



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανασκόπηση στις αναλυτικές μεθόδους προσδιορισμού υδατοδιαλυτών και λιποδια-
λυτών βιταμινών στα τρόφιμα**

MSc Thesis

**Review of analytical methods for the determination of water soluble and fat-soluble
vitamins in food**

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/ NAME OF STUDENT

Εμμανουήλ Ρουμελιώτης
Emmanouil Roumeliotis

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/ NAME OF SUPERVISOR

Ειρήνη Στρατή
Eirini Strati

ΑΙΓΑΛΕΩ/ AIGALEO 2023



Faculty of Food Sciences

Department of Food Science and Technology

MSc THESIS

**Review of analytical methods for the determination of water soluble and fat-soluble
vitamins in food**

NAME OF STUDENT

21026

manosroum573@gmail.com

SUPERVISOR

Eirini Strati

AIGALEO 2023

Επιτροπή Αξιολόγησης Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο «Ανασκόπηση στις αναλυτικές μεθόδους προσδιορισμού υδατοδιαλυτών και λιποδιαλυτών βιταμινών στα τρόφιμα» που παρουσιάστηκε από τον Ρουμελιώτη Εμμανουήλ, υποψηφίου για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία

Στρατή Ειρήνη

Επίκουρη Καθηγήτρια

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σινάνογλου Βασιλεία

Καθηγήτρια Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Κοσμήτορας της Σχολής Επιστήμων Τροφίμων

Τσιάκα Θάλεια

Διδάσκουσα στο πλαίσιο υλοποίησης της πράξης «Απόκτηση ακαδημαϊκής διδακτικής εμπειρίας σε νέους επιστήμονες κατόχους διδακτορικού 2022-2023 στο Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής»

Δήλωση περί λογοκλοπής

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Ρουμελιώτης Εμμανουήλ



Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «Ανασκόπηση στις αναλυτικές μεθόδους προσδιορισμού των υδατοδιαλυτών και λιποδιαλυτών βιταμινών στα τρόφιμα» πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της ολοκλήρωσης των μεταπτυχιακών σπουδών μου στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ» του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής. Στο σημείο αυτό λοιπόν, αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις θερμές και ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα Καθηγήτρια της εργασίας, κα Στρατή Ειρήνη που με την ουσιαστική βοήθειά της και την πολύτιμη καθοδήγησή της, καταφέραμε να ολοκληρώσουμε με επιτυχία αυτό το όμορφο «έργο».

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη γραμματεία του τμήματος, κα Παπαύλου Ευανθία, για τη συνεχή υποστήριξη όλο αυτό το διάστημα των Μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Και τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου η οποία υπήρξε πάντα ένα ανεκτίμητο στήριγμα σε κάθε μου προσπάθεια καθώς και στη κα Καταβελάκου Βασιλική στην οποία οφείλω όλη τη διαδρομή των Μεταπτυχιακών μου Σπουδών, έως σήμερα.

Αθήνα, 17/01/2023

Στην οικογένειά μου και την Βάσω

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AA	Ασκορβικό οξύ
ACN	Ακετονιτρίλιο
AdoCbl	Αδενοσυλοκοβαλαμίνη
AOAC	Ένωση Επισήμων Αναλυτικών Χημικών
APCI	Χημικός Ιονισμός Ατμοσφαιρικής Πίεσης
BEH C ₁₈	Υβριδική Γέφυρα Αιθυλενίου
CC	Χρωματογραφία Σύγκλισης
CEC	Τριχοειδής Ηλεκτροχρωματογραφία
CLC	Τριχοειδής Υγρή Χρωματογραφία
CLIA	Ανοσοδοκιμασία Χημειοφωταύγειας
CNCBL	Κυανοκοβαλαμίνη
CPB	Ανταγωνιστική Πρωτεϊνική Δέσμευση
CSH	Υβριδική Φορτισμένη Επιφάνεια
CZE	Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδών Ζωνών
DAD/ PDA	Ανιχνευτής Δυστοξίας Διοδίων
DHA	Δεϋδροασκορβικό οξύ
DHF	Διϋδροφυλλικό
DTT	Διθειοδρεΐτόλη
EC	Ηλεκτροψεκασμός
ECD	Μέθοδος Ηλεκτροχημικής Ανίχνευσης
EKC	Ηλεκτροκινητική Χρωματογραφία
EOF	Ηλεκτροωσμωτική Ροή
ESI	Ιονισμός Ηλεκτροψεκασμού
FAD	Δινουκλεοτίδιο Φλαβίνης
FD	Μέθοδος Ανίχνευσης Φθορισμού
FID	Ανίχνευση Ιονισμού Φλόγας
FLD	Ανιχνευτής Φθορισμού
FMN	Μονονουκλεοτίδιο Φλαβίνης
HILIC	Υγρή Χρωματογραφία Υδρόφιλης Αλληλεπίδρασης
HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
ICP-MS	Επαγωγικά Συζευγμένα Πλάσμα – Φασματομετρία Μάζας
L-AA	L-Ασκορβικό οξύ
LC	Υγρή Χρωματογραφία
LC-ICP-MS	Φασματομετρία Μάζας – Υγρής Χρωματογραφίας – Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος
LC-MS	Υγρή Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας
LODs	Όρια Ανίχνευσης
LOQs	Όρια Ποσοτικοποίησης
MeCbl	Μεθυλοκοβαλαμίνη
MEKC	Μικκυλιακή Ηλεκτροκινητική Χρωματογραφία
MEEKC	Ηλεκτροκινητική Χρωματογραφία Μικρογαλακτώματος
MPA	Μεταφωσφοτικό Οξύ
MS	Φασματομετρία Μάζας
NARP	Μη Υδατική Αντίστροφη Φάση
nano-LC	Νανο – Υγρή Χρωματογραφία

NP	Κανονική Φάση
OHCl	Υδροξυκοβαλαμίνη
PA-EFSI	Έγχυση Δείγματος Ενισχυμένη Με Πίεση
PEDAS	Μονοστεατική διακρυλική πενταερυθριτόλη ως μονομερές
PFP	Πενταφθοροφαινόλιο
PL	Πυριδοξάλη
PM	Πυριδοξαμίνη
PN	Πυριδοξόλη
PLP	Φωσφορική Πυριδοξάλη
PMP	Φωσφορική Πυριδοξαμίνη
PNP	Φωσφορική Πυριδοξόλη
RDA	Ανάλυση Πλεονασμού
RIA	Ραδιοανοσοδοκιμασία
RP-HPLC	Υγρή Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης Υψηλής Απόδοσης
SC	Χολικό Νάτριο
SDC	Δεοξυ-χολικό Νάτριο
SDS	Δωδεκυλοθειικό Νάτριο
SFC	Χρωματογραφία Υπερκρίσιμου Υγρού
SIM	Παρακολούθηση Ενός Ιόντος
SLE	Υποστηριζόμενη Υγρή Εκχύλιση
SPE	Εκχύλιση Στρερεής Φάσης
TAA	Ολικό Ασκορβικό Οξύ
TCEP	Τρις (2-καρβοξυαιθυλο) Φωσφίνη
TDP	Διφωσφορική Θειαμίνη
THF	Τετραϋδροφυλλικό
TMP	Μονοφωσφορική Θειαμίνη
UHPLC	Υγρή Χρωματογραφία Εξαιρετικά Υψηλής Απόδοσης
UPCC/UPC ²	Χρωματογραφία Σύγκλισης Υπερ – Απόδοσης
UPLC HSS T ₃	Υψηλής Αντοχής Πυρίτιο Με Τριλειτουργική Αλκαλική Φάση
UV	Υπεριώδης Ακτινοβολία
2DLC	Δισδιάστατη Υγρή Χρωματογραφία
4-PA	4-Πυριδοξικό Οξύ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Δήλωση περί λογοκλοπής	- 5 -
Ευχαριστίες	- 6 -
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	- 9 -
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ	- 13 -
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ	- 14 -
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	- 15 -
ABSTRACT	- 17 -
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο. ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ	- 19 -
1.1. Γενικά	- 19 -
1.1. Υδατοδιαλυτές βιταμίνες	- 21 -
1.1.1. Βιταμίνη C	- 26 -
1.1.2. Βιταμίνη B	- 28 -
1.2. Λιποδιαλυτές βιταμίνες	- 28 -
1.2.1. Βιταμίνη A	- 29 -
1.2.2. Βιταμίνη D	- 30 -
1.2.3. Βιταμίνη E	- 30 -
1.2.4. Βιταμίνη K	- 31 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	- 32 -
2.1. Γενικά	- 32 -
2.2. Μέθοδοι ανάλυσης υδατοδιαλυτών βιταμινών	- 35 -
2.2.1. Μέθοδοι προσδιορισμού της βιταμίνης C	- 37 -
2.2.2. Νέες τάσεις στην ανάλυση της βιταμίνης C	- 41 -
2.2.2. Μέθοδοι προσδιορισμού της βιταμίνης B	- 42 -
2.2.1 . Υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC)	- 45 -
2.2.2. Υγρή Χρωματογραφία Εξαιρετικά Υψηλής Απόδοσης (UHPLC)	- 47 -
2.2.2. Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE)	- 50 -
2.3. Μέθοδοι προσδιορισμού λιποδιαλυτών βιταμινών	- 52 -
2.3.1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	- 52 -
2.3.1.2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP HPLC)	- 59 -
2.3.2. Τεχνικές νανοκλίμακας στην ανάλυση λιποδιαλυτών βιταμινών	- 63 -
2.3.2.2. Διαχωρισμός βιταμινών με τεχνικές τριχοειδούς ηλεκτροχρωματογραφίας	- 64 -

2.3.3. Χρωματογραφία Υπερκρίσιμου Ρευστού	- 66 -
2.3.4. Μικκυλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία	- 68 -
2.3.5. Ηλεκτροκινητική χρωματογραφία μικρογαλακτώματος.....	- 68 -
2.3.6. Τριχοειδής ηλεκτροχρωματογραφία	- 69 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ	- 70 -
3.1. Σύγχρονες μελέτες ανάλυσης υδατοδιαλυτών βιταμινών	- 70 -
3.1.1. Μελέτες ανάλυσης βιταμινών Β και C στα πολυβιταμινούχα προϊόντα	- 77 -
3.2. Σύγχρονες μελέτες ανάλυσης λιποδιαλυτών βιταμινών.....	- 80 -
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	- 84 -
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	- 85 -

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1.** (A) Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα του L-AA σε πρότυπο διάλυμα, σε εκχύλισμα χυμού πορτοκάλι και σε εκχύλισμα κλημεντινών. (B) Φάσματα απορρόφησης UV για L-AA σε χρωματογράφημα ($\lambda_{\max}=243\text{nm}$): (A) 100% φυσικό εκχύλισμα χυμού πορτοκαλιού (B) Πρότυπο διάλυμα L-AA (C) Φάσμα μάζας L-AA $[M-H] - (m/z)=175$ (Spinola et al., 2014)..... - 38 -
- Εικόνα 2.** Μηχανισμός συγκράτησης της HILIC (Fatima et al., 2019)..... - 47 -
- Εικόνα 3.** Χρωματογραφίες LC/MS ESI+ μονού τετραπολικού (A) χρωματογράφημα ολικού ιόντος α -τοκοφερόλη (διάλυμα 1 mg L σε βουτανόλη) το σήμα αναγνωρίστηκε θετικά στα 11,75 λεπτά (B) Φασματογράφημα μάζας για α -τοκοφερόλη (διάλυμα 1 mg L σε βουτανόλη) χρησιμοποιώντας ενέργεια κώνου 120V που εξάγεται από ένα σήμα με χρόνο κατακράτησης 11,71 λεπτά (C) α -τοκοφερόλη (χρόνος κατακράτησης 11,77 λεπτά) που προσδιορίζεται σε δείγμα πλάσματος κοτόπουλου μετά την εκχύλιση με χλωροφόρμιο και βουτανόλη (D) α -τοκοφερόλη σε επιλεγμένο ιόν λειτουργία παρακολούθησης (SIM) χρησιμοποιώντας ενέργεια κώνου 120V που εξάγεται από το σήμα με χρόνο συγκράτησης 11,82 λεπτά (E) α -οξική τοκοφερόλη σε ενέσιμο διάλυμα βιταμίνης E για κτηνιατρική χρήση χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση «αραιωμένο και βολή» (16,32 λεπτά) και (F) α -οξική τοκοφερόλη σε λειτουργία SIM χρησιμοποιώντας ενέργεια κώνου 60V που εξάγονται από το σήμα με χρόνο συγκράτησης 16,34 λεπτά (Lee et al., 2011). - 54 -
- Εικόνα 4.** Χρωματογραφήματα εκχυλίσεων ιόντων ενός τυπικού μίγματος καροτενοειδών σε στήλη HPLC C30 (a) και σε δύο στήλες C18 UHPLC (b και c). Καροτενοειδή: 1. Βιολαξανθίνη, 2. Ασταξανθίνη, 3. Ανθραξανθίνη, 4. Ζεαξανθίνη, 5. Λουτεΐνη, 6. Τουναξανθίνη, 7. Κανθαξανθίνη, 8. Λυκοπένιο, 9. Α-καροτίνη, 10. Β-καροτίνη, 11. Φυτοφλουόλιο, 12. Φυτοενθίνη, 13. Ασταξανθίνη διπαλμιτικό. Στατικές φάσεις: (a) HPLC YMC C30 (2,0×250mm, 3mm), (b) ACQUITY UPLC HSS T3 (2,1×, (c) 100mm, 1,8mm), ACQUITY UPLC HSS C18 SB (2,1×, C: 100mm, 1,8mm)..... - 61 -
- Εικόνα 5.** Διαχωρισμός του BHT, τοκοφερόλων και οξικής α -τοκοφερόλης στη μονολιθική στήλη. Τριχοειδής στήλη, 23,5mm, ενεργό μήκος, 32m, συνολικό μήκος, 100mm και με μήκος κύματος ανίχνευσης, $\lambda=200\text{nm}$ - 65 -
- Εικόνα 6.** UPC2-MS χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος που περιέχει τις τοκοφερόλες και τις τοκοτριενόλες (Gee et al., 2016)..... - 67 -
- Εικόνα 7.** Ηλεκτροφερόγραμμα μικτού προτύπου διαλύματος (α) και δισκίου βιταμίνης εμπορίου (β) (Yin et al., 2008). - 69 -
- Εικόνα 8.** Χρωματογράφημα τυπικού μίγματος έντεκα υδατοδιαλυτών βιταμινών στα 210nm που αντιπροσωπεύει τον χρωματογραφικό διαχωρισμό τους (Temova Rakuša et al., 2021)..... - 79 -
- Εικόνα 9.** Ανάλυση UPLC-MS/MS (λειτουργία RP και HILIC) των ενεργών μορφών της βιταμίνης C σε δείγματα φρούτων (Taujenis et al., 2016). - 79 -

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Κύριες χημικές ιδιότητες των υδατοδιαλυτών βιταμινών (Fatima et al., 2019).	- 21 -
Πίνακας 2. Βασικές λειτουργίες και διατροφικές διότητες των υδατοδιαλυτών βιταμινών (Yuang Zhang et al., 2018).	- 25 -
Πίνακας 3. Λιποδιαλυτές βιταμίνες (Yuang Zhang et al., 2018; Tyskiewicz et al., 2018). ..	- 31 -
Πίνακας 4. Επισκόπηση επικυρωμένων χρωματογραφικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της βιταμίνης C σε τρόφιμα (Spinola et al., 2014).	- 39 -
Πίνακας 5. Σύνοψη των μεθόδων LC για την ανάλυση των υδατοδιαλυτών βιταμινών από το 2014-2018 (με επίκεντρο τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών και των ενεργών μορφών τους) (Fatima et al., 2019).	- 49 -
Πίνακας 6. Τεχνικές προετοιμασίες δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση των μεταβολιτών της βιταμίνης D σε ανθρώπινο μητρικό γάλα ή σε γαλακτοκομικό γάλα ή προϊόντα (Tuddenham et al., 2021).	- 56 -
Πίνακας 7. Σύγχρονες μελέτες προεπεξεργασίας δειγμάτων, χρωματογραφικού διαχωρισμού και ανίχνευσης ριβοφλαβίνης σε διάφορα τρόφιμα (Zhou et al., 2021)...	- 75 -
Πίνακας 8. Υγροχρωματογραφικές μέθοδοι για ανάλυση των λιποδιαλυτών βιταμινών σε τρόφιμα	- 81 -

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι βιταμίνες είναι από τα βασικότερα θρεπτικά στοιχεία των τροφίμων λόγω της υψηλής διατροφικής τους αξίας. Με την αυξημένη ανάγκη για πρόσληψη πολυβιταμινούχων προϊόντων έχουν προκύψει ιδιαίτερες ανησυχίες στον τομέα της αναλυτικής χημείας. Οι ερευνητές έχουν καταβάλει ιδιαίτερες προσπάθειες για να βελτιώσουν την ακρίβεια, την επιλεκτικότητα, την ταχύτητα και την ευαισθησία της ανάλυσης των βιταμινών για διαφορετικές μήτρες τροφίμων. Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική ανασκόπηση των υπαρχόντων μεθοδολογιών για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των υδατοδιαλυτών και των λιποδιαλυτών βιταμινών στα τρόφιμα. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται αναφορά στις μελέτες που έχουν γίνει την τελευταία δεκαετία παρέχοντας μια επισκόπηση των προσφάτων εξελίξεων των βασικών τεχνικών ανάλυσης σε συνδυασμό με διαφορετικές τεχνικές ανίχνευσης για την ανάλυση των βιταμινών. Μεταξύ των αναλυτικών τεχνικών, οι μέθοδοι της υγρής χρωματογραφίας (HPLC) και της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (CE) είναι από τις πιο κοινές τεχνικές διαχωρισμού βιταμινών σε ποικιλία τροφίμων λόγω της υψηλής επιλεκτικότητας και της ευαισθησίας. Ωστόσο, οι μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας – φασματομετρία μάζας (LC-MS) αποτελούν τις πιο κλασικές και αξιόπιστες μεθόδους, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επαλήθευση της αξιοπιστίας και άλλων μεθόδων ανίχνευσης. Ιδιαίτερα, η ανάπτυξη της φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης (Orbitrap, QqTOF κ.λπ.) και η προηγμένη χρωματογραφική τεχνική, όπως η υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC) έχουν προωθήσει την εφαρμογή των μεθόδων φασματομετρίας μάζας για την ανίχνευση και την μελέτη των βιταμινών. Τέλος, γίνεται μια σύντομη αναφορά σχετικά με τις τρέχουσες τάσεις και τις μελλοντικές προοπτικές της ανάλυσης των βιταμινών στα τρόφιμα.

Λέξεις – Κλειδιά

Βιταμίνες, τρόφιμα, αναλυτικές μέθοδοι, χρωματογραφικός διαχωρισμός, υγρή χρωματογραφία, τριχοειδής ηλεκτροφόρηση

ABSTRACT

Vitamins are one of the most basic nutritional elements of food due to their high nutritional value. With the increased need for prevention of multivitamin products have arisen particular concerns in the field of analytical chemistry. Researchers have made special efforts to improve the accuracy, selectivity, speed and sensitivity of vitamin analysis for different food matrices. In this thesis, a literature review of existing methodologies for the analysis and determination of water-soluble and fat-soluble vitamins in food was carried out. Specifically, reference is made to the studies that have been done in the last decade providing an overview of recent developments in basic analytical techniques combined with different detection techniques for vitamin analysis. Among the analytical techniques, liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE) methods are among the most common techniques for the separation of vitamins in a variety of food due to their high selectivity and sensitivity. However, liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) methods are the most classical and reliable methods, which can be used to verify the reliability of other detection methods. In particular, the development of high-resolution mass spectrometry (Orbitrap, QqTOF, etc.) and advanced chromatographic techniques such as hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) have promoted the application of mass spectrometry methods for the detection and study of vitamins. Finally, current trends and future prospects of vitamin analysis in food are presented.

Keywords

Vitamins, food, analytical methods, chromatographic separation, liquid chromatography, capillary electrophoresis

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο. ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ

1.1. Γενικά

Τα θρεπτικά στοιχεία των τροφίμων χωρίζονται σε 6 μεγάλες κατηγορίες: πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες, βιταμίνες, ανόργανα στοιχεία και νερό.

Οι βιταμίνες είναι οργανικά μόρια που λειτουργούν ως συστατικά συνενζύμων ή ενζύμων με διάφορες χημικές αντιδράσεις οι οποίες λαμβάνουν χώρα στον ανθρώπινο οργανισμό. Ως κοινό χαρακτηριστικό των βιταμινών αποτελεί το γεγονός ότι απαιτούνται σε πολύ μικρές ποσότητες (της τάξεως του mg ή µg ανά ημέρα, micronutrients) καθώς και ότι εμπλέκονται σε βασικές λειτουργίες του οργανισμού, όπως η ανάπτυξη, η λειτουργία και ο μεταβολισμός. Επίσης, οι βιταμίνες παρέχονται στον ανθρώπινο οργανισμό, καθ' ολοκληρίαν ή μερικώς, από την τροφή που καταναλώνει. Ανάλογα με τη διαλυτότητά τους διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες και τις λιποδιαλυτές βιταμίνες. Προς ευκολία της επιστήμης των τροφίμων, οι βιταμίνες έχουν εμπειρικά ονόματα αλλά συμβολίζονται και με γράμματα του λατινικού αλφαβήτου. Στις υδατοδιαλυτές βιταμίνες περιλαμβάνονται οι βιταμίνες του συμπλέγματος Β και η βιταμίνη C, ενώ στις λιποδιαλυτές βιταμίνες περιλαμβάνονται οι Α, D, Ε και Κ βιταμίνες.

Αναλυτικότερα, οι βιταμίνες δεν είναι δομικά συστατικά των ιστών, ούτε προμηθεύουν με ενέργεια τον οργανισμό, αλλά δρουν ως συνένζυμα διαφόρων ενζυμικών συστημάτων. Είναι δηλαδή βιολογικά οργανικά σύμπλοκα, απαραίτητα στον άνθρωπο και τη φυσιολογική σωματική και ψυχική ανάπτυξή του. Οι κυριότερες λειτουργίες που επιτελούν οι βιταμίνες στον οργανισμό είναι οι εξής: 1) δρουν ως συνένζυμα, 2) είναι βιολογικά αντιοξειδωτικά, 3) αποτελούν συμπαράγοντες μείωσης οξειδωτικών αντιδράσεων του μεταβολισμού και 4) δρουν σαν ορμόνες. Ουσιαστικά, οι βιταμίνες αποτελούν τον ακρογωνιαίο λίθο για τις περισσότερες διαδικασίες του μεταβολισμού.

Πολλές βιοχημικές αντιδράσεις δεν θα μπορούσαν να διεξαχθούν χωρίς την παρουσία των βιταμινών, ενώ άλλες πάλι θα γίνονταν πολύ αργά και ακανόνιστα. Είναι αναγκαίες, λοιπόν, για την αφομοίωση των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων και των λιπών. Συντελούν στη σύνθεση των ορμονών και των ενζύμων. Ενισχύουν το αμυντικό σύστημα του οργανισμού και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του νευρικού συστήματος. Γενικότερα, οι βιταμίνες δρουν ως καταλύτες και συνδυάζονται με πρωτεΐνες δημιουργώντας

μεταβολικά ενεργά ένζυμα, ώστε να λαμβάνουν χώρα πολλές αντιδράσεις στον οργανισμό. Πλήρης ή μερική στέρηση μίας ή περισσότερων βιταμινών από τον οργανισμό, προκαλεί διάφορες παθολογικές καταστάσεις (αβιταμίνωση ή υποβιταμίνωση), που υποχωρούν ταχύτατα με την πρόσληψη των βιταμινών που λείπουν. Η ανεπάρκειά τους στη διατροφή του ανθρώπου, ελαττώνει την αντίσταση του οργανισμού και τον καθιστά ευπρόσβλητο στις μολύνσεις και τις ασθένειες. Οι βιταμίνες εμπλέκονται σε συγκεκριμένες ζωτικές λειτουργίες στο μεταβολισμό και η έλλειψη ή η περίσσεια τους μπορεί να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα υγείας. Κύριες αιτίες έλλειψης βιταμινών είναι ο τρόπος μαγειρέματος τροφίμων, το κάπνισμα, το αλκοόλ, οι κακές διατροφικές συνήθειες μαζί με αυστηρές δίαιτες αδυνατίσματος, το άγχος, η χρήση αντισυλληπτικών, τα αντιβιοτικά και η κακώς εννοούμενη χορτοφαγία. Με εξαίρεση τη βιταμίνη D, οι βιταμίνες δεν μπορούν να παραχθούν μέσα στο σώμα και θα πρέπει να λαμβάνονται από τον διαιτολόγο μέσω φαρμακευτικών προϊόντων. Επομένως, τα προϊόντα υγειονομικής περίθαλψης με βιταμίνες είναι πολύ κοινά στη σύγχρονη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων. Ορισμένες βιταμίνες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για ορισμένες ασθένειες. Για παράδειγμα, μια ανεπάρκεια λιποδιαλυτής βιταμίνης είναι χαρακτηριστική για παιδιά με κυστική ίνωση. Ως εκ τούτου, μια αξιόπιστη ανάλυση βιταμινών σε διαφορετικές μήτρες δειγμάτων κρίνεται απαραίτητη για τη βιομηχανία υγειονομικής περίθαλψης και τον έλεγχο των ασθενειών (Wang et al., 2018).

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται πολλαπλασιασμός στην κατανάλωση φαρμακευτικών βιταμινούχων σκευασμάτων με τη μορφή δισκίων ή σκόνης, πιστεύοντας ότι βελτιώνουν την υγεία. Μια καλή και ισορροπημένη διατροφή παρέχει στον ανθρώπινο οργανισμό όλες τις απαραίτητες βιταμίνες και επομένως, σπάνια αποτελεί αναγκαία η καταφυγή στην πρόσληψή τους μέσω συμπληρωμάτων διατροφής (Δρακοπούλου, 2021).

Ο ανθρώπινος οργανισμός διαχειρίζεται τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες με διαφορετικό τρόπο από τις λιποδιαλυτές. Πιο συγκεκριμένα, οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες απορροφούνται στο αίμα και με εξαίρεση τη βιταμίνη B12, δεν διατηρούνται για μεγάλες περιόδους στον οργανισμό. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητος ο ημερήσιος εφοδιασμός του οργανισμού με τις βιταμίνες αυτές μέσω της διατροφής. Η τυχόν αποθήκευσή τους οφείλεται σε σύνδεση αυτών με ένζυμα ή μεταφορικές πρωτεΐνες. Όταν η ημερήσια πρόσληψη κάποιας υδατοδιαλυτής βιταμίνης υπερκαλύπτει τις ανάγκες του οργανισμού, το πλεόνασμα απεκκρίνεται με τα ούρα. Από την άλλη πλευρά, η απορρόφηση και η μεταφορά των λιποδιαλυτών βιταμινών σχετίζεται άμεσα με την απορρόφηση και την μεταφορά των λιπιδίων. Για την απορρόφηση των λιποδιαλυτών βιταμινών απαιτείται η παρουσία χολικών αλάτων και

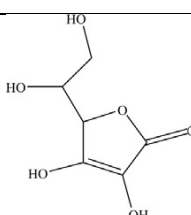
η μεταφορά τους γίνεται αρχικά από τα χυλομικρά. Σε αντίθεση με τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες, οι λιποδιαλυτές αποθηκεύονται στον οργανισμό. Βέβαια κάθε μία από αυτές αποθηκεύονται σε διαφορετικό ποσοστό.

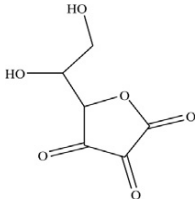
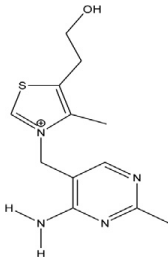
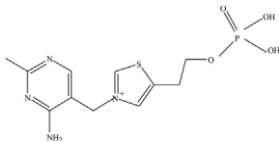
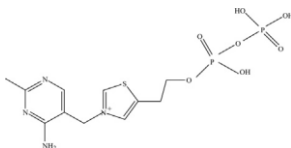
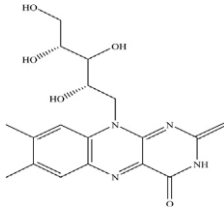
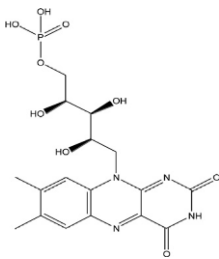
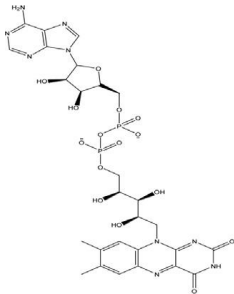
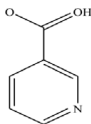
1.1. Υδατοδιαλυτές βιταμίνες

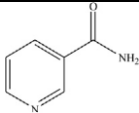
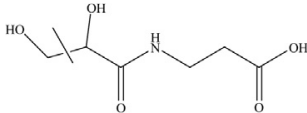
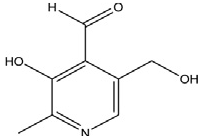
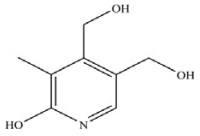
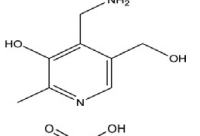
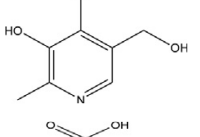
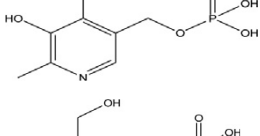
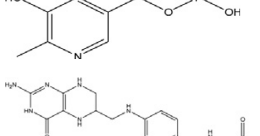

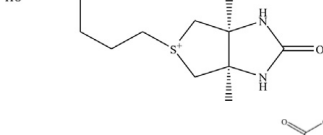
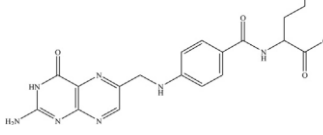
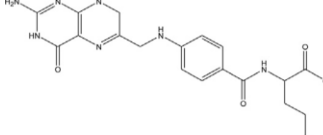
Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες περιλαμβάνουν το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) και τις βιταμίνες του συμπλέγματος B και συγκεκριμένα τη θειαμίνη (βιταμίνη B1), τη ριβοφλαβίνη (βιταμίνη B2), το νικοτινικό οξύ ή νιασίνη (βιταμίνη B3), το φολικό οξύ (βιταμίνη B9), τη πυριδοξίνη (βιταμίνη B6), τη κυανοκοβαλαμίνη (βιταμίνη B12), τη βιοτίνη (βιταμίνη B7) και το παντοθενικό οξύ (βιταμίνη B5). Η βιοτίνη αναφέρεται επίσης ως βιταμίνη B8 και παλαιότερα γνωστή ως βιταμίνη H/ συνένζυμο R.

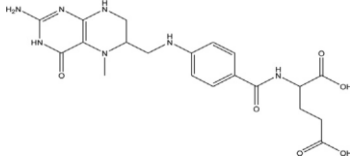
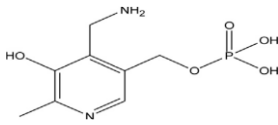
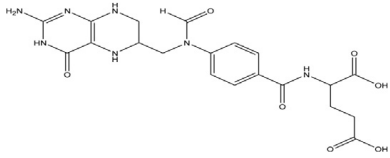
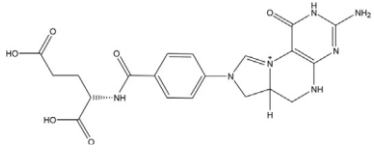
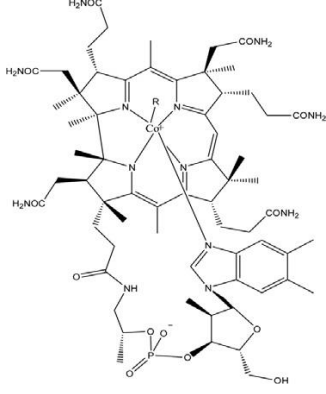
Ορισμένες βιταμίνες του συμπλέγματος B όπως η B1, B2, B6 και B9, περιλαμβάνουν πολλά βιταμερή. Ως βιταμερή θεωρούνται οι ενώσεις που αλληλομετατρέπονται ή υποκαθιστούν τη λειτουργική μορφή της βιταμίνης. Οι βιταμίνες αυτές εμφανίζουν διαφορετική χημική φύση, πολυπλοκότητα δομής, σταθερότητα και φυσικές ιδιότητες. Όλες οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες παρουσιάζουν υδρόφιλη φύση, ωστόσο, η διαλυτότητά τους στο νερό ποικίλλει σημαντικά από λιγότερη διαλυτή (ριβοφλαβίνη B2) έως εξαιρετικά διαλυτή (ασκορβικό οξύ). Ο Πίνακας 1. παραθέτει τα κύρια παράγωγα και τα βιταμερή των υδατοδιαλυτών βιταμινών (Fatima et al., 2019).

