

ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ

Α. Μπαδέκα
Αναπλ. Καθηγήτρια
Τμήμα Χημείας,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
2020

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

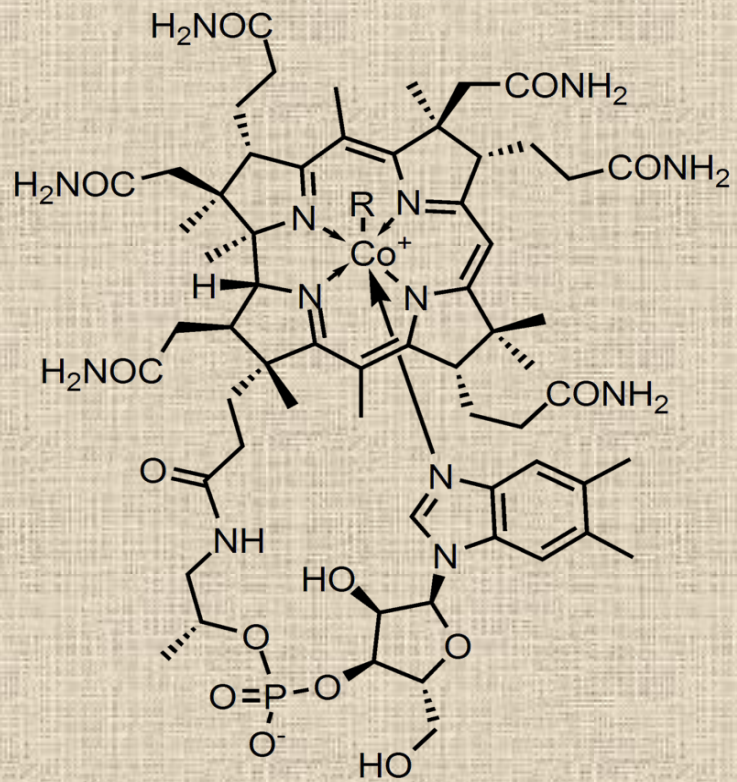
- Οι βιταμίνες είναι μικρού σχετικά μοριακού βάρους ενώσεις τις οποίες ο οργανισμός τις χρειάζεται, έστω και σε μικρές ποσότητες για τον φυσιολογικό μεταβολισμό του οργανισμού.
- Με κάποιες εξαιρέσεις, ο άνθρωπος δεν μπορεί να τις συνθέσει κι επομένως πρέπει να τις προσλάβει με την τροφή και τα συμπληρώματα.
- Μη ικανοποιητικά επίπεδα βιταμινών οδηγούν σε διάφορες ασθένειες (π.χ. σκορβούτο-έλλειψη βιταμίνης C, πελλάγρα – έλλειψη νιασίνης)

ΜΟΝΑΔΕΣ

- Συνήθως χρησιμοποιούνται οι Διεθνείς Μονάδες (IU - ΔΜ) ή % ημερήσια λήψη (DV).
- Ο ορισμός IU/ΔΜ διαφέρει από ένωση σε ένωση, έτσι 1 ΔΜ της βιταμίνης E δεν περιέχει την ίδια ποσότητα με την 1 ΔΜ της βιταμίνης A.
- 1 ΔΜ βιταμίνης A είναι το βιολογικό ισοδύναμο 0,3μg ρετινόλης, 0,6μg β-καροτενίου και 1,2μg άλλων ενεργών καροτενοειδών (προβιταμίνη A) (α-καροτένιο, β-κρυπτοξανθίνη).

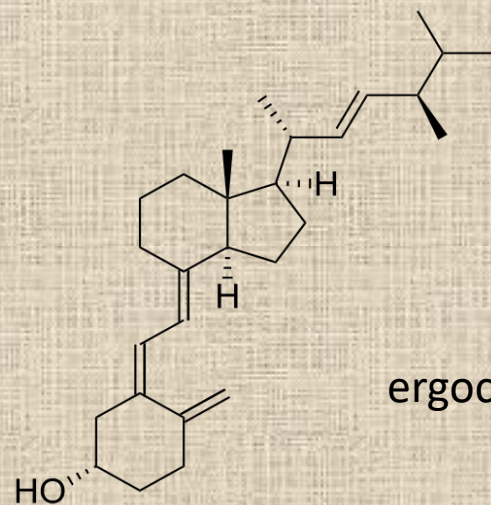
ΜΟΝΑΔΕΣ

- Γενικά για τη μετατροπή ΔΜ της Α σε ρετινόλη πολλαπλασιάζεται με 0,1 εάν το τρόφιμο είναι φυτικής προέλευσης και με 0,2 εάν είναι ζωικής προέλευσης.
- 1 ΔΜ της C είναι το βιολογικό ισοδύναμο 50μg του L-ασκορβικού οξέος.
- 1 ΔΜ της βιταμίνης D → 0,025μg cholecalciferol/ergocalciferol

