μερικών τροφίμων, προστίθεται σε ορισμένα τρόφιμα και είναι διαθέσιμη ως συμπλήρωμα διατροφής. Αυτή η βιταμίνη παίζει κρίσιμο ρόλο στο μεταβολισμό της ενέργειας, της αύξησης, της ανάπτυξης και της λειτουργίας των κυττάρων.



Εικόνα 7: Δομή θειαμίνης

Απορροφάται από το λεπτό έντερο μέσω της ενεργού μεταφοράς.⁴⁵ Οι άνθρωποι την αποθηκεύουν κυρίως στο ήπαρ, αλλά σε πολύ μικρές ποσότητες. Έχει μικρό χρόνο

ημιζωής και γι' αυτό είναι απαραίτητο οι άνθρωποι να την λαμβάνουν συνεχώς μέσω της διατροφής.⁴⁶

Περίπου 80% των 25-30 mg θειαμίνης στο ανθρώπινο σώμα των ενηλίκων είναι υπό μορφή διφωσφορικής θειαμίνης (TPP- γνωστή και ως πυροφωσφορική θειαμίνη). Η TPP αποτελεί την κύρια δραστική μορφή της θειαμίνης. Τα βακτήρια στο παχύ έντερο συνθέτουν επίσης ελεύθερη θειαμίνη και TPP αλλά η συμβολή τους είναι προς το παρόν άγνωστη.⁴⁷ Είναι απαραίτητη για την αντίδραση τρανσκετολάσης στην πορεία των φωσφοπεντοζών καθώς είναι η μόνη πηγή ριβόζης για την σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων DNA και RNA. Επιπλέον, η TPP χρησιμεύει ως συμπαραγοντας σε ενζυματικές αντιδράσεις για την βιοσύνθεση των λιπιδίων και άλλων βιοσυνθετικών πορειών.⁴⁸ Τα επίπεδα της θειαμίνης στο αίμα δεν είναι αξιόπιστοι δείκτες, γι' αυτό γίνεται προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου τρανσκετολάση το οποίο εξαρτάται από την TPP. Τα αποτελέσματα είναι συνήθως 0% -15% σε υγιή άτομα, 15% -25% σε εκείνους με οριακή ανεπάρκεια, και μεγαλύτερο από 25% σε άτομα με ανεπάρκεια.⁴⁶

Πλούσιες πηγές θειαμίνης αποτελούν τα δημητριακά ολικής αλέσεως, το κρέας και το ψάρι. Τα ψωμιά, τα δημητριακά και τα παρασκευάσματα για βρέφη στις Ηνωμένες Πολιτείες και σε πολλές άλλες χώρες είναι εμπλουτισμένα με θειαμίνη.⁴⁹ Τα γαλακτοκομικά προϊόντα και τα περισσότερα φρούτα είναι φτωχά σε θειαμίνη. Η θέρμανση και το μαγείρεμα των τροφίμων στο νερό μπορεί να μειώσει την περιεκτικότητα των τροφίμων σε θειαμίνη επειδή η θειαμίνη διαλύεται εύκολα στο νερό. Η επεξεργασία των τροφίμων αλλάζει επίσης τα επίπεδα θειαμίνης στα τρόφιμα όπως για παράδειγμα το λευκό ρύζι που είναι εμπλουτισμένο με θειαμίνη αλλά περιέχει το ένα δέκατο της θειαμίνης σε σχέση με το καστανό ρύζι.^{46,50}

Σε πρώιμο στάδιο, έλλειψη θειαμίνης μπορεί να προκαλέσει απώλεια βάρους, ανορεξία, σύγχυση, βραχυπρόθεσμη απώλεια μνήμης, μυϊκή αδυναμία και καρδιαγγειακά συμπτώματα.⁵⁰ Η πιο συχνή ασθένεια από σοβαρή έλλειψη θειαμίνης είναι το beri-beri, το οποίο χαρακτηρίζεται κυρίως από περιφερική νευροπάθεια. Έχει υποδιαιρεθεί σε ξηρό, υγρό, εγκεφαλικό ή γαστρεντερικό, ανάλογα με τα συστήματα που επηρεάζονται.⁴⁸ Το ξηρό beri-beri εμφανίζει προχωρημένα νευρομυϊκά συμπτώματα και αδυναμία και ατροφία των μυών και το υγρό beri-beri εμφανίζει συνδυασμό των συμπτωμάτων με πρήξιμο.⁸ Το εγκεφαλικό beri-beri συνδέεται με το σύνδρομο Wernicke-Korsakoff και το γαστρεντερικό beri-beri σχετίζεται με την γαλακτική οξέωση και την συσσώρευση γαλακτικού οξέος.⁵¹ Οι

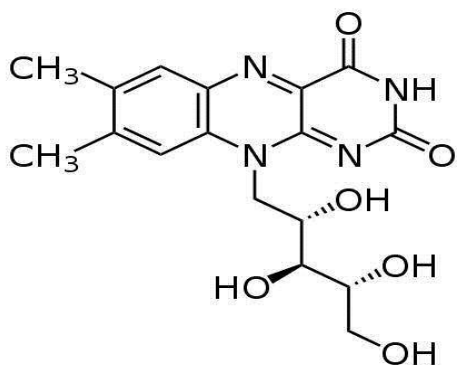
άνθρωποι με αυτή την ασθένεια έχουν μειωμένες αισθητικές, κινητικές και αντανakλαστικές λειτουργίες. Σε σπάνιες περιπτώσεις, το beri-beri προκαλεί συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια που οδηγεί σε οίδημα των κάτω άκρων και σε περιστασιακά θάνατο.^{45,46} Είναι σπάνιο στις ανεπτυγμένες χώρες, ωστόσο οι άνθρωποι στις χώρες αυτές δεν αποκλείεται να αναπτύξουν την ασθένεια. Η χορήγηση συμπληρωματικής θειαμίνης γίνεται συχνά παρεντερικά.⁴⁷

Μέτρια ανεπάρκεια θειαμίνης προκαλεί το σύνδρομο Wernicke-Korsakoff. Η διαταραχή αυτή είναι περίπου 8-10 φορές πιο συχνή σε άτομα με χρόνια αλκοολισμό αλλά μπορεί επίσης να αναπτυχθεί σε ασθενείς που πάσχουν από σοβαρές γαστρεντερικές διαταραχές, ταχύτατα εξελισσόμενες αιματολογικές κακοήθειες, διαταραχές από τη χρήση ναρκωτικών, ή AIDS.⁵¹ Σε πολλούς ασθενείς, σύνδρομο Wernicke-Korsakoff έχει δύο φάσεις. Το πρώτο στάδιο το χαρακτηρίζει η οξεία και απειλητική για τη ζωή κατάσταση, εγκεφαλοπάθεια του Wernicke, που συνήθως τα άτομα πάσχουν από περιφερική νευροπάθεια. ^{46,52} Χωρίς θεραπεία, έως και το 20% των ανθρώπων πεθαίνουν με εγκεφαλοπάθεια του Wernicke, ενώ αυτοί που επιβιώνουν αναπτύσσουν ψύχωση του Korsakoff, αν και ορισμένα άτομα με ψύχωση του Korsakoff δεν έπασχαν προηγουμένως εγκεφαλοπάθεια του Wernicke.^{53,54} Η ψύχωση του Korsakoff σχετίζεται με σοβαρή βραχυπρόθεσμη απώλεια μνήμης, αποπροσανατολισμό, και ανικανότητα συνομιλίας (σύγχυση ανάμεσα στην πραγματικές και φανταστικές μνήμες). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) συνιστά ημερησίως για σοβαρή ανεπάρκεια 25-30 mg ενδοφλεβίως σε βρέφη και 50-100 mg σε ενήλικες για μία εβδομάδα, και 3-5mg / ημέρα για τουλάχιστον 6 εβδομάδες.^{45,46,49}

Το σώμα εκκρίνει τα υπερβολικά ποσά θειαμίνης μέσω των ούρων. Δεν εμφανίζει τοξικότητα λόγω της μειωμένης απορρόφησης της σε προσλήψεις άνω των 5 mg. Ωστόσο, η υπερβολική πρόσληψη θειαμίνης ενδοφλεβίως θα μπορούσε να προκαλέσει δυσμενείς επιπτώσεις.⁴⁹

1.2.2.3 Βιταμίνη B₂(Ριβοφλαβίνη)

Η ριβοφλαβίνη αποτελείται από μια μονάδα d-ριβιτόλης προσκολλημένης σε ένα δακτύλιο ισοαλλοξαζίνης. Μια μικρή αλλαγή στο μόριο μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της δραστηριότητας της βιταμίνης.³



Εικόνα 8:Δομή ριβοφλαβίνης

Είναι κίτρινο στερεό που φθορίζει όταν εκτίθεται στο υπεριώδες φως.⁵⁵ Επιπλέον, στο ορατό φως μπορεί να αδρανοποιηθεί ταχέως η ριβοφλαβίνη και τα παράγωγά της. Λόγω αυτής της ευαισθησίας, ο κίνδυνος απώλειας ριβοφλαβίνης από την έκθεση στο φως είναι και ο λόγος για τον οποίο το γάλα δεν αποθηκεύονται συνήθως σε γυάλινα δοχεία καθώς η ριβοφλαβίνη μετατρέπεται στη λουμιφλαβίνη, η οποία καταστρέφει το ασκορβικό οξύ.^{3,56}

Αποτελεί βασικό συστατικό δύο μεγάλων συνενζύμων, του μονονουκλεοτιδίου της φλαβίνης (FMN) και του δικουνετιδίου της αδενίνης (FAD). Αυτά τα συνένζυμα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ενέργειας, την κυτταρική λειτουργία, την ανάπτυξη και το μεταβολισμό λιπών, νευρικών, και στεροειδών. Η μετατροπή του αμινοξέος τρυπτοφάνη σε νιασίνη απαιτεί το συνένζυμο FAD.^{47,50} Παρομοίως, η μετατροπή της βιταμίνης B₆ σε 5'-φωσφορική πυριδοξάλη χρειάζεται το συνένζυμο FMN. Βοηθά στη διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων ομοκυστεΐνης και αμινοξέων στο αίμα.⁵⁵ Περισσότερο από το 90% της ριβοφλαβίνης των τροφών είναι στη μορφή FAD και FMN ενώ το υπόλοιπο βρίσκεται στην ελεύθερη μορφή ως γλυκοζίτες και εστέρες.⁵³ Η βιοδιαθεσιμότητα της ελεύθερης ριβοφλαβίνης είναι παρόμοια με εκείνη του FAD και FMN.^{57,58}

Απορροφάται στο λεπτό έντερο και αποθηκεύεται σε μικρές ποσότητες σε ήπαρ, καρδιά και νεφρά. Όταν καταναλώνονται υπερβολικές ποσότητες τότε είτε δεν απορροφούνται είτε η ποσότητα που απορροφάται απεκκρίνεται στα ούρα.⁵³

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ριβοφλαβίνης στον οργανισμό γίνεται μέσω της αναγωγής της γλουταθειόνης των ερυθροκυττάρων, έναν συντελεστή δραστηριότητας της αναγωγής (EGRAC), η οποία βασίζεται στην αναλογία μεταξύ της *in vitro* δραστηριότητας του ενζύμου με την παρουσία του FAD και χωρίς την προσθήκη FAD. Τα κατώτερα όρια EGRAC είναι αβέβαια.^{8,50,59}

Τα τρόφιμα που είναι πλούσια σε ριβοφλαβίνη είναι τα αυγά, κρέας, τα νεφρά, το ήπαρ, το άπαχο κρέας, το γάλα, τα γαλακτοκομικά, το ψωμί, τα προϊόντα αρτοποιίας και τα πράσινα λαχανικά. Οι σπόροι και τα δημητριακά είναι συνήθως εμπλουτισμένα με ριβοφλαβίνη. Η ριβοφλαβίνη στα περισσότερα τρόφιμα είναι υπό την μορφή FAD, αν και η

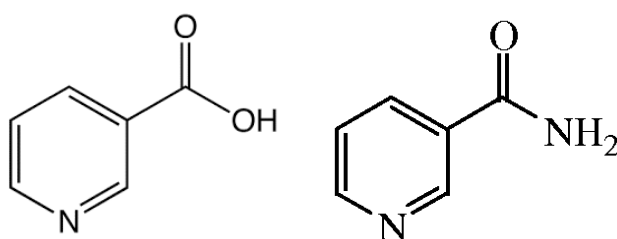
κύρια μορφή στα αυγά και το γάλα είναι η ελεύθερη ριβοφλαβίνη. Επειδή η ριβοφλαβίνη είναι διαλυτή στο νερό, μέρος της χάνεται στο μαγείρεμα με ατμό ή μικροκύματα.^{53,57,60}

Τα συμπτώματα έλλειψης ριβοφλαβίνης περιλαμβάνουν διαταραχές του δέρματος, υπεραιμία (περίσσεια αίματος) και οίδημα του στόματος και του λαιμού, γωνιακή στοματίτιδα (βλάβες στις γωνίες του στόματος), χειλίτιδα (πρησμένα, σκασμένα χείλη), γλωσσίτιδα, φοιδωτή δερματίτιδα (κυρίως γύρω από τα ρινικά πτερύγια και τις ρυτίδες), απώλεια μαλλιών, προβλήματα αναπαραγωγής, πονόλαιμο, φαγούρα, κόκκινα μάτια και εκφυλισμό του ήπατος και του νευρικού συστήματος. Τα άτομα που πάσχουν από σοβαρή ανεπάρκεια ριβοφλαβίνης εμφανίζουν έλλειψη και άλλων θρεπτικών συστατικών με αποτέλεσμα κάποια από τα συμπτώματα αυτά να αντικατοπτρίζουν και άλλες ελλείψεις, ειδικά των άλλων βιταμινών του συμπλέγματος Β. Παρατεταμένη έλλειψη μπορεί να οδηγήσει σε αναιμία και καταρράκτης.^{53,55,60}

Δυσμενείς επιπτώσεις από την υπερβολική πρόσληψη ριβοφλαβίνης από τα τρόφιμα ή τα συμπληρώματα (400 mg / ημέρα για τουλάχιστον 3 μήνες) δεν έχουν αναφερθεί, πιθανώς λόγω της διαλυτότητας της και της ικανότητας της να απορροφάται στην γαστρεντερική οδό.⁵³

1.2.2.4 Νιασίνη (Βιταμίνη PP)

Η νιασίνη είναι γνωστή και ως αντιπελαργική βιταμίνη ή νικοτινικό οξύ ή βιταμίνη Β₃. Δεν είναι βιταμίνη με την αυστηρή έννοια του όρου καθώς μπορεί να την συνθέσει ο οργανισμός μας από το αμινοξύ θρυπτοφάνη. Η μετατροπή της θρυπτοφάνης σε νιασίνη είναι ανεπαρκής δεδομένου ότι γίνεται μόνο όταν έχουν ικανοποιηθεί όλες οι άλλες λειτουργίες του οργανισμού που απαιτούν θρυπτοφάνη. Η μετατροπή αυτή απαιτεί την παρουσία των βιταμινών Β₁, Β₂ και Β₆. Απαντάται στα τρόφιμα είτε ως νικοτινικό οξύ είτε ως νικοτιναμίδιο είτε ως συνένζυμο.⁸



Εικόνα 9: Δομές νικοτινικού οξέος και νικοτιναμίδιου

Πριν ανακαλυφθεί η βιταμίνη το νικοτινικό οξύ παρασκευαζόταν από τη νικοτίνη. Ωστόσο το νικοτινικό οξύ των τροφίμων δεν σχετίζεται ούτε με την νικοτίνη ούτε με το κάπνισμα.²

Ο ρόλος του νικοτιναμιδίου είναι πολύ σημαντικό καθώς αποτελεί συμπαράγοντα των συνενζύμων . Πάνω από 400 ένζυμα απαιτούν τα NAD και NADP για να μεταφέρουν ηλεκτρόνια για τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις.⁶¹ Το NAD συμμετέχει σε αντιδράσεις που παράγουν ενέργεια συμπεριλαμβανομένου της αποικοδόμησης (καταβολισμό) των υδατανθράκων, των λιπών, πρωτεϊνών, και του αλκοόλ. Το NADP συμμετέχει σε αντιδράσεις βιοσύνθεσης όπως η σύνθεση όλων των μακρομορίων, συμπεριλαμβανομένου των λιπαρών οξέων και χοληστερόλης .^{62,63}

Επίσης, χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις διαβήτη λόγω της ικανότητάς της να προστατεύει τα β-κύτταρα με χαμηλό ποσοστό παρενεργειών και τοξικότητας.^{64,65}

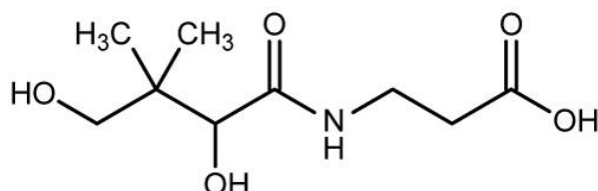
Οι καλύτερες πηγές βιταμίνης B₃ είναι η μαγιά μπύρας, το συκώτι, το βόειο κρέας ,τα νεφρά, το ψάρι, ο σολομός, ο ξιφία, ο τόνος, οι ηλιόσποροι, τα μανιτάρια και τα φιστίκια. Το ψωμί και δημητριακά είναι συνήθως εμπλουτισμένα με νιασίνη. Επιπλέον, τα τρόφιμα που περιέχουν τρυπτοφάνη είναι πουλερικά, το κόκκινο κρέας, τα αυγά, και τα γαλακτοκομικά προϊόντα.^{66,67}

Έλλειψη της οδηγεί σε πελλάγρα, μιας ασθένειας που συνδέεται με αδυναμία, γαστρεντερικές διαταραχές και δερματίτιδα. Τα αρχικά συμπτώματα δεν είναι συγκεκριμένα. Χαρακτηρίζεται από τα τρία D: Dementia, Dermatitis, Diarrhea. Το δέρμα επηρεάζεται ιδιαίτερα όταν εκτίθεται στον ήλιο. Τα νευρολογικά συμπτώματα συνδυάζονται με τον εκφυλισμό του νευρικού ιστού. Εμφανίζεται στους αλκοολικούς, σε ασθενείς με σοβαρά προβλήματα κακής απορρόφησης και σε ηλικιωμένους με αυστηρή δίαιτα. Θεραπεύεται με συμπληρώματα νικοτιναμιδίου.^{8,68}

1.2.2.5 Παντοθενικό οξύ

Το παντοθενικό οξύ είναι γνωστό και ως βιταμίνη B₅. Είναι πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση του συνενζύμου A και είναι απαραίτητο σε πολλές βιοχημικές αντιδράσεις και αντιδράσεις σχηματισμού ή μεταφοράς ακέτυλο-ομάδας. Είναι ευρύτατα διαδεδομένο καθώς βρίσκεται παντού σε τρόφιμα φυτικής και ζωικής προέλευσης.^{2,8}

Τα βακτήρια που αποικίζουν στο παχύ έντερο είναι ικανά να συνθέτουν παντοθενικό οξύ. Ένας εξειδικευμένος μεταφορέας για την πρόσληψη βιοτίνης και παντοθενικού οξέος ταυτοποιήθηκε σε καλλιεργημένα κύτταρα που προέχονταν από το κολόν του εντέρου, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο άνθρωπος μπορεί να είναι σε θέση να απορροφήσει το παντοθενικό οξύ και τη βιοτίνη παράγεται από τα εντερικά βακτήρια.⁶⁹



Εικόνα 10: Δομή παντοθενικού οξέος

Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και στην απελευθέρωση ενέργειας από το λίπος, τους υδατάνθρακες, τις πρωτεΐνες και τις αλκοόλες. Συμβάλει στη διαδικασία επούλωσης των πληγών του δέρματος. Θεραπεία με παντεθίνη—ένα παράγωγο του παντοθενικού οξέος—έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη χοληστερόλη του ορού και των λιπιδίων.⁷⁰

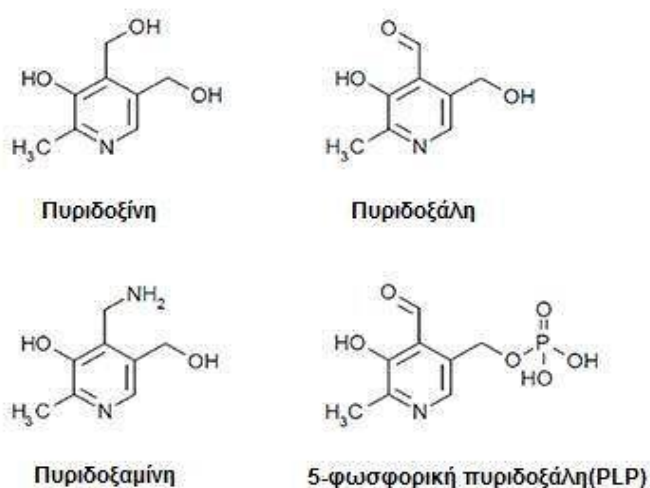
Το παντοθενικό οξύ είναι διαθέσιμο σε μια ποικιλία τροφίμων, συνήθως ως συστατικό του συνενζύμου Α (CoA). Τροφές πλούσιες σε παντοθενικό οξύ αποτελούν τα ζωικά όργανα (ήπαρ και νεφρά), το χοιρινό, το κοτόπουλο, τα ψάρια, τα οστρακοειδή, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα αυγά, το αβοκάντο, τα όσπρια, τα μανιτάρια και οι γλυκοπατάτες. Ολόκληροι κόκκοι είναι επίσης καλές πηγές του παντοθενικού οξέος. Η κατάψυξη και η κονσερβοποίηση των τροφίμων οδηγούν σε απώλειες της βιταμίνης σε ποσοστό 35%-75%. Έχει παρατηρηθεί ότι επαρκής ημερήσια πρόσληψη παντοθενικού οξέος αποτελούν 4-7 mg / ημέρα σε ενήλικες.⁵⁰

Η διαιτητική του ανεπάρκεια είναι πολύ σπάνια και έχει παρατηρηθεί μόνο σε περιπτώσεις σοβαρού υποσιτισμού.⁷¹ Έχει προκληθεί στον άνθρωπο πειραματικά με συν-χορήγηση ενός αναστολέα της κινάσης του παντοθενικού. Οι συμμετέχοντες σε αυτό το πείραμα παραπονέθηκαν για πονοκέφαλο, κόπωση, αϋπνία, γαστρεντερικές διαταραχές, και μούδιασμα και μυρμήγκιασμα των χεριών και των ποδιών τους. Η ποικιλομορφία των συμπτωμάτων υπογραμμίζει τις πολυάριθμες λειτουργίες του παντοθενικού οξέος ως συνένζυμο.⁷²

Το παντοθενικό οξύ δεν είναι τοξικό για τον άνθρωπο. Η μόνη αρνητική επίδραση που έχει παρατηρηθεί είναι η διάρροια λόγω πολύ υψηλή πρόσληψη του 10 έως 20 g / ημέρα.⁷³ Ωστόσο, μερικές περιπτώσεις ερεθισμού του δέρματος, δερματίτιδας εξ επαφής και έκζεμα έχουν αναφερθεί με τη χρήση αλοιφών που περιέχουν δεξπανθενόλης.^{74,75}

1.2.2.6 Βιταμίνη B₆(πυριδοξίνη)

Η βιταμίνη B₆ είναι γνωστή με τις εξής 6 μορφές: πυριδοξίνη, πυριδοξάλη, πυριδοξαμίνη και τις φωσφοριλιωμένες μορφές τους αντίστοιχα. Η δραστική της μορφή είναι οι αντίστοιχες εστέρες της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP) και της 5'-φωσφορικής πυριδοξαμίνης (PMP).^{76,77}



Εικόνα 11: Δομές πυριδοξίνης

Η βιταμίνη B₆ ως συνένζυμο συμμετέχει σε εύρος λειτουργιών, σε περισσότερες από 100 ενζυματικές αντιδράσεις που ως επί το πλείστον ασχολούνται με το μεταβολισμό των πρωτεϊνών.⁵⁰ Τόσο η PLP όσο και η PMP¹⁶ εμπλέκονται στο μεταβολισμό των αμινοξέων. Η PLP εμπλέκεται επίσης και στο μεταβολισμό υδατανθράκων και λιπιδίων. Παίζει ρόλο στην ανάπτυξη της γνωστικής ικανότητας μέσω της βιοσύνθεσης των νευροδιαβιβαστών και στη διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων ομοκυστεΐνης, ενός αμινοξέος στο αίμα. Τέλος, συμμετέχει στη γλυκονεογένεση, στη γλυκογονόλυση και στο σχηματισμό της αιμοσφαιρίνης.⁷⁸

Το ανθρώπινο σώμα απορροφά την βιταμίνη B₆ με παθητική διάχυση, αφού γίνει αποφωσφορυλίωση των φωσφορυλιωμένων μορφών της. Οι συγκεντρώσεις της μπορούν να υπολογιστούν άμεσα μέσω των συγκεντρώσεων των PLP ή της ολικής βιταμίνης στο πλάσμα, στα ερυθροκύτταρα και στα ούρα.^{50,77}

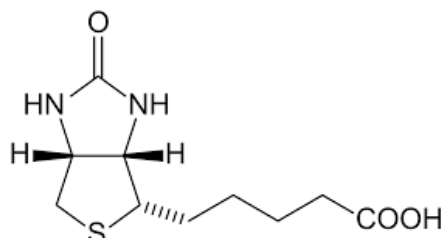
Βρίσκεται σε ευρεία ποικιλία τροφίμων. Οι πλουσιότερες πηγές είναι τα ψάρια, το βοδινό συκώτι (και άλλα εντόσθια), οι πατάτες και άλλα αμυλούχα λαχανικά και φρούτα (εκτός από τα εσπεριδοειδή). Οι ενήλικες μπορούν να αποκτήσουν το μεγαλύτερο μέρος της διαιτητικής βιταμίνης B₆ από τα εμπλουτισμένα δημητριακά, το βόειο κρέας, τα πουλερικά, τα αμυλούχα λαχανικά, τα φρούτα και μερικά μη-εσπεριδοειδή φρούτα. Περίπου το 75% της βιταμίνης B₆ είναι βιοδιαθέσιμο.^{50,77,78}

Η ανεπάρκεια της βιταμίνης B₆ συνδέεται συνήθως με χαμηλές συγκεντρώσεις άλλων βιταμινών του συμπλέγματος B, όπως η βιταμίνη B₁₂ και το φολικό οξύ. Προκαλεί βιοχημικές αλλαγές που γίνονται εμφανείς καθώς η ανεπάρκεια εξελίσσεται. Προκαλεί μικροκυτταρική αναιμία, δερματίτιδα με χείλωση (κλιμακωτή στα χείλη και ρωγμές στις γωνίες του στόματος), γλωσσίτιδα (πρησμένη γλώσσα), κατάθλιψη, σύγχυση, νεφρικές ασθένειες τελικού σταδίου, ομοκυστινουρία και εξασθενημένο ανοσοποιητικό λειτουργία. Τα άτομα με οριακές συγκεντρώσεις βιταμίνης B₆ ή ήπια ανεπάρκεια μπορεί να μην έχουν σημάδια ή συμπτώματα ανεπάρκειας για μήνες ή ακόμη και χρόνια. Στα βρέφη, ανεπάρκεια βιταμίνης B₆ προκαλεί ευερεθιστότητα, ασυνήθιστα οξεία ακοή, και με σπασμούς. Τέλος, έλλειψη βιταμίνης B₆ μπορεί να προκύψει από διάφορα σύνδρομα δυσαπορρόφησης, όπως κοιλιοκάκη, νόσο του Crohn, και κολίτιδα.^{50,77}

Υψηλή πρόσληψη βιταμίνης B₆ δεν έχει αναφερθεί ότι προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις.⁵⁰ Ωστόσο, η χρόνια χορήγηση στοματικής πυριδοξίνης μπορεί να προκαλέσει σοβαρή και προοδευτική νευροπάθεια που χαρακτηρίζεται από επώδυνα νευρολογικά συμπτώματα όπως μούδιασμα των άκρων, αταξία (απώλεια του ελέγχου των κινήσεων), δυσκολία στο περπάτημα.⁷⁹ Η σοβαρότητα των συμπτωμάτων εξαρτάται από τις δόσεις που προσλαμβάνει ο ασθενής και τα συμπτώματα συνήθως σταματούν όταν ο ασθενής διακόψει τα συμπληρώματα πυριδοξίνης. Μόλις εμφανιστούν τα νευρολογικά συμπτώματα.^{50,77,80}

1.2.2.7 Βιοτίνη (Βιταμίνη B₇)

Περιέχει θείο στο δακτύλιο της και είναι παράγωγο του ημιδαζολίου. Είναι ευρύτατα διαδεδομένο στην φύση και είναι απαραίτητο για το μεταβολισμό υδατανθράκων, λιπαρών οξέων και του αμινοξέος λευκίνη. Λειτουργεί ως συμπαραγοντας για τη βιολογική δράση γνωστών καρβοξυλασών των θηλαστικών.^{8,81}



Εικόνα 12: Δομή βιοτίνης

Η βιοτίνη συντίθεται από την πλειοψηφία των βακτηρίων που φυσιολογικά αποικίζουν το λεπτό και παχύ έντερο (κόλον). Εάν η βιοτίνη απελευθερώνεται και απορροφάται από τον άνθρωπο σε ουσιαστικές ποσότητες παραμένει άγνωστο.^{82,83}

Βρίσκεται σε πολλά τρόφιμα είτε σε ελεύθερη μορφή που παραλαμβάνεται άμεσα από τα εντεροκύτταρα είτε σε δεσμευμένη μορφή που συνδέεται με τις πρωτεΐνες. Κρόκος αυγού, ήπαρ, νεφρά, γάλα, λαχανικά, μανιτάρια και μαγιά είναι πλούσιες πηγές βιοτίνης. Οι εκτιμήσεις της μέσης ημερήσιας πρόσληψης βιοτίνης από διάφορες μελέτες που διεξάχθηκαν κυμαίνονταν μεταξύ 40 και 60 μικρογραμμάρια (μg) ανά ημέρα για τους ενήλικες.⁵⁰

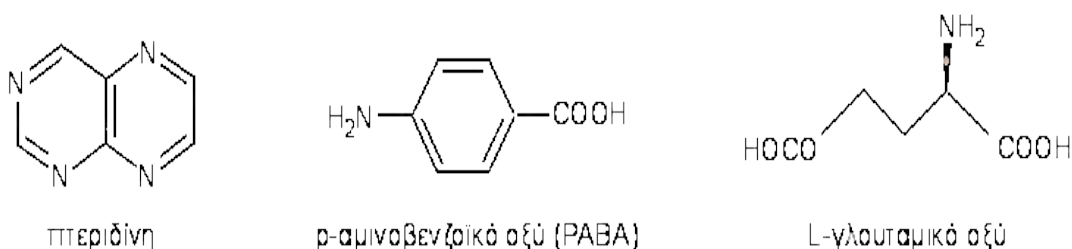
Η έλλειψη βιοτίνης είναι πολύ σπάνια και οι απαιτήσεις για βιοτίνη παρουσιάζονται σε περιπτώσεις όπως η κατανάλωση ωμών ασπράδιών αυγού για μια παρατεταμένη περίοδο (πολλές εβδομάδες έως χρόνια). Το ωμό ασπράδι περιέχει μια αντιμικροβιακή πρωτεΐνη γνωστή ως αβιδίνη που μπορεί να δεσμεύει τη βιοτίνη και να καταστήσει αδύνατη την απορρόφηση της. Στο μαγειρεμένο ασπράδι αποδιατάσσεται η αβιδίνη και έτσι καθίσταται εφικτή η πέψη της και συνεπώς η απορρόφηση της βιταμίνης.³

Συμπτώματα ανεπάρκειας βιοτίνης περιλαμβάνουν απώλεια μαλλιών (αλωπεκία), φολιδωτό εξάνθημα γύρω από τα μάτια, τη μύτη, το στόμα, και την περιοχή των γεννητικών οργάνων. Έχουν παρατηρηθεί νευρολογικά συμπτώματα σε ενήλικες συμπεριλαμβανομένου κατάθλιψης, λήθαργου, παραισθήσεων μούδιασματος, μυρμηκίασης των άκρων, αταξίας και επιληπτικών κρίσεων.³

Η βιοτίνη δεν είναι τοξική. Σε ανθρώπους χωρίς διαταραχές του μεταβολισμού της, δόσεις μέχρι και 5 mg / ημέρα για δύο χρόνια δεν συσχετίστηκαν με ανεπιθύμητες ενέργειες.⁸⁴ Συμπληρώματα βιοτίνης είναι ανεκτά σε δόσεις μέχρι και 200 mg / ημέρα σε ανθρώπους με κληρονομικές διαταραχές του μεταβολισμού της.⁵⁰

1.2.2.8 Φολικό οξύ (Βιταμίνη B₉)

Το **φυλλικό οξύ** (φολικό οξύ ή φολασίνη) είναι ένωση αποτελούμενη από τρία διακριτά τμήματα: ένα υδροξυ-αμινο-παράγωγο της πτεριδίνης, π-αμινοβενζοϊκό οξύ και L-γλουταμικό οξύ.



Εικόνα 13: Δομή φολικού οξέος

Μια χημική ονομασία του φυλλικού οξέος είναι **πτεροϋλο-L-γλουταμικό οξύ** (pteroyl-L-glutamic acid, PGA). Το φυλλικό οξύ είναι η πλέον οξειδωμένη μορφή της κατηγορίας των φυλλικών (ή -σπανιότερα- φολικών) ενώσεων και ανήκει στο σύμπλεγμα των βιταμινών B. Ονομάζεται επιπλέον και βιταμίνη B₉ ή βιταμίνη Bc ή βιταμίνη M.⁸⁵

Λειτουργεί ως συνένζυμο ή συνυπόστρωμα στις μεταφορές ενός άνθρακα στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) και στο μεταβολισμό των αμινοξέων. Συμβάλλει στη μετατροπή της ομοκυστεΐνης σε μεθειονίνη και στη σύνθεση της αδενοσυλομεθειονίνης.^{50,86,87}

Όταν καταναλώνεται μέσω της τροφής υδρολύεται στη μονογλουταμική μορφή του στο έντερο πριν απορροφηθεί μέσω της ενεργούς μεταφοράς κατά μήκος του εντερικού βλεννογόνου ενώ όταν καταναλώνεται μέσω φαρμακολογικών σκευασμάτων απορροφάται μέσω της παθητικής διάχυσης. Η κύρια μορφή του φυλλικού οξέος στο πλάσμα είναι 5-μεθυλο-τετραϋδροφυλλικό (THF).⁵⁰

Η συνολική περιεκτικότητα σε φυλλικό οξύ υπολογίζεται να είναι 10 έως 30 mg, περίπου το ήμισυ του ποσού αυτού είναι αποθηκευμένο στο ήπαρ και το υπόλοιπο στο αίμα και το σώμα τους ιστούς. Ένας συνδυασμός ορού και συγκέντρωσης ερυθροκυττάρων είναι οι δείκτες της μεταβολικής λειτουργίας που χρησιμοποιούνται για να αξιολογηθούν τα επίπεδα του φυλλικού οξέος.^{86,87}

Βρίσκεται σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων, όπως λαχανικά (ιδιαίτερα σκούρα πράσινα φυλλώδη λαχανικά), φρούτα και χυμούς φρούτων, ξηρούς καρπούς, φασόλια, μπιζέλια, γαλακτοκομικά προϊόντα, πουλερικά, κρέας, αυγά, θαλασσινά και δημητριακά. Σπανάκι, σικώτι, μαγιά, σπαράγγια και λαχανάκια Βρυξελλών είναι τα τρόφιμα με τα υψηλότερα επίπεδα φυλλικού οξέος.^{87,88}

Τον Ιανουάριο του 1998, η αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) άρχισε απαιτεί από τις βιομηχανίες τροφίμων να εμπλουτίσουν προϊόντα ευρείας κατανάλωσης με φυλλικό οξύ όπως το ψωμί, τα δημητριακά, τα αλεύρια, τα ζυμαρικά, το ρύζι, και άλλα προϊόντα δημητριακών. Η συνιστώμενη αύξηση ήταν κατά 100 mcg / ημέρα αλλά εν τέλει η μέση πρόσληψη φυλλικού οξέος αυξήθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες περίπου στα 190 mcg / ημέρα.^{89,90,91}

Η έλλειψη του σχετίζεται με την κακή διατροφή, τον αλκοολισμό και την κακή απορρόφηση θρεπτικών ουσιών. Έλλειψη του προκαλεί μεγαλοβλαστική αναιμία, η οποία χαρακτηρίζεται από μεγάλα, ασυνήθιστα εμπύρνηνα ερυθροκύτταρα. Αποτελεί πρωταρχικό κλινικό σημάδι της ανεπάρκειας του φυλλικού οξέος ή της έλλειψης βιταμίνης B₁₂. Τα συμπτώματα της αναιμίας περιλαμβάνουν αδυναμία, κόπωση, δυσκολία συγκέντρωσης, ευερεθιστότητα, κεφαλαλγία, αίσθημα παλμών της καρδιάς, και δύσπνοια. Ανεπάρκεια φυλλικού οξέος μπορεί επίσης να προκαλέσει πόνο κ έλκος στο βλεννογόνο του στόματος, αλλαγές στο δέρμα, τα μαλλιά, χρώση στα νύχια και αυξημένες συγκεντρώσεις της ομοκυστεΐνης στο αίμα.^{50,86,87}

Σε μεγαλύτερο κίνδυνο ανεπάρκεια φυλλικού οξέος βρίσκονται οι ακόλουθες ομάδες :

✓ Άτομα με εξάρτηση από το αλκοόλ

Τα άτομα αυτά κάνουν συχνά δίαιτες χαμηλής ποιότητας που περιέχουν ανεπαρκείς

ποσότητες φυλλικού οξέος. Επιπλέον, το αλκοόλ επηρεάζει την απορρόφηση του φυλλικού οξέος και το μεταβολισμό των θρεπτικών συστατικών. Ακόμη και η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ των 240 ml κόκκινο κρασί την ημέρα ή 80 ml βότκα ανά ημέρα για 2 εβδομάδες μπορεί να μειώσει σημαντικά τις συγκεντρώσεις φυλλικού οξέος στον ορό και στα υγιή άτομα.^{86,87,92}

✓ Γυναίκες σε αναπαραγωγική ηλικία

Όλες οι γυναίκες που σκοπεύουν να μείνουν έγκυες θα πρέπει να λαμβάνουν επαρκείς ποσότητες φυλλικού οξέος για να μειώσουν τον κίνδυνο για NTDs (συγγενείς ανωμαλίες του νωτιαίου μυελού) και άλλες γενετικές ανωμαλίες. Δυστυχώς, μερικές γυναίκες σε αναπαραγωγική ηλικία λαμβάνουν ανεπαρκή φυλλικό οξύ είτε μέσω της διατροφής είτε μέσω των συμπληρωμάτων διατροφής.⁹³ Επαρκής ποσότητα φυλλικού οξέος κυμαίνεται στα 400 mcg / ημέρα από συμπληρώματα διατροφής ή / και εμπλουτισμένα τρόφιμα, εκτός από την ποσότητα φυλλικού οξέος που λαμβάνεται μέσω της καθημερινής διατροφής.⁵⁰