Πίνακας 1. Κύριες χημικές ιδιότητες των υδατοδιαλυτών βιταμινών (Fatima et al., 2019).

Όνομα	Παράγωγα/ Βιταμερή	Δομή	Μοριακό βάρος (g/ mol)	Συ- ντελε- στής κατα- νομής (log P)
Βιταμίνη C	Ασκορβικό (AA)	οξύ 	176.12	-1.88

	Δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA)		174.108	-1.0
Θειαμίνη (B1)	Θειαμίνη		265.355	1
	Μονοφωσφορική θειαμίνη (TMP)		343.32	-5.70
	Πυροφωσφορική θειαμίνη (διφωσφορική θειαμίνη, TDP)		425.3	-5.80
Ριβοφλαβίνη (B2)	Ριβοφλαβίνη		376.37	-1.46
	Μονονουκλεοτίδιο φλαβίνης (FMN, ριβοφλαβίνη-5'-φωσφορική)		456.348	-2.6
	Δινουκλεοτίδιο φλαβίνης αδενίνης (FAD)		785.557	-5
Νιασίνη (B3)	Νικοτινικό οξύ		123.111	0.4

	Νιασιναμίδη		122.27	-0.4
Παντοθενικό οξύ (B5)			219.237	-1.1
Πυριδοξίνη (B6)	Πυριδοξάλη (PL)		167.164	0
	Πυριδοξίνη (πυριδοξόλη, PN)		169.18	-0.8
	Πυριδοξαμίνη (PM)		168.197	-1
	4-πυριδοξικό οξύ (4-PA)		183.167	0.1
	Φωσφορική πυριδοξάλη (PLP)		247.143	-1.1
	Φωσφορική πυριδοξίνη (PNP)		249.159	-1.9
	Φωσφορική πυριδοξαμίνη (PMP)		248.175	-4.4
Βιοτίνη (B7)			244.309	0.3
Βιταμίνη B9	Φολικό οξύ (Pte Glu)		441.404	-1.1
	Τετραϋδροφυλικό (THF, H4folate)		445.436	-0.6

	Διϋδροφολικό οξύ (DHF, H2FA)		443.42	-0.9
	5-methyl-THF (5- CH3-H4folate)		459.463	-0.5
	10-formyl-THF (10-HCO-H4fo- late)		473.446	-1.2
	5,10 methenyl- THF (5,10- CH+- H4folate)		456.439	-1.7
Κοβαλαμίνες (B12)	Μεθυλοκοβαλα- μίνη (MeCbl) Αδενοσυλοκοβαλα- μίνη (AdoCbl) Υδροξυκοβαλαμίνη (OHCbl) Κυανοκοβαλαμίνη (CNCbl)		1355.388	1.897
		R = CN (CNCbl), OH (OHCbl), CH3 (MeCbl), -C12H10N5O3 (AdoCbl)		

Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες είναι ευρέως γνωστές για τον ιδιαίτερο ρόλο τους στον μεταβολισμό ενέργειας, καθώς και στη διατήρηση υγιών μυών, δέρματος, μαλλιών και ήπατος. (Πίνακας 2). Δρουν ως πρόδρομοι συνενζύμων και ενζυμικών συμπαραγόντων σε διάφορες μεταβολικές αντιδράσεις που συμβαίνουν στον οργανισμό, όπως λιπίδια, υδατάνθρακες και μεταβολισμό πρωτεϊνών (Fatima et al., 2019). Η ανεπάρκεια των βιταμινών αυτών στο ανθρώπινο σώμα μπορεί να προκαλέσει διάφορα μεταβολικά κι άλλα προβλήματα υγείας, όπως μπέρι-μπέρι, αναιμία, νευρολογικές παθήσεις, στοματικές βλάβες και πελλάγρα.

Πιο συγκεκριμένα, η βιταμίνη C παίζει ευεργετικό ρόλο σε ορισμένες επιδράσεις που προάγουν την υγεία, όπως η βιοσύνθεση κολλαγόνου, καρνιτίνης και ορμονών, η ανοσολογική απόκριση, η απορρόφηση σιδήρου και η ανεπαρκής πρόσληψή της μπορεί να προκαλέσει τη θανατηφόρο νόσο του σκορβούτου. Ορισμένες υδατοδιαλυτές βιταμίνες, επίσης, παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση, ειδικά το ασκορβικό οξύ, είναι ένα πολύ γνωστό πρόσθετο των τροφίμων λόγω της ιδιότητας αυτής. Στον Πίνακα 1.2 που ακολουθεί περιγράφονται βασικές λειτουργίες και διατροφικές πηγές των υδατοδιαλυτών βιταμινών (Yuan Zhang et al., 2018). Εκτός από τη βιταμίνη B12, η αποθήκευση και η σύνθεση άλλων υδατοδιαλυτών βιταμινών δεν είναι δυνατή από τον ανθρώπινο οργανισμό, επομένως η συνεχής ημερήσια πρόσληψή τους είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της καλής υγείας (Fatima et al., 2019). Επιπλέον γνωρίζουμε ότι οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες απορροφώνται απ' ευθείας στο αίμα σε υψηλά ποσοστά. Αξίζει επομένως να σημειωθεί ότι δεν εγκυμονεί κίνδυνος για τοξικότητα από την υπερβολική πρόσληψη των συγκεκριμένων βιταμινών διότι πλεονάζουσες ποσότητες απομακρύνονται μέσω των ούρων. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι καταστρέφονται με το μαγείρεμα, την αποθήκευση (κονσερβοποίηση, κατάψυξη) και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στη θερμότητα και στο φως (κυρίως η βιταμίνη C).

Πίνακας 2. Βασικές λειτουργίες και διατροφικές διότιες των υδατοδιαλυτών βιταμινών (Yuang Zhang et al., 2018).

Βιταμίνη	Λειτουργία	Διατροφικές Πηγές
Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C)	Έχει αντιοξειδωτική δράση και αποτελεί μέρος ενός ενζύμου που απαιτείται για τον μεταβολισμό των πρωτεϊνών. Επίσης βοηθά στην απορρόφηση του σιδήρου και είναι σημαντικό για την ομαλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος	Βρίσκεται σε λαχανικά και φρούτα, ιδιαίτερα: ακτινίδια, μάνγκο, παπάγια, μαρούλι, πατάτες, ντομάτες, πιπεριές, φράουλες, πεπόνι κλπ.
Θειαμίνη (Βιταμίνη B1)	Αποτελεί μέρος ενός ενζύμου που απαιτείται για τον μεταβολισμό της ενέργειας και είναι σημαντικό για τη λειτουργία του νευρικού συστήματος	Βρίσκεται σε μέτριες ποσότητες σε όλα τα θρεπτικά τρόφιμα, όπως ξηροί καρποί, σπόροι, όσπρια, δημητριακά ολικής άλεσης και ψωμιά, κρέας χοιρινό.

Ριβοφλαβίνη (Βιταμίνη B2)	Αποτελεί μέρος ενός ενζύμου που απαιτείται για τον μεταβολισμό της ενέργειας. Είναι επίσης σημαντικό για την υγεία του δέρματος και τη φυσιολογική όραση	Εμπλουτισμένα δημητριακά ολικής άλεσης και ψωμιά, πράσινα φυλλώδη λαχανικά, γαλακτοκομικά προϊόντα
Νικοτινικό οξύ (Βιταμίνη B3)	Αποτελεί μέρος ενός ενζύμου που απαιτείται για τον μεταβολισμό της ενέργειας. Είναι επίσης σημαντικό για την υγεία του δέρματος και την ομαλή λειτουργία του νευρικού και πεπτικού συστήματος	Φυστικοβούτυρο, λαχανικά (ιδιαίτερα, πράσινα φυλλώδη λαχανικά, σπαράγγια,μανιτάρια), εμπλουτισμένα ή ολικής άλεσης δημητριακά και ψωμιά, πουλερικά και κρέας
Παντοθενικό οξύ (Βιταμίνη B5)	Αποτελεί μέρος ενός ενζύμου που απαιτείται για τον ενεργειακό μεταβολισμό	Είναι ευρέως διαδεδομένο στα τρόφιμα
Πυριδοξίνη (Βιταμίνη B6)	Αποτελεί ενός ενζύμου που απαιτείται για τον μεταβολισμό πρωτεϊνών. Βοηθάει επίσης στην παραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων	Φρούτα, λαχανικά, πουλερικά, ψάρια και κρέας
Φολικό οξύ (Βιταμίνη B9)	Αποτελεί μέρος ενός ενζύμου που απαιτείται για τη δημιουργία νέων κυττάρων και DNA	Συκώτι, χυμός πορτοκαλιού, σπόροι, όσπρια, πράσινα φύλλα
Κοβαλαμίνη (Βιταμίνη B12)	Αποτελεί μέρος ενός ενζύμου που απαιτείται για τη δημιουργία νέων κυττάρων και είναι σημαντικό για την ομαλή λειτουργία του νευρικού συστήματος	Γάλα, γαλακτοκομικά προϊόντα, αυγά, θαλασσινά, ψάρια, πουλερικά, κρέας. Δεν υπάρχει σε φυτικές τροφές
Βιοτίνη (Βιταμίνη B7)	Αποτελεί μέρος οποιουδήποτε ενζύμου που απαιτείται για τον μεταβολισμό της ενέργειας	Είναι ευρέως διαδεδομένο στα τρόφιμα και μπορεί να παραχθεί από βακτήρια στον εντερικό σωλήνα

1.1.1. Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C ή το ασκορβικό οξύ είναι μια από τις πιο σημαντικές βιταμίνες για τον ανθρώπινο οργανισμό, επομένως αξιόπιστες πληροφορίες σχετικά με την περιεκτικότητά της στα τρόφιμα αποτελεί ιδιαίτερη ανησυχία τόσο για τους καταναλωτές όσο και για τους φορείς ποιοτικού ελέγχου. Ωστόσο, η ετερογένεια των τροφίμων και η πιθανή αποικοδόμηση της βιταμίνης κατά την ανάλυσή της δημιουργούν τεράστιες τροποποιήσεις (Spinola et al., 2014).

Η βιταμίνη C αναφέρεται σε όλες τις ενώσεις που εμφανίζουν ισοδύναμη βιολογική δράση με το L-ασκορβικό οξύ (L-AA), συμπεριλαμβανομένων των προϊόντων οξειδωσής του (δεϋδροασκορβικό οξύ, DHAA), των ισομερών (ισοασκορβικό οξύ, IAA), των εστέρων (παλμιτικός ασκορβυλεστέρας) και των συνθετικών μορφών (6-δεοξυ-L-AA, 2-φωσφορικό-L-AA). Είναι μια από τις πιο σημαντικές υδατοδιαλυτές βιταμίνες για την ανθρώπινη υγεία, γνωστή για την υψηλή αντιοξειδωτική της δράση. Συμμετέχει σε πολλές βιοχημικές λειτουργίες, όπως η απορρόφηση του σιδήρου, η σύνθεση κολλαγόνου και ορμονών (ενζυμικός συμπαράγοντας) και η εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών που προκύπτουν από τον κυτταρικό μεταβολισμό (αντιοξειδωτικό). Αποτρέπει την εμφάνιση της γήρανσης, τον σχηματισμό καταρράκτη, την αρτηριοσκλήρωση, τον καρκίνο και τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Εφαρμόζεται επίσης από τη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετο, αποτρέποντας την οξείδωση των προϊόντων διατροφής (Spinola et al., 2014).

Το L-ασκορβικό οξύ υπάρχει φυσικά στα περισσότερα φρούτα και λαχανικά, αλλά ο ανθρώπινος οργανισμός δεν είναι σε θέση να συνθέσει μόνος του. Η Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη (ΣΗΠ) είναι 75 και 90 mg/ημέρα για ενήλικες γυναίκες και άνδρες, αντίστοιχα. Το L-AA οξειδώνεται γρήγορα σε DHAA και οξειδωσή του μπορεί να προκληθεί από έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες και pH, φως, παρουσία οξυγόνου ή μετάλλων (Fe^{3+} , Ag^{+} , Cu^{2+}) και ενζυμική δράση. Το DHAA παρουσιάζει ισοδύναμη βιολογική δραστηριότητα με το L-AA, επομένως είναι σημαντικό να μετρηθούν και τα δύο μόρια για να γνωρίζουμε τη συνολική περιεκτικότητα σε ασκορβικό οξύ (TAA) ή τη συνολική περιεκτικότητα σε βιταμίνη C στα τρόφιμα. Η ισορροπία μεταξύ L-AA και DHAA εξαρτάται από τις συνθήκες πριν από τη συγκομιδή του δείγματος (προέλευση, πρακτικές καλλιέργεια, στάδιο ωρίμανσης) και τις συνθήκες μετά τη συγκομιδή (χειρισμός και αποθήκευση δείγματος). Το DHAA αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 10% του συνολικού ασκορβικού οξέος στα φρέσκα κηπευτικά προϊόντα, αλλά η περιεκτικότητά του τείνει να αυξάνεται κατά την

αποθήκευση. Ο κύριος στόχος μιας αναλυτικής μεθόδου είναι να μετρήσει το πραγματικό περιεχόμενο του δείγματος χωρίς να μετατοπίσει τεχνητά την ισορροπία των δύο μορίων. Επομένως, πρέπει να δίνεται προσοχή καθ' όλη τη διάρκεια της εκχύλισης και της ανάλυσης για να αποτραπεί η αποδόμηση και η απώλεια του L-ασκορβικού οξέος. Η μη αναστρέψιμη υδρόλυση του δεϋδροασκορβικού οξέος παράγει το βιολογικά ανενεργό 2,3-δικετο-I-γουλονικό οξύ (DKGA), που ακολουθείται από την αποικοδόμησή του σε άλλα παραπροϊόντα, συμπεριλαμβανομένου του οξαλικού οξέος, του I-θρεονικού οξέος, του διοξειδίου του άνθρακα, του I-ξυλονικού οξέος και I-ξυλόζη. Ορισμένοι αναγωγικοί παράγοντες μπορούν να μετατρέψουν το DHAA πίσω σε L-AA *in vivo* (αφυδρογονάση γλουταθειόνης) και *in vitro* συστήματα (ομοκυστίνη, dl-1,4-διθειοθρεϊτόλη, DTT, διμερκαπτοπροπανόλη, BAL και τρις-(2- καρβοξυαιθυλο)φωσφίνη, TCEP). Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη τη πιθανή αποικοδόμηση του L-AA ανάλογα με τις συνθήκες αποθήκευσης, προετοιμασίας δειγμάτων και εκχύλισης, είναι σημαντικό να αναπτυχθούν προσεκτικά και να επικυρωθούν οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της βιταμίνης C σε δείγματα τροφίμων, ώστε τα αποτελέσματα που λαμβάνονται να είναι αξιόπιστα (Spinola et al., 2014).

1.1.2. Βιταμίνη B

Η βιταμίνη B είναι ένα συνένζυμο που καταλύει τη μετατροπή των υδατανθράκων σε ενέργεια και τη βιοσύνθεση του DNA και των λιπαρών οξέων στον οργανισμό. Η έλλειψη πρόσληψης βιταμίνης B μπορεί να προκαλέσει ασθένεια ανεπάρκειας, οπότε η πρόσληψη βιταμίνης B είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της υγείας. Το σύμπλεγμα βιταμινών B είναι υδατοδιαλυτό και περιλαμβάνει οκτώ βιταμίνες, τη θειαμίνη (B1), ριβοφλαβίνη (B2), πυριδοξίνη (B6), κοβαλαμίνη (B12), νιασίνη (B3, PP και νικοτινικό οξύ), παντοθενικό οξύ (B5), φολικό οξύ (B9) και βιοτίνη (B7). Το σύμπλεγμα B υπάρχει σε διάφορες δομές στους οργανισμούς και τα τρόφιμα.

1.2. Λιποδιαλυτές βιταμίνες

Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια βασικών μικροθρεπτικών συστατικών με ποικιλία κρίσιμων λειτουργιών για τον ανθρώπινο οργανισμό. Σε σύγκριση με τα μακροθρεπτικά συστατικά, η φυσική τους κατανομή είναι πλέον πιο γνωστή λόγω της σημαντικής αναλυτικής πολυπλοκότητας (Fanali et al., 2017). Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες

ταξινομούνται στις ομάδες A, D, E και K, καθεμία από τις οποίες περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό ομολόγων (βιταμερών) και μεταβολιτών, με διαφορετική βιοδιαθεσιμότητα, βιολογική δραστηριότητα και/ή φυσιολογικό ρόλο. Πολλές λιποδιαλυτές βιταμίνες ταξιδεύουν στο σώμα με την συνοδεία πρωτεϊνών, οι οποίες λειτουργούν ως μεταφορείς. Λιποδιαλυτές ονομάζονται οι βιταμίνες που διασπώνται στο λίπος, επομένως τα λιπαρά τρόφιμα και τα έλαια αποτελούν κύριες αποθήκες αυτών των βιταμινών. Σε αντίθεση με τις υδατοδιαλυτές, ο οργανισμός αποθηκεύει την περίσσεια και απελευθερώνει σταδιακά τις απαραίτητες ποσότητες για να καλυφθούν οι εκάστοτε ανάγκες. Ακριβώς επειδή αποθηκεύονται για μεγάλες χρονικές περιόδους, μπορούν εύκολα να εμφανιστούν τοξικά επίπεδα. Ο Πίνακας 3 παραθέτει βασικές λειτουργίες και πηγές των λιποδιαλυτών βιταμινών (Yuan Zhang et al., 2018; Tyskiewicz et al., 2018).

1.2.1. Βιταμίνη A

Η βιταμίνη A είναι ένας γενικός όρος που περιλαμβάνει δύο κατηγορίες ενώσεων, τα ρετινοειδή (ρετινόλη, ρετινάλη, ρετινοϊκό οξύ, εστέρες ρετινυλίου), οι οποίες βρίσκονται σε τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης και τα καροτενοειδή προβιταμίνη A που υπάρχουν στα φρούτα και λαχανικά. Κατά συνέπεια, ο αριθμός και η ποικιλία των βιταμερών της βιταμίνης A που απαντώνται στα τρόφιμα, μπορεί να είναι αρκετά υψηλά. Έλλειψη αυθεντικών προτύπων και χημικής ετερογένειας αποτελούν τις κύριες δυσκολίες στον εντοπισμό, τον διαχωρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων αυτών, ιδιαίτερα εστέρες ρετινυλίου. Για το λόγο αυτό, η βιβλιογραφία επί του θέματος είναι περιορισμένη, ενώ αρκετές είναι οι μέθοδοι που αφορούν τον προσδιορισμό της συνολικής βιταμίνης A μέσω της υδρόλυσης όλων των μορφών. Τα πρακτικά πλεονεκτήματα που προκύπτουν από την ανάλυση της ολικής βιταμίνης A αφορούν την απλοποίηση του χρωματογραφικού διαχωρισμού, την αυξημένη ευαισθησία (ολόκληρο το σήμα συγκεντρώνεται μόνο σε ένα ομόλογο) και τέλος, την μείωση του κόστους ανάλυσης (μόνο ένα αυθεντικό πρότυπο είναι απαραίτητο). Από την άλλη πλευρά, το βασικό μειονέκτημα μιας τέτοιας προσέγγισης είναι το γεγονός ότι οι πληροφορίες σχετικά με τη φυσική κατανομή των εστέρων ρετινυλίου χάνονται (Fanali et al., 2017).

1.2.2. Βιταμίνη D

Η βιταμίνη D υπάρχει φυσικά σε πολύ λίγα τρόφιμα, όπως τα ψάρια αλμυρού νερού (σολομός, σαρδέλα, τόνος), αυγά, συκώτι και γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι πιο κοινές μορφές είναι η εργοκαλσιφερόλη (βιταμίνη D2) και η χοληκαλσιφερόλη (βιταμίνη D3), αλλά παράγεται επίσης και ενδογενώς όταν οι υπεριώδεις ακτίνες από το ηλιακό φως πέφτουν στο δέρμα και ενεργοποιούν τη σύνθεση της 7-δεϋδροχοληστερόλης. Επιπλέον, η βιταμίνη D2 είναι η λιγότερη κοινή μορφή της βιταμίνης D και έχει δυνητικά χαμηλότερη βιοδιαθεσιμότητα από τη βιταμίνη D3. Βασικές λειτουργίες της βιταμίνης D είναι η απορρόφηση του ασβεστίου, η ρύθμιση στην ανάπτυξη των οστών και η συμβολή της στη λειτουργία του ανοσοποιητικού (Fanali et al., 2017).

Λόγω της φυσικής χαμηλής αφθονίας των τροφίμων που περιέχουν βιταμίνη D, συχνά εμπλουτίζεται σε τρόφιμα όπως τα δημητριακά και το γάλα. Εκτός από τα συμπληρώματα, η διαιτητική πρόσληψη της βιταμίνης D συμβάλλει ελάχιστα στα επίπεδα της βιταμίνης. Η κύρια φυσική πηγή βιταμίνης D είναι η μετατροπή της στο δέρμα από το στερεοειδές 7-δεϋδροχοληστερόλη με το φως του ήλιου. Κατά προσέγγιση το 90% της βιταμίνης D λαμβάνεται μέσω της μετατροπής της 7-δεϋδροχοληστερόλης, που βρίσκεται στα επιδερμικά κύτταρα του δέρματος, σε προβιταμίνη D, η οποία στη συνέχεια ισομερίζεται σε βιταμίνη D3. Αυτό συμβαίνει με την έκθεση του δέρματος σε ακτινοβολία UV σε μήκος κύματος 290-315 nm. Και οι δύο βιταμίνες D2 και D3 είναι μεταβολικά ανενεργές εντός του σώματος και απαιτούν πολλά στάδια υδροξυλίωσης πριν μπορέσουν να ασκήσουν τη λειτουργία τους (Tuddenham et al., 2021). Συνολικά, μέχρι σήμερα, περισσότεροι από 50 φυσικοί μεταβολίτες της βιταμίνης D είναι γνωστοί και ορισμένοι από αυτούς μπορούν να παρεμβαίνουν σε αναλυτικές μετρήσεις με άλλους μεταβολίτες ενδιαφέροντος (Kattner et al., 2016).

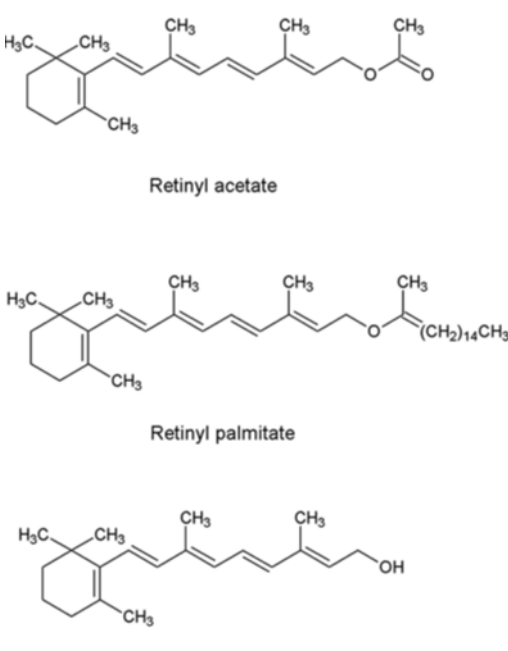
1.2.3. Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E αποτελείται από τις τοκοχρωμανόλες, όλες φυτικής προέλευσης: τέσσερις τοκοφερόλες (Ts), που έχουν μια κορεσμένη ισοπρενοειδή πλευρική αλυσίδα και τέσσερις τοκοτριενόλες (T3s), με πλευρική αλυσίδα ανάλογη με τις τοκοφερόλες αλλά που περιέχει τρεις *trans*-διπλούς δεσμούς. Οι τοκοφερόλες και οι τοκοτριενόλες ορίζονται ως α-, β-, γ- και δ- σύμφωνα με τον αριθμό και τη θέση των μεθυλικών υποκαταστατών. Δυσκολίες που εμποδίζουν την ειδογένεση των ομόλογων της βιταμίνης E αφορούσαν κυρίως τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των β- και γ- ισομερών, που έχουν προσδιοριστεί παγκοσμίως.

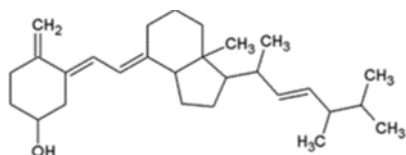
1.2.4. Βιταμίνη Κ

Η βιταμίνη Κ αντιπροσωπεύεται από δύο οικογένειες με έναν κοινό πυρήνα ναφθοκινόνης και μια διαφορετική πλευρική αλυσίδα: την βιταμίνη Κ1 ή φυλλοκινόνη (Κ1), η οποία έχει αλυσίδα φυτιλίου, από φυτικά τρόφιμα και την βιταμίνη Κ2, συμπεριλαμβανομένης της ομάδας των μετακινονών (MK-n, με n ο αριθμός των μονάδων ακόρεστου ισοπρενίου που κυμαίνεται από 4 έως 13), από βακτηριακές πηγές. Τα σημαντικότερα εμπόδια που, μέχρι στιγμής, εμπόδιζαν την ανάλυση των MK-n σε τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης ήταν οι πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, η συνεκχύλιση λιπιδίων παρεμβάλλοντας στον προσδιορισμό της μετακινόνης-4 (MK-4) και την περιορισμένη διαθεσιμότητα ή/ και το υψηλό κόστος των αυθεντικών προτύπων τους (Fanali et al., 2017).

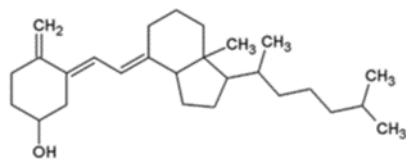
Πίνακας 3. Λιποδιαλυτές βιταμίνες (Yuang Zhang et al., 2018; Tyskiewicz et al., 2018).

Βιταμίνη	Δομή	Λειτουργία	Διατροφικές Πηγές
Βιταμίνη Α	 <p>Retinyl acetate</p> <p>Retinyl palmitate</p> <p>Retinol</p>	<p>Υγιείς βλεννογόνους μεμβράνες, υγιή δέρμα, όραση, δόντια και ανάπτυξη των οστών, ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα</p>	<p>Από ζωϊκές πηγές (ρετινόλη): συκώτι, αυγά, μαργαρίνη, βούτυρο, κρέμα γάλακτος, τυρί, εμπλουτισμένο γάλα</p> <p>Από φυτικές πηγές (β-καροτίνη): λαχανικά, όπως κολοκύθα, γλυκοπατάτες, καρότα, φρούτα, όπως πεπόνι και βερίκοκα, πράσινα φυλλώδη λαχανικά</p>

Βιταμίνη
D



Ergocalciferol (D₂)

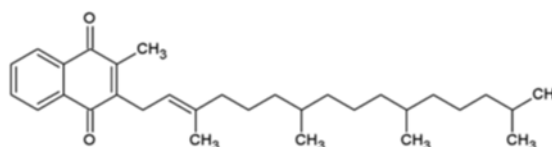


Cholecalciferol (D₃)

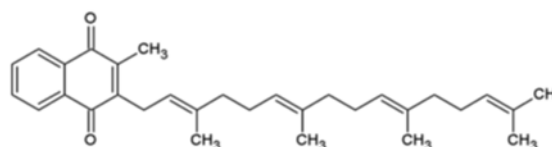
Απαιτείται για τη σωστή απορρόφηση του ασβεστίου

Εμπλουτισμένη μαργαρίνη και γάλα, λιπαρά ψάρια, συκώτι, κρόκοι αυγών. Το δέρμα μπορεί επίσης να παράγει βιταμίνη D όταν εκτίθεται στο ηλιακό φως

Βιταμίνη
K



Menaquinone (K₁)



Phylloquinone (K₂ MK₄)

Απαιτείται για τη σωστή πήξη του αίματος

Λαχανικά, όπως το λάχανο και τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά, και το γάλα. Παράγεται επίσης στον εντερικό σωλήνα από τα βακτήρια

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Γενικά

Η αναλυτική χημεία περιγράφεται συχνά ως ο κλάδος της χημείας που ασχολείται με τον χαρακτηρισμό της σύνθεσης ενός δείγματος. Πιο αναλυτικά, ο κλάδος αυτός εστιάζει στην αναγνώριση των συστατικών σε ένα μείγμα ή/ και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Ωστόσο, ο ορισμός αυτός δεν μπορεί να θεωρηθεί πλήρης, αφού όλοι οι ερευνητές πραγματοποιούν ποσοτικές ή ποιοτικές μετρήσεις στον τομέα της αναλυτικής χημείας. Επομένως, ο πραγματικός στόχος δεν είναι η απλή εκτέλεση μιας τεχνικής ανάλυσης, αλλά η ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθόδων κατάλληλων για συγκεκριμένες εφαρμογές, η βελτίωση των υφιστάμενων μεθόδων ή η επέκταση των ήδη καθιερωμένων μεθόδων σε διαφορετικά είδη δειγμάτων. Για τους λόγους αυτούς, η αναλυτική χημεία χρησιμοποιείται σε όλα σχεδόν τα

επιστημονικά πεδία, που κυμαίνονται από τη μηχανική έως την ιατρική, τη φυσική έως τη γεωλογία και ούτω καθεξής. Ιδιαίτερα όμως σημαντικός είναι ο ρόλος της αναλυτικής χημείας στον κλάδο της επιστήμης των τροφίμων. Επιπλέον, ορίζεται ως μια «κεντρική επιστήμη» ικανή να χρησιμεύει ως γέφυρα μεταξύ της βιομηχανίας και της ακαδημαϊκής έρευνας.

Η αναλυτική χημεία έχει θεμελιώδη ρόλο στην επιστήμη των τροφίμων, επειδή τα τρόφιμα αντιπροσωπεύουν περίπλοκα και ετερογενή μείγματα πολλών βιοχημικών συστατικών. Για τον λόγο αυτό, η ανάπτυξη κατάλληλων αναλυτικών τεχνικών έχει καθοριστικό ρόλο για τον καθορισμό των χημικών, φυσικών και βιολογικών ιδιοτήτων των προϊόντων διατροφής και για τις αλλαγές που μπορούν να υποστούν κατά την επεξεργασία και την αποθήκευσή τους. Όπως είναι γνωστό, οι αναλυτικές μεθοδολογίες έχουν εξελιχθεί σημαντικά με την πάροδο των χρόνων, από βασικές χημικές αναλύσεις έως προηγμένες ενόργανες τεχνικές. Η σημαντική πρόοδος στην ανάλυση των τροφίμων σχετίζεται σημαντικά με την τεχνολογική ανάπτυξη, η οποία οδήγησε στον σχεδιασμό εξαιρετικά εξελιγμένων αναλυτικών οργάνων και λογισμικών, αλλά και στην προσπάθεια κάλυψης των αυξημένων αναγκών των καταναλωτών. Για παράδειγμα, διάφορες αναλυτικές προσεγγίσεις εφαρμόζονται ευρέως στην μελέτη τροφίμων, με στόχο την αξιολόγηση της θρεπτικής αξίας, της ποιότητας, της γνησιμότητας, της ασφάλειας και της σταθερότητας κάθε προϊόντος. Σήμερα, οι συνδυασμένες αναλυτικές τεχνικές χρησιμοποιούνται εύκολα για τη μελέτη της χημικής σύνθεσης σε μοριακό επίπεδο πολλών τροφίμων, λαμβάνοντας έτσι πληροφορίες σχετικά με ολόκληρο το προφίλ των συστατικών στα τρόφιμα. Οι προσεγγίσεις αυτές παρέχουν ένα χρήσιμο δακτυλικό αποτύπωμα για κάθε μήτρα τροφίμων και αντιπροσωπεύουν πολύτιμα εργαλεία για την αξιολόγηση της γνησιότητας και της ποιότητας των τροφίμων. Τέλος, η αναλυτική χημεία συμβάλλει σημαντικά και ουσιαστικά στην παροχή πληροφοριών σχετικά με τα τρόφιμα και στην εφαρμογή νόμων και κανονισμών στον τομέα των τροφίμων.

Η ανάλυση των τροφίμων είναι πρωταρχικής σημασίας για την αξιολόγηση τόσο της διατροφικής ποιότητας όσο και της ασφάλειας των προϊόντων. Έχουν καθοριστεί νομικά όρια που καθορίζουν αποδεκτά επίπεδα για μεμονωμένα χημικά πρόσθετα, υπολείμματα και ρύπους σε προϊόντα. Η τροφοδοσία είναι πρωταρχικός στόχος για την ανάλυση, καθώς βρίσκεται στην αρχή της τροφικής αλυσίδας και η κακή ποιότητα των α' υλών μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την παραγωγή των τροφίμων. Όλοι οι ενδιαφερόμενοι που εμπλέκονται στην αλυσίδα των τροφίμων πρέπει να είναι σε θέση να αξιολογήσουν την ποιότητα και την ασφάλεια των προϊόντων. Επομένως, είναι επιτακτική ανάγκη η αξιολόγηση και ο προσδιορισμός να βασίζεται σε τεχνικές που πληρούν πολλές αναλυτικές παραμέτρους απόδοσης.