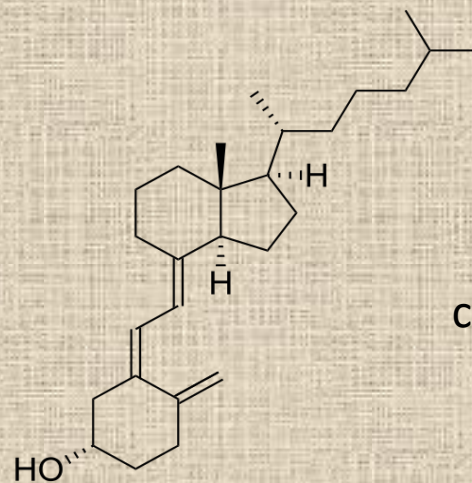


R = 5'-deoxyadenosyl, Me, OH, CN

Cyanocobalamin



ergocacliferol



cholecacliferol

Υδατοδιαλυτές

- Σύμπλεγμα βιταμινών Β: Β1 (θειαμίνη), Β2 (ριβοφλαβίνη), Β4 (νιασίνη), Β5 (παντοθενικό οξύ), Β6 (πυριδοξίνη), Β8 (βιοτίνη), Β9 (φολικό οξύ), Β12 (κοβαλαμίνη), (γάλα, ασπράδι αυγού, κρέας, ψάρια, λάδι και πατάτες).
- Βιταμίνη C (φρέσκα λαχανικά και εσπεριδοειδή).

Λιποδιαλυτές

- Βιταμίνη Α (ψάρια, γαλακτοκομικά και καρότα)
- Βιταμίνη D (D2+D3 κύρια πηγή είναι το γάλα)
- Βιταμίνη Ε (έλαια και ορισμένα λαχανικά)
- Βιταμίνη Κ (φύλλα φυτών)

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

- Bioassays (βιοπροσδιορισμοί) περιλαμβάνουν ανθρώπους και ζώα.
- Μικροβιολογικοί προσδιορισμοί, χρήση πρωτόζωων, βακτηρίων και ζυμών.
- Φυσικοχημικοί προσδιορισμοί (φασματοφωτομετρικοί, φθορισμομετρικοί, χρωματογραφικοί, ενζυματικοί, ανοσολογικοί και ραδιομετρικοί).

- Πολλοί παράμετροι επηρεάζουν την επιλογή της μεθόδου ανάλυσης, όπως ακρίβεια, ευαισθησία, κόστος και η φύση του δείγματος.
- Πολλές βιταμίνες αποικοδομούνται από το φως, το οξυγόνο, το pH, θερμότητα κ.α.
- Η κατάλληλη δειγματοληψία επίσης παίζει ρόλο κυρίως στην ομοιογένεια του δείγματος.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

- Η κάθε μέθοδος εξειδικευμένη για κάθε βιταμίνη και κυρίως να σταθεροποιεί τη βιταμίνη.
- Ασκορβικό οξύ: ψυχρή εκχύλιση με μεταφωσφορικό ή οξικό οξύ.
- Βιταμίνη B₁ & B₂: βρασμός ή καύση σε οξύ + ενζυμική επεξεργασία.
- Νιασίνη: πέψη με οξύ ή βάση.
- Φυλλικό: ενζυμική εκχύλιση με α-αμυλάση, πρωτεάση και γ-γλουταμυλοϋδρολάση.
- Βιταμίνες A, E ή D: Εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες, σαπωνοποίηση και επανεκχύλιση. Στις ασταθείς βιταμίνες προστίθενται αντιοξειδωτικά.

ΒΙΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ - bioassay

Είναι πορείες που προσδιορίζουν τη συγκέντρωση καθαρότητας ή τη βιολογική δράση μίας ένωσης. Μετρούν το ένζυμο υπό την επίδραση της βιταμίνης (βιταμίνες ελέγχουν τη σύνθεση ορισμένων ενζύμων) ή τα φαινοτυπικά αποτελέσματα της ανεπάρκειάς της.