✓ Εγκυμονούσες γυναίκες

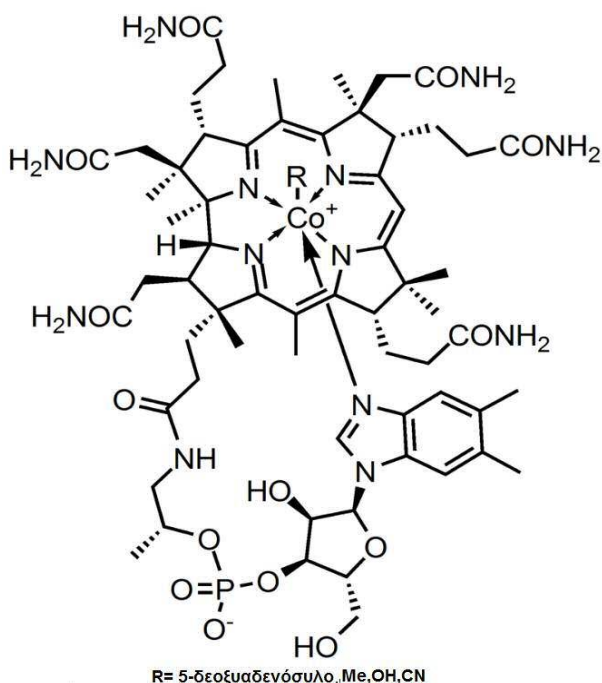
Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, οι απαιτήσεις για φυλλικό οξύ αυξάνονται λόγω σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων. Έτσι, επαρκή ποσότητα φυλλικού οξέος κατά την εγκυμοσύνη θεωρούνται τα 600 mcg, το οποίο είναι δύσκολο να επιτευχθεί μόνο μέσω της διατροφής. Οι γυναίκες με ανεπαρκή πρόσληψη φυλλικού οξέος βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο να γεννήσουν μωρά με ανωμαλίες του νωτιαίου μυελού (NTDS) και κατά συνέπεια εγκυμονεί ο κίνδυνος γέννησης ελλιποβαρών βρεφών, πρόωρου τοκετού και εμβρυϊκής καθυστέρησης και ανάπτυξης.^{50,94}

✓ Άτομα με διαταραχές απορρόφησης

Άτομα με διαταραχές απορρόφησης συμπεριλαμβανομένου των ασθενειών στεατόρροια, κοιλιοκάκη, και φλεγμονώδες έντερο ενδέχεται να απορροφούν χαμηλότερα ποσά φυλλικού οξέος σε σχέση με υγιή άτομα.⁸⁷

1.2.2.9 Βιταμίνη B₁₂ (Κυανοκοβαλαμίνη)

Έχει την πιο περίπλοκη και πιο μεγάλη δομή από όλες τις βιταμίνες. Είναι η μοναδική βιταμίνη που περιέχει ένα μεταλλικό ιόν, το κοβάλτιο και γι' αυτό οι ενώσεις της ονομάζονται «κοβαλαμίνες». Η μεθυλοκοβαλαμίνη και η 5-δεοξαδενοσυλο-κοβαλαμίνη είναι οι μορφές που δραστηριοποιούνται στον ανθρώπινο μεταβολισμό.^{95,96}



Είναι συνδεδεμένη με πρωτεΐνη στα τρόφιμα και απελευθερώνεται παρουσία υδροχλωρικού οξέος και γαστρικών υγρών στο στομάχι. Όταν η συνθετική βιταμίνη B₁₂ προστίθεται σε εμπλουτισμένα τρόφιμα και διαιτητικά συμπληρώματα, είναι ήδη σε ελεύθερη μορφή και δεν απαιτείται το στάδιο της αποδέσμευσης. Η ελεύθερη βιταμίνη συνδυάζεται στη συνέχεια με μια γλυκοπρωτεΐνη που εκκρίνεται από τα τοιχώματα των κύτταρων του στομάχου, και προκύπτει ένα σύμπλοκο που απορροφάται από τον ειλεό από με ενδοκυττάρωση.^{50,96}

Εικόνα 14: Δομή κυανοκοβαλαμίνης

Βρίσκεται φυτικά και ζωικά προϊόντα, όπως ψάρια, κρέας, πουλερικά, αυγά, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα. Τα εμπλουτισμένα δημητριακά και τα προϊόντα με μαγιά αποτελούν άμεσα διαθέσιμη πηγή της βιταμίνης με υψηλή βιοδιαθεσιμότητα για τους χορτοφάγους.⁹⁶

Ανεπάρκεια βιταμίνης B₁₂ προκαλεί μεγαλοβλαστική αναιμία, κόπωση, αδυναμία, δυσκοιλιότητα, απώλεια της όρεξης και βάρους.^{97,98,99} Ενδέχεται να εμφανιστούν και νευρολογικά συμπτώματα όπως μούδιασμα και μυρμήγκιασμα στα χέρια και στα πόδια, δυσκολία στην διατήρηση της ισορροπίας, κατάθλιψη, σύγχυση, άνοια, κακή μνήμη, και πόνος του στόματος ή της γλώσσας.^{50,100} Ποσότητες φυλλικού οξέος μπορούν να καλύψουν τις βλαβερές συνέπειες της έλλειψης βιταμίνης B₁₂ χωρίς ωστόσο να ξεπερνούν τα 1000 mcg ημερησίως σε υγιείς ενήλικες καθώς μπορεί να επιφέρει αρνητικά αποτελέσματα.⁷⁶

Σε μεγαλύτερο κίνδυνο ανεπάρκεια κυανοκοβαλαμίνης βρίσκονται οι ακόλουθες ομάδες

✓ Ηλικιωμένοι

Πάσχουν από ατροφική γαστρίτιδα, μια κατάσταση που επηρεάζει 10% -30% των ηλικιωμένων καθώς μειώνει την έκκριση του υδροχλωρικού οξέος στο στομάχι με αποτέλεσμα την μειωμένη απορρόφηση της βιταμίνης B₁₂ .^{50,101}

✓ Άτομα με γαστρεντερικές διαταραχές

Τα άτομα με εντερικές και στομαχικές διαταραχές, όπως η κοιλιοκάκη και η νόσος του Crohn, δεν είναι σε θέση να απορροφήσουν αρκετή βιταμίνη B₁₂.¹⁰²

✓ Άτομα που έχουν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση του γαστρεντερικού
Χειρουργικές επεμβάσεις στο γαστρεντερικό σωλήνα, όπως η χειρουργική επέμβαση απώλειας βάρους ή χειρουργική επέμβαση για αφαίρεση μέρους του στομάχου, έχει συχνά ως αποτέλεσμα την απώλεια των κυττάρων που εκκρίνουν το υδροχλωρικό οξύ και τον ενδογενή παράγοντα. Αυτό μειώνει την ποσότητα της βιταμίνης B₁₂, ιδιαίτερα των τροφίμων που είναι δεσμευμένη η βιταμίνη.^{50,103}

✓ Χορτοφάγοι

Αυστηροί χορτοφάγοι και vegans βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης ανεπάρκεια βιταμίνης B₁₂, από ό,τι οι γαλακτο-ωο-χορτοφάγοι και οι non vegetarians γιατί οι πηγές βιταμίνης B₁₂ περιορίζονται κυρίως στα ζωικά τρόφιμα. Τα εμπλουτισμένα δημητριακά είναι μία από τις λίγες πηγές βιταμίνης B₁₂ που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διατροφική πηγή βιταμίνης B₁₂ για τους αυστηρούς χορτοφάγους και vegans.⁵⁰

✓ Εγκυμονούσες και θηλάζουσες γυναίκες που ακολουθούν αυστηρή χορτοφαγική διατροφή

Η βιταμίνη B₁₂ διαπερνά τον πλακούντα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και είναι παρούσα στο μητρικό γάλα. Αποκλειστικά θηλάζοντα βρέφη από γυναίκες που δεν καταναλώνουν ζωικά προϊόντα μπορεί να έχουν πολύ περιορισμένα αποθέματα βιταμίνης B₁₂ και μπορεί να αναπτύξουν ανεπάρκεια μέσα σε λίγους μήνες από τη γέννηση που να οδηγήσει σε σοβαρή και μόνιμη νευρολογική βλάβη.^{50,104}

1.3 Προσδιορισμός των λιποδιαλυτών βιταμινών

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για τον προσδιορισμό των λιποδιαλυτών βιταμινών ανάλογα με την βιταμίνη που θα μελετηθεί, ακόμη και επίσημες μέθοδοι όπως μεθόδους AOAC, CEN και ISO. Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι είναι χρωματογραφικές τεχνικές τόσο υγροχρωματογραφίας (LC) και αέριοχρωματογραφίας (GC) όσο και χρωματογραφία λεπτής στιβάδας καθώς και φασματοφωτομετρικές τεχνικές. Έχει εξεταστεί η αποτελεσματικότητα των μεθόδων ως προς την εκχύλιση, την ποσότητα του δείγματος που εξετάζεται, τις χρωματογραφικές τεχνικές (βαθμονόμηση προτύπων αναφοράς, εσωτερικά και εξωτερικά πρότυπα) και την χρήση υλικών αναφοράς για έλεγχο του δείγματος και επικύρωση της μεθόδου.¹⁰⁵

Οι βιταμίνες είναι ενώσεις πολύ ευαίσθητες και ασταθείς στο φως, στον ατμοσφαιρικό αέρα, στη θερμοκρασία, στο pH και σε άλλους χημικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες με αποτέλεσμα ο προσδιορισμός τους να καθίσταται δύσκολος, χρονοβόρος, να απαιτεί υψηλό κόστος και τα αποτελέσματα να παρουσιάζουν μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ τους όχι μόνο από εργαστήριο σε εργαστήριο αλλά και από μέρα σε μέρα ανάλογα με τις εργαστηριακές συνθήκες. Γι' αυτό είναι απαραίτητο ο αναλυτής να λαμβάνει όλα τα απαραίτητα μέτρα για την προστασία των δειγμάτων και των πρότυπων βιταμινών ώστε να διασφαλιστεί η εγκυρότητα της μεθόδου. Ένα άλλο μειονέκτημα που παρουσιάζεται είναι η έλλειψη πολλών πρότυπων υλικών (SRM-Standard Reference Material) για την διαπίστευση των μεθόδων.¹⁰⁶

Ο προσδιορισμός των λιποδιαλυτών βιταμινών είναι δύσκολος σε σχέση με τον προσδιορισμό των λιποδιαλυτών βιταμινών λόγω της διαλυτότητας τους στο λίπος. Καθοριστικό παράγοντα αποτελεί η εκχύλιση τους από την μήτρα-δείγμα ώστε να επιτευχθεί απομάκρυνση του λίπους κυρίως σε τρόφιμα που είναι πλούσια σε λίπος όπως σοκολάτα, κακάο, γάλα. Ανάλογα με το είδος του τροφίμου που μελετάται και το είδος της βιταμίνης που θέλουμε να εκχυλιστεί εφαρμόζεται και ανάλογη μέθοδος εκχύλισης.

1.3.1 Είδη εκχύλισης

Η επιλογή της κατάλληλης εκχύλισης γίνεται με βάση τα παρακάτω κριτήρια:

- i. τη φύση της μήτρας του τροφίμου,
- ii. τη μορφή υπό την οποία η βιταμίνη εμφανίζεται φυσικά ή προστίθεται στο τρόφιμο
- iii. τις ποσότητες των ουσιών παρεμβολής,
- iv. τη σταθερότητα της βιταμίνης στη θερμότητα και τις ακραίες τιμές pH,
- v. την εκλεκτικότητα της αναλυτικής τεχνικής που θα χρησιμοποιηθεί.¹⁰⁷

Οι πιο κοινές μέθοδοι εκχύλισης βασίζονται στην εκχύλιση με οργανικό διαλύτη, στην εκχύλιση στερεάς φάσης και στην εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (SFE). Η σαπωνοποίηση είναι η πιο αποδεκτή μέθοδος για την εκχύλιση της βιταμίνης A, τα καροτενοειδή, της βιταμίνης D και της βιταμίνης E στα τρόφιμα.¹⁰⁶

Κατά την εκχύλιση είναι σημαντικό να αποφευχθούν οι απώλειες των βιταμινών λόγω οξειδωσης. Γι' αυτό το λόγο είναι πρέπει να παίρνονται όλα τα απαραίτητα μέτρα για την αποφυγή σφαλμάτων σε αυτό το στάδιο της ανάλυσης. Μία λύση αποτελεί η εγκατάσταση κατάλληλου φωτισμού με φίλτρο UV που να αποκλείει μήκη κύματος ακτινοβολίας κάτω των 500 nm και η χρήση σκουρόχρωμων υάλινων σκευών.¹⁰⁸

1.3.1.1 Εκχύλιση με οργανικό διαλύτη

a. Σαπωνοποίηση

Ένα ποσοστό των λιποδιαλυτών βιταμινών (FSV) των τροφίμων είναι συνδεδεμένο με ένα σύμπλοκο λιποπρωτεΐνης και έτσι πρέπει να διασπαστεί ο δεσμός αυτός ώστε να απελευθερωθούν οι εστεροποιημένες μορφές τους και να εκχυλιστούν.¹⁰⁸

Η σαπωνοποίηση ή αλκαλική υδρόλυση μπορούν να χρησιμοποιηθεί για τις βιταμίνες A, D, και E, αλλά δεν είναι κατάλληλη για βιταμίνη K βιταμίνη, η οποία αποσυντίθενται γρήγορα σε αλκαλικό περιβάλλον. Πολλά τρόφιμα μπορούν να σαπωνοποιηθούν απευθείας. Δείγματα με υψηλή συγκέντρωση αμύλου, όπως δημητριακά, πρέπει πρώτα να χωνευθούν με το κατάλληλο ένζυμο διασάσης που διασπά το άμυλο σε μαλτόζη πριν την σαπωνοποίηση έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός θρόμβων και συσσωματωμάτων.⁷

Η σαπωνοποίηση είναι μια διαδικασία που καταστρέφει την μήτρα του δείγματος, διευκολύνοντας έτσι την εκχύλιση των βιταμινών καθώς τις μετατρέπει στις ελεύθερες μορφές τους και καταστρέφει άλλες ενώσεις όπως χλωροφύλλες που μπορεί να επηρεάσουν τη χρωματογραφία. Πραγματοποιείται αναρροή του καταλλήλως προετοιμασμένου δείγματος με μίγμα αιθανόλης και 60% w/v υδατικού διαλύματος ΚΟΗ παρουσία κάποιου αντιοξειδωτικού (πυρογαλλόλης, βουτυλιωμένο υδροξυ-τολουόλιο (BHT) ή βιταμίνης C) και αέριου αζώτου για να αποφευχθεί η οξείδωση στους 70°C για 30 λεπτά.

Μετά από σαπωνοποίηση, απαιτείται ταχεία ψύξη του δείγματος και πραγματοποιούνται εκχυλίσσεις υγρού-υγρού (LLE) με μη πολικούς οργανικούς διαλύτες. Το σαπωνοποιημένο κλάσμα που περιέχει τις λιποδιαλυτές βιταμίνες, τις στερόλες, τα καροτενοειδή, και άλλα συστατικά εκχυλίζεται με εξάνιο, διαιθυλαιθέρα ή μίγμα εξανίου και οξικού αιθυλεστέρα, αφήνοντας τα άλατα λιπαρών οξέων και τα άλλα υδατοδιαλυτά συστατικά στην υδατική φάση. Τέλος, οι οργανικές φάσεις συνενώνονται, εξατμίζονται μέχρι ξηρού και επαναδιαλυτοποιούνται με τον διαλύτη της κινητής φάσης. Αυτή η διαδικασία δημιουργεί σημαντικές ποσότητες αποβλήτων και είναι πολύ χρονοβόρα. Η χρήση του εξανίου δεν συνιστάται σε ορισμένες χώρες και η χρήση του μιγμάτων με αιθέρες μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα ασφάλειας για εργαστηριακό περιβάλλον.^{106, 108}

Οι διάφορες διεθνείς μέθοδοι προτείνουν διαφοροποιήσεις στις συνθήκες σαπωνοποίησης ανάλογα με τη βιταμίνη που θέλουμε να προσδιοριστεί, την μήτρα, την ποσότητα του δείγματος που αναλύεται και την περιεκτικότητα του τροφίμου σε λίπος^{109,110}

Για τη βιταμίνη Α απαιτούνται τουλάχιστον 3 εκχυλίσσεις αλλά ακόμη και τότε η βιταμίνη δεν μπορεί να ανακτηθεί πλήρως. Ένας τρόπος για να βελτιωθεί η κατάσταση είναι να χρησιμοποιήσετε στερεάς φάσης εκχύλισης (SPE).¹¹¹ Η βιταμίνη D υφίσταται ισομερίωση με την θερμή σαπωνοποίηση και γι' αυτό απαιτείται κρύα σαπωνοποίηση δηλαδή παρατεταμένη αλκαλική υδρόλυση σε θερμοκρασία δωματίου.¹¹² Η βιταμίνη Ε κατά την σαπωνοποίηση υφίσταται μικρές απώλειες αλλά είναι απαραίτητη η παρουσία του ασκορβικού οξέος ως αντιοξειδωτικό για την προστασία της α-τοκοφερόλη έναντι υπεροξειδωσιών.¹¹³

b. Ενζυμική υδρόλυση

Αποτελεί μια εναλλακτική λύση έναντι της σαπωνοποίησης για την απομάκρυνση των τριγλυκεριδίων. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της βιταμίνης K καθώς δεν είναι σταθερή σε αλκαλικό περιβάλλον. Μελετήθηκε τόσο από την CEN όσο και από τον AOAC και επιτεύχθηκε ταυτόχρονος προσδιορισμός των βιταμινών A, D, E, και K σε βρεφικές τροφές (γάλα και παρασκευάσματα βασισμένα στη σόγια).^{114,115}

Μία ποσότητα δείγματος που περιέχει περίπου 3.5-4.0 g λίπους υδρολύεται για 1 ώρα στους 37 ° C σε pH 7.7 μαζί με κατάλληλο ένζυμο -λιπάση. Μέσω αυτής της επεξεργασίας υδρολύονται αποτελεσματικά τα γλυκερίδια, αλλά μόνο ένα μέρος του παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης και του οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης μετατρέπεται στις αλκοολικές μορφές τους. Η βιταμίνη D και η βιταμίνη K (φυλλοκινόνη) μένουν ανεπηρέαστες.¹¹⁶

c. Αλκοόλυση

Η περιεκτικότητα σε λιπίδια ενός δείγματος μπορεί να απομακρυνθεί με τη μετατροπή των μητρικών γλυκεριδίων στους αντίστοιχους μεθυλικούς εστέρες του μέσω μιας αντίδρασης με μεθανολικό διάλυμα KOH υπό τέτοιες συνθήκες που να ευνοούν την αλκοόλυση έναντι της σαπωνοποίησης.¹¹⁷ Η αλκοόλυση βασίζεται στην αντίδραση KOH και μεθανόλης όπου και σχηματίζεται το μεθοξείδιο του καλίου, το οποίο με τη σειρά του, μετατρέπει τα γλυκερίδια σε μεθυλεστέρες και σαπούνια. Η αντίδραση ολοκληρώνεται μέσα σε 2 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. ως εκ τούτου, η αλκοόλυση είναι μια πολύ γρήγορη και πολύ πιο ήπια διαδικασία σε σύγκριση με την σαπωνοποίηση. Δεν υδρολύει τους εστέρες της βιταμίνης A και κατά συνέπεια υπάρχει μικρότερος κίνδυνος καταστροφής της.¹⁰⁷

d. Άμεση εκχύλιση με οργανικό διαλύτη

Πολυάριθμες δημοσιεύσεις περιγράφουν αυτή την τεχνική για τις λιποδιαλυτές βιταμίνες αλλά δεν έχουν ακόμη πλήρως επικυρωθεί και εγκριθεί ως επίσημες διαδικασίες.¹⁰⁸ Η μέθοδος αυτή αποφεύγει την σαπωνοποίηση με άμεση εκχύλιση με τους οργανικούς διαλύτες. Η εκχύλιση υγρού-υγρού χρησιμοποιείται συχνά για την εκχύλιση των βιταμινών από υγρά τρόφιμα. Ο εξοπλισμός που απαιτείται είναι απλός και σε πολλές περιπτώσεις οι οργανικές φάσεις είναι συμβατές με τις κινητές φάσεις του χρωματογράφου. Ο προσδιορισμός των λιποδιαλυτών βιταμινών από στερεά τρόφιμα περιλαμβάνει ένα προηγούμενο στάδιο έκπλυσης-καθαρισμού. Η αναγκαιότητα αυτού του σταδίου εξαρτάται

από την παρεμβολή άλλων ουσιών μεταξύ δείγματος και αναλύτη και από την ευαισθησία και την εκλεκτικότητα της μεθόδου HPLC που χρησιμοποιείται.

Για την εκχύλιση της βιταμίνης D, οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι ακετονιτρίλιο, διαιθυλαιθέρας και μίγματα όπως μεθανόλη-τολουόλιο, τετραϋδροφουράνιο (THF) -διαιθυλαιθέρας. Για την εκχύλιση της βιταμίνης E χρησιμοποιούνται επτάνιο, ξυλόλιο, διαιθυλαιθέρας και εξάνιο. Η βιταμίνη A εκχυλίζεται ταυτόχρονα με τη βιταμίνη E χρησιμοποιώντας εξάνιο, χλωροφόρμιο και μίγμα οξικού αιθυλεστέρα-βουτανόλης. Οι βιταμίνες D και E εκχυλίζονται μεμονωμένα, χρησιμοποιώντας διαφορετικούς διαλύτες όπως διχλωρομεθάνιο, διαιθυλαιθέρας και εξάνιο.¹⁰⁷

1.3.1.2 Εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (SFE)

Τα υπερκρίσιμα ρευστά βρίσκονται πάνω από την κρίσιμη θερμοκρασία και πίεση τους έχουν ενδιάμεσες ιδιότητες μεταξύ υγρών και αερίων. Μεταβάλλοντας τις συνθήκες, η πυκνότητα, το ιξώδες και η ικανότητα διαλυτοποίησης τους μπορεί να αλλάξει. Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι ότι οι συνθήκες εκχύλισης είναι ηπιότερες και μπορεί να διεξαχθεί σε χαμηλότερες θερμοκρασίες από ό,τι εκχύλιση υγρού-υγρού, μειώνοντας έτσι την υποβάθμιση του αναλύτη και κατά συνέπεια των βιταμινών. Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης το δείγμα βρίσκεται επίσης σε αδρανή ατμόσφαιρα και προστατεύεται από το φως.

Η εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού με διοξείδιο του άνθρακα είναι κατάλληλη για την εκχύλιση λιποδιαλυτών ουσιών σε διάφορες μήτρες, καθώς το υπερκρίσιμο CO₂ έχει υψηλή διαλυτική ικανότητα για μη πολικές ενώσεις.¹⁰⁷ Ωστόσο, ένα μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η μικρή ποσότητα δείγματος η οποία χρησιμοποιείται (500 mg) με αποτέλεσμα μικρότερη ακρίβεια στα αποτελέσματα για ετερογενή μήτρες τροφίμων, όπως οι παιδικές τροφές σε σκόνη.

Η μέθοδος αυτή έχει μελετηθεί συνεργατικά από διάφορα εργαστήρια και τα προϊόντα που έχουν αναλυθεί είναι γάλα σε σκόνη, παρασκευάσματα για βρέφη, χοιρινό κρέας και κιμάς, και πάστα συκωτιού υψηλής και χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά.¹¹⁸ Η φυλλοκινόννη έχει προσδιοριστεί σε βρεφική τροφή σε σκόνη χρησιμοποιώντας υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα υπό πίεση 8000 psi στους 60 °C για 15 λεπτά.¹¹⁹ Μια παρόμοια τεχνική

εφαρμόσθηκε για την εκχύλιση του παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης από προϊόντα σιτηρών.¹²⁰

1.3.1.3 Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)

Είναι η ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την προετοιμασία ,τον καθαρισμό και την εκχύλιση του δείγματος τα τελευταία χρόνια. Με την τεχνική αυτή οι μέθοδοι είναι ταχείες και επιλεκτικές προσφέροντας καλές ανακτήσεις και χρησιμοποιώντας μικρότερες ποσότητες οργανικού διαλύτη από ό,τι άλλες τεχνικές όπως η εκχύλιση υγρού-υγρού. Ένα άλλο πλεονεκτήματα της SPE είναι τα μειωμένα προβλήματα μόλυνσης και η εύκολη αυτοματοποίηση της διαδικασίας, διευκολύνοντας την κατεργασία του δείγματος με την χρήση κατάλληλων φυσιγγίων SPE.^{121,122,123}

Ο συνδυασμός SPE και HPLC αποτελεί ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την ποσοτικοποίηση των βιταμινών σε τρόφιμα. Διάφορες μη αυτοματοποιημένες μέθοδοι για την ταυτόχρονη εκχύλιση των λιποδιαλυτών βιταμινών προτείνουν τη χρήση C18¹²⁴ ή διοξείδιο του πυριτίου¹²⁵ ως προσροφητικού υλικού. Μια εναλλακτική λύση για μικρού όγκου δείγματα είναι η στερεάς φάσης μικροεκχύλιση (SPME).Η μέθοδος αυτή έχει μελετηθεί για την εκχύλιση των βιταμινών A ,D₃ και E χρησιμοποιώντας ως ίνες SPME πολυμεθυλοσιλοξάνης(PDMS) και διαλύτες υδατικό ακετονιτρίλιο, μεθανόλη και 2-προπανόλη.¹²⁶

Μια τέτοια μέθοδος καθαρισμού και προσυγκέντρωσης σε συνδυασμό με την HPLC έχει αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό των υδρόξυ μεταβολιτών της βιταμίνης D₃. Έχουν γίνει βελτιστοποιήσεις της μεθόδου αυτή και τώρα χρησιμοποιείται για αναλύσεις ρουτίνας σε κλινικές και νοσοκομεία καθώς είναι εύκολη, αυτοματοποιημένη και χαμηλού κόστους. Έχει επεκταθεί και εφαρμόζεται και για τον προσδιορισμό των βιταμινών A ,D₂,D₃,E,K₁ και K₃.¹²⁷

1.3.2 Χρωματογραφικές τεχνικές

1.3.2.1 Υγροχρωματογραφία (LC)

Η υγροχρωματογραφία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για δείγματα που περιέχουν μεγάλα μόρια ή ιονισμένα σωματίδια με χαμηλές τάσεις ατμών και για θερμικά ασταθείς ενώσεις που δε μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν. Στην υγροχρωματογραφία η κινητή φάση

είναι υγρή ενώ η στατική στερεά. Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική φάση επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση αντλιών υψηλής πίεσης, όταν η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου (επομένως μεγάλης αντίστασης) σωματίδια υψηλής διαχωριστικής απόδοσης (Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης ή Απόδοσης - HPLC). Η χρησιμοποίηση των υλικών πλήρωσης σωματιδίων μεγέθους 2-10 μm στη σύγχρονη υγρή-χρωματογραφία απαιτεί την ανάπτυξη πιέσεων από τις αντλίες της τάξης μερικών χιλιάδων psi για να γίνει δυνατή η επίτευξη ικανοποιητικών ταχυτήτων ροής του υλικού έκλουσης.¹²⁸

Ο διαχωρισμός των βιταμινών μπορεί να επιτευχθεί είτε χρωματογραφία κανονικής είτε αντίστροφης φάσης. Στη λειτουργία κανονικής φάσης, μια πολική (υδρόφιλη) στατική φάση χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με μια μη πολική κινητή φάση. Ο διαχωρισμός βασίζεται στη σχετική πολικότητα των διαλυμένων ουσιών και συγγένεια τους με τη στατική φάση. Έτσι, οι μη πολικές ενώσεις προτιμούν την κινητή φάση και εκλούνται πρώτες και οι περισσότερες πολικές εκλούνται αργότερα. Στη λειτουργία αντίστροφης φάσης, μια μη πολική στατική φάση χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με μια πολική κινητή φάση και έτσι οι πολικές ενώσεις εκλούνται πριν από τις μη πολικές.¹⁰⁷

Για τον προσδιορισμό των βιταμινών χρησιμοποιούνται κυρίως οι παρακάτω ανιχνευτές:¹²⁸

I. Ανιχνευτές υπεριώδους (UV)

Τα φωτόμετρα φίλτρου με πηγή λυχνία υδραργύρου είναι, οι απλούστατοι ανιχνευτές απορρόφησης UV. Πιο συχνά, απομονώνεται από τα φίλτρα η γραμμή έντασης στα 254 nm. Σε ορισμένα όργανα επιλέγονται οι γραμμές 250, 334 και 365 nm με επιλογή κατάλληλου φίλτρου. Είναι προφανές ότι αυτός ο τύπος ανιχνευτή περιορίζεται σε ενώσεις που απορροφούν στα προαναφερθέντα μήκη κύματος. Χαρακτηριστικές οργανικές ομάδες και ένας αριθμός ανόργανων ουσιών παρουσιάζουν ευρείες περιοχές απορρόφησης που περιλαμβάνουν ένα ή περισσότερα από αυτά τα μήκη κύματος. Οι λυχνίες δευτερίου ή πυράκτωσης βολφραμίου με φίλτρα συμβολής παρέχουν επίσης έναν απλό τρόπο προσδιορισμού συστατικών που απορροφούν καθώς εκλούνται από την στήλη. Οι διατάξεις αυτές είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για επαναλαμβανόμενες ποσοτικές αναλύσεις όπου η ποιοτική σύσταση του δείγματος είναι γνωστή έτσι ώστε να μπορεί να επιλεγεί μια αλληλουχία κατάλληλων φίλτρων.

II. Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (DAD)

Οι διατάξεις αυτές αποτελούν τους αποδοτικότερους φασμαφωτομετρικούς ανιχνευτές υπεριώδους. Τέτοιες διατάξεις προσφέρονται για συλλογή δεδομένων ενός πλήρους φάσματος σε χρόνο περίπου ενός δευτερολέπτου. Υπάρχουν διάφορες επιλογές στην λειτουργία τους. Μπορεί να επιλεγεί ένα μόνο μήκος κύματος, ή όταν τα εκλούμενα συστατικά διαχωρίζονται ικανοποιητικά, μπορούν να επιλεγούν διαφορετικά μήκη κύματος για κάθε κορυφή. Έτσι συλλέγονται και αποθηκεύονται φασματικά δεδομένα για κάθε χρωματογραφική κορυφή κατά την έξοδο από την στήλη. Ένας τύπος παρουσίασης χρήσιμος για την ταυτοποίηση συστατικών είναι ένα τρισδιάστατο γράφημα.

III. Ανιχνευτής φθορισμού (FLD)

Ο φθορισμός παρατηρείται με φωτοηλεκτρικό ανιχνευτή τοποθετημένο σε γωνία 90° σε σχέση με τη δέσμη διέγερσης. Οι πιο απλοί ανιχνευτές χρησιμοποιούν πηγή λυχνία Hg ή Xe με φίλτρα ή μονοχρωμάτορα. Παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία, η οποία είναι μεγαλύτερη από μια τάξη μεγέθους από τις περισσότερες μεθόδους απορρόφησης. Το πλεονέκτημα αυτό εκμεταλλεύεται η υγροχρωματογραφία για τον διαχωρισμό και προσδιορισμό των συστατικών δειγμάτων που φθορίζουν. Συχνά ο αριθμός των φθορίζόντων συστατικών μπορεί να αυξηθεί με προκαταρκτική επεξεργασία των δειγμάτων με αντιδραστήρια που σχηματίζουν φθορίζοντα παράγωγα.

Ο προσδιορισμό των βιταμινών στα τρόφιμα και η ποσοτικοποίηση τους είναι συχνά αδύνατος χρησιμοποιώντας μια μόνο στήλη. Αυτό συμβαίνει επειδή οι χρωματογραφικές τεχνικές καθαρισμού αποτυγχάνουν να αφαιρέσουν αποτελεσματικά τις λιπιδικές ουσίες που έχουν παρόμοια πολικότητα με τις βιταμίνες με αποτέλεσμα οι ουσίες αυτές να παρεμβαίνουν στην χρωματογραφία. Επομένως, σε τέτοιες περιπτώσεις κρίνεται αναγκαία η χρήση HPLC με δύο συστήματα, κανονικής και αντίστροφης φάσης παρέχοντας καλύτερη εκλεκτικότητα από ό,τι η χρήση δύο στηλών με την ίδια φάση. Οι στήλες που χρησιμοποιούνται κυρίως είναι C18 και C30 για διαχωρισμό των cis-trans ισομερών.¹²⁹

Αν η έρευνα επικεντρώνεται για το διαχωρισμό των διαφόρων ισομερών της βιταμίνης A, τότε η μέθοδος που επιλέγεται είναι η χρωματογραφία προσρόφησης. Υλικά πλήρωσης των στηλών όπως η σίλικα απαιτούν ένα μη πολικό διαλύτη έκλουσης (πχ ν-εξάνιο) και σε μικρότερο ποσοστό ένα περισσότερο πολικό διαλύτη. Στήλες αντίστροφης φάσης (C18 και C8) χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό των εστέρων της ρετινόλης και για μίγματα

ρετινόλης και καροτενοειδών σε εκχυλίσματα τροφίμων και κλινικά δείγματα. Οι περισσότερες ημιυδατικές κινητές φάσεις αποτελούνται από μείγματα μεθανόλης ή ακετονιτριλίου και νερό απαιτούν 1 ώρα για την έκλουση της βιταμίνης Α. Η βαθμιαία έκλουση επιταχύνει το διαχωρισμό των δυο εστέρων της ρετινόλης. Σε συνθήκες ισοκρατικής μη υδατικής αντίστροφης φάσης (NARP) μίγμα ακετονιτριλίου - διχλωρομεθάνιου μπορεί να διαχωρίσει τους εστέρες της ρετινόλης εντός 15 λεπτών καθώς αυτές οι συνθήκες (NARP) σε ημιυδατικά συστήματα παρουσιάζουν αυξημένη διαλυτότητα έναντι των λιπιδίων. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές για τον προσδιορισμό της βιταμίνης Α είναι οι ανιχνευτές απορρόφησης UV, οι ανιχνευτές φθορισμού επειδή η ρετινόλη και οι εστέρες της έχουν την ικανότητα να φθορίζουν και οι ανιχνευτές φασματομετρίας μαζών.

Όσον αφορά τα καροτενοειδή τα συστήματα κανονικής φάσης έχουν το πλεονέκτημα ότι είναι συμβατά με εκχυλίσματα σε εξάνιο. Στήλες πληρωμένες με σίλικα και αλουμίνιο είναι κατάλληλες για τον διαχωρισμό των γεωμετρικά ισομερών (cis-trans) και διαστερεοϊσομερών, αλλά όχι των ισομερών θέσης (α-,β-καροτένιο). Η πλειοψηφία των μεθόδων βασίζεται στη χρωματογραφία αναστροφής φάσης. Χρησιμοποιούνται μίγματα ακετονιτριλίου-μεθανόλης που περιέχουν επίσης διχλωρομεθάνιο, χλωροφόρμιο ή τετραυδροφουράνη. Άλλες φορές εφαρμόζεται βαθμιδωτή έκλουση για να γεφυρώσει τις μεγάλες διαφορές πολικότητας μεταξύ ξανθοφυλλών και υδρογονανθράκων των καροτενίων και άλλες φορές ισοκρατική έκλουση για ευρύτερο διαχωρισμό των καροτενοειδών. Σε σύνθετα δείγματα συχνά απαιτείται τη συμπληρωματική χρήση στήλης αντίστροφης φάσης (C18) με έναν πολικό (κυανο) προσροφητή. Με τον σύγχρονο εξοπλισμό, είναι δυνατόν να επιτευχθεί ακριβής και επαναλήψιμος διαχωρισμός και ποσοτικοποίηση των καροτενοειδών, των ρετινοειδών και των τοκοφερολών μέσα σε 10 λεπτά για εκχυλίσματα του πλάσματος και άλλα βιολογικά δείγματα. Οι χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές είναι οι ανιχνευτές απορρόφησης UV και οι ανιχνευτές φασματομετρίας μαζών.

Ο διαχωρισμός των μεταβολιτών της βιταμίνης D εξαρτάται ανάλογα με τον αριθμό και τη θέση των υδροξυ-ομάδων στο μόριο. Συνήθως χρησιμοποιείται μίγμα δυο ή τριών διαλυτών ως κινητή φάση, εξάνιο-2-προπανόλη-διχλωρομεθάνιο. Ωστόσο, οι D₂ και D₃ μητρικές παραμένουν αδιάλυτες σε σύστημα κανονικής φάσης και γι' αυτό προτιμώνται συστήματα αντίστροφης φάσης με κινητή φάση τα μίγματα νερό-μεθανόλη ή νερό-ακετονιτρίλιο. Η βιταμίνη D και οι μεταβολίτες του μπορεί να ανιχνευθεί με ανιχνευτή απορρόφησης UV (264

nm). Ωστόσο, λόγω της φτωχής εκλεκτικότητας και ευαισθησίας αυτής της μεθόδου η ποσοτικοποίηση δεν είναι δυνατή και πραγματοποιείται με άλλες δοκιμασίες. Η βιταμίνη D₂ χρησιμοποιείται συνήθως ως εσωτερικό πρότυπο για τη βιταμίνη D₃.

Για τον διαχωρισμό των τοκοφερόλες και των τοκοτριενόλες εφαρμόζεται χρωματογραφία κανονικής φάσης. Αυτό επιτυγχάνεται με χρήση στηλών πληρωμένων με σίλικα και μιγμάτων διαλυτών έκλουσης εξάνιο-δισοπροπυλαιθέρα ή εξάνιο-2-προπανόλη. Έτσι, η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για δείγματα φυτικών ελαίων, μετά από απλή διαλυτοποίηση σε εξάνιο. Ο προσδιορισμός των α-, γ- και δ- τοκοφερολών βασίζεται στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης με ισοκρατική έκλουση. Η κινητή φάση αποτελείται από μεθανόλη και σε ένα μικρό ποσοστό από νερό. Η προσθήκη ηλεκτρολυτών επιτρέπει την ηλεκτροχημική ανίχνευση της βιταμίνης E. Υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα επιτυγχάνεται με τη χρήση ανιχνευτών φθορισμού ή με ηλεκτροχημικούς ανιχνευτές. Με τον ανιχνευτή φθορισμού σε χαμηλό μήκος κύματος (205 nm) βελτιώνονται τα όρια ανίχνευσης αλλά εις βάρος της εκλεκτικότητας σε σύγκριση με τη χρήση των 295 nm. Με τον ηλεκτροχημικό ανιχνευτή σε κατάσταση οξειδωσης (αμπερομετρία ή κουλομετρία) αυξάνεται η ευαισθησία μέχρι και 20 φορές.

Στις αναλύσεις ρουτίνας, συνήθως χρησιμοποιούνται τα 292-295nm. Αν πραγματοποιείται ταυτόχρονος προσδιορισμός ρετινόλης και καροτενοειδών τότε προτιμάται ανιχνευτής συστοιχίας διοδίων.

