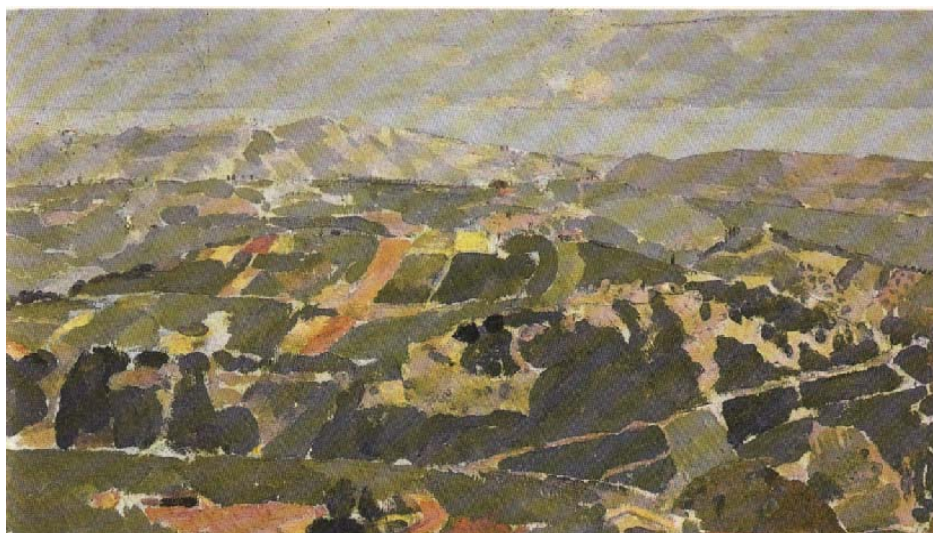




ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Προσδιορισμός βιταμινών στην Κορινθιακή σταφίδα

Πτυχιακή Μελέτη
Κανέλλος Παναγιώτης



Επιβλέπων Καθηγητής:

Καραθάνος Βάιος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Τριμελής επιτροπή:

Καραθάνος Βάιος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Καλογερόπουλος Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής

Χίου Αντωνία, Επίκουρη Καθηγήτρια

-ΑΘΗΝΑ 2009-

Στην οικογένειά μου και στη Ρίτσα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε από τον φοιτητή του Τμήματος Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, Κανέλλο Παναγιώτη. Το πειραματικό μέρος της μελέτης έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Χημείας, Φυσικοχημείας & Βιοχημείας Τροφίμων κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2007-2008 και 2008-2009 υπό την επίβλεψη του κου Καραθάνου Βάιου, Αναπληρωτή Καθηγητή του τμήματος.

Ευχαριστώ θερμά τον κ. Καραθάνο που πίστεψε στις ικανότητες μου και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα προϊόν με ιδιαίτερη σημασία για εμένα, καθώς η καταγωγή μου είναι από το Αίγιο, μια περιοχή όπου η ιστορία της είναι συνυφασμένη με την Κορινθιακή σταφίδα.

Ευχαριστώ επίσης θερμά την κα Χίου Αντωνία, Επίκουρη Καθηγήτρια του τμήματος, η οποία ήταν η πηγή της γνώσης και της εμπειρίας που απέκτησα από την ενασχόλησή μου με την μελέτη αυτή. Χωρίς την πολύτιμη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον κ. Καλογερόπουλο Νικόλαο, Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος, για την πολύτιμη συμβολή του στην περάτωση της πτυχιακής μου εργασίας, καθώς και την κα Ανδριάννα Καλιώρα, Λέκτορα του τμήματος, για τη βοήθειά της σε κρίσιμα σημεία του πειράματος.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στις κυρίες Μ. Χρηστέα, Α. Γκιοζάρη, Ε. Καρβέλα, Α. Κουντούρη, Ν. Σάλτα και Φ. Γαβαλά για την υλική και ψυχολογική υποστήριξή τους κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

**Ιούλιος 2009,
Κανέλλος Παναγιώτης**

Το εξώφυλλο είναι έργο του Αιγιώτη ζωγράφου Πάνου Φειδάκη, με τίτλο «Τοπίο της Αιγιαλείας»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αρκετές μελέτες έχουν ασχοληθεί με το περιεχόμενο της Κορινθιακής σταφίδας σε αντιοξειδωτικές ουσίες, αλλά όχι και με το περιεχόμενό της σε βιταμίνες.

Σκοπός: Δεδομένου του κενού στην επιστημονική βιβλιογραφία αλλά και της σημαντικής θέσης της Κορινθιακής σταφίδας ανάμεσα στα προϊόντα εξαγωγής της χώρας μας, η παρούσα μελέτη έχει σκοπό να προσδιορίσει (ποιοτικά και ποσοτικά) τις βιταμίνες σε αυτό το προϊόν.

Μεθοδολογία: Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα σταφίδας Βοστίτσας (vostizza) τόσο συμβατικής επεξεργασμένης όσο και βιολογικής επεξεργασμένης. Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση της θειαμίνης, της ριβοφλαβίνης και της πυριδοξίνης από τα δείγματα σταφίδας με HCl 0,1M και στη συνέχεια ενζυμική κατεργασία με διάφορα ενζυμικά παρασκευάσματα (τακαδιαστάση, όξινη φωσφατάση, β-γλυκοζιδάση). Στη συνέχεια έγινε ο προσδιορισμός των βιταμινών αυτών με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC). Παράλληλα, έγινε προσδιορισμός του ασκορβικού οξέος σε 3 δείγματα Κορινθιακής σταφίδας Βοστίτσας με μια ογκομετρική μέθοδο, η οποία περιλαμβάνει τιτλοδότηση του διαλύματος 2,6-διχλωρο-φαινυλο-ινδο-φαινόλης (DPI) και στη συνέχεια ογκομέτρηση του ασκορβικού οξέος με το τιτλοδοτημένο διάλυμα DPI.

Αποτελέσματα: Η HPLC έδειξε την παρουσία θειαμίνης και ριβοφλαβίνης τόσο στα δείγματα βιολογικής όσο και συμβατικής σταφίδας που μελετήθηκαν, με μικρές μόνο διαφορές μεταξύ τους. Επίσης, διαπιστώθηκε η παρουσία πυριδοξίνης στα δείγματα συμβατικής σταφίδας τα οποία μελετήθηκαν, ενώ φάνηκε και η πιθανή παρουσία γλυκοζυλιωμένων μορφών της βιταμίνης αυτής στη σταφίδα. Επιπλέον, φάνηκε και η παρουσία ασκορβικού οξέος και στα 3 δείγματα σταφίδας που χρησιμοποιήθηκαν, με τη σταφίδα small να εμφανίζει τη μικρότερη συγκέντρωση σε ασκορβικό οξύ.

Συμπεράσματα: Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά για τη συνέχιση της έρευνας πάνω στο συγκεκριμένο προϊόν, καθώς διαπιστώθηκε η παρουσία 4 υδατοδιαλυτών βιταμινών σε ποσότητες μετρήσιμες και συγκρίσιμες με άλλα φρούτα που καταναλώνονται ευρέως από τον ελληνικό πληθυσμό.

ABSTRACT

Many studies have dealt with the content of currants in antioxidant substances, but no with its content in vitamins.

Aim: Because of the lack of the evidence in the scientific bibliography and the important place of currants between the products that our country exports, the present study has aims to determine (qualitatively and quantitatively) the vitamins in this product.

Methodology: The samples of currants (vostizza) that were used in the study were samples of biological processed and conventional processed currants. Thiamin, riboflavin and pyridoxine were extracted from the samples of currants with HCl 0,1M and followed by enzymatic treatment with various enzymatic preparations (takadiastase, acid phosphatase, β -glycosidase). The determination of vitamins was performed by using High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). At the same time, the determination of ascorbic acid in 3 samples of currants (vostizza) was performed by a volumetric method, which included titration of the solution of 2,6-Dichloro-phenylo-indo-phenol (DPI) and then titration of ascorbic acid with the solution of DPI.

Results: HPLC analysis demonstrated the presence of thiamine and riboflavin in the samples of biological and conventional currants that were studied, with only small differences between them. Moreover, HPLC analysis demonstrated the presence of pyridoxine in the samples of conventional currants, while glucosylated forms of B6 vitamers could also be present. Furthermore, the volumetric method for ascorbic acid demonstrated the presence of ascorbic acid in the 3 samples of currants that were used, but the concentration of ascorbic acid varied among the 3 samples.

Conclusions: The results of the present study can be particularly motivating for continuing the study on this product, as this study demonstrated the presence of 4 water-soluble vitamins in quantities measurable and comparable with other fruits that are consumed widely by the Greek population.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Η ΣΤΑΦΙΔΑ	8
1.1 Γενικά	8
1.2 Είδη σταφίδας	10
1.2.1 Κορινθιακή σταφιδάμπελος	10
1.2.2 Σουλτανίνα	13
1.3 Κατεργασία Κορινθιακής σταφίδας	14
1.3.1 Ξήρανση σταφίδας	14
1.3.2 «Τρίψιμο», «λίχνισμα», «κοσκίνισμα» & «διαλογή» τελικού προϊόντος	15
1.3.3 Επεξεργασία σταφίδας	15
1.3.4 Αποθήκευση σταφίδας	16
1.4 Συστατικά της σταφίδας	17
1.5 Η θέση της σταφίδας στη Μεσογειακή Διατροφή	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ	21
2.1 Γενικά	21
2.2 Υδατοδιαλυτές βιταμίνες	23
2.2.1 Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C)	23
2.2.2 Θειαμίνη (Βιταμίνη B1)	25
2.2.3 Ριβοφλαβίνη (Βιταμίνη B2)	27
2.2.4 Νιασίνη (Βιταμίνη B3)	30
2.2.5 Παντοθενικό οξύ	32
2.2.6 Βιοτίνη	35
2.2.7 Βιταμίνη B6	38
2.2.8 Φυλλικό οξύ	40
2.2.9 Κοβαλαμίνη (Βιταμίνη B12)	42
2.3 Λιποδιαλυτές βιταμίνες	45
2.3.1 Βιταμίνη A	45
2.3.2 Βιταμίνη D	47
2.3.3 Βιταμίνη E	52
2.3.4 Βιταμίνη K	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ	58
3.1 Υδατοδιαλυτές βιταμίνες	58
3.1.1 Θειαμίνη	58
3.1.2 Ριβοφλαβίνη	61
3.1.3 Νιασίνη	63
3.1.4 Βιταμίνη B6	65
3.1.5 Παντοθενικό οξύ	67
3.1.6 Βιοτίνη	68
3.1.7 Ασκορβικό οξύ	69
3.1.8 Φυλλικό οξύ	72
3.2 Λιποδιαλυτές βιταμίνες	73
3.2.1 Βιταμίνη A	73
3.2.2 Βιταμίνη D	74
3.2.3 Βιταμίνη E	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	77
4.1 Υλικά & όργανα	77

4.1.1 Υλικά	77
4.1.2 Όργανα	78
4.2 Δείγματα σταφίδας	79
4.3 Πειραματικές διαδικασίες	79
4.3.1 Σύγχρονος Προσδιορισμός 7 Υδατοδιαλυτών Βιταμινών	79
4.3.2 Προσδιορισμός Ριβοφλαβίνης	80
4.3.3 Προσδιορισμός Θειαμίνης (ως Θειόχρωμα)	82
4.3.4 Προσδιορισμός βιταμίνης B6	83
4.3.5 Προσδιορισμός Ασκορβικού οξέος	85
4.3.6 Προσδιορισμός Λιποδιαλυτών βιταμινών	86
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	87
5.1 Περιεκτικότητα της σταφίδας σε θειαμίνη	87
5.2 Περιεκτικότητα της σταφίδας σε ριβοφλαβίνη	89
5.3 Περιεκτικότητα της σταφίδας σε βιταμίνη B6	95
5.4 Περιεκτικότητα της σταφίδας σε ασκορβικό οξύ	99
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	101
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	105

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Η ΣΤΑΦΙΔΑ

1.1 Γενικά



Το ευρέως διαδεδομένο θαμνώδες φυτό του αμπελιού ανήκει στο γένος *Vitis* της οικογένειας των αμπελιδών (*Ampelidae*, *Vitaceae*), το οποίο περιλαμβάνει μία ιδιαίτερα μεγάλη ποικιλία ειδών.

Ανάμεσα σε αυτά είναι και η άμπελος η οиноφόρος ή *Vitis Vinifera* var. *apyrena* ή όπως κοινώς ονομάζεται σταφιδάμπελος, η οποία καλλιεργείται σε πολλές περιοχές του πλανήτη (Χαλουλάκος, 1993). Οι ποικιλίες της «Αμπέλου της Οиноφόρου» (*Vitis vinifera*), λόγω της υψηλής γενετικής ετερογένειας, υπερβαίνουν τις 10.000 παγκοσμίως. Ο αριθμός όμως των ποικιλιών, που καλλιεργούνται για παραγωγή αμπελουργικών προϊόντων, περιορίζεται σε μερικές εκατοντάδες και ομαδοποιούνται με διάφορα κριτήρια.

Με βάση το κριτήριο, «προορισμός χρήσης των προϊόντων», οι ποικιλίες κατατάσσονται σε πέντε κατηγορίες:

- ✓ Επιτραπέζιες
- ✓ Οινοποιίας
- ✓ Σταφιδοποιίας
- ✓ Χυμοποίησης
- ✓ Κονσερβοποίησης

Για την κατηγορία της Σταφιδοποιίας, τα κριτήρια είναι πολύ αυστηρά και έτσι, λίγες ποικιλίες είναι κατάλληλες για παραγωγή σταφίδων.

Τον καρπό της σταφιδάμπελου αποτελεί η μαύρη ή κορινθιακή σταφίδα, η οποία ευδοκμεί κατά κύριο λόγο στην Ελλάδα και ιδιαίτερα στην περιοχή της Πελοποννήσου. Η κορινθιακή σταφίδα, σύμφωνα με επιστημονική εκδοχή, αποτελεί προϊόν βλαστικής μεταλλαγής της οινοποιήσιμης αμπέλου και μάλιστα της ποικιλίας Λιάτικο. Χαρακτηριστικό της γνώρισμα είναι η απουσία κουκουτσιών "γιγάρτων" από τις ρόγες του σταφυλιού και έτσι αναγνωρίστηκε ως ιδιαίτερη ποικιλία αμπέλου (*Vitis vinifera* varietas *apyrena*).

Η σταφίδα ορίζεται ως ο επεξεργασμένος με κάθε τρόπο καρπός όλων των ειδών - ποικιλιών του αμπελιού, του οποίου η βρώση είναι εφικτή (Σταυρακάκης, 1986). Διεθνώς ο όρος αυτός αποδίδεται στα αποξηραμένα σταφύλια ορισμένων μόνο ποικιλιών της αμπέλου και συγκεκριμένα:

- της Σουλτανίνας
- της Κορινθιακής Σταφίδας
- του Μοσχάτου Αλεξανδρείας

Το σύνολο των μεθόδων, των τεχνικών και των μέσων που χρησιμοποιούνται σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, για να μετατραπούν τα σταφύλια σε σταφίδες, συνιστούν την Σταφιδοποιία (Σταυρακάκης, 1986). Στη χώρα μας σταφιδοποιούνται σταφύλια των δύο πρώτων ποικιλιών.