- *In vivo*: Παρόλο που αυτή η μέθοδος είναι κοντά στην πραγματικότητα έχει πολλά μειονεκτήματα, όπως ότι δεν είναι εφαρμόσιμη για όλες τις βιταμίνες, είναι χρονοβόρα, υψηλού κόστους και δεν έχει κλινική εφαρμογή.
- *In vitro*: Σε σύγκριση με την *in vivo* είναι πιο απλή, μη χρονοβόρα, φθηνή και μπορεί να εφαρμοστεί σε διάφορες βιταμίνες, δεν είναι κοντά στην πραγματικότητα και οι καλλιέργειες των κυττάρων κινδυνεύουν από επιμόλυνση.

- Συνήθως χρησιμοποιούνται για την ανάλυση βιταμινών B₁₂ & D.
- Πρωτόκολλα πορείας π.χ. AOAC method 936.14, 43.3.01.
- Έλεγχος της χρώσης των οστών της κνήμης ή της ωλένης.
- Λόγω του θανάτου των πειραματόζωων έχει περιορισμένη χρήση σε ζώα.

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ

- Είναι μέθοδοι μέτρησης ενώσεων, όπως βιταμίνες και αμινοξέα, χρησιμοποιώντας μικροοργανισμούς.
- Προσδιορίζει ή εκτιμά τη συγκέντρωση ή την ισχύ ενός π.χ. αντιβιοτικού, μέσω μέτρησης και σύγκρισης της περιοχής της ζώνης αναστολής ή της ταχύτητας που παράγεται από την εξεταζόμενη ουσία με εκείνη του προτύπου πάνω σε κατάλληλο μικρόβιο υπό κανονικές συνθήκες.

- Συνήθως για τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες.
- Είναι ευαίσθητες, συγκεκριμένες για κάθε βιταμίνη.
- Είναι χρονοβόρες αλλά μπορούν γενικά να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση μιας σχετικά ευρείας σειράς βιολογικών μήτρων χωρίς σημαντικές τροποποιήσεις.
- Απαιτούν πιστή ακολουθία των πρωτοκόλλων για ακριβή αποτελέσματα.

Αρχή

- Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι ανάλογη με τις απαιτήσεις τους στη συγκεκριμένη βιταμίνη.
- Η ανάπτυξη μετρείται με όρους θολερότητας, παραγωγή οξέος, σταθμικά ή με προϊόντα μεταβολισμού.
- Με τα βακτήρια και τις ζύμες χρησιμοποιείται η θολερότητα.

ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

- Είναι σχετικά απλές, ακριβείς χρησιμοποιούνται ευρέως, και αυτή που προτιμάται να είναι η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) με διάφορους ανιχνευτές ανάλογα με τη φύση της εξεταζόμενης βιταμίνης.

Λιποδιαλυτές βιταμίνες

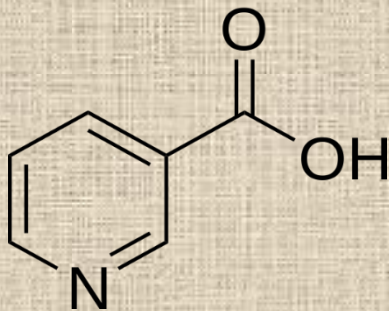
Vitamin	Method
Vitamin A (& precursors) Retinol all-trans-retinol 13-cis-retinol β-carotene	LC 340nm, 328nm or 313nm LC – 325nm, FL – $E_x=325\text{nm}$, $E_m=475\text{nm}$ LC – 445nm, 444nm or 444nm
Vitamin D Cholecalciferol, ergocalciferol	Bioassay, LC – 265nm
Vitamin E R,R,R – tocopherols	LC, FL – $E_x=295\text{nm}$, $E_m=330\text{nm}$
Vitamin K phylloquinone	LC postocolumn reduction FL – $E_x=243\text{nm}$, $E_m=430$