Η χρωματογραφία προσρόφησης διευκολύνει τον διαχωρισμό των cis- trans ισομερών της βιταμίνης K₁ και συμβάλλει στο περαιτέρω καθαρισμό των ακατέργαστων εκχυλισμάτων. Υπό καθορισμένες συνθήκες, η K₁ διαχωρίζεται από διαφορετικές τάξεις λιπιδίων αλλά συν-εκλύεται με το εσωτερικό πρότυπο, το οποίο είναι ένα ομόλογο της βιταμίνης K₁ που δεν υπάρχει φυσικά στο δείγμα και γι' αυτό το κλάσμα αυτό συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και υπόκεινται σε ένα περαιτέρω αναλυτικό στάδιο. Τα σύγχρονα χρωματογραφικά συστήματα μπορούν να εξαλείψουν το στάδιο εξάτμισης αυξάνοντας την ευαισθησία ανίχνευσης. Με την χρωματογραφία αντίστροφης φάσης μπορεί εύκολα να διαχωριστεί η βιταμίνη K₁ από λιπίδια με συγγενή πολικότητα και από ανάλογα που χρησιμοποιούνται ως εσωτερικό πρότυπο. Οι ανιχνευτές απορρόφησης UV είναι κατάλληλοι μόνο για την ποσοτικοποίηση υψηλών συγκεντρώσεων βιταμίνης K₁. Οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές απαιτούν ημιωδατική κινητή φάση και σύστημα αντίστροφης φάσης διαφορετικά είναι απαραίτητη η προσθήκη ηλεκτρολύτη μετά τη στήλη με συνέπεια μειωμένη ευαισθησία. Τέλος, οι ανιχνευτές

φθορισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση της βιταμίνης K₁ αλλά επειδή η K₁ δεν φθορίζει πρέπει να υποστεί μια τροποποίηση ώστε να μετατραπεί σε φθορίζον μόριο.^{130,131}

1.3.2.2 Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Είναι μέθοδος επίπεδης χρωματογραφίας όπου χρησιμοποιείται ένα λεπτό επίπεδο στρώμα μιας ουσίας και τοποθετείται ως φύλλο σε μια επιφάνεια υάλου, πλαστικού ή μετάλλου. Η κινητή φάση διέρχεται μέσα από τη σταθερή φάση με τριχοειδή φαινόμενα που μερικές φορές υποβοηθούνται και από την βαρύτητα ή από ένα ηλεκτρικό πεδίο. Αποτελεί ένα γρήγορο και οικονομικό οδηγό εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών διαχωρισμού των ενώσεων.¹²⁸

Χρησιμοποιείται σπάνια για την ανάλυση της βιταμίνης A. Εναλλακτικά χρησιμοποιείται Υγροχρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC) σε συνδυασμό με πυκνομετρική σάρωση. Όσον αφορά τα καροτενοειδή συμβάλει στην προκλασματοποίηση και την ταυτοποίηση τους και όχι στον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Ανιχνεύονται με βάση το χρώμα μέσω πυκνομετρικής σάρωσης στα 450 nm. Ευρέως χρησιμοποιημένες απορροφητικές ουσίες είναι η σίλικα η οποία παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα ως προς τα ισομερή των καροτενοειδών.

Για τον προσδιορισμό της βιταμίνης D χρησιμοποιείται η HPTLC καθώς αποτελεί μια πιο οικονομική λύση υγρής χρωματογραφίας για τον καθαρισμό και την προκλασματοποίηση των λιπιδίων πριν από την αέρια χρωματογραφία. Στα τρόφιμα, η βιταμίνη D εφαρμόζεται σε συνδυασμό με φωτοπυκνομετρία στα 266 nm ή μετά τον ψεκασμό με χρωμογόνο αντιδραστήριο σε υψηλότερα μήκη κύματος. Ως τεχνική για τον διαχωρισμό των αναλόγων της έχει αντικατασταθεί από την Υγροχρωματογραφία με εκχύλιση SPE.

Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό της βιταμίνης E ως ένα στάδιο καθαρισμού σε σχέση με την χρωματομετρία ή την αεριοχρωματογραφία επειδή αποτελεί η μοναδική τεχνική διαχωρισμού των β- και γ- τοκοφερολών. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πραγματοποιείται φωτοπυκνομετρική σάρωση σε συνδυασμό με HPTLC.

Στον προσδιορισμό της βιταμίνης K₁ μπορούν να εφαρμοστούν τρεις τύποι TLC: (1) χρωματογραφία προσρόφησης σε πλάκες σίλικας επιτρέποντας έτσι το διαχωρισμό των

cis-trans ισομερών,(2) χρωματογραφία αργυρώσεως για τον διαχωρισμό των κορεσμένων και των ακόρεστων ομολόγων της βιταμίνης K₁ και (3) χρωματογραφία αντίστροφης φάσης επιτρέποντας τον διαχωρισμό των μεθυλιωμένων και απομεθυλιωμένων K-βιταμερών. Τώρα πια η μέθοδος αυτή έχει αντικατασταθεί από την υγρή χρωματογραφία.^{130,131}

1.3.2.3 Αεριοχρωματογραφία (GC)

Υπάρχουν δυο τύποι αέριας χρωματογραφίας ανάλογα με την στατική φάση. Σε αντίθεση με τα άλλα είδη χρωματογραφίας η κινητή φάση δεν αλληλοεπιδρά με τα μόρια του αναλύτη. Η κινητή φάση είναι πάντα αέρια ενώ η στατική φάση μπορεί να είναι είτε στερεή (αέρια-στερεή χρωματογραφία, GSC) είτε υγρή (αέρια-υγρή χρωματογραφία, GLS) . Στη GSC ο διαχωρισμός οφείλεται στην προσρόφηση ή το μοριακό αποκλεισμό των συστατικών του μίγματος στη στατική φάση. Στην GLS ή απλώς αεριοχρωματογραφία (GC), ο διαχωρισμός των συστατικών (αέριων ή πτητικών) βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ της αέριας κινητής και μιας υγρής φάσης, η οποία είναι ακινητοποιημένη στην επιφάνεια ενός αδρανούς αερίου. Ο διαχωρισμός οφείλεται στη διέλευση των συστατικών μέσα από την στήλη με διαφορετικές ταχύτητες. Η ταχύτητα διαχωρισμού των συστατικών μέσα στην στήλη εξαρτάται από τις τάσεις ατμών των συστατικών και τις αλληλεπιδράσεις τους με την στατική φάση.^{128,132}

Είναι δύσκολος ο προσδιορισμός της βιταμίνης A με χρήση αέριας χρωματογραφίας επειδή είναι πολύ ασταθής ένωση και σε συνδυασμό με χρήση στήλης που δεν περιέχει αδρανοποιημένο υλικό πλήρωσης οι απώλειες είναι μεγάλες. Ωστόσο, παρατηρήθηκε πως οι τριχοειδείς στήλες αποσυνθέτουν σε μικρό βαθμό τη ρετινόλη. Έτσι ανοίγονται νέες προοπτικές για την αεριοχρωματογραφία μάζας (GC-MS) και ειδικά για την ταυτοποίηση των καροτενοειδών καθώς σε αντίθεση με την ρετινόλη είναι ανθεκτικότερα στην θερμοκρασία.

Κατά την αεριοχρωματογραφία η βιταμίνη D και οι μεταβολίτες της υπόκεινται σε ορισμένα δυσμενή φαινόμενα, όπως προσρόφηση στην στήλη αφυδάτωση των 25-υδροξυ παραγώγων και θερμική αναδιάταξη. Ανίχνευση των παραγώγων των τριμεθυλοσιλάνιων με πρόσκρουση ηλεκτρονίων ή φασματομετρία μάζας-ιονισμού οδηγεί σε καλύτερη εκλεκτικότητα και ευαισθησία, επιτρέποντας έτσι τον προσδιορισμό της βιταμίνης D, της 25-υδροξυ-βιταμίνης D και των διυδροξυλιωμένων μεταβολιτών της στο πλάσμα ή στα τρόφιμα.

Η αεριοχρωματογραφία είναι επιτυχημένη για την ανάλυση της βιταμίνης Ε όταν συνδυάζεται με φασματομετρία μάζας (MS). Στην λειτουργία SIM (selected ion monitoring) χρησιμοποιείται ένα δευτεριωμένο εσωτερικό πρότυπο GC-MS επιτρέποντας την καλύτερη ποσοτικοποίηση της α-τοκοφερόλης μέσα σε λίγα λεπτά. Με την χρήση τριχοειδών στηλών μπορεί να επιτευχθεί διαχωρισμός των β- και γ-τοκοφερολών. Για αναλύσεις ρουτίνας σε βιολογικά δείγματα ο προσδιορισμός της βιταμίνης Ε γινόταν με GC με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας αλλά τώρα πια σε μεγάλο βαθμό έχει αντικατασταθεί από το LC.

Λόγω των μεγάλων χρόνων κατακράτησης και την αποικοδόμηση των Κ-βιταμερών πάνω στην στήλη, η εφαρμογή του GC καθίσταται δύσκολη. Ωστόσο, μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση κατάλληλων στηλών και ανιχνευτή ιονισμού φλόγας επιτυγχάνοντας έτσι καλύτερη ευαισθησία και εκλεκτικότητα.^{130,131}

1.4 Προσδιορισμός των λιποδιαλυτών βιταμινών σε παιδικές τροφές με HPLC

Ο προσδιορισμός των βιταμινών ως επί το πλείστο πραγματοποιείται με τεχνικές υγρής χρωματογραφίας. Υπάρχουν πολλοί μέθοδοι προσδιορισμού των λιποδιαλυτών βιταμινών με χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε βρεφικές και παιδικές τροφές. Αρκετές είναι και οι επίσημοι μέθοδοι (AOAC, CEN, ISO) που έχουν αναπτυχθεί κυρίως για τον προσδιορισμό των βιταμινών Α, Ε και D. Η βιταμίνη Κ δεν έχει απασχολήσει τόσο πολύ την επιστημονική κοινότητα τουλάχιστον σε αυτό το είδος τροφίμων.

Τα τελευταία έχει αλλάξει η νομοθεσία σε πολλές χώρες για να ενισχύσει την ασφάλεια των τροφίμων εξασφαλίζοντας ότι οι ποσότητες των λιποδιαλυτών βιταμινών είναι σύμφωνη με την αναγραφόμενη των ετικετών των προϊόντων αποφεύγοντας έτσι πιθανούς κινδύνους για την υγεία που συνδέονται με υπερδοσολογία, ιδιαίτερα της βιταμίνης D. Έτσι οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται από τους φορείς πρέπει να είναι κατάλληλες για τον σκοπό αυτό παρέχοντας ορθότητα και ακρίβεια. Έχουν δημοσιευτεί επίσης μέθοδοι από οργανισμούς όπως AOAC INTERNATIONAL, European Committee for Standardization (CEN), International Dairy Federation (IDF), U.S. Pharmacopeia (USP) και International Organization for Standardization (ISO).¹⁰⁸

Η επιτροπή του AOAC αρχικά εγκρίνει μια μέθοδο ως επίσημη μέθοδο «Πρώτη Δράση» όπου χαρακτηρίζεται έτσι για 2 χρόνια. Κατά το διάστημα αυτό, η μέθοδος χρησιμοποιείται

σε εργαστήρια που την αξιολογούν. Με το πέρασμα των 2 ετών η επιτροπή αξιολογεί αν η μέθοδος αυτή μπορεί να αποτελέσει επίσημη μέθοδο «Τελικής Δράσης». Μέσω της διαδικασίας αυτής έχει αναπτυχθεί οι παρακάτω μέθοδοι για των προσδιορισμό των βιταμινών Α και Ε:¹³³

- ✓ ΑΟΑC Επίσημη Μέθοδο 2011.07 :Βιταμίνη Α σε βρεφικές τροφές και τροφές για ενήλικες με UPLC-UV -Πρώτη Δράση 2011 ¹³³
- ✓ ΑΟΑC Επίσημη Μέθοδο 2.012.09:Προσδιορισμός των βιταμινών Α και σε παρασκευάσματα για βρέφη και ενήλικες βρέφη με HPLC -UV και ανιχνευτή φθορισμού- Πρώτη Δράσης 2012 ¹³⁴
- ✓ ΑΟΑC Επίσημη Μέθοδο 2012.10 :Ταυτόχρονος προσδιορισμός του 13-cis και all-trans παλμιτικού εστέρα της βιταμίνης Α (παλμιτικής ρετινόλης), του οξικού εστέρα της βιταμίνης Α (οξικής ρετινόλη)και της ολικής βιταμίνης Ε (dl-α-τοκοφερόλης και οξικής dl-α-τοκοφερόλης) σε παρασκευάσματα για βρέφη και ενήλικες με κανονικής φάσης HPLC - Πρώτη δράση 2012¹³⁵

Μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί και από άλλους επίσημους φορείς όπως από το Υπουργείο Υγείας της Κίνας με την μέθοδο GB 5413.9 για τον προσδιορισμό των βιταμινών Α:,D και Ε σε γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα για βρέφη και παιδιά.¹³⁶

Οι μέθοδοι αυτοί πλεονεκτούν έναντι όλων των άλλων μεθόδων στην ακρίβεια, στην επαναληψιμότητα και στη αναπαραγωγιμότητα αλλά παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα. Είναι πολύ χρονοβόρες και απαιτούν πολύ χρόνο από τον αναλυτή. Το κόστος τους είναι υψηλό λόγω των πολλών αντιδραστηρίων και αναλυσίμων που απαιτούν με συνέπεια να μην είναι εφαρμόσιμες σε εταιρίες–βιομηχανίες που πραγματοποιούν καθημερινούς ελέγχου στα προϊόντα τους και σε εξωτερικά εργαστήρια που πραγματοποιούν όγκο αναλύσεων. Για τους παραπάνω λόγους προτιμώνται άλλες μέθοδοι ακόμη και όταν δεν είναι επίσημες που να ταιριάζουν με τις ανάγκες της εταιρίας (**fit for purpose**) να είναι γρήγορες και οικονομικές. Ανάλογα με τον εργαστηριακό εξοπλισμό και την μήτρα του τροφίμου μπορούν να δοκιμαστούν διάφορες μέθοδοι μέχρι να βρεθεί μια που να ανταποκρίνεται αποτελεσματικά στην ανάλυση των βιταμινών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ-ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Εισαγωγή

Ύστερα από βιβλιογραφική έρευνα , μελετήθηκαν οι μέθοδοι και εξετάστηκαν οι χρωματογραφικές συνθήκες(στήλες, ανιχνευτές, ροή, κινητή φάση κλπ.).Κατόπιν έγιναν παραγγελίες των πιο συμβατών αναλώσιμων με τον εξοπλισμό και τις ανάγκες του εργαστηρίου. Επιλέχθηκαν να δοκιμαστούν οι πιο ταιριαστές μέθοδοι και κυρίως αυτές που ανταποκρίνονταν στην ανάπτυξη μεθόδου fit for purpose.

Ανάμεσα στις μεθόδους που εξετάστηκαν υπήρχαν παραπάνω επίσημες μέθοδοι ΑΟΑC και ΕΝ.Ωστόσο ήταν πολύπλοκες, χρονοβόρες και δεν υπήρχε ο κατάλληλος εξοπλισμός ώστε να δοκιμαστούν εξαρχής. Γι' αυτό το λόγο αποφασίστηκε να δοκιμαστούν άλλες μεθόδους πιο απλές που να ανταποκρίνονται καλύτερα στο σκοπό μας.

Έτσι, ερευνήθηκαν και αναπτύχθηκαν οι μέθοδοι των παρακάτω άρθρων:

- I. Γρήγορος προσδιορισμός των βιταμινών Α και Ε σε βρεφικές τροφές μέσω RP-HPLC¹³⁷
- II. Προσδιορισμός των βιταμινών Α και Ε σε βρεφικές τροφές μέσω HPLC-UV ¹³⁸

Έγιναν βελτιστοποιήσεις των μεθόδων αυτών ώστε να μπορέσουν να ανταποκριθούν στη μήτρα των παιδικών τροφών που αναλύθηκαν.

2.2 Δείγματα που μελετήθηκαν

Για τις ανάγκες της εργασίας αυτής αναλύθηκαν οι παρακάτω παιδικές τροφές:

- Sanilac 1 & 2: Σκόνες γάλακτος 1^{ης} και 2^{ης} βρεφικής ηλικίας
- Sanilac 3 : Σκόνες γάλακτος για μικρά παιδιά μετά τους 12 μήνες
- Φαρίν Λακτέ: μεταποιημένες τροφές με βάση τα δημητριακά που προορίζονται για κατανάλωση από βρέφη κατά την περίοδο του απογαλακτισμού και από παιδιά μικρής

ηλικίας ως συμπλήρωμα του διαιτολογίου τους ή και για την σταδιακή προσαρμογή τους στην κανονική διατροφή

- ο Λευκή Φαρίν Λακτέ (Φαρίν Λακτέ Ελεύθερη Βιταμινών) :Σαν την προηγούμενη Φαρίν Λακτέ αλλά δεν περιέχει βιταμίνες



Εικόνα 15: Αναλυθέντα δείγματα

2.3 Γρήγορος προσδιορισμός των βιταμινών Α και Ε σε βρεφικές τροφές μέσω RP-HPLC¹³⁷

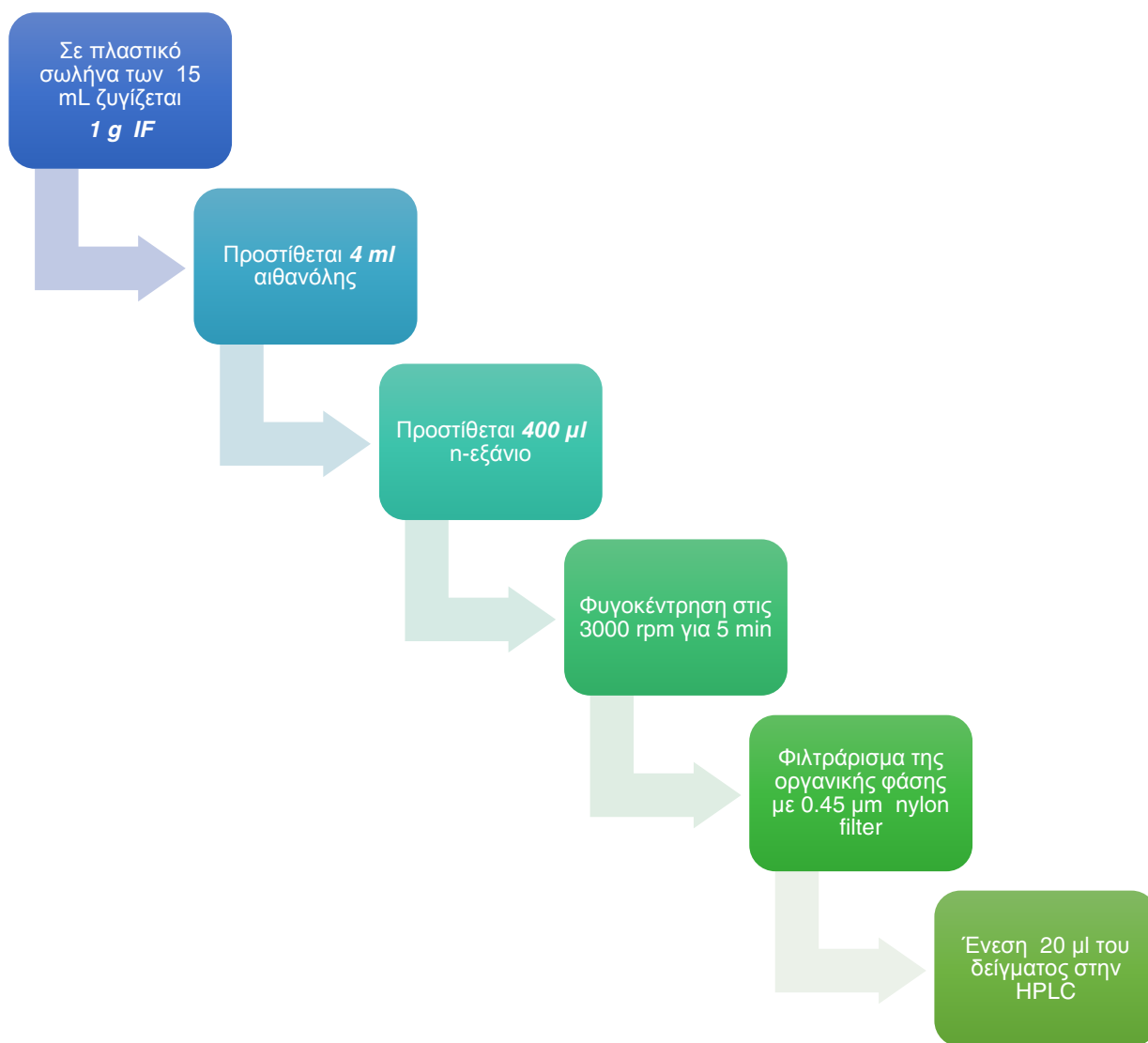
2.3.1 Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός των βιταμινών Α και Ε βασίζεται στην απευθείας εκχύλιση του οξικού εστέρα της ρετινόλης και της α-τοκοφερόλης χωρίς να έχει προηγηθεί σαπωνοποίηση. Η εκχύλιση πραγματοποιείται με μίγμα αιθανόλης-εξανίου και στην συνέχεια το εκχύλισμα

φιλτράρεται και εισάγεται στον χρωματογράφο. Οι βιταμίνες προσδιορίζονται στις εστεροποιημένες μορφές τους και δεν χρειάζεται χρήση αντιοξειδωτικών για την προστασία τους. Γρήγορη, απλή και ακριβής μέθοδος για αναλύσεις ρουτίνας όταν δεν χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί το λίπος του δείγματος για περαιτέρω αναλύσεις, ιδανική για μεγάλο αριθμό δειγμάτων.

2.3.2 Πειραματική πορεία

Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε είναι απλή και γρήγορη. Δεν περιλαμβάνει ούτε σαπωνοποίηση ούτε εκχύλιση του λίπους όπως οι περισσότεροι μέθοδοι, όπως φαίνεται και από το παρακάτω διάγραμμα.



Σχήμα 1: Διάγραμμα πειραματικής πορείας προσδιορισμού λιποδιαλυτών βιταμινών σε IF

2.3.3 Συσκευές και όργανα

- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας Mettler Toledo AB204, 4 δεκαδικών 0,1mg
- Συνήθη εργαστηριακά υάλινα σκεύη
- Αναδευτήρας Vortex
- Φυγόκεντρος
- Φίλτρα nylon 0.45 μm (pore size)
- HPLC, 1200 infinity series, Agilent Technologies
- Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων Diode Array (DA)

- Στήλη Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 250×4.6mm, διαμέτρου πόρων 5 μm και αντίστοιχη προστήλη

2.3.4 Αντιδραστήρια και πρότυπες ουσίες

- Μεθανόλη, HPLC καθαρότητας της Fischer
- Αιθανόλη, HPLC καθαρότητας της Fischer
- n-εξάνιο, HPLC καθαρότητας του Carlo Erba

Πρότυπα Βιταμινών

- Ρετινόλη (βιταμίνη A), Sigma Aldrich
- Οξικός εστέρας της ρετινόλης, Sigma Aldrich
- dl-α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E), Sigma Aldrich
- Οξικός εστέρας της dl-α-τοκοφερόλης, Sigma Aldrich

Τα πρότυπα διαλύονται σε αιθανόλη, φυλάσσονται στους -20°C και προστατεύονται από το φως με εξωτερική επικάλυψη αλουμινοχάρτου και από πιθανή οξείδωση από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο με αέριο άζωτο.

Παρασκευάστηκαν πυκνά πρότυπα όλων των βιταμινών (διαλύματα παρακαταθήκης) και στην συνέχεια από αυτά παρασκευάστηκαν πρότυπα εργασίας. Πιο αναλυτικά παρατίθενται στον μέθοδο II (**παράγραφος 2.3**) τα χρωματογραφήματα και οι χρόνοι έκλουσης των προτύπων των βιταμινών.

2.3.5 Χρωματογραφικές συνθήκες

- Κινητή φάση: 100% μεθανόλη
- Θερμοκρασία στήλης: 40 °C
- Ροή: 1,00 mL /min
- Λήψη σημάτων στα 325 nm για τον προσδιορισμό της βιταμίνης A και 292 nm για της βιταμίνης E

Οι χρωματογραφικές συνθήκες με τις οποίες πραγματοποιήθηκαν όλα τα πειράματα βασίζονται στην προτεινόμενη μέθοδο που ακολουθήθηκε εκτός από την θερμοκρασία της στήλης η οποία προσαρμόστηκε στους 40 °C έναντι των 50 °C προτείνεται στην μέθοδο επειδή θεωρήθηκε πολύ υψηλή θερμοκρασία που εγκυμονεί τον κίνδυνο καταστροφής των βιταμινών και βάσει του εγχειριδίου χρήσης της στήλης η ενδεικνυόμενη θερμοκρασία ήταν 40 °C.

2.3.6 Βελτιστοποίηση της μεθόδου

2.3.6.1 Μάζα δείγματος

Σύμφωνα με την προτεινόμενη στη δημοσίευση μέθοδο ζυγίζεται 1 g IF (Infant Formula), τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα των 15 mL και διαλύεται σε 4 mL αιθανόλης. Δοκιμάστηκαν να διαλυθούν 2g IF σε αντίστοιχα 4 mL αιθανόλης ώστε να παρασκευαστεί πιο πυκνό διάλυμα.

2.3.6.2 Επίδραση αριθμού εκχυλίσεων

Ο αριθμός των εκχυλίσεων παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο ποσοτικό προσδιορισμό των βιταμινών. Έχει σημειωθεί σε πολλές έρευνες ότι μία εκχύλιση είναι ανεπαρκής για την παραλαβή των βιταμινών και κυρίως της βιταμίνης A ¹¹¹ και αυτό διαπιστώθηκε και από το δικό μας πείραμα. Γι' αυτό δοκιμάστηκαν η μία εκχύλιση και οι τρεις εκχυλίσεις.

2.4 Προσδιορισμός των βιταμινών A και E σε βρεφικές τροφές μέσω HPLC-UV¹³⁸

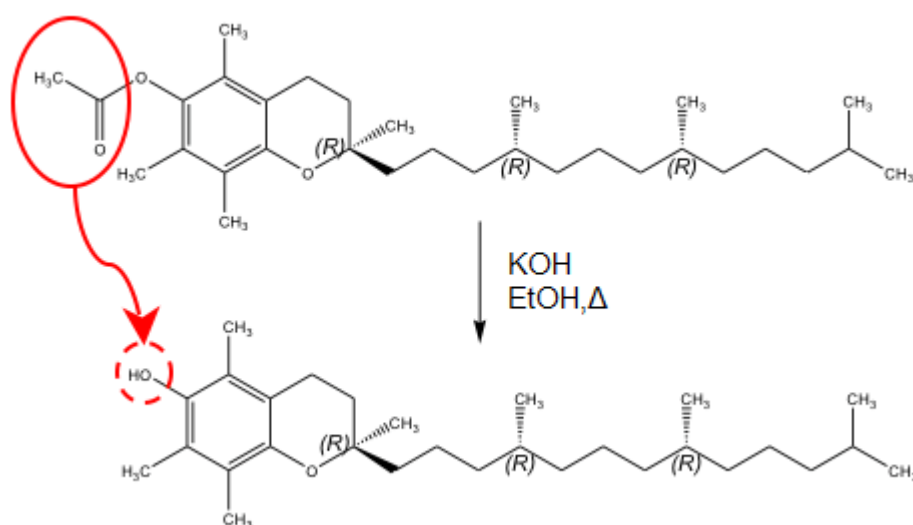
2.4.1 Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός των βιταμινών A και E βασίζεται στο φαινόμενο της σαπωνοποίησης του οξικού εστέρα της ρετινόλης και της α-τοκοφερόλης. Όπως φαίνεται και από τα παρακάτω σχήματα ο οξικός εστέρας της ρετινόλης μετατρέπεται σε ρετινόλη και ο οξικός εστέρας της α-τοκοφερόλης σε α-τοκοφερόλη. Στην συνέχεια πραγματοποιείται εκχύλιση με πετρελαϊκό αιθέρα. Γίνεται χρήση αντιοξειδωτικών για την προστασία των βιταμινών

τόσο στο στάδιο της σαπωνοποίησης όσο και στο στάδιο της εκχύλισης. Γρήγορη και οικονομική μέθοδος για αναλύσεις ρουτίνας, ιδανική για μεγάλο αριθμό δειγμάτων.



Σχήμα 2: Αντίδραση σαπωνοποίησης του οξικού εστέρα της ρετινόλης



Σχήμα 3: Αντίδραση σαπωνοποίησης του οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης

2.4.2 Πειραματική πορεία

Η απομόνωση των λιποδιαλυτών βιταμινών χωρίζεται σε 3 κυρίως μέρη:

- Προκατεργασία δείγματος (στάδιο 1^ο)
- Σαπωνοποίηση (στάδιο 2^ο-5^ο)
- Εκχύλιση (στάδιο 6^ο-8^ο)

Η πειραματική πορεία παρουσιάζεται στο διάγραμμα του Σχήματος 4. Σε αυτήν έγιναν παραμετρικές βελτιστοποιήσεις.



Σχήμα 4: Διάγραμμα πειραματικής πορείας προσδιορισμού λιποδιαλυτών βιταμινών σε IF με σαπωνοποίηση χωρίς χρήση α- αμυλάσης

2.4.3 Συσκευές και όργανα

- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας Mettler Toledo AB204, 4 δεκαδικών 0,1mg
- Συνήθη εργαστηριακά υάλινα σκεύη
- Θερμόμετρο (ακρίβεια 1°C)
- Υδατόλουτρο Buchi (του περιστροφικού εξατμιστήρα RII)
- Χρονόμετρο
- Gas tight Syringe 1mL της Supelco
- Αναδευτήρας Vortex
- Φυγόκεντρος
- HPLC, 1200 infinity series, Agilent Technologies
- Ανιχνευτής συστοιχίας διόδων Diode Array (DA
- Στήλη Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 250×4.6mm, διαμέτρου 5 μm και αντίστοιχη προστήλη

2.4.4 Αντιδραστήρια και πρότυπες ουσίες

- Υδροξείδιο του καλίου (KOH), Sigma Aldrich
- Ασκορβικό οξύ, Sigma Aldrich
- Μεθανόλη HPLC καθαρότητας της Fischer
- Απόλυτη, Αιθανόλη, HPLC καθαρότητας της Fischer
- Πετρελαϊκός αιθέρας
- Βουτυλιωμένο υδροξυ -τολουόλιο (BHT), Sigma Aldrich
- α-αμυλάση, Sigma Aldrich

Πρότυπα Βιταμινών

- Ρετινόλη (βιταμίνη A), Sigma Aldrich
- Οξικός εστέρας της ρετινόλης, Sigma Aldrich
- Παλμιτικός εστέρας της ρετινόλης, Sigma Aldrich
- dl-α-τοκοφερόλη (βιταμίνη E), Sigma Aldrich
- Οξικός εστέρας της dl-α-τοκοφερόλης, Sigma Aldrich
- Χολεκαλσιφερόλη (βιταμίνη D₃), Sigma Aldrich
- Εργοκαλσιφερόλη (βιταμίνη D₃), Sigma Aldrich
- Φυλλοκινόννη(βιταμίνη K₁), Sigma Aldrich

Τα πρότυπα διαλύονται σε αιθανόλη, φυλάσσονται στους -20°C και προστατεύονται από το φως με εξωτερική επικάλυψη αλουμινόχαρτου και από πιθανή οξείδωση από το ατμοσφαιρικό οξυγόνο με αέριο άζωτο. Παρασκευάστηκαν πυκνά πρότυπα όλων των βιταμινών (διάλυμα παρακαταθήκης) και στην συνέχεια από αυτά παρασκευάστηκαν αραιότερα πρότυπα.

2.4.5 Χρωματογραφικές συνθήκες

- Κινητή φάση: 100% μεθανόλη
- Θερμοκρασία στήλης: 35 °C
- Ροή: 1,00 mL /min
- Μήκη κύματος που απαιτούνται για των προσδιορισμό των βιταμινών είναι:
 - 325 nm για την βιταμίνη A
 - 292 nm για την βιταμίνη E
 - 264 nm για την βιταμίνη D
 - 244 nm για την βιταμίνη K

Οι χρωματογραφικές συνθήκες με τις οποίες πραγματοποιήθηκαν όλα τα πειράματα βασίζονται στην προτεινόμενη μέθοδο που ακολουθήθηκε. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 35 °C, όπως προτείνεται και σε άλλες έρευνες¹³⁶, παρόλο που βάσει του εγχειριδίου χρήσης της στήλης η ενδεικνυόμενη θερμοκρασία ήταν 40 °C για καλύτερη προστασία των βιταμινών.

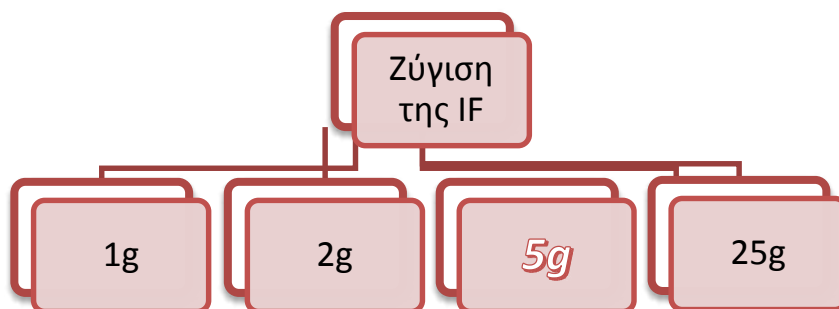
2.4.6 Βελτιστοποίηση της μεθόδου

I. Προκατεργασία δείγματος

2.4.6.1 Μάζα δείγματος

Πραγματοποιείται διάλυση της IF (Infant Formula) υπό μορφή σκόνης σε θερμό (60°C) υπερκάθαρο νερό ώστε να παρασκευαστεί ομογενοποιημένο δείγμα 10% w/v. Γενικά το πρόβλημα που παρουσιάζει η ανάλυση των στερεών δειγμάτων-σκονών-αιωρημάτων είναι η ανομοιογενής κατανομή των αναλυτών. Το ίδιο πρόβλημα παρουσιάζεται και στην ανάλυση των βιταμινών σε IF.¹³⁹ Αυτό συμβαίνει όχι μόνο επειδή δεν πρόκειται για ομοιογενές χημικό μίγμα αλλά και γιατί η συνήθης πρακτική των βιομηχανιών παραγωγής

IF είναι η προσθήκη μίγματος βιταμινών υπό μορφή σκόνης μετά την παραγωγή του blank υλικού από άμυλο ,δημητριακά κ.λπ. Έτσι, στην βιβλιογραφία συνήθως προτείνεται ζύγιση μεγάλης σχετικά ποσότητας δείγματός. Γι' αυτό το λόγο δοκιμάστηκαν οι παρακάτω ποσότητες δείγματος ώστε να βρεθεί η βέλτιστη για την μέθοδο μας.



Σχήμα 5 : Μάζα δείγματος

2.4.6.2 Όγκος προστιθέμενου θερμού νερού για ομογενοποίηση IF

Για την διάλυση της IF προστίθεται θερμό (60°C) υπερκάθαρο νερό. Παρασκευάζεται ομογενοποιημένο δείγμα 10% w/v. Δοκιμάστηκε να παρασκευαστεί και ομογενοποιημένο δείγμα 20% w/v για να διαπιστωθεί εάν μπορεί να παρασκευαστεί πυκνότερο δείγμα για την ανάλυση.

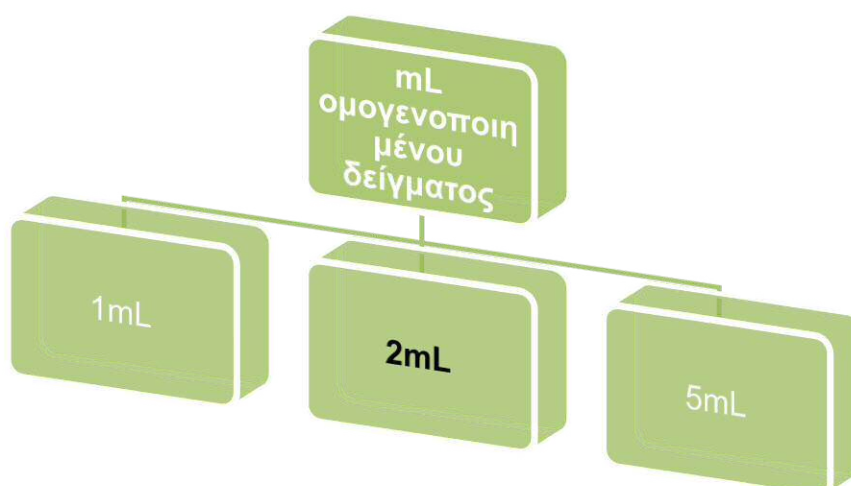
II. Σαπωνοποίηση

Η σαπωνοποίηση αποτελεί το 2^ο μέρος της πειραματικής πορείας και περιγράφεται στα στάδια 2 έως 5. Τονίζεται ότι καθ' όλη την διάρκεια της σαπωνοποίησης οι σωλήνες των 15 mL είναι καλυμμένοι με αλουμινόχαρτο ώστε να μην έρχονται σε επαφή με το φως.

Παρακάτω εξετάζονται διάφορες παράμετροι που επηρεάζουν την πορεία της σαπωνοποίησης όπως ο χρόνος σαπωνοποίησης ,ο ληφθείς όγκος ομογενοποιημένου δείγματος και η παρουσία ασκορβικού οξέος.

2.4.6.3 Όγκος ομογενοποιημένου δείγματος 10% w/v

Σύμφωνα με την μέθοδο που ακολουθείται προστίθεται 1 mL ομογενοποιημένου δείγματος (10%w/v). Ωστόσο, κρίθηκε ότι η ποσότητα αυτή ήταν ανεπαρκής για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βιταμινών και γι' αυτό το λόγο δοκιμάστηκαν διαφορετικοί όγκοι:



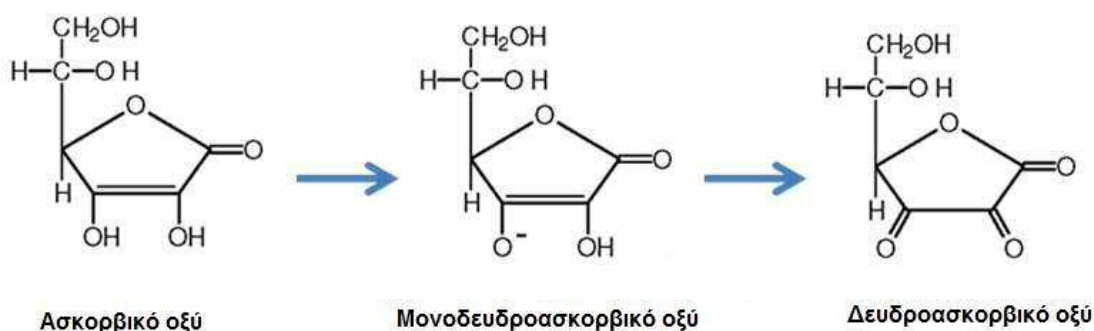
Σχήμα 6: Όγκος ομογενοποιημένου δείγματος

2.4.6.4 Επίδραση προσθήκης ασκορβικού οξέος

Το ασκορβικό οξύ είναι γνωστό φυσικό αντιοξειδωτικό και συμβάλλει στην προστασία των βιταμινών από διάφορους παράγοντες όπως από την οξείδωση από τον ατμοσφαιρικό αέρα, το φως και τη θερμοκρασία δεδομένου πως οι βιταμίνες είναι μια ομάδα ενώσεων ιδιαίτερα ευαίσθητη.³⁵

Παρασκευάζεται αιθανολικό διάλυμα 0.2% w/v ασκορβικού οξέος και προστίθενται 2.5mL αυτού κατά την σαπωνοποίηση. Το διάλυμα αφήνεται υπό μαγνητική ανάδευση για 10-15 λεπτά επειδή είναι δύσκολη η διαλυτοποίηση του ασκορβικού οξέος. Έγιναν δοκιμές και απουσία ασκορβικού οξέος. Πιο αναλυτικά εξετάζεται ο ρόλος του στην **παράγραφο 2.4.6.7** σε συνάρτηση με τον ρόλο του BHT, ενός άλλου χημικού αντιοξειδωτικού που χρησιμοποιείται κατά την εκχύλιση.