Σήμερα, η μελέτη και η έρευνα για τις βιταμίνες έχει προσελκύσει ευρύ ενδιαφέρον στον τομέα των τροφίμων. Ο αριθμός των δημοσιεύσεων για τις βιταμίνες έχει αυξηθεί σημαντικά, γεγονός που δηλώνει ότι τα ζητήματα αυτά γίνονται όλο και περισσότερο δημοφιλή. Από το 2010 και έπειτα, έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι προσδιορισμού βιταμινών στα τρόφιμα που περιλαμβάνουν μεθόδους χρωματογραφίας, ηλεκτροφορητικές μεθόδους και άλλες. Όπως γνωρίζουμε, έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος στην αναλυτική χημεία των τροφίμων, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό των βιταμινών.

Οι διεθνώς αποδεκτές συμβατικές μέθοδοι ανάλυσης των βιταμινών βασίζονται κυρίως στην μικροβιολογική ανάλυση και στην ανοσοδοκιμασία. Ωστόσο, οι μέθοδοι αυτές είναι συνήθως χρονοβόρες και απαιτούν αρκετή μελέτη και εργασία, ενώ επί το πλείστον δεν επιτρέπουν τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολυβιταμινών. Η μέθοδος της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) είναι μια από τις πιο κοινές τεχνικές για τον διαχωρισμό των βιταμινών σε ποικιλία τροφίμων λόγω της υψηλής επιλεκτικότητας και ευαισθησίας της. Η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας και της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στο πεδίο της επιστήμης των τροφίμων. Η μεγάλη ποικιλία των υλικών διαχωρισμού σε συνδυασμό με τους διάφορους εμπορικούς ανιχνευτές καθιστούν τις τεχνικές αυτές ιδιαίτερα ελκυστικές. Μεγάλο πλεονέκτημα των τεχνικών αυτών είναι ακριβώς η φύση τους ως διαχωριστικές τεχνικές και η μεγάλη ικανότητα διαχωρισμού που παρέχουν. Σημαντική είναι η συμβολή των τεχνικών αυτών στην επιστήμη των τροφίμων, ιδιαίτερα στον κλάδο ανάπτυξης και στον έλεγχο ποιότητας νέων τροφίμων. Στον έλεγχο ποιότητας των τροφίμων, η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση παίζει πρωταγωνιστικό ρόλο, αφού η αξιοπιστία, η ακρίβεια και η ταχύτητα στην ανάλυση των δειγμάτων είναι τα κύρια χαρακτηριστικά της. Πιο συγκεκριμένα, η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis, CE) μπορεί να θεωρηθεί ως η ενόργανη προσέγγιση της συμβατικής ηλεκτροφόρησης και είναι μια διαχωριστική τεχνική υψηλής απόδοσης, στην οποία η ηλεκτροφόρηση διεξάγεται σε στενούς τριχοειδείς σωλήνες, μικρής εσωτερικής διαμέτρου, συνήθως 25 έως 100 μm, οι οποίοι έχουν πληρωθεί με ρυθμιστικό διάλυμα και πραγματοποιούνται διαχωρισμοί τόσο μικρών όσο και μεγάλων μορίων. Οι διαχωρισμοί αυτοί διευκολύνονται από τη χρήση υψηλών τάσεων, οι οποίες δημιουργούν ηλεκτροωσμωτική ροή (electroosmotic flow, EOF) και ηλεκτροφορητική ροή των ρυθμιστικών διαλυμάτων και των φορτισμένων συστατικών, αντίστοιχα, μέσα στον τριχοειδή. Η παράμετρος ευαισθησία, θα μπορούσε να αποτελεί ένα μειονέκτημα για την μέθοδο CE στην ανάλυση βιταμινών λόγω της μικρής διαδρομής του φωτός. Οι μέθοδοι ανάλυσης των βιταμινών με την τεχνική της CE έχουν εφαρμοστεί σε

τρόφιμα, φαρμακευτικά και βιολογικά δείγματα. Οι περισσότερες από τις αναπτυγμένες μεθόδους που βασίζονται στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση με ανιχνευτή UV αφορούν κυρίως την αξιολόγηση βιταμινών σε φαρμακευτικά προϊόντα και τρόφιμα λόγω της σχετικά υψηλής συγκέντρωσης αναλυόμενης ουσίας. Ο ανιχνευτής UV αποτελεί επίσης μια καλή επιλογή για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλών βιταμινών. Ωστόσο, η εφαρμογή της μεθόδου CE-UV ήταν αρκετά περιορισμένη λόγω της σχετικά χαμηλής ευαισθησίας ανίχνευσης με κύρια αίτια την μικρή διαδρομή του φωτός και του μικρού όγκου δειγμάτων, ειδικά στην περίπτωση των βιολογικών δειγμάτων. Για τη βελτίωση της ευαισθησίας στην ανάλυση με την μέθοδο CE συνήθως εφαρμόζονται ευαίσθητοι ανιχνευτές ή/ και μέθοδοι on-line προσυγκέντρωσης (Wang et al., 2018).

Από το 2010 έχουν εφαρμοστεί διαφορετικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των βιταμινών σε διάφορους τύπους δειγμάτων. Οι επί του παρόντος προτεινόμενες αναλυτικές προσεγγίσεις για την ανίχνευση βιταμινών βασίζονται κυρίως στις μεθόδους HPLC-MS ή HPLC-MS/ MS. Η μεγάλη πρόοδος στην μέθοδο HPLC-MS/ MS την καθιστά βασική τεχνική για τον προσδιορισμό όχι μόνο των βιταμινών αλλά και άλλων βασικών συστατικών. Η κύρια τάση στον τομέα αυτό είναι ο συνδυασμός ανιχνευτών φασματομετρίας μάζας με σύγχρονες χρωματογραφικές προσεγγίσεις όπως την μέθοδο UHPLC και την εφαρμογή των ισχυρών οργάνων QqTOF και Orbitrap. Οι υβριδικές αυτές προσεγγίσεις έχουν συμβάλει σημαντικά στην ανάλυση οργανικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των βιταμινών, και έχουν συμβάλει στην ανάπτυξη τεχνικών πολυαναλυτών για την ανίχνευση ενός ευρέος φάσματος ουσιών σε μια ενιαία αναλυτική σειρά. Οι αναλυτικές αυτές μέθοδοι φαίνεται να είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές για αναλυτικούς σκοπούς στο μέλλον. Ωστόσο, τα κύρια μειονεκτήματά τους είναι ο πολύπλοκος εξοπλισμός και το υψηλό κόστος.

Ιδιαίτερα μεγάλο ενδιαφέρον υπάρχει για την ανάπτυξη μεθόδων προσυμπτωματικού ελέγχου που βασίζονται σε μικροβιολογικές, ανοσοδοκιμασίες και βιοαισθητήρες, οι οποίες έχουν το κύριο πλεονέκτημα του χαμηλού κόστους, του σύντομου χρόνου ανάλυσης και τη δυνατότητα άμεσης χρήσης τους. Η σαφής τάση στον τομέα αυτό είναι η σμίκρυνση των συστημάτων διαλογής (τσιπ, μικροσυστοιχίες, μικρότιτλοι, πλάκες) καθώς και τον αυτοματισμό τους. Στο εγγύς μέλλον πιστεύεται ότι τα χαρακτηριστικά αυτά θα διατηρήσουν τη βιώσιμη πρόοδο από τις παραπάνω μεθόδους (Zhang et al., 2018).

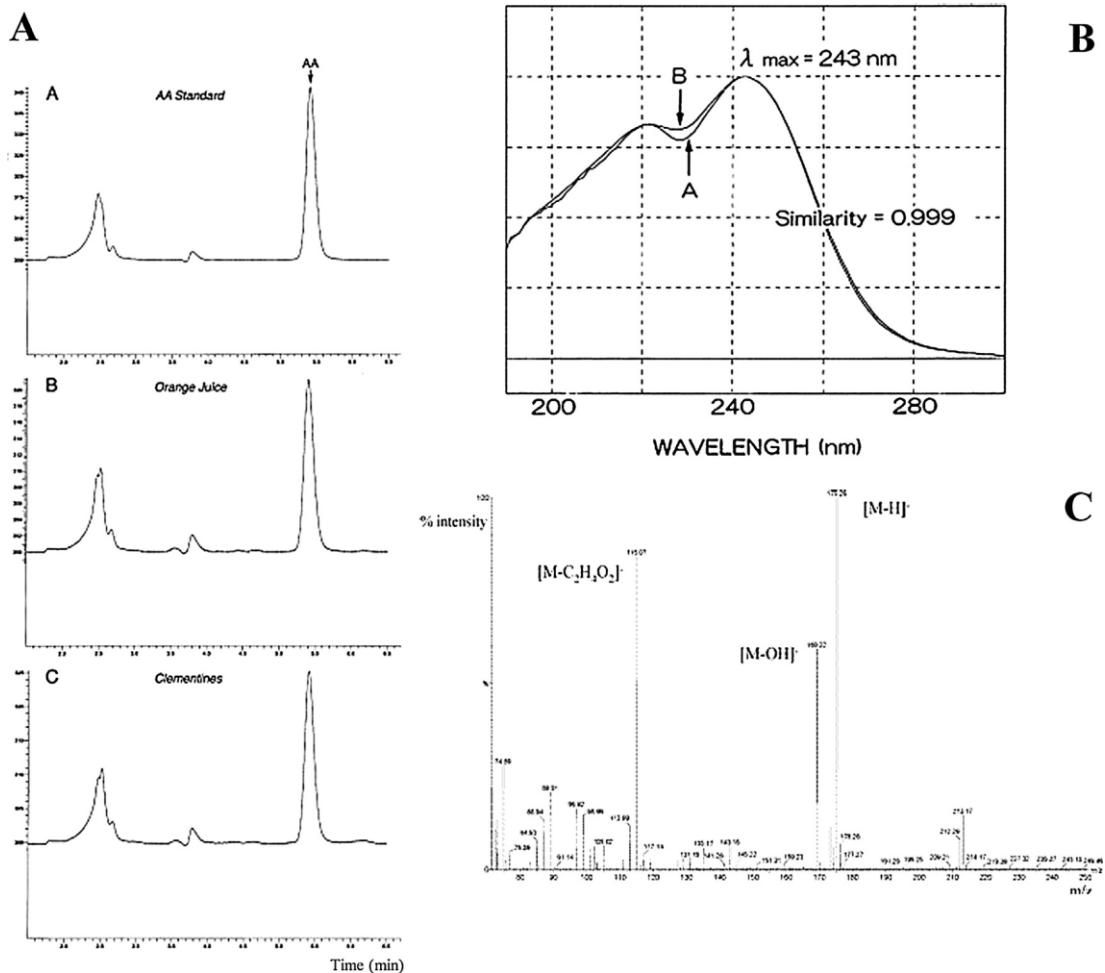
2.2. Μέθοδοι ανάλυσης υδατοδιαλυτών βιταμινών

Η ανάπτυξη και η επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων αποτελούν συνεχείς και στενές διαδικασίες που διεξάγονται σε όλη την ανάλυση των τροφίμων. Η εφαρμογή μιας αναλυτικής μεθόδου στο εργαστήριο υφίσταται πολλές στενά συνδεδεμένες φάσεις με τελικό στόχο τη διασφάλιση των παραγόμενων δεδομένων. Η επιλογή της αναλυτικής μεθόδου θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη, τα χαρακτηριστικά της αναλυόμενης ουσίας, τη μήτρα, τον σκοπό της ανάλυσης και τους διαθέσιμους αναλυτικούς πόρους. Τα τρία κύρια συστατικά μιας μεθόδου HPLC είναι η προετοιμασία του δείγματος, οι συνθήκες ανάλυσης HPLC και η τυποποίηση (Spinola et al., 2014).

Σήμερα, οι επίσημες αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της βιταμίνης Β περιλαμβάνουν μικροβιολογικές, χρωματογραφικές μεθόδους και φασματοφωτομετρικές μεθόδους. Οι μικροβιολογικές μέθοδοι βασίζονται στη δραστηριότητα της αναλυόμενης ουσίας για μικροοργανισμούς, επομένως, παρουσιάζουν έλλειψη ειδικότητας και επιλεκτικότητας για τα βιταμερή (Fatima et al., 2019). Επιπλέον, είναι χρονοβόρες, περίπλοκες και παρουσιάζουν χαμηλή ακρίβεια. Οι περισσότερες σύγχρονες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες βασίζονται σε τεχνικές υγρής χρωματογραφίας (LC) σε συνδυασμό με ανιχνευτές υπεριώδους (UV), φθορισμού, και ηλεκτροχημικούς ανιχνευτές. Η υγρή χρωματογραφία φασματομετρία μάζας (LC-MS) είναι πολύ ευαίσθητη και ειδική για τον προσδιορισμό των βιταμινών, ειδικά σε σύνθετα τρόφιμα, επιτρέποντας την ανάλυση πολυβιταμινών. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της μεθόδου LC-MS αποτελεί ο εντοπισμός πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων διαφορετικών ομόλογων βιταμινών για την διαμόρφωση του προφίλ θρεπτικών συστατικών σε δείγματα τροφίμων. Για τους λόγους αυτούς, οι εφαρμογές των μεθόδων LC-MS για την ανάλυση βιταμινών έχουν αυξηθεί σημαντικά την τελευταία δεκαετία. Η τεχνική της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (CE) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των υδατοδιαλυτών βιταμινών λόγω της ειδικής ηλεκτροχημικής συμπεριφοράς τους. Μεταξύ των μεθόδων που βασίζονται στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση, η μικκυλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (MEKC) έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για τον ταυτόχρονο διαχωρισμό πολλών υδατοδιαλυτών βιταμινών, λόγω της βελτιωμένης επιλεκτικότητας και καταλληλότητας. Λαμβάνοντας υπόψη τον μεγάλο αριθμό τεχνικών που σχετίζονται με τις διαδικασίες προεπεξεργασίας δειγμάτων και τον αναλυτικό προσδιορισμό των φυσικών δειγμάτων των υδατοδιαλυτών βιταμινών, η ανασκόπηση αυτή στοχεύει να απαριθμήσει τις τελευταίες τάσεις και προβλήματα που σχετίζονται με τον προσδιορισμό αυτής της σημαντικής κατηγορίας ενώσεων.

2.2.1. Μέθοδοι προσδιορισμού της βιταμίνης C

Πολλές αναλυτικές μέθοδοι, συμπεριλαμβανομένης της χρωματογραφίας, έχουν αναφερθεί για τη μέτρηση της περιεκτικότητας σε βιταμίνη C στα τρόφιμα. Παρά τους περιορισμούς τους, οι κλασικές μέθοδοι εξακολουθούν να είναι κοινές στην ανάλυση των τροφίμων. Η επίσημη μέθοδος τιτλοδότησης AOAC εφαρμόζεται συστηματικά για την ανάλυση φρούτων και χυμών, λόγω της απλότητας και του χαμηλού κόστους της. Έχουν αναφερθεί συγκρίσεις μεταξύ HPLC και παραδοσιακών μεθόδων (Spinola et al., 2013; Hernandez et al., 2006). Παρόλο που παρατηρήθηκαν παρόμοια αποτελέσματα για πολλά δείγματα, οι μέθοδοι HPLC είναι απαραίτητες για την ανάλυση πολλών δειγμάτων τροφίμων λόγω της υψηλής πολυπλοκότητάς τους, η οποία απαιτεί υψηλή επιλεκτικότητα και ευαισθησία. Επιπλέον, μόνο το L-ασκορβικό οξύ μπορεί να προσδιοριστεί με την κλασική ιωδομετρία, ενώ το L-ασκορβικό οξύ και το δεϋδροασκορβικό οξύ μπορούν να ποσοτικοποιηθούν με κατάλληλες μεθόδους HPLC.



Εικόνα 1. (A) Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα του L-AA σε πρότυπο διάλυμα, σε εκχύλισμα χυμού πορτοκαλιού και σε εκχύλισμα κλημεντινών. (B) Φάσματα απορρόφησης UV για L-AA σε χρωματογράφημα ($\lambda_{max}=243nm$): (A) 100% φυσικό εκχύλισμα χυμού πορτοκαλιού (B) Πρότυπο διάλυμα L-AA (C) Φάσμα μάζας L-AA $[M-H] - (m/z)=175$ (Spinola et al., 2014).

Ένα τυπικό παράδειγμα επιλεκτικότητας μπορεί να παρατηρηθεί στην Εικόνα 1. Πιο συγκεκριμένα, στο σχήμα (A), η κορυφή που αντιστοιχεί στο L-ασκορβικό οξύ διακρίνεται εύκολα από τις υπόλοιπες κορυφές στο χρωματογράφημα. Η επίδειξη και η τεκμηρίωση της επιλεκτικότητας της μεθόδου ανάλυσης μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες προσεγγίσεις. Για παράδειγμα, στην μέθοδο HPLC μπορούμε να κάνουμε διάκριση μεταξύ της επιλεκτικότητας ανίχνευσης (τεχνική ανίχνευσης) και της επιλεκτικότητας διαχωρισμού (συνθήκες χρωματογραφικού διαχωρισμού). Η πιο κοινή τεχνική ανίχνευσης για τον προσδιορισμό του L-AA είναι η ανίχνευση στο UV. Σε πολλές μεθόδους, η καθαρότητα της κορυφής του L-AA επιβεβαιώνεται από τη σύγκριση του χρόνου κατακράτησης (tR) και του φάσματος UV με εκείνα ενός καθαρού προτύπου, όπως φαίνεται στο σχήμα (B). Η χρήση ανιχνευτών μάζας μπορεί να βελτιώσει την επιβεβαίωση της καθαρότητας της κορυφής μετρώντας επίσης την αναλογία μάζας προς το φορτίο του, συνήθως, του αποπρωτονισμένου μορίου [σε λειτουργία αρνητικού ESI ως $[M-H] - (m/z)=175$, Σχήμα (C)]. Ο φθορισμός έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για σκοπούς ταυτοποίησης. Ωστόσο, απαιτείται μια αντίδραση παραγωγοποίησης για το L-AA, η οποία απαιτεί τη χρήση πρόσθετων αντιδραστηρίων και περισσότερο χρονοβόρες διαδικασίες (Spinola et al., 2014).

Διαφορετικές μέθοδοι HPLC παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. για τον προσδιορισμό της βιταμίνης C, δημοσιευμένες μεταξύ 2000 και 2014 στον τομέα της επιστήμης και χημείας τροφίμων. Λόγω της μη πτητικής και υδρόφιλης φύσης της βιταμίνης C, η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (RP)-HPLC είναι η πιο κοινή προσέγγιση. Η υγρή χρωματογραφία εξαιρετικά υψηλής απόδοσης (UHPLC) έχει πρόσφατα εφαρμοστεί στην ανάλυση της βιταμίνης C στα τρόφιμα, με βασικό πλεονέκτημα τον μικρότερο χρόνο ανάλυσης και τη χαμηλότερη κατανάλωση διαλύτη σε σύγκριση με άλλες αναλυτικές προσεγγίσεις. Το pH της κινητής φάσης συνήθως ρυμίζεται κάτω από το pKa του L-ασκορβικού οξέος, για να αποτραπεί η υποβάθμισή του.

Το L-ασκορβικό οξύ παρουσιάζει ισχυρή απορρόφηση στην περιοχή υπεριώδους ακτινοβολίας (245-270 nm), καθιστώντας την απορρόφηση στο UV την πιο δημοφιλή τεχνική ανίχνευσης. Ωστόσο, η απορρόφηση αυτή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το pH και θα

πρέπει να λαμβάνεται υπόψη. Λιγότερες συχνές είναι οι εφαρμογές για τον προσδιορισμό βιταμίνης C με τις μεθόδους ανίχνευσης φθορισμού (FD) και ηλεκτροχημικής ανίχνευσης (ECD), καθώς και η φασματομετρία μάζας (MS). Τα όρια ανίχνευσης (LODs) κυμαίνονται μεταξύ 0,02 και 0,16 g/mL για την ECD και μεταξύ $1,2 \times 10^{-3}$ και 7,2g/mL για την ανίχνευση φθορισμού (Πίνακας 4.). Συνήθως, ο ηλεκτροχημικός ανιχνευτής είναι πιο ευαίσθητος από τον ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας, αν και το ευρύ φάσμα των LOD καθιστά δύσκολη την πραγματοποίηση ακριβούς σύγκρισης (Spinola et al., 2014).

Αξίζει να αναφερθεί ότι τα χαμηλά επίπεδα δεϋδροασκορβικού οξέος στα περισσότερα δείγματα δυσκολεύουν την ποσοτική ανάλυση με οποιονδήποτε ανιχνευτή HPLC. Επομένως, το δεϋδροασκορβικό οξύ συχνά ανάγεται σε L-ασκορβικό οξύ πριν από τον χρωματογραφικό διαχωρισμό και μετριέται ως συνολικό ασκορβικό οξύ, δηλαδή το άθροισμα των περιεχομένων L-AA και DHAA (Spinola et al., 2014).

Πίνακας 4. Επισκόπηση επικυρωμένων χρωματογραφικών μεθόδων για τον προσδιορισμό της βιταμίνης C σε τρόφιμα (Spinola et al., 2014).

Προσδιοριζόμενη ουσία	Δείγμα	Προετοιμασία δείγματος	Συνθήκες HPLC	Επικύρωση μεθόδου	Πηγή
L-AA, DHAA, TAA (reduction with DTT)	Πράσινα φασόλια	SLE με 4,5% MPA, διήθηση	Sphereclone ODS (250mm×4,5mm, 5μm) 1,8mM H ₂ SO ₄ (pH 2.6) UV (245nm)	Επιλεκτικότητα: Σύγκριση φασμάτων tR και UV $R^2 > 0,9993$, 5-20g/mL (ES) LOD: 0,097g/mL LOQ: 32,3g/mL(S/N) Επανάληψη: 6.4% L-AA, 7.1% TAA Ακρίβεια: 93.3% L-AA, 89.4% TAA	Sanchez-Mata et al., 2000
L-AA, DHAA (reduction with DTT)	Φρούτα και λαχανικά	SLE με νερό, διήθηση	HiChrom C18 (250mm×4,0mm, 5μm) M KH ₂ PO ₄ (pH 2.4) UV (254nm)	$R^2 = 0,9992$, 10-100g/mL (ES) Lnt. Ακρίβεια < 1% (tR) Ακρίβεια: 81.7-105.9%. (δοκιμές ανάκτησης)	Gokmen et al., 2000
TAA (reduction with DTT)	Χυμοί φρούτων	Αραίωση με νερό και φυγοκέντρωση	Jōsphere ODS-H80 (250mm×4.6mm, 4μm)	Επιλεκτικότητα: Σύγκριση φασμάτων tR και UV $R^2 = 0,9998$	Furusawa et al., 2001

			2% (v/v) acetic acid (pH 2.5) UV (243nm)	20–2000g/mL (ES) LOD: 0,5g/mL (S/N) Επανάληψη: 1%	
L-AA και άλλες 6 υδατοδιαλυτές βιταμίνες	Μέλι	Αραίωση με νερό	Bondapack C18 (150mm×3.9mm, 10μm) 0,01% H2SO4 0,01M CTAB 0,022% (v/v) MeOH (pH 2.8) UV (254nm)	$R^2=0,9981$ 0,11-276,7g/mL (ES) LOD: 0,64g/mL LOQ: 2,13g/mL (S/N) Επανάληψη: 0,35% Ακρίβεια: 3,76% Ανθεκτικότητα: %MeOH, pH κινητής φάσης, θερμοκρασία στήλης	Leon-Ruiz et al., 2013
L-AA και άλλες 3 υδατοδιαλυτές βιταμίνες	Μέλι	Αραίωση με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 1M (pH 5.5)	Alltima C18 (250mm×4.6mm, 5μm) A: 0,025% TFA, B: ACN (βαθμιδωτή έκλουση) UV (254nm)	Επιλεκτικότητα: Σύγκριση φασμάτων tR και UV $R^2=0,9989$ 0,05-500g/mL (ES) LOD: 0,10g/g LOQ: 0,30g/g (ULA) Επανάληψη: 7,3% Ακρίβεια: 104% (δοκιμές ανάκτησης)	Ciulu et al., 2011
L-AA, TAA (reduction with TCEP)	Εξωτικά φρούτα, χυμοί και πολτούς φρούτων	Αραίωση με 10% PCA-1% MPA + TCEP, διήθηση	Synergi Hydro-RP (150mm×4.6mm, 4μm) 20mM NH4H2PO4 (pH 3.5) +0,015% (w/v) MPA PDA (246nm)	Επιλεκτικότητα: Σύγκριση φασμάτων tR και UV $R^2=0,9995$ 1-100g/mL (ES) LOD: 0,035g/mL LOQ: 0,09g/mL (S/N) Επανάληψη: 0,43-0,70% Ακρίβεια: 3,67% Αναπαραγωγικότητα <2 Ακρίβεια: 96,6-97,3% (δοκιμές ανάκτησης) Ανθεκτικότητα: pH και ροή κινητής φάσης, θερμοκρασία Σταθερότητα: θερμοκρασία	Valente et al., 2014

L-AA, TAA (reduction with DTT)	CRMs (γάλα, θρεπτικές φόρμουλες, δημητριακά)	USLE με 40% MPA, φυγοκέντρωση	YMC C18 Pro (250mm×4.6mm, 5μm) A: 0,02M ρυθμιστικό διάλυμα KH ₂ PO ₄ (pH 3.1) B: ACN (βαθμιδωτή έκλυση) UV (243nm)	Επιλεκτικότητα: CRMs $R^2=0,9986$ 1000-4000g/g (IS) LOD: 0,05g/g (S/N) LOQ: 0,7g/G (S/N) Επανάληψη: 2,7-6,5% Ακρίβεια: 3,8-4,5% (CRMs) Ακρίβεια: 93,7-106,4% (CRMs)	Thomas et al., 2013
L-AA, DHAA, TAA, άλλα οργανικά οξέα (reduction with L-cystein)	Λαχανικά	SLE με 4,5% MPA	Sphereclone ODS (250mm×4.6mm, 5μm) 1,8mM H ₂ SO ₄ (pH 2.6) UV (245nm)	$R^2=0,9980$ 100-2000g/g (ES) LOD: 0,8g/g (S/N) Ακρίβεια <5,3% (AOAC) Ακρίβεια: 90,1-94,6% (δοκιμές ανάκτησης)	Sanchez-Mata et al., 2012

2.2.2. Νέες τάσεις στην ανάλυση της βιταμίνης C

Σήμερα, η βιταμίνη C προστίθεται στις εμπορικές τροφές και στα βρεφικά παρασκευάσματα, με σκοπό τη χορήγηση της ημερήσιας διατροφικής πρόσληψης και την μείωση του κινδύνου σκορβούτου. Επομένως, η παρακολούθηση των επιπέδων της βιταμίνης C κατά την παραγωγή και αποθήκευση των τροφίμων αποτελεί κρίσιμη ανησυχία τόσο για τις βιομηχανίες παραγωγής όσο και για τους καταναλωτές και απαιτεί τη χρήση μεθόδων ταχείας εξέτασης για τον έλεγχο της περιεκτικότητας της. Μια νέα ηλεκτροανλυτική προσέγγιση υψηλής ευαισθησίας για τον προσδιορισμό της βιταμίνης C έχει αναπτυχθεί σε σύνθετες μήτρες τροφίμων. Πιο αναλυτικά, ένα νέο υβριδικό νανοσύνθετο που σχηματίζεται από μειωμένες νιφάδες οξειδίου του γραφενίου (Reduced Graphene Oxide, RGO), επιφάνεια διακοσμημένη με 3,4-διμεθυλβενζολοθειόλη (DMBT)–κολλοειδή νανοσωματίδια Au (Au NPs), έχει κατασκευαστεί για να συνδυάσει τις ανώτερες ιδιότητες των δύο συστατικών σε ένα πρωτότυπο σύνθετο (Bettazzi et al., 2021).

Σε πρόσφατη μελέτη των Ingrosso et al. (2019), η νέα νανοδομημένη πλατφόρμα έχει δοκιμαστεί και επικυρωθεί με επιτυχία ως άμεση και γρήγορη αναλυτική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της βιταμίνης C, με αμπερομετρία, σε διάφορα εμπλουτισμένα δείγματα γάλακτος και βρεφικά παρασκευάσματα. Η καινοτόμος αυτή μέθοδος παρουσιάζει όριο ανίχνευσης χαμηλότερο από άλλους τροποποιητές ηλεκτροδίων γραφενίου/ Au NPs που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και χαμηλότερο

από αυτό ενός συνηθισμένου φασματοφωτόμετρου που βασίζεται σε ενζυμικές μεθόδους. Ειδικότερα, δείχνει μια καλή γραμμική απόκριση με εύρος συγκέντρωσης 50-500 μ M με LOD 17 μ M και LOQ 57 μ M, με RSD 8% (n=5), κατά την ανάλυση δειγμάτων αγελαδινού γάλακτος.

Κάποια κρίσιμα πλεονεκτήματα, όπως το χαμηλό κόστος, η εύκολη προετοιμασία δειγμάτων, η γρήγορη απόκριση και αναπαραγωγικότητα, καθώς και η δυνατότητα χρήσης του αισθητήρα μετά την χρήση, ενθαρρύνουν την εφαρμογή της καινοτόμου μεθόδου σε εργαστήρια ποιοτικού ελέγχου, ως εναλλακτική των φασματοφωτομετρικών μεθόδων που βασίζονται σε ενζυμικές μεθόδους για τον προσδιορισμό της βιταμίνης C σε σύνθετες μήτρες τροφίμων. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό της βιταμίνης C σε τρόφιμα στα οποία υπάρχει φυσικά, ιδιαίτερα σε φρούτα και λαχανικά, και σε τρόφιμα στα οποία χρησιμοποιείται ως πρόσθετο τροφίμων, ως σταθεροποιητικό ή/ και ως αντιοξειδωτικό.

Τέλος, η εφαρμογή της προτεινόμενης μεθόδου μπορεί να εξεταστεί για τον προσδιορισμό άλλων ενώσεων, και ως εκ τούτου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ποικίλες εφαρμογές στη χημεία τροφίμων και στις διαδικασίες παραγωγής τροφίμων (Bettazzi et al., 2021).

2.2.2. Μέθοδοι προσδιορισμού της βιταμίνης B

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) με μη πολική στατική φάση και πολική κινητή φάση είναι η πιο δημοφιλής τεχνική για τον διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών λόγω πολλών πλεονεκτημάτων σε σχέση με την χρωματογραφία κανονικής φάσης. Για παράδειγμα, η συμβατότητά της με ανίχνευση φασματομετρίας μάζας, η γρήγορη ισορροπία, η εμφάνιση καλύτερης κορυφής και η ευρωστία των χρωματογραφικών στηλών αποτελούν βασικά πλεονεκτήματα της τεχνικής RP-HPLC (Fatima et al., 2019). Μεταξύ των διαφορετικών τύπων στατικών φάσεων που χρησιμοποιούνται στην τεχνική RP-HPLC, η στατική φάση με βάση τη στήλη C18 έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών με έκλυση μείγματος νερού και οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, αιθανόλη, ACN) και μικρό ποσοστό οξέων (FA, TFA κ.λπ.). Οι στατικές φάσεις που βασίζονται στη στήλη C18 έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την ταυτόχρονη διαφοροποίηση των δραστικών ενώσεων ορισμένων υδατοδιαλυτών βιταμινών συμπεριλαμβανομένων ενώσεων φλαβίνης, νικοτιναμίδης, νικοτινικού οξέος, πυριδοξάλης, πυριδοξαμίνης, πυριδοξίνης, τεσσάρων κοβαλαμινών και ορισμένων φολικών

βιταμερών από σύνθετα δείγματα τροφίμων. Οι κοινώς χρησιμοποιούμενες τεχνικές ανίχνευσης που συνδέονται με την τεχνική RP-HPLC περιλαμβάνουν DAD, FLD, ECD και MS (Fatima et al., 2019).

Σε μια μελέτη (Gliszczynska-Swigło et al., 2015), δώδεκα υδατοδιαλυτές βιταμίνες διαχωρίστηκαν σε στήλη C18 χρησιμοποιώντας σύστημα ανίχνευσης FLD για τις βιταμίνες B2 και B6, λόγω της επιλεκτικότητας της FLD για αυτές τις βιταμίνες και το σύστημα ανίχνευσης DAD για τις άλλες βιταμίνες που μελετήθηκαν. Η βιταμίνη B2 αναλύθηκε με τη μορφή FMN και ριβοφλαβίνης και η βιταμίνη B6 με τη μορφή πυριδοξάλης (PL), πυριδοξαμίνης (PM) και πυριδοξίνης (PN). Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη (Lebiedzinska et al., 2018), ο διαχωρισμός τριών βιταμερών της βιταμίνης B6 συμπεριλαμβανομένων των PM, PL και PN πραγματοποιήθηκε σε στήλη C18 με ηλεκτροχημική ανίχνευση (ECD). Μεγαλύτερες διαφορές στην κατανομή ηλεκτροστατικού δυναμικού των βιταμινών B6 έχουν ως αποτέλεσμα ένα καλά διαχωρισμένο προφίλ έκλουσης που καθιστά αυτή την τεχνική κατάλληλη για τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες.