Υδατοδιαλυτές βιταμίνες

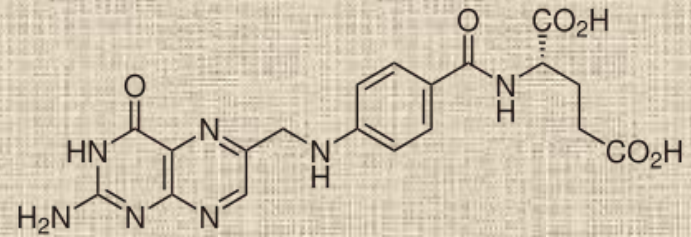
Vitamin	Method
Ascorbic acid (vitamin C) Ascorbic acid	2,6-dichloroindophenol (titration) LC – 265nm, FL – $E_x=350\text{nm}$, $E_m=430\text{nm}$
Thiamin (Vitamin B ₁) Thiamin, thiamin HCl	Thiochrome, LC, FL – $E_x=365, 366\text{nm}$, $E_m=435, 420\text{nm}$
Riboflavin (Vitamin B ₂) Riboflavin	LC, FL – $E_x=440, 468\text{nm}$, $E_m=565, 520\text{nm}$
Niacin Nicotinic acid, nicotinamide	Microbiological
Vitamin B ₆ Pyridoxine, pyridoxal, pyridoxamine	FL – $E_x=290\text{nm}$, $E_m=395\text{nm}$
Folic acid, folate	Microbiological
Vitamin B ₁₂ Cyanocobalamin	Microbiological
Biotin	LC – 200nm or Microbiological
Pantothenic acid	Microbiological

Νιασίνη - B₃

- Χρησιμοποιείται το *Lactobacillus plantarum*.
- Μετρείται η θολότητα, επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η οξύμετρία (απαιτείται χρόνος επώασης 72h)



Φολικά (φυλλικό οξύ)



- Το **φολικό οξύ** (folate) είναι η βιταμίνη που υπάρχει φυσικά στις τροφές ενώ το φυλλικό οξύ (folic acid) είναι το συνθετικό μόριο που δημιουργήθηκε στο εργαστήριο, για πρώτη φορά το 1943.
- Το **φυλλικό οξύ** δεν υπάρχει εκ φύσεως στις τροφές αλλά βρίσκεται στα συμπληρώματα διατροφής και στα εμπλουτισμένα τρόφιμα.

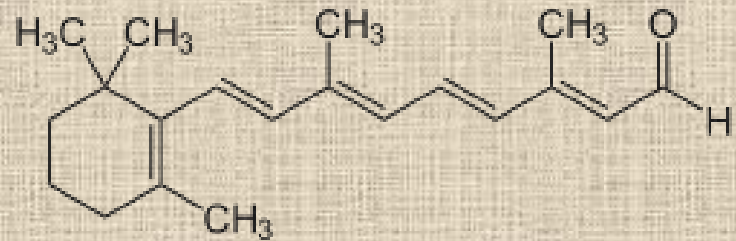
- Η φυσική βιταμίνη δεν είναι ακριβώς ίδια με τη συνθετική. Το φολικό οξύ, όταν εκτίθεται στον αέρα και τη θέρμανση γίνεται ασταθές και διασπάται.
- Αλλά μια μικρή ποσότητα της φυσικής βιταμίνης μετατρέπεται με την οξείδωση (μια φυσική διαδικασία) σε φυλλικό οξύ που είναι μια πολύ πιο σταθερή μορφή και διατηρείται μεγάλο χρονικό διάστημα.

- Τα ανθρώπινα κύτταρα δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν το φυλλικό οξύ αυτό καθ' εαυτό αλλά το μετατρέπουν (κυρίως στο συκώτι) στις φυσικές μορφές της βιταμίνης.
- Αυτός είναι ο λόγος που το φυλλικό οξύ, παρότι δεν βρίσκεται στις τροφές αποκαλείται βιταμίνη.
- Όμως καθώς ο άνθρωπος μεγαλώνει σε ηλικία, η μετατροπή του φυλλικού οξέος σε φολικό οξύ μέσα στο σώμα καθίσταται δυσκολότερη.

- Φολικό οξύ και τα συζυγή πολυ-γ-γλουταμυλικά → φυλλικό οξύ.
- Είναι ασταθές στην οξείδωση, το φως, θερμότητα, στην έκπλυση (επεξεργασία).
- Υπάρχουν αναλυτικές δυσκολίες (συνθετικό και φυσικό φυλλικό).
- Το φυλλικό οξύ είναι 85% βιοδιαθέσιμο ενώ τα φολικά στα τρόφιμα είναι 50% βιοδιαθέσιμα, το φυλλικό στα ενισχυμένα τρόφιμα είναι 1,7 φορές πιο βιοδιαθέσιμο.