Παρατηρήθηκε ότι είναι απαραίτητη η παρασκευή του αιθανολικού διαλύματος σε καθημερινή βάση επειδή το ασκορβικό οξύ είναι ευαίσθητη ένωση και οξειδώνεται εύκολα σε άλλες μορφές.¹⁴⁰

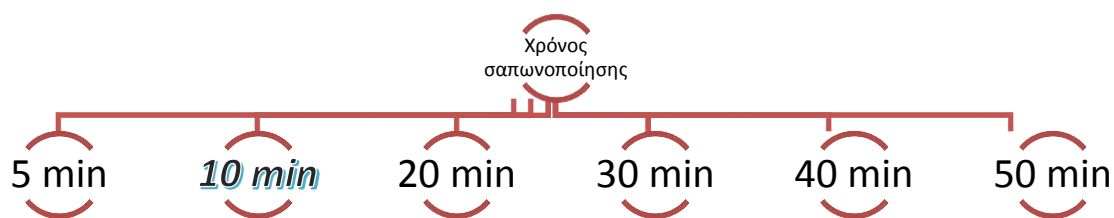


Εικόνα 16:Οξείδωση ασκορβικού οξέος

2.4.6.5 Χρόνος σαπωνοποίησης

Σύμφωνα με την μέθοδο που ακολουθείται στην δημοσίευση ο χρόνος σαπωνοποίησης είναι μόλις 5 λεπτά στους 80°C. Είναι σημαντικό το υδατόλουτρο να είναι καλά θερμοστατημένο στους 80°C ,όπως προτείνεται από την βιβλιογραφία.¹³⁶ Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε το υδατόλουτρο (της Buchi ,του περιστροφικού εξατμιστήρα RII) καθώς η θερμοκρασία του είναι πολύ σταθερή και ταυτόχρονα πραγματοποιούνταν διαρκής έλεγχος της θερμοκρασίας με θερμόμετρο Hg,εμβαπτιζόμενο στο υδατόλουτρο.

Ο χρόνος σαπωνοποίησης είναι πολύ μικρός και σε μερικές περιπτώσεις δεν επιτυγχάνεται πλήρης σαπωνοποίηση των βιταμινών με αποτέλεσμα οι οξικοί εστέρες να μετατρέπονται μερικώς στις αντίστοιχες βιταμίνες και ένα μέρος τους να παραμένει ασαπωνοποίητο. Γι' αυτό το λόγο δοκιμάστηκαν και μεγαλύτεροι χρόνοι σαπωνοποίησης όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 7:Χρόνος σαπωνοποίησης

III. Εκχύλιση

Κατά την εκχύλιση επιλέχθηκε να τοποθετείται το σαπωνοποιημένο δείγμα σε κατάλληλο γυάλινο δοχείο και στην συνέχεια προστίθενται 800μl πετρελαϊκού αιθέρα -1% w/v BHT και μαγνητικός αναδευτήρας συγκεκριμένης διαμέτρου. Τα γυάλινα δοχεία καλύπτονται με αλουμινόχαρτο για να προστατεύονται από το φως και αφήνονται υπό μαγνητική ανάδευση για 20 λεπτά. Κατόπιν, αφήνεται το δείγμα για 2-3 λεπτά σε ηρεμία ώστε να διαχωριστούν ευκρινώς οι φάσεις. Γίνεται παραλαβή της υπερκείμενης οργανικής φάσης σε Eppendorf πλαστικό δοχείο όγκου 1.5 mL και προστίθενται εκ νέου 800μl πετρελαϊκού αιθέρα -1% w/v BHT (2^η εκχύλιση) και ακολουθεί μαγνητική ανάδευση για άλλα 20 λεπτά. Τέλος, συγκεντρώνονται οι 2 οργανικές φάσεις και εξατμίζονται πλήρως με αέριο άζωτο. Πραγματοποιείται ανασύσταση με 150 μL μεθανόλης, γίνεται ανάδευση στο vortex και το δείγμα αυτό ενίεται στον χρωματογράφο.

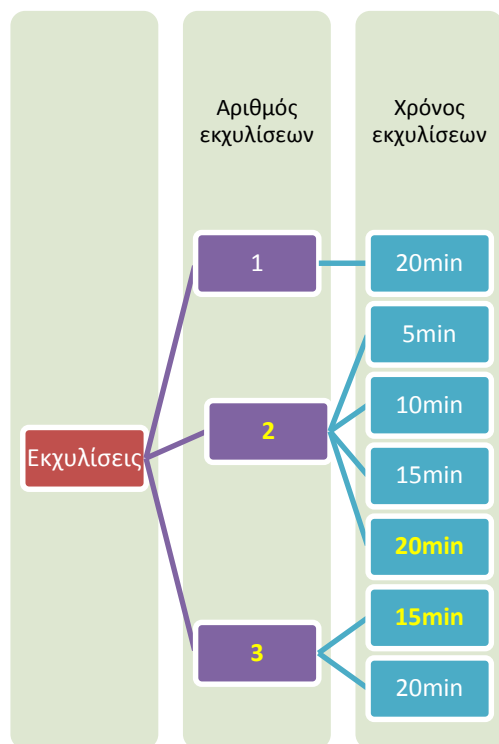
Πραγματοποιήθηκαν βελτιστοποιήσεις και σε αυτό το 3^ο πειραματικό μέρος στις εξής παραμέτρους.

2.4.6.6 Επίδραση του αριθμού εκχυλίσεων και χρόνου μαγνητικής ανάδευσης

Ο αριθμός των εκχυλίσεων παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στο ποσοτικό προσδιορισμό των βιταμινών. Έχει σημειωθεί σε έρευνες ότι μία εκχύλιση είναι ανεπαρκής για την παραλαβή των βιταμινών ¹¹¹ και αυτό διαπιστώθηκε και από το δικό μας πείραμα. Γι' αυτό κρίθηκε απαραίτητη η δοκιμή δύο και τριών εκχυλίσεων, μια πάγια τακτική της Αναλυτικής Χημείας.

Ταυτόχρονα ερευνήθηκε και ο χρόνος εκχύλισης διότι σε μικρό χρονικό διάστημα εκχυλίζεται μόνο ένα μέρος των βιταμινών ενώ σε πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα ελλοχεύει ο κίνδυνος καταστροφής των βιταμινών.

Έτσι, έγιναν αρκετές δοκιμές με διαφόρους συνδυασμούς που φαίνονται στο παρακάτω σχήμα ώστε να επιλεγούν οι βέλτιστες συνθήκες.



Σχήμα 8: Αριθμός εκχυλίσεων σε συσχέτιση με τον χρόνο εκχύλισης

2.4.6.7 Χρήση αντιοξειδωτικών-Διερεύνηση ρόλου BHT

Σύμφωνα με την μέθοδο που ακολουθήθηκε χρησιμοποιούνται δυο αντιοξειδωτικά για την προστασία των βιταμινών καθ'όλη την πειραματική πορεία. Το μεν ασκορβικό οξύ προστίθεται σε αιθανόλη (0.2 % w/v) κατά την σαπωνοποίηση και το δε BHT προστίθεται σε πετρελαϊκό αιθέρα (1 % w/v) κατά την εκχύλιση των δειγμάτων.



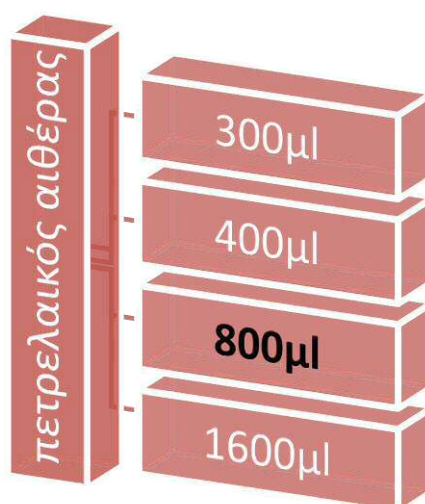
Σχήμα 9:Χρήση αντιοξειδωτικών

Για να διαπιστωθεί η δράση τους έγιναν τα εξής συγκριτικά πειράματα:

- Παρουσία BHT και ασκορβικού οξέος
- Παρουσία μόνο ασκορβικού οξέος
- Παρουσία μόνο BHT
- Έλλειψη και των δυο

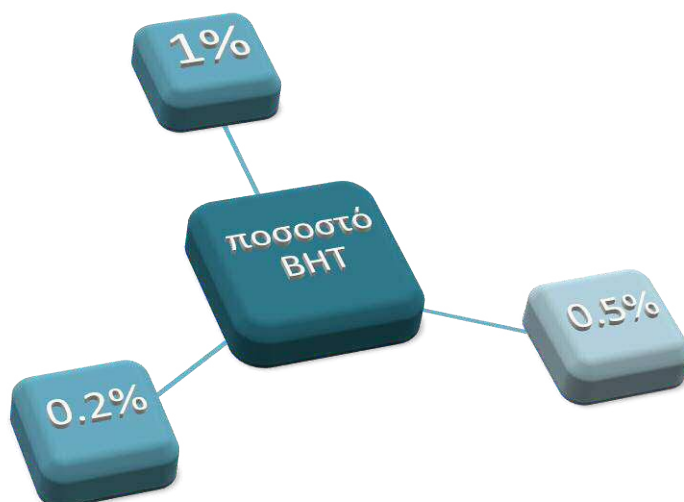
2.4.6.8 Επίδραση της ποσότητας πετρελαϊκού αιθέρα στην εκχύλιση

Όσον αφορά τον πετρελαϊκό αιθέρα έγινε βελτιστοποίηση στην ποσότητα που προστίθεται κατά την εκχύλιση. Σύμφωνα με την προτεινόμενη μέθοδο προστίθενται 300μl αλλά δοκιμάστηκαν οι παρακάτω όγκοι:



Σχήμα 10:Όγκος πετρελαϊκού αιθέρα

2.3.6.9 Συγκέντρωση BHT



Σχήμα 11: Συγκέντρωση δ/τος BHT

Μελετήθηκε επίσης η συγκέντρωση του BHT που προστέθηκε. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα πετρελαϊκού αιθέρα με 1% BHT σύμφωνα με την προτεινόμενη μέθοδο. Ωστόσο δοκιμάστηκαν και διαλύματα με 0.5 % και 0.2% BHT για να διαπιστωθεί αν μπορούν να προστατεύσουν ικανοποιητικά τις βιταμίνες.

2.4.6.10 Όγκος διαλύτη ανασύστασης

Μετά το τέλος των εκχυλίσεων συγκεντρώνονται οι 2 οργανικές φάσεις σε Eppendorf σωληνάκι των 1.5 mL και εξατμίζονται με αέριο άζωτο. Στην συνέχεια γίνεται ανασύσταση του δείγματος με μεθανόλη. Σύμφωνα με την προτεινόμενη στη δημοσίευση μέθοδο προστίθενται 100μl μεθανόλης. Ωστόσο, ο όγκος αυτός είναι πολύ μικρός και γι' αυτό δοκιμάστηκαν και 150μl μεθανόλης.

2.4.6.11 Επιλογή κατάλληλων σκευών

Διάμετρος μαγνητικών αναδευτήρων

Μία παράμετρος που ακόμη μελετήθηκε είναι το μέγεθος (διάμετρος) των μαγνητικών αναδευτήρων. Χρησιμοποιήθηκαν 2 είδη:

- μικροί (15 x 4.5 mm) και
- μεσαίοι (20 x 6 mm) αναδευτήρες

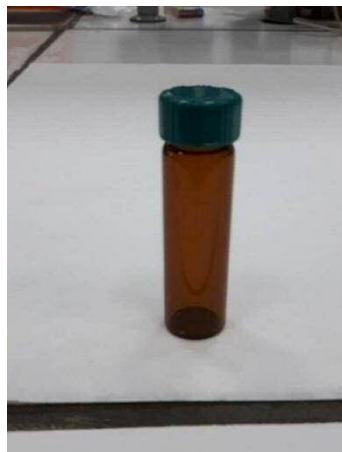
Υάλινα σκεύη

Επιπλέον , μια σημαντική παράμετρος-κλειδί για την ανάπτυξη της μεθόδου που επηρέασε την εκχύλιση των βιταμινών είναι τα γυάλινα φιαλίδια που επιλέχθηκαν κατά την εκχύλιση. Δοκιμάστηκαν 3 είδη φιαλιδίων που παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες.



- ✓ Ογκομετρική φιάλη των 5mL

- ✓ Σκουρόχρωμο υάλινο δοχείο των 7 mL(PTFE) με πλαστικό βιδωτό καπάκι





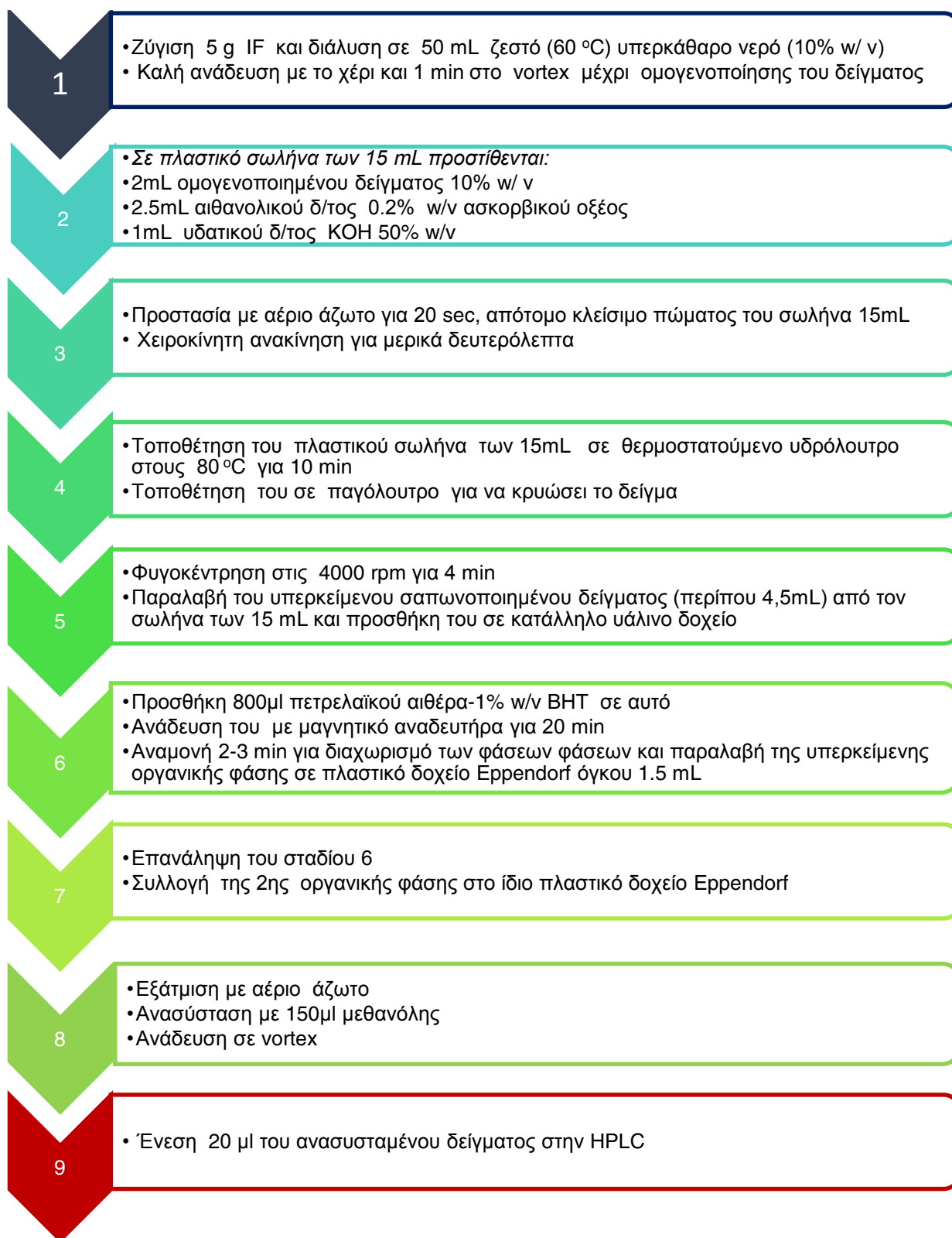
✓ Διαφανές υάλινο δοχείο των 12mL με πλαστικό βιδωτό καπάκι

Πιπέτες Pasteur-Gas tight Syringe

Τέλος, για το διαχωρισμό των δύο φάσεων μετά από κάθε εκχύλιση δοκιμάστηκαν γυάλινες πιπέτες pasteur (μήκους 230 mm) και σύριγγα gas tight του 1 mL.(SGE Syringe)

2.4.7 Βέλτιστη πειραματική πορεία

Ύστερα από όλες τις παραπάνω βελτιστοποιήσεις επιλέχθηκε η παρακάτω πειραματική πορεία ως η βέλτιστη.



Σχήμα 12: Επιλεχθείσα βελτιστοποιημένη πειραματική πορεία προσδιορισμού λιποδιαλυτών βιταμινών σε IF με σαπωνοποίηση χωρίς χρήση α-αμυλάσης

2.4.8 Προσθήκη πρότυπης ένωσης σε δείγμα

Πραγματοποιήθηκαν 5 είδη προσθήκης σε Φαρίν Λακτέ Ελεύθερη Βιταμινών :

1. ρετινόλης,
2. οξικού εστέρα της ρετινόλης,
3. παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης,
4. τοκοφερόλης και
5. οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης

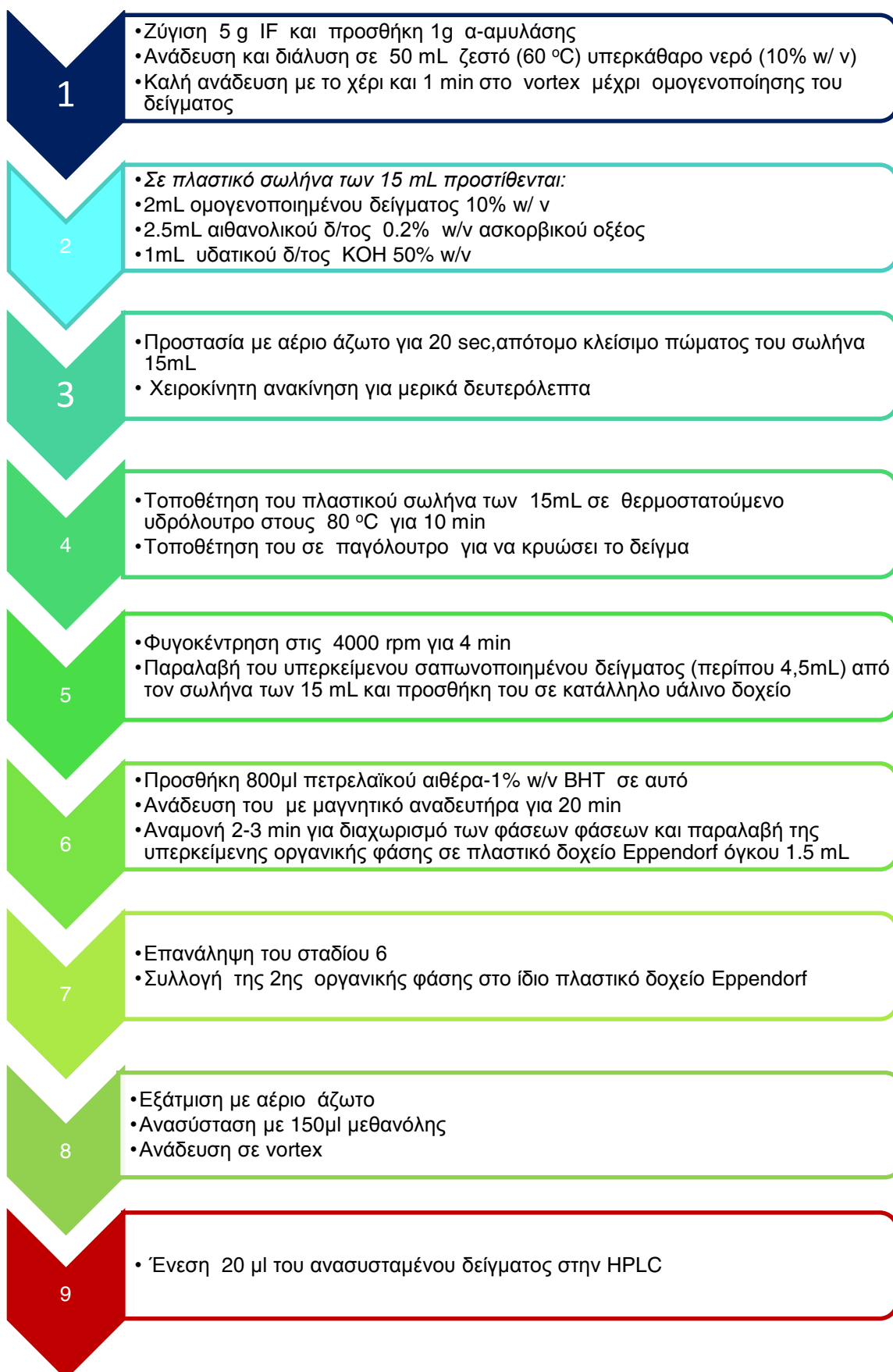
για 3 επίπεδα συγκεντρώσεων 50%, 100% και 150%. Ως 100% επιλέγεται κάθε φορά η τιμή συγκέντρωσης που αναγράφεται για την εκάστοτε βιταμίνη στην ετικέτα κάθε είδους IF.

Στην Φαρίν Λακτέ Ελεύθερη Βιταμινών προστίθεται η εκάστοτε πρότυπη ουσία και στην συνέχεια ακολουθείται η πειραματική πορεία όπως αναγράφεται στο **Σχήμα 12**.

2.5 Μέθοδος με χρήση α-αμυλάσης ¹³⁸

2.5.1 Πειραματική πορεία

Κατά την ομογενοποίηση της βρεφικής τροφής που περιέχει άμυλο γίνεται συνήθως προσθήκη του ενζύμου α-αμυλάσης για να διαπιστωθεί αν βοηθάει στην παραλαβή των βιταμινών.¹³⁶ Προστίθεται 1 g αμυλάσης στα 5g IF, το μίγμα ανακινείται καλά και ακολουθείται η ίδια πειραματική πορεία που περιγράφεται στο στάδιο της προκατεργασίας δείγματος(**στάδιο 1^ο**), όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 13: Πειραματική πορεία προσδιορισμού λιποδιαλυτών βιταμινών σε IF με σαπωνοποίηση και με χρήση α-αμυλάσης

2.5.2 Προσθήκη πρότυπης ένωσης στο δείγμα

Πραγματοποιήθηκαν όπως και προηγουμένως (παράγραφος 2.4.8) πέντε είδη προσθήκης σε Φαρίν Λακτέ Ελεύθερη Βιταμινών :

1. ρετινόλης,
2. οξικού εστέρα της ρετινόλης,
3. παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης,
4. τοκοφερόλης και
5. οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης

για 3 επίπεδα συγκεντρώσεων 50%, 100% και 150%. Ως 100% επιλέγεται κάθε φορά η τιμή συγκέντρωσης που αναγράφεται για την εκάστοτε βιταμίνη στην ετικέτα κάθε είδους IF.

Στην Φαρίν Λακτέ Ελεύθερη Βιταμινών προστίθεται 1g α-αμυλάσης ,ανακινείται το δείγμα για ομογενοποιηθεί και στην συνέχεια προστίθεται η εκάστοτε πρότυπη ουσία και ακολουθείται η πειραματική πορεία όπως αναγράφεται στο **Σχήμα 13**.

2.6 Μέθοδος σάρωσης (screening method)

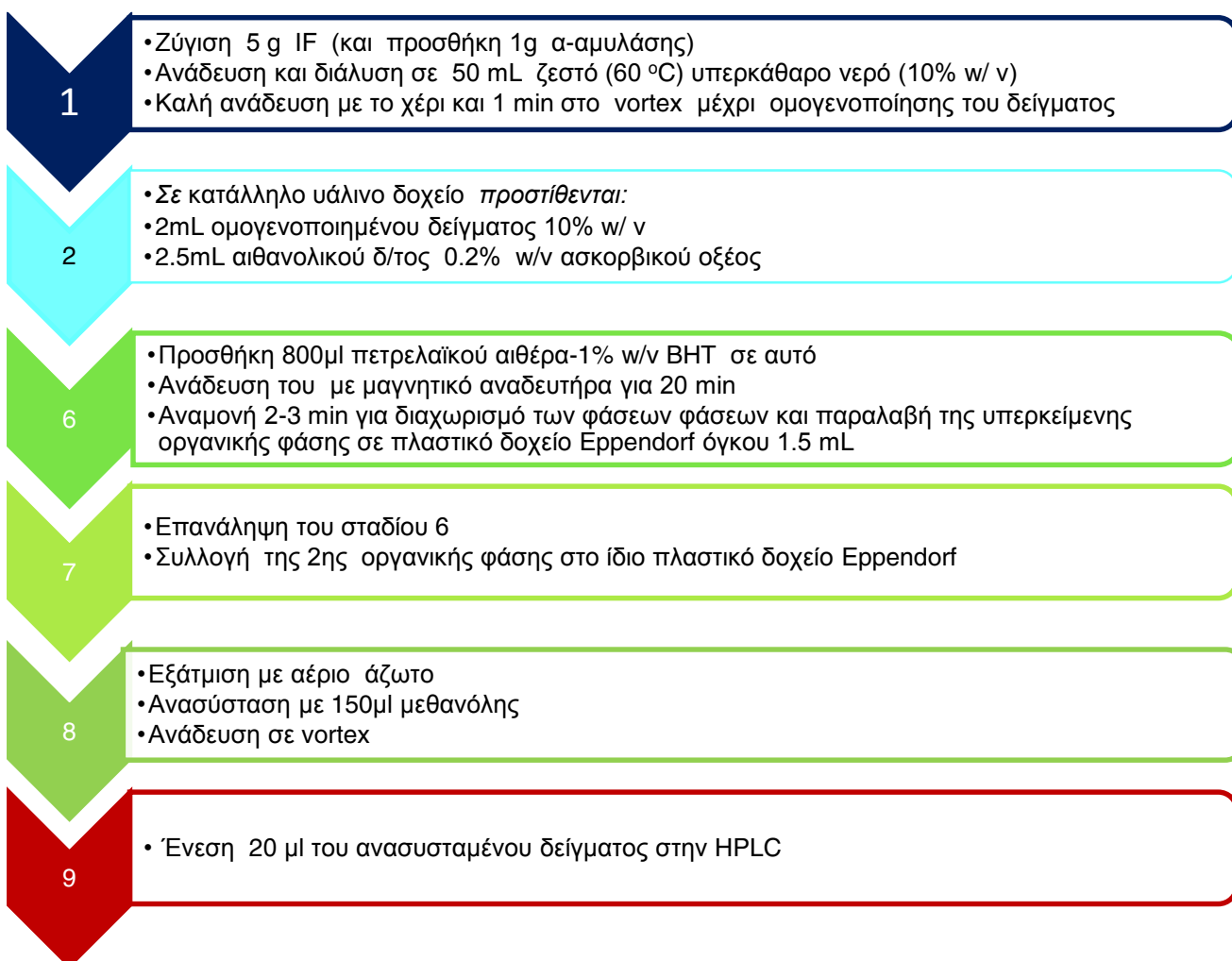
Στην ετικέτα της Φαρίν Λακτέ αναγράφονται οι εξής λιποδιαλυτές βιταμίνες: βιταμίνη Α ως οξικό εστέρα της ρετινόλης , βιταμίνη Ε ως οξικό εστέρα της α-τοκοφερόλη και βιταμίνη D₃. Στην ετικέτα της Sanilac (2 & 3) αναγράφονται : βιταμίνη Α ως οξικό εστέρα της ρετινόλης , βιταμίνη Ε ως οξικό εστέρα της α-τοκοφερόλη, βιταμίνη D₃ και βιταμίνη Κ₁.

Με την σαπωνοποίηση όλες οι μορφές των βιταμινών Α και Ε (οξικοί και παλμιτικοί εστέρες) μετατρέπονται σε καθαρές βιταμίνες(ρετινόλη και α-τοκοφερόλη αντίστοιχα).Οι βιταμίνες D₃ και Κ₁ δεν αλλάζουν μορφή. Άρα στόχος ήταν να βρεθεί μια μέθοδος που να μπορεί να διακρίνει (ανιχνεύσει ποιοτικά) ποια μορφή βιταμίνης υπάρχει ακριβώς στην IF,επιβεβαιωτική της σύστασης της μορφής βιταμινών που δηλώνονται στις ετικέτες των IF.

Έτσι, αναπτύχθηκε μια απλή screening μέθοδος στην οποία παραλείπεται το στάδιο της σαπωνοποίησης και οι βιταμίνες Α και Ε εκλούνται στις οξικές τους μορφές.

2.6.1 Πειραματική πορεία

Στη μέθοδο αυτή παραλείπεται το στάδιο της σαπωνοποίησης και πραγματοποιούνται μόνο τα στάδια της προκατεργασίας και της εκχύλισης του δείγματος όπως φαίνεται και από το **Σχήμα 14**.



Σχήμα 14: Πειραματική πορεία προσδιορισμού λιποδιαλυτών βιταμινών σε IF χωρίς σαπωνοποίηση

2.6.2 Προσθήκη πρότυπης ένωσης σε δείγμα

Ελέγχθηκε επίσης και κατά πόσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος αυτή και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των οξικών μορφών των βιταμινών A και E, προσθέτοντας τις πρότυπες βιταμίνες σε Φαρίν Λακτέ Ελεύθερη Βιταμινών.

Πραγματοποιήθηκαν όπως και προηγουμένως (**παράγραφος 2.4.8**) πέντε είδη προσθήκης σε Φαρίν Λακτέ Ελεύθερη Βιταμινών :

1. ρετινόλης,
2. οξικού εστέρα της ρετινόλης,
3. παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης,
4. τοκοφερόλης και
5. οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης

για 3 επίπεδα συγκεντρώσεων 50%, 100% και 150%. Ως 100% επιλέγεται κάθε φορά η τιμή συγκέντρωσης που αναγράφεται για την εκάστοτε βιταμίνη στην ετικέτα κάθε είδους IF.

Στη Φαρίν Λακτέ Ελεύθερη Βιταμινών προστίθεται η εκάστοτε πρότυπη ουσία και στην συνέχεια ακολουθείται η πειραματική πορεία όπως αναγράφεται στο **Σχήμα 14**.

2.7 Επικύρωση μεθόδου με πρότυπο υλικό αναφοράς SRM 1849a¹⁴¹

Το Πρότυπο Υλικό Αναφοράς (SRM) προορίζεται κυρίως για την επικύρωση μεθόδων και για τον προσδιορισμό λιπαρών οξέων, χοληστερόλης, βιταμινών, ιχνοστοιχείων, αμινοξέων και νουκλεοτιδίων σε θρεπτικά υλικά για βρέφη και ενήλικες. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη διασφάλιση ποιότητας. Είναι υλικό βασισμένο στο γάλα υπό μορφή σκόνης και παρασκευάζεται από κατασκευαστές βρεφικών και παιδικών τροφών. Πρέπει να αποθηκεύεται στους -80°C ή σε χαμηλότερη θερμοκρασία.

Μπορούν να προσδιοριστούν τόσο υδατοδιαλυτές όσο και λιποδιαλυτές βιταμίνες. Οι περιεχόμενες βιταμίνες στο υλικό αυτό και στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1: Περιεχόμενες βιταμίνες στο SRM

Βιταμίνες	Συγκέντρωση(mg/Kg)
Ρετινόλη	7.68 ± 0.23
Παλμιτικός εστέρας της ρετινόλης	14.3 ± 0.20
Ολική α-τοκοφερόλη	219± 16.0
Οξικός εστέρας της α-τοκοφερόλης	158 ±18.0
Χολεκαλσιφερόλη(D ₃)	0.11 ± 0.02
Φυλλοκινόνη(K ₁)	1.06 ±0.17
Ασκορβικό οξύ	784 ± 65.0

Θειαμίνη(B ₁)	12.6 ± 0.98
Ριβοβλαβίνη(B ₂)	20.4 ± 0.52
Νικοτιναμίδιο(B ₃)	108 ± 10.0
Παντοθενικό οξύ(B ₅)	68.2 ± 1.90
Πυριδοξίνη(B ₆)	13.5 ± 0.93
Φολικό οξύ	2.29 ± 0.06
Βιοτίνη	1.99 ± 0.13

Ύστερα από την βελτιστοποίηση όλων των μεθόδων που μελετήθηκαν παραπάνω χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο αυτό υλικό αναφοράς για να διαπιστωθεί η ακρίβεια και η αποτελεσματικότητα των μεθόδων .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

3.1 Γρήγορος προσδιορισμός των βιταμινών Α και Ε σε βρεφικές τροφές μέσω RP-HPLC¹³⁷

3.1.1 Αποτελέσματα βελτιστοποίησης μεθόδου

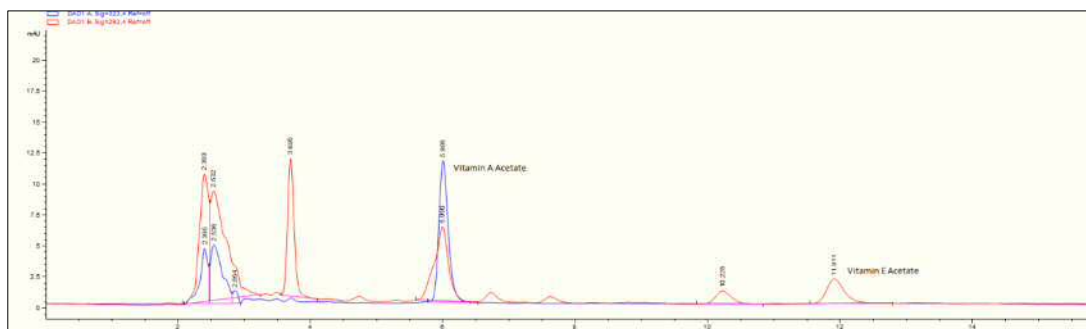
3.1.1.1 Μάζα δείγματος

Δοκιμάστηκαν να διαλυθούν 1g και 2g IF σε αντίστοιχα 4 mL αιθανόλης . Επιλέχθηκαν τα 2g IF ώστε να παρασκευαστεί πιο πυκνό διάλυμα, διπλάσιας περιεκτικότητας σε δείγμα από αυτό που αναγραφόταν στην μέθοδο. Ωστόσο, παρατηρήθηκε πως αυτό δεν είναι εφαρμόσιμο σε όλα τα είδη των παιδικών τροφών. Πιο συγκεκριμένα , 2g Sanilac (1,2&3) μπορούσαν να διαλυθούν σε 4 mL αιθανόλης ενώ 2g Φαρίν Λακτέ χρειαζόταν σχεδόν τριπλάσια ποσότητα αιθανόλης(10-12 mL) ώστε να ομογενοποιηθεί το δείγμα ,οπότε δεν μπορούσε να παρασκευασθεί πιο πυκνό διάλυμα. Παρόλα αυτά τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά ούτε και για την Sanilac για τους εξής λόγους:

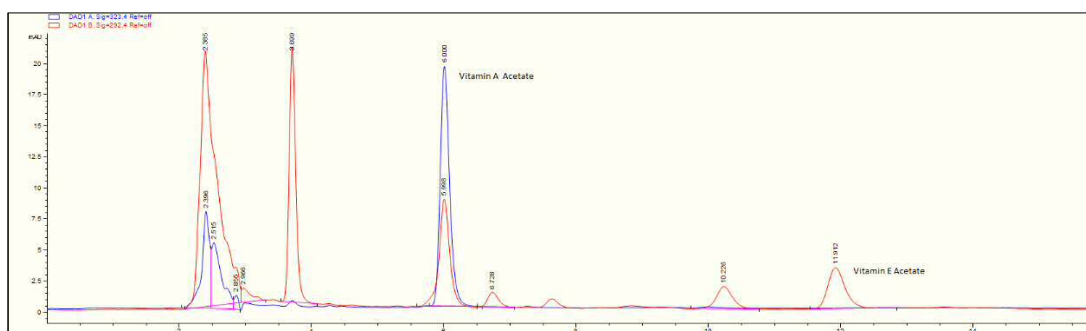
- Εκχυλίζεται μόνο η βιταμίνη Α και όχι και η βιταμίνη Ε όπως αναμενόταν
- Τα σήματα ήταν πάρα πολύ μικρά με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει ποσοτικοποίηση, όπως φαίνεται και από τα παρακάτω χρωματογραφήματα (**Εικόνα 17 και 18**).

3.1.1.2 Επίδραση αριθμού εκχυλίσεων

Δοκιμάστηκαν μία εκχύλιση και οι τρεις διαδοχικές εκχυλίσεις. Τα αποτελέσματα είναι πολύ πιο ικανοποιητικά με τις τρεις εκχυλίσεις καθώς εκχυλίστηκε και η βιταμίνη Ε ,κάτι που δεν συνέβαινε με την μια εκχύλιση. Τα σήματα που πήραμε ήταν μεγαλύτερα αλλά όχι σε τέτοιο βαθμό που να μπορεί να πραγματοποιηθεί ποσοτικός προσδιορισμός των βιταμινών, όπως φαίνεται και από τα παρακάτω χρωματογραφήματα (**Εικόνες 17 και 18**).



Εικόνα 17:Χρωματογράφημα δείγματος με μία εκχύλιση



Εικόνα 18: Χρωματογράφημα δείγματος με τρεις εκχυλίσσεις

Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι είναι γρήγορη και η προκατεργασία των δειγμάτων είναι απλή και αυτός ήταν ο βασικός λόγος που επιλέχθηκε να ερευνηθεί πρώτη. Παρόλα αυτά τα ποσοτικά αποτελέσματα της δεν ήταν ικανοποιητικά αφού μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για τον ποιοτικό προσδιορισμό των βιταμινών. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο διαφορετική μήτρα των παιδικών τροφών που αναλύσαμε έναντι αυτών της μεθόδου. Στο μέλλον πρέπει να επανεξετασθεί ώστε να επιτευχθεί βελτιστοποίηση της μεθόδου.

3.2 Προσδιορισμός των βιταμινών A και E σε βρεφικές τροφές μέσω HPLC-UV¹³⁸

3.2.1 Πρότυπα βιταμινών

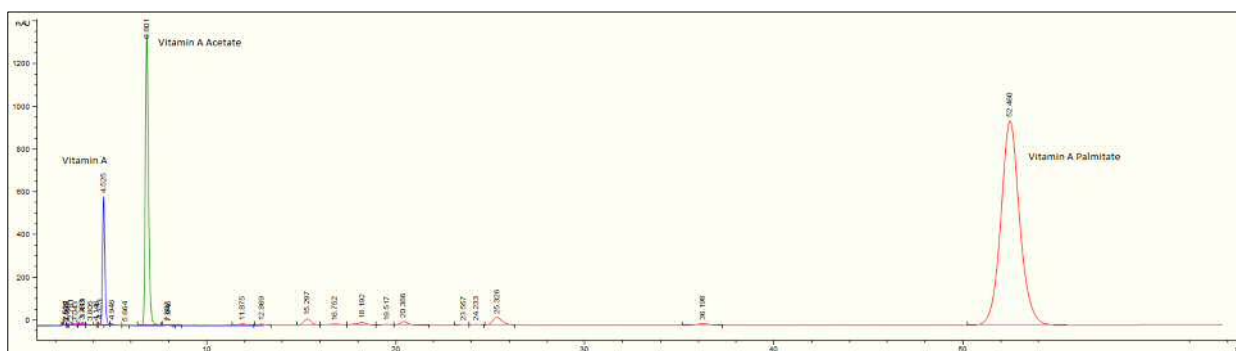
Τα πρότυπα των βιταμινών διαλύονται σε αιθανόλη και στην συνέχεια αραιώνονται και παρασκευάζονται διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης που χρειάζονται για τις καμπύλες αναφοράς τους και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους.