Ενώ μέχρι τις αρχές του 20^{ου} αιώνα οι κύριες σταφιδοπαραγωγικές χώρες ήταν η Τουρκία και η Ελλάδα, τα πιο πρόσφατα δεδομένα (μέσα 20^{ου} αιώνα έως σήμερα) δείχνουν τις Η.Π.Α. και την Τουρκία να κατέχουν τις πρώτες θέσεις ενώ η Ελλάδα, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα, βρίσκεται στην 4^η θέση. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια μείωση της παραγωγής σταφίδας στην Ελλάδα και επομένως μείωση στο ποσοστό συμμετοχής της χώρας μας στην παγκόσμια παραγωγή σταφίδας.

Πίνακας 1.1: Παραγωγή σταφίδας σε τόνους. Δεδομένα για τα έτη 2004 2005. [Βάση δεδομένων FAOSTAT (Διεθνής Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας)].

Χώρα	2004		2005	
 Τουρκία	329 000,00	30 %	343 100,00	30 %
 ΗΠΑ	310 500,00	28 %	320 000,00	28 %
 Ιράν	145 000,00	13 %	145 500,00	13 %
 Ελλάδα	73 269,00	7 %	71 194,00	6 %
 Χιλή	53 700,00	5 %	64 000,00	6 %
 Νότια Αφρική	39 500,00	4 %	40 000,00	4 %
 Ουζμπεκιστάν	37 500,00	3 %	37 500,00	3 %
 Αφγανιστάν	33 750,00	3 %	33 750,00	3 %
 Αυστραλία	28 500,00	3 %	22 000,00	2 %
 Συρία	12 000,00	1 %	12 000,00	1 %
Άλλες χώρες	44 351,96	4 %	44 849,00	4 %
Σύνολο	1 107 070,96	100 %	1 133 893,00	100 %

Εάν επιχειρούσαμε μία ιστορική διαδρομή στην αρχαία Ελλάδα θα συναντούσαμε τις σταφίδες με τις ονομασίες ασταφίδες, σταφιλίδες και οσταφίδες, η οποία αποτελεί και την παλαιότερή τους ονομασία (Διοσκορίδης Ε, 4). Η πρωτότυπη λέξη, στην οποία βασίστηκαν τα παραπάνω παράγωγα, πιστεύεται ότι είναι η «οστέινη», η οποία χρησιμοποιούνταν για τον προσδιορισμό της έννοιας του σκληρού στην αρχαία Ελλάδα. Σκληρά αντικείμενα θεωρούνταν το οστό, ο αστακός και το όστρακο. Οι παραπάνω ονομασίες επομένως ενδέχεται να δόθηκαν στη σταφίδα λόγω της οστεώδους (ξηρής και σκληρής) ρίζας της αμπέλου από την οποία προέρχεται, αλλά και της ιδιότητας του καρπού να είναι ξηρός.

Η σταφίδα, κατά τον συγγραφέα Νίκο Μπακουνάκη, είναι από εκείνα τα μυθιστορηματικά "αντικείμενα" που αποτελούν την υλική απόδειξη της ευτυχίας της αστικής και μεσοαστικής αγγλικής οικογένειας του 19^{ου} αιώνα. Συστατικό στοιχείο της πουτίγκας και του κέικ, παίρνει μέρος στο χριστουγεννιάτικο τραπέζι και αποθεώνεται από τον Κάρολο Ντίκενς, ως σημάδι πλούτου και αφθονίας, στην έξοχη νουβέλα του «A Christmas Carol» (Μπακουνάκης, 1988).

1.2 Είδη σταφίδας

1.2.1 Κορινθιακή σταφιδάμπελος

Η κορινθιακή σταφιδάμπελος είναι ζωνρότατη και παραγωγική ποικιλία και καρποφορεί ακόμα και σε ξερό ξύλο. Ως νεαρό φυτό, έχει χρώμα τεφροπράσινο με ερυθρά παρυφή καλυμμένη με βαμβακώδες χνούδι. Το φύλλο είναι μάλλον μεγάλου μεγέθους, σχήματος κυκλικού προς σφηνοειδές, συνήθως πεντάκολπο, με έλασμα παχύ, βαθυπράσινου χρώματος με οδόντες σε δύο σειρές και νευρώσεις κιτρινοπράσινου χρώματος, με την άνω επιφάνεια λεία και την κάτω με βαμβακώδες χνούδι.

Το σταφύλι είναι μετρίου μεγέθους, κυλινδρικό, συνήθως διπλό και πυκνόραγο. Ο ποδίσκος είναι μετρίου μεγέθους και πάχους και εύκολα αποκοπώμενος. Το μέσο βάρος του σταφυλιού είναι περίπου 200g. Οι ράγες αποτελούν το 98% του ολικού βάρους του σταφυλιού, αρκετά μεγαλύτερο από το αντίστοιχο άλλων ποικιλιών της αμπέλου. Η ράγα είναι μικρή, σφαιρική και σε ποσοστό περίπου 98%, χωρίς κουκούτσι (αγίγερτη). Οι εγίγερτες ράγες και αυτές μεγάλης διαμέτρου, θεωρούνται κακής ποιότητας προϊόν (Κριμπά, 1943).

Η ωρίμανση αρχίζει από τις αρχές Αυγούστου στα πεδινά και φτάνει μέχρι τα τέλη Σεπτεμβρίου στα ορεινά. Η Κορινθιακή Σταφίδα ευδοκίμει σε εδάφη ελαφρά, καλώς στραγγιζόμενα, έστω και χαλικώδη, όπου έχει τις μεγαλύτερες αποδόσεις. Είναι καλλιέργεια ευαίσθητη στα παθογόνα (περονόσπορο, ωίδιο, ίσκα, ευδεμίδα) και γι αυτό απαιτεί ιδιαίτερο κόπο (Νταβίδης, 1982, Σταύρακας, 1993).

Τα σταφύλια τα οποία προορίζονται για σταφιδοποίηση αποκαλούνται: Κορινθιακή σταφίδα (ελλην.), Raisin de Corinthe (γαλλ.), Currant (αγγλ.), Passolina, Passerina (ιταλ.). Λόγω ομοιότητας του συγκεκριμένου φρούτου με τους καρπούς ορισμένων θαμνοειδών φυτών (του γένους Ribes, οικογένειας Grossulariaceae), δόθηκε σε αυτά η αγγλική ονομασία του φυτού "currant". Υπάρχουν τρεις υποποικιλίες: η μαύρη, η λευκή και η ερυθρά, σε μεγαλύτερη όμως έκταση καλλιεργείται η μαύρη Κορινθιακή, η οποία είναι και η πιο παραγωγική. Η λευκή υποποικιλία απαντάται διάσπαρτα κατά κύριο λόγο στους αμπελώνες της Ζακύνθου. Η μικρότερης παραγωγικότητας κόκκινη φύεται στην περιοχή της Κεφαλονιάς.

Η Κορινθιακή σταφιδάμπελος αποτελεί το πρώτο από άποψη αρχαιότητας εθνικό προϊόν. Παρόλο που η χρονολογική περίοδος εμφάνισής της δεν είναι διευκρινισμένη, οι ονομασίες της (σταφίδες, ασταφίδες, οσταφίδες) αναφέρονται από πολύ παλιά. Συγκεκριμένα, ο Ιπποκράτης αναφέρει χαρακτηριστικά στα συγγράμματά του τους όρους ασταφίδα και σταφίδα, την οποία μάλιστα διακρίνει και σε δύο είδη: τη λευκή και τη μαύρη (β' και γ' «περί νουσών», «περί γυναικείας φύσεως»).

Η σταφιδάμπελος είναι σαφές ότι προϋπήρχε στην Πελοπόννησο. Πρώτη σχετική μαρτυρία συναντάμε στα «Προβλήματα» του Αριστοτέλη, ο οποίος αναφέρει ότι πρόκειται για ατελή σταφύλια με μικρές ράγες, τα οποία στερούνται πυρήνα ή διαθέτουν ένα πολύ μικρό σε μέγεθος πυρήνα. Πολύ αργότερα, στις αρχές του 14^{ου} αιώνα, η ύπαρξη της Κορινθιακής σταφιδάμπελου επικυρώνεται από γραπτές μαρτυρίες, καθώς αναφέρονται οι περιοχές Κατάκολο και Κόρινθος ως οι εξαγωγικοί λιμένες της κορινθιακής σταφίδας. Η ραγδαία ανάπτυξη στον τομέα του εμπορίου (14^{ος} – 15^{ος} αι.) καθιστά τη σταφίδα ως ένα πλέον αναγνωρισμένο είδος εμπορίας στην Ευρώπη (Σάββα, 2006).

Η Κορινθιακή σταφίδα αποτελεί ένα από τα βασικότερα αγροτικά εξαγωγικά προϊόντα της Ελλάδας. Σήμερα οι εξαγωγές σταφίδας αποτελούν το 2% - 3% της αξίας των συνολικών εξαγωγών, με σταθερή ή και ανερχόμενη τάση, λόγω μείωσης του όγκου των συνολικών ελληνικών εξαγωγών. Κατά το τελευταίο τέταρτο του 19^{ου}

αιώνα αποτέλεσε το βασικό μοχλό εκσυγχρονισμού της οικονομίας και των μεγάλων έργων (διώρυγα Κορίνθου, σιδηροδρομικό δίκτυο) επειδή αποτελούσε το 70% των ελληνικών εξαγωγών. Στον **πίνακα 2.1** φαίνονται οι εξαγωγές της Κορινθιακής σταφίδας κατά τα έτη 2002-2003 και 2003-2004.

Πίνακας 1.2: Εξαγωγές Κορινθιακής σταφίδας και χώρες προορισμού (Στατιστικό δελτίο κίνησης Κορινθιακής Σταφίδας, Σ.Κ.Ο.Σ.)

ΕΞΑΓΩΓΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟΣ ΑΠΟ 01/09/03 ΕΩΣ 31/08/04				
ΣΤΑΦΙΔΙΚΑ ΕΤΗ ⇒ ΧΩΡΑ ΠΡΟΟΡΙΣΜΟΥ	2003/2004		2002/2003	
	01/08/04-31/08/04 ΚΙΛΑ	01/09/03-31/08/04 ΚΙΛΑ	01/08/03-31/08/03 ΚΙΛΑ	01/09/02-31/08/03 ΚΙΛΑ
Αγγλία	1.227.168	13.540.930	460.930	11.913.958
Αυστραλία		2.255.650		995.625
Γαλλία	25.750	609.080	17.550	583.930
Γερμανία	34.625	1.437.120	155.580	921.635
Ιταλία		448.637	40.800	419.506
Καναδάς	20.000	477.236		16.250
Νέα Ζηλανδία	20.000	340.000		80.000
Ολλανδία	176.938	4.984.472	-5.906	4.945.154
Τουρκία	76.000	395.463	38.750	391.463
Διάφορες Χώρες	29.760	937.149	20.000	644.649
Ελλάδα	25.379	1.488.231	-30.457	604.132
ΣΥΝΟΛΑ	1.635.620	26.913.968	697.247	21.516.302

Η κατάσταση που επικρατεί από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 στην παραγωγή και εμπορία της Κορινθιακής σταφίδας δεν παρουσιάζει σοβαρά προβλήματα εξαιτίας της έλλειψης ισχυρού ανταγωνισμού. Η μέση ετήσια παραγωγή μαύρης σταφίδας φτάνει τα τελευταία χρόνια τους 35.000 τόνους από τους οποίους οι 25.000 εξάγονται στην Αγγλία. Η ποιότητα του παραγόμενου σταφιδόκαρπου διαφέρει από περιοχή σε περιοχή και χαρακτηρίζεται από την περιοχή προέλευσης: VOSTIZZA (Αιγίου), GULF (περιοχή Κορινθίας - Νεμέας - Κιάτου), ZANTE (Ζακύνθου), PROVINCIAL (επαρχιακή ή λοιπή Πελοπόννησος: Πάτρα, Ηλεία, Μεσσηνία κ.α).

Όσον αφορά στις περιοχές στις οποίες ευδοκιμεί και καλλιεργείται η Κορινθιακή σταφίδα σήμερα, αναφέρονται οι νομοί Κορινθίας, Αχαΐας, Ηλείας, Μεσσηνίας, Ζακύνθου και Κεφαλληνίας. Χαρακτηριστικό είναι το ότι καλλιεργείται σε πολύ μεγάλες εκτάσεις, τις τάξεως των 400.000 στρεμμάτων περίπου και καταλαμβάνει την πρώτη θέση μεταξύ των καλλιεργούμενων ποικιλιών αμπελιού στην Ελλάδα. Κατά αμερικανούς αμπελογράφους, ο πιο αντιπροσωπευτικός τύπος κορινθιακής σταφίδας απαντάται στην περιφέρεια του χωριού Παναρίτη, στη περιοχή

της Αιγιαλείας (Haward A, 2002).

Η Κορινθιακή σταφίδα πλέον απολαμβάνει διεθνώς πολύ καλύτερων τιμών πώλησης από ομοειδή προϊόντα όπως η Σουλτανίνα που σήμερα καλλιεργείται κυρίως στην Μικρά Ασία και το Ιράν [μικρές ποσότητες σουλτανίνας παράγονται και στην Ελλάδα (Πελοπόννησος, Κρήτη)]. Σήμερα η Κορινθιακή σταφίδα καλλιεργείται και εκτός των ελληνικών συνόρων, σε μικρή βέβαια κλίμακα, στην Αυστραλία και στη Ν. Αφρική. Δυστυχώς όμως, το προϊόν αυτό δεν έτυχε του ενδιαφέροντος πολλών επιστημόνων λόγω του περιορισμένου γεωγραφικού ενδιαφέροντος της παραγωγής του, που εντοπίζεται στην Ελλάδα (Karathanos V, 1999).

Ωστόσο, η ανάλυση των μικροσυστατικών της σταφίδας, των θετικών επιδράσεων της στην υγεία των καταναλωτών αλλά και της επίδρασης της επεξεργασίας στην διατήρηση των αντιοξειδωτικών και της εν γένει θρεπτικής αξίας της σταφίδας, αποτελεί βασικό εργαλείο για τη διατήρηση των ελληνικών εξαγωγών, ενώ μπορεί να στρέψει το ερευνητικό ενδιαφέρον προς ένα αποκλειστικής ελληνικής προέλευσης προϊόν.

Γενικότερα, η καλλιέργεια της Κορινθιακής σταφίδας σε άλλες χώρες δεν ευνοήθηκε. Η ευμορφικότητα, το χαρακτηριστικό σκούρο χρώμα, η επαρκής ανάπτυξη του καρπού και του φυτού καθώς και η χαρακτηριστική της στυφή γεύση είναι χαρακτηριστικά τα οποία απαντώνται στις ελληνικές σταφιδοκαλλιέργειες, στο χώρο δηλαδή όπου και διαμορφώθηκε η ποικιλία αυτή.

1.2.2 Σουλτανίνα

Η πρώτη αναφορά στη Σουλτανίνα εντοπίζεται το 12^ο αιώνα μ.Χ. Φαίνεται να πήρε το όνομά της από την ομώνυμη επαρχία της Περσίας Σουλτανιέ από την οποία και μεταφέρθηκε στις ακτές της Ιωνίας την εποχή των Σελτζούκων Τούρκων. Αρχικά καλλιεργήθηκε στην περιοχή της Μαγνησίας της Μ. Ασίας αλλά δεν άργησε η διάδοσή της στη Σμύρνη και όλες τις παράκτιες περιοχές (Κριμπά, 1943). Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι η παραγωγή και το εμπόριο της σουλτανίνας βρισκόταν σχεδόν αποκλειστικά στα χέρια των Ελλήνων της Μ. Ασίας.