- Χρησιμοποιείται η υγρή χρωματογραφία και μικροβιολογική μέθοδος (*Lactobacillus casei*) και τριενζυμική πέψη.
- Εκχύλιση, πέψη.
- Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού μετρείται με την % διαπερατότητα (εξαρτάται από τη συγκέντρωση των φυλλικών).
- Προσοχή στην οξείδωση και φωτοξείδωση (αναγωγικά μέσα).

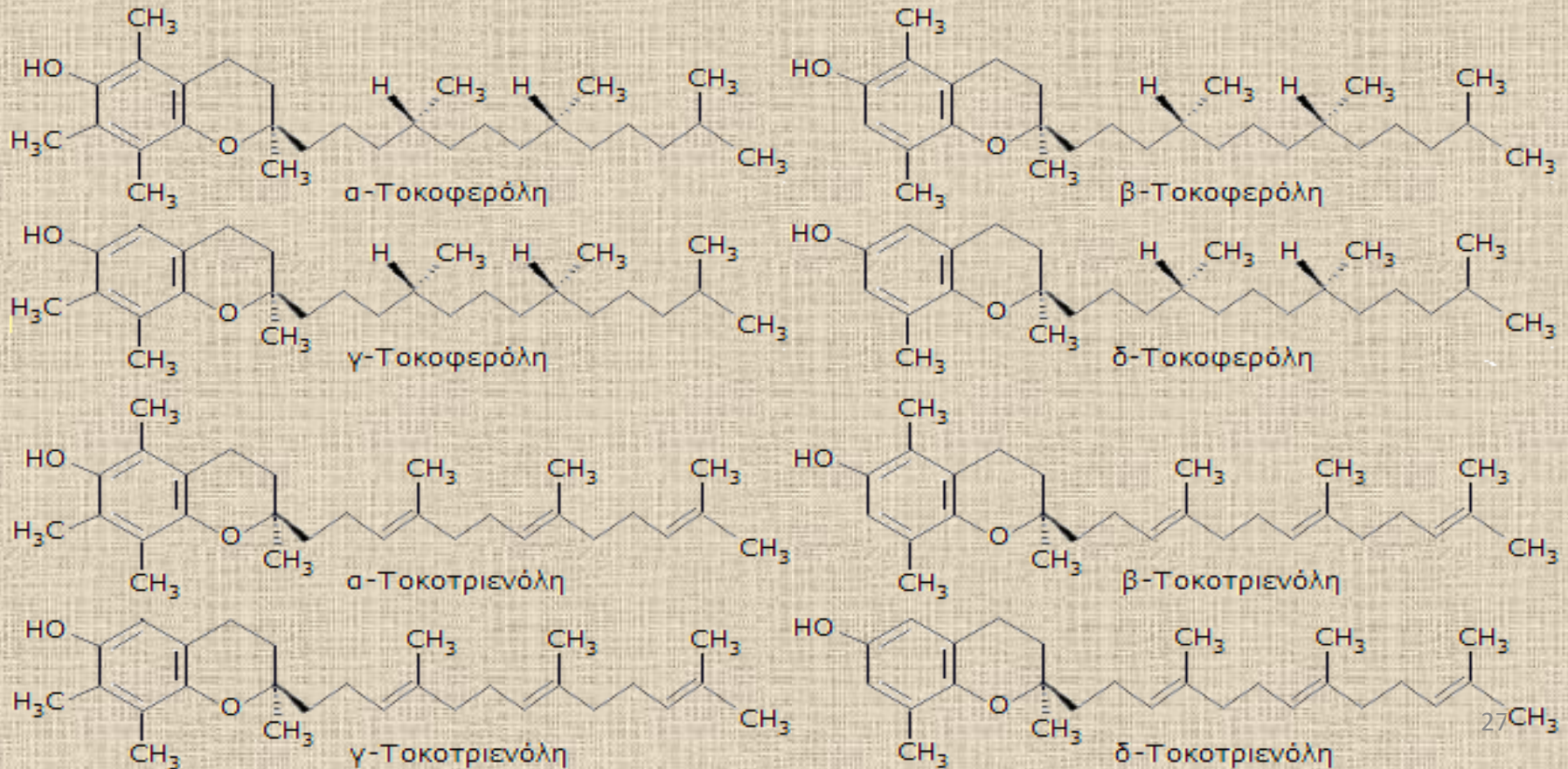
Βιταμίνη Α



- Η βιταμίνη Α είναι ευαίσθητη στη UV, τον αέρα, υψηλές θερμοκρασίες και υγρασία.
- Χρησιμοποιείται η HPLC.
- Αρχικά σαπωνοποίηση, εκχύλιση με οργανικό διαλύτη και συμπύκνωση.
- Προσοχή στην οξείδωση, η εξάτμιση του διαλύτη με άζωτο και προσθήκη δεκαεξανίου για αποφυγή της καταστροφής της.