Ο χρόνος έκλουσης των βιταμινών με κινητή φάση μεθανόλη και ροή 1.00 mL / min παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα:

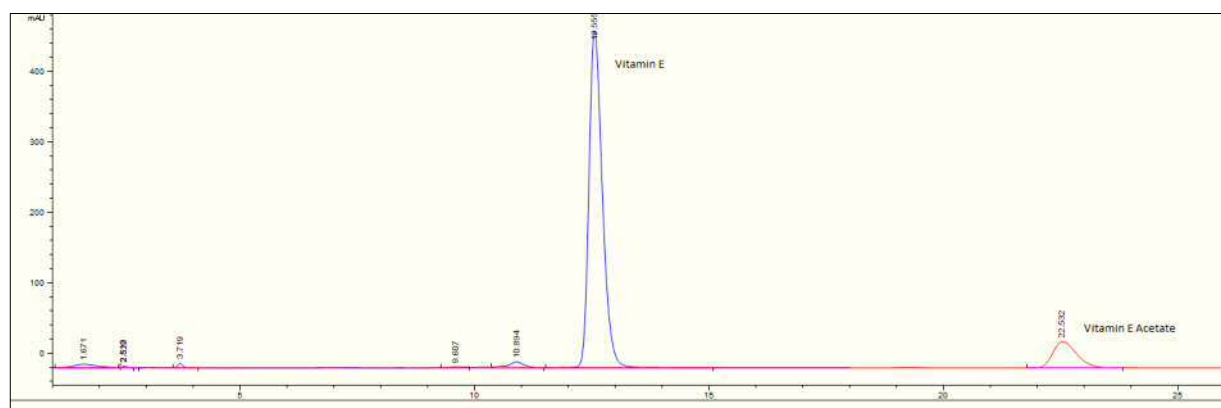
Πίνακας 2:Χρόνος έκλουσης βιταμινών

Βιταμίνες	Χρόνος έκλουσης (min)
Ρετινόλη	4.51
Οξικός εστέρας της ρετινόλης	6.13
Εργοκαλσιφερόλη (D ₂)	9.95
Χολεκαλσιφερόλη(D ₃)	10.40
dl-a-τοκοφερόλη	12.55
Οξικός εστέρας της dl-a-τοκοφερόλης	17.59
Φυλλοκινόνη (K ₁)	24.50
Παλμιτικός εστέρας της ρετινόλης	52.05

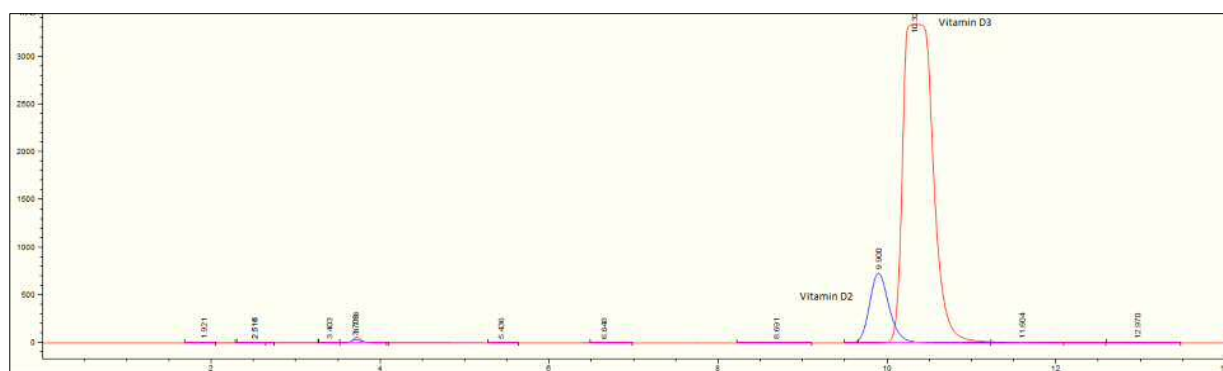
Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα των προτύπων βιταμινών στα αντίστοιχα μήκη κύματος.



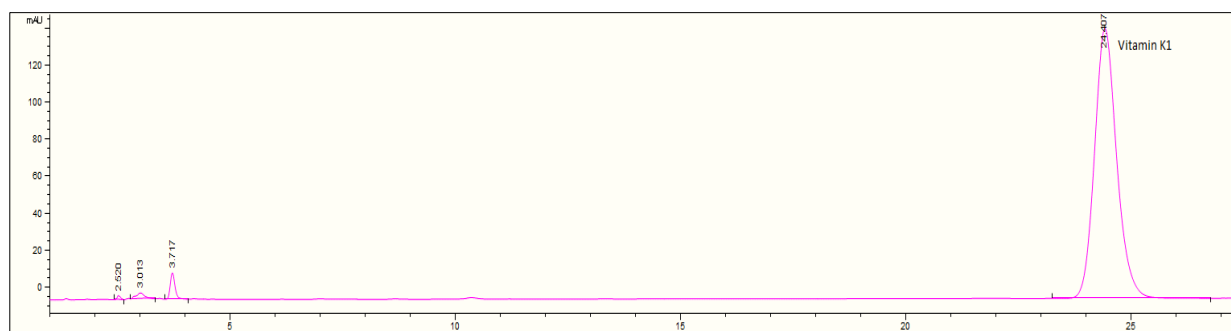
Εικόνα 19:Πρότυπο διάλυμα ρετινόλης, οξικού εστέρα της ρετινόλης και παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης 100 ppm στα 325 nm



Εικόνα 20:Πρότυπο διάλυμα της α-τοκοφερόλης και οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης 100ppm στα 292 nm



Εικόνα 21: Πρότυπο διάλυμα της χολεκαλσιφερόλης και της εργοκαλσιφερόλης 2000ppm στα 264 nm



Εικόνα22: Πρότυπο διάλυμα της φυλλοκινόνης 100ppm στα 244 nm

3.2.2 Αποτελέσματα βελτιστοποίησης μεθόδου

IV. Προκατεργασία δείγματος

3.2.2.1 Μάζα δείγματος

Δοκιμάστηκαν 1,2,5 και 25 g και η βέλτιστη ποσότητα δείγματος ήταν τα 5g IF. Στα 25g IF υπάρχει δυσκολία στην ομογενοποίηση του δείγματος καθώς απαιτείται μεγάλος όγκος θερμού νερού για την διάλυση της ενώ ταυτόχρονα απαιτείται και έντονη ανάδευση με χρήση μαγνητικού αναδευτήρα. Το 1g είναι πολύ λίγο και με βάση επίσημες μεθόδους δεν είναι αντιπροσωπευτική ποσότητα και γι' αυτό προτιμάται μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος.¹⁰⁸ Επίσης, η % σχετική απόκλιση για n=3 ήταν μικρότερη για επεξεργασία 5g IF και για τις δύο βιταμίνες A και E (13% και 29% αντίστοιχα) και γι' αυτό το λόγο επιλέχθηκε η ποσότητα αυτή ως η βέλτιστη.

Πίνακας 3: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης της μάζας για την βιταμίνη A

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της ρετινόλης					Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα ρετινόλης		
Δείγμα	μg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος	μg/100g	Average	%RSD
Sanilac2	320	268	30	2g IF	169	141	30
Sanilac2	308				162		
Sanilac2	176				93		
Sanilac2	467	420	13	5g IF	246	221	13
Sanilac2	433				228		
Sanilac2	361				188		
Sanilac2	554	540	21	25g IF	292	280	30
Sanilac2	645				339		
Sanilac2	420				221		

Πίνακας 4: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης της μάζας για την βιταμίνη Ε

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης				
Δείγμα	mg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος
Sanilac2	1,10	0,81	54	2g IF
Sanilac2	1,03			
Sanilac2	0,31			
Sanilac2	4,54	3,57	29	5g IF
Sanilac2	3,70			
Sanilac2	2,46			
Sanilac2	2,17	3,87	46	25g IF
Sanilac2	5,72			
Sanilac2	3,73			

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ, 5 λεπτά σαπωνοποίηση, 2 εκχυλίσσεις των 20 λεπτών, 400μl πετρελαϊκού αιθέρα, 100μl μεθανόλης και χρήση ογκομετρικών φιαλών των 5 ml

3.2.2.2 Όγκος προστιθέμενου θερμού νερού για ομογενοποίηση IF

Δοκιμάστηκε να παρασκευαστούν ομογενοποιημένα δείγματα με νερό 10% και 20% w/v. Ωστόσο, υπήρχε δυσκολία ομογενοποίησης στην Φαρίν Λακτέ στο δείγμα με συγκέντρωση 20% w/v καθώς η ποσότητα νερού ήταν ανεπαρκής για να διαλυτοποιηθεί πλήρως. Για τη Sanilac τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο ικανοποιητικά όσο αφορά την βιταμίνη Ε καθώς στο δείγμα με 20% w/v παραλαμβάνεται η μισή ποσότητα βιταμίνης και η % RSD είναι η διπλάσια. (% 9,3% και 19%) Γι' αυτούς τους λόγους επιλέχθηκε να διατηρηθεί η προτεινόμενη περιεκτικότητα 10% w/v.

Πίνακας 5: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης όγκου προστιθέμενου νερού για την βιταμίνη Α

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της ρετινόλης					Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα ρετινόλης		
Δείγμα	μg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος	μg/100g	Average	%RSD
Sanilac3	831	870	4,5	10% w/v IF	1691	1760	3,9
Sanilac3	870				1760		
Sanilac3	909				1830		
Sanilac3	740	725	4,5	20% w/v IF	1419	1392	4,2
Sanilac3	687				1326		
Sanilac3	748				1433		

Πίνακας 6: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης όγκου προστιθέμενου νερού για την βιταμίνη E

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης				
Δείγμα	mg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος
Sanilac3	12,4	13,7	9,3	10% w/v IF
Sanilac3	13,6			
Sanilac3	15,0			
Sanilac3	8,33	7,21	18,6	20% w/v IF
Sanilac3	7,58			
Sanilac3	5,72			

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ, 10 λεπτά σαπωνοποίηση, 2 εκχυλίσσεις των 20 λεπτών, 800μl πετρελαϊκού αιθέρα-0,1% BHT, 150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων

V. Σαπωνοποίηση

3.2.2.3 Όγκος ομογενοποιημένου δείγματος 10% w/v

Με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων διαπιστώθηκε πως η ιδανική ποσότητα που επιτρέπει τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των βιταμινών είναι τα 2mL ομογενοποιημένου δείγματος. Το 1 mL απορρίφθηκε επειδή τα ποσά των βιταμινών που παραλαμβάνουμε είναι ανεπαρκή και η % σχετική απόκλιση των δειγμάτων είναι μεγάλη τόσο για την βιταμίνη A (23,6% και 15%) όσο και για την βιταμίνη E (24% και 15%). Τα 5 mL απορρίφθηκαν αφού δημιουργούν ένα πολύ πυκνό δείγμα όπου η εκχύλιση του και ο διαχωρισμός των φάσεων γίνεται δύσκολα με αποτέλεσμα είτε να μην γίνεται πλήρης παραλαβή της υπερκείμενης οργανικής φάσης είτε να αυξάνει τη δυσκολία της πειραματικής επεξεργασίας μιας και λαμβανόταν μέρος της ανόργανης φάσης. Επιπροσθέτως, για όγκο 2 mL παρατηρήθηκαν καλύτερες % RSD είτε για τη ρετινόλη (9,2% και 7,2% για n=3) είτε και για την α-τοκοφερόλη (7,1% για n=3).

Πίνακας 7 :Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης όγκου δείγματος για την βιταμίνη Α

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της ρετινόλης					Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα ρετινόλης		
Δείγμα	μg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος	μg/100g	Average	%RSD
Sanilac2	153	208	24	1 mL	656	786	15
Sanilac2	247				879		
Sanilac2	224				823		
Sanilac2	268	296	9,2	2 mL	779	846	7,6
Sanilac2	322				907		
Sanilac2	299				852		
Sanilac2	86	113	21	5 mL	263	326	17
Sanilac2	122				346		
Sanilac2	132				370		

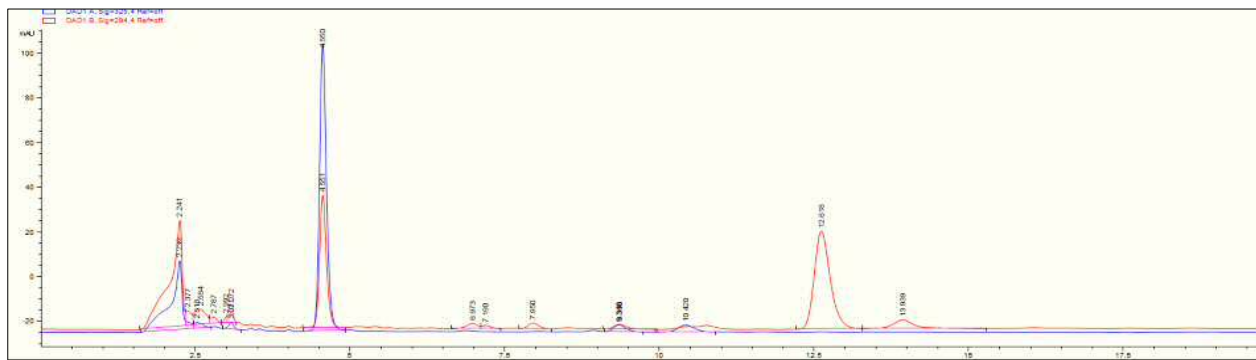
Πίνακας 8 :Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης όγκου δείγματος για την βιταμίνη Ε

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης				
Δείγμα	mg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος
Sanilac2	0,84	1,21	39	1 mL
Sanilac2	1,73			
Sanilac2	1,05			
Sanilac2	4,61	4,63	7,1	2 mL
Sanilac2	4,32			
Sanilac2	4,97			
Sanilac2	1,82	1,63	11	5 mL
Sanilac2	1,50			
Sanilac2	1,58			

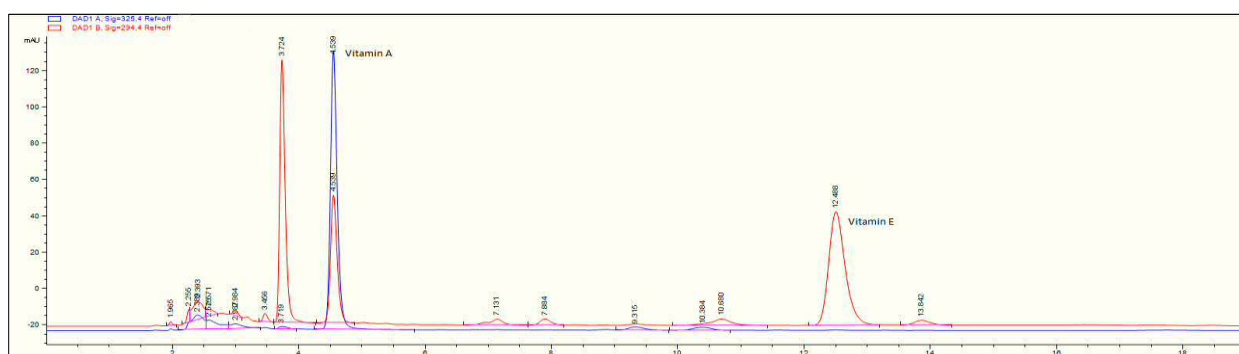
Πειραματικές συνθήκες:2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ,5 λεπτά σαπωνοποίηση, 2 εκχυλίσαις των 20 λεπτών,400μl πετρελαϊκού αιθέρα,100μl μεθανόλης και χρήση ογκομετρικών φιαλών των 5 ml

3.2.2.4 Επίδραση προσθήκης ασκορβικού οξέος

Κρίθηκε ότι είναι απαραίτητη η παρασκευή του αιθανολικού διαλύματος σε καθημερινή βάση επειδή το ασκορβικό οξύ οξειδώνεται εύκολα σε άλλες μορφές με αποτέλεσμα να ελλοχεύει ο κίνδυνος να περιοριστεί η αντιοξειδωτική του δράση. Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται η οξείδωση που έχει υποστεί το ασκορβικό οξύ με το πέρασ μιας μέρας.



Εικόνα 23: Χρωματογράφημα με την χρήση αιθανολικού διαλύματος με 0,2%w/v ασκορβικό οξύ ημέρας



Εικόνα 24: Χρωματογράφημα με την χρήση παλιού αιθανολικού διαλύματος με 0,2%w/v ασκορβικό οξύ

Απουσία ασκορβικού οξέος παρατηρείται απώλεια των βιταμινών επειδή τα δείγματα παραμένουν απροστάτευτα κατά την διάρκεια της σαπωνοποίησης. Παραλαμβάνουμε σχεδόν την μισή ποσότητα των βιταμινών A και E και η % RSD των δειγμάτων είναι σχεδόν διπλάσια.(26 και 21 για τις βιταμίνες A και E για n=3)

Πίνακας 9: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης ασκορβικού οξέος για την βιταμίνη A

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της ρετινόλης					Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα ρετινόλης		
Δείγμα	μg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος	μg/100g	Average	%RSD
Sanilac2	247	286	26	απουσία ασκορβικού	584	653	20
Sanilac2	370				802		
Sanilac2	241				573		
Sanilac2	384	466	16	παρουσία ασκορβικού	827	972	14
Sanilac2	529				1084		
Sanilac2	484				1004		

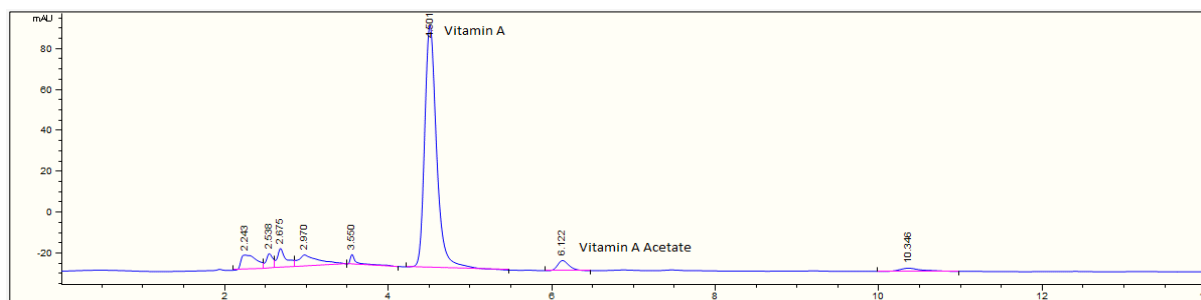
Πίνακας 10 :Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης ασκορβικού οξέος για την βιταμίνη Ε

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης				
Δείγμα	mg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος
Sanilac2	4,08	4,09	21	απουσία ασκορβικού
Sanilac2	4,94			
Sanilac2	3,24			
Sanilac2	7,44	8,9	15	παρουσία ασκορβικού
Sanilac2	10,1			
Sanilac2	9,18			

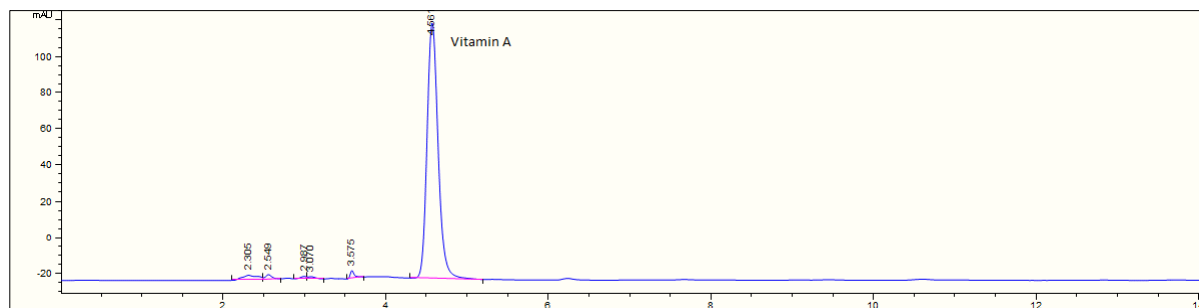
Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα, 5 λεπτά σαπωνοποίησης ,2 εκχυλίσες των 20 λεπτών ,**400μl πετρελαϊκού αιθέρα με 1% BHT**, 100μl μεθανόλης και χρήση ογκομετρικών φιαλών των 5 ml.

3.2.2.5 Χρόνος σαπωνοποίησης

Διαπιστώθηκε ότι στα 5 λεπτά σαπωνοποίησης δεν επιτυγχάνεται πάντα πλήρης σαπωνοποίηση των βιταμινών με αποτέλεσμα ένα μέρος τους να παραμένει ασαπωνοποίητο και κατά συνέπεια στο χρωματογράφημα να παρατηρούμε 2 κορυφές αντί για μία που αναμέναμε, όπως φαίνεται και στο παρακάτω χρωματογράφημα.



Εικόνα 25:Χρωματογράφημα δείγματος που υπέστη μερική σαπωνοποίηση



Εικόνα 26: Χρωματογράφημα δείγματος που υπέστη πλήρη σαπωνοποίηση

Γι' αυτό το λόγο δοκιμάστηκαν και μεγαλύτεροι χρόνοι σαπωνοποίησης όπως 10, 20, 30, 40, και 50 min. Επιλέχθηκε ως βέλτιστος χρόνος τα 10 λεπτά , καθώς επιτυγχάνεται πλήρης σαπωνοποίηση χωρίς να υπάρχει κίνδυνος να καταστραφούν οι βιταμίνες όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα. Ένα ακόμη κέρδος της αύξησης του χρόνου σαπωνοποίησης (κατά 5 λεπτά μόνο) ήταν η ανίχνευση της βιταμίνης D₃ . Απορρίφθηκαν μεγαλύτεροι χρόνοι σαπωνοποίησης γιατί καταστρέφεται ένα μέρος των βιταμινών και κυρίως της βιταμίνης E, όπως φαίνεται και στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 11: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης χρόνου σαπωνοποίησης για την βιταμίνη A

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της ρετινόλης					Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα ρετινόλης		
Δείγμα	μg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος	μg/100g	Average	%RSD
Φαρίν Λακτέ	427	524	24	5 min	977	1147	19
Φαρίν Λακτέ	482				1074		
Φαρίν Λακτέ	662				1392		
Φαρίν Λακτέ	692	591	15	10 min	1445	1267	13
Φαρίν Λακτέ	560				1213		
Φαρίν Λακτέ	520				1142		
Φαρίν Λακτέ	542	531	4,5	20 min	1180	1161	3,7
Φαρίν Λακτέ	548				1190		
Φαρίν Λακτέ	503				1112		
Φαρίν Λακτέ	825	710	15	30 min	1681	1477	13
Φαρίν Λακτέ	691				1444		
Φαρίν Λακτέ	613				1305		
Φαρίν Λακτέ	696	690	9,3	40 min	1453	1442	7,9
Φαρίν Λακτέ	623				1324		
Φαρίν Λακτέ	751				1550		
Φαρίν Λακτέ	711	706	6,6	50 min	1480	1470	5,6
Φαρίν Λακτέ	657				1384		
Φαρίν Λακτέ	750				1547		

Πίνακας 12: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης χρόνου σαπωνοποίησης για την βιταμίνη Ε

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης				
Δείγμα	mg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος
Φαρίν Λακτέ	5,10	4,97	17	5 min
Φαρίν Λακτέ	5,72			
Φαρίν Λακτέ	4,09			
Φαρίν Λακτέ	6,87	6,35	8,2	10 min
Φαρίν Λακτέ	6,33			
Φαρίν Λακτέ	5,83			
Φαρίν Λακτέ	5,96	5,85	3,5	20 min
Φαρίν Λακτέ	5,96			
Φαρίν Λακτέ	5,61			
Φαρίν Λακτέ	5,59	4,56	20	30 min
Φαρίν Λακτέ	4,04			
Φαρίν Λακτέ	4,06			
Φαρίν Λακτέ	4,12	4,28	9,1	40 min
Φαρίν Λακτέ	4,00			
Φαρίν Λακτέ	4,72			
Φαρίν Λακτέ	4,42	4,35	1,5	50 min
Φαρίν Λακτέ	4,30			
Φαρίν Λακτέ	4,32			

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα, 2 εκχυλίσες των 20 λεπτών ,800μl πετρελαϊκού αιθέρα -0.1% BHT, 150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων

VI. Εκχύλιση

3.2.2.6 Επίδραση του αριθμού εκχυλίσεων και του χρόνου μαγνητικής ανάδευσης

Συγκριτικά όλων των αποτελεσμάτων , η μία εκχύλιση ήταν ανεπαρκής. Μεταξύ των 2 εκχυλίσεων προτιμώνται οι 2 εκχυλίσες των 20 λεπτών η καθεμία δεδομένου ότι επιτυγχάνεται καλύτερη παραλαβή των βιταμινών. Μεταξύ και των 3 εκχυλίσεων προτιμώνται οι 3 εκχυλίσες των 15 λεπτών η καθεμία καθώς στις εκχυλίσες των 20 λεπτών αρχίζει αι καταστρέφεται ένα μέρος των βιταμινών Α και Ε. Ανάμεσα στις 2 εκχυλίσες των 20 λεπτών και στις 3 εκχυλίσες των 15 λεπτών προτιμώνται οι 2 εκχυλίσες των 20 λεπτών, δεδομένου ότι τα αποτελέσματα παρουσιάζουν καλύτερη επαναληψιμότητα ως προς την

βιταμίνη Α (%RSD =15%) ενώ ταυτόχρονα εκχυλίζεται ικανοποιητικά και η βιταμίνη Ε σε σχέση με τις 3 εκχυλίσσεις των 15 λεπτών όπου παρατηρείται σημαντική μείωση της.(από 7,69 mg/100g στα 5,12mg/100g) Επιλέγοντας έτσι τις 2 εκχυλίσσεις των 20 λεπτών μειώνεται ο χρόνος επεξεργασίας των δειγμάτων και κατά συνέπεια και ο κίνδυνος αλλοίωσης των αναλυτών μέχρι να γίνει η εισαγωγή τους στον χρωματογράφο.

Πίνακας 13:Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης αριθμού και χρόνου εκχύλισης για την βιταμίνη Α

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της ρετινόλης					Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα ρετινόλης		
Δείγμα	μg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος	μg/100g	Average	%RSD
Sanilac2	141	200	26	1 εκχύλιση x 20 min	397	501	18
Sanilac2	219				536		
Sanilac2	239				571		
Sanilac2	223	290	26	2 εκχυλίσσεις x 5 min	542	661	20
Sanilac2	372				806		
Sanilac2	275				634		
Sanilac2	323	342	5,4	2 εκχυλίσσεις x 10 min	719	752	18
Sanilac2	360				784		
Sanilac2	343				754		
Sanilac2	364	334	15	2 εκχυλίσσεις x 15 min	791	738	12
Sanilac2	276				636		
Sanilac2	362				788		
Sanilac2	442	483	14	2 εκχυλίσσεις x 20 min	930	1002	12
Sanilac2	559				939		
Sanilac2	447				1136		
Sanilac2	598	629	23	3 εκχυλίσσεις x 15 min	1205	1259	20
Sanilac2	501				1033		
Sanilac2	787				1539		
Sanilac2	580	523	39	3 εκχυλίσσεις x 20 min	1173	1073	33
Sanilac2	299				677		
Sanilac2	690				1369		

Πίνακας 14: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης αριθμού και χρόνου εκχύλισης για την βιταμίνη E

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης				
Δείγμα	mg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος
Sanilac2	1,49	1,00	42	1 εκχύλιση x20 min
Sanilac2	0,78			
Sanilac2	0,74			
Sanilac2	1,24	1,26	25	2 εκχυλίσσεις x 5 min
Sanilac2	1,58			
Sanilac2	0,96			
Sanilac2	2,69	2,51	6,4	2 εκχυλίσσεις x 10 min
Sanilac2	2,48			
Sanilac2	2,37			
Sanilac2	0,74	1,80	100	2 εκχυλίσσεις x 15 min
Sanilac2	3,89			
Sanilac2	0,78			
Sanilac2	4,89	7,69	32	2 εκχυλίσσεις x 20 min
Sanilac2	8,85			
Sanilac2	9,32			
Sanilac2	3,27	5,12	108	3 εκχυλίσσεις x 15 min
Sanilac2	0,74			
Sanilac2	11,4			
Sanilac2	2,04	4,60	93	3 εκχυλίσσεις x 20 min
Sanilac2	2,21			
Sanilac2	9,54			

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ, 5 λεπτά σαπωνοποίηση, 400μl πετρελαϊκού αιθέρα, 100μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων.

3.2.2.7 Χρήση αντιοξειδωτικών-Διερεύνηση ρόλου BHT

Στην παράγραφο αυτή μελετήθηκε η δράση του ασκορβικού οξέος και του BHT. Παρατηρήθηκε πως η παρουσία του αντιοξειδωτικού BHT προσφέρει επιπλέον προστατευτική δράση σε σχέση με το ασκορβικό οξύ και συνεπώς κρίθηκε απαραίτητη η παρουσία και των δύο αντιοξειδωτικών. Απορρίφθηκε η περίπτωση της πλήρους έλλειψης αντιοξειδωτικών επειδή με το πέρασμα του χρόνου αυξάνεται η απώλεια βιταμινών .

Η προσθήκη μόνο του BHT στο στάδιο της εκχύλισης δεν προσφέρει πλήρη προστασία λόγω της έλλειψης ασκορβικού οξέος κατά την σαπωνοποίηση με αποτέλεσμα να καταστρέφεται μέρος των βιταμινών λόγω της παραμονής των βιταμινών στο υδατόλουτρο των 80 °C.

Η προσθήκη μόνο ασκορβικού οξέος προστατεύει ικανοποιητικά μόνο την βιταμίνη Α ενώ δεν παρατηρήθηκε κάτι παρόμοιο για την βιταμίνη Ε και αυτό διαπιστώθηκε καθώς με το πέρασ του χρόνου η τιμή της βιταμίνης Ε ήταν ασταθής με κακή επαναληψιμότητα και με % RSD 46% απουσία BHT έναντι 3,8% παρουσία BHT.

Συμπερασματικά, για να επιτευχθεί καλή επαναληψιμότητα και πλήρης προστασία των βιταμινών κρίθηκε απαραίτητη η προσθήκη και των δύο αντιοξειδωτικών, του μεν ασκορβικού οξέος για την προστασία της βιταμίνης Α και του δε BHT κυρίως για την προστασία της βιταμίνης Ε.

Πίνακας 15: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης BHT για την βιταμίνη Α

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της ρετινόλης					Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα ρετινόλης		
Δείγμα	μg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος	μg/100g	Average	%RSD
Φαρίν Λακτε	624	743	14	απουσία BHT	1324	1535	12
Φαρίν Λακτε	797				1631		
Φαρίν Λακτε	808				1650		
Φαρίν Λακτε	877	845	3,4	παρουσία BHT	1772	1716	2,9
Φαρίν Λακτε	837				1703		
Φαρίν Λακτε	821				1674		

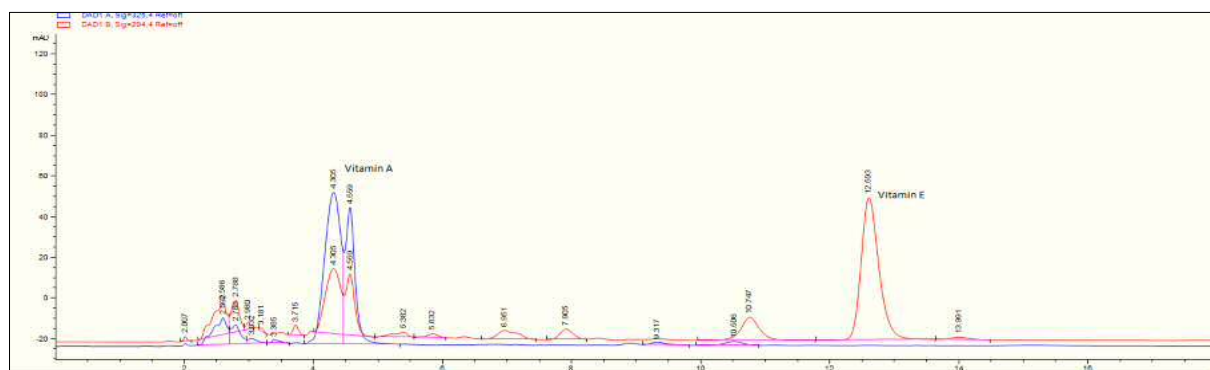
Πίνακας 16: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης BHT για την βιταμίνη Ε

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης				
Δείγμα	mg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος
Φαρίν Λακτε	2,85	5,81	46	απουσία BHT
Φαρίν Λακτε	7,98			
Φαρίν Λακτε	6,60			
Φαρίν Λακτε	6,43	6,21	3,8	παρουσία BHT
Φαρίν Λακτε	5,96			
Φαρίν Λακτε	6,25			

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml **αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ**, 5 λεπτά σαπωνοποίηση, 2 εκχύλισεις των 20 λεπτών, 150μl μεθανόλης, 800μl πετρελαϊκού αιθέρα και χρήση διαφανών φιαλιδίων.

3.2.2.8 Επίδραση της ποσότητας πετρελαϊκού αιθέρα στην εκχύλιση

Έγινε βελτιστοποίηση της ποσότητας του πετρελαϊκού αιθέρα για 300,400,800 και 1600 μl. Τα 300μl είναι ανεπαρκής ποσότητα διαλύτη καθώς δεν μπορεί να διαχωριστούν εύκολα οι δυο φάσεις. Τα 1600μl είναι πολύ μεγάλος όγκος και δεν δίνει αναλογικά μεγαλύτερο σήμα αλλά μερικές φορές βρέθηκε να καταστρέφεται η βιταμίνη A, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 27**.



Εικόνα 27: Εκχύλιση δείγματος με 1600μl πετρελαϊκού αιθέρα

Τα 400μl είναι ικανοποιητική ποσότητα διαλύτη για το διαχωρισμό των φάσεων αλλά παρατηρήθηκε πως τα 800μl διαλύτη δίνουν καλύτερη επαναληψιμότητα και συμβάλλουν στην καλύτερη εκχύλιση των βιταμινών διπλασιάζοντας σχεδόν τα ποσά των βιταμινών που παραλαμβάνουμε. (% RSD 9,0 και 4,0 για την βιταμίνη A και 5,8 για την βιταμίνη E για n=3)

Πίνακας 17: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης όγκου πετρελαϊκού αιθέρα για την βιταμίνη Α

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της ρετινόλης					Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δι/μα ρετινόλης		
Δείγμα	μg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος	μg/100g	Average	%RSD
Sanilac2	442	453	22	400μl πετρελαϊκού αιθέρα	930	949	19
Sanilac2	559				1136		
Sanilac2	359				782		
Sanilac2	887	831	9,0	800μl πετρελαϊκού αιθέρα	1717	1657	4,0
Sanilac2	860				1669		
Sanilac2	746				1585		
Sanilac2	0	-	-	1600μl πετρελαϊκού αιθέρα	0	-	-
Sanilac2	0				0		
Sanilac2	919				1773		

Πίνακας 18: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης όγκου πετρελαϊκού αιθέρα για την βιταμίνη Ε

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης				
Δείγμα	mg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος
Sanilac2	4,89	7,69	32	400μl πετρελαϊκού αιθέρα
Sanilac2	8,85			
Sanilac2	9,32			
Sanilac2	11,7	12,00	5,8	800μl πετρελαϊκού αιθέρα
Sanilac2	12,8			
Sanilac2	11,5			
Sanilac2	3,56	8,46	52	1600μl πετρελαϊκού αιθέρα
Sanilac2	9,80			
Sanilac2	12,0			

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ ,5 λεπτά σαπωνοποίηση, 2 εκχυλίσσεις των 20 λεπτών, 100μl μεθανόλης και χρήση διαφανών μπουκαλιών

3.2.2.9 Συγκέντρωση BHT

Δοκιμάστηκαν διαλύματα με 1% ,0.5 % και 0.2% BHT για να μελετηθεί η επίδραση στην προστασία των βιταμινών Με βάση τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι και το διάλυμα 0.2% BHT μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά. Επειδή όμως όλα τα πειράματα είχαν γίνει με 1% BHT αλλά και για λόγους συγκρισιμότητας και για μεγαλύτερη προστασία των βιταμινών διατηρήθηκε σε όλα τα πειράματα το ποσοστό αυτό..

Πίνακας 19: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης συγκέντρωσης BHT για την βιταμίνη Α

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της ρετινόλης					Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα ρετινόλης		
Δείγμα	μg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος	μg/100g	Average	%RSD
Φαρίν Λακτε	1121	1212	13	0.2 % BHT	2204	2365	12
Φαρίν Λακτε	1396				2690		
Φαρίν Λακτε	1119				2201		
Φαρίν Λακτε	1216	1097	11	0.5% BHT	2373	2162	9,5
Φαρίν Λακτε	983				1960		
Φαρίν Λακτε	1093				2154		
Φαρίν Λακτε	948	983	5,4	1% BHT	1898	1960	4,8
Φαρίν Λακτε	1044				2069		
Φαρίν Λακτε	957				1914		

Πίνακας 20: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης συγκέντρωσης BHT για την βιταμίνη Ε

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης				
Δείγμα	mg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος
Φαρίν Λακτε	8,74	8,70	1,6	0.2 % BHT
Φαρίν Λακτε	8,55			
Φαρίν Λακτε	8,82			
Φαρίν Λακτε	8,54	8,18	7,1	0.5% BHT
Φαρίν Λακτε	7,52			
Φαρίν Λακτε	8,50			
Φαρίν Λακτε	7,42	7,69	5,4	1% BHT
Φαρίν Λακτε	8,17			
Φαρίν Λακτε	7,48			

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ ,5 λεπτά σαπωνοποίηση, 800μl πετρελαϊκού αιθέρα, 150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών μπουκαλιών.

3.2.2.10 Επίδραση του όγκου διαλύτη ανασύστασης

Σύμφωνα με την χρησιμοποιούμενη μέθοδο προστίθενται 100μl μεθανόλης. Ωστόσο ,ο όγκος αυτός είναι πολύ μικρός και υπάρχει μεγάλη απόκλιση μεταξύ των ίδιων δειγμάτων.(%RSD 22 % και 19% για την βιταμίνη Α και 32% για την βιταμίνη Ε για n=3) Γι' αυτό δοκιμάστηκαν 150μl μεθανόλης βελτιώνοντας έτσι σημαντικά την επαναληψιμότητα των δειγμάτων τόσο για τη ρετινόλη (%RSD=1,8 % για n=3) όσο και την α-τοκοφερόλη.(%RSD=3,1 % για n=3)

Πίνακας 21:Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης όγκου διαλύτη ανασύστασης για την βιταμίνη Α

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της ρετινόλης					Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα ρετινόλης		
Δείγμα	μg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος	μg/100g	Average	%RSD
Sanilac2	442	453	22	100μl μεθανόλης	930	949	19
Sanilac2	559				1136		
Sanilac2	359				782		
Sanilac2	447	445	1,8	150μl μεθανόλης	675	672	1,4
Sanilac2	450				679		
Sanilac2	436				661		

Πίνακας 22:Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης όγκου διαλύτη ανασύστασης για την βιταμίνη Ε

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης				
Δείγμα	mg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος
Sanilac2	4,89	7,69	32	100μl μεθανόλης
Sanilac2	8,85			
Sanilac2	9,32			
Sanilac2	7,98	8,28	3,1	150μl μεθανόλης
Sanilac2	8,43			
Sanilac2	8,43			

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος,2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ,5 λεπτά σαπωνοποίησης,2 εκχυλίσσεις των 20 λεπτών ,400μl πετρελαϊκού αιθέρα και χρήση διαφανών μπουκαλιών.

3.2.2.11 Επιλογή κατάλληλων σκευών

Διάμετρος μαγνητικών αναδευτήρων

Το μέγεθος τους επηρεάζει την ταχύτητα ανάδευσης. Με την χρήση των μικρών μαγνητικών αναδευτήρων αυξήθηκαν οι στροφές ανάδευσης και επιτεύχθηκε πλήρης ανάμιξη των δύο φάσεων, γεγονός που δεν συνέβη με την χρήση των μεσαίων αναδευτήρων, με αποτέλεσμα την καλύτερη εκχύλιση των βιταμινών.