Γύρω στα μέσα του 19^{ου} αιώνα (1838) γίνεται η πρώτη γνωστή εισαγωγή της Σουλτανίνας σε κτήματα της περιοχής του Ναυπλίου. Περί το 1900 εντοπίζεται και στην Ανατολική Κρήτη (Πισκοκέφαλο Σητείας) ενώ η ευρύτερη επέκταση της καλλιέργειάς της γίνεται μετά την εγκατάσταση των Ελλήνων της Μ. Ασίας στην

Ελλάδα. Σήμερα καλλιεργείται κυρίως στο νομό Ηρακλείου Κρήτης αλλά και στους νομούς Κορινθίας, Λασιθίου, Ρεθύμνης, Χανίων, Ηλείας και Δωδεκανήσου σε έκταση 340.000 στρεμμάτων περίπου. Η Σουλτανίνα ευδοκιμεί και εκτός Ελλάδας και συγκεκριμένα στην Καλιφόρνια, την Τουρκία, την Αυστραλία, το Ιράν, το Αφγανιστάν, τη Ν. Αφρική, την Κύπρο και πολλές άλλες περιοχές.

Η ποικιλία της Σουλτανίνας χαρακτηρίζεται από τη ζωηρότητα και την παραγωγικότητά της. Ευδοκιμεί σε μαργώδη, καλά αποστραγγισμένα εδάφη ενώ πολύ σημαντική είναι η θετική συσχέτιση που υπάρχει ανάμεσα στο βαθμό ευφορίας του εδάφους και της απόδοσης του θαμνοειδούς φυτού. Αντίθετα ένα αβαθές και στεγνό έδαφος κρίνεται ακατάλληλο για την ευδοκίμησή του.

Ο καρπός του φυτού (σταφυλή) έχει ένα αρκετά μεγάλο μέγεθος (μέσο βάρος 500 γρ.), ενώ το σχήμα του είναι κυλινδροκωνικό και είναι μετρίως πυκνόρραγο. Ο ποδίσκος της σταφυλής κατά την ωρίμανση ξυλοποιείται. Η ράγα είναι ελλειψοειδής, μετρίου ή μεγάλου μεγέθους. Ο φλοιός είναι μετρίου πάχους, χρώματος κίτρινου χρυσίζοντος κατά την πλήρη ωρίμανση και η επιδερμίδα λεπτή καλυμμένη από λεπτό στρώμα άχνης. Η σάρκα είναι μετρίως ανθεκτική και χυμώδης.

1.3 Κατεργασία Κορινθιακής σταφίδας

1.3.1 Ξήρανση σταφίδας

Η ξήρανση της σταφίδας λαμβάνει χώρα είτε στον ήλιο είτε στη σκιά με διάφορες μεθόδους. Πιο διαδεδομένη θεωρείται η διαδικασία ξήρανσης στον ήλιο, η οποία πραγματοποιείται σε ακάλυπτα χωμάτινα ξηραντήρια (αλώνια) επάνω σε σταφιδόχαρτο, σε ξηραντήρια από σκυρόδεμα και σε τσιβιέρες (σιδερένια ή ξύλινα πλαίσια με συρμάτινη επιφάνεια). Τα σταφύλια μπορούν να ξηρανθούν επίσης σε ειδικά χαμωτά ξηραντήρια με κάλυψη. Ο χρόνος της ξήρανσης στα ακάλυπτα ξηραντήρια κυμαίνεται από 7-12 ημέρες ανάλογα με τις καιρικές συνθήκες.

Αν και η διαδικασία ξήρανσης στη σκιά δίνει ανώτερης ποιότητας σταφίδες δεν είναι πλέον τόσο διαδεδομένη λόγω μεγάλου χρόνου ξήρανσης. Με βάση τη συγκεκριμένη μέθοδο πραγματοποιείται ανάρτηση των σταφυλιών σε σύρματα σε μόνιμο ξηραντήριο - στέγαστρο ή ξήρανσή τους υπό τη σκιά του φυλλώματος του πρεμνού. Η διάρκεια ξήρανσης στη σκιά είναι περίπου 20 μέρες. Χαρακτηριστικό της είναι η μετέπειτα έκθεση των σχεδόν αποξηραμένων σταφίδων στον ήλιο για 2 ημέρες όπου και αποξηραίνονται πλήρως (Χαλουλάκος, 1993).

1.3.2 «Τρίψιμο», «λίχνισμα», «κοσκίνισμα» & «διαλογή» τελικού προϊόντος

Μετά την ξήρανση ακολουθεί το «τρίψιμο», η απομάκρυνση δηλαδή των βοστρύχων. Ακολούθως έρχεται το «λίχνισμα» και το «κοσκίνισμα» κατά το οποίο γίνεται η ρήψη της σταφίδας από ένα ορισμένο ύψος και η απαλλαγή της, λόγω του ρεύματος αέρος, από ξένες ύλες, σκόνη και ξερούς μίσχους. Η διαλογή του τελικού προϊόντος αποτελεί το βήμα πριν την επεξεργασία της σταφίδας. Το τελικό προϊόν έχει χρώμα καστανωπό έως σκούρο καστανό, είναι μαλακό και ήπιας γεύσης. Η σταφίδα οδηγείται στον τόπο επεξεργασίας της με μεγάλα πλαστικά κιβώτια.

1.3.3 Επεξεργασία σταφίδας

Η επεξεργασία της σταφίδας γίνεται σε ειδικούς χώρους, τα σταφιδοεργοστάσια και αποτελείται από τρία συγκεκριμένα στάδια: την πρόπλυση - στράγγισμα, την απομίσχωση - στίλπνωση και την τυποποίηση - συσκευασία. Στην επεξεργασία της σουλτανίνας απαιτείται ένα επιπλέον στάδιο (θείωση - πλύση - ρύθμιση υγρασίας).

A) Πρόπλυση - Στράγγισμα

Αποσκοπεί στην απαλλαγή της σταφίδας από ξένες ύλες, την απομάκρυνση κούφιων ραγών, τη διάσπαση των σβόλων της σταφίδας και τον καθαρισμό της επιφάνειας από τα σάκχαρα, που προέρχονται από τους τραυματισμούς των ραγών. Η Κορινθιακή σταφίδα πλένεται περίπου για ένα λεπτό ώστε να μην απορροφηθεί νερό. (Αντίθετα, η ύγρανση της Σουλτανίνας είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχημένη θείωση που ακολουθεί). Το στράγγισμα επιτυγχάνεται με ταλαντευόμενα κόσκινα ενώ παράλληλα απομακρύνεται ένα ποσοστό μίσχων και λοιπών ξένων υλών.

B) Απομίσχωση - Στίλπνωση

Για την απομίσχωση συνήθως χρησιμοποιούνται μηχανήματα που περιλαμβάνουν διάτρητα κόσκινα μέσα στα οποία περιστρέφονται πτερύγια και απομακρύνουν τους μίσχους. Στο στάδιο αυτό η σταφίδα υφίσταται αρκετές ζημιές που εξαρτώνται από το ποσοστό υγρασίας των σταφίδων και τις συνθήκες λειτουργίας των μηχανημάτων. Για να μειωθούν οι κακώσεις και να αποκτήσει το προϊόν κάποια στιλπνότητα χρησιμοποιούνται διάφορες ελαιώδεις ουσίες. Η χρήση των ουσιών αυτών βοηθά επίσης στη παρεμπόδιση του σβολιάσματος και στην

τόνωση του χρωματισμού. Τα έλαια που χρησιμοποιούνται είναι: α) Ελαιόλαδο ραφινέ σε πυρηνέλαιο χαμηλής οξύτητας σε ποσοστό έως 0,3%, β) Παραφινέλαιο σε αναλογία 0,3 - 0,5% του ξηρού βάρους της σταφίδας, γ) Εμπορικά σκευάσματα όπως το Sultanol, το Migryol, το Myraget κ.ά. Η εφαρμογή των σκευασμάτων αυτών πρέπει να γίνεται με προσοχή, καθώς μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα ανεπιθύμητων οσμών.

Γ) Τυποποίηση - Συσκευασία

Η τυποποίηση της σταφίδας γίνεται ανάλογα με το μέγεθος και επιτυγχάνεται με το πέρασμα των σταφίδων από σειρά κόσκινων με τρύπες ανάλογες με τους επιζητούμενους ποιοτικούς τύπους.

- Η Κορινθιακή σταφίδα κατατάσσεται σε μία από τις εξής ποιοτικές κατηγορίες: 1.Extra Choicest 2.Choicest και 3.Choice.

Η κατάταξη αυτή γίνεται βάσει του χρώματος, της περιεχόμενης υγρασίας, των ξένων υλών και του ποσοστού ισχνών, κόκκινων βεβλαμένων, πολύ χονδρών ή πολύ ψιλών και αναπομίσχωτων ραγών.

- Επίσης κατατάσσεται σύμφωνα με το μέγεθος σε Bold, Medium, Small, Siltings, Ungraded. Στην εμπορική πρακτική έχουν καθιερωθεί τα τοπωνυμικά σήματα όπως Vostizza, Gulf, Zante, Patras κ.ά.

Η συσκευασία γίνεται με χάρτινα κιβώτια με πλαστικά σακουλάκια ή σε μικροσυσκευασία πλαστικών ή σελοφάν.

1.3.4 Αποθήκευση σταφίδας

Η σταφίδα διατηρείται μέχρι την τελική της επεξεργασία σε αποθήκες για εξισορρόπηση της υγρασίας της. Οι αποθήκες πρέπει να είναι κατάλληλων προδιαγραφών, με ευνοϊκές συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας, αερισμού και φωτισμού για την αποτροπή αλλοιώσεων. Οι κυριότερες αλλοιώσεις είναι το κρυστάλλωμα (ζαχάρωμα), το σβόλιασμα, η αλλοίωση του χρώματος και η προσβολή από έντομα και μύκητες. Σημαντικό ρόλο στην διατήρηση των σταφίδων κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης παίζει η μέθοδος αποξήρανσης των σταφυλιών και η περιεκτικότητά τους σε υγρασία. Η υγρασία που πρέπει να έχουν οι σταφίδες ώστε να διατηρηθούν σε καλή κατάσταση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης κυμαίνεται από 13% έως 15%. Στη χώρα μας κατά την παράδοση από τον παραγωγό στο εργοστάσιο, η εκτίμηση της περιεκτικότητας σε υγρασία γίνεται με εμπορικά

κριτήρια. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη μεγάλη διάρκεια αποθήκευσης, κυρίως τα τελευταία χρόνια, οδηγεί σε ποιοτική υποβάθμιση του προϊόντος.

1.4 Συστατικά της σταφίδας

Η σταφίδα καταναλώνεται ευρέως ιδιαίτερα στη Δυτική Ευρώπη και αποτελεί ένα τέλειο γλυκαντικό. Είναι πλούσια σε φυτικές ίνες και σύνθετους υδατάνθρακες και περιέχει πολλά μικροθρεπτικά συστατικά απαραίτητα για τη ζωή. Περίπου 3 kg σταφυλιών αποδίδουν 1 kg οποιασδήποτε ποικιλίας σταφίδας, είτε κορινθιακής είτε σουλτανίνας. Οι σταφίδες είναι πλούσιες σε απλά σάκχαρα όπως φρουκτόζη και γλυκόζη, τα οποία ως γνωστό αποτελούν την αμεσότερη πηγή ενέργειας για τον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ παράλληλα το ότι υπάρχουν κύτταρα όπως τα εγκεφαλικά αλλά και τα ερυθροκύτταρα που χρησιμοποιούν μόνο σάκχαρα για τις καύσεις τους, τις καθιστά ως ένα τρόφιμο το οποίο αξίζει να μελετηθεί εκτενώς. Επίσης η παρουσία των σακχάρων αυτών κινητοποιεί μια αλκαλική αντίδραση με την οποία πραγματοποιείται εξουδετέρωση των οξέων που σχηματίζονται στον οργανισμό μετά από την κατανάλωση τροφών όπως το κρέας και τα αυγά.

Ως μέρος μιας ισορροπημένης δίαιτας, η σταφίδα, όπως αναφέρθηκε, είναι πλούσια σε υδατάνθρακες και φυτικές ίνες και δεν περιέχει σχεδόν καθόλου λίπος ή χοληστερόλη με αποτέλεσμα να αποτελεί ένα εναλλακτικό γλυκαντικό. Από τις μέχρι στιγμής μελέτες σχετικά με τη σταφίδα φαίνεται η παρουσία αρκετών φαινολικών ενώσεων σε αυτή (Chiou et al, 2007). Υπάρχουν πολλές μελέτες σε ανθρώπους που δείχνουν ότι πολλές πολυφαινόλες απορροφώνται καλά και είναι βιοδιαθέσιμες. (Manach et al, 2005) Μεταξύ αυτών, φαινολικές ενώσεις παρούσες στη σταφίδα, όπως το βανιλλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το γαλλικό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ, το πρωτοκατεχικό οξύ, το φερουλικό οξύ και η κερκετίνη είναι γνωστές για την αντιοξειδωτική τους δράση (Chiou et al, 2007, Karadeniz et al, 2000). Επομένως, η κατανάλωση σταφίδας μπορεί να φανεί πολύ ωφέλιμη για τους ανθρώπους. Όπως φάνηκε και από μια πρόσφατη μελέτη (Kaliora et al, 2008), τα μεθανολικά εκχυλίσματα σταφίδας, τα οποία είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις, επιδεικνύουν προστατευτική δράση απέναντι στον καρκίνο του στομάχου, περιορίζοντας την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες στο εργαστήριο (Κωνσταντίνου, 2008) έδειξαν ότι η κορινθιακή σταφίδα περιέχει ανθοκυανίνες, μια

άλλη κατηγορία πολυφαινολών και συγκεκριμένα πεονιδίνη, μαλβιδίνη και κυανιδίνη.