Βιταμίνη Ε (τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες)

- Είναι παρούσα σε 8 διαφορετικές μορφές και είναι 6-hydroxychromans.
- α-, β-, γ- & δ-τοκοφερόλη (κορεσμένη πλευρική αλυσίδα τριών ισοπρενικών ομάδων).
- α-, β-, γ- & δ-τοκοτριενόλες (οι αντίστοιχες ακόρεστες μορφές).



- Σαπωνοποίηση, εκχύλιση με εξάνιο και HPLC κανονικής φάσης με ανιχνευτή φθορισμού ($E_x=290\text{nm}$, $E_m=330\text{nm}$).
- Μαργαρίνη και αλείμματα φυτικών ελαίων: διάλυση σε εξάνιο, προσθήκη άνυδρου MgSO_4 , φιλτράρισμα των εκχυλισμάτων.
- Έλαια: διάλυση σε εξάνιο και άμεση έγχυση στην HPLC.
- Είναι ευαίσθητη στην οξείδωση. Η σαπωνοποίηση (κάθετος ψυκτήρας) παρουσία πυρογαλλόλης, και προστασία από το φως.

Βιταμίνη B12 (cobalamin)

- Η κυανοκοβαλαμίνη είναι η πιο σταθερή μορφή βιταμίνης B12 και συνήθως χρησιμοποιείται στα ενισχυμένα τρόφιμα.
- Είναι πιο σταθερή σε pH 4 - 4.5 και στη θέρμανση. Οι κρυσταλλικές μορφές είναι σταθερές όταν προστατεύονται από το φως.
- Ισχυρά οξέα ή βάσεις, το δυνατό φως ή η παρουσία οξειδωτικών παραγόντων καταστρέφουν τη βιταμίνη.

- Όταν συνθετική B12 προστίθεται σε τρόφιμα ή συμπληρώματα διατροφής είναι ήδη σε ελεύθερη μορφή → Υδατική εκχύλιση σε pH ~ 4.
- Στα τρόφιμα (φυσική παρουσία) είναι συνδεδεμένη με πρωτεΐνη και πριν την ανάλυση πρέπει να ελευθερωθεί. → Μετουσίωση πρωτεϊνών με θέρμανση κατά την εκχύλιση (επίσης χρήση πεψίνης και άλλων ενζύμων – πρωτεάσες).

- Συνήθως βιοπροσδιορισμός (π.χ. *Lactobacillus delbreueckii*). Η ανάπτυξή του ανάλογη με την ποσότητα της βιταμίνης.
- Είναι χρονοβόρα, εύκολη επιμόλυνση, υψηλή ευαισθησία αλλά ο προσδιορισμός επηρεάζεται από την παρουσία άλλων συστατικών των τροφίμων.
- Προσδιορισμός της κυανοκοβαλαμίνης και της υδροξοκοβαλαμίνης σε καθαρή ουσία (ενέσιμα διαλύματα, δισκία και κάψουλες διαλυτές σε έλαιο ή νερό) γίνεται με χρήση φασματοφωτομετρικών και HPLC μεθόδων.

Βιταμίνη C

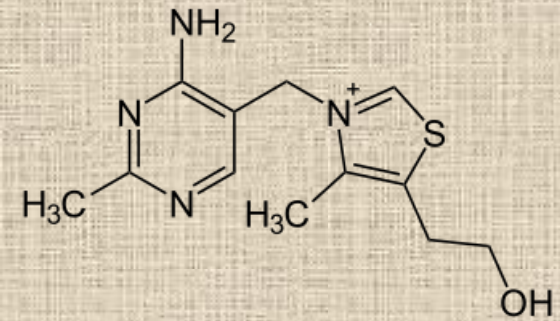
- L-ασκορβικό + L-δεϋδροασκορβικό οξύ.
- Οξειδώνεται ταχύτατα κυρίως σε υψηλό pH και την παρουσία ιόντων Fe & Cu (ίσως και χρήση χειλικού μέσου).
- Χρησιμοποιούνται και αναγωγικά μέσα (π.χ. β-μερκαπτοαιθανόλη).