Η ποσοτικοποίηση της βιταμίνης B12 πραγματοποιήθηκε μετατρέποντας όλες τις ενεργές μορφές σε μια σταθερή μορφή CN-Cbl χρησιμοποιώντας το KCN. Το LC-ICP-MS ενεργοποιεί την επιλεκτική ανίχνευση της βιταμίνης B12 με ελάχιστη παρεμβολή της μήτρας, αλλά παρουσιάζει πρόβλημα χαμηλότερης απόδοσης ιονισμού του οργανικού κοβαλτίου σε σύγκριση με το ανόργανο. Επιπλέον, η τεχνική αυτή δεν είναι εντελώς επιλεκτική για τη διαφοροποίηση βιταμερών επειδή απαιτεί πλήρη χρωματογραφική ανάλυση όλων των ομόλογων βιταμινών και χαρακτηρίζονται μόνο από τους χρόνους κατακράτησης. Ωστόσο, η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με την ανίχνευση MS παρέχει καλύτερη επιλεκτικότητα από το LC-ICP-MS για την ανάλυση των βιταμερών της βιταμίνης B12. Για παράδειγμα, τέσσερα ομόλογα της βιταμίνης B12 (CNCbl, OHCbl, MeCbl και AdoCbl) σε δείγματα αγελαδινού γάλακτος ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το σύστημα ανίχνευσης C18 SP και ESI-MS με όριο ανίχνευσης που κυμαίνεται από 0.36-1.62 g/L (Pérez-Fernández et al., 2016). Ο προσδιορισμός των 14 υδατοδιαλυτών βιταμινών συμπεριλαμβανομένων δύο βιταμερών της βιταμίνης B3 και πέντε βιταμερών της βιταμίνης B6 πραγματοποιήθηκε σε μία μόνο χρωματογραφία σε στήλη C18 σε συνδυασμό με σύστημα ανίχνευσης MS (Gentili et al., 2008). Η υψηλότερη ευαισθησία και επιλεκτικότητα αυτής της μεθόδου απλοποιεί τον συνολικό κύκλο ανάλυσης επειδή δεν απαιτήθηκε προσυγκέντρωση του εκχυλίσματος. Επιπλέον, τα χαμηλότερα LOQs (ng/g) ξεπερνούν το πρόβλημα που σχετίζεται με τις βιταμίνες

B9 και B12 λόγω της πολύ χαμηλής συγκέντρωσής τους στα τρόφιμα. Ενώ, αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι το σύστημα ανάλυσης ESI μπορεί να ιονίσει αποτελεσματικά πολικές και υψηλού μοριακού βάρους ενώσεις, όπως κοβαλαμίνες που παράγουν πολυφορτισμένα ψευδομοριακά ιόντα. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι απαραίτητο για την ανίχνευση ενεργών μορφών της βιταμίνης B12 που δίνουν έντονα μονο- και διπλο- φορτισμένα ψευδομοριακά ιόντα.

Έχουν διεξαχθεί αρκετές μελέτες για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών που χρησιμοποιούν στατική φάση C18. Για παράδειγμα, η στήλη C18 bonded χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό τεσσάρων υδατοδιαλυτών βιταμινών από ανθρώπινο ορό με τη μέθοδο LC-MS/MS. Η καθιερωμένη μέθοδος LC-MS/MS βρέθηκε ότι σχετίζεται στενά με τη συνήθη ηλεκτροχημική μέθοδο (EC) για τις βιταμίνες στον κλινικό τομέα. Οι βιταμίνες C, B2, B3, B5 και B9 έχουν ποσοτικοποιηθεί ταυτόχρονα από δείγματα μελιού σε C18 SP χρησιμοποιώντας TFA και ACN ως διαλύτες κινητής φάσης (Ciulua et al., 2011). Σε μια πρόσφατη μελέτη, η στήλη C18 με σύστημα ανίχνευσης DAD και MS χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη μιας αναλυτικής προσέγγισης για ταυτόχρονο και ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό οκτώ βιταμινών του συμπλέγματος B από συμπληρώματα διατροφής χωρίς τη χρήση εσωτερικού προτύπου (Hee-Jung et al., 2016). Επιπλέον, άλλες στατικές φάσεις αντίστροφης φάσης όπως C8, C30 και οι φθοριωμένες φάσεις είναι λιγότερο συχνές για τον διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών.

Οι κινητές φάσεις που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης (NP-LC) δεν είναι συμβατές με την τεχνική ανίχνευσης φασματομετρίας μάζας. Ωστόσο, είναι διαθέσιμοι παράγοντες διάσπασης πτητικών ιόντων για ανάλυση με RP-LC-MS. Επιπλέον, η ιοντική καταστολή RP-LC είναι επίσης συμβατή με την MS χρησιμοποιώντας πτητικά οξέα ως πρόσθετα στις κινητές φάσεις. Από την άλλη πλευρά, η μέθοδος LC-MS υπόκειται επίσης σε ορισμένα προβλήματα, όπως συνέκλουση, βασικές και χρονικές μετατοπίσεις, χαμηλός λόγος S/N και περίπλοκα φασματικά υπόβαθρα.

Σε πρόσφατη μελέτη των Sasaki et al. (2020) αναπτύχθηκε μια υγρή χρωματογραφική μέθοδος υψηλής απόδοσης για τον διαχωρισμό και τον προσδιορισμό 13 βιταμινών της ομάδας B, όπως θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, 5'-μονοφωσφορική ριβοφλαβίνη, πυριδοξίνη, υδροξοκοβαλαμίνη, κυανοκοβαλαμίνη, αδενοσυλοκοβαλαμίνη, νιασίνη, νιασιναμίδη, παντοθενικό οξύ, φολικό οξύ και βιοτίνη. Η μέθοδος συνίσταται από μια στήλη ODS, μια βαθμιδωτή έκλουση χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με pH 3.0 – ακετονιτρίλιο, αντιδραστήριο ζευγαρώματος ιόντων ως κινητή φάση σε 1.0 mL min^{-1} και ανίχνευση

UV στα 210 nm. Ως αποτέλεσμα ο διαχωρισμός των ενώσεων της βιταμίνης B σε 60 λεπτά με τη γραμμικότητα, το όριο ανίχνευσης, το όριο ποσοτικοποίησης, την ακρίβεια, το εύρος και την ανάκτηση σε ικανοποιητικά επίπεδα. Το όριο ανίχνευσης κυμαινόταν από 0.03 έως 0.41 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ενώ η ακρίβεια της περιοχής της κορυφής, εκφρασμένη σε RSD, ήταν 0.542-6.367%. Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των ενώσεων της βιταμίνης B σε ενεργειακά ποτά και πολυβιταμινούχα χάπια. Στην περίπτωση ανάλυσης των ενεργειακών ποτών, η μέθοδος εντόπισε και αξιολόγησε όχι μόνο τις ενώσεις της βιταμίνης B, αλλά και κύρια συστατικά των ενεργειακών ποτών, όπως καφεΐνη, βανιλίνη και το βενζοϊκό οξύ. Οι ενώσεις της βιταμίνης B στα δείγματα προσδιορίστηκαν επίσης ποσοτικά και συγκρίθηκαν με τις τιμές που αναγράφονται στην ετικέτα κάθε προϊόντος. Κάθε ποσοτική τιμή πλησίαζε κοντά με τις τιμές της ετικέτας, υποδηλώνοντας υψηλή ποσοτική ικανότητα της μεθόδου που αναπτύχθηκε (Sasaki et al., 2020).

2.2.1 . Υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC)

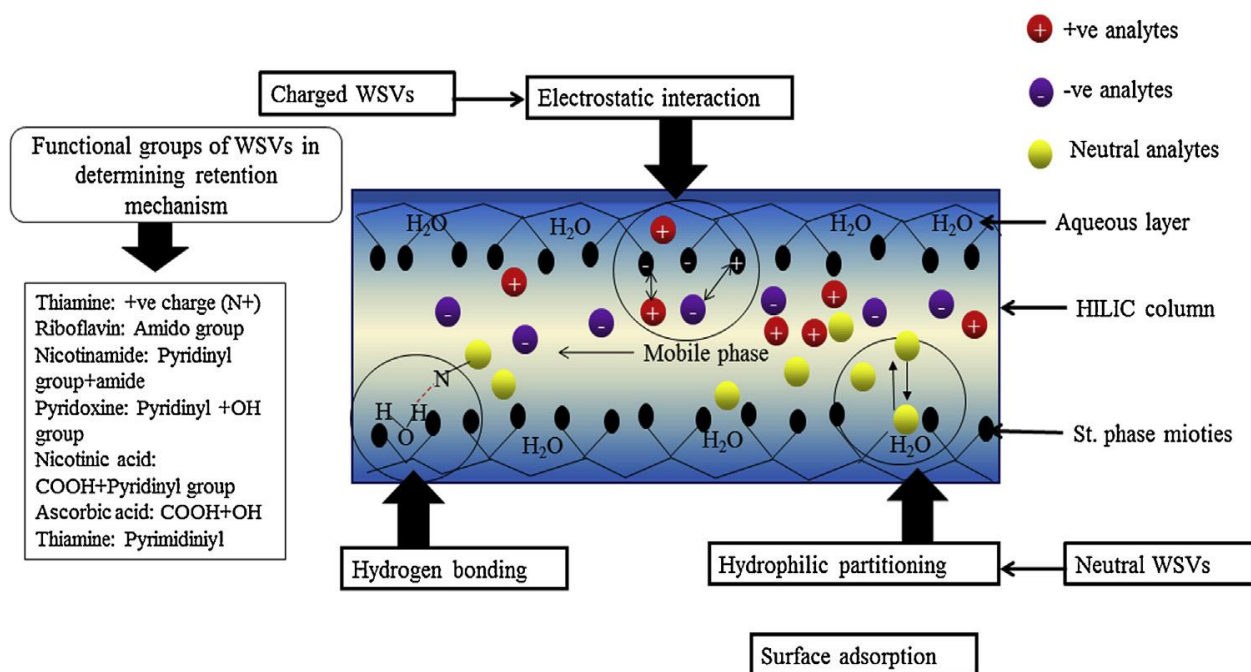
Η υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC) είναι η καλύτερη εναλλακτική λύση της μεθόδου RP-LC για πολικούς αναλυτές συμπεριλαμβανομένων των υδατοδιαλυτών βιταμινών. Η μέθοδος υδρόφιλης αλληλεπίδραση υγρής χρωματογραφίας χρησιμοποιεί πολική στατική φάση (π.χ. bare silica ή πολική δεσμευμένη φάση) για να διατηρήσει τις αναλυόμενες ουσίες, αλλά η κινητή φάση παραμένει ίδια με αυτή στη μέθοδο RP-LC. Ωστόσο, η βαθμιδωτή έκλυση ξεκινά με υψηλότερο ποσοστό οργανικού διαλύτη που ευνοεί την ευαισθησία και την καλύτερη συγκράτηση των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε σύγκριση με την μέθοδο RP-LC. Επιπλέον, η κινητή φάση περιέχει σχετικά υψηλή περιεκτικότητα νερού (5-50% υδατική) σε αντίθεση με αυτά που χρησιμοποιούνται στη λειτουργία αντίστροφης φάσης. Το υψηλό υδατικό περιβάλλον στη HILIC αποτελεί ιδιαίτερο πλεονέκτημα για τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες επειδή έχουν μεγαλύτερη διαλυτότητα στο περιβάλλον αυτό. Τα χαρακτηριστικά της τεχνικής HILIC καθιστούν την μέθοδο περισσότερο συμβατή με την ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας και επίσης εξαλείφουν το πρόβλημα της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας και την ανάγκη του παράγοντα σύζευξης ιόντων που χρησιμοποιείται στη κινητή φάση. Οι περισσότερες στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται στην υδρόφιλη αλληλεπίδραση υγρής χρωματογραφίας βασίζονται σε πυρίτιο και πολυμερή. Η στατική φάση του γυμνού πυριτίου είναι μια

ευρέως χρησιμοποιούμενη φάση και κατάλληλη λόγω της σταθερότητας και της συμβατότητας της με την ανίχνευση MS. Μεταξύ σταθερών φάσεων HILIC που βασίζονται σε πολυμερή, οι στατικές φάσεις Zwitterionic πολυμερούς έχουν προσελκύσει σημαντική προσοχή από τους ερευνητές. Η στήλη Zwitterionic χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των βιταμινών B και άλλων βιοδραστικών ενώσεων σε χυμό παντζαριών με υψηλότερη ευαισθησία σε σύγκριση με τη λειτουργία αντίστροφης φάσης. Στη μελέτη αυτή, προέκυψε τιμές LOD για τις βιταμίνες B, 0.03mg/L σε Zwitterionic στατική φάση με υψηλότερη περιεκτικότητα σε ACN σε κινητή φάση μέσω της τεχνικής ανίχνευσης φασματομετρίας μάζας (Fatima et al., 2019).

Ο μηχανισμός συγκράτησης της τεχνικής HILIC είναι αρκετά περίπλοκος ανάλογα με τις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες και τους παράγοντες. Στην Εικόνα 2. απεικονίζονται οι κύριες αλληλεπιδράσεις που εμπλέκονται στον μηχανισμό συγκράτησης της τεχνικής HILIC. Λόγω της χημικής ετερογένειας, οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες εμφανίζουν διαφορετική συμπεριφορά συγκράτησης και έκλουσης σε διαφορετικές στατικές φάσεις και με την αλλαγή στη σύνθεση της κινητής φάσης. Για παράδειγμα, στην περίπτωση μιας πιο υδρόφιλης και θετικά φορτισμένης θειαμίνης, η οποία διατηρείται πιο έντονα στη στήλη διόλης σε σύγκριση με άλλες υδατοδιαλυτές βιταμίνες και στη στήλη πυριτίου, μπορούν να εμφανιστούν ισχυρές αλληλεπιδράσεις ανταλλαγής κατιόντων. Η συμπεριφορά κατακράτησης του τολουολίου και των υδατοδιαλυτών βιταμινών έχουν μελετηθεί σε στήλη πυριτίου, διόλης και αμινο-στηλών με ίδιες διαστάσεις. Στη μελέτη αυτή, η επιφανειακή προσρόφηση ήταν ο κυρίαρχος μηχανισμός συγκράτησης για τις βιταμίνες που έχουν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και ο μηχανισμός κατακράτησης για τις ουδέτερες υδατοδιαλυτές βιταμίνες, συμπεριλαμβανομένων των μηχανισμών κατακράτησης νικοτιναμίδης, ριβοφλαβίνης και πυριδοξίνης αλλάζει από καταμερισμό σε επιφανειακή προσρόφηση με αύξηση της περιεκτικότητας σε ACN στην κινητή φάση. Η στήλη διόλης έχει αποδειχθεί καταλληλότερη για τον διαχωρισμό πολικών ενώσεων λόγω λιγότερων πιθανοτήτων σύνδεσης υδρογόνου σε σύγκριση με το γυμνό πυρίτιο με αποτέλεσμα μειωμένη αλληλεπίδραση με τη στατική φάση. Η τεχνική HILIC αποτελεί την πιο κατάλληλη για τον προσδιορισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών, ωστόσο έχει επίσης ορισμένα μειονεκτήματα, όπως λιγότερη ευαισθησία και ακρίβεια για τον προσδιορισμό του δεϋδροασκορβικού οξέος στα φρούτα. Επιπλέον, το πιο κατάλληλο και ευρέως χρησιμοποιούμενο MPA

ως σταθεροποιητής για τις βιταμίνες C, δεν είναι συμβατό με τη λειτουργία HILIC λόγω της μικρότερης διαλυτότητας στην κινητή φάση ACN.

Επτά υδατοδιαλυτές βιταμίνες (θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, νικοτινικό οξύ, νικοτιναμίδα, πυριδοξάλη, φολικό οξύ και ασκορβικό οξύ) αναλύθηκαν με τη HILIC και η σύγκριση του ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (DAD), του ανιχνευτή φθορισμού (FLR) και της κουλομετρικής ανίχνευσης έχει αξιολογηθεί. Οι βιταμίνες B2 και B6 μπορούν να ανιχνευθούν καλά με ανίχνευση FLR επειδή εμφανίζουν ιδιότητες φυσικού φθορισμού. Από την άλλη πλευρά, οι βιταμίνες B6, B9 και C είναι οξειδοαναγωγικές δραστικές ενώσεις και μπορούν να ανιχνευθούν καλύτερα με κουλομετρική ανίχνευση, ενώ ο ανιχνευτής DAD μπορεί να χρησιμοποιηθεί για άλλες βιταμίνες του συμπλέγματος B. Η προσέγγιση HILIC-ID-MS βρέθηκε να είναι πιο πλεονεκτική για τις υδρόφιλες βιταμίνες B, συμπεριλαμβανομένης της νιασιναμίδης, θειαμίνης και πυριδοξίνης, εξαιρίζοντας τα προβλήματα που σχετίζονται με τη μέθοδο RP-LC (Fatima et al., 2019).



Εικόνα 2. Μηχανισμός συγκράτησης της HILIC (Fatima et al., 2019).

2.2.2. Υγρή Χρωματογραφία Εξαιρετικά Υψηλής Απόδοσης (UHPLC)

Η υγρή χρωματογραφία εξαιρετικά υψηλής απόδοσης (UHPLC), που χρησιμοποιεί στήλη διαχωρισμού αποτελούμενη από σωματίδια κάτω των 2μm και πίεση μεγαλύτερη από 20.000 psi, έχει αυξήσει την ευαισθησία και την ανάλυση της χρωματογραφικής ανάλυσης.

Η γρήγορη ταχύτητα ανάλυσης, η συμβατότητα με όλους τους κοινούς τρόπους ανίχνευσης της υψηλής απόδοσης υγρής χρωματογραφίας και τις στήλες υγρής χρωματογραφίας υψηλής θερμοκρασίας ή 2D-LC και η χρήση μικρότερης ποσότητας διαλύτη και δείγματος καθιστούν την τεχνική ανάλυσης πιο ευαίσθητη, προηγμένη και αποδοτική. Η χρήση στηλών μικροδιατρήσεων στην τεχνική UHPLC μπορεί να μειώσει την επιζήμια επίδραση στη φασματομετρία μάζας που προκαλείται από τον υψηλό ρυθμό ροής οργανικού διαλύτη στη RP-HPLC. Επιπλέον, η ενισχυμένη ανάλυση και τα χαμηλότερα LODs είναι χρήσιμα για τον διαχωρισμό των ομόλογων βιταμινών και την αποτελεσματική ανίχνευση χαμηλών συγκεντρώσεων διαφορετικών δευτερευουσών μορφών (Fatima et al., 2019).

Μέχρι στιγμής, οι περισσότεροι διαχωρισμοί των υδατοδιαλυτών βιταμινών έχουν πραγματοποιηθεί σε στήλες UPLC HSS T3 (υψηλής αντοχής πυρίτιο με τριλειτουργική αλκαλική φάση) και BEH (υβριδική γέφυρα αιθυλενίου) C18. Η στήλη HSS T3 με δεσμευμένη φάση C18 με βάση το πυρίτιο είναι κατάλληλη για τον διαχωρισμό πολικών υδρόφιλων υδατοδιαλυτών βιταμινών σε υψηλότερες πιέσεις καθώς και πιο συμβατή με την υδατική κινητή φάση. Επιπλέον, πιο έντονη και στενή κορυφή του CNCbl με υψηλότερη ανάλυση έχει ληφθεί στη στήλη HSS T3 C18 σε σύγκριση με τη στήλη BEH C18 πιθανόν λόγω του μεγαλύτερου αριθμού θεωρητικών πλακών. Ταυτόχρονος προσδιορισμός των βιταμερών της βιταμίνης Β6 πυριδοξίνη, πυριδοξίνη, πυριδοξαμίνη, μονοφωσφορικοί εστέρες τους και το 4-πυριδοξικό οξύ καθώς και η βιταμίνη Β12 ως ριβοφλαβίνη και η 5-φωσφορική εστεριβοφλαβίνη του φωσφόρου σε γάλα έχουν προσδιοριστεί επιτυχώς με χρήση της τεχνικής UHPLC εντός 6 λεπτών (Schmidt et al., 2017).

Η υγρή χρωματογραφία εξαιρετικά υψηλής απόδοσης είναι μια εξαιρετική τεχνική διαχωρισμού των υδατοδιαλυτών βιταμινών, ειδικά για τον προσδιορισμό βιταμερών/ ενεργών μορφών βιταμινών. Μέχρι σήμερα, υπάρχουν περιορισμένες εφαρμογές της ανάλυσης των βιταμινών με την τεχνική UHPLC, πιθανόν λόγω του υψηλού κόστους του εργαστηριακού εξοπλισμού της (Fatima et al., 2019). Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται ορισμένες πρόσφατες εφαρμογές των μεθόδων υγρής χρωματογραφίας με στόχο τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών και των ενεργών βιταμερών τους (Fatima et al., 2019).

Πίνακας 5. Σύνοψη των μεθόδων LC για την ανάλυση των υδατοδιαλυτών βιταμινών από το 2014-2018 (με επίκεντρο τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών και των ενεργών μορφών τους) (Fatima et al., 2019).

Προσδιοριζόμενη ουσία	Μήτρα	Συνθήκες LC	Ανίχνευση	Επικύρωση μεθόδου	Πηγή
Καφεΐνη, ασκορβικό οξύ, θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, 5-φωσφορικό (FMN) και ριβοφλαβίνη (B2), νικοτινικό οξύ, νικοτιναμίδη (B3), παντοθενικό οξύ (B5), πυριδοξάλη, πυριδοξαμίνη, πυριδοξίνη (B6), φολικό οξύ (B9), κυανοκοβαλαμίνη (B12)	Ενεργειακά ποτά	Στήλη Nova-Pak C18 (150mm×3.9mm, 5μm) Κινητή φάση: A=MeOH, B=0,05M NaH ₂ PO ₄ που περιέχει 0,005M εξανοδουλφονικό οξύ	DAD και FLD	LOD: 13 – 121 ng mL – 1 (LC-PDA) 8 και 61 ng mL – 1 (LC-FL) RSD: 1.87 – 1.73% (LC-PDA) 1.44 – 1.83% (LC-FL)	Gliszczynska Świąło et al., 2015
Βιταμίνη B1 (θειαμίνη, TMP, TDP)	Βοδινό γάλα	Στήλη UPLC (HSS T3, 100mm×2.1mm, 1.7μm) Κινητή φάση: A= Οξικό νάτριο σε UP νερό, B= Μεθανόλη	FLD	LOD: 0.99 – 1.56nmol/L LOQ: 3.29 – 5.52nmol/L	Schmidt et al, 2017
Βιταμίνες C, B1, B2, B9, B3, B6, ρετινόλη, γ-τοκοφερόλη, φυλλοκινόνη, λυκοπένιο, β-καροτένιο	Ντομάτες και φαρμακευτικά σκευάσματα	Στήλη C18 Kinetex (100mm×4.6mm, 2.6μm) Κινητή φάση: A=0,1% FA σε νερό, B=ACN, C=ACN/μεθανόλη/ HEX (90/8/2, v/v/v) που περιέχει 0,1% οξικό οξύ	UV	LOD: 0.6-200 μg/L LOQ: 2-700 μg/L	Melfi et al., 2018
L-AA, B1, B2, B3, B6 και B9	Δημητριακά	Zorbax HILIC Plus (100mm×4.6mm, 3.5μm) Κινητή φάση: A=10mM CH ₃ COONH ₄ σε H ₂ O:ACN (95:5) B=10mM CH ₃ COONH ₄ σε ACN:H ₂ O (95:5)	ECD (30mV)	LOD: 0.16 μg/mL LOQ: 0.55 μg/mL	Langer et al., 2014

B6, B9, B12	Φυτά (<i>S. aegyptiaca</i> και <i>S. vera</i>)	Στήλη MZ ODS-C18 (250×4.6 mm, 5μm) Κινητή φάση: Meth- anol-phosphate buffer solution	DAD	LOQ: LOD: 1.8-4.8 mg/kg R^2 : 0.999 Recoveries: 91- 102%	Chamkour et al., 2015
Ριβοφλαβίνη (B2), νι- κοτιναμίδη (B3), πυρι- δοξίνη (B6)	Χυμοί φρού- των	Στήλη Agilent C18 (4.6mm×250mm, 5μm) Κινητή φάση: water-methanol-ace- tic acid (72%:27%:1%, v/v)	UV	LOQ: 4.0-18.4μg L - 1 LOD: 1.2-5.5μg L - 1	Ostovan et al., 2018
Θειαμίνη, ριβοφλα- βίνη, νικοτιναμίδη, νι- κοτινικό οξύ, πυριδο- ξίνη, πυριδοξάλη, βιο- τίνη, παντοθενικό οξύ, FAD	Ανθρώπινο γάλα	Στήλη UPLC HSS T3 (2.1×100MM, 1.8μm) Κινητή φάση: A=ACN, B=Μυρμηκικό αμ- μόνιο σε νερό	ESI-MS	LOQ: 0.5-45 ng/ml LOD: 0.15-13.6 ng/ml	Luo et al., 2017
Θειαμίνη, ριβοφλα- βίνη, νικοτιναμίδη και νικοτινικό οξύ, παντο- θενικό οξύ, πυριδο- ξίνη, βιοτίνη, φολικό οξύ		Waters Acquity BEH C18 (2.1×100 mm, 1.7μm) Κινητή φάση: A = 20 mM μυρμη- κικό αμμώνιο, B = μεθανόλη	ESI MS/MS	LOQ: 0.627-100 mg/kg LOD: nr RSD: 3.4 ± 2.6% Recovery: 100.2 ± 2.4% (n = 160).	Le- biedzinska et al., 2018

2.2.2. Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE)

Οι χρωματογραφικές τεχνικές είναι πιο ευαίσθητες για τον προσδιορισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε σύγκριση με τις τεχνικές της CE. Από την άλλη πλευρά, οι μέθοδοι που βασίζονται στη τριχοειδή ηλεκτροφόρηση παρουσιάζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σύγκριση με τις μεθόδους που βασίζονται στην υγρή χρωματογραφία. Το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου CE είναι το πρόβλημα της μικρότερης ευαισθησίας, το οποίο μπορεί να λυθεί με τη χρήση κατάλληλων ανιχνευτών, όπως ο φθορισμός (LIF) και με χρήση κατάλληλης μεθόδου εξαγωγής για τον εμπλουτισμό των αναλυτών. Οι κοινώς χρησιμοποιούμενες μέθοδοι που βασίζονται στη τεχνική CE για τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες περιλαμβάνουν την ηλεκτροφόρηση τριχοειδών ζωνών (CZE), τη μικκυλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (MEKC) και την τριχοειδή ηλεκτροχρωματογραφία (CEC).

Στην μικκυλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (MEKC) συμβαίνουν υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τον αναλύτη επειδή τα μικκύλια επιφανειοδραστικών ουσιών στο υπόβαθρο του ηλεκτρολύτη (BGE) δρουν ως ψευδοστάσιμη φάση. Οκτώ υδατοδιαλυτές βιταμίνες έχουν αναλυθεί από τη MEKC χρησιμοποιώντας σύστημα HP3D CE με DAD σε ενεργειακά και αθλητικά ποτά. Στη μελέτη αυτή, το δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (SDS) μπόρεσε να διαχωρίσει το ζεύγος βιταμινών B5-C και έδωσε τον καλύτερο διαχωρισμό σε σύγκριση με άλλα ελεγμένα επιφανειοδραστικά όπως το χολικό νάτριο (SC) και το δεοξυ-χολικό νάτριο (SDC). Ωστόσο, η μέθοδος της MEKC δεν ήταν κατάλληλη για τον προσδιορισμό των βιταμινών B12 λόγω της πολύ χαμηλής συγκέντρωσής του κάτω από το LOQ. Η βελτιστοποίηση του υποβάθρου ηλεκτρολύτη CE είναι σημαντική για την ελαχιστοποίηση τυχόν παρεμβολών (Mazina et al., 2010). Ταυτόχρονη ανάλυση των συμπληρωμάτων διατροφής και των εκχυλισμάτων αγκινάρας σε πολυβιταμίνες βιταμίνης C και τεσσάρων βιταμινών B έχει πραγματοποιηθεί από την μικκυλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία χρησιμοποιώντας βορικό ρυθμιστικό διάλυμα σε *pH* 8.2, SDS ως επιφανειοδραστικό και 2-χλωρονικοτινικό οξύ ως εσωτερικό πρότυπο (Serni et al., 2013). Ο ταυτόχρονος διαχωρισμός δέκα υδατοδιαλυτών βιταμινών έχει πραγματοποιηθεί σε συντηγμένο πυριτικό τριχοειδές από λειτουργία MEKC με ανίχνευση UV. Το ρυθμιστικό διάλυμα βορικού που περιέχει αιθανόλη έχει χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της επιλεκτικότητας και της αποτελεσματικότητας του διαχωρισμού (Da Silva et al., 2013).

Η τριχοειδής ηλεκτροχρωματογραφία (CEC) είναι ένας συνδυασμός των τεχνικών HPLC και CE, όπου οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες διαχωρίζονται συνήθως σε λειτουργία τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης, ενώ οι λιποδιαλυτές βιταμίνες μπορούν να διαχωριστούν κυρίως από την αλληλεπίδρασή τους με μια στατική φάση. Ο ταυτόχρονος διαχωρισμός των υδατοδιαλυτών και των λιποδιαλυτών βιταμινών έχει επιτευχθεί χρησιμοποιώντας την μέθοδο CEC υποβοηθούμενη από πίεση με τριχοειδή μονολιθική στήλη με βάση το μεθακρυλικό. Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση σε συνδυασμό με την μέθοδο ICP-MS (Επαγωγικά Συζευγμένο Πλάσμα- Φασματομετρία Μάζας) έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για ανάλυση διαφορετικών μορφών κοβαλαμινών της βιταμίνης B12 σε σχετικά απλά δείγματα, όπως συμπληρώματα διατροφής και δείγμα χλωρέλλας (Chen et al., 2008). Σε μια πρόσφατη μελέτη (Ni et al., 2014), εφαρμόστηκε ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (EKC) για το διαχωρισμό υδατοδιαλυτών και λιποδιαλυτών βιταμινών σε συντηγμένο πυριτικό τριχοειδές, με χρήση πολυμερούς μικκυλίου, που σχηματίζεται από τυχαίο συμπολυμερές (stearyl methacrylate-co-methacrylic acid) ως ψευδοστατική φάση και ρυθμιστικό διάλυμα 25 mM Tris που περιέχει 125 mM SDS ως ηλεκτροφορητικό διάλυμα.

2.3. Μέθοδοι προσδιορισμού λιποδιαλυτών βιταμινών

Κυρίως, λόγω του μεγάλου αριθμού των μορφών βιταμινών που εμφανίζονται φυσικά στα τρόφιμα, η υγρή χρωματογραφία (LC) σε όλες τις παραλλαγές της [υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), υγρή χρωματογραφία εξαιρετικά υψηλής απόδοσης (HILIC), νανο-υγρή χρωματογραφία (nano-LC), δισδιάστατη υγρή χρωματογραφία (2DLC)] είναι η καταλληλότερη τεχνική για την ανάλυση των λιποδιαλυτών βιταμινών. Επίσης, κομβικό είναι η ευελιξία που σχετίζεται με την ποικιλία των χρωματογραφικών μοντέλων [κανονική φάση (NP), αντίστροφη φάση (RP), μη υδατική αντίστροφη φάση (NARP), στατικές φάσεις (SPs)] και συσκευασίες στηλών (πορώδη σωματίδια 2-5 μ m, σωματίδια κάτω των 2mm, σωματίδια με πυρήνα κέλυφους και μονόλιθοι). Επομένως, η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με μια μεγάλη ποικιλία από ανιχνευτές (υπεριώδους/ ορατού (UV/Vis), φθορισμού (FL), ηλεκτροχημικοί (EL), φασματομετρίας μάζας (MS)], προσφέρει μια σειρά τεχνικών για τον διαχωρισμό και τον προσδιορισμό των βιταμινών σε σύνθετες μήτρες όπως τα τρόφιμα. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος LC-MS παρέχει τόσο επιλεκτικότητα όσο και ευαισθησία για τον εντοπισμό και την μελέτη των πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων ορισμένων μορφών/ μεταβολιτών βιταμινών.