Η ύπαρξη αντιοξειδωτικών καθώς και ιχνοστοιχείων, όπως του καλίου και του ασβεστίου, μικρού μοριακού βάρους σακχάρων (35% φρουκτόζη) και σημαντικής ποσότητας φυτικών ινών (7% κ.β.) λογικά συνιστούν ένα διατροφικά άριστο προϊόν. Τα υπάρχοντα στοιχεία σε βασικά διατροφικά μακρο- και μικρο-συστατικά (κυρίως βιταμίνες και ιχνοστοιχεία) προέρχονται από τις αναλύσεις και τις προδιαγραφές προϊόντων (Παναιγιάλειος Ένωση Συνεταιρισμών, 2001). Δεν υπάρχουν σημαντικά βιβλιογραφικά δεδομένα για την περιεκτικότητα της Κορινθιακής σταφίδας στα ανωτέρω συστατικά. Μόνο για την κορινθιακή σταφίδα τύπου zante (που παράγεται στις ΗΠΑ ως είδος που μοιάζει με την κορινθιακή σταφίδα) υπάρχουν δεδομένα από το USDA και φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 1.3. Διατροφική αξία σταφίδας [Currants, zante, dried (Scientific name: Vitis Vinifera) (Πηγή: USDA, NDB No: 09085)]

Nutrient	Units	Value per 100 grams
Water	g	19,21
Energy	kJ/kcal	1184/282
Protein	g	4,08
Total lipid (fat)	g	0,27
Ash	g	2,36
Carbohydrate, by difference	g	74,08
Fiber, total dietary	g	6,8
Sugars, total	g	67,28
Calcium, Ca	mg	86
Iron, Fe	mg	3,26
Magnesium, Mg	mg	41
Phosphorus, P	mg	125
Potassium, K	mg	892
Sodium, Na	mg	8
Zinc, Zn	mg	0,66
Copper, Cu	mg	0,468
Manganese, Mn	mg	0,469
Selenium, Se	µg	0,7
Vitamin C, total ascorbic acid	mg	4,7
Thiamin	mg	0,160
Riboflavin	mg	0,142
Niacin	mg	1,615
Pantothenic acid	mg	0,045
Vitamin B-6	mg	0,296

Folate, total	µg	10
Folic acid	µg	0
Folate, food	µg	10
Folate, OFE	µg	10
Vitamin B12	µg	0,00
Vitamin A, RAE	µg	4
Retinol	µg	0
Carotene, beta	µg	43
Carotene, alpha	µg	1
Cryptoxanthin, beta	µg	1
Vitamin A, IU	IU	73
Lycopene	µg	0
Lutein + zeaxanthin	µg	0
Vitamin E (alpha-tocopherol)	mg	0,11
Vitamin E, added	mg	0,00
Vitamin K (Phylloquinone)	µg	3,3
Fatty acids, total saturated	g	0,028
4:0	g	0,000
6:0	g	0,000
8:0	g	0,000
10:0	g	0,000
12:0	g	0,000
14:0	g	0,000
16:0	g	0,019
18:0	g	0,009
Fatty acids, total monounsaturated	g	0,047
16:1 undifferentiated	g	0,002
18:1 undifferentiated	g	0,045
20:1	g	0,000
22:1 undifferentiated	g	0,000
Fatty acids, total polyunsaturated	g	0,180
18:2 undifferentiated	g	0,180
18:3 undifferentiated	g	0,000
18:4	g	9
20:4 undifferentiated	g	0,000
20:5 n3	g	0,000
22:5 n3	g	0,000
22:6 n3	g	0,000
Cholesterol	mg	0
Alcohol, ethyl	g	0,0
Caffeine	mg	0
Theobromine	mg	0

Επομένως, η παρούσα πτυχιακή μελέτη αναγνωρίζοντας το κενό που υπάρχει στη βιβλιογραφία σχετικά με την περιεκτικότητα της κορινθιακής σταφίδας και συγκεκριμένα της σταφίδας Vostizza σε βιταμίνες έχει ως στόχο τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των μικροσυστατικών αυτών.

1.5 Η θέση της σταφίδας στη Μεσογειακή Διατροφή

Η σταφίδα αποτελεί ένα προϊόν το οποίο καλλιεργείται στην περιοχή της Μεσογείου και σε μεγαλύτερο βαθμό στον ελλαδικό χώρο. Το γεγονός αυτό καθιστά τη σταφίδα σημαντικό κομμάτι της Μεσογειακής Δίαιτας. Η πυραμίδα της μεσογειακής Διατροφής προτείνει κατανάλωση 3-5 μικρομερίδων φρούτων την ημέρα. (De Lorgeril et al, 2002) Μια μικρομερίδα σταφίδας ισοδυναμεί με ποσότητα ίση με 2 κοφτές κουταλιές της σούπας, δηλαδή περίπου 18γρ. σταφίδας.

Οι σταφίδες μπορούν να καταναλωθούν ως έχουν ή μαγειρεμένες μέσα σε διάφορες συνταγές. Είναι πολύ μαλακές λόγω της υψηλής συγκέντρωσης σε σάκχαρα και όταν αποθηκεύονται για μεγάλη χρονική περίοδο τα σάκχαρα κρυσταλλοποιούνται στο εσωτερικό των φρούτων. Αυτό κάνει το φρούτο πιο σκληρό χωρίς αυτό να επηρεάζει την βρωσιμότητά του.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

BITAMINEΣ

2.1 Γενικά

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

Η ανακάλυψη των βιταμινών ή των αποκαλούμενων «βοηθητικών παραγόντων» έγινε στις αρχές του 20^{ου} αιώνα. Ήταν τότε που οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι για τη ζωή και την ανάπτυξη των ζώων απαιτείται κάτι περισσότερο από μια χημικά καθορισμένη δίαιτα αποτελούμενη από υδατάνθρακες, λίπη, πρωτεΐνες, ανόργανα στοιχεία και νερό. Το πρώτο από αυτά τα «απαραίτητα συστατικά της διατροφής» που ανακαλύφθηκε ήταν ο παράγοντας κατά της beri-beri ασθένειας, από τον Funk, ο οποίος του έδωσε το όνομα *vitamine* επειδή η ένωση αυτή ήταν μια αμίνη (*amine*) απαραίτητη για τη ζωή (*vita*). Στη συνέχεια οι McCollum και Davis απομόνωσαν έναν παράγοντα από το λίπος βουτύρου που ονόμασαν λιποδιαλυτό παράγοντα Α. Αυτοί οι απαραίτητοι παράγοντες έγιναν γνωστοί ως *vitamine A* και *B*. Έκτοτε, κάθε νέα βιταμίνη που γινόταν γνωστή ονομαζόταν με ένα γράμμα της λατινικής αλφαβήτου. [Καθώς οι περισσότερες από τις νέες *vitamines* που ανακαλύπτονταν δεν ήταν *amines* το γράμμα *e* προοδευτικά απαλείφθηκε από τον όρο και έτσι καταλήξαμε στην ονομασία *vitamin* (βιταμίνη).] Με την απομόνωση και τη διευκρίνιση της δομής της, κάθε βιταμίνη απέκτησε το χημικό της όνομα και το κάθε χημικό όνομα θεωρήθηκε ότι αντιστοιχεί σε μία ένωση που έχει μια καθορισμένη δράση. Σήμερα είναι πλέον γνωστό ότι κάθε βιταμίνη έχει μια ποικιλία λειτουργιών και επιπλέον ότι βιταμινική δράση μπορεί να βρεθεί σε μια σειρά σχετιζόμενων μορίων, τα *vitamers* (ουσίες που διαθέτουν βιταμινική δραστηριότητα). Ένα χαρακτηριστικό τέτοιο παράδειγμα είναι η βιταμίνη Α: υπό τον όρο βιταμίνη Α τίθενται οι ενώσεις ρετινόλη, ρετινάλη και ρετινοϊκό οξύ.

Οι βιταμίνες είναι οργανικά μόρια που λειτουργούν ως συστατικά συνενζύμων ή ενζύμων σε διάφορες χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στον οργανισμό. Απαιτούνται σε πολύ μικρές ποσότητες (της τάξεως του mg ή μg ανά ημέρα, *micronutrients*) και εμπλέκονται σε βασικές λειτουργίες του οργανισμού όπως η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός. Οι βιταμίνες παρέχονται στον οργανισμό, καθ' ολοκληρίαν ή μερικώς, από την τροφή. Διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες τις

υδατοδιαλυτές βιταμίνες και τις λιποδιαλυτές βιταμίνες. Στις υδατοδιαλυτές βιταμίνες περιλαμβάνονται οι βιταμίνες του συμπλέγματος Β και η βιταμίνη C και στις λιποδιαλυτές βιταμίνες περιλαμβάνονται οι Α, D, Ε και Κ βιταμίνες. Κάθε μια κατηγορία περιλαμβάνει έναν αριθμό μη-σχετιζόμενων χημικά ενώσεων που διαφέρουν ως προς το φυσιολογικό τους ρόλο στον οργανισμό.

Ο οργανισμός μεταχειρίζεται τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες με διαφορετικό τρόπο από τις λιποδιαλυτές. Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες απορροφώνται στο αίμα και με εξαίρεση τη βιταμίνη Β₁₂, δε διατηρούνται για μεγάλες περιόδους στον οργανισμό. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητος ο ημερήσιος ανεφοδιασμός του οργανισμού με τις βιταμίνες αυτές από την τροφή. 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. Η απορρόφηση και μεταφορά των λιποδιαλυτών βιταμινών σχετίζεται άμεσα με την απορρόφηση και τη 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 μια από αυτές αποθηκεύεται σε διαφορετικό ποσοστό και ποσό.

Κύριες αιτίες έλλειψης βιταμινών είναι οι εξής:

1. Τρόπος μαγειρέματος τροφίμων
2. Κάπνισμα
3. Αλκοόλ
4. Κακές διατροφικές συνήθειες, αυστηρές δίαιτες αδυνατίσματος.
5. Άγχος
6. Χρήση αντισυλληπτικών
7. Αντιβιοτικά
8. Κακώς εννοούμενη χορτοφαγία

2.2 Υδατοδιαλυτές Βιταμίνες

2.2.1 Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C)

Η βιολογικά δραστική βιταμίνη C είναι το L-(+)-ασκορβικό οξύ. Παρόμοια δράση πιστεύεται ότι έχει και το δεϋδροασκορβικό οξύ. Το D-(-)-ασκορβικό οξύ έχει το 1/10 της βιταμινικής δραστηρότητας του L-(+)-ασκορβικού οξέος. Τα μεγαλύτερα ποσά βιταμίνης C παράγονται από τη γλυκόζη. Ο άνθρωπος είναι ένα από τα λίγα θηλαστικά που δε συνθέτουν βιταμίνη C, γεγονός που οφείλεται στην έλλειψη της οξειδάσης της γουλονολακτόνης.

Πηγές

Οι καλύτερες διαιτητικές πηγές βιταμίνης C είναι το σπαράγγι, η παπάγια, το πορτοκάλι και ο χυμός του, το κουνουπίδι, το μπρόκολο, τα λαχανάκια Βρυξελλών, οι πράσινες πιπεριές, το γκρέιφρουτ και ο χυμός του, το λάχανο, τα λεμόνια και οι φράουλες. Από τα τρόφιμα αυτά, τα εσπεριδοειδή θεωρούνται ως σημαντικότερες πηγές της βιταμίνης.

Απορρόφηση, Μεταφορά και Αποθήκευση

Η απορρόφηση του ασκορβικού οξέος λαμβάνει χώρα κυρίως με ενεργητική μεταφορά. Τα συστήματα μεταφοράς του ασκορβικού οξέος παρουσιάζουν κορεσμό και η μεταφορά είναι δοσο-εξαρτώμενη. Η απορρόφηση του ασκορβικού οξέος μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί σε μικρό βαθμό και με απλή διάχυση ή διευκολυνόμενη μεταφορά από το στόμα και το στομάχι. Το μεγαλύτερο ποσοστό της απορρόφησης πραγματοποιείται στον ειλέο με ένα σύστημα ενεργητικής μεταφοράς εξαρτώμενο από το νάτριο.

Πριν την απορρόφησή του το ασκορβικό οξύ μπορεί να οξειδωθεί προς δεϋδροασκορβικό οξύ, το οποίο μπορεί να απορροφηθεί με παθητική μεταφορά. Πιστεύεται ότι το ασκορβικό οξύ απορροφάται από τον οργανισμό κυρίως υπό τη μορφή δεϋδροασκορβικού. Ο βαθμός απορρόφησης βιταμίνης C εξαρτάται αντιστρόφως ανάλογα από την ημερήσια πρόσληψη. Στα φυσιολογικά επίπεδα πρόσληψης (20-120 mg/ημέρα) η απορρόφηση κυμαίνεται από 80-95%. Η βιταμίνη C που δεν απορροφάται μπορεί να μεταβολιστεί από την εντερική χλωρίδα.

Ουσίες που μπορούν να επιδράσουν αρνητικά στην απορρόφηση βιταμίνης C είναι η ηκτίνη (14,2 g/ημέρα) και ο ψευδάργυρος (9,3 mg/ημέρα). Επιπλέον, υψηλές

συγκεντρώσεις σιδήρου στο γαστρεντερικό αυλό μπορεί να οξειδώσουν τη βιταμίνη C προς δικετογουλονικό οξύ και άλλα προϊόντα που δεν παρουσιάζουν βιταμινική δράση.

Η μεταφορά της βιταμίνης C κατά μήκος της βασηοπλευρικής μεμβράνης του εντεροκυττάρου γίνεται με ειδικά συστήματα μεταφοράς. Η βιταμίνη C που απορροφάται μεταφέρεται στο πλάσμα κυρίως ως ασκορβικό οξύ και σε μικρό ποσοστό (περίπου 5%) ως δεϋδροασκορβικό.

Η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος στους διάφορους ιστούς ποικίλλει. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις βιταμίνης C παρατηρούνται στην υπόφυση και τα επινεφρίδια (περίπου 30-50 mg/100g ιστού). Ενδιάμεσα ποσά βιταμίνης C βρίσκονται στο ήπαρ, στη σπλήνα, στους νεφρούς, στην καρδιά, στους πνεύμονες, στο πάγκρεας, στα λευκά αιμοσφαίρια. Στους μύες και τα ερυθρά αιμοσφαίρια περιέχονται μικρά ποσά. Γενικά η συγκέντρωση βιταμίνης C στους διάφορους ιστούς σχετίζεται με τη συγκέντρωση της βιταμίνης στο πλάσμα και συγχρόνως και οι δύο εξαρτώνται από την πρόσληψη της βιταμίνης.

Καταβολισμός & απέκκριση

Το ασκορβικό οξύ οξειδώνεται εύκολα προς δεϋδροασκορβικό. Η ένωση αυτή έχει βιταμινική δραστηριότητα και επιπλέον μπορεί να αναχθεί (με GSH ή NADH, NADPH) προς ασκορβικό. Επιπλέον όμως μπορεί να οξειδωθεί παραπέρα οδηγώντας στην απέκκριση της βιταμίνης. Οι αντιδράσεις αυτές λαμβάνουν χώρα κυρίως στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό στους νεφρούς. Έτσι, το δεϋδροασκορβικό μπορεί να υδρολυθεί προς το 2,3-δικετογουλονικό οξύ που δεν έχει πλέον βιταμινική δράση. Το δικετογουλονικό μπορεί να ακολουθήσει 2 οδούς είτε να διασπασθεί προς οξαλικό οξύ και θρεονικό οξύ είτε να οδηγηθεί προς μια ποικιλία πεντοζών (π.χ. ξυλόζη). Οι υδατάνθρακες που παράγονται είτε μετατρέπονται σε διάφορα άλλα συστατικά του κυττάρου είτε οξειδώνονται προς CO₂ και H₂O. Διάφοροι μεταβολίτες της βιταμίνης C και η περίσσεια του ασκορβικού απεκκρίνονται από τα ούρα. Περίπου το 25% της βιταμίνης C απεκκρίνονται ως οξαλικό οξύ. Οι νεφροί μπορούν να ανάγουν το δεϋδροασκορβικό προς ασκορβικό και έτσι να επαναπορροφηθεί. Η επαναπορρόφηση βιταμίνης C από τους νεφρούς εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις βιταμίνης C στο πλάσμα. Σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0,8-1,4 mg/dl στο πλάσμα υπάρχει επαναπορρόφηση. Πάνω από αυτές τις τιμές υπάρχει απέκκριση με τα ούρα.