Υάλινα σκεύη

Τα σκουρόχρωμα και τα διαφανή μικρά μπουκαλάκια δίνουν καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τις ογκομετρικές φιάλες λόγω της μεγαλύτερης ταχύτητας ανάδευσης που μπορεί να εφαρμοστεί καθώς και της πιο στρωτής-ομαλής περιστροφής του μαγνητικού αναδευτήρα αφού ο πάτος της ογκομετρικής φιάλης είναι στενός και ο μαγνήτης βρίσκεται στα τοιχώματά της προκαλώντας ασυνέχειες στην ανάδευση και ίσως και ανατροπή της ογκομετρικής φιάλης. Συνεπώς η %RSD να είναι πολύ μεγαλύτερη για τις ογκομετρικές φιάλες (21% για τη βιταμίνη Α) έναντι των διαφανών (2,4 % για τη βιταμίνη Α) και των σκουρόχρωμων μπουκαλιών (10% για τη βιταμίνη Α). Τα σκουρόχρωμα μπουκαλάκια παρουσιάζουν το πλεονέκτημα της επιπλέον προστασίας από το φως (πέραν του αλουμινόχαρτου που χρησιμοποιείται) αλλά είναι πιο δύσκολη η απομάκρυνση της υπερκείμενης οργανικής φάσης καθώς δεν είναι ευδιάκριτο το σημείο διαχωρισμού των φάσεων με αποτέλεσμα να λαμβάνεται πολλές φορές και ένα μικρό μέρος της υδατικής φάσης. Γι' αυτό τον πρακτικό λόγο τα διαφανή μπουκαλάκια αποτέλεσαν την καλύτερη επιλογή για το στάδιο της εκχύλισης.

Πίνακας 23: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης υάλινων σκευών για την βιταμίνη Α

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της ρετινόλης					Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα ρετινόλης		
Δείγμα	μg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος	μg/100g	Average	%RSD
Sanilac2	427	433	2,4	διαφανές σκεύος	902	913	2
Sanilac2	445				934		
Sanilac2	427				903		
Sanilac2	375	384	10	σκουρόχρωμο σκεύος	811	826	8,5
Sanilac2	349				765		
Sanilac2	427				903		
Sanilac2	390	317	21	ογκομετρική φιάλη 5 ml	837	708	16
Sanilac2	295				669		
Sanilac2	266				618		

Πίνακας 24: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης υάλινων σκευών για την βιταμίνη Ε

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης				
Δείγμα	mg/100g	Average	%SD	Μεταβλητή Παράμετρος
Sanilac2	6,49	5,99	9,9	διαφανές σκεύος
Sanilac2	6,13			
Sanilac2	5,34			
Sanilac2	5,84	6,21	5,2	σκουρόχρωμο σκεύος
Sanilac2	6,43			
Sanilac2	6,36			
Sanilac2	2,63	3,27	18,4	ογκομετρική φιάλη 5 ml
Sanilac2	3,83			
Sanilac2	3,35			

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ, 5 λεπτά σαπωνοποίηση, 2 εκχυλίσσεις των 20 λεπτών, 400μl πετρελαϊκού αιθέρα και 100μl μεθανόλης

Πιπέτες Pasteur-Gas tight Syringe

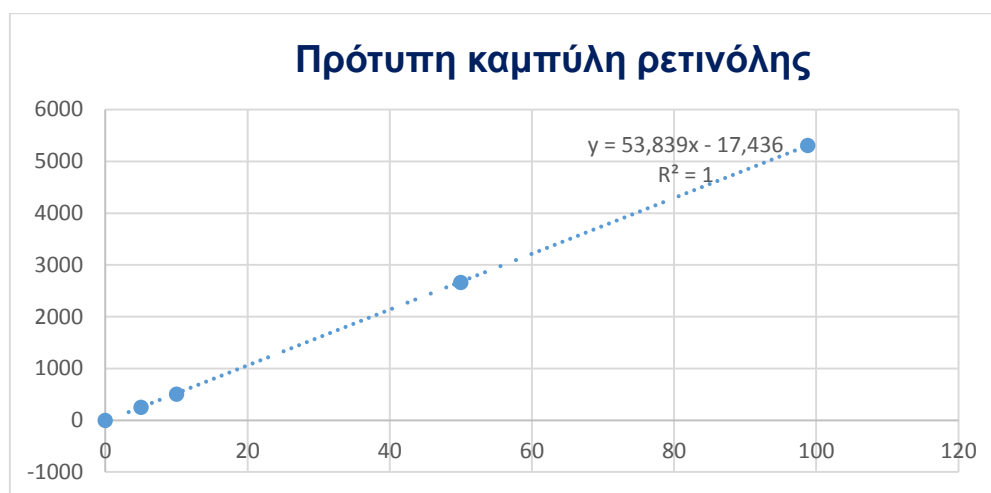
Διαπιστώθηκε ότι με την σύριγγα μπορεί να γίνει καλύτερη απομάκρυνση της άνω οργανικής φάσης αφενός αυξάνοντας το όγκο της οργανικής φάσης που παραλαμβάνουμε και αφετέρου αποφεύγοντας την παραλαβή μη οργανικής φάσης, γεγονός που ήταν πάρα πολύ δύσκολο με την χρήση των πιπετών pasteur και γι' αυτούς τους λόγους επιλέχθηκε να χρησιμοποιείται η σύριγγα.

Με το πέρας όλων των παραπάνω βελτιστοποιήσεων επιλέχθηκε η βέλτιστη πειραματική πορεία που αναφέρεται στην παράγραφο 2.3.6.

3.2.3 Προσθήκη πρότυπης ένωσης σε δείγμα

ι. Προσθήκη ρετινόλης

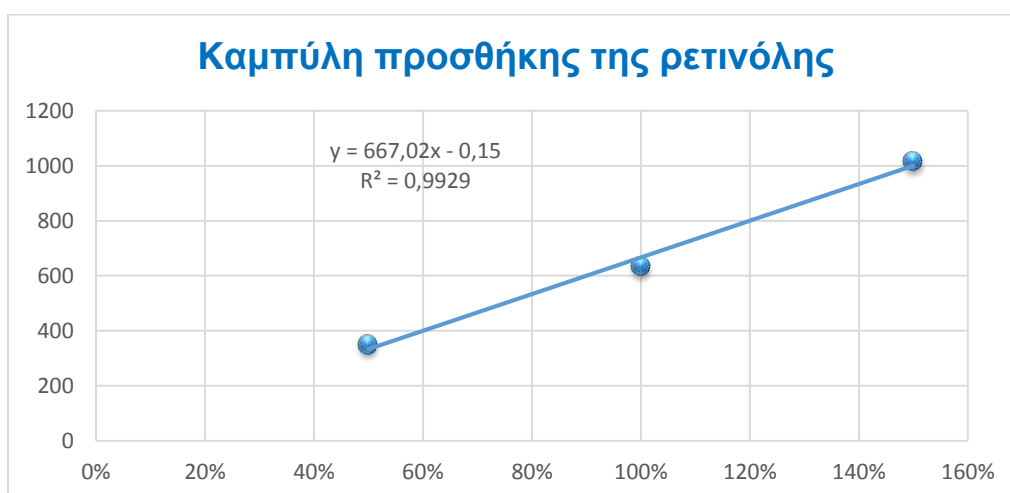
Η ρετινόλη είναι η αλκοολική μορφή της βιταμίνης Α και η πιο ευαίσθητη στις οξειδώσεις σε σχέση με τις εστεροποιημένες μορφές της.¹⁴² Με την σαπωνοποίηση δεν αλλάζει μορφή και ο χρόνος έκλουσης της είτε με είτε χωρίς σαπωνοποίηση όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 25** είναι σταθερός στα 4.51 λεπτά. Όλες οι ποσοτικοποιήσεις γίνονται με βάση την παρακάτω καμπύλη αναφοράς της που δημιουργείται από τα πρότυπα διαλύματα ρετινόλης σε 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις.



Πίνακας 25: Προσθήκη ρετινόλης

Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα ρετινόλης			
Δείγμα	μg/100g	%Recovery	Θεωρητική τιμή (μg/100g)
50%	525	105	500
100%	951	95,1	1000
150%	1525	102	1500

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ, 2 εκχυλίσσεις των 20 λεπτών, 5 λεπτά σαπωνοποίηση, 800μl πετρελαϊκού αιθέρα, 100μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων.



Όπως φαίνεται και από το παραπάνω πίνακα και από το αντίστοιχο διάγραμμα τα δείγματα με προσθήκη ρετινόλης παρουσιάζουν καλή επαναληψιμότητα και καλές ανακτήσεις. (>95%)

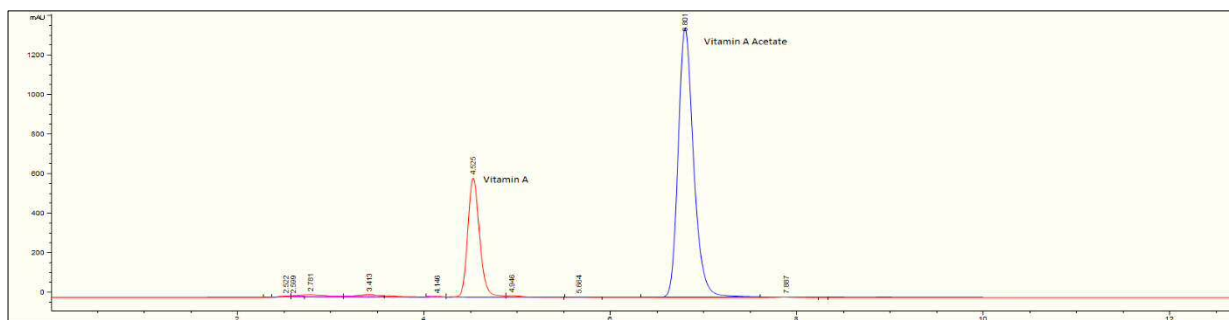
ii. Προσθήκη οξικού εστέρα της ρετινόλης

Με την σαπωνοποίηση ο οξικός εστέρας της ρετινόλης μετατρέπεται σε ρετινόλη και εκλούεται τελικά στα 4.51 λεπτά.

Ο οξικός εστέρας της ρετινόλης εμφανίζει περίπου τριπλάσια ευαισθησία (τριπλάσιο σήμα) σε σχέση με την ρετινόλη στην ίδια συγκέντρωση, όπως φαίνεται και από το παρακάτω πίνακα και το αντίστοιχο χρωματογράφημα. (Εικόνα 28)

Πίνακας 26: Συγκριτικός πίνακας σήματος για πρότυπο διάλυμα βιταμίνης Α

Ένωση	Σήμα
Ρετινόλη (100ppm)	5313
Οξικός εστέρας της ρετινόλης(100ppm)	15733



Εικόνα 28: Πρότυπο διάλυμα ρετινόλης και οξικού εστέρα της ρετινόλης 100 ppm

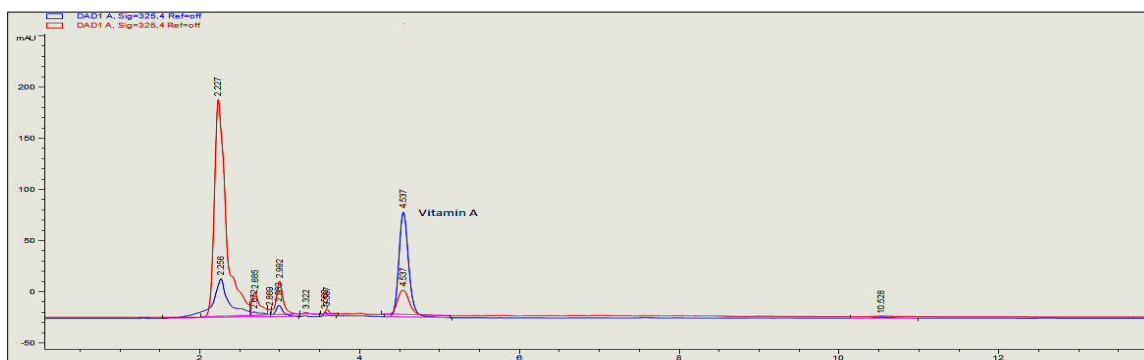
Πραγματοποιήθηκαν δυο διαφορετικά είδη προσθήκης στην ίδια συγκέντρωση σε Φαρίν Λακτέ Ελεύθερη Βιταμινών. Προστέθηκε :

- a) Ρετινόλη και
- b) Οξικός εστέρας της ρετινόλης

Τα δείγματα αυτά ακολούθησαν την ίδια πειραματική διαδικασία με τον ίδιο χρόνο σαπωνοποίησης. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 29** και στα δυο (a) και (b) εκλούστηκε ρετινόλη, όπως ήταν αναμενόμενο αφού ο εστέρας της ρετινόλης σαπωνοποιήθηκε. Αυτό όμως που είναι χαρακτηριστικό είναι ότι στο δείγμα (b) το σήμα που καταγράφηκε ήταν σχεδόν τριπλάσιο από αυτό του (a). Αυτό πιθανότατα εξηγείται από το ότι η οξική ομάδα «προστατεύει» καλύτερα την ρετινόλη κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Πίνακας 27: Συγκριτικός πίνακας σήματος προσθήκης για την βιταμίνη Α

Προσθήκη πρότυπης ένωσης	Σήμα
Κορυφή ρετινόλης	248
Κορυφή ρετινόλης από οξικό εστέρα της ρετινόλης	877



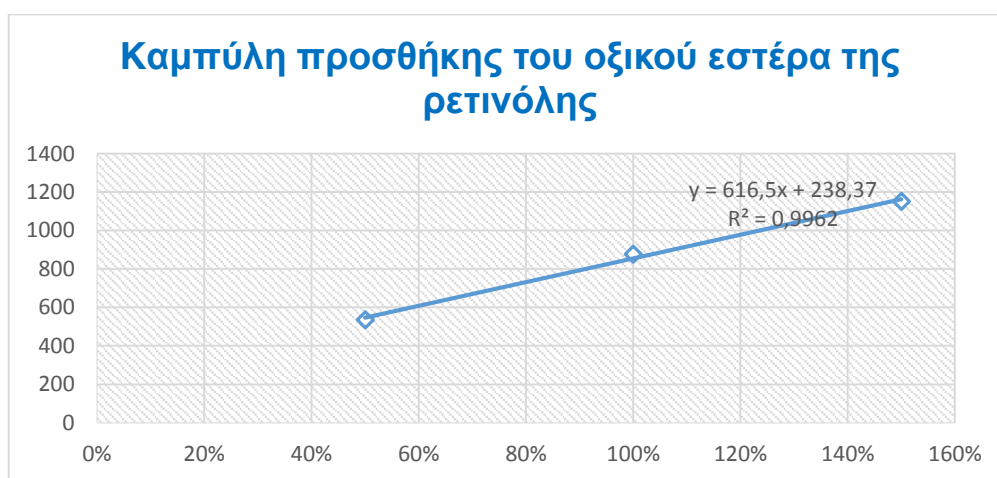
Εικόνα 29:Χρωματογράφημα προσθήκης ρετινόλης και οξικού εστέρα της ρετινόλης ίδιας συγκεντρώσεως(5ppm)

Έτσι, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων πρέπει να γίνεται με την καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της ρετινόλης και όχι με την πρότυπη καμπύλη της ρετινόλης λόγω της διαφορετικής ευαισθησίας, ειδικά θα υπολογίζουμε έτσι την διπλάσια ποσότητα βιταμίνης.

Πίνακας 28:Συγκεντρωτικός πίνακας προσθήκης με οξικό εστέρα της ρετινόλης

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της ρετινόλης				Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα ρετινόλης	
Δείγμα	μg/100g	%Recovery	Μεταβλητή Παράμετρος	μg/100g	%Recovery
50%	315	126	προσθήκη οξικού εστέρα της ρετινόλης	778	311
100%	583	117		1252	250
150%	799	107		1634	218

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ, 2 εκχυλίσες των 20 λεπτών, 10 λεπτά σαπωνοποίηση, 800μl πετρελαϊκού αιθέρα-0.1%BHT, 150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων.



Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι τα δείγματα παρουσιάζουν καλή επαναληψιμότητα(>105%) και καλή γραμμικότητα.

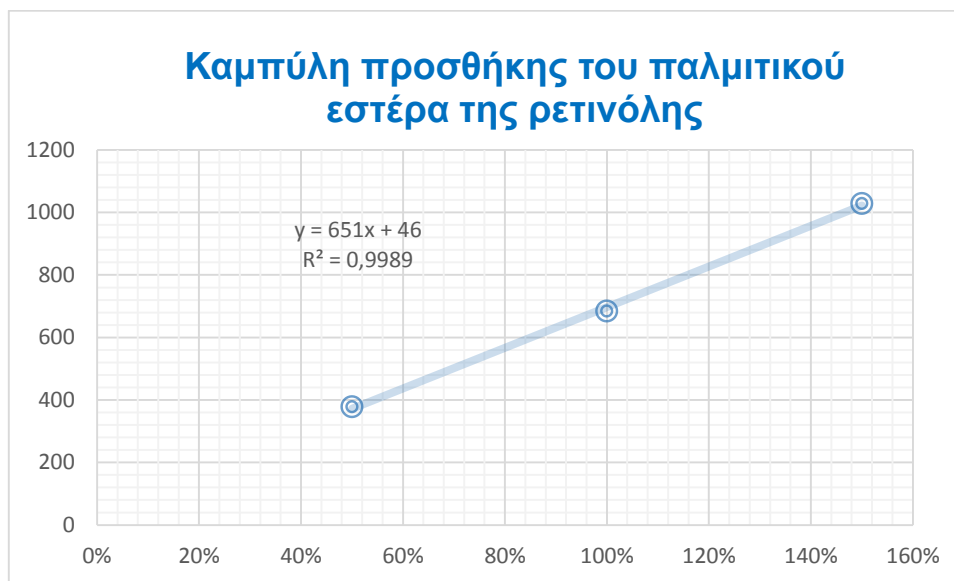
iii. Προσθήκη παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης

Σαν πρότυπο διάλυμα εκλούεται στα 52.05 λεπτά. Με την σαπωνοποίηση μετατρέπεται και αυτός (όπως ο οξικός εστέρας της ρετινόλης) σε ρετινόλη(αλκοολική μορφή) και εκλούεται τελικά στα 4.51 λεπτά. Κατά συνέπεια η ποσοτικοποίηση του γίνεται με βάση την πρότυπη καμπύλη της ρετινόλης.

Πίνακας 29:Προσθήκη παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης

Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα ρετινόλης			
Δείγμα	μg/100g	%Recovery	Θεωρητική τιμή (μg/100g)
50%	559	78,1	715
100%	985	68,9	1430
150%	1463	68,2	2145

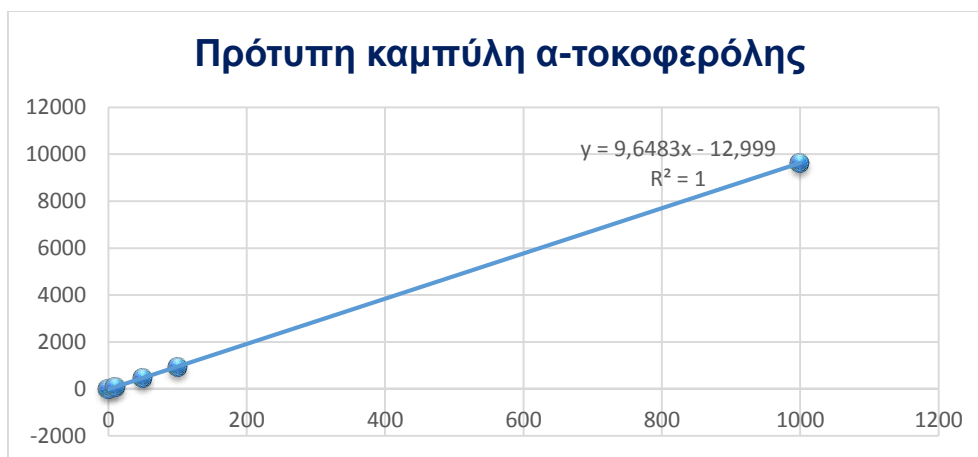
Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ, 2 εκχυλίσες των 20 λεπτών, 10 λεπτά σαπωνοποίησης, 800μl πετρελαϊκού αιθέρα-0.1%BHT, 150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων.



Η προσθήκη παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης βασίστηκε σε πρότυπο υλικό **-SRM 1849a** καθώς οι βρεφικές τροφές που μελετήθηκαν δεν περιείχαν παλμιτικό εστέρα της ρετινόλης. Όπως ήταν αναμενόμενο, η μέθοδος δεν ανταποκρίνεται απόλυτα σε αυτού του είδους την προσθήκη και αυτό δικαιολογεί και τις χαμηλές ανακτήσεις (<80%)

iv. Προσθήκη α-τοκοφερόλης

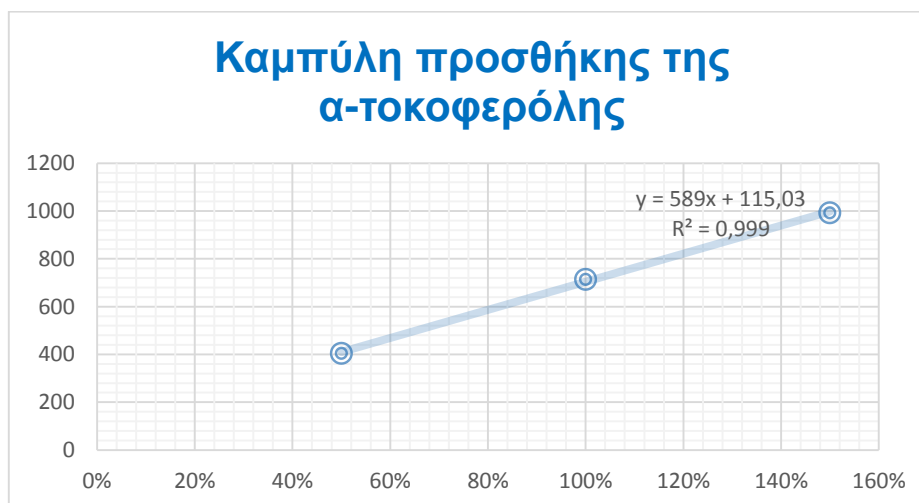
Η α-τοκοφερόλη είναι η αλκοολική μορφή της βιταμίνης Ε και η πιο ευαίσθητη σε οξειδώσεις σε σχέση με την εστεροποιημένη μορφή της. Με την σαπωνοποίηση δεν αλλάζει μορφή και γι' αυτό και όλες οι ποσοτικοποιήσεις γίνονται με βάση την καμπύλη αναφοράς της που δημιουργείται από τα πρότυπα διαλύματα α-τοκοφερόλης σε 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις.



Πίνακας 30: Προσθήκη α-τοκοφερόλης

Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα α-τοκοφερόλης			
Δείγμα	mg/100g	%Recovery	Θεωρητική τιμή (mg/100g)
50%	3,20	81,1	4,00
100%	5,70	70,7	8,00
150%	7,80	65,2	12,0

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ, 2 εκχυλίσες των 20 λεπτών, 10 λεπτά σαπωνοποίησης, 800μl πετρελαϊκού αιθέρα-0.1%BHT, 150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων.



Όπως φαίνεται και από το παραπάνω διάγραμμα τα δείγματα παρουσιάζουν καλή γραμμικότητα. Ωστόσο οι ανακτήσεις τους δεν είναι τόσο υψηλές και αυτό μπορεί να οφείλεται σε τυχόν υποβάθμιση των πρότυπων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

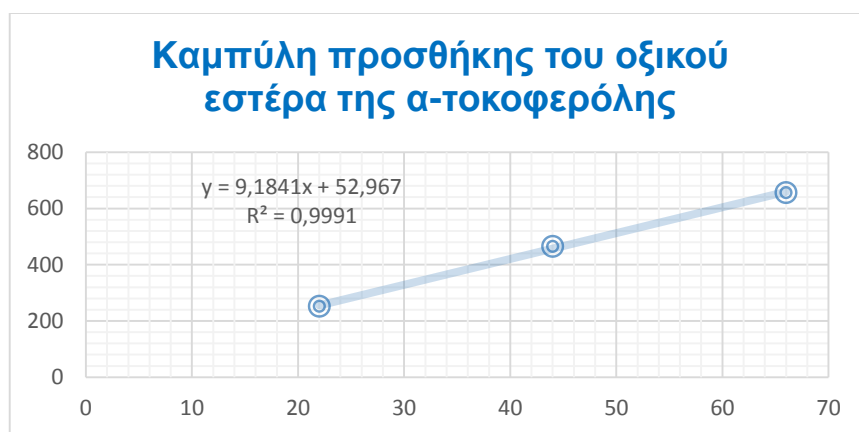
ν. Προσθήκη οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης

Με την σαπωνοποίηση ο οξικός εστέρας της α-τοκοφερόλης μετατρέπεται σε α-τοκοφερόλη και εκλύεται τελικά στα 12.55 λεπτά.

Πίνακας 31:Προσθήκη οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης

Ποσοτικοποίηση με πρύτο δ/μα α-τοκοφερόλης			
Δείγμα	mg/100g	%Recovery	Θεωρητική τιμή (mg/100g)
50%	2,10	97,5	2,20
100%	3,80	86,3	4,40
150%	5,30	80,0	6,60

Πειραματικές συνθήκες:2ml δείγματος,2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ ,2 εκχυλίσσεις των 20 λεπτών, 5 λεπτά σαπωνοποίηση ,800μl πετρελαϊκού αιθέρα-0.1% BHT,150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων.



Όπως φαίνεται και από το παραπάνω πίνακα τα δείγματα παρουσιάζουν καλή επαναληψιμότητα και καλές ανακτήσεις.(>80%)

3.3 Μέθοδος με χρήση α-αμυλάσης (ενζυμική υδρόλυση)

3.3.1 Αποτελέσματα μεθόδου με χρήση α-αμυλάσης

Διαπιστώθηκε και ήρθε σε συμφωνία με την διεθνή πρακτική πως η χρήση της α-αμυλάσης αφενός βοηθάει πολύ στην προκατεργασία δείγματος στον τομέα της ομογενοποίησης και αφετέρου βοηθάει στην χρωματογραφία λόγω της καλύτερης ρευστοποίησης του εξεταζόμενου δείγματος μιας και το ένζυμο καταλύει την υδρόλυση των 1,4-γλυκοζιτικών δεσμών του αμύλου σπάζοντας το σε μικρότερα μόρια γλυκόζης ,μαλτόζης και μαλτοτριόζης.¹⁴³ Έτσι οι πιέσεις παρέμεναν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια

της ανάλυσης δείγματος και από δείγμα σε δείγμα στην HPLC, χωρίς να υπάρχει μικρή σταδιακή αύξηση με το πέρας του χρόνου, όπως παρατηρήθηκε στα δείγματα που αναλύθηκαν με μεθόδους που δεν χρησιμοποίησαν α-αμυλάση.

Με το πέρας των πειραμάτων διαπιστώθηκε πως η χρήση της α-αμυλάσης δεν συμβάλει περαιτέρω στην εκχύλιση των βιταμινών καθώς όπως φαίνεται και από τους παρακάτω πίνακες τα αποτελέσματα είναι πανομοιότυπα. Πραγματοποιήθηκε το ίδιο πείραμα και για τα δυο είδη παιδικών τροφίμων (Φαρίν Λακτέ και Sanilac 3). Η Sanilac 3 δεν περιέχει άμυλο, οπότε η χρήση της α-αμυλάσης δεν άλλαξε τα αποτελέσματα μας. Η χρήση α-αμυλάσης στ Φαρίν Λακτέ βοήθησε πολύ στην ομογενοποίηση της αλλά δεν επηρέασε τον ποσοτικό προσδιορισμό των βιταμινών παρόλο που περιέχει άμυλο.

Πίνακας 32: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης α-αμυλάσης για την βιταμίνη Α

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της ρετινόλης					Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα ρετινόλης		
Δείγμα	μg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος	μg/100g	Average	%RSD
Sanilac3	838	793	6,1	απουσία α- αμυλάσης	1704	1625	5,2
Sanilac3	799				1635		
Sanilac3	743				1535		
Sanilac3	780	778	3,7	παρουσία α-αμυλάσης	1601	1597	3,2
Sanilac3	805				1646		
Sanilac3	748				1544		
Φαρίν Λακτέ	515	572	10	απουσία α- αμυλάσης	1133	1233	8,4
Φαρίν Λακτέ	631				1338		
Φαρίν Λακτέ	568				1227		
Φαρίν Λακτέ	581	605	12	παρουσία α-αμυλάσης	1250	1292	9,8
Φαρίν Λακτέ	549				1193		
Φαρίν Λακτέ	686				1434		

Πίνακας 33: Συγκριτικά αποτελέσματα βελτιστοποίησης α-αμυλάσης για την βιταμίνη Ε

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης				
Δείγμα	mg/100g	Average	%RSD	Μεταβλητή Παράμετρος
Sanilac3	12,9	12,5	2,8	απουσία α-αμυλάσης
Sanilac3	12,4			
Sanilac3	12,3			
Sanilac3	12,8	13,1	4,7	παρουσία α-αμυλάσης
Sanilac3	13,8			
Sanilac3	12,8			
Φαρίν Λακτέ	5,32	5,80	7,8	απουσία α-αμυλάσης
Φαρίν Λακτέ	6,23			
Φαρίν Λακτέ	5,85			
Φαρίν Λακτέ	5,56	5,71	8,2	παρουσία α-αμυλάσης
Φαρίν Λακτέ	5,34			
Φαρίν Λακτέ	6,24			

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ, 2 εκχυλίσσεις των 20 λεπτών, 10 λεπτά σαπωνοποίηση, 800μl πετρελαϊκού αιθέρα-0.1% BHT, 150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων.

3.3.2 Προσθήκη πρότυπης ένωσης σε δείγμα με α-αμυλάση

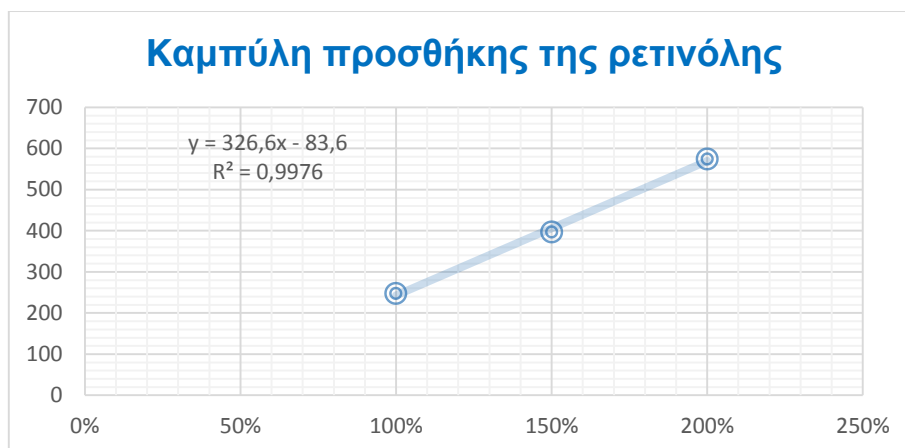
i. Προσθήκη ρετινόλης

Οι ποσοτικοποιήσεις γίνονται με βάση την καμπύλη αναφοράς της ρετινόλης.
(παράγραφος 3.2.3)

Πίνακας 34: .Προσθήκη ρετινόλης παρουσία α-αμυλάσης

Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα ρετινόλης			
Δείγμα	μg/100g	%Recovery	Θεωρητική τιμή (μg/100g)
100%	248	75,6	500
150%	397	78,1	750
200%	574	83,1	1000

Πειραματικές συνθήκες : 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ, 2 εκχυλίσσεις των 20 λεπτών, 10 λεπτά σαπωνοποίηση, 800μl πετρελαϊκού αιθέρα-1% BHT, 150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων.



Όπως φαίνεται και από το παραπάνω διάγραμμα οι προσθήκες της ρετινόλης παρουσιάζουν καλή επαναληψιμότητα και καλές ανακτήσεις (>75%). Αναμέναμε καλύτερες ανακτήσεις αλλά αυτό μπορεί να οφείλεται στην ευαισθησία του πρότυπου διαλύματος ρετινόλης που χρησιμοποιήθηκε για τους προσθήκης.

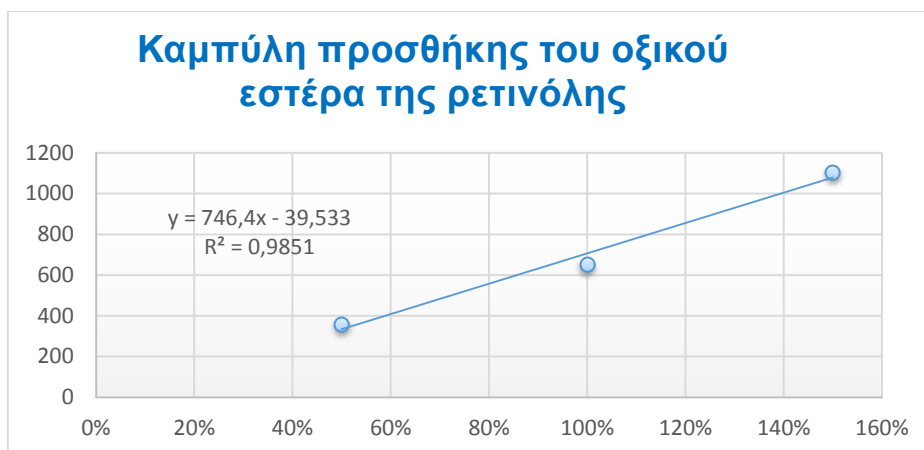
ii. Προσθήκη οξικού εστέρα της ρετινόλης

Πραγματοποιείται Προσθήκη οξικού εστέρα της ρετινόλης όπως αναφέρεται και στην παράγραφο 3.2.3.

Πίνακας 35: Προσθήκη οξικού εστέρα της ρετινόλης παρουσία α-αμυλάσης

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της ρετινόλης				Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα ρετινόλης	
Δείγμα	μg/100g	%Recovery	Μεταβλητή Παράμετρος	μg/100g	%Recovery
50%	177	70,7	προσθήκη οξικού εστέρα της ρετινόλης	526	210
100%	407	81,5		935	187
150%	763	102		1566	209

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ, 2 εκχυλίσσεις των 20 λεπτών, 5 λεπτά σαπωνοποίηση, 800μl πετρελαϊκού αιθέρα-0.1%BHT, 150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων.



Με βάση τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνεται πως το 50% παρουσιάζει το μικρότερο ποσοστό ανάκτησης σε σχέση με τα άλλα δυο δείγματα. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε κάποιο πειραματικό σφάλμα είτε στο ότι προστέθηκε πολύ μικρή ποσότητα βιταμίνης.

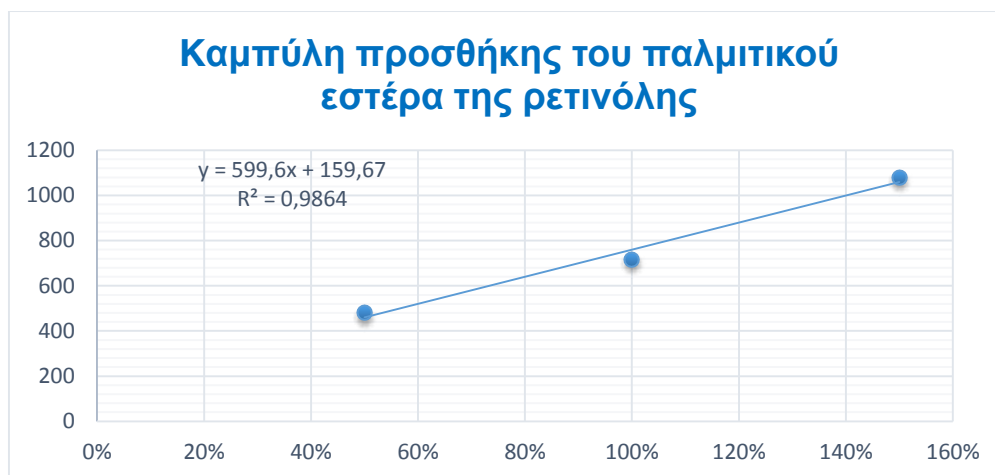
iii. Προσθήκη παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης

Η προσθήκη παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης βασίστηκε και πάλι στο πρότυπο υλικό - **SRM 1849a** και η ποσοτικοποίηση του έγινε με βάση την πρότυπη καμπύλη της ρετινόλης.

Πίνακας 36: Προσθήκη παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης παρουσία α-αμυλάσης

Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα ρετινόλης			
Δείγμα	μg/100g	%Recovery	Θεωρητική τιμή (μg/100g)
50%	692,7	96,9	715
100%	1025	71,7	1430
150%	1528	71,2	2145

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ, 2 εκχυλίσες των 20 λεπτών, 10 λεπτά σαπωνοποίηση, 800μl πετρελαϊκού αιθέρα-0.1%BHT, 150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών μπουκαλιών



Όπως φαίνεται απόν το πίνακα οι ανακτήσεις δεν είναι πολύ υψηλές(>71%) αλλά αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι η βελτιστοποίηση της μεθόδου δεν πραγματοποιήθηκε με βάση τον παλμιτικό εστέρα της ρετινόλης αλλά τον οξικό της εστέρα.

iv. Προσθήκη α-τοκοφερόλης

Πραγματοποιείται προσθήκη της πρότυπης ένωσης όπως αναφέρεται και στην **παράγραφο 3.2.3**.

Πίνακας 37: Προσθήκη α-τοκοφερόλης παρουσία α-αμυλάσης

Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα α-τοκοφερόλης			
Δείγμα	mg/100g	%Recovery	Θεωρητική τιμή (mg/100g)
100%	2,90	66,0	4,40
150%	4,50	68,3	6,60
200%	5,90	67,4	8,80

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ, 2 εκχυλίσες των 20 λεπτών, 10 λεπτά σαπωνοποίησης, 800μl πετρελαϊκού αιθέρα-0.1%BHT, 150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων.



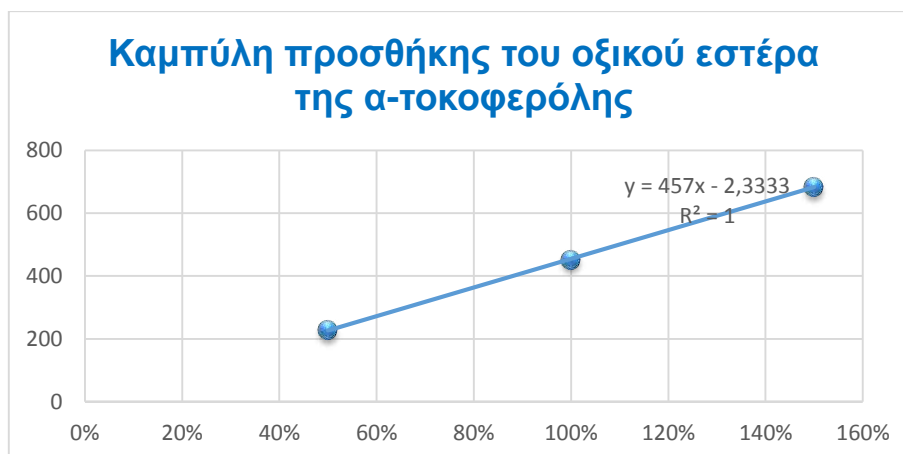
Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων διαπιστώνεται πως η γραμμικότητα των δειγμάτων είναι πολύ καλή αν και οι ανακτήσεις τους όχι πολύ υψηλές.(<70%) Πιθανόν να συμβαίνει αυτό σε αλλοίωση του πρότυπου διαλύματος α-τοκοφερόλης κατά την συντήρηση του.

ν. Προσθήκη οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης
Πραγματοποιείται προσθήκη της πρότυπης ένωσης όπως αναφέρεται και στην παράγραφο 3.2.3.