2.3.1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

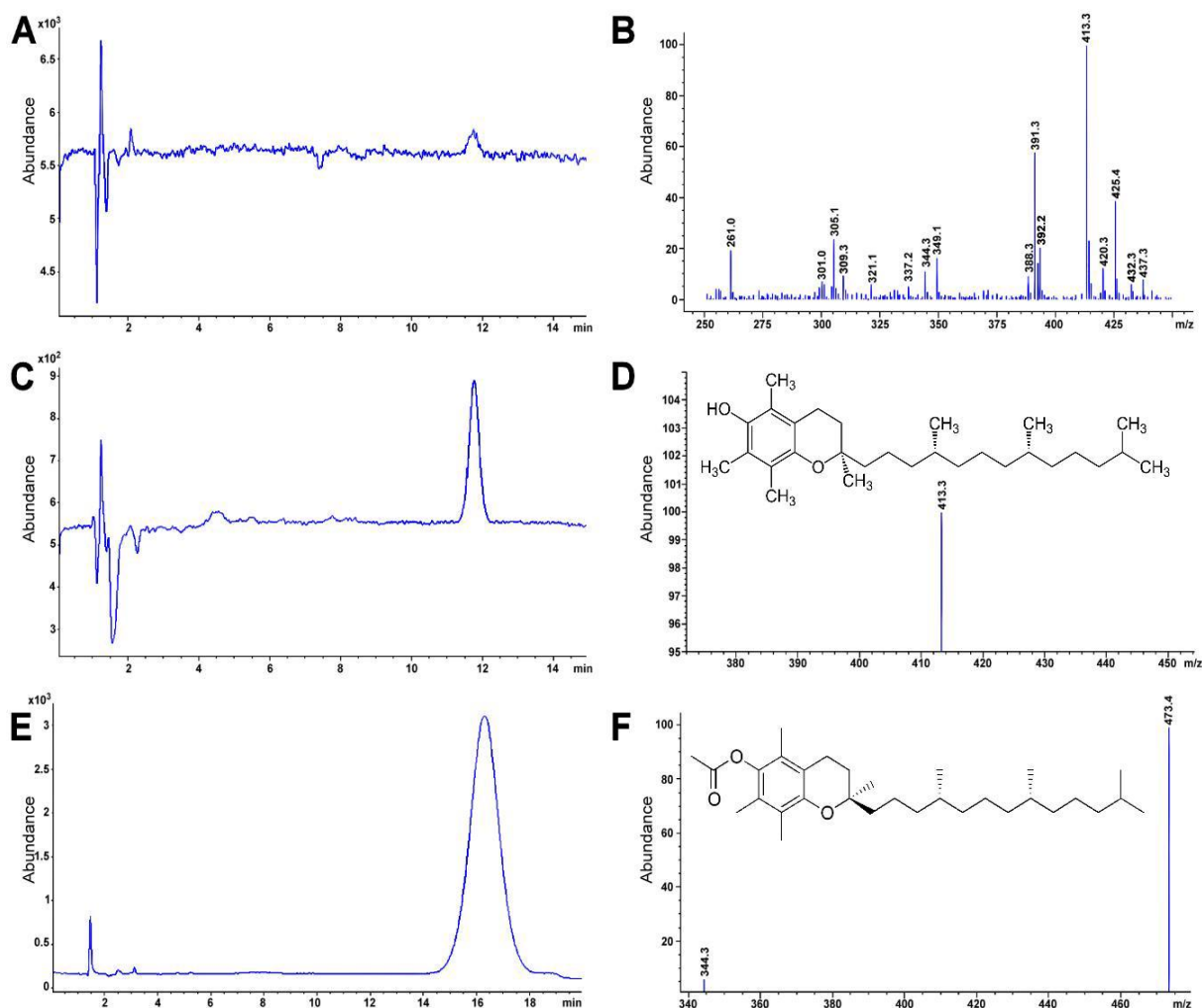
Οι μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης κανονικής φάσης (NP), αντίστροφης φάσης (RP) και μη υδατικής αντίστροφης φάσης (NARP) είναι οι πιο συνηθισμένοι μέθοδοι HPLC που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό των λιποδιαλυτών βιταμινών. Το είδος της μήτρας του τροφίμου, οι μορφές βιταμινών και η δειγματοληψία είναι οι κρίσιμοι παράγοντες για την επιλογή της μεθόδου χρωματογραφίας που πρέπει να χρησιμοποιηθεί (Fanali et al., 2017).

2.3.1.1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης κανονικής φάσης (NP HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης κανονικής φάσης (NP HPLC) έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για τον διαχωρισμό των cis- και trans- ισομερών της ρετινόλης καθώς και των οκτώ ομοειδών της βιταμίνης E, επιτρέποντας την ατομική ποσοτικοποίηση των β- και γ-ισομερών. Ένα ακόμη πλεονέκτημα των στηλών κανονικής φάσης συνίσταται στην ανοχή σχετικά υψηλών φορτίων λιπιδικού υλικού, το οποίο δεν απορροφάται έντονα και μπορούν

εύκολα να αφαιρεθούν από την στήλη λόγω μη πολικής κινητής φάσης. Επειδή η σαπωνοποίηση δεν είναι απαραίτητη για την απομόνωση της αναλυόμενης ουσίας, η ικανότητα αυτή μπορεί να αξιοποιηθεί για την άμεση έγχυση εκχυλισμάτων από λιπαρά τρόφιμα, όπως μαργαρίνη, λάδι και γάλα, με εκχύλιση/ αραίωση δείγματος με εξάνιο. Στην περίπτωση αυτή, η ανίχνευση φθορισμού προτιμάται από την ανίχνευση απορρόφησης δεδομένου ότι επηρεάζεται λιγότερο από τα παρεμβαλλόμενα λιπίδια που συνεκχυλίζονται από την στήλη. Ωστόσο, ένας ουσιαστικός περιορισμός της Normal Phase HPLC αποτελεί η μη πλήρης καταλληλότητα για τον ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας. Στην πραγματικότητα, οι περισσότερες κινητές φάσεις που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση λιποδιαλυτών βιταμινών χρησιμοποιούν ένα δυαδικό σύστημα διαλυτών με βάση το εξάνιο σε συνδυασμό με πολικούς οργανικούς τροποποιητές, συμπεριλαμβανομένων των αιθέρων ή αλκοολών σε χαμηλό ποσοστό, το οποίο δεν ευνοεί ούτε τον ηλεκτροψεκασμό (EC) ούτε τον χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI). Παρ' όλα αυτά, ο Strobel et al. (2013) εφάρμοσε ανάλυση χρωματογραφίας με ανίχνευση παγίδας ιόντων APCI για την διάκριση και τον προσδιορισμό της βιταμίνης D2, D3, 25-OHD2 και 25-OHD3 στο κρέας. Ωστόσο, η NP-HPLC σε συνδυασμό με τις μεθόδους ανίχνευσης UV-Vis, φθορισμού και ηλεκτροχημικής ανίχνευσης, έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση των τοκοφερόλων και ειδικότερα των τοκοτριενολών, των οποίων η ταυτοποίηση επιβεβαιώνεται και από τη σειρά έκλουσης: $\alpha\text{-T} < \alpha\text{-T3} < \beta\text{-T} < \gamma\text{-T} < \beta\text{-T3} < \gamma\text{-T3} < \delta\text{-T} < \delta\text{-T3}$ (Gee et al., 2016).

Η αναλυτική μέθοδος για τον προσδιορισμό των βιταμινών στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές, είναι η υγρή χρωματογραφία (HPLC ή UPLC), λόγω της επιλεκτικότητας, του μικρού χρόνου ανάλυσης και της υψηλής απόδοσης. Οι μέθοδοι που βασίζονται στη χρωματογραφία μπορούν εύκολα να αυτοματοποιηθούν και να προσδιορίσουν πολλές ενώσεις την ίδια ώρα. Οι μέθοδοι κυμαίνονται από τη χρήση χρωματογραφίας κανονικής φάσης με στήλες πυριτίου έως τη χρήση χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης με στήλες C8, C18 και C30. Οι Lee et al. (2011) μελέτησαν τρεις διαφορετικές στήλες για τον διαχωρισμό της βιταμίνης A και E: μία στήλη NH_2 , C30 και C18 (Εικόνα 3). Στο τέλος της ανάλυσης, παρατήρησαν ότι η τοκοφερόλη και οι κορυφές της τοκοφερόλης της βιταμίνης E δεν διαχωρίστηκαν και εμφανίστηκαν ως μια ενιαία επικαλυπτόμενη κορυφή όταν χρησιμοποιείται η στήλη C18, αλλά θα μπορούσε να διαχωριστεί χρησιμοποιώντας τη στήλη NH_2 . Όσον αφορά τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, η στήλη NH_2 παρουσίασε χαμηλότερες τιμές από τη στήλη C8 αλλά υψηλότερες από τη C18.



Εικόνα 3. Χρωματογραφίες LC/MS ESI+ μονού τετραπολικού (A) χρωματογράφημα ολικού ιόντος α-τοκοφερόλη (διάλυμα 1 mg L σε βουτανόλη) το σήμα αναγνωρίστηκε θετικά στα 11,75 λεπτά (B) Φασματογράφημα μάζας για α-τοκοφερόλη (διάλυμα 1 mg L σε βουτανόλη) χρησιμοποιώντας ενέργεια κώνου 120V που εξάγεται από ένα σήμα με χρόνο κατακράτησης 11,71 λεπτά (C) α-τοκοφερόλη (χρόνος κατακράτησης 11,77 λεπτά) που προσδιορίζεται σε δείγμα πλάσματος κοτόπουλου μετά την εκχύλιση με χλωροφόρμιο και βουτανόλη (D) α-τοκοφερόλη σε επιλεγμένο ιόν λειτουργία παρακολούθησης (SIM) χρησιμοποιώντας ενέργεια κώνου 120V που εξάγεται από το σήμα με χρόνο συγκράτησης 11,82 λεπτά (E) α-οξική τοκοφερόλη σε ενέσιμο διάλυμα βιταμίνης E για κτηνιατρική χρήση χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση «αραιωμένο και βολή» (16,32 λεπτά) και (F) α-οξική τοκοφερόλη σε λειτουργία SIM χρησιμοποιώντας ενέργεια κώνου 60V που εξάγονται από το σήμα με χρόνο συγκράτησης 16,34 λεπτά (Lee et al., 2011).

Τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιούνται ως κινητή φάση ποικίλλουν ανάλογα με την επιλεγμένη προσέγγιση. Στην περίπτωση της χρωματογραφίας κανονικής φάσης, ως συστήματα διαλυτών χρησιμοποιούνται κυρίως η 2-προπανόλη/εξάνιο σε διαφορετική αναλογία, καθώς επίσης και η μεθανόλη/εξάνιο/THF (97.25:2.5:0.25) ή εξάνιο/MTBE (96:4). Σε αντίστροφη φάση, οι πιο κοινές είναι οι MeOH-H₂O, MeOH-CAN, και οι δύο τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε βαθμωτή ή ισοκρατική λειτουργία.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η τεχνική υγρής χρωματογραφίας έχει μεγάλη ποικιλία από τεχνικές παρακολούθησης, η οποία περιλαμβάνει PDA, FLD, ECD, ELSD ή MSD. Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής για τις βιταμίνες είναι ο φθορισμομετρικός, ο οποίος είναι πολύ ευαίσθητος και εκλεκτικός σε σχέση με τον ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας. Επομένως, είναι δυνατή η διεξαγωγή ταυτόχρονου προσδιορισμού της βιταμίνης A και E, για την οποία προγραμματίζεται ο απαιτούμενος εξοπλισμός έτσι ώστε σε ορισμένα χρονικά διαστήματα να χρησιμοποιείται το μήκος κύματος διέγερσης (λ_{ex}) και το μήκος κύματος εκπομπής (λ_{em}) που καθορίζεται για κάθε βιταμίνη. Πιο συγκεκριμένα, για τη βιταμίνη E, $\lambda_{ex}=285\text{nm}$ και $\lambda_{em}=470\text{nm}$ και για τη βιταμίνη A, $\lambda_{ex}=325\text{nm}$ και $\lambda_{em}=470\text{nm}$, ενώ δεν μπόρεσαν να ανιχνευθούν άλλες βιταμίνες όπως η K ή D. Εναλλακτικά, ο ανιχνευτής PDA μπορεί να λειτουργήσει σε πολλαπλά μήκη κύματος UV και να καθορίσει τέσσερις βιταμίνες την ίδια στιγμή. Η συζευγμένη χρωματογραφία φασματομετρίας μάζας είναι συνήθως η πιο ευέλικτη επιλογή για τον προσδιορισμό των βιταμινών. Ωστόσο, το εργαστήριο μελέτης απαιτεί να έχει τους απαραίτητους πόρους για την απόκτησή του. Με επιτυχία έχει εφαρμοστεί φασματομετρία μάζας για την αξιολόγηση των τοκοφερολών σε συμπληρώματα ζωοτροφών και σε βιολογικά δείγματα ζώων.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι πρώτες μέθοδοι που αναπτύχθηκαν στην ανάλυση της βιταμίνης D βασίστηκαν σε ανταγωνιστικές μεθόδους δέσμευσης συνδετή για ορό/πλάσμα. Πιο πρόσφατα, αυτοματοποιημένες και ημιαυτόματες ανοσοδοκιμασίες έχουν αναπτυχθεί για την ανάλυση υψηλής απόδοσης της 25-υδροξυβιταμίνης (25-OHD). Σε πρόσφατες έρευνες χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός λεπτής στρώσης χρωματογραφίας και φασματοφωτομετρικές τεχνικές για τη διερεύνηση της περιεκτικότητας σε βιταμίνη D στο μητρικό γάλα. Αργότερα, έγινε εφαρμογή ενός συνδυασμού HPLC και δοκιμασιών δέσμευσης προσδέματος/ ανταγωνιστικής δέσμευσης πρωτεϊνών για το διαχωρισμό και την εκτίμηση των μεταβολιτών της βιταμίνης D στο μητρικό γάλα. Τα μειονεκτήματα της ανάλυσης είναι η περιορισμένη ευαισθησία και διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ των διαφορετικών μεταβολιτών της βιταμίνης D. Ως εκ τούτου, η χρήση της φασματομετρίας μάζας κερδίζει

δημοτικότητα για τη μέτρηση των μεταβολιτών της βιταμίνης D και θεωρείται ιδανική μέθοδος λόγω της αυξημένης ευαισθησίας και ειδικότητάς της στην ανίχνευση (Tuddenham et al., 2021).

Η μέθοδος LC-MS/MS της βιταμίνης D στο μητρικό γάλα βασίζεται σε τρεις κύριες διαδικασίες εκχύλισης, χρωματογραφικός διαχωρισμός, φασματομετρία μάζας διαχωρισμού και ανίχνευσης. Παρόμοια με τις μεθόδους που βασίζονται στο αίμα, τυπικά η ανάλυση LC-MS/MS της βιταμίνης D στο μητρικό γάλα περιλαμβάνει χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, ένα πρόγραμμα βαθμίδωσης διαλύτη νερού και μεθανόλης (MeOH) και τη χρήση κατάλληλου εσωτερικού προτύπου (ISTD) για τη διόρθωση τυχόν απώλειας δείγματος κατά την εξαγωγή, και συνέπειες της καταστολής ιόντων. Η τεχνική LC-MS/MS είναι λιγότερο ευαίσθητη μέθοδος ως προς τα αποτελέσματα της μήτρας σε σύγκριση με την ανοσοδοκιμασία. Έχει επίσης το πλεονέκτημα να διακρίνει διαφορετικούς μεταβολίτες της βιταμίνης D μεταξύ τους, καθιστώντας τη μέθοδο αυτή ιδιαίτερα ευαίσθητη και ως εκ τούτου ιδανική για την ανίχνευση μεταβολιτών της βιταμίνης D στο μητρικό γάλα. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι δεν διαχωρίζουν όλες οι μέθοδοι την 25-υδροξυβιταμίνη D3 από το επιμερές του, με αποτέλεσμα να υπάρχουν δυναμικές ανακρίβειες (Tuddenham et al., 2021). Στον Πίνακα 6 γίνεται σύγκριση τεχνικών προετοιμασίας δειγμάτων και μεθόδων ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών της βιταμίνης D σε μητρικό γάλα ή άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Πίνακας 6. Τεχνικές προετοιμασσίες δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση των μεταβολιτών της βιταμίνης D σε ανθρώπινο μητρικό γάλα ή σε γαλακτοκομικό γάλα ή προϊόντα (Tuddenham et al., 2021).

Δείγμα	Μεταβολίτες βιταμίνης D	Τεχνική εξαγωγής	Μέθοδος ανάλυσης	Ποσοστό εύρεσης
Μητρικό γάλα, 5-10mL	25-OHD2, 25-OHD3, Βιταμίνη D2, D3	SPE – 0,5g silica column	LC-MS/ MS	-
Μητρικό γάλα, 10mL	25-OHD2, 25-OHD3, Βιταμίνη D2, D3	LLE – εξάνιο	LC-MS/ MS	90,9-105%
Μητρικό γάλα	25-OHD2, 25-OHD3, Βιταμίνη D2, D3	LLE – επτάνιο	LC-MS/ MS	-

Αγελαδινό γάλα, 4mL	25-OHD2, 25-OHD3, 3-epi25-OHD3, Βιταμίνη D2, D3	LLE – εξάνιο	LC-MS/ MS	88,2-105%
Αγελαδινό γάλα, 10mL	Βιταμίνη D3	LLE – εξάνιο	LC-MS/ MS	78%
Εμπλουτισμένο και μη αγελαδινό γάλα, 50mL	Βιταμίνη D2, D3	LLE – εξάνιο	HPLC/ UV	88-99%
Διάλυμα μη-τρικού γάλακτος, 0.5g αραιωμένα σε 10mL νερό	Βιταμίνη D3	SPE	LC-MS/ MS	93,1-110,6%
Διάλυμα μη-τρικού γάλακτος, 10g αραιωμένα σε 40mL αιθανόλη	Βιταμίνη D3	LLE – εξάνιο	UFLC-DAD	89,5-105,1%

Πολλές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί συστηματικά στην ποσοτικοποίηση της βιταμίνης D, συμπεριλαμβανομένης της δοκιμασίας της ανταγωνιστικής πρωτεϊνικής δέσμευσης (CPB), τις ραδιοανοσοδοκιμασίες (RIA), τις ανοσοδοκιμασίες χημειοφωταύγειας (CLIA), τη υγρή χρωματογραφία (LC) με ανίχνευση UV, και υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS) ή διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS). Σε κλινική πράξη, οι δοκιμασίες CPB, RIA και CLIA παραμένουν οι πιο ευρέως εφαρμοσμένες δοκιμασίες. Διατίθεται σε μορφή κιτ και μπορούν να αυτοματοποιηθούν εύκολα σε υψηλή απόδοση, επιτρέποντας εκατοντάδες δείγματα να μετρούνται ανά ώρα (Volmer et al., 2013).

Οι μέθοδοι υγρής χρωματογραφίας συχνά εφαρμόζονταν στο παρελθόν χρησιμοποιώντας κυρίως ανιχνευτή UV. Η αναλυτική προδιαγραφή της ανίχνευσης UV είναι περιορισμένη, αλλά το κύριο πλεονέκτημα των μεθόδων που βασίζονται σε LC είναι η ικανότητα να διαχωρίζουν τα διαφορετικά είδη της βιταμίνης D, επιτρέποντας την ατομική ποσοτικοποίηση και αφαίρεση των ειδών που παρεμβάλλονται. Ένα απλό παράδειγμα είναι η ειδική αξιολόγηση της συμπλήρωσης βιταμίνης D2 σε ασθενείς μετά από διαχωρισμό της 25-υδροξυβιταμίνης D2 και της 25-υδροξυβιταμίνης D3 (Volmer et al., 2013).

Η μέθοδος LC-MS προσφέρει πρόσθετα πλεονεκτήματα μετρώντας τις αναλογίες μάζας (m/z) ως χαρακτηριστικό ανίχνευσης, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με τη διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS/MS). Το χαρακτηριστικό αυτό παρέχει πληροφορίες για συγκεκριμένα στοιχεία της δομής των μορίων μετά τη διάσπαση των ιονισμένων μορίων σε θραύσματα κατά τη διάρκεια MS/MS. Ένα ακόμη εγγενές πλεονέκτημα της τεχνικής που βασίζονται στην MS είναι ότι μπορούν να αντιπροσωπεύουν τη δέσμευση πρωτεΐνης με την εφαρμογή προτύπων ισοτόπων των ειδών της βιταμίνης D ως εσωτερικά πρότυπα (Volmer et al., 2013).

Σε μια πρόσφατη μελέτη σχετικά με τις τεχνικές LC-MS/MS για την ανάλυση της βιταμίνης D, έγινε αναφορά ότι ιδανικά, ένα καθολικό χρυσό πρότυπο προσδιορισμού θα επέτρεπε την ποσοτικοποίηση σε επίπεδα υψηλής απόδοσης, με εξαιρετική αναπαραγωγικότητα και ακρίβεια σε διαφορετικά εργαστήρια. Ταυτόχρονα, θα έπρεπε να είναι απλή στην εκτέλεση και την εφαρμογή της. Το συμπέρασμα είναι ότι, δυστυχώς, επί του παρόντος δεν υπάρχει τέτοιος προσδιορισμός. Παρ' όλα αυτά, η τεχνική LC-MS/MS περιγράφεται συχνά ως ένα τέτοιο χρυσό πρότυπο στη βιβλιογραφία. Επομένως, είναι σημαντικό να επισημάνουμε ότι η φασματομετρία μάζας εμφανίζει εγγενείς πηγές διακύμανσης και σφαλμάτων, οι οποίες θα πρέπει να αποκαλυφθούν και να διορθωθούν. Αυτά περιλαμβάνουν επιδράσεις μήτρας, χημικά επιμέρη, ζητήματα επιλεκτικότητας φασματικής μάζας από ισομερή και ισοβαρή παρεμβολές, επιρροή διαφορετικών πηγών ιονισμού [πρακτικά, χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI) έναντι ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI)], γενική ευαισθησία και περιορισμοί λόγω της περιορισμένης απόδοσης ιονισμού (Volmer et al., 2013).

Αξίζει να αναφέρουμε στο σημείο αυτό, ωστόσο, τους περιορισμούς της μεθόδου LC-MS/MS που σχετίζονται με παρεμβολές και μπορεί να προκαλέσει μεταβλητότητα που σχετίζεται με τη μέθοδο στα αποτελέσματα της 2,5-υδροξυβιταμίνης D₃. Ιδιαίτερη ανησυχία προκαλεί η επιζήμια συνεισφορά άλλων χημικών ενώσεων στη μετρούμενη συγκέντρωση της 2,5-υδροξυβιταμίνης D₃, οι οποίες προέρχονται κυρίως από συν-ιονισμένα συστατικά, προερχόμενα από το εκχύλισμα του δείγματος, συνέκλουση ισοβαρικών μορίων από ενδογενείς και εξωγενείς πηγές καθώς και ισομερή όπως το C-3 επιμερές. Παρεμβολές από συνεκλούμενα συστατικά από το εκχύλισμα του δείγματος μπορεί να προκαλέσει ένα φαινόμενο που ονομάζεται καταστολή ιόντων. Η διαδικασία αυτή περιγράφει τη μείωση (σπάνια ενίσχυση) του μετρούμενου σήματος της αναλυόμενης ουσίας από άλλα συστατικά που τυχαίνει να εισέρχονται ταυτόχρονα στην πηγή ιόντων και που στη συνέχεια ιονίζεται κατά προτίμηση έναντι της ένωσης που μελετάται. Σταθερά πρότυπα ισοτόπων της 2,5-υδροξυβιταμίνης D₃ χρησιμοποιούνται για διόρθωση τυχόν συστηματικών σφαλμάτων από

την καταστολή ιόντων, καθώς η πρωτεϊνική δέσμευση του ισοτοπικά επισημασμένου ανάλογου είναι παρόμοια με αυτή της 2,5-υδροξυβιταμίνης D3 (Volmer et al., 2013).

2.3.1.2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP HPLC)

Σε σύγκριση με την HPLC κανονικής φάσης, η υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης RP HPLC προσφέρει μια σειρά από πλεονεκτήματα που περιλαμβάνουν τη χρήση κατάλληλης κινητής φάσης για πιο ευαίσθητη ανίχνευση φασματομετρίας μάζας, μεγαλύτερη ανθεκτικότητα των χρωματογραφικών στηλών, αναπαραγωγικότητα των χρόνων συγκράτησης, της γρήγορης εξισορρόπησης και του σχηματισμού της βέλτιστης κορυφής. Για τους λόγους αυτούς, η πλειοψηφία των λιποδιαλυτών βιταμινών έχει διαχωριστεί με HPLC σε στήλες C18. Για παράδειγμα, ο Jakobsen et al (2009) εφάρμοσε τη στήλη C18 με υψηλό φορτίο άνθρακα για την διάκριση της βιταμίνης D2 από τη D3 σε βοοειδές γάλα και βούτυρο.

Εναλλακτικά, οι στήλες C30 (τριακοντύλιο) και PFP (πενταφθοροφαινύλιο) επιτρέπουν στα όργανα της HPLC την ανίχνευση και τον διαχωρισμό λιποδιαλυτών βιταμινών. Έπειτα από μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η στήλη C30 αποτελεί το «χρυσό πρότυπο» στο χρωματογραφικό διαχωρισμό των καροτενοειδών, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί λιγότερο για τις λιποδιαλυτές βιταμίνες. Το κύριο πλεονέκτημα της στήλης C30 είναι η επιλεκτικότητα σχήματος που επιτρέπει τη μερική ή πλήρη ανάλυση των γεωμετρικών ισομερών και των ισομερών θέσης. Ο βαθμός διαχωρισμού εξαρτάται κυρίως από την σύνθεση της κινητής φάσης καθώς και από τη θερμοκρασία της στήλης C30. Καλύτερα αποτελέσματα διαχωρισμού παρατηρούνται σε θερμοκρασία υποπεριβάλλοντος λόγω φαινομένου ευθυγράμμισης της αλυσίδας. Επιπλέον, μια στήλη C30, σε σύγκριση με τη στήλη C18, είναι λιγότερο αποτελεσματική και εμφανίζει ευρύτερες χρωματογραφικές κορυφές. Αυτό συνεπάγεται υψηλότερα όρια ανίχνευσης (LODs) και μικρότερη ικανότητα για ανίχνευση και ποσοτικοποίηση δευτερευόντων μικροθρεπτικών συστατικών σε ένα τρόφιμο. Ειδικότερα, η φάση του δεσμού PRP, εκτός από την ευνοϊκή κατακράτηση πολικών και ιοντικών ενώσεων, παρουσιάζει μια σχετική ακαμψία που παρέχει ανώτερη επιλεκτικότητα σχήματος των παρόμοιων αναλυτών για διαχωρισμό, αλλά διαφέρουν ως προς το μέγεθος και τη χωροδιάταξη. Η πρόσφατη, λοιπόν, εμπορική διαθεσιμότητα των PFP επέτρεψε τον διαχωρισμό των β- και γ- τοκοφερόλων με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα απ' αυτή των συμβατικών στηλών πυριτίου (Gornas et al., 2015).

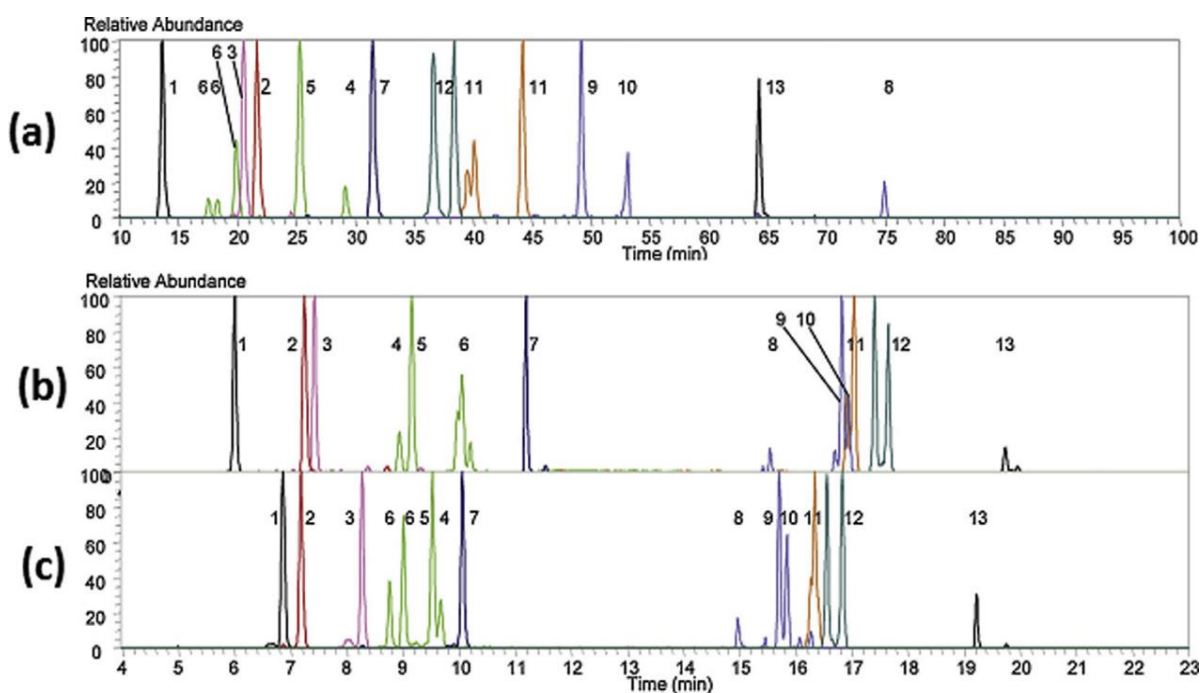
Η χρωματογραφία μη υδατικής αντίστροφης φάσης (Non-Aqueous Reversed Phase, NARP) είναι ένα είδος υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης, η οποία έχει σχεδιαστεί για τον διαχωρισμό ενώσεων χαμηλής πολικότητας και έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τον διαχωρισμό των λιποδιαλυτών βιταμινών και των καροτενοειδών. Η χρωματογραφία αυτή κάνει χρήση και των δύο χαμηλών πολικών εκλουστικών για τη βελτίωση της διαλυτότητας της αναλυόμενης ουσίας και της υψηλής συγκράτησης της στερεής φάσης (π.χ. C18 με υψηλό φορτίο άνθρακα 20%-ποσότητα συνδεδεμένης φάσης στο υλικό βάσης, εκφρασμένη ως % C ή C30) για να εξισορροπηθεί η αυξημένη συγγένεια αναλυόμενης ουσίας για την κινητή φάση της NARP. Περισσότερο πολικός διαλύτης είναι συνήθως η μεθανόλη ή το ακετονιτρίλιο, ενώ ο τροποποιητής είναι ένας ισχυρότερος διαλύτης, όπως το διχλωρομεθάνιο ή/και ένα μείγμα διαλυτών, όπως το 2-προπανόλη:εξάνιο 50:50 (v/v). Αξιόζει να σημειωθεί ότι η επιλεκτικότητα αυξάνεται όσο η διαφορά πολικότητας μεταξύ κινητής και στερεής φάσης γίνεται μικρότερη (Fanali et al., 2017).

Ωστόσο, η κινητή φάση NARP δεν είναι συμβατή με το χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης, APCI για τον ιοντισμό των λιποδιαλυτών βιταμινών. Σε σχετικά πρόσφατη μελέτη, οι Gentili et al. (2007) μελέτησαν τη σύνθεση της NARP-MP για να προσδιορίσουν τόσο χρωματογραφικές όσο και φασματομετρικές απαιτήσεις μάζας για το προφίλ των λιποδιαλυτών μικροθρεπτικών συστατικών σε διάφορα τρόφιμα. Ως πολικός διαλύτης επιλέχθηκε μεθανόλη, ενώ το μείγμα 2-προπανόλη:εξάνιο (50:50, v/v) επιλέχθηκε ως τροποποιητής, όπου το εξάνιο χρησιμοποιήθηκε για τη μείωση του χρόνου κατακράτησης των καροτενίων και την αποφυγή της διεύρυνσης της κορυφής λόγω διάχυσης. Η μεθανόλη και η 2-προπανόλη ήταν αποτελεσματικοί στην υποστήριξη της APCI λόγω της συμμετοχής τους στις βασικές αντιδράσεις οξέος στην αέρια φάση. Η σύνθεση της κινητής φάσης εγγυάται τη διαλυτότητα των αναλυτών καθώς και την πλήρη διάλυση των εκχυλισμάτων που λαμβάνονται από ιδιαίτερα λιπαρά τρόφιμα.