Λειτουργίες & μηχανισμοί δράσεις

Η βιταμίνη C παρουσιάζει πολλές λειτουργίες στον ανθρώπινο οργανισμό:

- Σύνθεση κολλαγόνου
- Σύνθεση καρνιτίνης
- Σύνθεση νευροδιαβιβαστών
- Αντιοξειδωτική δράση

Διαιτητικές Προσλήψεις Αναφοράς

Οι απόψεις για τη συνιστώμενη ημερήσια δόση βιταμίνης C ποικίλουν και έχουν οριστεί διαφορετικά κατά καιρούς. Οι Διαιτητικές Προσλήψεις Αναφοράς που εκδόθηκαν το 2000 συνιστούν μια πρόσληψη 90 mg για τους ενήλικες άνδρες και 75 mg για τις ενήλικες γυναίκες. Για τους καπνιστές συνιστάται η κατανάλωση επιπλέον 35 mg βιταμίνης C καθώς φαίνεται ότι το κάπνισμα μειώνει τα αποθέματα του ασκορβικού οξέος.

2.2.2 Θειαμίνη (Βιταμίνη B1)

Αποτελείται από έναν δακτύλιο πυριμιδίνης και το μισό μόριο μιας θειαζόλης, που είναι συνδεδεμένα με μια γέφυρα μεθυλενίου.

Πηγές

Η θειαμίνη βρίσκεται σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων, συμπεριλαμβανομένου του κρέατος, των λαχανικών και των δημητριακών ολικής άλεσης ή των εμπλουτισμένων δημητριακών. Η μαγιά και το φύτρο σταριού περιέχουν επίσης σημαντικές ποσότητες θειαμίνης.

Πέψη, απορρόφηση, μεταφορά και αποθήκευση

Γενικά η απορρόφηση θειαμίνης είναι αρκετά υψηλή. Σε αντίθεση με τα φυτικά τρόφιμα όπου η θειαμίνη υπάρχει υπό την ελεύθερη μορφή της, στα περισσότερα ζωικά τρόφιμα βρίσκεται υπό τη μορφή πυροφωσφορικής θειαμίνης (TPP). Προκειμένου να απορροφηθεί η TPP υδρολύεται από εντερικές φωσφατάσες.

Η απορρόφηση της ελεύθερης θειαμίνης γίνεται από τα εντερικά κύτταρα είτε με ενεργητική είτε με παθητική μεταφορά. Ο τρόπος μεταφοράς της εξαρτάται από την προσλαμβανόμενη δόση. Σε μικρές συγκεντρώσεις απορροφάται κυρίως με

ενεργητική μεταφορά, ενώ παρουσία μεγάλων ποσοτήτων θειαμίνης η απορρόφηση γίνεται κυρίως με παθητική μεταφορά. Η απορρόφηση γίνεται κυρίως στην αρχή της νήστιδας όπου το pH είναι ακόμη αρκετά όξινο.

Η μεταφορά θειαμίνης κατά μήκος της βασηοπλευρικής μεμβράνης απαιτεί ενέργεια και ιόντα νατρίου.

Μετά την απορρόφηση, η περισσότερη ελεύθερη θειαμίνη παραλαμβάνεται από το ήπαρ όπου υφίσταται φωσφορυλίωση και μετατρέπεται σε συνένζυμο (TPP). Περίπου το 80% της θειαμίνης του οργανισμού βρίσκεται υπό τη μορφή TPP. Ένα μικρό ποσοστό θειαμίνης βρίσκεται υπό τη μορφή τριφωσφορικού εστέρα (TTP) που συντίθεται από την TPP με δράση μιας μεταφεράσης.

Γενικά η θειαμίνη δεν αποθηκεύεται σε μεγάλα ποσά στον οργανισμό. Στο ανθρώπινο σώμα υπάρχουν περίπου 30mg θειαμίνης. Μεγαλύτερη συγκέντρωση θειαμίνης παρατηρείται στους σκελετικούς μύες, στην καρδιά, το ήπαρ, τους νεφρούς, τον εγκέφαλο.

Μεταβολισμός & απέκκριση

Η περίσσεια θειαμίνης του οργανισμού απεκκρίνεται από τα ούρα. Η αποικοδόμηση θειαμίνης ξεκινά με τη διάσπαση του μορίου σε τμήμα πυριμιδίνης και σε τμήμα θειαζολίου. Οι δύο κυκλικές ενώσεις υφίστανται στη συνέχεια σειρά μετατροπών που οδηγούν στο σχηματισμό 20 περίπου μεταβολιτών.

Λειτουργίες & μηχανισμοί δράσης

- Παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ενέργειας στο κύτταρο (ATP) μετέχοντας ως συνένζυμο (υπό τη μορφή TPP) στο πολυενζυμικό σύστημα (πυροσταφυλική αφυδρογονάση) που μετατρέπει το πυροσταφυλικό οξύ σε ακετυλο-συνένζυμο Α (Ac-CoA) και στην αποκαρβοξυλίωση του ακετογλουταρικού οξέος προς ηλεκτρογλουταμικό-CoA στον κύκλο του Krebs.
- Η TPP μετέχει σε μια σειρά αντιδράσεων αποκαρβοξυλίωσης στον οργανισμό.
- Η TPP δρα ως χαλαρά συνδεδεμένη προσθετική ομάδα στην τρανσκετολάση. Το ένζυμο αυτό ευθύνεται για την αλληλομετατροπή των υδατανθράκων.
- Η θειαμίνη επηρεάζει τη λειτουργία του ΚΝΣ.

Διαιτητικές Προσλήψεις Αναφοράς

Λόγω της σημασίας της θειαμίνης στην παραγωγή ενέργειας, η απαιτούμενη ποσότητα θειαμίνης στις συστάσεις του 1989 εξαρτιόταν από τις λαμβανόμενες θερμίδες. Ωστόσο, οι Διαιτητικές Προσλήψεις Αναφοράς του 1999 για τους ενήλικες άνδρες 19 ετών και άνω προτείνουν 1,2 mg θειαμίνης ημερησίως και για τις γυναίκες από 19 ετών και άνω 1,1 mg ημερησίως. Οι προσλήψεις θειαμίνης κατά την εγκυμοσύνη και τη γαλουχία αυξάνονται σε 1,4 mg/ημέρα.

2.2.3 Ριβοφλαβίνη (Βιταμίνη B2)

Η ριβοφλαβίνη αποτελείται από τη φλαβίνη (δακτύλιο ισοαλλοξαζίνης), στον οποίο βρίσκεται συνδεδεμένη μια ριβιτόλη (σάκχαρο αλκοόλης) ως πλευρική αλυσίδα.

Πηγές

Η ριβοφλαβίνη βρίσκεται σε μια ευρεία ποικιλία τροφίμων, αλλά κυρίως στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Το γάλα και τα προϊόντα γάλακτος, όπως τα τυριά παρέχουν το μεγαλύτερο ποσοστό της διαιτητικής ριβοφλαβίνης. Τα αυγά, το κρέας και τα όσπρια περιέχουν επίσης σημαντικές ποσότητες ριβοφλαβίνης, ενώ τα φρούτα, τα λαχανικά και τα δημητριακά περιέχουν μικρότερες ποσότητες.

Πέψη, απορρόφηση, μεταφορά

Προτού απορροφηθεί η δεσμευμένη ριβοφλαβίνη πρέπει να απελευθερωθεί. Η ριβοφλαβίνη που βρίσκεται μη-ομοιοπολικά συνδεδεμένη με πρωτεΐνες απελευθερώνεται με τη δράση του HCl του στομάχου ή από τα γαστρικά και/ή παγκρεατικά πρωτεολυτικά ένζυμα. Η ποσότητα ριβοφλαβίνης που βρίσκεται ως FAD απελευθερώνεται με τη δράση της FAD-πυροφωσφατάσης υπό το σχηματισμό FMN και το συνολικό FMN απελευθερώνεται από την FMN-φωσφατάση. Επίσης η ριβοφλαβίνη μπορεί να παραληφθεί και από άλλες εντερικές φωσφατάσες. Ένα ποσοστό του FAD, περίπου το 5-7%, βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένο με πρωτεΐνες μέσω Cys ή His. Κατά την πέψη των τροφών οι πρωτεΐνες αυτές αποικοδομούνται, αλλά συνήθως η ριβοφλαβίνη παραμένει συνδεδεμένη με την Cys ή His. Η απορρόφηση της συνδεδεμένης ριβοφλαβίνης συνήθως δε συμβαίνει, αλλά και όταν συμβεί το σύμπλεγμα αυτό δε χρησιμοποιείται από τον οργανισμό αλλά

απεκκρίνεται ως έχει από τα ούρα.

Γενικά η ριβοφλαβίνη από ζωικές πηγές πιστεύεται ότι απορροφάται καλύτερα από τον οργανισμό. Δισθενή μεταλλικά ιόντα όπως C^{2+} , F^{2+} , Mn^{2+} , Z^{2+} , σχηματίζουν σύμπλοκα με τη ριβοφλαβίνη και το FMN και αναστέλλουν την απορρόφησή της.

Η ελεύθερη ριβοφλαβίνη απορροφάται από το λεπτό έντερο με ενεργό μεταφορά (εξαρτώμενη από ATP και Na^{+}). Ο ρυθμός απορρόφησης εξαρτάται από την ληφθείσα δόση, αν και γενικά παρουσιάζει ένα πλατό κατά την παρουσία μεγάλων ποσοτήτων (περίπου 25 mg).

Στο εντερικό κύτταρο η ριβοφλαβίνη φωσφορυλιώνεται υπό το σχηματισμό FMN με τη δράση της φλαβοκινάσης ενώ για να μεταφερθεί πρέπει να υδρολυθεί πάλι σε ριβοφλαβίνη. Στη συνέχεια μεταφέρεται στο ήπαρ όπου επαναφωσφορυλιώνεται υπό το σχηματισμό FMN και συντίθεται και το FAD. Στο πλάσμα του αίματος η ριβοφλαβίνη, το FMN και το FAD μεταφέρονται από πρωτεΐνες (αλβουμίνη, ανοσοσφαιρίνες, ινωδογόνο κλπ.). Η αλβουμίνη πιστεύεται ότι είναι η κύρια πρωτεΐνη μεταφοράς.

Ανεξάρτητα από τη μορφή υπό την οποία μεταφέρεται η βιταμίνη B2 (ριβοφλαβίνη, FMN, FAD) μέσα στο αίμα, στον ιστό που πρόκειται να αποδοθεί μόνο η ριβοφλαβίνη περνά την κυτταρική μεμβράνη μέσω δράσεως μεταφορέων ριβοφλαβίνης. Εξαίρεση στον παραπάνω κανόνα αποτελεί ο εγκέφαλος, όπου υπάρχουν υψηλής συγγένειας συστήματα μεταφοράς FAD.

Γενικά η ριβοφλαβίνη βρίσκεται σε μικρά ποσά σε διάφορους ιστούς. Τα μεγαλύτερα ποσά εντοπίζονται στο ήπαρ, στους νεφρούς και στην καρδιά. Προκειμένου να παραμείνει η ριβοφλαβίνη στον ιστό πρέπει να μετατραπεί σε συνένζυμο (FAD ή FMN), αντίδραση που καταλύεται από τη φλαβοκινάση και τη FAD-συνθετάση. Γενικά πιστεύεται ότι η σύνθεση FMN και FAD υπόκειται σε ορμονική ρύθμιση από την ACTH, την αλδοστερόνη και τις θυρεοειδείς ορμόνες οι οποίες πιστεύεται ότι αυξάνουν τη δραστηριότητα της φλαβοκινάσης. Τα FMN και FAD συνδέονται με το αποένζυμο των φλαβοπρωτεϊνών και εμπλέκονται σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις.

Καταβολισμός & απέκκριση

Στα ούρα συναντάται κυρίως ελεύθερη ριβοφλαβίνη. Κάποιοι μεταβολίτες της προέρχονται από την αποικοδόμηση των ομοιοπολικά συνδεδεμένων φλαβινών ή

οφείλονται σε βακτηριακή δράση στο έντερο. Πιστεύεται ότι οι μεταβολίτες που παράγονται στο έντερο από βακτηριακή δράση μπορούν να απορροφηθούν και στη συνέχεια να εκκριθούν στα ούρα.

Η ριβοφλαβίνη που δεν είναι συνδεδεμένη με πρωτεΐνες στο πλάσμα του αίματος φιλτράρεται από το νεφρικό σπείραμα. Επίσης από τα ούρα απεκκρίνεται και η ριβοφλαβίνη που είναι συνδεδεμένη με Cys ή His.

Μικρά ποσά ελεύθερης ριβοφλαβίνης μπορούν να εκκριθούν από τη χολή και να απεκκριθούν από τα κόπρανα. Στα κόπρανα ανιχνεύονται και κάποιοι μεταβολίτες της ριβοφλαβίνης, από την τροποποίησή της από την εντερική χλωρίδα.

Λειτουργίες & μηχανισμοί δράσης

Η ριβοφλαβίνη παίρνει μέρος σε διάφορες πορείες στον οργανισμό, όπως π.χ. στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, του λίπους και των πρωτεϊνών. Η ριβοφλαβίνη αποτελεί τμήμα 2 στενά σχετιζόμενων συνενζύμων, του FMN και του FAD.

Συγκεκριμένα, η ριβοφλαβίνη με τη μορφή FAD επιτελεί τις ακόλουθες λειτουργίες:

- Περιέχεται ως προσθετική ομάδα στην αφυδρογονάση του ηλεκτρικού.
- Απαιτείται για την οξείδωση των λιπαρών οξέων από την αφυδρογονάση του λιπαρού ακυλο-CoA.
- Απαιτείται από την οξειδάση σφιγγανίνης στη σύνθεση σφιγγοσίνης.
- Απαιτείται από διάφορα ένζυμα του καταβολισμού της χολίνης.
- Δρα ως ενδιάμεσος μεταφορέας ηλεκτρονίων με τελικό αποδέκτη το NAD στην οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού και του ακετογλουταρικού.
- Απαιτείται για την αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GS-SG) σε GSH από την αναγωγή της γλουταθειόνης.
- Απαιτείται από την οξειδάση των αλδεϋδών για την οξείδωση διαφόρων αλδεϋδών.

Τέλος, με τη μορφή FMN απαιτείται από την οξειδάση του φωσφορικού εστέρα της πυριδοξίνης στο μεταβολισμό της B6.

Διαιτητικές Προσλήψεις Αναφοράς

Με βάση τις Διαιτητικές Προσλήψεις Αναφοράς του 1998 για τη ριβοφλαβίνη, οι οποίες ισχύουν και σήμερα, οι συστάσεις για την πρόσληψη

ριβοφλαβίνης είναι παρόμοιες με αυτές του 1989. Οι συστάσεις για ενήλικες άνδρες και γυναίκες από 19 ετών και άνω είναι 1,3 και 1,1 mg/ημέρα αντίστοιχα. Κατά την εγκυμοσύνη και τη γαλουχία, οι συστάσεις αυτές αυξάνονται σε 1,4 και 1,6 mg/ημέρα αντίστοιχα.

2.2.4 Νιασίνη (Βιταμίνη B3)

Ο όρος νιασίνη είναι ένας γενικός όρος για το νικοτινικό οξύ και το νικοτιναμίδιο, που καλείται επίσης νιασιναμίδιο. Δραστικότητα νιασίνης έχει τόσο το νικοτινικό οξύ όσο και το νικοτιναμίδιο.