Ογκομετρική Μέθοδος με 2,6- διχλωροϊνδοφαινόλη

- Το L-ασκορβικό οξύ οξειδώνεται σε L-δεϋδροασκορβικό με τη χρωστική. Στο τέλος η περίσσεια της μη ανηγμένης χρωστικής → ελαφρύ ροζ χρώμα.
- Εάν είναι παρόντα, σε μεγάλη συγκέντρωση, Fe, Cu, Sn → προσθήκη χειλικού μέσου EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid).
- Εάν το τρόφιμο είναι έντονα χρωματισμένο π.χ. παντζάρι → αλλαγή διαπερατότητας σε φωτόμετρο στα 545nm.

Θειαμίνη(B₁)

θειοχρωμική φθορισμομετρική πορεία



- Εκχύλιση, ενζυμική υδρόλυση των φωσφορικών εστέρων της θειαμίνης και χρωματογραφικός καθαρισμός.
- Μέτρηση του φθορισμού της οξειδωμένης μορφής της θειαμίνης (thiochrome) και σύγκριση με εκείνου του προτύπου διαλύματος θειαμίνης.
- Το thiochrome είναι ευαίσθητο στο φως, θερμότητα (κυρίως αλκαλικό περιβάλλον).

Ριβοφλαβίνη (B₂)

- Εκχύλιση, καθαρισμός, συμπύκνωση και μέτρηση φθορισμομετρικά.
- Ευαίσθητη στο UV (χαμηλό φωτισμό).
- Παρόλο που κατατάσσεται στις υδατοδιαλυτές βιταμίνες δεν διαλύεται εύκολα στο νερό.

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ

- Οι μέθοδοι **βιοπροσδιορισμού** είναι εξαιρετικά χρονοβόρες.
- Χρησιμοποιούνται στις περιπτώσεις που απαιτείται η βιοδιαθεσιμότητα της βιταμίνης και όταν δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί άλλη μέθοδος.
- Πλεονέκτημα: δεν απαιτείται ιδιαίτερη προετοιμασία κι έτσι αποφεύγονται οι ανεπιθύμητες μεταβολές που δημιουργούνται κατά την π.χ. εκχύλιση.
- Είναι περιορισμένες στα πειραματόζωα.

- Οι μικροβιολογικές και χημικές μέθοδοι απαιτούν εκχύλιση της βιταμίνης.
- Τα αποτελέσματα αντιστοιχούν στη συνολική περιεκτικότητα σε βιταμίνη και όχι απαραίτητα τη βιοδιαθεσιμότητά της στους ανθρώπους.
- Οι μικροβιολογικές μέθοδοι συνήθως εφαρμόζονται στις υδατοδιαλυτές βιταμίνες (κυρίως για την B_{12} και το παντοθενικό οξύ – B_5).
- Εφαρμόζονται σε μεγάλο εύρος βιολογικών υποστρωμάτων και δεν απαιτούνται μεγάλες τροποποιήσεις.

- Λόγω της σχετικής ευκολίας, της ακρίβειας, της ευαισθησίας τους χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι με χρήση **HPLC**.
- Για την A, E, D και ως μέθοδος ελέγχου ποιότητας για την C.
- Σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να γίνει ταυτόχρονη ανάλυση διαφόρων βιταμινών και των ισομερών τους.
- Υδατοδιαλυτές βιταμίνες σε συμπληρώματα διατροφής (μεγάλες σχετικά συγκεντρώσεις).

- Τις τελευταίες δεκαετίες η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας έδωσε νέα διάσταση στην ανάλυση των βιταμινών.
- Ο προσδιορισμός με MS δίνει αποτελέσματα με υψηλή ευαισθησία και επιπλέον ταυτοποίηση και χαρακτηρισμό μιας βιταμίνης.
- Μπορεί να εφαρμοστεί σε δύσκολα υποστρώματα κι επίσης μπορεί να γίνει ανάλυση με LC-MS/MS με πολλά πλεονεκτήματα και να γίνει αντικατάσταση των μεθόδων που εφαρμόζονται π.χ. φυλλικά → μικροβιολογική.