Πίνακας 38: Προσθήκη οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης παρουσία α-αμυλάσης

Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα α-τοκοφερόλης			
Δείγμα	mg/100g	%Recovery	Θεωρητική τιμή (mg/100g)
50%	1,90	84,8	2,20
100%	3,60	82,3	4,40
150%	5,40	82,1	6,60

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ ,2 εκχυλίσσεις των 20 λεπτών, 10 λεπτά σαπωνοποίηση ,800μl πετρελαϊκού αιθέρα-0.1% BHT, 150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων.



Όπως φαίνεται και από το παραπάνω πίνακα τα δείγματα παρουσιάζουν πολύ καλή γραμμικότητα και οι ανακτήσεις τους είναι ικανοποιητικές.(>82%)

3.4 Μέθοδος σάρωσης(screening method)

3.4.1 Αποτελέσματα μεθόδου

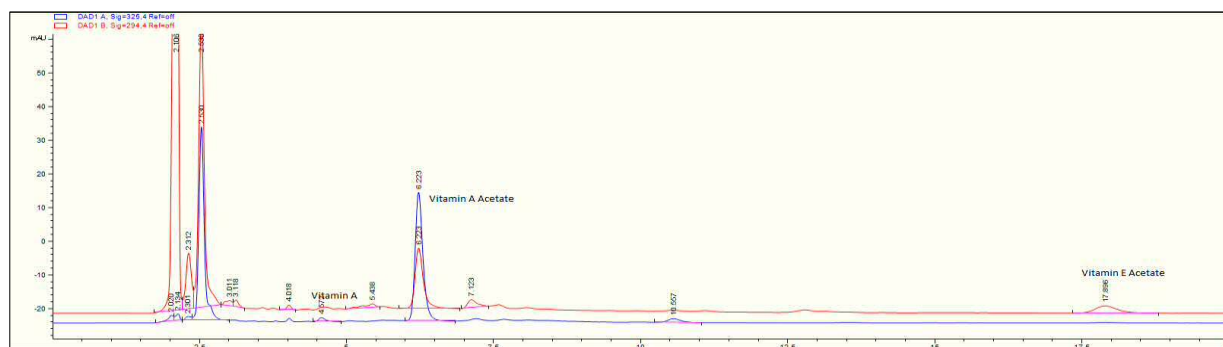
Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η σαπωνοποίηση επηρεάζει τον χρόνο έκλουσης των βιταμινών καθώς μετατρέπει τους εστέρες τους στις αντίστοιχες ελεύθερες μορφές .Αυτό δεν συμβαίνει με όλες τις βιταμίνες αλλά με τους εστέρες των βιταμινών Α και Ε ,ενώ οι

βιταμίνες D₃ και K₁ παραμένουν ανεπηρέαστες κατά την σαπωνοποίηση. Έτσι στη screening μέθοδο όπου παραλείπεται το στάδιο της σαπωνοποίησης οι βιταμίνες A και E εκκλύονται στις οξικές τους μορφές. Στον παρακάτω συγκριτικό πίνακα παρατηρούμε πιο συγκεκριμένα τους χρόνους έκλυσης των λιποδιαλυτών βιταμινών.

Πίνακας 39:Χρόνος έκλυσης βιταμινών με και χωρίς σαπωνοποίηση

Βιταμίνες	Χρόνος έκλυσης χωρίς σαπωνοποίηση(min)	Χρόνος έκλυσης με σαπωνοποίηση(min)
Ρετινόλη	4.51	4.51
Οξικός εστέρας της ρετινόλης	6.13	
Εργικαλσιφερόλη (D ₂)	9.95	9.95
Χολεκαλσιφερόλη(D ₃)	10.4	10.40
dl-a-τοκοφερόλη	12.55	12.55
Οξικός εστέρας της dl-a-τοκοφερόλης	17.59	
Φυλλοκινόνη (K ₁)	24.5	24.50
Παλμιτικός εστέρας της ρετινόλης	52.05	4.51

Στη screening μέθοδο παραλείπεται το στάδιο της σαπωνοποίησης και οι βιταμίνες A και E εκκλύονται στις οξικές τους μορφές όπως φαίνεται και στο χρωματογράφημα της **Εικόνας 30**.



Εικόνα 30: Χρωματογράφημα δείγματος χωρίς σαπωνοποίηση

Επιπροσθέτως, ελέγχθηκε κατά πόσο μπορεί η μέθοδος αυτή να χρησιμοποιηθεί και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των οξικών μορφών των βιταμινών A και E είτε προσθέτοντας τις βιταμίνες σε Φαρίν Λακτέ Ελεύθερη Βιταμινών είτε μέσω των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα δείχνουν ότι οι ποσότητες των βιταμινών που εκχυλίζονται είναι ανεπαρκής(λιγότερο και από το 50%) και συνεπώς η

μέθοδος αυτή δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βιταμινών παρά μόνο για ποιοτικό έλεγχο των βιταμινών που έχουν προστεθεί.

Πίνακας 40:Αποτελέσματα Screening μεθόδου

Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα οξικού εστέρα της ρετινόλης			
Δείγμα	μg/100g	Average	%SD
Φαρίν Λακτε	256	278	15
Φαρίν Λακτε	254		
Φαρίν Λακτε	325		
Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης			
Δείγμα	mg/100g	Average	%SD
Φαρίν Λακτε	2,52	1,64	46
Φαρίν Λακτε	1,18		
Φαρίν Λακτε	1,23		

Πειραματικές συνθήκες:2ml δείγματος,2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ ,2 εκχυλίσες των 20 λεπτών, 10 λεπτά σαπωνοποίηση ,800μl πετρελαϊκού αιθέρα-0.1% BHT,150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων.

3.4.2 Προσθήκη πρότυπης ένωσης σε δείγμα απουσία α-αμυλάσης

Έγινε προσθήκη των πρότυπων ενώσεων όπως αναφέρεται στην **παράγραφο 3.2.3.** και ακολουθήθηκε η πειραματική πορεία χωρίς το στάδιο της σαπωνοποίησης.

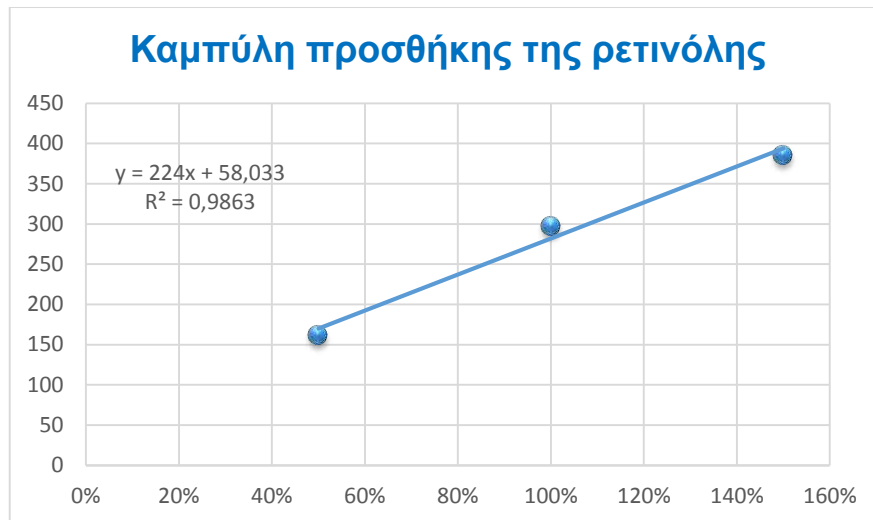
i. Προσθήκη ρετινόλης

Οι ποσοτικοποιήσεις γίνονται με βάση την καμπύλη αναφοράς της ρετινόλης. (**παράγραφος 3.2.3)**

Πίνακας 41:Προσθήκη ρετινόλης(screening μέθοδος)

Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα ρετινόλης			
Δείγμα	μg/100g	%Recovery	Θεωρητική τιμή (μg/100g)
50%	251	65,2	384
100%	438	57,1	768
150%	563	48,8	1152

Πειραματικές συνθήκες:2ml δείγματος,2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ ,2 εκχυλίσες των 20 λεπτών, 10 λεπτά σαπωνοποίηση ,800μl πετρελαϊκού αιθέρα-0.1% BHT,150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων.



Οι παραπάνω προσθήκες έγιναν με βάση το πρότυπο υλικό αναφοράς SRM 1849a.(Πίνακας 1)Οι ανακτήσεις δεν είναι πολύ ικανοποιητικές δεδομένου πως είναι μικρότερες του 66%.

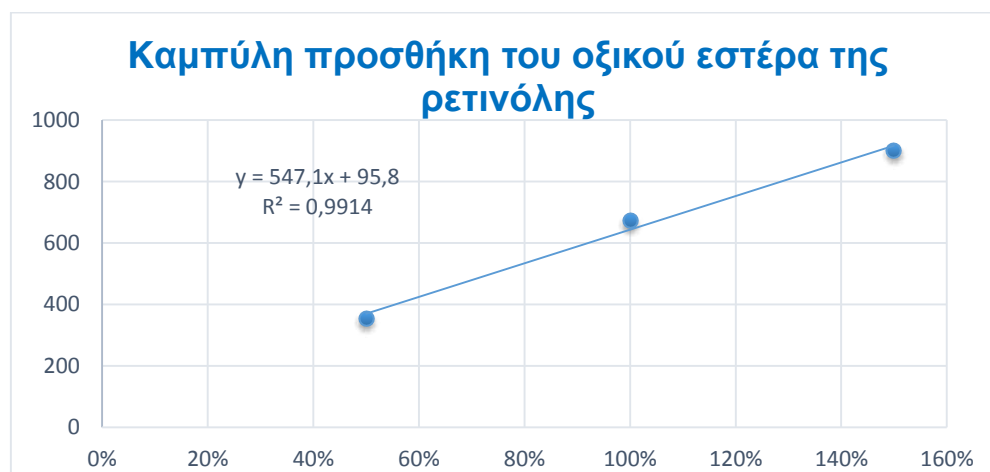
ii. Προσθήκη οξικού εστέρα της ρετινόλης

Πραγματοποιείται προσθήκη οξικού εστέρα της ρετινόλης όπως αναφέρεται και στην παράγραφο 3.2.3.

Πίνακας 42: Προσθήκη οξικού εστέρα της ρετινόλης(screening μέθοδος)

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της ρετινόλης			
Δείγμα	μg/100g	%Recovery	Θεωρητική τιμή (μg/100g)
50%	172	69,0	250
100%	422	84,4	500
150%	602	80,3	750

Πειραματικές συνθήκες:2ml δείγματος,2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ ,2 εκχυλίσες των 20 λεπτών, 10 λεπτά σαπωνοποίηση ,800μl πετρελαϊκού αιθέρα-0.1% BHT,150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων.



Βάσει του παραπάνω πίνακα τα δείγματα παρουσιάζουν καλή επαναληψιμότητα και οι ανακτήσεις τους είναι ικανοποιητικές με εξαίρεση το 50%.(recovery<70%)Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω της μικρής ποσότητας βιταμίνης που προστέθηκε.

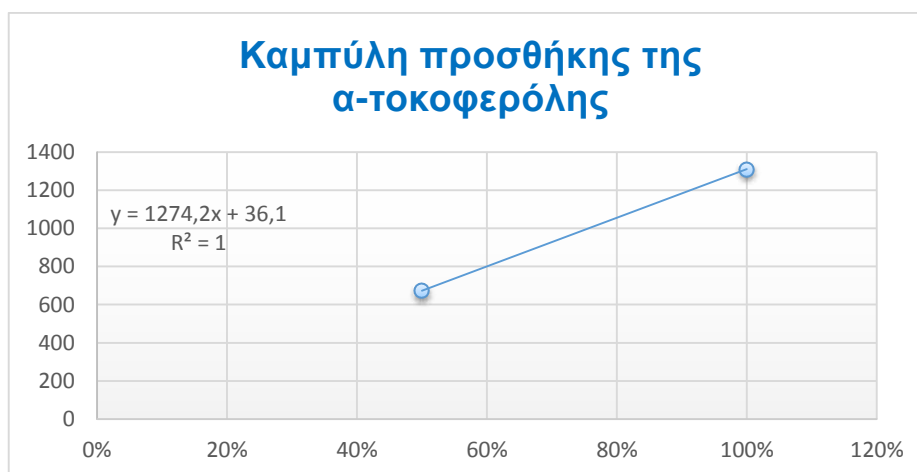
iii. Προσθήκη α-τοκοφερόλης

Πραγματοποιείται προσθήκη της πρότυπης ένωσης όπως αναφέρεται και στην **παράγραφο 3.2.3.**

Πίνακας 43:Προσθήκη α-τοκοφερόλης(screening μέθοδος)

Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα α-τοκοφερόλης			
Δείγμα	mg/100g	%Recovery	Θεωρητική τιμή (mg/100g)
50%	5,33	67,5	7,90
100%	10,3	65,1	15,8
150%	10,4	44,0	23,7

Πειραματικές συνθήκες:2ml δείγματος,2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ ,2 εκχυλίσσεις των 20 λεπτών, 10 λεπτά σαπωνοποίηση ,800μl πετρελαϊκού αιθέρα-0.1% BHT,150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων



Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του Πίνακα 43 το δείγμα 150% παρουσιάζει πολύ μικρότερη ανάκτηση (44%)από τα άλλα δυο δείγματα(~66%) και αποκλίνει από την γραμμικότητα των άλλων δυο σημείων. Γι' αυτό το λόγο εξαιρείται από την παραπάνω καμπύλη.

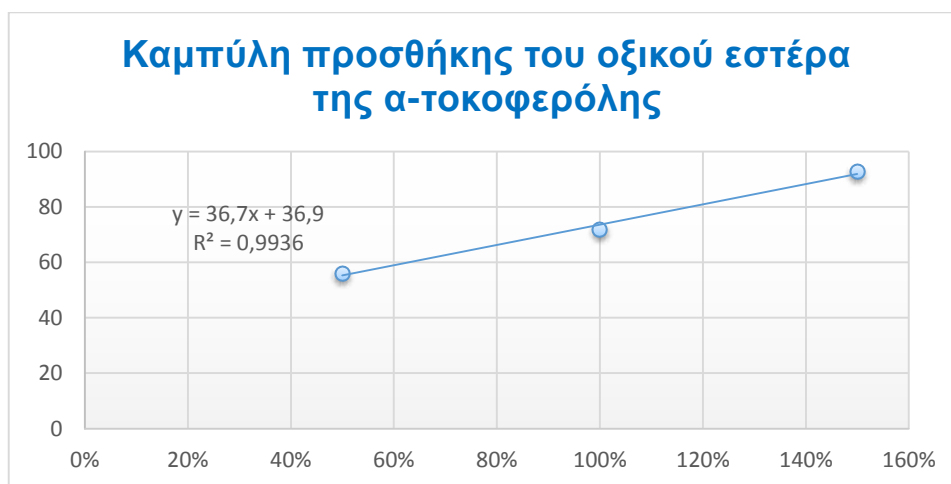
iv. Προσθήκη οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης

Πραγματοποιείται προσθήκη της πρότυπης ένωσης όπως αναφέρεται και στην **παράγραφο 3.2.3.**

Πίνακας 44: Προσθήκη οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης(screening μέθοδος)

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης			
Δείγμα	mg/100g	%Recovery	Θεωρητική τιμή (mg/100g)
50%	0,50	22,9	2,20
100%	0,68	15,4	4,40
150%	0,91	13,8	6,60

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ ,2 εκχυλίσες των 20 λεπτών, 10 λεπτά σαπωνοποίηση ,800μl πετρελαϊκού αιθέρα-0.1% BHT, 150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων.



Με βάση τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι η γραμμικότητα των δειγμάτων είναι ικανοποιητική αλλά οι ανακτήσεις είναι παρά πολύ χαμηλές.(<25%)

Βάσει όλων των αποτελεσμάτων των παραπάνω προσθηκών αυτής της μεθόδου παρατηρούμε ότι οι ανακτήσεις είναι πολύ χαμηλές. Συγκρίνοντας τις τιμές με τα αντίστοιχα αποτελέσματα προσθήκης της μεθόδου με σαπωνοποίηση απουσία α-αμυλάσης διαπιστώνεται ότι οι ανακτήσεις είναι αρκετά πιο χαμηλές. Γι' αυτό το λόγο η ποσοτικοποίηση των βιταμινών δεν μπορεί να γίνεται με τους προσθήκης της screening μεθόδου.

3.4.3 Προσθήκη πρότυπης ένωσης σε δείγμα παρουσία α-αμυλάσης

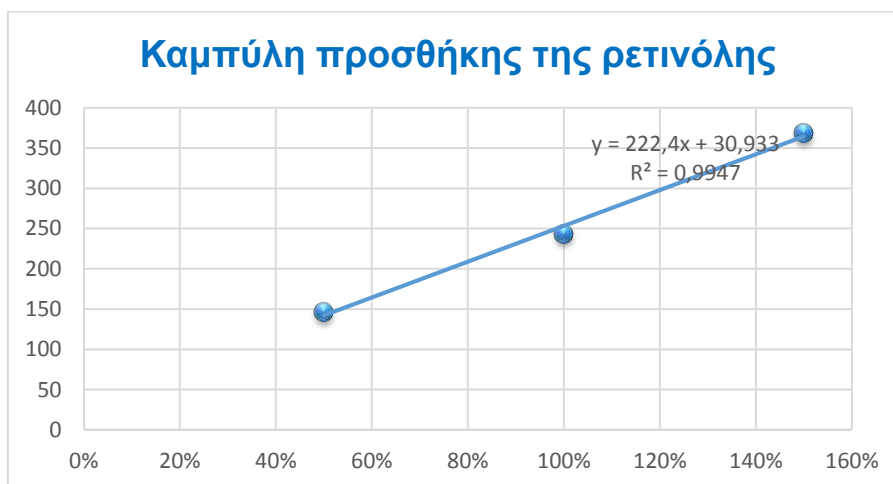
i. Προσθήκη ρετινόλης

Οι ποσοτικοποιήσεις γίνονται με βάση την καμπύλη αναφοράς της ρετινόλης .(παράγραφος 3.2.3

Πίνακας 45: Προσθήκη ρετινόλης παρουσία α-αμυλάσης(screening μέθοδος)

Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δι/μα ρετινόλης			
Δείγμα	μg/100g	%Recovery	Θεωρητική τιμή (μg/100g)
50%	229	59,6	384
100%	364	47,4	768
150%	538	46,8	1152

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ ,2 εκχυλίσαις των 20 λεπτών, 10 λεπτά σαπωνοποίηση ,800μl πετρελαϊκού αιθέρα-0.1% BHT, 150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων.



Τα δείγματα παρουσιάζουν καλή γραμμικότητα αλλά οι ανακτήσεις τους δεν είναι πολύ υψηλές.(<60%)

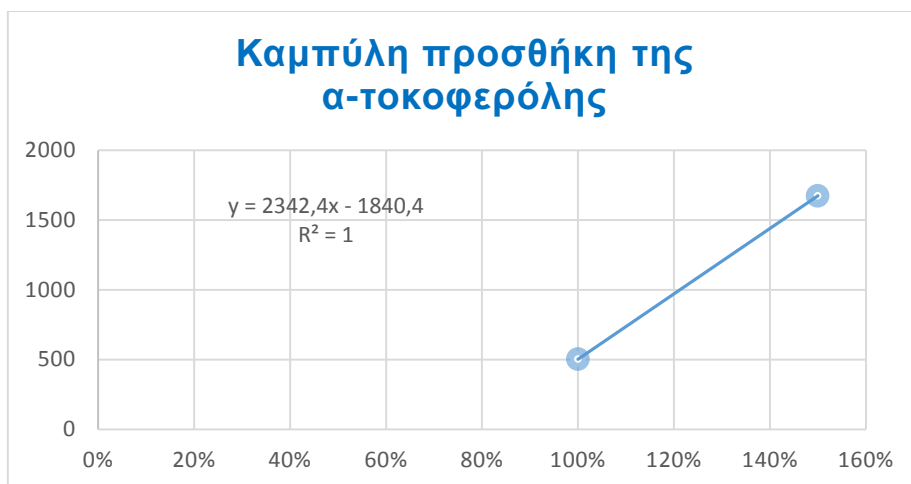
ii. Προσθήκη α-τοκοφερόλης

Πραγματοποιείται προσθήκη της πρότυπης ένωσης όπως αναφέρεται και στην παράγραφο 3.2.3

Πίνακας 46: Προσθήκη α-τοκοφερόλης παρουσία α-αμυλάσης(screening μέθοδος)

Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δι/μα α-τοκοφερόλης			
Δείγμα	mg/100g	%Recovery	Θεωρητική τιμή (mg/100g)
50%	0,16	2,00	7,90
100%	4,00	25,3	15,8
150%	13,1	55,3	23,7

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ ,2 εκχυλίσαις των 20 λεπτών, 10 λεπτά σαπωνοποίηση ,800μl πετρελαϊκού αιθέρα-0.1% BHT, 150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων.



Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνεται πως οι ανακτήσεις είναι ιδιαίτερα χαμηλές και ειδικά στο δείγμα 50% και γι' αυτό το λόγο εξαιρείται από την παραπάνω καμπύλη.

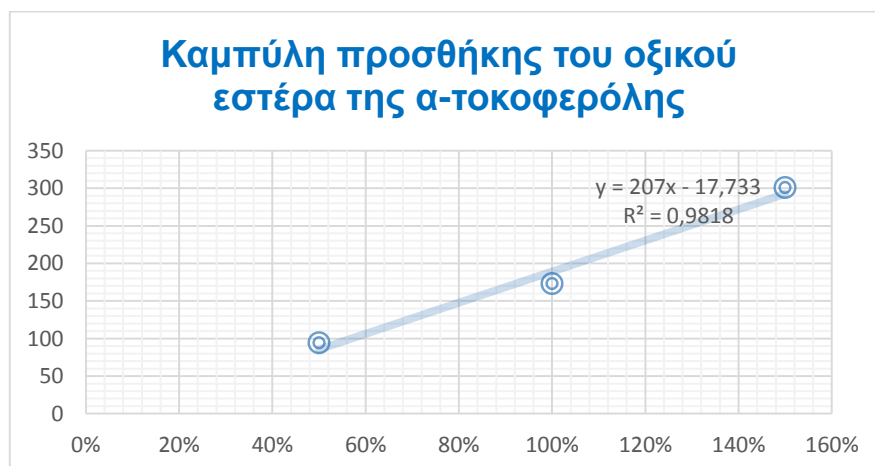
iii. Προσθήκη οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης

Πραγματοποιείται προσθήκη της πρότυπης ένωσης όπως αναφέρεται και στην παράγραφο 3.2.3.

Πίνακας 47: Προσθήκη οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης παρουσία α-αμυλάσης(screening μέθοδος)

Ποσοτικοποίηση με πρότυπο δ/μα α-τοκοφερόλης			
Δείγμα	mg/100g	%Recovery	Θεωρητική τιμή (mg/100g)
50%	5,11	46,7	10,9
100%	11,2	51,3	21,9
150%	21,2	64,4	32,8

Πειραματικές συνθήκες: 2ml δείγματος, 2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ ,2 εκχυλίσαις των 20 λεπτών, 10 λεπτά σαπωνοποίηση ,800μl πετρελαϊκού αιθέρα-0.1% BHT, 150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων.



Με βάση τα αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι τα δείγματα παρουσιάζουν χαμηλές ανακτήσεις (<65%) και ιδιαίτερα το δείγμα 50%.

Συγκρίνοντας τις προσθήκες του οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης αυτής της μεθόδου με την αντίστοιχη μέθοδο παρουσία α-αμυλάσης συμπεριλαμβανομένου του σταδίου σαπωνοποίησης διαπιστώνεται πως οι ανακτήσεις είναι αρκετά πιο χαμηλές. Γι' αυτό το λόγο η ποσοτικοποίηση των βιταμινών δεν μπορεί να γίνεται με την προσθήκη της screening μεθόδου.

3.5 Αποτελέσματα πρότυπου υλικού αναφοράς SRM 1849a

Το πρότυπο υλικό αναφοράς χρησιμοποιήθηκε και για τις 4 προαναφερθείσες μεθόδους για να διαπιστωθεί η ορθότητα και η αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Οι ποσοτικοποιήσεις δεν έγιναν με βάση τις πρότυπες καμπύλες αναφοράς της ρετινόλης και της α-τοκοφερόλης αλλά με βάση την καμπύλη προσθήκης της ρετινόλης. Πραγματοποιήθηκαν προσθήκες παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης και οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις του προτύπου αναφοράς σε Φαρίν Λακτέ Ελεύθερη Βιταμινών. Με βάση τα αποτελέσματα των παρακάτω πινάκων διαπιστώνεται ότι η βιταμίνη Α είναι μεγαλύτερη από την θεωρητική τιμή ενώ η βιταμίνη Ε είναι εντός ορίων του προτύπου NIST. Η απόκλιση της βιταμίνης Α μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η μέθοδος μας βασίστηκε στον προσδιορισμό του οξικού εστέρα της ρετινόλης και όχι στον παλμιτικό εστέρα που περιέχει το υλικό αναφοράς. Ενδεχομένως να χρειάζεται κάποια βελτιστοποίηση της μεθόδου για τον προσδιορισμό του παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης.

Όσον αφορά την βιταμίνη Α παρατηρείται μικρή διαφορά μεταξύ των δειγμάτων απουσία και παρουσία α-αμυλάσης. Για την βιταμίνη Ε η διαφορά αυτή μεγαλύτερη αλλά εντός των αναμενόμενων ορίων. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα και των δυο βιταμινών διαπιστώνεται ότι τα δείγματα παρουσία α-αμυλάσης παρουσιάζουν μεγαλύτερη απόκλιση για $n=3$. (%RSD 2,2 και 3,1 αντίστοιχα για τις βιταμίνες Α και Ε) σε σχέση με τα δείγματα απουσία α-αμυλάσης (%RSD 1,4 και 2,4 αντίστοιχα για τις βιταμίνες Α και Ε)

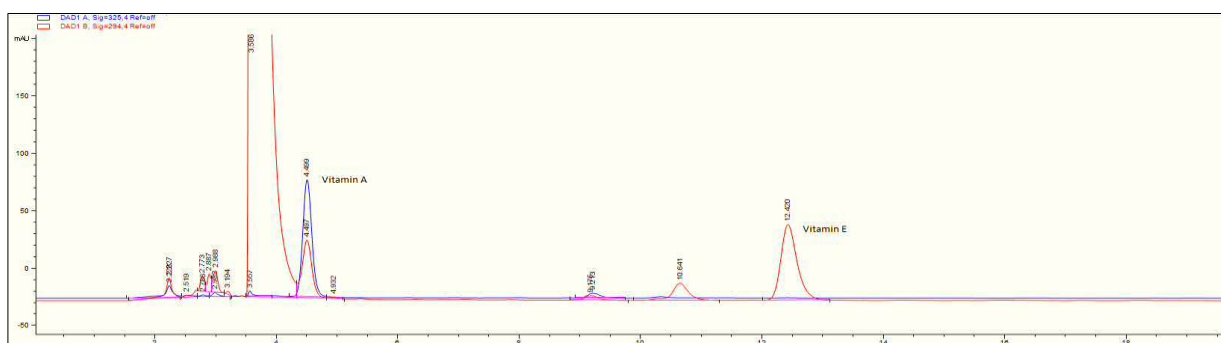
Πίνακας 48: Αποτελέσματα SRM 1849a για την βιταμίνη A

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του παλμιτικού εστέρα της ρετινόλης				
Δείγμα	mg/kg	Average	%RSD	Θεωρητική τιμή(mg/kg)
απουσία α-αμυλάσης	15,1	15,3	1,4	14.30 ± 0.20
	15,4			
	15,5			
παρουσία α-αμυλάσης	15,1	15,2	2,2	
	15,5			
	14.9			

Πίνακας 49:Αποτελέσματα SRM 1849αγια την βιταμίνη E

Ποσοτικοποίηση με καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της α-τοκοφερόλης				
Δείγμα	mg/kg	Average	%SD	Θεωρητική τιμή(mg/kg)
απουσία α-αμυλάσης	156	161	2,4	158 ± 18
	162			
	164			
παρουσία α-αμυλάσης	167	165	3,1	
	169			
	159			

Πειραματικές συνθήκες:2ml δείγματος,2.5 ml αιθανολικό διάλυμα με 0.2% w/v ασκορβικό οξύ ,2 εκχυλίσαις των 20 λεπτών, 10 λεπτά σαπωνοποίηση ,800μl πετρελαϊκού αιθέρα-0.1% BHT,150μl μεθανόλης και χρήση διαφανών φιαλιδίων.



Εικόνα 31: Χρωματογράφημα δείγματος SRM 1849a

Η screening μέθοδος δεν μπορεί να εφαρμοστεί αποτελεσματικά στο SRM 1849a είτε παρουσία είτε απουσία α-αμυλάσης. Θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μόνο ποιοτικός

προσδιορισμός των βιταμινών αλλά το ποσό των βιταμινών και το είδος των βιταμινών που εκχυλίζεται κάθε φορά από δείγμα σε δείγμα διαφέρει αρκετά καθιστώντας με τον τρόπο αυτό την μέθοδο αυτή ανακριβή και γι' αυτούς τους λόγους απορρίπτεται.

3.6 Συμπεράσματα

3.6.1 Γρήγορος προσδιορισμός των βιταμινών Α και Ε σε βρεφικές τροφές μέσω RP-HPLC¹³⁷

Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται γρήγορη καθώς δεν απαιτεί μεγάλο χρόνο προκατεργασίας των δειγμάτων και αυτός ήταν ο βασικός λόγος που επιλέχθηκε να ερευνηθεί πρώτη. Ωστόσο, δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα καθώς τα σήματα είναι πολύ μικρά και είναι δύσκολο να επιτευχθεί ποσοτικός προσδιορισμός των βιταμινών Α και Ε. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο διαφορετική μήτρα των παιδικών τροφών που αναλύσαμε έναντι αυτών της μεθόδου.

Στο μέλλον μετά την εμπειρία που αποκτήθηκε μπορεί να επανεξεταστεί με διάφορες παραλλαγές ώστε να επιτευχθεί βελτιστοποίηση της μεθόδου.

3.6.2 Προσδιορισμός των βιταμινών Α και Ε σε βρεφικές τροφές μέσω HPLC-UV¹³⁸

Με βάση όλα τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα σχετικά με τη βελτιστοποίηση της μεθόδου:

- η μάζα του δείγματος IF (5 g) που ζυγίζουμε για την ομογενοποίηση με κατάλληλο διαλύτη παίζει σημαντικό ρόλο εξαιτίας της ανομοιογένειας των βιταμινών μέσα στο δείγμα
- ο όγκος του ομογενοποιημένου δείγματος (2 ml) που επιλέχθηκε αύξησε σημαντικά τα ποσά των βιταμινών που εκχυλίζονται
- ο αριθμός των εκχυλίσεων σε σχέση με τον χρόνο μαγνητικής ανάδευσης του δείγματος καθορίζουν τις ποσότητες των βιταμινών που εκχυλίζονται
- η χρήση φυσικών και τεχνητών αντιοξειδωτικών (ασκορβικό οξύ και BHT αντίστοιχα) σε συνδυασμό με την χρήση αλουμινόχαρτου καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και το μειωμένο φωτισμό συμβάλουν αποτελεσματικά στην προστασία των βιταμινών.
- η χρήση των υάλινων φιαλιδίων σταθεροποίησε τις συνθήκες εκχύλισης των βιταμινών

- η αύξηση του χρόνου σαπωνοποίησης κατά μόλις 5 λεπτά σταθεροποίησε την πλήρη μετατροπή των εστεροποιημένων μορφών των βιταμινών στις αλκοολικές μορφές τους και συνέβαλε στην εκχύλιση της βιταμίνης D₃
- η αύξηση του όγκου του διαλύτη εκχύλισης (πετρελαϊκός αιθέρας) κατά 0,5 ml συνέβαλε στην καλύτερη εκχύλιση των βιταμινών
- η αύξηση του όγκου του διαλύτη ανασύστασης(μεθανόλη) κατά 50% ελαχιστοποίησε την % σχετική απόκλιση (%RSD) των δειγμάτων
- η χρήση της α-αμυλάσης για ενζυμική υδρόλυση συνέβαλε στην ομογενοποίηση των δειγμάτων βελτιώνοντας ταυτόχρονα τις χρωματογραφικές συνθήκες

Σχετικά με την επικύρωση της μεθόδου οι προσθήκες των βιταμινών σε Φαρίν Λακτέ Ελεύθερη Βιταμινών και η χρήση του πρότυπου υλικού αναφοράς SRM 1849a επιβεβαίωσαν την ορθότητα και την ακρίβειας της μεθόδου.

Όσον αφορά την μέθοδο σάρωσης (screening method) αποτελεί χρήσιμη μέθοδο για τον ποιοτικό έλεγχο των δειγμάτων ως προς τις μορφές των βιταμινών που περιέχουν.

Τέλος, καθοριστικό ρόλο στον προσδιορισμό των βιταμινών έπαιξε η επιλογή της πρότυπης καμπύλης για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων όπου πρέπει να γίνεται με βάση την καμπύλη προσθήκης του οξικού εστέρα της ρετινόλης και όχι με την πρότυπη καμπύλη αναφοράς της ρετινόλης λόγω της διαφορετικής ευαισθησίας ,ειδάλλως θα υπολογίζεται διπλάσια ποσότητα βιταμίνης.

Μελλοντικά προτείνεται να δοκιμαστούν τα παρακάτω πειράματα:

- αλλαγή των συνθηκών φωτισμού κατά την διάρκεια του πειράματος εκτός από τον ελαφρύ φωτισμό που έχει εφαρμοστεί, πλήρης φωτισμός και απόλυτο σκοτάδι
- αλλαγή στήλης
- αλλαγή του βρόγχου έκχυσης δείγματος από 20 μl στα 100μl με στόχο τον προσδιορισμό των βιταμινών D₃ και K
- δοκιμή της μεθόδου και σε άλλα τρόφιμα π.χ. δημητριακά ,σοκολάτα, κακάο κλπ.
- άλλες τεχνικές όπως HPLC-FLD,LC-MS/MS
- συμμετοχή σε διεργαστηριακές δοκιμές (Ring tests)
- πειράματα επικύρωσης

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
European Committee for Standardization	Ευρωπαϊκή Επιτροπή Τυποποίησης
Infant Formula	βρεφικές τροφές
International Dairy Federation	Διεθνής Ομοσπονδία Γαλακτοκομικών Προϊόντων
International Organization for Standardization	Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης
Standard Reference Material	Πρότυπο υλικό αναφοράς
U.S. Pharmacopeia	Φαρμακοποιία των Η.Π.Α

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

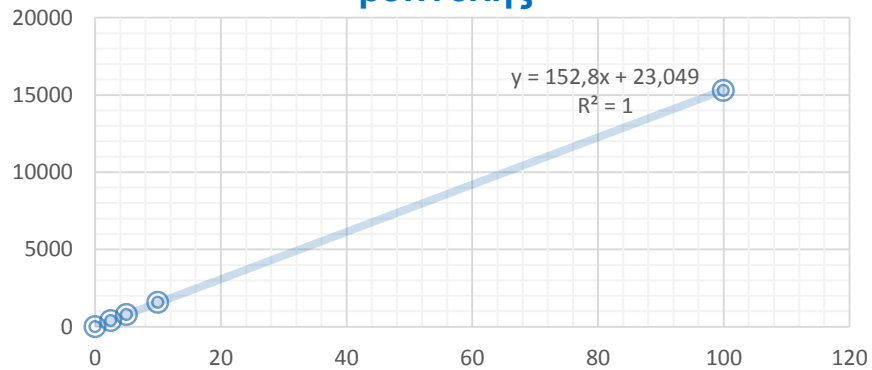
Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

AA	αραχιδονικό οξύ
ALA	λινολενικό οξύ
BHT	βουτυλιωμένο υδροξυ-τολουόλιο
CEN	European Committee for Standardization
DHA	εικοσαεξανοϊκό οξύ
DNA	δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ
EGRAC	συντελεστής δραστηριότητας της αναγωγής
EPA	εικοσιπεντανοϊκό οξύ
FAD	δικουνετιδίο της αδενίνης
FDA	Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων
FMN	μονονουκλεοτιδίο της φλαβίνης
FSV	λιποδιαλυτές βιταμίνες
GC	αέριας χρωματογραφίας
GC-MS	Αεριοχρωματογραφία μάζας
GLS	αέρια-υγρή χρωματογραφία
GSC	αέρια-στερεή χρωματογραφία
HPLC	Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης
HPTLC	Υγροχρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης
IDF	International Dairy Federation
IF	Infant formula
ISO	International Organization for Standardization
IU	διεθνείς μονάδες
LA	λινελαϊκό οξύ
LC	υγρή χρωματογραφίας
LDL	λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
LLE	εκχύλιση υγρού-υγρού
NAD	νικοτιναμίδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
NADP	φωσφορικό νικοτιναμίδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
NARP	μη υδατικής αντίστροφης φάσης
NTDs	συγγενείς ανωμαλίες του νωτιαίου μυελού

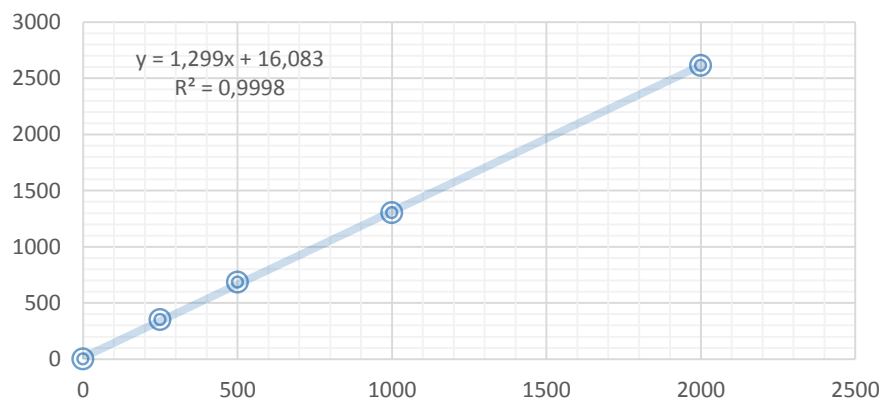
PDMS	πολυμεθυλοσιλοξάνη
PGA	πτεροϋλο-L-γλουταμικό οξύ
PLP	εστέρας της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης
PMP	εστέρας της 5'-φωσφορικής πυριδοξαμίνης
PTH	παραθορμόνη
PUFA	πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
RE	ισοδύναμο ρετινόλης
RNA	ριβονουκλεϊκό οξύ
SFE	εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού
SPE	εκχύλιση στερεάς φάσης
SPME	στερεάς φάσης μικροεκχύλιση
SRM	Standard Reference Material
THF	5-μεθυλο- τετραϋδροφυλλικό οξύ
TLC	χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
TPP	πυροφωσφορική θειαμίνη
USP	U.S. Pharmacopeia
WHO	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
ΣΗΠ	Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

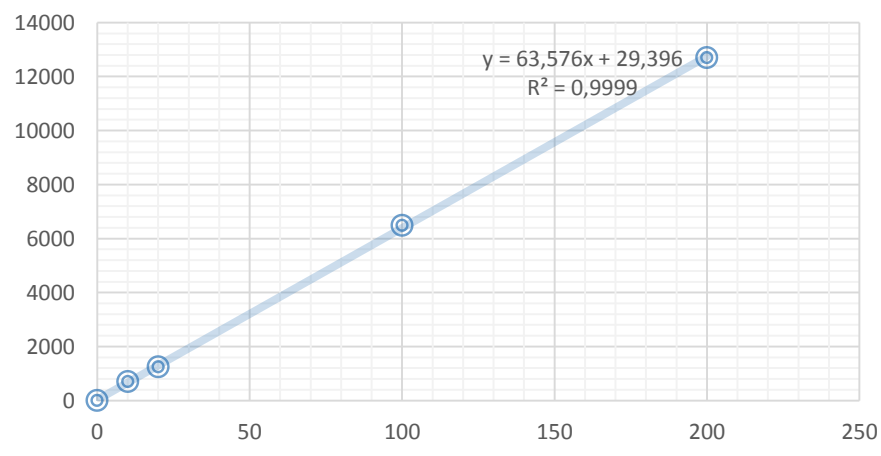
**Πρότυπη καμπύλη οξικού εστέρα της
ρετινόλης**