Πηγές

Στη φύση η νιασίνη βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή σε πολύ μικρό ποσοστό. Το μεγαλύτερο ποσοστό νιασίνης αποτελεί συστατικό του NAD/NADP. Το NAD/NADP είναι ενώσεις σχετικά σταθερές στο μαγείρεμα και την αποθήκευση. Σε πολλά τρόφιμα, ιδίως στα δημητριακά, η νιασίνη είναι χαμηλής βιολογικής αξίας, γιατί είναι προσδεδεμένη σε μακρομόρια (πολυσακχαρίτες ή πεπτίδια). Καλή πηγή νιασίνης αποτελεί το κρέας (ιδίως το συκώτι), το ψάρι, τα λαχανικά, κάποια δημητριακά. Αρκετά υψηλό ποσοστό βιταμίνης περιέχεται στο τσάι και τον καφέ.

Η πρόδρομος της βιταμίνης, η τρυπτοφάνη (Trp) μετέχει μερικώς στην κάλυψη των ημερήσιων αναγκών σε βιταμίνη. Η βιοσύνθεση του NAD/NADP από Trp συμβαίνει σε όλους τους οργανισμούς μέσω ενδιάμεσου σχηματισμού κινολινικού οξέος. Γενικά, από 60 mg Trp παράγεται περίπου 1 mg νιασίνης. Σημειώνεται ότι στο τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης η ικανότητα αυτής της μετατροπής τριπλασιάζεται, πιθανόν λόγω ενεργοποίησης της οξυγεννάσης της Trp (ρυθμιστικό ένζυμο για τη μετατροπή) από οιστρογόνα.

Το NAD μπορεί επίσης να συντεθεί από νικοτινικό οξύ ή νικοτιναμίδιο. Η πορεία περιλαμβάνει το σχηματισμό του αμιδίου του αδενοδινουκλεοτιδίου του νικοτινικού, μια πορεία που είναι μη-αντιστρεπτή. Η βιοσύνθεση του NAD από το νικοτιναμίδιο συμβαίνει σε όλους τους ιστούς και ρυθμίζεται από τη συγκέντρωση του εξωκυττάριου νικοτιναμιδίου, το οποίο υφίσταται ηπατική και ορμονική ρύθμιση.

Πέψη, απορρόφηση, μεταφορά και αποθήκευση

Μέσα στον εντερικό αυλό το NAD και το NADP μπορεί να υδρολυθεί από τη γλυκοϋδρολάση απελευθερώνοντας νικοτιναμίδιο. Νικοτιναμίδιο και νικοτινικό οξύ μπορεί να απορροφηθούν από το στομάχι, αλλά γενικά απορροφώνται καλύτερα από το λεπτό έντερο. Το νικοτιναμίδιο μπορεί να υδρολυθεί προς νικοτινικό οξύ από τη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου.

Ο τρόπος απορρόφησης της νιασίνης εξαρτάται από το προσλαμβανόμενο ποσό. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις η απορρόφηση γίνεται από εξαρτώμενη από Na^+ , διευκολυνόμενη (από μεταφορέα) διάχυση ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις η απορρόφηση γίνεται με παθητική διάχυση.

Πιστεύεται ότι μέσα στο εντερικό κύτταρο το νικοτινικό οξύ μετατρέπεται σε νικοτιναμίδιο. Κατά πάσα πιθανότητα για να γίνει η μετατροπή πρέπει το νικοτινικό να ενταχθεί σε ένα μόριο NAD και στη συνέχεια να απελευθερωθεί ως αμίδιο μέσω υδρόλυσης του NAD.

Στο πλάσμα η νιασίνη υπάρχει κυρίως υπό τη μορφή νικοτιναμιδίου και σε μικρότερο ποσοστό ως νικοτινικό οξύ. Περίπου το 15-30% του νικοτινικού οξέος του πλάσματος είναι δεσμευμένο σε πρωτεΐνες του πλάσματος.

Από το αίμα, το νικοτινικό οξύ και αμίδιο εισέρχονται στο κύτταρο με απλή διάχυση. Εντούτοις η μεταφορά του νικοτινικού οξέος στα νεφρικά σωληνάρια και στα ερυθροκύτταρα απαιτεί ένα σύστημα μεταφοράς εξαρτώμενο από Na^+ .

Το νικοτιναμίδιο λειτουργεί ως ο κύριος πρόδρομος του NAD, το οποίο συντίθεται σε όλους τους ιστούς. Στο ήπαρ πάντως για τα σύνθεση του NAD μπορεί να χρησιμοποιηθεί και το νικοτινικό οξύ.

Υπό τη μορφή NAD και NADP (που είναι η κύρια μορφή υπό την οποία η νιασίνη δρα στον οργανισμό), η βιταμίνη εγκλωβίζεται στο κύτταρο. Στο διακυττάριο υγρό η συγκέντρωση του NAD είναι πολύ μεγαλύτερη αυτής του NADP.

Μεταβολισμός & απέκκριση

Το NAD και NADP που παράγονται στον οργανισμό μπορούν να αποικοδομηθούν από τη γλυκοϋδρολάση σε νικοτιναμίδιο και ADP-ριβόζη. Το νικοτιναμίδιο υφίσταται μεθυλίωση και στη συνέχεια οξειδώνεται προς μια ποικιλία προϊόντων που απεκκρίνονται από τα ούρα. Κύριοι μεταβολίτες είναι το N-μεθυλο-νικοτιναμίδιο (20-30% της νιασίνης) και το N'-μεθυλο-2-πυριδο-5-καρβοξαμίδιο (40-60%). Πρακτικά πολύ λίγο νικοτινικό οξύ ή αμίδιο απεκκρίνονται γιατί μπορεί

να γίνει επαναπορρόφηση.

Λειτουργίες & μηχανισμοί δράσης

Περίπου 200 ένζυμα του οργανισμού, κατά κύριο λόγο αφυδρογονάσες, απαιτούν NAD ή NADP για να δράσουν. Ο ρόλος των NAD/NADH, NADP/NADPH είναι να δρουν ως δότες υδρογόνου ή δέκτες ηλεκτρονίων.

Αν και η δομή των NAD, NADP είναι παρόμοια, η δράση τους στο κύτταρο είναι αρκετά διαφορετική. Τα περισσότερα από τα ένζυμα που απαιτούν NAD εμπλέκονται σε καταβολικές αντιδράσεις (γλυκόλυση, οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού, οξείδωση του Ac-CoA μέσω του κύκλου του Krebs κλπ), ενώ οι πιο κοινές δράσεις του NADP (ως NADPH) είναι σε αναγωγικές βιοσυνθέσεις (όπως π.χ. των λιπαρών οξέων και των στεροειδών ορμονών).

Τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί και κάποιες μη-οξειδοαναγωγικές δράσεις του NAD. Έτσι, έχει βρεθεί ότι το NAD μπορεί να δράσει ως δότης ADP-ριβόζης σε πρωτεΐνες (μετα-μεταφραστική τροποποίηση).

Διαιτητικές Προσλήψεις Αναφοράς

Ο προσδιορισμός της απαιτούμενης νιασίνης από την τροφή είναι αρκετά πολύπλοκη διαδικασία γιατί δεν είναι εύκολο να προσδιοριστεί το ποσοστό NAD που παράγεται από την τρυπτοφάνη. Η ικανότητα μετατροπής τρυπτοφάνης σε βιταμίνη στον οργανισμό επηρεάζεται από το λαμβανόμενο ποσό τρυπτοφάνης, νιασίνης, ενέργειας, πρωτεΐνης, βιταμίνης B6 και ριβοφλαβίνης. Με βάση τις νεότερες συστάσεις, οι απαιτήσεις σε νιασίνη για ενήλικες άνδρες και γυναίκες από 19 ετών και άνω είναι 16 και 14 mg/ημέρα αντίστοιχα.

2.2.5 Παντοθενικό οξύ

Το παντοθενικό οξύ, ένα αμίδιο, αποτελείται από β-αλανίνη και παντοϊκό οξύ, συνδεδεμένα μεταξύ τους με έναν πεπτιδικό δεσμό.

Πηγές

Το παντοθενικό οξύ πήρε το όνομά του από την ελληνική λέξη «παντού», καθώς η βιταμίνη αυτή είναι ευρύτατα διαδεδομένη στη φύση. Επειδή βρίσκεται σε

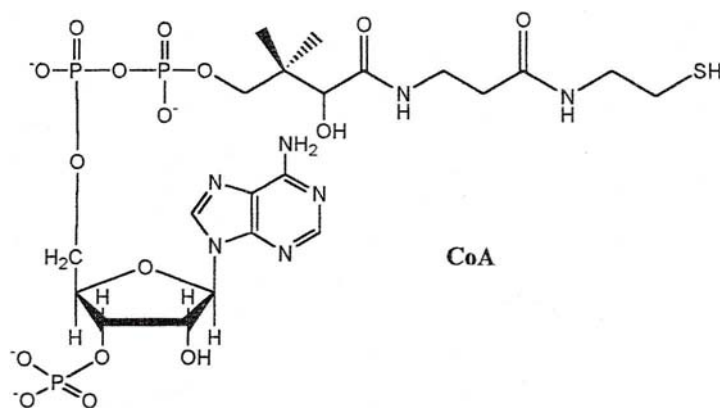
όλα τα ζωικά και φυτικά τρόφιμα, η ανεπάρκεια σε αυτή τη βιταμίνη είναι απίθανη. Καλές πηγές παντοθενικού οξέος είναι το κρέας (σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο συκώτι), ο κρόκος αυγού, τα λαχανικά (μπρόκολο,μανιτάρια, αβοκάντο).

Σε συμπληρώματα βιταμινών το παντοθενικό οξύ παρέχεται υπό τη μορφή αλάτων ασβεστίου.

Πένψη και μεταφορά

Περίπου το 85% του παντοθενικού οξέος βρίσκεται υπό τη μορφή συνενζύμου Α (CoA) (βλ. σχήμα 2.1). Κατά την πέψη το παντοθενικό οξύ υδρολύεται προς παντοθεινή και στη συνέχεια προς παντοθενικό οξύ.

Σχήμα 2.1: Δομή Συνενζύμου Α (CoA)



Η απορρόφηση γίνεται από τον ειλέο με παθητική μεταφορά. Περίπου το 40-60% του παντοθενικού οξέος που προσλαμβάνεται μπορεί να απορροφηθεί. Επίσης απορροφάται και η παντοθενόλη (που υπάρχει σε πολυβιταμινούχα σκευάσματα). Πάντως η απορρόφηση του παντοθενικού οξέος ελαττώνεται σημαντικά (φθάνει στο 10%) όταν η πρόσληψή του ξεπερνά το 100-πλάσιο της απαραίτητης ημερήσιας δόσης.

Το παντοθενικό οξύ που απορροφάται εισέρχεται στην κυκλοφορία για να μεταφερθεί στα διάφορα κύτταρα του οργανισμού. Παντοθενικό οξύ υπάρχει τόσο στο πλάσμα όσο και στα ερυθροκύτταρα. Στα ερυθροκύτταρα βρίσκεται παντοθενικό οξύ αλλά και 4-φωσφοπαντοθενικό και παντοθεινή και από αυτά μπορεί να μεταφέρεται με παθητική διάχυση.

Ο τρόπος πρόσληψης παντοθενικού οξέος από τους διάφορους ιστούς διαφέρει. Η καρδιά, οι μύες, τα ηπατικά κύτταρα λαμβάνουν παντοθενικό οξύ με

ενεργό μεταφορά εξαρτώμενη από ιόντα νατρίου. Το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) , οι νεφροί, ο λιπώδης ιστός το λαμβάνουν με διευκολυνόμενη διάχυση. Μέσα στο κύτταρο το παντοθενικό οξύ χρησιμοποιείται για τη σύνθεση CoA. Το CoA βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στο ήπαρ, τα επινεφρίδια, τους νεφρούς, την καρδιά, τον εγκέφαλο.

Καταβολισμός & απέκκριση

Κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού το CoA αποφωσφορυλιώνεται και μέσω μιας σειράς αντιδράσεων παράγεται παντοθενικό οξύ. Το παντοθενικό οξύ απεκκρίνεται κυρίως από τα ούρα. Η απέκκριση του είναι δυνατόν να γίνει και μέσω των κοπράνων. Στον ανθρώπινο οργανισμό δεν έχουν ταυτοποιηθεί μεταβολίτες της βιταμίνης.

Η απέκκριση παντοθενικού από τα ούρα αντικατοπτρίζει τη διαιτητική πρόσληψη. Όταν η έκκριση από τα ούρα είναι <1 mg/ημέρα (αντιστοιχεί σε πρόσληψη μικρότερη των 4 mg) είναι πιθανή η ανεπάρκεια παντοθενικού οξέος.

Λειτουργίες & μηχανισμοί δράσης

Μια από τις κύριες δράσεις του παντοθενικού οξέος είναι ο ρόλος του ως συστατικό του CoA. Βέβαια και η 4-φωσφοπαντεθείλη που παράγεται από το CoA μπορεί να έχει κάποια φυσιολογική δράση.

Συγκεκριμένα, συμμετέχει:

- Στην παραγωγή ενέργειας μέσω της σύνθεσης του ακετυλο-CoA το οποίο στη συνέχεια συμπυκνώνεται με οξαλοξικό και οξειδώνεται στον κύκλο του Krebs. Το Ac-CoA είναι το κοινό προϊόν διάσπασης των 3 τάξεων θρεπτικών συστατικών που παράγουν ενέργεια.
- Στην αντίδραση του ακετυλο-CoA με ενεργοποιημένο CO₂ για την παρασκευή μηλονυλο-CoA (πρώτο στάδιο για τη σύνθεση λιπαρών οξέων).
- Στην αντίδραση του ακετυλο-CoA με ακετοακετυλο-CoA για την παραγωγή HMG-CoA το οποίο είναι σημαντικό για τη σύνθεση χοληστερόλης και για την κετογένεση. Επίσης, η σύνθεση φωσφολιπιδίων και σφιγγομυελίνης από φωσφατιδικό οξύ και σφιγγοσίνη απαιτεί ακετυλο-CoA.
- Ως προσθετική ομάδα στην ακυλο-μεταφέρουσα πρωτεΐνη (ACP). Η ACP δρα ως μεταφορέας ακυλομάδας στη σύνθεση λιπαρών οξέων και αποτελεί

απαραίτητο στοιχείο του συστήματος της συνθάσης λιπαρών οξέων.

- Στην ακετυλίωση πρωτεϊνών. Το CoA μεταφέρει λιπαρά οξέα μακριάς αλυσίδας ή οξικό οξύ σε πρωτεΐνες ως μετα-μεταφραστική τροποποίηση.
- Στο μεταβολισμό κάποιων φαρμάκων και στη σύνθεση ακετυλοχολίνης.

Διαιτητικές Προσλήψεις Αναφοράς

Το 1998 ορίστηκε ως Επαρκής Πρόσληψη παντοθενικού οξέος για τους ενήλικες από 19 ετών και άνω τα 5 mg. Οι Επαρκείς Προσλήψεις χρησιμοποιούνται αντί για τις Συνιστώμενες Διαιτητικές Προσλήψεις, όταν δεν υπάρχουν αρκετά διαθέσιμα δεδομένα για να οριστεί η Εκτιμώμενη Μέση Απαίτηση και ακολούθως η Συνιστώμενη Διαιτητική πρόσληψη. Κατά την εγκυμοσύνη και το θηλασμό ως Επαρκής Πρόσληψη προτείνεται η τιμή των 6 και 7 mg/ημέρα αντίστοιχα.