Είναι περισσότερο από μία δεκαετία όπου η τεχνολογία της UHPLC είναι πλέον διαθέσιμη και επιτρέπει τη χρήση στηλών πληρωμένων με σωματίδια κάτω των 2mm. Σε σύγκριση με τις τυπικές στήλες HPLC συνήθως πληρωμένων με σωματίδια 2×5mm, η χρήση των στηλών UHPLC οδηγεί σε μικρά πλάτη κορυφών που ευθύνονται για μια βελτιωμένη ανάλυση, δυνητικά χρήσιμη για:

1. αποτελεσματικό διαχωρισμό ομόλογων βιταμινών
2. χαμηλότερα όρια αναγνώρισης, τα οποία είναι χρήσιμα για ανίχνευση μικρών ενδογενών συγκεντρώσεων δευτερευόντων μορφών
3. μικρότερους χρόνους λειτουργίας

Παρά τα πλεονεκτήματα αυτά, ο αριθμός των εφαρμογών UHPLC για την ανάλυση των λιποδιαλυτών μικροθρεπτικών συστατικών στα τρόφιμα είναι ακόμα περιορισμένος. Οι κύριοι λόγοι σχετίζονται με το υψηλό κόστος των οργάνων και την τρέχουσα εμπορική μη διαθεσιμότητα των στηλών UHPLC που περιέχουν στερεή φάση. Ειδικότερα, ο Bijttebier et al. (2014) σύγκρινε ένα σύνολο έξι στηλών UHPLC ACQUITY (BEH C18, HSS T3, HSS C18 SB, CSH C18, BEH Shield RP C18, BEH Phenyl, 2.1×100 mm, 1.7 ή 1.8mm, from Waters, Milford, MA) με ένα HPLC YMC C30 (2.0×250mm, 3mm from YMC, Dinslaken, Germany) για να μελετήσει τον διαχωρισμό 15 καροτενοειδών προτύπων. Ολοκληρώνοντας τις αναλύσεις, επιβεβαιώθηκε ανώτερη επιλεκτικότητα από τη στήλη HPLC C30 για cis- και trans- ισομερή και μια συνολικά καλύτερη απόδοση στον διαχωρισμό των καροτενοειδών (Εικόνα 4.).



Εικόνα 4. Χρωματογραφήματα εκχυλίσεων ιόντων ενός τυπικού μίγματος καροτενοειδών σε στήλη HPLC C30 (a) και σε δύο στήλες C18 UHPLC (b και c). Καροτενοειδή: 1. Βιολαξανθίνη, 2. Ασταξανθίνη, 3. Ανθραξανθίνη, 4. Ζεαξανθίνη, 5. Λουτεΐνη, 6. Τουναξανθίνη, 7. Κανθαξανθίνη, 8. Λυκοπένιο, 9. Α-καροτίνη, 10. Β-καροτίνη, 11. Φυτοφλουόλιο, 12. Φυτοενθίνη, 13. Ασταξανθίνη διπαλμιτικό. Στατικές φάσεις: (a) HPLC YMC C30 (2,0×250mm, 3mm), (b) ACQUITY UPLC HSS T3 (2,1×, (c) 100mm, 1,8mm), ACQUITY UPLC HSS C18 SB (2,1×, C: 100mm, 1,8mm).

Από την άλλη πλευρά, η μέγιστη χωρητικότητα της στήλης HPLC ήταν περίπου ένα τρίτο χαμηλότερη σε σύγκριση με αυτή από τις στήλες της UHPLC. Επιπλέον, υπό συνθήκες αντίστροφης φάσης, η ανάλυση στην στήλη HPLC C30 χρειάστηκε περισσότερο χρόνο σε σχέση με τη στήλη UHPLC (100 λεπτά έναντι 23 λεπτών, αντίστοιχα). Ωστόσο, έχουν πραγματοποιηθεί συντομότερες αναλύσεις σε στήλες HPLC C30 χρησιμοποιώντας κινητές φάσεις NARP που συντέθηκαν για τον έλεγχο APCI-MS των καροτενοειδών στα τρόφιμα. Ένα ακόμη μειονέκτημα των στηλών UHPLC είναι η περιορισμένη στιβαρότητα που απαιτεί εξαντλητική προετοιμασία του δείγματος για την αποφυγή προβλημάτων που προκύπτουν από αφόρητα υψηλή αντίθλιψη και/ ή απόφραξη στήλης.

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι πολλές από τις εφαρμογές UHPLC για τον διαχωρισμό των λιποδιαλυτών βιταμινών που έχουν πραγματοποιηθεί, περιελάμβαναν τη χρήση στηλών που βασίζονται στην τεχνολογία Fused-Core ή Core-Shell. Οι ιδιαιτερότητες της τεχνολογίας αυτής, καθιστούν ιδιαίτερα επωφελή τη δυνατότητα χρήσης συμβατικών συστημάτων HPLC που υπάρχουν ήδη στο εργαστήριο, χωρίς την ανάγκη επένδυσης σε νέο ακριβό εξοπλισμό. Στην πραγματικότητα, τα σωματίδια πυρήνα-κελύφους αποτελούνται από ένα συμπαγή εσωτερικό πυρήνα (πυρίτιο, αλουμίνιο, χρυσός, άνθρακας ή συμπολυμερές) καλυμμένο από επιφανειακό πορώδες κέλυφος. Διατίθεται σε διαφορετικές συνολικές διαμέτρους: 1,3 mm και 1,7 mm (κατάλληλο μόνο για στήλες UHPLC), 2,6 mm (ιδανικό για UHPLC και HPLC στήλες) και 5,0 mm (κατάλληλο για στήλες HPLC). Οι στατικές φάσεις (ειδικά εκείνες με σωματίδια πυρήνα-κέλυφος 2,6 mm) έχουν εφαρμοστεί επιτυχώς στον τομέα της ανάλυσης βιταμινών. Τέτοιες στήλες χαρακτηρίζονται από μικρότερους συντελεστές Van Deemter, όπου ο όρος είναι λιγότερος από 40% σε σύγκριση με πλήρως πορώδη σωματίδια, μειώνεται κατά 20% και επίσης μειώνεται η τιμή. Ωστόσο, οι στήλες αυτές παρέχουν ταχύτητα και απόδοση σε σύγκριση με τα σωματίδια κάτω των 2 mm, αλλά περίπου στο ήμισυ της αντίθλιψης για το ίδιο μήκος στήλης. Η χαμηλότερη αυτή πίεση είναι ο λόγος για τον οποίο οι 5 mm και 2,6 mm στήλες πυρήνα – κελύφους μπορούν να αξιοποιηθούν σε όργανα HPLC, ειδικά όταν η θερμοκρασία της στήλης διατηρείται μεταξύ 30 και 40°C ή/ και ο ρυθμός ροής είναι 0,5 mL/ min. Τόσο οι στήλες C18 όσο και οι PFP SP, όλες με σωματίδια πυρήνα 2,6 mm, έχουν επιτυχώς εφαρμοστεί στον τομέα της ανάλυσης βιταμινών. Η συνολική επιλεκτικότητα είναι παρόμοια με αυτή των πλήρως πορώδων σωματιδίων, αλλά η αξιοσημείωτη αύξηση της απόδοσης οφείλεται στην υποστήριξη σωματιδίων Fused-Core. Σε μελέτη του 2015, οι Knecht et al. σύγκριναν τις στήλες PFP και C30 που βασίζονται σε core-shell σε ανιχνευτή HPLC-FL για τον διαχωρισμό των τοκοφερολών και

τοκοτριενολών που παραλαμβάνονται από ωμά και μαγειρεμένα λαχανικά μέσω άμεσης εκχύλισης ακετόνης. Στη στήλη PFP, η σειρά έκλουσης ήταν δ-, β-, γ- και α-, ενώ στη στήλη C30 ήταν δ-, γ-, β- και α- χρησιμοποιώντας μεθανόλη:νερό (85:15, v/v για PFP και 91:1, v/v για C30 ως φάση A) και μεθυλο-τριτο-βουτυλαιθέρας:μεθανόλη: νερό (80:18:2, v/v/v ως φάση B). Κύριο συμπέρασμα της μελέτης έδειξε ότι καλύτερη ανάλυση και μικρότερος χρόνος λειτουργίας λαμβάνεται χρησιμοποιώντας τη στήλη PFP καθώς και ότι ο διαχωρισμός των γ- και β- ισομερών στη στήλη C30 ήταν δυνατός μόνο όταν ψύχεται και διατηρείται στους 18°C.

2.3.2. Τεχνικές νανοκλίμακας στην ανάλυση λιποδιαλυτών βιταμινών

Οι τεχνικές νανοκλίμακας έχουν εισαχθεί στην επιστήμη του διαχωρισμού θρεπτικών συστατικών στα τρόφιμα με κύριους στόχους την επίτευξη γρήγορων διαχωρισμών, τη βελτίωση της απόδοσης της χρωματογραφίας, τη μείωση του κόστους καθώς και τη μείωση του χώρου που καταλαμβάνει ο εργαστηριακός εξοπλισμός. Πολλές τεχνικές νανοκλίμακας, όπως nano-LC ή τριχοειδής ηλεκτροχρωματογραφία (CEC), έχουν μελετηθεί και με επιτυχία εφαρμόζονται στην ανάλυση πολλών ενώσεων συμπεριλαμβανομένων των φαρμάκων, εναντιομερών, πρωτεϊνών, πεπτιδίων, βιταμινών κ.λπ. Οι τεχνικές νανοκλίμακας που αναφέρθηκαν χρησιμοποιούν λεπτά τριχοειδή αγγεία με εσωτερική διάμετρος (I.D.) <100 μm που περιέχουν τη στατική φάση, ενώ η κινητή φάση παραδίδεται στους χαμηλούς ρυθμούς ροής (nL/min). Πιο αναλυτικά, στην τεχνική αυτή, η ροή ελέγχεται από μια αποκλειστική αντλία και έχει προφίλ παραβολής, ενώ στην τεχνική CEC η κίνηση της κινητής φάσης δημιουργείται από ηλεκτροωσμωτική ροή (EOF) ως αποτέλεσμα εφαρμογής υψηλού ηλεκτρικού πεδίου. Το προφίλ της ροής έχει ένα επίπεδο σχήμα, επομένως υψηλότερη απόδοση αναμένεται στην τριχοειδή ηλεκτροχρωματογραφία. Η ηλεκτροωσμωτική ροή επηρεάζεται από ορισμένες παραμέτρους, όπως το διπλό στρώμα στη φορτισμένη επιφάνεια (τριχοειδές τοίχωμα ή σωματίδια ή πολυμερικό υλικό – μονόλιθος) καθώς και τη σύνθεση της κινητής φάσης (pH, τύπος και συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος, οργανικό πρόσθετο κ.λπ.). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των δύο τεχνικών είναι ο χαμηλός ρυθμός ροής (10-800 nL/min). Στην περίπτωση της χαμηλής ροής, οι τεχνικές nano-LC και CEC μπορούν να προσφέρουν ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές, όπως υψηλή ευαι-

σθησία μάζας, χαμηλότερο κόστος λειτουργίας καθώς και καλύτερη συμβατότητα με τη φασματομετρία μάζας. Επομένως, λόγω των χαρακτηριστικών τους, οι τεχνικές νανοκλίμακας εφαρμόζονται επιτυχώς για τον διαχωρισμό και την ανάλυση των βιταμινών.

Οι μονολιθικές τριχοειδείς στήλες έχουν χρησιμοποιηθεί σε τεχνικές nano-Liquid Chromatography και σε τριχοειδή υγρή χρωματογραφία, Capillary Liquid Chromatography για τον διαχωρισμό πολλών κατηγοριών ενώσεων που περιλαμβάνουν και τις βιταμίνες. Οι στήλες αυτές παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω χαμηλότερης αντίθλιψης και, επομένως, μπορούν να λειτουργούν με υψηλότερο ρυθμό ροής. Επίσης, μπορεί να είναι από πυρίτιο με βάση πολυμερών, όπως μεθακρυλικά.

Σε μελέτη των Zhang et al. (2010) μία στήλη μονολιθικού πυριτίου C18 με I.D. 0,2 mm χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό της βιταμίνης D2, της α-τοκοφερόλης και της φυτοναδιόνης, με έκλουση μεθανόλης και σχετικά υψηλό ρυθμό ροής 50-100 mL/ min. Η επικυρωμένη μέθοδος (LOD 0,9 ng/ mL με σχετικές τυπικές αποκλίσεις του χρόνου κατακράτησης στο εύρος 1,2-1,4% και ανάκτηση 55-84%) εφαρμόστηκε για τον διαχωρισμό και την ανάλυση των βιταμινών σε χυμό φρούτων και γάλα μετά από εξαγωγή με μαγνητικά σωματίδια C18.

Παρά την μελέτη που έγινε από τους Cerretani et al. (2010) στην προσπάθεια για τον διαχωρισμό των τοκοφερολών και των τοκοτριενολών σε δείγμα φυτικών ελαίων με χρήση νάνο-LC στην ίδια εκτέλεση, ο διαχωρισμός των β- και γ- τοκοφερολών απέτυχε χρησιμοποιώντας ένα μεθακρυλικό λαυρυλεστέρα με βάση μια στήλη μονολιθικού πυριτίου με I.D. 100 nm.

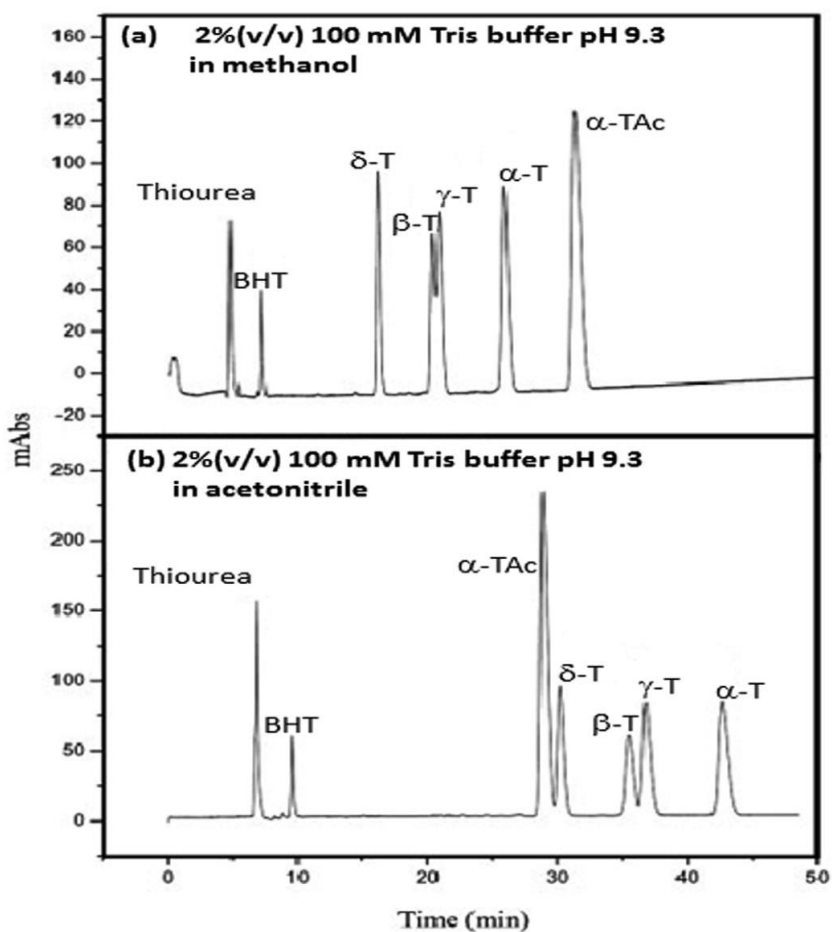
Παρά τα εξαιρετικά αποτελέσματα που λαμβάνονται με τη χρήση μονολιθικού υλικού, ειδικές στήλες από πυρίτιο ή τιτάνιο, χρησιμοποιούνται όχι μόνο στην HPLC αλλά και σε άλλες τεχνικές μικροσκοπικής LC. Πιο συγκεκριμένα, η τριχοειδής υγρή χρωματογραφία έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για την ανάλυση των λιποδιαλυτών βιταμινών σε βιολογικά δείγματα και καλλυντικά προϊόντα (Vinas et al., 2014), ενώ περιορισμένες είναι οι εφαρμογές που σχετίζονται με τα τρόφιμα.

2.3.2.2. Διαχωρισμός βιταμινών με τεχνικές τριχοειδούς ηλεκτροχρωματογραφίας

Στατικές φάσεις με βάση το πυρίτιο που περιέχουν είτε πολυμερικό είτε μονομερές C30 χρησιμοποιήθηκαν για την τριχοειδή ηλεκτροχρωματογραφία των τοκοφερολών. Η μελέτη έγινε για τη σύνθεση της κινητής φάσης και προέκυψε αρκετά καλή επιλεκτικότητα για όλους τους αναλύτες που μελετήθηκαν συμπεριλαμβανομένων των β- και γ- ισομερών. Η

βελτιστοποιημένη μέθοδος που εφαρμόστηκε σε συνδυασμό με τη χρήση μεθανόλης και την προσθήκη μικρής ποσότητας νερού επέτρεψε και βοήθησε στην ανάλυση του συμπληρώματος της βιταμίνης E.

Μια αμφίφιλη μονολιθική τριχοειδής στήλη με πενταερυθριτόλη – διακρυλικό μονοστεατικό ως μονομερές (PEDAS) χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό των τοκοφερόλων (Εικόνα 5.). Η στατική φάση, που περιέχει τα υδρόφιλα υδροξύλια και τις υδρόφοβες C17 ομάδες, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην τεχνική CEC για τον διαχωρισμό των τεσσάρων τοκοφερολών και της οξικής α-τοκοφερόλης. Η τεχνική CEC ήταν ικανή να διαχωρίσει τις τοκοφερόλες και τις τοκοτριενόλες, συμπεριλαμβανομένων και των ζευγών β-τοκοφερόλη/ γ-τοκοφερόλη και β-οκοτριενόλη/ γ-τοκοτριενόλη, χρησιμοποιώντας μία στατική φάση με βάση το πυρίτιο PFP σε υδατική μεθανόλη. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση ελαίων από πίτουρο ρυζιού και σογιέλαιου.



Εικόνα 5. Διαχωρισμός του BHT, τοκοφερολών και οξικής α-τοκοφερόλης στη μονολιθική στήλη. Τριχοειδής στήλη, 23,5mm, ενεργό μήκος, 32m, συνολικό μήκος, 100mm και με μήκος κύματος ανίχνευσης, $\lambda=200nm$.

Ενδιαφέροντα αποτελέσματα, συνδυάζοντας τον διαχωρισμό των ίδιων αναλυτών, έχουν αναφερθεί από τους Carabias-Martinez et al. (2006) χρησιμοποιώντας την τεχνική CEC. Τριχοειδείς στήλες με 100 mm I.D. ήταν γεμάτες με τρεις διαφορετικές στατικές φάσεις με βάση το πυρίτιο: C18, C30 και πολική ενσωματωμένη φάση (ULTIMA C18). Υπό καθορισμένες συνθήκες, η ανάλυση των τεσσάρων τοκοφερολών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση C30 και ULTIMA C18. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι οι δύο στατικές φάσεις αλληλο-επιδρούσαν με διαφορετικό τρόπο με τη β- και γ- τοκοφερόλη, ενώ χρησιμοποιήθηκαν ίδιες πειραματικές συνθήκες (100% μεθανόλη και 5m MTRIS) καθώς και ότι επιτεύχθηκε αντιστροφή του χρόνου διατήρησης.

2.3.3. Χρωματογραφία Υπερκρίσιμου Ρευστού

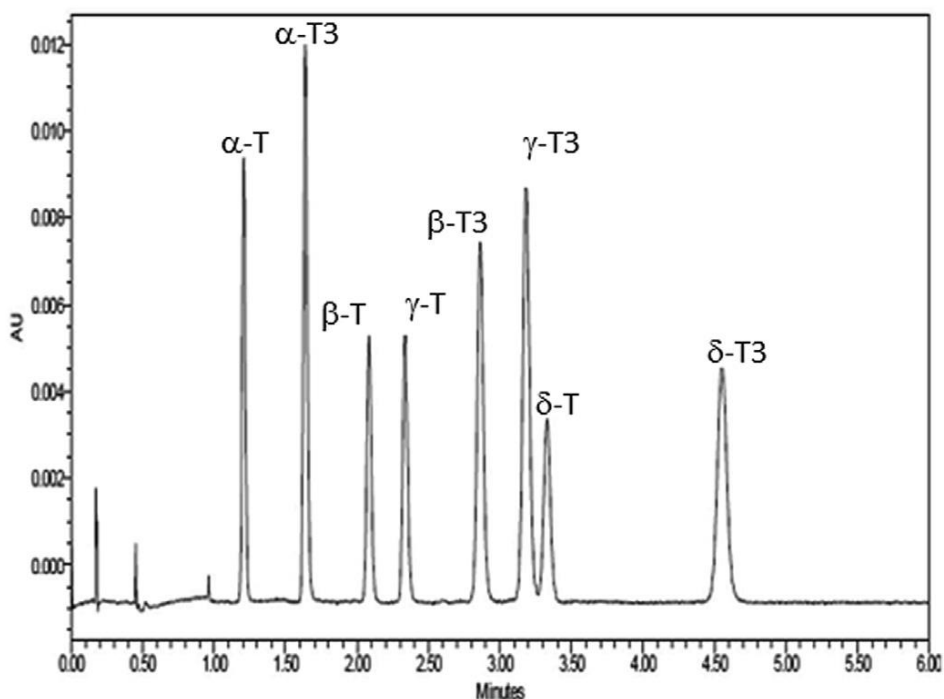
Η χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (Supercritical Fluid Chromatography) είναι μια τεχνική διαχωρισμού η οποία, ενσωματώνοντας χαρακτηριστικά της αέριας χρωματογραφίας (GC) και της υγρής χρωματογραφίας (LC), παρουσιάζει εξαιρετική εκλεκτικότητα για τον διαχωρισμό μη πολικών και μέτρια πολικών ενώσεων όπως λιποδιαλυτά μικροθρεπτικά συστατικά. Με το πέρασμα των χρόνων και των αναλύσεων, λόγω του συμπληρωματικού χαρακτήρα, έχει επίσης οριστεί χρωματογραφία υπερκρίσιμου υγρού ως υψηλής πίεσης GC, πυκνή GC ή χρωματογραφία σύγκλισης (CC). Αξίζει να αναφέρουμε ότι συνδυάζοντας τα πλεονεκτήματα της τεχνικής SFC με εκείνα των τεχνικών HPLC/ UPLC προέκυψε ένα υβριδικό σύστημα LC/SFC και ένα ολιστικό σύστημα SFC. Στην τελευταία περίπτωση, η τεχνική έχει ονομαστεί χρωματογραφία σύγκλισης υπερ-απόδοσης (UPCC ή UPC^2) και έχει δοκιμαστεί με επιτυχία σε διάφορους τομείς εφαρμογής (Nováková et al., 2014).

Πιο αναλυτικά, στη χρωματογραφία σύγκλισης η κύρια κινητή φάση είναι το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) είτε σε υπερκρίσιμη κατάσταση (οι αέριες και υγρές φάσεις δεν διακρίνονται) είτε σε υποκρίσιμη κατάσταση (υγρή κατάσταση). Παρά το χαμηλό κρίσιμο σημείο του CO_2 (74 bar και 31°C), οι περισσότεροι διαχωρισμοί που ορίζονται ως SFC, έχουν πραγματοποιηθεί, εν μέρει ή εντελώς, σε υποκρίσιμες συνθήκες (Lesellier et al., 2015).

Η κατακράτηση της αναλυόμενης ουσίας εξαρτάται κυρίως από τη σύνθεση της κινητής φάσης, αλλά επηρεάζεται επίσης και από την πυκνότητά της, δηλαδή από την πίεση και τη θερμοκρασία. Η χρωματογραφία σύγκλισης μπορεί να αντικαταστήσει τις τεχνικές NP LC και NARP LC για να αποκτήσει γρήγορους διαχωρισμούς με ποικίλη σύνθεση και

πυκνότητα της δυαδικής κινητής φάσης (σε αντίθεση με την τεχνική LC, όπου η αύξηση της θερμοκρασίας συνεπάγεται αύξηση του χρόνου συγκράτησης αφού μειώνεται η πυκνότητα της κινητής φάσης). Επιπλέον, η χρωματογραφία σύγκλισης είναι συμβατή με βαθμίδες έκλυσης που επιτρέπουν τη χρήση ανιχνευτών, όπως υπεριώδους ακτινοβολίας UV, ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD) και ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας. Η ανίχνευση APCI επηρεάζεται επίσης από τον ρυθμό ροής/πίεση της κινητής φάσης και τον λόγο διαχωρισμού καθώς πρόκειται για τεχνική ιοντισμού ευαίσθητη στη μάζα.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι συνθήκες της τεχνικής CC βελτιστοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό των εννέα μεταβολιτών της βιταμίνης D μέσα σε 8 λεπτά. Η χρωματογραφία σύγκλισης εμφανίζει αυξημένη εκλεκτικότητα για το διαχωρισμό των ενώσεων με δομική ομοιότητα (εναντιομερή, ισομερή θέσης και δομικά ανάλογα και συζυγή). Αφού όλες οι ενώσεις με τιμές logP που κυμαίνονται μεταξύ 2 και 9 είναι κατάλληλες για CC, τα καροτενοειδή (logP > 8) και οι λιποδιαλυτές βιταμίνες (logP από 6 έως 9) κρίνονται ιδανικοί υποψήφιοι. Ένα άμεσο πλεονέκτημα της τεχνικής UPC² αποτελεί η μείωση του χρόνου ανάλυσης από 30s έως 5,5min για τον πλήρη διαχωρισμό των τοκοφερολών, σε σύγκριση με τους τυπικούς χρόνους ανάλυσης περίπου 20 λεπτών με την τεχνική NPLC και περίπου 10 λεπτών με τη χρωματογραφία NARP (Gee et al., 2016).



Εικόνα 6. UPC²-MS χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος που περιέχει τις τοκοφερόλες και τις τοκοτριενόλες (Gee et al., 2016).

2.3.4. Μικκυλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία

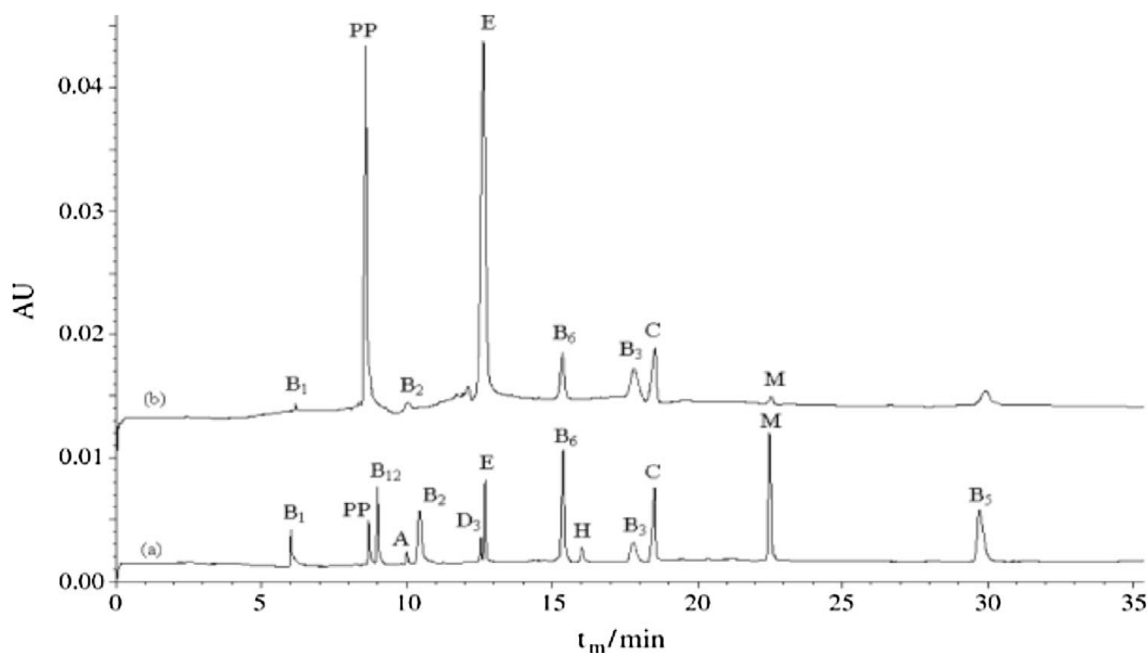
Η μικκυλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (Micellar electrokinetic chromatography, MEKC) έχει χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό τόσο των ιοντικών όσο και των ουδέτερων αναλυτών που είναι δύσκολο να διαχωριστούν από το CZE. Η ανίχνευση UV αποτελεί μια από τις πιο χρησιμοποιούμενες τεχνικές ανίχνευσης στη μέθοδο MEKC. Έχει αναπτυχθεί μέθοδος MEKC με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τριών λιποδιαλυτών βιταμινών συμπεριλαμβανομένων της εργοκαλσιφερόλης (βιταμίνη D₂), της α-τοκοφερόλης (βιταμίνη E) και της παλμιτικής ανδρετινόλης (βιταμίνη A) σε διάσπασμα πολυβιταμινών και σε κάψουλες βιταμίνης E. Στην μελέτη των Liu et al. (2010), χρησιμοποιήθηκαν τρεις μέθοδοι on-line συγκέντρωσης, συγκεκριμένα η σάρωση, η έγχυση δείγματος ενισχυμένης στο πεδίο και η έγχυση δείγματος ενισχυμένης με πίεση (PA-FESI) για τη βελτίωση των ευαισθησιών ανίχνευσης των αναλυτών. Το PA-FESI εφάρμοσε θετική πίεση για να εξισορροπήσει τον αντίστροφο EOF στην τριχοειδή στήλη κατά τη διάρκεια της έγχυσης του δείγματος, η οποία παρείχε μια μικρή πρόοδο στην απόδοση συγκέντρωσης για τις βιταμίνες σε σύγκριση με τις άλλες δύο μεθόδους.

2.3.5. Ηλεκτροκινητική χρωματογραφία μικρογαλακτώματος

Η ηλεκτροκινητική χρωματογραφία μικρογαλακτώματος (Microemulsion electrokinetic chromatography, MEEKC) αποτελεί μια τεχνική διαχωρισμού με ηλεκτροκίνηση, που χρησιμοποιεί ρυθμιστικό μικρογαλακτώματος, για τον διαχωρισμό φορτισμένων ή ουδέτερων αναλυτών με βάση τόσο την υδροφοβικότητά τους όσο και την ηλεκτροφορητική κινητικότητά τους. Τα μικρογαλακτώματα περιέχουν διασκορπισμένα σταγονίδια λαδιού σε νερό ή νερό σε λάδι, μεγέθους νανομέτρων, σταθεροποιημένα από επιφανειοδραστική αλκοόλη βραχείας αλυσίδας που χρησιμοποιείται ως συν-τασιενεργό (1-βουτανόλη και 2-προπανόλη) (Wang et al., 2018).

Σε σύγκριση με τη μέθοδο MEKC, η ηλεκτροκινητική χρωματογραφία μικρογαλακτώματος έχει αυξημένη ικανότητα επιλεκτικότητας για μη πολικές ενώσεις και μπορεί να δώσει καλύτερα αποτελέσματα ανάλυσης για τις λιποδιαλυτές βιταμίνες. Το κύριο μειονέκτημα της τεχνικής MEEKC είναι οι σχετικά μεγάλοι χρόνοι ανάλυσης (περίπου μία ώρα) για τον διαχωρισμό των λιποδιαλυτών βιταμινών. Ωστόσο, αρκετές μελέτες έχουν αναπτυχθεί με στόχο τη βελτίωση του μειονεκτήματος. Σε μελέτη των Yin et al. (2008), πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονος προσδιορισμός 10 υδατοδιαλυτών και 3 λιποδιαλυτών βιταμινών με

την τεχνική ΜΕΕΚC εντός 30 λεπτών, με στόχο τη μείωση του απαιτούμενου χρόνου (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Διάγραμμα ηλεκτροφόρησης μικτού προτύπου διαλύματος (α) και δισκίου βιταμίνης εμπορίου (β) (Yin et al., 2008).

2.3.6. Τριχοειδής ηλεκτροχρωματογραφία

Η τριχοειδής ηλεκτροχρωματογραφία (Capillary electrochromatography, CE) είναι μια τεχνική διαχωρισμού που συνδυάζει τις μεθόδους HPLC και CE, οι οποίες δρουν ταυτόχρονα στον διαχωρισμό των αναλυτών. Στην τριχοειδή ηλεκτροχρωματογραφία, οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες μπορούν να διαχωριστούν κυρίως με την μέθοδο CE, ενώ οι λιποδιαλυτές μπορούν να διαχωριστούν κυρίως από την αλληλεπίδρασή τους με μια στατική φάση (Wang et al., 2018).