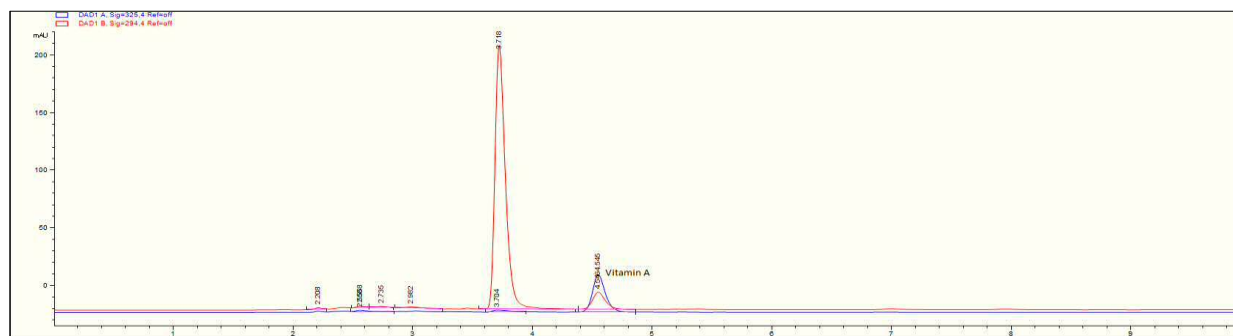
**Πρότυπη καμπύλη οξικού εστέρα της α-
τοκοφερόλης**



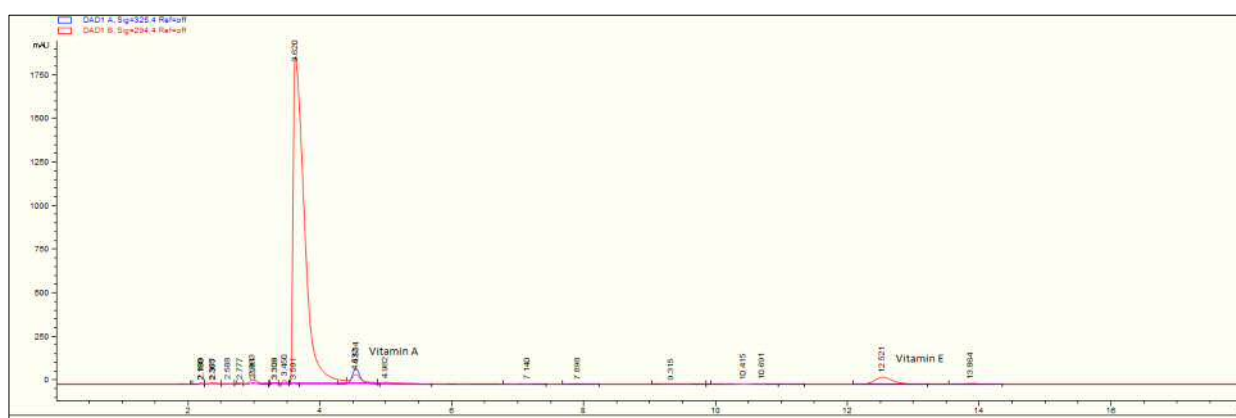
Πρότυπη καμπύλη D3



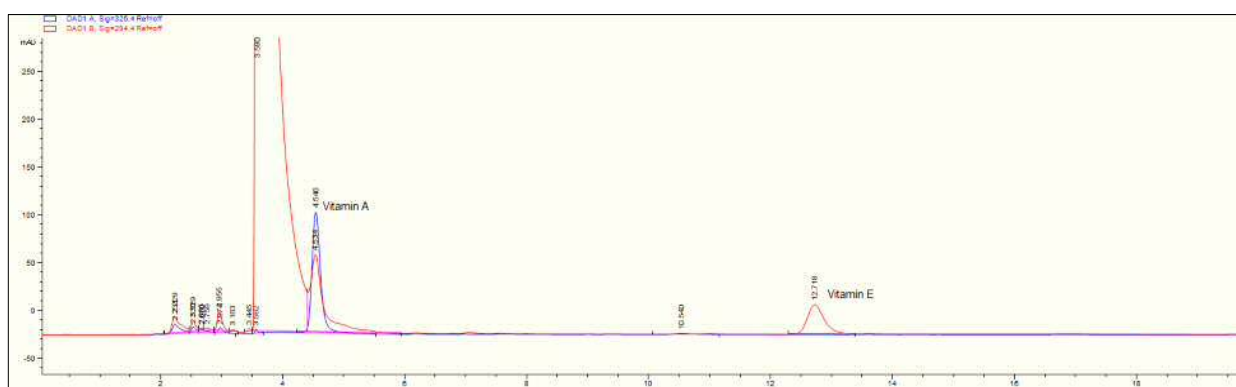
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II



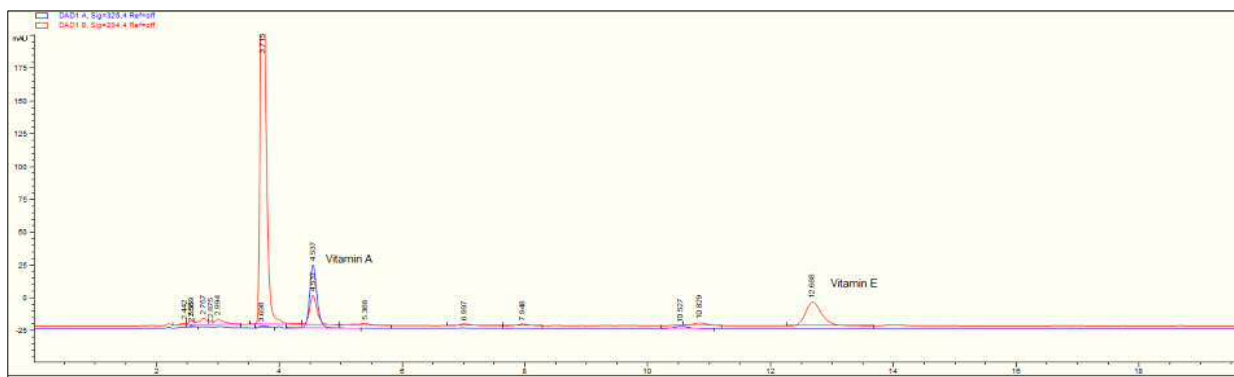
Χρωματογράφημα δείγματος χωρίς την χρήση αντιοξειδωτικών



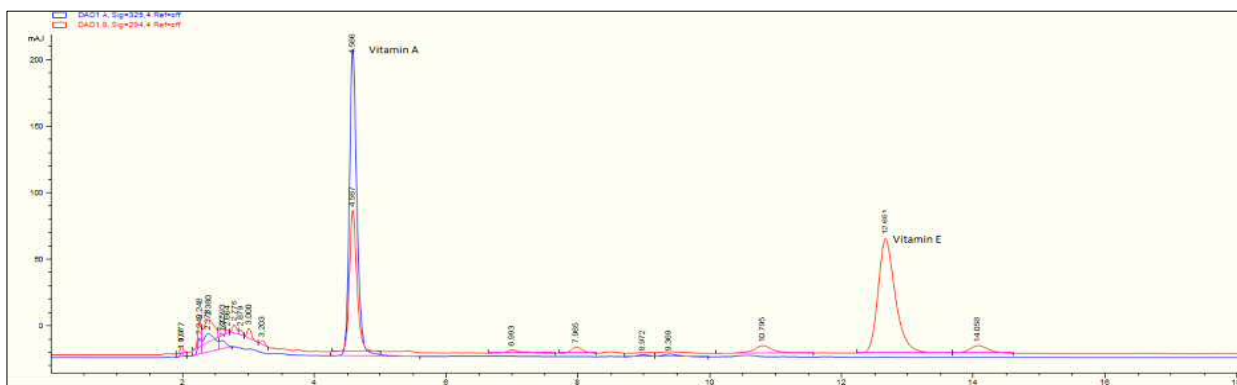
Χρωματογράφημα δείγματος μόνο με χρήση BHT



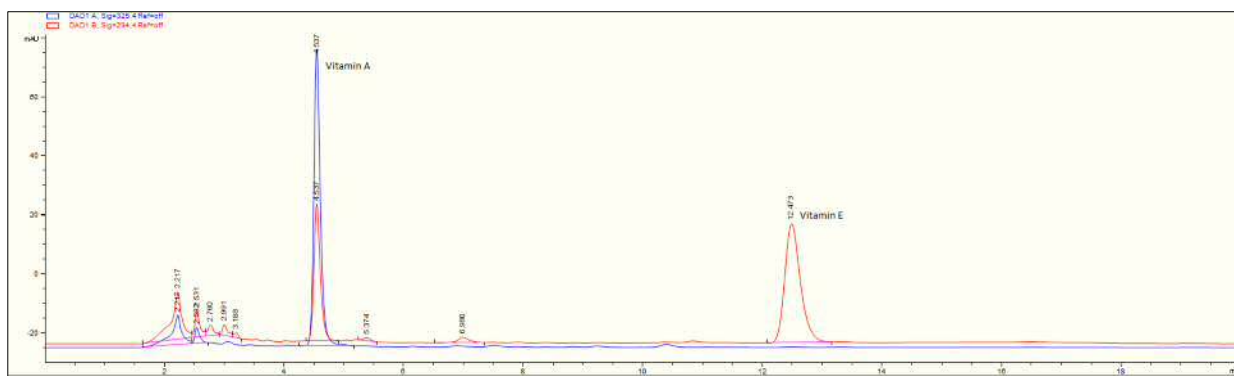
Χρωματογράφημα δείγματος με την χρήση των δύο αντιοξειδωτικών



Χρωματογράφημα δείγματος με την χρήση μόνο ασκορβικού οξέος



Εκχύλιση δείγματος με 800μl πετρελαϊκού αιθέρα



Χρωματογράφημα δείγματος 2 εκχυλίσεων των 20 λεπτών η καθεμία

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. G. Schaafma, *Vitamins/ General Introduction*, Encyclopedia of Dairy Sciences, 2002, pp.2653–2657.
2. Ε.Κ. Βουδούρης, Μ.Γ. Κοντομηνά, *Εισαγωγή στην Χημεία Τροφίμων*, Αθήνα, Οργανισμός Εκδόσεως Διδακτικών βιβλίων, pp. 119-129.
3. Γ. Ζαμπετάκης, Π. Μαρκάκη, Χ. Προεστός, *Χημεία Τροφίμων*, Εκδόσεις Σταμούλης, 2014, Κεφ.7, pp. 235-239.
4. Anthony W Norman, *Sunlight, season, skin pigmentation, vitamin D. and 25-hydroxyvitamin D: integral components of the vitamin D endocrine system*, The American Journal of Clinical Nutrition, 1998, 67(6), pp. 1108-1110.
5. J. F. Gregory, *Vitamins/Food Chemistry*, Marcel Dekker, New York, 1996, pp. 531-616.
6. F. I. Chow, and S. T. Omaye, *Use of antioxidants in the analysis of vitamins A and E in mammalian plasma by high-performance liquid chromatography*, Lipids, 1983, 18(11), pp. 837-841.
7. M.H. Bui, *Sample preparation and liquid chromatographic determination of vitamin D in food products*, Association of Official Analytical Chemists, 1987, 70(5), pp.802-805.
8. Σ. Μηνιάδου-Μεϊμάρογλου, *Διατροφή, Σημειώσεις εργαστηρίου Χημείας Τροφίμων* ΕΚΠΑ Αθήνα, 2008, pp. 81-121.
9. Η.–D.Belitz, W.Grossch, P. Schieberle, *Χημεία Τροφίμων*, Εκδόσεις Τζιόλα, 4^η Έκδοση, pp. 427-429.
10. N.I. Krinsky, *The antioxidant and biological properties of the carotenoids*, Annals of the New York Academy of Science, 1998, 854, pp. 443-7.
11. H.J.Thompson, J. Helmendinger, A. Haegele,S.M. Sedlacek, C. Gillette, C. O'Neill, C. Wolfe E Conry, *Effect of increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidative cellular damage*, Carcinogenesis, 1999, 20, 2261-6.
12. L. Bellows and R. Moore, *Fat-soluble vitamins: A, D ,E, and K*, Colorado State University, Food and Nutrition Series, Health, Fact Sheet 9.315, 2012.
13. M.S Calvo ,S.J Whiting ,C.N Barton, *Vitamin D fortification in the United States and Canada: current status and data needs*, The American Journal of clinical nutrition, 2004, 80(6), pp.1710-1716.
14. E. Zadzinska, M. Kurek, B. Borowska-Struginska, W. Lorkiewicz, I. Rosset, A. Sitek, *The effect of the season of birth and of selected maternal factors on linear enamel*

- thickness in modern human deciduous incisors*, Archives of Oral Biology, 2013, 58, pp. 951-963.
15. S. Escott-Stump, L. Kathleen Mahan, *Krause's Food, Nutrition, & Diet Therapy*, Saunders, 11th Edition, 2004, 83 (3).
 16. P. Lips, *Vitamin D physiology*, Progress in Biophysics and molecular biology, 2006, 92(1), pp. 4-8.
 17. M.L. Colombo, *An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol-perspectives*, Molecules, 2010, 15(4), pp. 2103-13.
 18. P.A. Morrissey, M. Kiely, *Vitamins/Vitamin E, Nutritional Significance*, Encyclopedia of Dairy , 2002, pp.2670-2677.
 19. A.B. Weitberg, D. Corvese, *Effect of vitamin E and beta-carotene on DNA strand breakage induced by tobacco-specific nitrosamines and stimulated human phagocytes*, Journal of experimental & clinical cancer research, 1997, 16, pp. 11-4.
 20. P.M. Farrell, R.J. Roberts, *Vitamin E*, In: M. Shils, J. A., Olson, & M. Shike, Modern Nutrition in Health and Disease, 8th Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, 1994, pp.326-341.
 21. R. Brigelius-Flohé, M.G. Traber, *Vitamin E: Function and metabolism*, official publication of the Federal of American Societies for Experimental Biology Journal, 1999, 13(10), pp. 1145-1155.
 22. H.M. Williams, *Διατροφή, Υγεία, ευρωστία και αθλητική απόδοση*, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 2003.
 23. S.J. Elder, D.B. Haytowitz, J. Howe, J.W. Peterson, S.L. Booth, *Vitamin K contents of meat, dairy, and fast food in the U.S. Diet*, Journal of agricultural and food chemistry, 2006, 54, pp. 463-467.
 24. M. Ufer, *Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists: warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol*, Clinical pharmacokinetics, 2005, 45(12), pp. 1227-1246.
 25. J.W. Suttie, J.M. Betz, M.R. Blackman et al., *Encyclopedia of Dietary Supplements*, 2nd edition, 2010, pp. 851-860.
 26. M.J. Shearer, X. Fu, S.L. Booth, *Vitamin K nutrition, metabolism, and requirements: current concepts and future research*, Advances in Nutrition, 2012, 3(2), pp. 182-195.
 27. M.J. Shearer, P. Newman, *Metabolism and cell biology of vitamin K*, Thrombosis and haemostasis, 2008, 100(4), pp. 530-547.

28. *Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc*, Institute of Medicine, National Academy Press, Washington, D.C., 2001.
29. J.W. Suttie, A.C. Ross, B. Caballero, R.J. Cousins, K.L. Tucker, T.R. Ziegler, *Modern Nutrition in Health and Disease*, 11th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2014, pp. 305-316.
30. V.A. Jagannath, Z. Fedorowicz, V. Thaker, A.B. Chang, *Vitamin K supplementation for cystic fibrosis*, The Cochrane database of systematic reviews, 2013, 4.
31. D. Majchrzak, Ibrahim, E. *Phylloquinone (vitamin K1) content of commercially-available baby food products*, Institute of Nutritional Sciences, University of Vienna, Food Chemistry, 2001, 74, pp. 275–280.
32. Y. Li, H.E. Schellhorn, *New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C*, The journal of nutrition, 2007, 137(10), pp. 2171-2184.
33. A.C Carr, B. Frei, *Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans*, The American journal of clinical nutrition, 1999, 69(6), pp. 1086-1107.
34. S.K. Powers, C.K. Sen, *Physiological antioxidants and exercise training*, In: C.K. Sen, L. Packer, O. Hänninen, , *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise*, Elsevier Science, Amsterdam, 2000, pp. 221-242.
35. D.V. Ratnam, D.D. Ankola, V. Bhardwaj, D.K. Sahana, & Kumar M.N., *Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective*, official journal of Controlled Release Society, 2006, 113(3), pp.189-207.
36. R.A. Jacob, G. Sotoudeh, *Vitamin C function and status in chronic disease*, Nutrition in clinical care, an official publication of Tufts University, 2002, 5(2), pp. 66-74.
37. G. Davison, M.Z. Gleeson, *The effect of 2 weeks vitamin C supplementation on immunoendocrine responses to 2.5 h cycling exercise in man*, European journal of Applied Physiology, 97(4), pp. 454-461.
38. J.M. Peake, K. Suzuki, S.J. Coombes, *The influence of antioxidant supplementation on markers of inflammation and the relationship to oxidative stress after exercise*, Journal of Nutritional Biochemistry, 18, pp. 357-371.
39. M. Weinstein, P. Babyn, S. Zlotkin, *An orange a day keeps the doctor away: scurvy in the year 2000*, Pediatrics, 2001, 108(3).
40. *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*, Institute of Medicine, The National Academy Press, Washington, DC, 2000.

41. A.H. Wang, C. Still, *Old world meets modern: a case report of scurvy*, Nutrition in clinical practice, official publication of the American Society for Parental and Enteral Nutrition, 2007, 22(4), pp. 445-448.
42. M. Levine, C. Conry-Cantilena, Y. Wang, R.W. Welch, P.W. Washko, K.R. Dhariwal, J.B. Park, A. Lazarev, J.F. Graumlich, J. King, L.R. Cantilena, *Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93(8), pp. 3704-3709.
43. M. Levine, S.C. Rumsey, R. Daruwala, J.B. Park, Y. Wang, *Criteria and recommendations for vitamin C intake*, The journal of the American Medical Association, 1999, 281(15), pp. 1415-1423.
44. R. Stephen, T. Utecht, *Scurvy identified in the emergency department: a case report*, The Journal of emergency medicine, 2001, 21(3), pp. 235-237.
45. H.M. Said, *Thiamin* In: P.M. Coates, J.M. Betz, M.R. Blackman, et al., Encyclopedia of Dietary Supplements. 2nd edition, London and New York: Informa Healthcare; 2010, pp.748-753.
46. C. Bemeur, R.F. Butterworth, *Thiamin*. In: A.C. Ross, B. Caballero, R.J. Cousins, K.L. Tucker, T.R. Ziegler, Modern Nutrition in Health and Disease, 11th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2014, pp. 317-324.
47. S.M. Nabokina, H.M. Said, *A high-affinity and specific carrier-mediated mechanism for uptake of thiamine pyrophosphate by human colonic epithelial cells*, American Journal of Physiology Gastrointestinal and liver physiology, 2012, 303(3), pp. 389-395.
48. V. Tanphaichitr, *Thiamin* In: M. Shils, J.A. Olson, M. Shike, A.C. Ross, Modern Nutrition in Health and Disease, 9th edition, Williams & Wilkins Baltimore, 1999, pp. 381-389.
49. L. Bettendorff, J.W. Erdman, I.A. Macdonald, S.H. Zeisel, *Thiamin*, Present Knowledge in Nutrition, 10th edition, Wiley-Blackwell, Washington, DC, 2012, pp. 261-279.
50. Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline, Institute of Medicine, National Academy Press, Washington, DC, 1998.

51. A.S. Hazell, S. Faim, G. Wertheimer, V.R. Silva, C.S. Marques, *The impact of oxidative stress in thiamine deficiency: a multifactorial targeting issue*, *Neurochemistry International*, 2013, 62(5), pp. 796-802.
52. R. Agabio, *Thiamine administration in alcohol-dependent patients*, *Alcohol and alcoholism*, 2005, 40(2), pp. 155-156.
53. A.D. Thomson, E.J. Marshall, *The natural history and pathophysiology of Wernicke's Encephalopathy and Korsakoff's Psychosis*, *Alcohol and alcoholic*, 2006, 41(2), pp. 151-158.
54. A.D. Thomson, I. Guerrini, E.J. Marshall, *The evolution and treatment of Korsakoff's syndrome: out of sight, out of mind*, *Neuropsychology Review*, 2012, 22(2), pp. 81-92.
55. R.S. Rivlin RS, *Riboflavin* In: P.M Coates, J.M. Betz, M.R. Blackman, et al., *Encyclopedia of Dietary Supplements*. 2nd edition, London and New York: Informa Healthcare, 2010, pp. 691-699.
56. A.M Gaylord, J.J Warthesen, D.E. Smith, *Influence of milk fat, milk solids, and light intensity on the light stability of vitamin A and riboflavin in low-fat milk*, *Journal of Dairy Science*, 1986, 69, pp. 2779-2784.
57. J.R. Dainty, N.R. Bullock, D.J. Hart, A.T. Hewson, R. Turner, P.M. Finglas, et al., *Quantification of the bioavailability of riboflavin from foods by use of stable-isotope labels and kinetic modeling*, *The American journal of clinical nutrition*, 2007, 85(6), pp. 1557-1564.
58. J.F. Gregory 3rd, *Accounting for differences in the bioactivity and bioavailability of vitamins*, *Food & Nutrition Research*, 2012, 56.
59. R.S. Gibson, *Assessment of the Status of Thiamin, Riboflavin, and Niacin*, *Principles of Nutritional Assessment*, 2nd edition, Oxford University Press, New York, 2005, pp. 545-568.
60. D.B. McCormick, *Vitamin/mineral supplements: of questionable benefit for the general population*, *Nutrition reviews*, 2010, 68(4), pp. 207-213.
61. W.T. Penberthy, J.B. Kirkland, *Niacin*, In: J.W. Erdman, I. MacDonald, S.H. Zeisel, *Present Knowledge in Nutrition*, 10th edition, Ames: International Life Sciences Institute, 2012, pp. 293-306.
62. D. Cervantes-Laurean, N.G. McElvaney, J. Moss, *Niacin*, In: M. Shils, J.A. Olson, M. Shike, A.C. Ross, *Modern Nutrition in Health and Disease*, 9th edition, Williams & Wilkins, Baltimore, 1999, pp. 401-411.

63. P.J. Matts, J.E. Oblong, D.L. Bissett, A review of the range of effects of niacinamide in human skin, *International Federation of Societies of Cosmetic Chemists Magazine*, 2002, 5, pp. 285–289.
64. K. Maiese, Z.Z. Chong, J. Hou, Y.C. Shang, *The vitamin nicotinamide: translating nutrition into clinical care*, *Molecules*, 2009, 14(9), pp. 3446–3485.
65. E.F. Lampeter, A. Klinghammer, W.A. Scherbaum, E. Heinze, B. Haastert, G. Giani, H. Kolb, *The Deutsche Nicotinamide Intervention Study: an attempt to prevent type 1 diabetes. DENIS group*, *Diabetes*, 1998, 47(6), pp. 980–984.
66. J.F. Gregory 3rd, *Nutritional properties and significance of vitamin glycosides*, *Annual Review of Nutrition*, 1998, 18, pp. 277-296.
67. R.Jacob, M. Swenseid ,*Niacin* In: E. Ziegler, L. Filer , eds.,*Present Knowledge in Nutrition*. 7th edition, International Life Sciences Institute, Washington,D.C., 1996,pp.185-190.
68. M. Knip, I.F. Douek, W.P. Moore, H.A. Gillmor, A.E. McLean, P.J. Bingley, E.A. Gale, *Safety of high-dose nicotinamide: a review*, *Diabetologia*, 2000, 43(11), pp. 1337–1345.
69. H.M. Said, A. Ortiz, E. McCloud, D. Dyer, M.P. Moyer, S. Rubin, *Biotin uptake by human colonic epithelial NCM460 cells: a carrier-mediated process shared with pantothenic acid*, *The American journal of physiology*, 1998, 275, pp. 1365-1371.
70. J.W. Erdman, I. MacDonald, S.H. Zeisel, *Present Knowledge in Nutrition*, J.W. Miller, R.B. Rucker, *Pantothenic acid*, 10th edition, Ames: International Life Sciences Institute, Wiley-Blackwell, 2012, pp. 375-390.
71. K. Bauerly, R.B. Rucker, J. Zemleni, R.B. Rucker, D.B. McCormick, J.W. Suttie, *Handbook of vitamins, Pantothenic acid*, 4th edition, CRC Press, Boca Raton, 2007, pp. 289-314.
72. R.E. Hodges, M.A. Ohlson, W.B. Bean, *Pantothenic acid deficiency in man*, *The Journal of clinical investigation*, 1958, 37(11), pp. 1642-1657.
73. N. Flodin, *Pharmacology of micronutrients*, Alan R. Liss, Inc., New York, 1988.
74. R.A. Herbst, W. Uter, C. Pirker, J. Geier, P.J. Frosch, *Allergic and non-allergic periorbital dermatitis: patch test results of the Information Network of the Departments of Dermatology during a 5-year period*, *Contact Dermatitis*, 2004, 51(1), pp. 13-19.
75. M. Schmuth, M.A. Wimmer, S. Hofer, et al., *Topical corticosteroid therapy for acute radiation dermatitis: a prospective, randomized, double-blind study*, *The British Journal of dermatology*, 2002, 146(6), pp. 983-991.

76. L. Galluzzi, E. Vacchelli, J. Michels, et al., Effects of vitamin B6 metabolism on oncogenesis, tumor progression and therapeutic responses, *Oncogene*, 2013, 32(42), pp. 4995-5004.
77. D. McCormick, *Vitamin B₆* In: B. Bowman, R. Russell, Present Knowledge in Nutrition, 9th edition, International Life Sciences Institute, Washington, D.C., 2006.
78. A. Mackey, S. Davis S, J. Gregory, *Vitamin B₆*, In: M. Shils, M. Shike, A. Ross, B. Caballero, R. Cousins, Modern Nutrition in Health and Disease, 10th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2005.
79. D.A. Bender, *Non-nutritional uses of vitamin B₆*, The British Journal of nutrition, 1999, 81(1), pp. 7-20.
80. A. Bendich, M. Cohen, *Vitamin B₆ safety issues*, Annals of the New York Academy of Sciences, 1990, 585, pp. 321-330.
81. J. Zemleni, D.C. Teixeira, T. Kuroishi, E.L. Cordonier, S. Baier, *Biotin requirements for DNA damage prevention*, Mutation Research, 2012, 733(1-2), pp. 58-60.
82. S. Magnúsdóttir S, D. Ravcheev, V. de Crecy-Lagard, I. Thiele, *Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes*, Frontiers in genetics, 2015, 6, 148.
83. H.M. Said, *Cell and molecular aspects of human intestinal biotin absorption*, The Journal of nutrition, 2009, 139(1), pp. 158-162.
84. D. Koutsikos, B. Agroyannis, H. Tzanatos-Exarchou, *Biotin for diabetic peripheral neuropathy*, Biomedicine & Pharmacotherapy, 1990, 44(10), pp. 511-514.
85. Θ. Βαλαβανίδης, Η χημική ένωση του μήνα «Φυλλικό οξύ», Τμήμα Χημείας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο, 2006.
86. L.B. Bailey, J.F. Gregory 3rd, *Folate metabolism and requirements*, The Journal of nutrition, 1999, 129(4), pp. 779-782.
87. R. Carmel, *Folic Acid*, In: M. Shils, M. Shike, A. Ross, B. Caballero, R. Cousins, Modern Nutrition in Health and Disease, 10th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2005, pp. 470-481.
88. Unites States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 25, 2012.
89. Department Of Health And Human Services, United States Food and Drug Administration, *Food standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid*, Federal Register 61(44): <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-1996-03-05/pdf/96-5014.pdf> .

90. S.F. Choumenkovitch, J. Selhub, P.W. Wilson, J.I. Rader, I.H. Rosenberg, P.F. Jacques, *Folic acid intake from fortification in United States exceeds predictions*, The Journal of nutrition, 2002, 132(9), pp. 2792-2798.
91. P. Whittaker, P.R. Tufaro, J.I. Rader, *Iron and folate in fortified cereals*, Journal of American College of Nutrition, 20(3), 2001, pp. 247-254.
92. A. Gibson, J.W. Woodside, I.S. Young, P.C. Sharpe, C. Mercer, C.C. Patterson, et al., *Alcohol increases homocysteine and reduces B vitamin concentration in healthy male volunteers--a randomized, crossover intervention study*, monthly journal of the Association of Physicians, 101(11), pp. 881-887.
93. R.L. Bailey, K.W. Dodd, J.J. Gahche, J.T. Dwyer, M.A. McDowell, E.A. Yetley, et al., *Total folate and folic acid intake from foods and dietary supplements in the United States: 2003-2006*, The American Journal of clinical nutrition, 91(1), 2010, pp. 231-237.
94. T.O. Scholl, W.G. Johnson, *Folic acid: influence on the outcome of pregnancy*, The American Journal of clinical nutrition, 71(5 Suppl), 2000, pp.1295-1303.
95. T. Brody, Nutritional Biochemistry, 2nd edition, Academic Press, San Diego, 1999.
96. G.G. Klee, Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B(12) and folate, Clinical chemistry, 2000, 46, pp. 1277-83.
97. V. Herbert, Vitamin B12 in Present Knowledge in Nutrition, 17th edition, International Life Sciences Institute Press, Washington, DC, 1996.
98. G. Combs, *Vitamin B12*, In: The Vitamins, Academic Press, Inc., New York, 1992.
99. M.A. Bernard, P.A. Nakonezny, T.M. Kashner, *The effect of vitamin B₁₂ deficiency on older veterans and its relationship to health*, Journal of the American Geriatrics Society, 1998, 46, pp. 1199-206.
100. T. Bottiglieri, *Folate, vitamin B₁₂, and neuropsychiatric disorders*, Nutrition reviews, 1996, 54, pp. 382-390.
101. P.M. Suter, B.B. Golner, B.R. Goldin, F.D. Morrow, R.M. Russel, *Reversal of protein-bound vitamin B₁₂ malabsorption with antibiotics in atrophic gastritis*, Gastroenterology, 1991, 101, pp. 1039-1045.
102. E. Andrès, L. Federici, S. Affenberger, J. Vidal-Alaball, N.M. Loukili, J. Zimmer, et al., *B12 deficiency: a look beyond pernicious anemia*, the Journal of family practice, 2007, 56, pp. 537-542.
103. A.E. Sumner, M.M. Chin, J.L. Abraham, G.T. Gerry, R.H. Allen, S.P. Stabler, *Elevated methylmalonic acid and total homocysteine levels show high prevalence of vitamin*

- B₁₂ deficiency after gastric surgery*, Annals of internal medicine, 1996, 124, pp. 469-476.
104. U. von Schenck, C. Bender-Gotze, B. Koletzko, *Persistence of neurological damage induced by dietary vitamin B₁₂ deficiency in infancy*, Archives of Disease in childhood, 1997, 77, pp. 137-139.
 105. C.J. Blake, *Committee on Food Nutrition/ Fat-soluble vitamins*, Journal of AOAC International, 88(1), 2005, pp. 325–329.
 106. R Eitenmiller and L Ye, *Determination of vitamins*, Handbook of Food Analysis,1, 2003, pp. 6054-6066.
 107. L.M.L. Nollet, *Fat-soluble vitamins* In: L.M.L. Nollet ,F. Toldrá, Food Analysis by HPLC, CRC Press, Taylor & Francis Group,2013,pp.272-313.
 108. C.J. Blake, *Status of Methodology for the Determination of Fat-Soluble Vitamins in Foods, Dietary Supplements, and Vitamin Premixes*, Journal of AOAC International, 2007, 90(4), 2007, pp. 897-909.
 109. J.A. Paixo, J.M. Campos, Journal of liquid chromatography & related technologies,26, 2013, pp. 641–663.
 110. The European Committee for Standardization, Foodstuffs - Determination of vitamin A by high performance liquid chromatography - Measurement of all-E-retinol and 13-Z-retinol, Part I, 2000.
 111. R. Fedder, A. Ploger, Solid-phase extraction of vitamins A and E from animal feeds: A substitute for liquid-liquid extraction, Journal of AOAC International, 88(6), 2005, pp. 1579–1582.
 112. J.N. Thompson, G. Hatina, W.B. Maxwell, S. Duval, *High performance liquid chromatographic determination of vitamin D in fortified milks, margarine and infant formulas*, Journal- Association of Official Analytical Chemists, 65, 1982, pp. 624–631.
 113. C.K. Chow, H.H. Draper, A. Saari Csallany, *Method for the assay of free and esterified tocopherols*, Analytical Biochemistry, 32, 1969, pp. 81–90.
 114. The European Committee for Standardization, Foodstuffs - Determination of vitamin K1 by high performance liquid chromatography, 2003.
 115. AOAC INTERNATIONAL, *Method 999.15*, Official Methods of Analysis 18th Ed., Gaithersburg, 2006.
 116. S.A. Barnett, L.W. Fricktur, H.M. Baine, *Simultaneous determination of vitamins A, D₂ or D₃, E and K₁ in infant formulas and dairy products by reversed-phase liquid chromatography*, Analytical chemistry, 52, 1980, pp. 610–614.

117. R.L. Glass, *Alcoholysis, saponification and the preparation of fatty acid methyl esters*. *Lipids*, 6(12), 1971, pp. 919–925.
118. L. Mathiasson, C. Turner, H. Berg, L. Dahlberg, A. Theobald, E. Anklam, R. Ginn, M. Sharman, F. Ulberth, R. Gabernig, *Development of methods for the determination of vitamins A, E and beta-carotene in processed foods based on supercritical fluid extraction: a collaborative study*, *Food additives & contaminants*, 19(7), 2002, pp. 632-646.
119. M.A. Schneiderman, A.K. Sharma, K.R.R. Mahanama, D.C. Locke, Determination of vitamin K1 in powdered infant formulas, using supercritical fluid extraction and liquid chromatography with electrochemical detection, *Journal- Association of Official Analytical Chemists*, 71(4), 1998, pp. 815-817.
120. M.A. Schneiderman, A.K. Sharma, D.C. Locke, Determination of vitamin A palmitate in cereal products using supercritical fluid extraction and liquid chromatography with electrochemical detection, *Journal of Chromatography A*, 765, 1997, pp. 215–220.
121. C. Markell, D.F. Hagen, V.A. Bunnelle, *New technologies in solid-phase extraction*, *LC-GC International*, 4(6), 1991, p.10
122. D.D. Blevins, S.K. Schultheis, *Comparison of extraction disk and packed-bed cartridge technology in SPE*, *LC-GC International*, 12, 1994, p.12-16.
123. R E. Majors, *Automation of solid-phase extraction*, *LC-GC International*, 6(6), 1993, p. 346.
124. D. Blanco, M.P. Fernandez, M.D. Gutierrez, *Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in dairy products by liquid chromatography with a narrow-bore column*, *The Analyst*, 125, 2000, 427–431.
125. K.E. Savolainen, K.M. Pynnonen, S.P. Lapinjoki, M.T. Vidgren, *Determination of fat-soluble vitamins in a pharmaceutical dosage form by solid-phase extraction and reversed-phase liquid chromatography*, *Journal of Pharmaceutical Science*, 77, 1988, pp. 802–803.
126. J.L. Luque-Garcia, M.D. Luque de Castro, *Extraction of fat-soluble vitamins*, *Journal of chromatography*, 935(1–2), 2001, pp. 3–11.
127. F. Ortiz-Boyer, J.M. Fernandez-Romero, M.D. Luque de Castro, J.M. Quesada, *Aminopropyl-silica as an advantageous alternative to nonpolar sorbents for continuous cleanup/preconcentration of vitamin D₃ metabolites*, *Chromatographia*, 47, 1998, 367–372.

128. D. Skoog, J.F. Holler, T.A. Niernan, *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, Κωσταράκης, 2002, pp. 816,844,855,856,886.
129. D.C. Woollard, H.E. Indyk, Y.F. Bertram, K.K. Cook, *Determination of vitamin K₁ isomers in foods by liquid chromatography with C30 bonded-phase column*, Journal of AOAC International, 85, 2002, pp. 682–691.
130. C.J. Bates, *Vitamins/Fat-Soluble*, Encyclopedia of Analytical Science 2nd edition, Molecular Sciences and Chemical Engineering, 2005, pp.159–172.
131. A.P. De Leenheer, H.J. Nelis, E.W. Lambert, R.M. Bauwens, *Chromatography Of Fat-Soluble Vitamins In Clinical Chemistry*, Journal of Chromatography, 429, 1988, pp. 3-58.
132. R. L. Pecsok, L. D. Shilds, T. Cairns, I. G. McWilliam, *Σύγχρονες μέθοδοι στη χημική ανάλυση*, 2η έκδοση, Γ.Α. Πνευματικός, Αθήνα, 1980.
133. M.J. Trisconi, E. Campos-Gimenez, G. Jaudzems, Dawn Dowell, *Determination of Vitamin A in Infant Formula and Adult Nutritionals by UPLC-UV*, Journal of AOAC International, 95(2), 2012, pp. 1-6.
134. Linda Butler Thompson and Karen Schimpf, Steve Baugh Thompson et al., *Determination of Vitamins A and E in Infant Formula and Adult/Pediatric Nutritional Formula by HPLC with UV and Fluorescence Detection*, Journal of AOAC International, 96(6), 2013, pp. 1407-1413.
135. A. McMahon, S. Christiansen, L. Shine, C. Loi, D. Dowell, *Simultaneous Determination of 13-cis and all-trans Vitamin A Palmitate (Retinyl Palmitate), Vitamin A Acetate (Retinyl Acetate), and Total Vitamin E (α-Tocopherol and dl-α-Tocopherol Acetate) in Infant Formula and Adult Nutritionals by Normal Phase HPLC*, Journal of AOAC International, 96(5), 2013, pp. 1073-1081.
136. National food safety standard, *Determination of vitamin A: D, E in foods for infants and young children, milk and milk products*, Ministry of Health, the People's Republic of China, 2010.
137. B. Rodas Mendoza, S. Morera Pons, A.I. Castellote Bargallo, M.C. Lopez-Sabater, *Rapid determination by reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography of Vitamins A and E in infant formulas*. Journal of Chromatography, 2003,1018, pp. 197-202.
138. A. Sarafray Yazdi, S. Yazdinezhad, *Simultaneous determination of Vitamin A and E in infant milk formulas using semi-micro liquid-liquid extraction followed by HPLC-UV*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2014, 37, pp. 391-403.

139. Θ.Π. Χατζηιωάννου, Α.Κ. Καλοκαιρινός, Μ. Τιμοθέου-Ποταμιά, *Ποσοτική Ανάλυση*, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2009, p.15.
140. J.C.Deutsch, *Ascorbic Acid Oxidation by Hydrogen Peroxide*, Analytical Biochemistry, 1998, 225, pp.1-7.
141. National Institute of Standards & Technology, *Certificate of Analysis Standard Reference Material SRM 1849a Infant/Adult Nutritional Formula*, Gaithersburg, MD, 2015, pp.1-13.
142. G.M Landers, J.A. Olson, *Absence of isomerization of retinyl palmitate, retinol, and retinal in chlorinated and nonchlorinated solvents under gold light*, Journal of Association of Official Analytical Chemistry, 1986, 69, pp. 50–55.
143. P. Monteiro de Souza, P. de Oliveira Magalhães, *Application of microbial α -amylase in industry*, Brazilian Journal of Microbiology, 2010, 41(4), pp. 850–861.