2.2.6 Βιοτίνη

Η βιοτίνη αναφερόταν στο παρελθόν και ως βιταμίνη H. Η δομή της αποτελείται από δυο δακτυλίους, έναν ουριδικό δακτύλιο που συνδέεται με έναν θειοφαινικό δακτύλιο, με μια πρόσθετη πλευρική αλυσίδα βαλαρικού οξέος.

Πηγές

Είναι ευρέως διαδεδομένη στα τρόφιμα και βρίσκεται στο συκώτι, τον κρόκο αυγού, σε δημητριακά και λαχανικά. Σε πολλά τρόφιμα η βιοτίνη βρίσκεται δεσμευμένη σε πρωτεΐνη ή ως βιοκυτίνη (βιτινυλολυσίνη). Επιπλέον η βιοτίνη παράγεται από βακτήρια στο λεπτό έντερο.

Η αβιδίνη, μια γλυκοπρωτεΐνη του κρόκου του αυγού, μπορεί να συνδεθεί μη-αντιστρεπτά, μέσω μη-ομοιοπολικού δεσμού με τη βιοτίνη και να παρεμποδίσει την απορρόφησή της. Καθώς η αβιδίνη είναι θερμοευαίσθητη, κατά το μαγείρεμα των αυγών καταστρέφεται και δεν παρεμβαίνει στην απορρόφηση της βιοτίνης.

Πέψη, απορρόφηση, μεταφορά

Προκειμένου να απορροφηθεί η βιοτίνη που βρίσκεται δεσμευμένη σε πρωτεΐνη πρέπει να υποστεί πρώτα πέψη από πρωτεολυτικά ένζυμα. Η πρωτεόλυση

οδηγεί σε βιοτίνη, βιοκυτίνη ή βιοτινυλοπεπτίδια. Η βιοκυτίνη και τα βιοτινυλοπεπτίδια μπορούν να υδρολυθούν στη συνέχεια από τη βιοτινιδάση. Η βιοτινιδάση που υπάρχει στο παγκρεατικό και/ή εντερικό υγρό υδρολύει τη βιοκυτίνη και τα βιοτινυλοπεπτίδια υπό απελευθέρωση βιοτίνης, λυσίνης και άλλων αμινοξέων.

Η βιοκυτίνη μπορεί επίσης να απορροφηθεί ως έχει και να υδρολυθεί στη συνέχεια από τη βιοτινιδάση του πλάσματος ή κάποιων ιστών όπως του ήπατος, των επινεφριδίων, των νεφρών. Η βιοκυτίνη που δεν μεταβολίζεται από τη βιοτινιδάση απεκκρίνεται από τα ούρα. Η βιοτινιδάση είναι δραστική σε μεγάλο εύρος pH και αναγνωρίζει το τμήμα βιοτίνης.

Η βιοδιαθεσιμότητα της βιοτίνης που εμπεριέχεται στα τρόφιμα κυμαίνεται από 100% στο καλαμπόκι έως και 0% στο σιτάρι.

Ο μηχανισμός απορρόφησης της βιοτίνης στον άνθρωπο δεν είναι απόλυτα διευκρινισμένος. Με βάση πειράματα σε ζώα έχει βρεθεί ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της απορρόφησης συμβαίνει στο δωδεκαδάκτυλο και κατά κύριο λόγο μέσω ενός μεταφορέα ενώ είναι πιθανή και η απορρόφηση με παθητική μεταφορά σε μικρότερο ποσοστό.

Στο πλάσμα βρίσκεται τόσο ελεύθερη βιοτίνη όσο και δεσμευμένη σε πρωτεΐνη. Βιοτίνη δεσμεύουν η αλβουμίνη του πλάσματος καθώς και α- και β-σφαιρίνες και η βιοτινιδάση. Η βιοτίνη αποθηκεύεται σε μικρό ποσοστό στους μύες, το ήπαρ και τον εγκέφαλο. Η ταχύτητα και το ποσοστό πρόσληψης βιοτίνης από τους διάφορους ιστούς εξαρτάται από τις ανάγκες του ιστού.

Καταβολισμός & απέκκριση

Ο καταβολισμός των ενζύμων που περιλαμβάνουν βιοτίνη από τα πρωτεολυτικά ένζυμα οδηγεί σε βιοκυτίνη. Στη συνέχεια η βιοκυτίνη αποικοδομείται από τη βιοτινιδάση υπό το σχηματισμό βιοτίνης. Ένα ποσοστό αυτής της βιοτίνης επαναχρησιμοποιείται και η υπόλοιπη αποικοδομείται. Για την αποικοδόμηση του μορίου της βιοτίνης το τμήμα του βαλαρικού οξέος υφίσταται β-οξειδωση υπό το σχηματισμό της δι-νορβιοτίνης. Στον άνθρωπο το τμήμα του δικυκλικού συστήματος δεν υφίσταται σημαντικές τροποποιήσεις.

Η απέκκριση της βιταμίνης αυτής γίνεται από τα ούρα είτε ως βιοτίνη αυτούσια είτε ως δι-νορβιοτίνη. Σε μικρότερο ποσοστό μπορεί να σχηματιστούν και κάποιοι άλλοι μεταβολίτες οι οποίοι απεκκρίνονται και αυτοί με τα ούρα. Από τα ούρα απεκκρίνεται επίσης και όση βιοκυτίνη δεν αποικοδομήθηκε από τη

βιοτινιδάση.

Η ελεύθερη βιοτίνη μπορεί να επαναπορροφηθεί από τους νεφρούς, αν και κορεσμός του νεφρικού συστήματος μεταφοράς οδηγεί σε απέκκριση της βιοτίνης. Η απέκκριση βιοτίνης από τα ούρα κυμαίνεται από 5-110 mg/ημέρα. Με βάση σειρά μελετών στις ΗΠΑ έχει βρεθεί ότι ημερήσια πρόσληψη βιοτίνης σε ποσά 100-200 mg από ενήλικες οδηγεί σε απέκκριση 18-46 mg βιοτίνης.

Η βιοτίνη που δεν απορροφάται από το λεπτό έντερο και αυτή που συντίθεται από τη μικροβιακή χλωρίδα μπορεί να απεκκριθεί από τα κόπρανα. Η απέκκριση από τα κόπρανα φαίνεται ότι είναι ανεξάρτητη από τη διατροφική πρόσληψη. Το σύνολο της απέκκρισης από τα ούρα και τα κόπρανα συχνά είναι μεγαλύτερο από το ποσό της προσλαμβανόμενης δόσης, πιθανότατα λόγω της συνεισφοράς της σύνθεσης βιοτίνης από τη χλωρίδα του εντέρου. Η απέκκριση από τα ούρα γενικά είναι μικρότερη από τη διατροφική πρόσληψη.

Λειτουργίες & μηχανισμοί δράσης

Η βιοτίνη δρα στο κύτταρο όντας συνδεδεμένη ομοιοπολικά σε πρωτεΐνες. Μέσα στο κύτταρο η βιοτίνη αντιδρά με ATP (αντίδραση που απαιτεί Mg^{2+}) υπό το σχηματισμό του βιοτινικού 5'-αδενυλεστέρα (ενεργοποιημένη βιοτίνη). Ακολούθως η συνθάση του ολοενζύμου συνδέει το τμήμα βιοτίνης με ένα από τα διάφορα αποένζυμα υπό το σχηματισμό του ολοενζύμου (καρβοξυλάση) και την απελευθέρωση AMP.

Στα ένζυμα που απαιτούν βιοτίνη για να δράσουν περιλαμβάνονται η καρβοξυλάση του Ac-CoA, η καρβοξυλάση του πυροσταφυλικού, η καρβοξυλάση του προπιονυλο-CoA, η καρβοξυλάση του β-μεθυλοκροτονυλο-CoA και η βιοτίνη συνδέεται με αμιδικό δεσμό με την ε-αμινομάδα της λυσίνης του αποενζύμου.

Διατροφικές Προσλήψεις Αναφοράς

Καθώς το ποσοστό συνεισφοράς σε βιοτίνη από τη μικροβιακή χλωρίδα δεν είναι σαφές και η βιοδιαθεσιμότητα βιοτίνης στα διάφορα τρόφιμα δεν είναι απόλυτα καθορισμένη, οι συστάσεις για τη διατροφική πρόσληψη του 1989 είχαν προτείνει ένα εύρος από 30-100 mg/ημέρα για ενήλικες και για παιδιά άνω των 11 ετών. Οι νέες συστάσεις της Εθνικής Ακαδημίας Επιστημών των ΗΠΑ συστήνουν ως Επαρκή Πρόσληψη βιοτίνης για ενήλικες 19 ετών και άνω τα 30 μg ημερησίως. Για τις έγκυες και τις θηλάζουσες η τιμή της Επαρκούς Πρόσληψης ανέρχεται στα 30 και 35 μg

ημερησίως αντίστοιχα.

2.2.7 Βιταμίνη B6

Η βιταμίνη B₆ απαντάται υπό 3 μορφές πυριδοξίνη (PN), πυριδοξάλη (PL) και πυριδοξαμίνη (PM). Οι ενώσεις αυτές αλληλομετατρέπονται και έχουν παρόμοια δραστηριότητα.

Πηγές

Όλα τα βιταμερή της βιταμίνης απαντώνται στα τρόφιμα. Η πυριδοξίνη βρίσκεται σχεδόν αποκλειστικά στα φυτικά τρόφιμα, ενώ πολύ μικρές ποσότητες πυριδοξάλης και πυριδοξαμίνης απαντώνται σε αυτά. Άριστες πηγές βιταμίνης B₆ είναι οι μπανάνες και τα καρύδια. Τα άλλα βιταμερη, κυρίως η φωσφορική πυριδοξάλη και η φωσφορική πυριδοξαμίνη βρίσκονται στα ζωικά τρόφιμα με πιο πλούσιες πηγές το άπαχο φιλέτο, τον σολομό και το ελαφρύ κρέας του κοτόπουλου. Ακόμα, σε ορισμένα φυτά η βιταμίνη B₆ βρίσκεται σε μια συζευγμένη μορφή, τη β-γλυκοσιδική πυριδοξίνη.

Πέψη, μεταφορά & απορρόφηση

Η βιταμίνη B₆ απορροφάται κυρίως από την ελεύθερη μορφή της (μη-φωσφορυλιωμένη) και για να γίνει αυτό η φωσφορυλιωμένη βιταμίνη υδρολύεται από την αλκαλική φωσφατάση υπό το σχηματισμό ανάλογα PN, PL, PM.

Η απορρόφηση των PN, PL και PM γίνεται με παθητική μεταφορά κυρίως στη νήστιδα. Η συνολική απορρόφηση της βιταμίνης κυμαίνεται από 70-85%. Μέσα στο εντερικό κύτταρο οι PN και PL μπορούν να φωσφορυλιωθούν με δράση κάποιας κινάσης προς φωσφορική πυριδοξίνη (PNP) και φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) αντίστοιχα. Η φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) είναι η κύρια μορφή υπό την οποία απαντάται η βιταμίνη B₆ στο αίμα (ποσοστό περίπου 60%). Σε μικρότερο ποσοστό (περίπου 15%) βρίσκεται η PL και η PM.

Το ήπαρ είναι το κύριο όργανο που προσλαμβάνει με παθητική διάχυση τη βιταμίνη B₆ που απορροφήθηκε. Το ήπαρ αποθηκεύει περίπου 5%-10% της βιταμίνης. Οι μη φωσφορυλιωμένες μορφές της συνήθως φωσφορυλιώνονται στο κυττόπλασμα των ηπατοκυττάρων.

Καταβολισμός & απέκκριση

Πιστεύεται ότι τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της PLP ρυθμίζονται με ενζυμική υδρόλυση. Ο έλεγχος γίνεται με βάση τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών που δεσμεύουν την PLP μέσα στο κύτταρο. Όταν οι πρωτεΐνες αυτές κορεστούν σε PLP, η νεοσυντιθέμενη PLP υδρολύεται από την ενδοκυττάρια φωσφατάση. Επιπλέον για τον έλεγχο της συγκέντρωσης της PLP στο κύτταρο μπορεί να υπάρχει και αναστολή από τα προϊόντα της PNP/PMP οξειδάσης.

Το κύριο προϊόν απέκκρισης της βιταμίνης B6 είναι το πυριδοξικό οξύ (PIC) το οποίο προκύπτει από οξείδωση της PL είτε από αλδεϋδική αφυδρογονάση (εξαρτώμενη από NAD) είτε από αλδεϋδική οξειδάση (εξαρτώμενη από FAD), που βρίσκεται στο ήπαρ και τους νεφρούς. Το ποσοστό της PL που απεκκρίνεται φαίνεται ότι αποτελεί δείκτη της προσλαμβανόμενης και όχι της αποθηκευμένης βιταμίνης B6 γιατί η νεοσυντιθέμενη PLP δεν ανταλλάσσεται ελεύθερα με την ενδογενή. Αντίθετα η νεοσυντιθέμενη PLP μπορεί να μετατραπεί σε PL και PIC και απελευθερώνεται στο πλάσμα.

Λειτουργίες & μηχανισμοί δράσης

Η βιταμίνη B6 παρουσιάζει τις ακόλουθες δράσεις:

- Δρα ως συνένζυμο σε έναν πολύ μεγάλο αριθμό ενζυμικών αντιδράσεων στο μεταβολισμό των αμινοξέων/πρωτεϊνών, όπως τρανσαμίνωση, αποκαρβοξυλίωση, τρανσουλφιδρίωση και αποσουλφιδρίωση αμινοξέων, αντιδράσεις διάσπασης, ρακεμοποίηση.
- Δρα ως συνένζυμο στον καταβολισμό του γλυκογόνου.
- Συμβάλλει στη σύνθεση διαφόρων άλλων ενώσεων, όπως νιασίνης από Trp, ισταμίνης από His, καρνιτίνης, ταυρίνης, ντοπαμίνης και αίμης.
- Δρα ως στεροειδής ορμόνη.

Διαιτητικές Προσλήψεις Αναφοράς

Οι Διαιτητικές Προσλήψεις Αναφοράς του 1998 για την πρόσληψη βιταμίνης B6 είναι χαμηλότερες τόσο για τους άνδρες όσο και για τις γυναίκες από τις συστάσεις του 1989. Οι νέες συστάσεις για τη βιταμίνη B6 για ενήλικες άνδρες από 19 έως 50 ετών είναι 1,3 mg και για άνδρες από 51 ετών και άνω είναι 1,7 mg. Οι συστάσεις για τις ενήλικες γυναίκες από 19 έως 50 ετών είναι επίσης 1,3 mg και για

τις γυναίκες από 51 ετών και άνω είναι 1,5 mg. Κατά την εγκυμοσύνη και τη γαλουχία οι Διαιτητικές Προσλήψεις Αναφοράς αυξάνονται στα 1,9 και 2,0 mg αντίστοιχα.

2.2.8 Φυλλικό οξύ

Το φυλλικό οξύ αποτελείται από 3 δομικά συστατικά απαραίτητα για την εμφάνιση της βιταμινικής του δράσης ένα δακτύλιο περιδίνης, π-αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA) και γλουταμινικό οξύ (Glu). Αν και τα θηλαστικά συνθέτουν τα 3 συστατικά του φυλλικού οξέος, δε διαθέτουν τα κατάλληλα ένζυμα για το σχηματισμό του δεσμού της περιδίνης με το PABA. Στον οργανισμό το δραστικό φυλλικό οξύ συνδέεται με αρκετές ομάδες Glu.