Μια μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό υδατοδιαλυτών και λιποδιαλυτών βιταμινών επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας την τεχνική CEC υποβοηθούμενη από πίεση με τριχοειδή μονολιθική στήλη με βάση το μεθακρυλικό. Ένα μείγμα έξι υδατοδιαλυτών και λιποδιαλυτών βιταμινών διαχωρίστηκε ταυτόχρονα μέσα σε 20 λεπτά χρησιμοποιώντας ισοκρατική έκλυση μαζί με 1M μυρμηκικό οξύ (pH 1.9)/ ακετονιτρίλιο (30:70, v/v) που περιέχει 10mM μυρμηκικό αμμώνιο ως κινητή φάση. Η ευαισθησία της μεθόδου δεν ήταν επαρκής για την ανάλυση όλων των βιταμινών σε ένα εμπορικό δισκίο πολυβιταμινών. Ένα

πτητικό ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε στη βελτιστοποιημένη κινητή φάση, καθιστώντας το συμβατό με τη μέθοδο MS, για ευαίσθητη ανίχνευση στο μέλλον (Yamada et al., 2013).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ

3.1. Σύγχρονες μελέτες ανάλυσης υδατοδιαλυτών βιταμινών

Τα τελευταία δέκα χρόνια, υπάρχει μια σημαντική αύξηση στον αριθμό των δημοσιεύσεων σχετικά με την ταυτόχρονη ανάλυση πολυβιταμινούχων συμπληρωμάτων και τον προσδιορισμό των ενεργών μορφών των βιταμινών. Ωστόσο, λόγω του ευρέος φάσματος λειτουργικότητας και της εξαιρετικά περίπλοκης φύσης των υδατοδιαλυτών βιταμινών, οι εφαρμογές προηγμένων τεχνικών προεπεξεργασίας και εξαγωγής δειγμάτων είναι αρκετά περιορισμένες. Πιο ακριβή αποτελέσματα έχουν ληφθεί για ενδογενείς και εξωγενείς μορφές βιταμινών χρησιμοποιώντας μεθόδους που βασίζονται στην υγρή χρωματογραφία. Η ποσοτικοποίηση και η ανίχνευση των φυσικών μικροθρεπτικών συστατικών συμπεριλαμβανομένων των υδατοδιαλυτών βιταμινών και των βιολογικά ενεργών μορφών τους στα τρόφιμα είναι η τρέχουσα ερευνητική τάση στη επιστήμη της διατροφής και την ανάλυση της ποιότητας των τροφίμων.

Η ταυτόχρονη ανάλυση πολυβιταμινών απαιτεί πιο εξελιγμένες αναλυτικές μέθοδοι, βασισμένες σε συστήματα διαχωρισμού ή/ και βελτιωμένης ανίχνευσης υψηλής ανάλυσης. Ο πολυδιάστατος χρωματογραφικός διαχωρισμός (π.χ. ολοκληρωμένος 2D-LC) και η ανίχνευση φασματομετρίας μάζας με διπλή πηγή ιονισμού που συνδυάζει ESI και APCI αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογική λύση στην επιστήμη των τροφίμων. Σε μια πρόσφατη μελέτη, έχει εκτελεστεί μια ολοκληρωμένη on-line μέθοδος 2D CF-ESI-MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων με μεγάλο εύρος πολικότητας αλλάζοντας τη σύνθεση της κινητής φάσης σε ίνες άνθρακα και ίνες ενεργού άνθρακα, η οποία μπορεί να εφαρμοστεί για την ταυτόχρονη ανάλυση πολυβιταμινών σε μιγαδικούς πίνακες. Η ενοποιημένη χρωματογραφία με συνδυασμό περισσότερων από μιας χρωματογραφικής ανάλυσης, για παράδειγμα χρωματογραφία υπερκρίσιμου υγρού και RPLC χρησιμοποιείται επιτυχώς για τον προσδιορισμό όλων των βιταμινών με πολικό χαρακτήρα.

Η χρήση της μεθόδου UHPLC με ανιχνευτή UV παρέχει ικανοποιητικά αποτελέσματα για ενεργές ομόλογες μορφές των βιταμινών του συμπλέγματος Β. Για λεπτομερή και ταυτόχρονη ομόλογη διαλογή των υδατοδιαλυτών βιταμινών, η εισαγωγή του συστήματος

ανίχνευσης UHPLC πριν από τον συνδυασμό, όπως το σύστημα DAD και MS, μπορεί να αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο στο μέλλον. Επιπλέον, η χρήση στήλης χωρίς μέταλλο μπορεί να ακυρώσει το πρόβλημα της αλληλεπίδρασης μετάλλων που σχετίζεται με στήλες ODS για τον διαχωρισμό φωσφορυλιωμένων μορφών της βιταμίνης Β (π.χ. πυροφωσφορική θειαμίνη, 5-φωσφορική ριβοφλαβίνη (FMN), 5-αδενοσυλοδιφωσφορική ριβοφλαβίνη (FAD), 5-φωσφορική πυριδοξάλη, 5-φωσφορική πυριδοξαμίνη) (Fatima et al., 2019).

Επιπρόσθετα, τα ενεργειακά ποτά αποτελούν καταναλωτικά προϊόντα τα οποία διαφημίζονται για την μείωση του λήθαργου και την αύξηση των επιπέδων ενέργειας κατά την κατανάλωσή τους. Η κατανάλωση των ενεργειακών ποτών έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια καθώς αποτελούν κοινό στοιχείο στη διατροφή διαφορετικών κοινωνικών τάξεων και ηλικιακών ομάδων. Τα κύρια ενεργά συστατικά των ενεργειακών ποτών περιλαμβάνουν σε ποικίλες ποσότητες, καφεΐνη, ταυρίνη, εκχύλισμα γκουαράνα και τζίνσενγκ. Πρόσθετα αμινοξέα, υδατάνθρακες, ηλεκτρολύτες και βιταμίνες του συμπλέγματος Β συνήθως συνθέτουν τα ευεργετικά συστατικά των ενεργειακών ποτών. Τα ενεργειακά ποτά οφείλουν να παρέχουν συντήρηση και βελτίωση της συγκέντρωσης, της αντοχής και της απόδοσης. Αντίστοιχα, τα ποτά αυτά θα πρέπει να υποστηρίζονται από εκτενή επιστημονική βάση και διατροφική έρευνα για την διασφάλιση της ποιότητας και της ασφάλειας προς το καταναλωτικό κοινό. Επομένως, ιδιαίτερα σημαντικό αποτελεί η πλήρης περιγραφή των εμπλεκόμενων συστατικών τους. Πιο αναλυτικά, οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες περιλαμβάνονται συνήθως στα ενεργειακά ποτά για τη ζωτική βιολογική τους λειτουργία ως συνένζυμα και το «κλειδί» που απαιτείται για να δρα όλη η ενέργεια που παρέχεται από τα απλά σάκχαρα στα ενεργειακά ποτά. Επιπλέον, υποστηρίζεται ότι η κατανάλωση των βιταμινών τους συμπλέγματος Β βελτιώνει την πνευματική συγκέντρωση και την εγρήγορση, καθώς ανεβάζει και τη διάθεση. Επομένως, οι βιταμίνες του συμπλέγματος Β συμπεριλαμβανομένων της θειαμίνης, ριβοφλαβίνης, νικοτινικό οξύ, νικοτιναμίδιο, παντοθενικό οξύ, πυριδοξίνη, βιοτίνη, φολικό οξύ και κυανοκοβαλαμίνη συχνά ενσωματώνονται στα ενεργειακά ποτά (Hu et al., 2018).

Ο προσδιορισμός των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε τρόφιμα, όπως τα ενεργειακά ποτά, συμπληρώματα διατροφής, μέλι και δημητριακά, αποτελεί ιδιαίτερα δύσκολο έργο λόγω της αστάθειάς τους, της φωτοευαισθησίας των βιταμινών της ομάδας Β με ποικίλες χημικές δομές και ιδιότητες καθώς και της πολυπλοκότητας των δειγμάτων. Οι κλασικές μέθοδοι για την ανάλυση των υδατοδιαλυτών βιταμινών είναι αρκετά χρονοβόρες και χωρίς να παρέχουν πλήρης μικροβιολογική ανάλυση. Έτσι, κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη μεθόδων χρωματογραφίας για

τον προσδιορισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών, όπως η μικκυλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία, η μικκυλιακή υγρή χρωματογραφία και η υγρή χρωματογραφία (LC). Ωστόσο, οι περισσότερες μέθοδοι είναι σχεδιασμένοι για περιορισμένο αριθμό αναλυτών επειδή ο πλήρης διαχωρισμός των υδατοδιαλυτών βιταμινών απαιτεί ειδικές συνθήκες χρωματογραφίας. Η υγρή χρωματογραφία που συνδέεται με διάταξη διόδων (DAD) ή/ και ανίχνευση φθορισμού (FLD) χρησιμοποιούνται ευρέως για τον προσδιορισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών σε φαρμακευτικά παρασκευάσματα και σε μήτρες τροφίμων. Υπάρχουν, επίσης, ορισμένες αναλυτικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών με σύζευξη LC με φασματομετρία μάζας (MS) ή διαδοχικά MS (MS/MS) σε μήτρες τροφίμων. Εν όψει των χημικών ιδιοτήτων και των πληροφοριών του περιεχόμενου φάσματος μάζας, η μέθοδος LC-MS (/MS) έχει θεωρηθεί ως μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλαπλών βιταμινών. Στις περιπτώσεις αυτές, ωστόσο, η μέθοδος LC-MS υπόκειται σε ορισμένα προβλήματα όπως η συνένωση (επικαλυπτόμενες και/ ή ενσωματωμένες κορυφές), γραμμή βάσης ή/ και χρονικές μετακινήσεις, χαμηλός λόγος σήματος προς θόρυβο (S/N) και περίπλοκα φασματικά υπόβαθρα. Το κύριο πρόβλημα στην ανάλυση των υδατοδιαλυτών βιταμινών στα ενεργειακά ποτά αποτελεί η υψηλή πολικότητά τους που οδηγεί σε σύντομο χρόνο διατήρησης και επομένως είναι δύσκολο να επιτευχθεί πλήρης χρωματογραφικός διαχωρισμός των αναλυτών από τον εαυτό τους και τις σύνθετες μήτρες τροφίμων (Hu et al., 2018).

Στόχος της μελέτης των Hu et al. (2018) ήταν να αναπτύξει και να επικυρώσει έναν αλγόριθμο βαθμονόμησης δεύτερης τάξης με τη βοήθεια της μεθόδου LC-MS για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό εννέα βιταμινών της ομάδας Β σε πέντε εμπορικά ενεργειακά ποτά. Η προτεινόμενη μέθοδος LC-MS επέτρεψε την έκλουση των εννέα αναλυτών σε 4,5 λεπτά, ανεξαρτήτως σενέκλουσης και ισχυρής παρεμβολής μήτρας, καθώς και ικανοποιητικός «μαθηματικός διαχωρισμός» πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μεθόδων βαθμονόμησης δεύτερης τάξης που βασίζονται σε ATLD και APTLD. Τα ποσοτικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τις προτεινόμενες μεθόδους ήταν σύμφωνα με αυτά που προέκυψαν από την μέθοδο LC-MS/MS. Επιπλέον, οι αναπτυγμένες μέθοδοι πέτυχαν σχεδόν ισοδύναμες ή/ και προτιμώμενες ικανότητες από αυτές της μεθόδου LC-MS/MS, ενώ προέκυψαν μικρές διαφορές στην απόδοση της μεθόδου ATLD LC-MS και της APTLD LC-MS όσον αφορά την ευρωστία και την ευελιξία, που παρέχει καθοδήγηση για την επιλογή των μεθόδων σε ορισμένες συνθήκες. Επομένως, η «πράσινη και έξυπνη» στρατηγική δεν ξεπερνά μόνο τις κύριες δυσκολίες

που αναφέρθηκαν παραπάνω για την ταυτόχρονη ανάλυση βιταμινών, αλλά απλοποιεί την προετοιμασία των δειγμάτων και τις διαδικασίες βελτιστοποίησης παραμέτρων, μειώνει σημαντικά τον χρόνο έκλυσης και την κατανάλωση τοξικών οργανικών διαλυτών καθώς και το κόστος ανά ανάλυση.

Οι De Assis et al. (2020) δημοσίευσαν μελέτη η οποία είχε σκοπό την ανάλυση των βιταμινών του συμπλέγματος Β, το ασκορβικό οξύ και τα καροτενοειδή σε τροπικά φρούτα από την αγροβιοποικιλότητα της βορειοανατολικής Βραζιλίας. Οι βιταμίνες προσδιορίστηκαν ποσοτικά χρησιμοποιώντας την αναλυτική μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Τα επίπεδα του συμπλέγματος Β διέφεραν από $0,003 \pm 0,01 \text{ mg}/100 \text{ g}$ έως $6,107 \pm 0,06 \text{ mg}/100 \text{ g}$. Η βιταμίνη C κυμαίνονταν από $0,36 \pm 0,06 \text{ mg}/100 \text{ g}$ έως $253,92 \pm 9,02 \text{ mg}/100 \text{ g}$, ενώ οι τιμές των καροτενοειδών κυμαίνονταν από $0,12 \pm 0,02 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ έως $395,63 \pm 113,69 \mu\text{g}/100 \text{ g}$. Επομένως το προφίλ των υδατοδιαλυτών βιταμινών και των καροτενοειδών που αναλύθηκαν ποσοτικοποιήθηκαν και προέκυψε το συμπέρασμα ότι τα φρούτα αυτά παρέχουν ποικίλες ποσότητες βιταμινών που είναι σημαντικές για την ανθρώπινη υγεία.

Σε πρόσφατη μελέτη των Porter et al. (2021), μια εμπορικά διαθέσιμη σούπα λαχανικών επιλέχθηκε ως δείγμα για την ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής διαδικασίας εκχύλισης για τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες. Πιο αναλυτικά, οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες εκχυλίστηκαν χρησιμοποιώντας μεταφωσφορικό οξύ σε συνδυασμό με έναν αναγωγικό παράγοντα, DL-διθειοθρεϊτόλη (DTT) για την παραγωγή της μητρικής ένωσης. Στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση στις εκχυλισμένες βιταμίνες χρησιμοποιώντας ένα σύστημα LC-MS με ηλεκτροψεκασμό-πηγή ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (ES-API) σε λειτουργία παρακολούθησης θετικού μονού ιόντος (SIM). Η φασματομετρία μάζας παρείχε καλή γραμμικότητα στο πλαίσιο της έρευνας που κυμαίνεται από 5 έως 400 ng/mL με συντελεστή προσδιορισμού R^2 να κυμαίνεται από 0,98 έως 0,99. Οι χρόνοι διατήρησης (0,65-9,04 λεπτά) ήταν αναπαραγωγίμοι και δεν παρατηρήθηκε συνένωση μεταξύ βιταμινών. το όριο ανίχνευσης (LODs) κυμαίνονταν από 2,4 έως 9,0 ng/mL και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) ήταν από 8 έως 30 ng/mL, συγκρίσιμο με προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες. Ο συνολικός χρόνος εκτέλεσης της μεθόδου αυτής ήταν περίπου 19 λεπτά, συμπεριλαμβανομένης της εξισορρόπησης της στήλης. Συμπερασματικά, η ομάδα των Porter et al., ανέπτυξε μια γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδος HILIC-single quad MS που χρησιμοποιεί SIM για το χαμηλό επίπεδο ποσοτικοποίησης τεσσάρων βιταμινών του συμπλέγματος Β σε μια μήτρα σούπας λαχανικών σε λιγότερο από 20 λεπτά. Η μέθοδος αυτή έδειξε εξαιρετική γραμμικότητα, αναπαραγωγικότητα και μπορεί να εφαρμοστεί άμεσα και σε άλλα τρόφιμα φυτικής προέλευσης.

Μια μέθοδος HPLC-DAD που δείχνει σταθερότητα για τον προσδιορισμό και των εννέα κύριων υδατοδιαλυτών βιταμινών, εκτός από δύο συνήθως χρησιμοποιούμενα βιταμινώδη, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε πλήρως σε αναλυτικές περιοχές, προσαρμοσμένες στις συνιστώμενες διατροφικές τιμές. Μια στήλη XSelect CSH C18 με βαθμιδωτή έκλυση χρησιμοποιώντας ως ρυθμιστικό διάλυμα ιόντα φωσφορικών και μεθανόλη, χρησιμοποιήθηκε για τον βέλτιστο διαχωρισμό των βιταμινών σε πολυβιταμίνες. Αξίζει να αναφέρουμε ότι η ταυτόχρονη αυτή ανάλυση των υδατοδιαλυτών αυτών βιταμινών συνδέεται με πολλά ζητήματα, συμπεριλαμβανομένων παραγόντων, όπως το ευρύ φάσμα συγκέντρωσης (από πολύ χαμηλή B12, B7 και B9 έως υψηλή C και B3), την έλλειψη χρωμοφόρων (B5 και B7), την περιορισμένη υδατοδιαλυτότητα (βιταμίνες B2 και B9), την παρουσία FMN (μίγμα διάφορων ενώσεων), τα ζητήματα σταθερότητας (ειδικά για βιταμίνες C και B9) καθώς και την παρουσία πολλών προϊόντων υποβάθμισης, υποδεικνύοντας έτσι την ανάγκη για ολοκληρωμένη και συστηματική προσέγγιση στην αξιολόγησή τους. Η προτεινόμενη αυτή μέθοδος ξεπερνά τους τρέχοντες περιορισμούς στην ανάλυση των υδατοδιαλυτών βιταμινών χρησιμοποιώντας κοινά όργανα ανάλυσης (HPLC-DAD), παρέχοντας ταυτόχρονη ανάλυση όλων των κύριων υδατοδιαλυτών βιταμινών, συμπεριλαμβανομένου του μονονουκλεοτιδίου φλαβίνης, το οποίο από μόνο του αποδίδει έως και 14 χρωματογραφικές κορυφές. Η ανεπτυγμένη αυτή μέθοδος είναι εφαρμόσιμη για τη δοκιμή σταθερότητας, τον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής των προϊόντων πολυβιταμινών καθώς και για τη συνήθη ανάλυση όλων των υδατοδιαλυτών βιταμινών στις πιο κοινές μορφές τους, όπως αποδεικνύεται σε 13 εμπορικά σκευάσματα σε διαφορετικές δοσολογικές μορφές (δίσκια, αναβράζοντα δίσκια, κάψουλες, σιρόπια και συμπυκνωμένα για έγχυση). Ωστόσο, η χαμηλή ποσότητα B12 στα περισσότερα παρασκευάσματα αποτελεί ένα γενικό πρόβλημα για τον ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας UV και συνιστά έναν περιορισμό της μεθόδου σε παρασκευάσματα με B12 κάτω από το RDA. Η ολοκληρωμένη προσέγγιση στην ταυτόχρονη ανάλυση υδατοδιαλυτών βιταμινών, μεταξύ και της καινοτόμου ιδέας RDA που επιτρέπει την ανάλυση όλων των βιταμινών με προετοιμασία ενός δείγματος, μαζί με τη σταθερότητα της μεθόδου – ενδεικτική φύση και δυνατότητα εφαρμογής τόσο για συνήθεις αναλύσεις, όσο και για μελέτες σταθερότητας, είναι τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα, τα οποία προκρίνουν την εν λόγω μέθοδο σε σχέση με επίσημες μεθόδους (Rakusa et al., 2021).

Με την αυξανόμενη σημασία της ριβοφλαβίνης στα τρόφιμα, σε βιολογικά και φαρμακευτικά πεδία, η ακριβής ανίχνευσή της στα τρόφιμα έχει μεγάλη σημασία για την καθοδήγηση της διατροφικής υγείας, της διάγνωσης/θεραπείας σχετικών ασθενειών, της φαρμα-

κολογικής έρευνας της ριβοφλαβίνης και της επίβλεψης της ποιότητας/ φαρμάκων. Σε μελέτη των Zhou et al. (2021) καθιερώθηκαν πρόσφατες μέθοδοι ανίχνευσης για τη ριβοφλαβίνη σε τρόφιμα και φαρμακευτικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένης της φασματομετρίας μάζας, της ανίχνευσης φθορισμού, της ηλεκτροχημικής ανίχνευσης και της ανοσοδοκιμασίας. Στον Πίνακα 7 καταγράφονται σύγχρονες μελέτες προεπεξεργασίας δειγμάτων, χρωματογραφικού διαχωρισμού για την ανίχνευση ριβοφλαβίνης σε διάφορα τρόφιμα.

Πίνακας 7. Σύγχρονες μελέτες προεπεξεργασίας δειγμάτων, χρωματογραφικού διαχωρισμού για την ανίχνευση της ριβοφλαβίνης σε διάφορα τρόφιμα (Zhou et al., 2021).

Δείγμα	Μέθοδος ανάλυσης	Χρωματογραφικές συνθήκες	LODs	R ²	Re%	RSD%
Χυμός πορτοκαλιού	LC-UV	Agilent 1100 LC-UV στα 270nm, Agilent C18, 4.6×250nm, 5mm), 1mL min ⁻¹ , 20mL, 25°C, κινητή φάση: H2O-μεθανόλη-οξικό οξύ	2.8 μg L ⁻¹	0.01-3.0 μg L ⁻¹	75,8 – 92,7	≤4,2
Αγελαδινό γάλα	LC-FD	Σύστημα Water Acquity LC με FD Στήλη HSS T3 (100mm×2.1mm, 1.7mm) 0.35 μg min ⁻¹ , 1.4mL και 30°C. Κινητή φάση: 10mM μυρμηκικό αμμώνιο με 0,006% μυρμηκικό οξύ (pH 4,4) (A) και 10mM μυρμηκικό αμμώνιο με 0,7% μυρμηκικό οξύ (B)	15.0 nM	0.05-20 μM 0.999	94,6 – 95,4	1,3 – 3,2
Γάλα	LC-FD	Σύστημα Water Acquity με 450nm για διέγερση και 520nm για εκπομπή. Στήλη Waters Acquity UPLC HSS T3 (150mm×2.1mm, 1.8mm) 0.3 mL min ⁻¹ , 15mL και 30°C. κινητή φάση: (A) 10 mM μυρμηκικό αμμώνιο, 0.1% μυρμηκικό οξύ σε	0.049 μg L ⁻¹	0.30 – 1.52 μg mL ⁻¹ -	87 - 107	-

		νερό, (B) 10 Mm μυρμηκικό αμμώ- νιο, 0.1% μυρμη- κικό οξύ σε μεθα- νόλη				
Σαφράν	Laser nduced FD	Τριχοειδής Agilent FD 100 επαγόμενος με λέιζερ εξοπλι- σμένο σύστημα ηλε- κτροφόρησης με λέ- ιζερ ZETALIF 2000 FD (εκπομπή στα 520nm). Το τριχοει- δές πυρίτιο ήταν 75mm D με συνο- λικό μήκος 65cm.	4,15nM	0.01-1μM	-	<4,7
Δείγματα τσα- γιού	Laser nduced FD	Εξοπλισμένο σύ- στημα τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης με ZETALIF. Ανιχνευ- τής LIF 2000 με διέ- γερση στα 488nm και εκπομπή στα 520nm. Το τριχοει- δές πυρίτιο ήταν 50mm D με συνο- λικό μήκος 67cm.	1.08 ng mL ⁻¹	0.01-5μM	99.7- 106	<4.58
Γάλα και δι- σκία βιταμίνη B2	-	Απευθείας φυγοκέ- ντρωση, ή διάλυση και φυγοκέντρήθηκε για να κερδίσει το υ- περκείμενο. Βασι- σμένο σε αναλογικό αισθητήρα FRET στο g-CNQDs@Zn- MOF	15nM	0.005-1.0μM 0.998	98.8- 106.0	0.4-1.0
Γάλα και ποτά	-	Καθίζηση και αραί- ωση λίπους για ά- μεση ανίχνευση FRET για αναλογία ανίχνευσης φθορι- σμού	0.4-10μM	98-101.3	-	
Πολυβιταμι- νούχο δισκίο	Διασπορές γρα- φενίου σε πο- λυαιθυλενογλυ- κόλη	-	0.03 μg mL ⁻¹	0-30 mg L ⁻¹	96,5	1.5-3.1

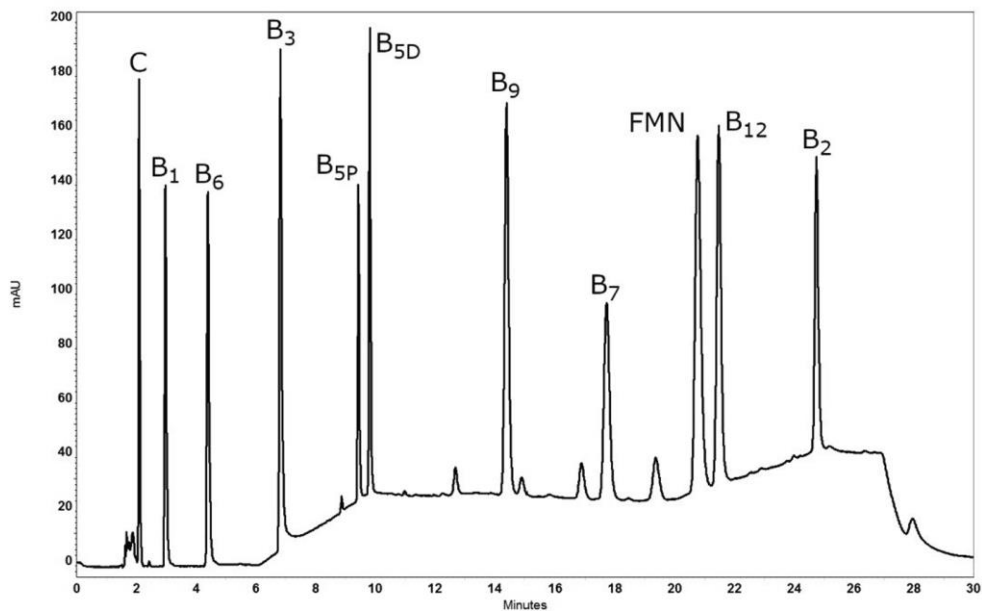
Κρόκος αυ- γού, γάλα, σκόνη και δι- σκία συμπλέγ- ματος Β	CV	Τροποποιημένα να- νοσωματίδια CuO- Γραφίτης εμπλουτι- σμένος με ηλεκτρό- διο παραφίνης	1.04nM	-	99-99.8	0.43- 1.66
---	----	--	--------	---	---------	---------------

3.1.1. Μελέτες ανάλυσης βιταμινών Β και C στα πολυβιταμινούχα προϊόντα

Η ανάγκη για καλύτερη ποιότητα ζωής και υγεία, οι σύγχρονοι ρυθμοί ζωής, και η ανεπαρκής ποιότητα διατροφής έχουν οδηγήσει στην ανάγκη πρόσληψης συμπληρωμάτων διατροφής και συγκεκριμένα πολυβιταμινούχων. Λόγω των πολυάριθμων λειτουργιών των υδατοδιαλυτών βιταμινών, οι ελλείψεις αυτών μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα υγείας και ασθένειες, όπως αναιμία, μπέρι-μπέρι και πελλάγρα. Μια καλά ισορροπημένη διατροφή παρέχει συνήθως τις απαραίτητες βιταμίνες που χρειάζεται ο ανθρώπινος οργανισμός. Ωστόσο σε περίπτωση ανεπαρκούς ή αυξημένης πρόσληψης απαιτείται η απαραίτητη συμπλήρωση (Kennedy, 2016). Για τους σκοπούς αυτούς, τα πολυβιταμινούχα συμπληρώματα διατροφής που πλέον είναι πολυχρησιμοποιούμενα, διατίθενται ως φάρμακα ή συμπληρώματα διατροφής σε διάφορες δοσολογικές μορφές. Οι περισσότερες βιταμίνες είναι αρκετά ασταθείς και μπορούν να χαθούν κατά την παρασκευή και αποθήκευσή τους. Έτσι οι κατασκευαστές συχνά προσθέτουν μια «υπέρβαση» βιταμινών που είναι ευαίσθητες στην υποβάθμιση για την παραγωγή εμπορικών προϊόντων με την επιθυμητή διάρκεια ζωής. Επομένως, ο ποιοτικός έλεγχος πολυβιταμινούχων προϊόντων από άποψη περιεχομένου και σταθερότητας βιταμινών είναι απαραίτητη. Ωστόσο, κάθε υδατοδιαλυτή βιταμίνη έχει μια μοναδική δομή και η ταυτόχρονη ανάλυσή της αποτελεί πρόκληση για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίησή της. Είναι επίσης σημαντικό να αναφέρουμε ότι οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες υπάρχουν σε διαφορετικές μορφές (βιταμερή) και ενώ κάποιες χρησιμοποιούνται αποκλειστικά (πχ. πυριδοξίνη για τη βιταμίνη Β6), υπάρχουν και άλλες οι οποίες μπορούν να βρεθούν σε διαφορετικές μορφές σε πολυβιταμινούχα συμπληρώματα (πχ. ριβοφλαβίνη και μονονουκλεοτίδιο φλαβίνης (FMN) για τη βιταμίνη Β2).

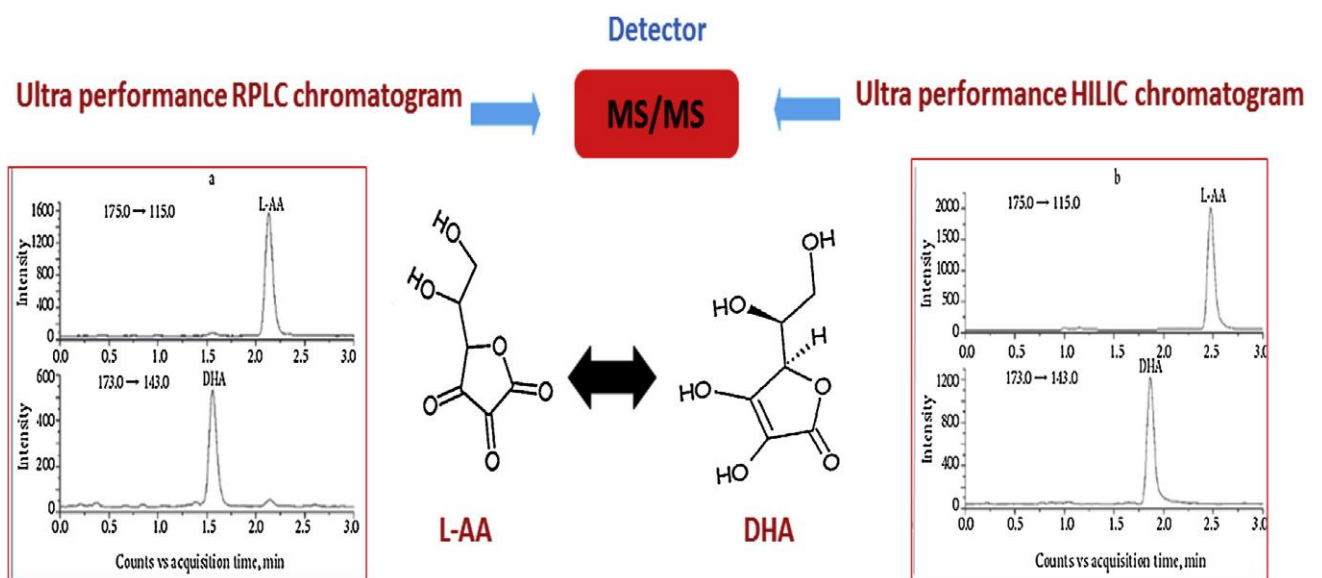
Σε πρόσφατη μελέτη των Temova Rakuša et al. (2021), ο κύριος στόχος ήταν η ανάπτυξη μιας απλής και σταθερής μεθόδου HPLC-DAD για τον διαχωρισμό και την ακριβή ποσοτικοποίηση των εννέα υδατοδιαλυτών βιταμινών, εκτός από τα δύο βιταμερή, σε πολυβιταμινούχα προϊόντα. Η ανάπτυξη της μεθόδου είχε αρκετές προ-

κλήσεις κυρίως λόγω των διαφορετικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων των επιμέρους βιταμινών καθώς και λόγω του ευρέος φάσματος της συγκέντρωσής τους στα πολυβιταμινούχα συμπληρώματα. Για παράδειγμα, η περιεκτικότητα των βιταμινών B7, B9 και B12 σε εμπορικά πολυβιταμινούχα προϊόντα είναι πολύ χαμηλότερη (έως και 20.000 φορές) σε σύγκριση με άλλες υδατοδιαλυτές βιταμίνες, όπως η βιταμίνη C, B3 και B5. Επιπλέον, η υψηλή πολικότητα και η ποικιλομορφία των δομών των υδατοδιαλυτών βιταμινών, η χαμηλή υδατοδιαλυτότητα και η αστάθεια ορισμένων βιταμινών καθώς και η πολυπλοκότητα των μητρών από εμπορικά παρασκευάσματα που αποτελούνται από άλλα συστατικά και βιταμίνες, περιέπλεξαν περισσότερο την ανάπτυξη της μεθόδου. Σύμφωνα με την χρωματογραφική συμπεριφορά, μερικές υδατοδιαλυτές βιταμίνες, όπως η βιταμίνη C, B1, B3 και B6 είναι πιο πολικές, ενώ άλλες βιταμίνες, όπως η B2, B7, B9 και B12, είναι λιγότερο πολικές. Παρ' όλο που η υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC) αναγνωρίζεται ως ένας πλεονεκτικός χρωματογραφικός τρόπος για την κατακράτηση των πολικών αναλυτών, ταυτόχρονα συνδέεται με αρκετά προβλήματα, όπως η επαναληψιμότητα, η ακρίβεια και η σταθερότητα. Για τον λόγο αυτό, έγινε η επιλογή λειτουργίας της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Στα αρχικά στάδια της μεθόδου, η χαμηλή κατακράτηση των πιο πολικών βιταμινών (κυρίως των βιταμινών C, B1 και B6) αντιμετωπίστηκε με την επιλογή μιας κατάλληλης στήλης αντίστροφης φάσης. Διάφορες στατικές φάσεις σε διαφορετικές διαστάσεις (50×2.1 – 250×4.6mm) με διάφορα μεγέθη σωματιδίων (1.6 – 5μm) με αναμενόμενες διαφορές στην επιλεκτικότητά τους. Δοκιμάστηκαν: Zorbax Eclipse plus C18 RRHD και Zorbax 300SB-C3 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), Luna Omega PS C18, Luna Omega Polar C18, Luna C18, Synergi Fusion-RP (Phenomenex, Torrance, CA, USA), Titan C18 (Supelco Bellefonte, PA, USA), XBridge C18 και XSelect CSH C18 (Water Corporation, Milford, MA, USA). Μεταξύ αυτών, η στήλη HPLC XSelect CSH C18 (150×4.6mm, 3.5μm) επιλέχθηκε ως η βέλτιστη στήλη για τη συγκράτηση και τον διαχωρισμό των περισσότερο πολικών υδατοδιαλυτών βιταμινών (βιταμίνη C, B1 και B6). Λόγω της τεχνολογίας Charged Surface Hybrid (CSH), οι βελτιστοποιημένες χρωματογραφικές συνθήκες κατέληξαν σε συμμετρικές κορυφές, οι οποίες ήταν σωστά διαχωρισμένες από τη γραμμή βάσης παρά την παρουσία πιθανής υποβάθμισης προϊόντων και άλλων συστατικών, με πολύ αποδεκτό χρόνο λειτουργίας 30 λεπτά (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Χρωματογράφημα τυπικού μίγματος έντεκα υδατοδιαλυτών βιταμινών στα 210nm που αντιπροσωπεύει τον χρωματογραφικό διαχωρισμό τους (Temona Rakuša et al., 2021).

Σε μελέτη του Karataranis et al. (2009) χρησιμοποιήθηκαν στήλες UPLC τόσο σε λειτουργία HILIC όσο και σε λειτουργία RPLC για τον διαχωρισμό των υδατοδιαλυτών βιταμινών (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Ανάλυση UPLC-MS/MS (λειτουργία RP και HILIC) των ενεργών μορφών της βιταμίνης C σε δείγματα φρούτων (Taujenis et al., 2016).

3.2. Σύγχρονες μελέτες ανάλυσης λιποδιαλυτών βιταμινών

Η ενότητα αυτή εστιάζει στην απεικόνιση και συζήτηση ορισμένων εφαρμογών που σχετίζονται με την ανάλυση λιποδιαλυτών βιταμινών σε τρόφιμα, που αναφέρονται στη βιβλιογραφία μεταξύ 2006 και 2016, τα οποία έχουν επιλεγεί είτε για την καινοτόμο προσέγγιση, είτε για τη χρήση προηγμένων τεχνικών εξαγωγής, διαχωρισμού ή/ και ανίχνευσης. Πρόσθετες πληροφορίες όσον αφορά την τεχνική παραλαβής, την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας, τις πειραματικές συνθήκες, τις στατικές και κινητές φάσεις καθώς και τους ανιχνευτές, καταγράφονται στον Πίνακα 8.

Είναι αξιοσημείωτο να συζητήσουμε τους λόγους για την ανάλυση των ρετινοειδών (παράγωγα της βιταμίνης A) στο γάλα και τις πρόσφατες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο αυτό. Η κύρια δυσκολία σχετίζεται με το περίπλοκο προφίλ των λιπαρών οξέων, και ως εκ τούτου, τον υψηλό αριθμό των ρετινυλεστέρων που προκύπτουν και που απαντώνται στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου LC-UV είναι η παρεμβολή των συνεκχυλισμένων λιπιδίων με την αναγνώριση των ρετινοειδών στα 325 nm, σε συνδυασμό με τη χρωματογραφία, γεγονός που εμποδίζει την αναγνώριση μεγάλων ποικιλιών. Πρόσφατα, ο συνδυασμός μεθόδων HPLC-DAD-APCI-MS/MS χρησιμοποιήθηκε για να ταυτοποιήσει τα ρετινοειδή και να αποσαφηνίσει τη σύνθεση του αγελαδινού, κατσικίσιου, βουβαλίσιου και προβατίσιου γάλακτος. Η φασματομετρία μάζας αποτελεί ένα επιλεκτικό σύστημα ανίχνευσης και αποτελεί ένα ισχυρό μέσο αναγνώρισης. Ωστόσο, οι συγγραφείς τόνισαν τα ελαττώματα της μεθόδου φασματομετρίας μάζας για την ανίχνευση των εστέρων ρετινυλίου, οι οποίοι στην APCI καθώς και σε άλλες πηγές ιονισμού, υφίστανται εκτεταμένο κατακερματισμό/ υποβάθμιση που ευθύνεται για την απώλεια πληροφοριών για τη μοριακή μάζα. Για κάθε ρετινυλεστέρα, το πιο άφθονο ανιχνευμένο ιόν ήταν το $[MH - \text{fat acid} - H_2O]^+$ δηλαδή πρωτονιωμένη δεϋδρορετινόλη, ενώ περισσότερα διαγνωστικά ιόντα, όπως το $[M]^+$ και το $[M+H]^+$, παρατηρήθηκαν με μειωμένη έκταση. Για τους λόγους αυτούς, ο μοναδικός τρόπος παρακολούθησης των ενδογενών συγκεντρώσεων του ρετινυλεστέρα σε πραγματικά δείγματα ήταν η απασχόληση των μεταβάσεων παρακολούθησης πολλαπλών αντοδράσεων (MRM) από κοινού με ρετινόλη, δηλαδή m/z 269/119 και m/z 269/199. Λόγω της μερικής επιλεκτικότητας της ανίχνευσης APCI, ο πλήρης χρωματογραφικός διαχωρισμός ήταν η μοναδική λύση για τον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ρετινοειδών (ρετινοϊκό οξύ, ρετινάλη, ρετινόλη και δεκατέσσερις εστέρες ρετινυλίου). Ο στόχος αυτός επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας το σύστημα διαδοχικών στηλών C18/ C30 σε συνδυασμό με την κινητή φάση NARP. Σε όλα τα είδη γάλακτος,

βρέθηκε ότι το παλμιτικό ρετινύλιο αποτελεί το πιο άφθονο βιταμερές της βιταμίνης A, αλλά το ελαϊκό ρετινύλιο ήταν η επικρατούσα μορφή στο αιγοπρόβειο γάλα. Επιπλέον, η σύνθεση ρετινοειδούς στο πρόβειο και βουβαλίσιο γάλα χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά.

Πίνακας 8. Υγροχρωματογραφικές μέθοδοι για ανάλυση των λιποδιαλυτών βιταμινών σε τρόφιμα.

Αναλυτής	Δείγμα	Τεχνική ανάλυσης	Διαχωρισμός	Ανίχνευση	Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης
D2, D3, 25-OHD2 25-OHD3	Κρέας	HPLC	NP	APCI-MS	–
α-, β-, γ-, δ- τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες	Ελαιόλαδο	HPLC	NP	FL και DAD UV Evaporative light scattering (ELSD)	LOD: 0.0001-0.0072 mg/mL (fluorescence/DAD): 0.13-0.94 mg/mL (UV): 0.35-5.40 mg/mL (ELSD)
Βιταμίνες D2, D3, K1, K2 και K3	Βρεφικές τροφές και πράσινα λαχανικά	HPLC	RP	DAD και APCI-MS	LOD: 0.6 (vit. D2) and 0.4 (vit. D3) ng/mL LOQ: 2.0 (vit. D2) and 1.3 (vit. D3)ng/mL
Βιταμίνη K	Φρέσκα και αποξηραμένα βότανα, μπαχαρικά και σπόρους, καρκεύματα και άλλα ενισχυτικά γεύσης	HPLC	RP	FL	LOD: 0.47-0.75 and 0.27-0.76 mg/mL for standard and spiked cereal samples LOQ: 1.42-2.26 and 0.82-2.32 mg/mL for standard and spiked cereal samples
15 καροτενοειδή	Καρότα	UHPLC	Έξι στήλες (BEH C18, HSS T3, HSS C18 SB, CSH C18, BEH Shield RP C18, BEH Phenyl)	APCI-MS	–

Βιταμίνη D3	Ψάρια και Οστρακοειδή	HPLC	RP	UV και επιλεγμένο ιόν παρακολούθησης MS (SIM-MS)	LOD: 1.22 mg/100 g LOQ: 5.30 mg/100 g
Εννέα λιποδιαλυτές βιταμίνες και τα παράγωγά τους	Βρεφικά μείγματα και συμπληρώματα διατροφής	UFLC	RP (C30 silica SP)	DAD και APCI-MS/MS	LOD: 0.001-0.063 mg/mL LOQ: 0.003-0.210 mg/mL
Πέντε καροτενοειδή, τέσσερις χλωροφύλλες και μία τοκοφερόλη	Μπρόκολο	UPLC	RP (two C18 sub two micron particle core-shell SP)	DAD	LOD: 05-8.0 ng/5mL LOQ: 2-16 ng/5 mL
α-, β-, γ- και δ- τοκοφερόλες	Δημητριακά	HPLC	RP	ESI-MS	91-109%
Καροτενοειδή, βιταμίνη A και E	Ζωοτροφές και γάλα	UPLC	RP (tandem C18 column system)	DAD	LOD: 1.0-3.0 ng LOQ: 7.0-13.3 ng
α-, β-, γ- και δ- τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες	Φρούτα και λαχανικά (σπανάκι, καλαμπόκι, κράνμπερι, ρόδι και χυμός μάνγκο)	HPLC	RP	HPLC-FL και APCI-MS	90-108%
Οξικός ρετινυλεστέρας, α-, δ- και (β+γ)-τοκοφερόλη	Παρασκευάσματα για βρέφη	HPLC	RP	Ηλεκτροχημική ανίχνευση (ELD) σε αμπερομετρική λειτουργία	92-106%

trans- β- καρο- τένιοι, trans- λουτεΐνη, trans- ζεαξανθίνη, trans-β- κρυπτοξαν- θίνη και tans- λυκοπένιο	Τομάτα	HPLC	RP	HPLC- DAD και APCI- MS/MS	–
trans- λουτεΐνη, trans- ζεαξανθίνη, trans-b- κρυ- πτοξανθίνη, trans-β- καροτένιο, trans- ρετινόλη, α-, γ- και δ- τοκο- φερόλη, D2, D3, K1, and MK-4	Γάλα από δια- φορετικά είδη ζώων	HPLC	RP	HPLC- DAD και APCI- MS/MS	55-100%
D2, D3, K1, MK-4 μενα- διόνη (K3)	Σπανάκι, μα- ρούλι και βρε- φικά δημη- τριακά	HPLC	RP	HPLC- DAD και HPLC-MS	88-105%

Μεταξύ των διαφορετικών τεχνικών χρωματογραφίας, η χρωματογραφία σύγκλισης είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική διότι προσφέρει γρήγορους, καθαρούς και καλά επιλυμένους διαχωρισμούς σε ενώσεις χαμηλής και μη- πολικότητας. Σε μελέτη των Taguchi et al. (2014) αναπτύχθηκε μια τεχνική για τον διαχωρισμό 17 βιταμινών (οξικός ρετινυλεστέρας, παλμιτικός ρετινυλεστέρας, β-καροτίνη, βιταμίνη D2, α-τοκοφερόλη, βιταμίνη K1, MK-4, θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, νικοτινικό οξύ, νικοτιναμίδιο, παντοθενικό οξύ, πυτριδοξίνη, βιοτίνη, κυανοκοβαλαμίνη και ασκορβικό οξύ) που καλύπτει ένα ευρύ φάσμα πολικότητας με logP από 2,11 για τη θειαμίνη έως 10,12 για το παλμιτικό ρετινύλιο. Η φασματομετρία μάζας σε συνδυασμό με την πηγή ESI χρησιμοποιήθηκε ως σύστημα ανίχνευσης. Κατά τη διάρκεια της μελέτης, η στήλη διατηρήθηκε στους 40°C και η κινητή φάση κυμαινόταν από σχεδόν 100% CO₂ έως 100% μεθανόλη. Με τον ρυθμιστή αντίστροφης πίεσης ρυθμισμένο

στα 12,4 MPa, η κατάσταση της κινητής φάσης ήταν υπερκρίσιμη στην έναρξη, μετά πιθανώς υποκρίσιμη και στο τέλος υγρή, αυξάνοντας τη σύνθεση του τροποποιητή. Η εφαρμογή αυτή έδειξε επίσης σημαντική δυνατότητα στην ανάλυση βιταμινών καθώς και σε προσεγγίσεις που περιλαμβάνουν την ταυτόχρονη ανάλυση ενός μεγάλου εύρους ενώσεων που διαφέρουν σημαντικά.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική έρευνα παρουσιάστηκαν αρχικά γενικές πληροφορίες που αφορούν τις βασικές κατηγορίες βιταμινών στα τρόφιμα, τις λιποδιαλυτές και τις υδατοδιαλυτές. Εν συνεχεία, έγινε αναφορά στις κυριότερες αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιεί ο κλάδος της αναλυτικής χημείας για τον προσδιορισμό των βιταμινών στα τρόφιμα. Αυτές είναι: η υγρή χρωματογραφία (LC) σε όλες τις παραλλαγές της, συμπεριλαμβανομένων της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), της υγρής χρωματογραφίας εξαιρετικά υψηλής απόδοσης (UHPLC), της υγρής χρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC), της νανο-υγρής χρωματογραφίας (nano-LC), της διςδιάστατης υγρής χρωματογραφίας (2D-LC), της χρωματογραφίας υπερκρίσιμου ρευστού (SFC) καθώς και της τριχοειδούς ηλεκτροχρωματογραφίας (CE). Παράλληλα, η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με μια μεγάλη ποικιλία από ανιχνευτές προσφέρει την δυνατότητα προσδιορισμού και διαχωρισμού των βιταμινών σε σύνθετες μήτρες τροφίμων. Οι ανιχνευτές αυτοί είναι: υπεριώδους/ ορατού (UV/Vis), φθορισμού (FL), συστοιχίας διοδίων (DAD), ηλεκτροχημικοί (EL) και φασματομετρίας μάζας (MS). Ακολούθως, από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας της τελευταίας δεκαετίας παρουσιάστηκαν ορισμένες σύγχρονες εφαρμογές ανάλυσης των βιταμινών. Ειδικότερα, η ποσοτικοποίηση και η ανίχνευση των φυσικών μικροθρεπτικών συστατικών συμπεριλαμβανομένων των υδατοδιαλυτών και των λιποδιαλυτών βιταμινών στα τρόφιμα είναι η τρέχουσα ερευνητική τάση στην επιστήμη της τεχνολογίας τροφίμων και στην ανάλυση της ποιότητας των τροφίμων. Επομένως, οι μελλοντικές έρευνες σχετικά με τις αναλυτικές μεθόδους προσδιορισμού των βιταμινών στα τρόφιμα, μπορεί να δώσουν έμφαση στις ακόλουθες πτυχές:

1. Η συνεχής βελτιστοποίηση και η ενσωμάτωση διαφόρων υπαρχόντων μέσων και μηχανισμών θα ενθαρρύνει την ανάπτυξη πιο αποτελεσματικών μεθόδων ανίχνευσης των βιταμινών με υψηλή αξιοπιστία, επαναληψιμότητα, ακρίβεια και ευαισθησία.

2. Με την ανάπτυξη καινοτόμων υλικών και την διευκρίνιση διαφορετικών μηχανισμών αίσθησης θα προκύψει έξυπνη προσαρμογή των βιταμινών σε πλατφόρμες αισθητήρων για φορητή και σε πραγματικό χρόνο ανίχνευση βιταμινών υψηλής απόδοσης, σύμφωνα με τη δομή των βιταμινών και τα πλεονεκτήματα των αντίστοιχων οργάνων.
3. Οι αποτελεσματικές ανοσοδοκιμασίες και τα εμπορικά kit είναι πολλά υποσχόμενες μέθοδοι ανάλυσης των βιταμινών, καθώς παρέχουν τη δυνατότητα άμεσης ανάλυσης των βιταμινών σε χαμηλό κόστος και αυξάνουν τη ζήτησή τους στον τομέα της αναλυτικής χημείας των τροφίμων.
4. Αποφεύγοντας αποτελεσματικά το στάδιο της προεπεξεργασίας των βιταμινών και δίνοντας έμφαση στην ανάπτυξη αυτόματων, οικολογικών και «έξυπνων» τεχνικών ανάλυσης των βιταμινών στο μέλλον. Ορισμένα παραδείγματα που θα μπορούσαμε να αναφέρουμε είναι η συσκευή μικροεκχύλισης και τα αντιδραστήρια/διαλύτες/ δείγματα χαμηλής κατανάλωσης για οικονομική και άμεση ανάλυση, η πρόληψη αποβλήτων με φιλικότητα προς το περιβάλλον, ο αυτοματοποιημένος εξοπλισμός που αποφεύγει την ένταση της εργασίας και του ανθρώπινου δυναμικού καθώς και αλγορίθμους που βασίζονται σε ισχυρά υπολογιστικά εργαλεία ή τεχνητή νοημοσύνη για αυτόνομη αναγνώριση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ανίχνευσης.

Τέλος, στόχος είναι οι πτυχές αυτές να αποτελέσουν ένα βήμα προόδου στην ανάλυση των βιταμινών στα τρόφιμα και όχι μόνο, παρέχοντας αξιόπιστα αποτελέσματα με την χρήση κατάλληλων μεθόδων για αναλύσεις ρουτίνας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Δρακοπούλου, Μ. (2021). Βιταμίνες και Ανόργανα Συστατικά. Διδακτική Προσέγγιση. *Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο*. 1, 1-9.
- Bettazzi, F., Ingrosso, G., Sfragano, P.S., Pifferi, V., Falciola, L., Curri, M.L., & Palchetti, I. (2021). Gold nanoparticles modified graphene platforms for highly sensitive electrochemical detection of vitamin C in infant food and formulae. *Food Chemistry*. 344, 128692.
- Bijttebier, S., D'Hondt, E., Noten, B., Hermans, N., Apers, S. & Voorspoels, S. (2014). Ultra-high performance liquid chromatography versus high performance liquid chromatography: stationary phase selectivity for generic carotenoid screening, *J. Chromatogr. A*, 1332, 46-56.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Smith, N.W., & Ruano-Miguel, L. (2006). Use of a polar-embedded stationary phase or the separation of tocopherols by CEC, *Electrophoresis*. 27, 4423-4430.
- Cerretani, L., Lerma-García, M.J., Herrero-Martínez, J.M., Gallina-Toschi, T., & Simó-Alfonso, E.F. (2010). Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils by nano liquid chromatography with ultraviolet-visible detection using a silica monolithic column, *J. Agric. Food Chem.* 58, 757-761.
- Ciulu, M., Solinas, S., Floris, I., Panzanelli, A., Pilo, M.I., Piu, P.C., Spano, N., Sanna, G. (2011). RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey, *Talanta*. 83, 924-929.
- Chamkouri, N., Khodadoust, S. & Ghalavandi, F. (2015). Solid-phase extraction coupled with HPLC-DAD for determination of B vitamin concentrations in halophytes, *J. Chromatogr. Sci.* 53, 1720-1724.
- Chen, J.H., & Jiang, S.J. (2008). Determination of Cobalamin in Nutritive Supplements and Chlorella Foods by Capillary Electrophoresis-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 56, 1210-1215.

- Da Silva, D., Visentainer, J., Souza, N., & Oliveira, C. (2013). Micellar electro kinetic chromatography method for determination of the ten water-soluble vitamins in food supplements, *Food Anal. Methods*. 6, 1592–1606.
- De Assis, R. C., De Lima Gomes Soares, R., Siqueira, A. C. P., De Rosso, V. V., De Sousa, P. H. M., Mendes, A. E. P., & Maia, C. S. C. (2020). Determination of water-soluble vitamins and carotenoids in Brazilian tropical fruits by High Performance Liquid Chromatography. *Heliyon*, 6 (10), e05307
- Fanali, C., D'Orazio, G., Fanali, S., & Gentili, A. (2017). Advanced analytical techniques for fat-soluble vitamin analysis, *Trends n Analytical Chemistry*. 87, 82-97.
- Fatima, Z., Jin, X., Zou, Y., Kaw, H. Y., Quinto, M., & Li, D. (2019). Recent trends in analytical methods for water-soluble vitamins. *Journal of Chromatography A*. 1606.
- Furusawa, N. (2001). Rapid high-performance liquid chromatographic identification/quantification of total vitamin C in fruit drinks, *Food Control*. 12, 27–29.
- Gee, P.T., Liew, C.Y., Thong, M.C. & Gay, M.C. (2016). Vitamin E analysis by ultra performance convergence chromatography and structural elucidation of novel atocodienol by high-resolution mass spectrometry, *Food Chem.*, 196, 367-373.
- Gentili, A., Caretti, F., Bellante, S., Ventura, S., Canepari & Curini, R. (2007). Comprehensive profiling of carotenoids and fat-soluble vitamins in milk from different animal species by LC-DAD-MS/MS hyphenation, *J. Agric. Food Chem.* 61, 1628-1639.
- Gentili, F., Caretti, G., D'Ascenzo, S., Marchese, D., Perret, D.D., Corcia, L., & Rocca, M. (2008). Simultaneous determination of water-soluble vitamins in selected food matrices by liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun, Mass Spectrom.* 22, 2029–2043.

- Gökmen, V., Kahraman, N., Demir, N., Acar, J. (2000). Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables, *J. Chromatogr. A.* 881, 309–316.
- Gornas, P., Siger, A. (2015). Simplified sample preparation and rapid detection by RP HPLC/ FLD of tocopherols and tocotrienols in margarines: preliminary screening of plant fats – potential quality markers, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, 117, 1589-1597.
- Gliszczynska-Świgło, A., Rybicka, I. (2015). Simultaneous determination of caffeine and water-soluble vitamins in energy drinks by HPLC with photodiode array and fluorescence detection, *Food Anal. Method.* 8, 139–146.
- Hernández, Y., Lobo, M.G., González, M. (2006). Determination of vitamin C in tropical fruits: a comparative evaluation of methods, *Food Chem.* 96, 654–664.
- Hee-Jung, S., Byungioo, K., & Joonhee, L. (2016). A Systematic Approach for the Determination of B-Group Vitamins in Multivitamin Dietary Supplements by High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection and Mass Spectrometry, *J. AOAC int.* 99, 1223–1232.
- Hu, C., Jia, L., Liu, Q., & Zhang, S. (2010). Development of magnetic octadecylsilane particles as solid-phase extraction adsorbent for the determination of fat-soluble vitamins in fruit juice-milk beverage by capillary liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 33, 2145-2152.
- Hu, Y., Wu, H.-L., Yin, X.-L., Gu, H.-W., Xiao, R., Xie, L.-X., Yu, R.-Q. (2018). Rapid and interference-free analysis of nine B-group vitamins in energy drinks using trilinear component modeling of liquid chromatography-mass spectrometry data. *Talanta*, 180, 108–119.
- Ingrosso, C., Corricelli, M., Bettazzi, F., Konstantinidou, E., Bianco, G. V., Depalo, N., & Palchetti, I. (2019). A nanoparticle in situ decorated RGO nanocomposites for highly

- sensitive electrochemical genosensors. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(5), 768–777.
- Jakobsen, J., Saxholt, E. (2009). Vitamin D metabolites in bovine milk and butter, *J. Food Comp. Anal.* 22, 472-478.
- Jumaah, F., Larsson, S., Essén, S., Cunico, L.P., Holm, C., Turner, C., & Sandahl, M. (2016). A rapid method for the separation of vitamin D and its metabolites by ultrahigh performance supercritical fluid chromatography - mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1440, 191-200.
- Kaede, S., Hideo, H., & Ryusuke, T. (2020). Determination of 13 Vitamin B and the Related Compounds Using HPLC with UV Detection and Application to Food Supplements, *Chromatographia*. 83, 839–851.
- Karatapanis, A.E., Fiamegos, Y.C., & Stalikas, C.D. (2009). HILIC separation and quantitation of water-soluble vitamins using diol column, *J. Sep. Sci.* 32, 909–917.
- Kattner, L., & Rauch, E. (2016). Optimization of chemical syntheses of vitamin D C3-epimers, *Anticancer Res.* 36, 1417-1421.
- Kennedy, D. (2016). B Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy-A Review. *Nutrients*. 8(2), 68–96.
- Knecht, K., Sandfuchs, K., Kulling, S.E. & Bunzel, D. (2015). Tocopherol and tocotrienol analysis in raw and cooked vegetables: a validated method with emphasis on sample preparation, *Food Chem.* 169, 20-27.
- Langer, S. & Lodge, J.K. (2014). Determination of selected water-soluble vitamins using hydrophilic chromatography: a comparison of photodiode array, fluorescence, and coulometric detection, and validation in a breakfast cereal matrix, *J. Chromatogr. B* 960, 73–81.

- Lebiedzinska A, Marszałł, M.L., Grembecka, M., Czaja, J., Szefer, P., Kuta, J., Garabato, B.D., & Kozłowski, P.M. (2018). Detection of B6 Vitamers in Grain Products: Experimental and Computational Studies, *Food Anal. Method.* 11, 725–732.
- Lee, H., Kwak, B., Ahn, J., Jeong, S., Shim, S., Kim, K., Yoon, T., Leem, D. & Jeong, J. (2011). Simultaneous Determination of Vitamin A and E in infant Formula by HPLC with Photodiode Array Detection. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 31, 191–199.
- León-Ruiz, V., Vera, S., González-Porto, A., San Andrés, M. (2013). Analysis of water-soluble vitamins in honey by isocratic RP-HPLC, *Food Anal. Meth.* 6, 488–496.
- Lesellier, E., & West, C. (2015). The many faces of packed column supercritical fluid chromatography - a critical review, *J. Chromatogr. A* 1382, 2-46.
- Liddicoat, C., Hucker, B., Liang, H., & Vriesekoop, F. (2015). Thiamin analysis in red wine by fluorescence reverse phase-HPLC, *Food Chem.* 177, 325–329.
- Liu, Q., Jia, L., & Hu, C. (2010). On-Line concentration methods for analysis of fat-soluble vitamins by MEKC, *Chromatographia.* 72, 95–100.
- Luo, S., Duan, H., Zou, Y., Qiu, R. & Wang, C. (2017). Quantification of total folate, Folate Species and Polyglutamyl Folate Distribution in Winged Beans (*Psophocarus tetragonolobus* (L) DC) from different cultivars and Growth Stages by Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 63, 69–80.
- Mazina, J., & Gorbato, J. (2010). Sample preparation for CE-DAD analysis of the water-soluble vitamins in food products, *Procedia Chem.* 2, 46–53.
- Mazurek, J., & Jamroz. (2015). Precision of dehydroascorbic acid quantitation with the use of the subtraction method – Validation of HPLC–DAD method for determination of total vitamin C in food, *Food Chem.* 173, 543–550.

- Melfi, M.T., Nardiello, D., Cicco, N., Candido, V. & Centonze, D. (2018). Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins, lycopene and beta-carotene in tomato samples and pharmaceutical formulations: Double injection single run by reverse-phase liquid chromatography with UV detection, *J. Food Compos. Anal.* 70, 9–17.
- Ni, X., Xing, X., Cao, Y., & Cao, G. (2014). Rapid analysis of water- and fat-soluble vitamins by electrokinetic chromatography with polymeric micelle as pseudo stationary phase, *J. Chromatogr A*. 1370, 263–269.
- Nováková, L., Perrenoud, A.G.G., Francois, West, C., Lesellier, E., & Guillaume, D. (2014). Modern analytical supercritical fluid chromatography using columns packed with sub-2mm particles: a tutorial, *Anal. Chim. Acta* 824, 18-35.
- Ostovan, A., Ghaedi, M., Arabi, M., Yang, J. & Li, L. (2018). Hydrophilic Multi-Template Molecularly Imprinted Biopolymers Based on a Green Synthesis Strategy for Determination of B-family Vitamins, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 10, 4140–4150.
- Pérez-Fernández, V., Gentili, A., Martinelli, A., Caretti, F., & Curini, R. (2016). Evaluation of oxidized buck paper as material for the solid phase extraction of cobalamins from milk: its efficacy as individual and support sorbent of a hydrophilic–lipophilic balance copolymer, *J. Chromatogr. A* 1428, 255–266.
- Porter, K. & Lodge, J.K. (2021). Determination of selected water-soluble vitamins (thiamine, riboflavin, nicotinamide and pyridoxine) from a food matrix using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with mass spectroscopy. *J. Chromatography B*, 1171, 122541.
- Rakusa, Z. T., Grobin, A. & Roskar, R. (2021). A comprehensive approach for the simultaneous analysis of all main water-soluble vitamins in multivitamin preparations by a stability-indicating HPLC-DAD method. *Food Chemistry*, 337, 127768.

- Sánchez-Mata, M.C., Cabrera Loera, R.D., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Cámara, M., Díez Marqués, C., Pardo-de-Santayana, M., Tardío, J. (2012). Wild vegetables of the Mediterranean area as valuable sources of bioactive compounds, *Genet. Resour. Crop Evol.* 59, 431–443.
- Sánchez-Mata, M.C., Cámara-Hurtado, M., Díez-Marqués, C., Torija-Isasa, M.E. (2000). Comparison of high-performance liquid chromatography and spectro fluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.), *Eur. Food Res. Technol.* 210, 220–225.
- Schmidt, A., Schreiner, M.G., & Mayer, H.K. (2017). Rapid determination of the various native forms of vitamin B6 and B2 in cow's milk using ultra-high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1500, 89–95.
- Serni, E., Audino, V., Carlo, S.D., Manera, C., Saccomanni, G., & Macchia, M. (2013). Determination of water-soluble vitamins in multivitamin dietary supplements and in artichokes by micellar electro kinetic chromatography, *Nat. Prod. Res.* 27, 2212–2215.
- Spínola, V., Mendes, B., Câmara, J.S., Castilho, P.C. (2013). Effect of time and temperature on vitamin C stability in horticultural extracts. UHPLC-PDA vs odometric titration as analytical methods, *LWT – Food Sci. Technol.* 50, 489–495.
- Spinola, V., Lliorent-Martinez, E., Castilho, P.C. (2014). Determination of vitamin C in foods: Current state of method, *J. Chromatography A.* 1369, 2-17.
- Strobel, N., Buddhadasa, S., Adorno, P., Stockham, K., & Greenfield, H. (2013). Vitamin D and 25-hydroxyvitamin D determination in meats by LC-MS, *Food Chem.*, 138, 1042-1047.

- Taguchi, K., Fukusaki, E., & Bamba, T. (2014). Simultaneous analysis for water-and fat-soluble vitamins by a novel single chromatography technique unifying supercritical fluid chromatography and liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1362, 270-277.
- Temova Rakusa, Z., Grobin, A., Roskar, R. (2021). A comprehensive approach for the simultaneous analysis of all main water-soluble vitamins in multivitamin preparations by a stability-indicating HPLC-DAD method, *Food Chemistry*. 337, 127768.
- Thomas, J., Yen, J., Sharpless, K. (2013). Characterization of NIST food-matrix standard reference materials for their vitamin C content, *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 4539–4548.
- Tyśkiewicz, K., Dębczak, A., Gieysztor, R., Szymczak, T., & Rój, E. (2017). Determination of fat- and water-soluble vitamins by supercritical fluid chromatography: A review. *Journal of Separation Science*, 41(1), 336–35.
- Valente, A., Sanches-Silva, A., Albuquerque, T.G., Costa, H.S. (2014). Development of an orange juice in-house reference material and its application to guarantee the quality of vitamin C determination in fruits, juices and fruit pulps, *Food Chem.* 154. 71–77.
- Volmer, DA., Mendes, LR., & Stokes, CS. (2013). Analysis of vitamin D metabolic markers by mass spectrometry: Current techniques, limitations of the "gold standard" method, and anticipated future directions. *Mass Spectrom Rev.* 34, 2-23.
- Vinas, P., Pastor-Belda, M., Campillo, N., Bravo-Bravo, M., & Hernandez-Cordoba, M. (2014). Capillary liquid chromatography combined with pressurized liquid extraction and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of vitamin E in cosmetic products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 94, 173-179.

- Wang, X., Li, K., Yao, L., Wang, C., & Schepdael, A.V. (2018). Recent advances in vitamins analysis by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 147, 278-287.
- Yamada, H., Kitagawa, S., & Ohtani, H. (2013). Simultaneous separation of water- and fat-soluble vitamins in-isocratic pressure – assisted capillary electrochromatography using a methacrylate-based monolithic column, *J. Sep. Sci.* 36, 1980–1985.
- Zhang, Y., Zhou, W., Yan, J., Liu, M., Zhou, Y., Shen, X., Ma, Y., Feng, X., Yang, J. and Li, G. (2018). A review of the Extraction and Determination Methods of Thirteen Essential Vitamins to the Human Body: An Update from 2010. *Molecules*, 23, 1484.
- Zhou, T., Li, H., Shang, M., Sun, D., Liu, C. & Che, G. (2021). Recent analytical methodologies and analytical trends for riboflavin (vitamin B2) analysis in food, biological and pharmaceutical samples. *Trends in Analytical Chemistry*. 143, 116412.