Πηγές

Βρίσκεται τόσο σε ζωικά όσο και σε φυτικά τρόφιμα. Καλές πηγές φυλλικού οξέος θεωρούνται το σπανάκι, τα μανιτάρια, τα πράσινα λαχανικά, τα σπαράγγια, το μπρόκολο, το συκώτι. Γενικά τα ωμά τρόφιμα περιλαμβάνουν υψηλότερα ποσά φυλλικού οξέος σε σχέση με τα βρασμένα. Κατά το μαγείρεμα μπορεί να υπάρξει απώλεια φυλλικού οξέος σε ποσοστό 50-90%.

Στα τρόφιμα το φυλλικό οξύ βρίσκεται συνήθως συνδεδεμένο με περισσότερες από μια ομάδες Glu (συνήθως υπάρχουν 9 ομάδες Glu) και κυρίως ως N⁵-μεθυλο-τετραϋδροφυλλικό (THF) ή N¹⁰-φορμυλο-THF. Έχουν καταγραφεί περισσότερες από 150 μορφές του φυλλικού οξέος.

Πέψη, απορρόφηση, μεταφορά

Για να γίνει απορρόφηση των πολυγλουταμινικών μορφών του φυλλικού οξέος πρέπει πρώτα να γίνει υδρόλυση προς τη «μονογλουταμινική» μορφή. Η υδρόλυση γίνεται από τις γ-γλουταμυλοκαρβοξυπεπτιδάσες. Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται στο παγκρεατικό υγρό, στις ψυκτροειδείς παρυφές του εντέρου και στη χολή. Η μακροχρόνια πρόσληψη αλκοόλ μπορεί να ελαττώσει τη δραστηριότητα των ενζύμων αυτών και να οδηγήσει σε μειωμένη απορρόφηση του φυλλικού οξέος. Κάποια τρόφιμα, π.χ. λάχανο, περιέχουν αναστολείς των ενζύμων αυτών.

Για την απορρόφηση του φυλλικού οξέος - στο λεπτό έντερο - υπάρχει

σύστημα μεταφοράς το οποίο πιστεύεται ότι ρυθμίζεται από το pH, ιόντα Na^+ και ενεργειακά. Επίσης, κάποιες πρωτεΐνες μεταφοράς φυλλικού οξέος που βρίσκονται στις ψυκτροειδείς παρυφές του εντέρου πιστεύεται ότι μετέχουν στην απορρόφηση της βιταμίνης. Η απορρόφηση του φυλλικού οξέος μπορεί να γίνει και με διάχυση. Περίπου το 50% του φυλλικού οξέος που λαμβάνεται από την τροφή μπορεί να απορροφηθεί.

Μέσα στο εντερικό κύτταρο το φυλλικό οξύ ανάγεται προς THF και μεθυλιώνεται προς N^5 -μεθυλο-THF. Στην κυκλοφορία το φυλλικό οξύ βρίσκεται κυρίως υπό τη μορφή N^5 -μεθυλο-THF αλλά και ως διϋδροφυλλικό και ως φορμυλιωμένο. Στο ήπαρ υπάρχει THF, N^5 -μεθυλο-THF, N^{10} -φορμυλο-THF και σε μικρότερο ποσοστό κάποιες άλλες μορφές. Στο N^5 -μεθυλο-THF και το N^{10} -φορμυλο-THF υπάρχουν συνδεδεμένες αρκετές ομάδες Glu (συνήθως 4-7). Το μεγαλύτερο ποσοστό N^5 -μεθυλο-THF, N^{10} -φορμυλο-THF εκκρίνεται στη χολή και επαναπορροφάται μέσω της εντεροηπατικής κυκλοφορίας. Στο αίμα περίπου τα 2/3 του φυλλικού οξέος είναι συνδεδεμένα σε πρωτεΐνες σύνδεσης φυλλικού οξέος ενώ το υπόλοιπο βρίσκεται ελεύθερο.

Η μεταφορά του φυλλικού οξέος στα κύτταρα των διαφόρων ιστών γίνεται μέσω ειδικών πρωτεϊνών μεταφοράς και μέσα στο κύτταρο προστίθενται ομάδες Glu που το καθιστούν δραστικό συνένζυμο και συγχρόνως το εγκλωβίζουν στο κύτταρο. Το κύριο όργανο αποθήκευσης φυλλικού οξέος είναι το ήπαρ, ενώ το συνολικό απόθεμα φυλλικού στον οργανισμό κυμαίνεται μεταξύ 5-10 mg.

Καταβολισμός & απέκκριση

Ο καταβολισμός του γίνεται με δράση της καρβοξυπεπτιδάσης G. Βασικές θέσεις διάσπασης είναι μεταξύ των θέσεων 9,10 και ακολουθεί ακετυλίωση που οδηγεί στους μεταβολίτες π-ακεταμιδοβενζοϊκό και π-ακεταμιδοβενζοϋλογλουταμινικό οξύ οι οποίοι απεκκρίνονται από τα ούρα.

Αν και μεγάλο ποσό φυλλικού οξέος εκκρίνεται από το ήπαρ στη χολή, το μεγαλύτερο ποσοστό αυτού επαναπορροφάται μέσω της εντεροηπατικής κυκλοφορίας. Μεγάλα ποσά από το μικροβιακής προέλευσης φυλλικό οξύ απεκκρίνονται με τα κόπρανα.

Λειτουργίες & μηχανισμοί δράσης

Το φυλλικό οξύ στη δραστική του μορφή (THF) δρα στον οργανισμό ως

μεταφορέας ομάδας ενός ατόμου C και το φυλλικό οξύ και το διϋδροφυλλικό οξύ ανάγονται από την αναγωγή του διϋδροφυλλικού οξέος προς τετραϋδροφυλλικό (THF). Το THF δέχεται μια ομάδα ενός ατόμου C κατά τη διάρκεια διαφόρων αντιδράσεων καταβολισμού των αμινοξέων και στη συνέχεια η ομάδα αυτή αποδίδεται από το THF σε διάφορα αναβολικά στάδια. Η ομάδα ενός ατόμου C εισάγεται στη θέση N⁵ ή NIO ή και στις 2. Οι μορφές αυτές του THF αλληλομετατρέπονται με εξαίρεση το N⁵-μεθυλο-THF που δεν μπορεί να μετατραπεί σε N⁵,N¹⁰-μεθυλενο-THF. Επομένως, συμμετέχει:

- Στο μεταβολισμό αμινοξέων, όπως Ser, Gly, Met, His.
- Στη σύνθεση πουρινών και πυριμιδινών.

Διαιτητικές Προσλήψεις Αναφοράς

Η ελάχιστη ημερήσια απαίτηση για το φυλλικό οξύ υπολογίζεται στα 50 μg, ενώ η πρόσληψη 100 μg πιστεύεται ότι εμποδίζει την εμφάνιση ανεπάρκειας. Η Συνιστώμενη Διαιτητική Πρόσληψη του 1989 είναι 3 μg/kg βάρους ή 200 μg για άνδρες και 180 μg για γυναίκες. Πιστεύεται όμως ότι αυτή η ποσότητα είναι ανεπαρκής και οι Sauberlich και συνεργάτες προτείνουν ότι οι μη έγκυες γυναίκες χρειάζονται 200-250 μg φυλλικού οξέος ημερησίως για τη διατήρηση της συγκέντρωσης του φυλλικού οξέος στο πλάσμα σε φυσιολογικά επίπεδα. Οι Διαιτητικές Προσλήψεις του 1998 για το φυλλικό λαμβάνουν υπόψη τη βιοδιαθεσιμότητά του και είναι σε συμφωνία με τις συστάσεις του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης των Νοσημάτων των ΗΠΑ (CDC). Οι συστάσεις για τους ενήλικες είναι 400 μg/ημέρα ως ισοδύναμα διαιτητικού φυλλικού οξέος. (DFE).

2.2.9 Κοβαλαμίνη (Βιταμίνη B12)

Με τον όρο βιταμίνη B12 αναφερόμαστε σε μια σειρά ενώσεων που ανήκουν στην κατηγορία των κορρινοειδών και ονομάζονται έτσι γιατί περιλαμβάνουν έναν κορρινικό δακτύλιο. Ο κορρινικός δακτύλιος είναι ένα μακροκυκλικό σύστημα αποτελούμενο από 4 ανηγμένους πυρρολικούς δακτυλίους που συνδέονται μεταξύ τους. Στη βιταμίνη B12 στο κέντρο του κορρινικού δακτυλίου υπάρχει ένα άτομο κοβαλτίου συμπλοκοποιημένο με τα άτομα N των πυρρολικών δακτυλίων και με ένα νουκλεοτίδιο. Το άτομο του κοβαλτίου συνδέεται επίσης με μια ακόμη ομάδα, βάσει

της οποίας δίνεται και το όνομα της κάθε κοβαλαμίνης.

Πηγές

Η βιταμίνη B12 βρίσκεται σε ζωικά προϊόντα τα οποία έχουν αποκτήσει τη βιταμίνη από μικροοργανισμούς. Γενικά, η φυσικά απαντώμενη βιταμίνη B12 παράγεται στο σύνολό της από μικροοργανισμούς.

Σε υψηλά ποσοστά η βιταμίνη υπάρχει στο κρέας (κυρίως στο συκώτι), σε κάποια ψάρια και οστρακοειδή και σε μικρότερα ποσοστά στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η κυανοκοβαλαμίνη υπάρχει επίσης στον καπνό.

Η διαθεσιμότητα της βιταμίνης B12 μπορεί να ελαττωθεί από τη βιταμίνη C. Βιταμίνη C που λαμβάνεται κατά τη διάρκεια του γεύματος ή μέσα στην επόμενη ώρα, σε δόσεις της τάξεως των 500 mg και άνω μπορεί να ελαττώσει τη διαθεσιμότητα της B12 από την τροφή.

Πέψη, απορρόφηση, μεταφορά

Επειδή οι κοβαλαμίνες βρίσκονται δεσμευμένες σε πρωτεΐνες της τροφής πριν την απορρόφησή τους πρέπει να λάβει χώρα αποδέσμευσή τους. Αυτό γίνεται κυρίως στο στομάχι με τη δράση της πεψίνης. Η ελεύθερη κοβαλαμίνη στη συνέχεια συνδέεται με μια πρωτεΐνη (R-πρωτεΐνη ή απτοκορρίνη ή κοβαλοφιλίνη) και εισέρχεται στο λεπτό έντερο.

Στο δωδεκαδάκτυλο γίνεται υδρόλυση της R-πρωτεΐνης από τα παγκρεατικά ένζυμα και η ελεύθερη κοβαλαμίνη συνδέεται με μια άλλη πρωτεΐνη (IF) και κυκλοφορεί στον ειλεό όπου υπάρχουν υποδοχείς κοβαλαμίνης. Το σύμπλεγμα IF-κοβαλαμίνη συνδέεται με τους υποδοχείς και παρουσία ασβεστίου γίνεται η απορρόφηση της βιταμίνης. Ο βαθμός απορρόφησης εξαρτάται αντιστρόφως ανάλογα από τη διαιτητική πρόσληψη. Όταν η διαιτητική πρόσληψη είναι χαμηλή η απορρόφηση μπορεί να είναι περίπου 80%, ενώ όταν η δόση είναι μεγάλη η απορρόφηση μπορεί να είναι μόλις 5% ή και λιγότερο.

Μέσα στον οργανισμό η βιταμίνη κυκλοφορεί συνδεδεμένη σε ειδικές πρωτεΐνες (τρανσκοβαλαμίνες, 3 κατηγορίες TCI, TCII, TCIII).

Η βιταμίνη B12 μπορεί να αποθηκευτεί και να παραμείνει στον οργανισμό για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα (μερικά χρόνια). Ο κύριος αποθηκευτικός χώρος της βιταμίνης είναι το ήπαρ. Σε μικρότερο ποσό υπάρχει στους νεφρούς, την καρδιά, τον σπλήνα, τον εγκέφαλο, τα οστά, τους μυς.

Καταβολισμός & απέκκριση

Γενικά το ποσοστό καταβολισμού της κοβαλαμίνης από τον οργανισμό πιστεύεται ότι είναι πολύ μικρό.

Κατά τη λήψη κανονικών ποσοτήτων, ένα σημαντικό ποσοστό κοβαλαμίνης απεκκρίνεται από τη χολή. Ένα μέρος απεκκρίνεται με τα κόπρανα ενώ από τα ούρα απεκκρίνεται μικρό ποσοστό και κυρίως σε περιπτώσεις αυξημένης διαιτητικής πρόσληψης.

Λειτουργίες & μηχανισμοί δράσης

Οι δράσεις της βιταμίνης B12 στον ανθρώπινο οργανισμό είναι οι εξής:

- Είναι απαραίτητη για την ομαλή ανάπτυξη, την ισορροπία του νευρικού συστήματος, τον ομαλό σχηματισμό του αίματος.
- Μετέχει σε αντιδράσεις μεθυλίωσης.
- Απαιτείται για τη μετατροπή του L-μεθυλομηλονυλο-CoA σε ηλεκτρυλο-CoA, αντίδραση που καταλύεται από τη μουτάση του L-μεθυλομηλονυλο-CoA.

Διαιτητικές Προσλήψεις Αναφοράς

Η Διαιτητική Πρόσληψη Αναφοράς για τους ενήλικες άνω των 19 ετών είναι σήμερα 2,4 μg βιταμίνης B12 ημερησίως. Αυξήσεις κατά 0,2 και 0,4 μg/ημέρα προτείνονται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας αντίστοιχα. Προτείνεται επιπλέον ότι τα άτομα ηλικίας 51 ετών και άνω θα πρέπει να καταναλώνουν τρόφιμα που είναι εμπλουτισμένα σε βιταμίνη B12 ή να καταναλώνουν συμπληρώματα που να περιέχουν B12. Η σύσταση αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι περίπου το 10% έως το 30% των ηλικιωμένων ατόμων δεν απορροφά επαρκώς τις μορφές βιταμίνης που βρίσκονται στα τρόφιμα.

2.3 Λιποδιαλυτές Βιταμίνες

2.3.1 Βιταμίνη Α

Με τον όρο βιταμίνη Α αναφερόμαστε σε μια σειρά ενώσεων απαντώμενων σε μια μεγάλη ποικιλία τροφίμων. Συνήθως ο όρος αναφέρεται στη ρετινόλη (μια αλκοόλη) και στη ρετινάλη (μια αλδεΐδη) με τη μητρική ένωση να είναι η all-trans-ρετινόλη. Το αντίστοιχο οξύ (ρετινοϊκό οξύ) είναι μεταβολίτης της ρετινάλης. Τα ρετινοειδή αποτελούνται από ομάδες ισοπρενίου συνδεδεμένες μεταξύ τους κατά «κεφαλή-ουρά».

Στα ζωικά τρόφιμα η βιταμίνη Α βρίσκεται κυρίως ως ρετινόλη, ρετινάλη ή ρετινοϊκό οξύ. Στα φυτικά τρόφιμα η βιταμίνη Α απαντάται υπό τη μορφή προβιταμίνης. Με τον όρο προβιταμίνη Α αναφερόμαστε στο β-καροτένιο και σε άλλα καροτενοειδή (χρωστικές των φυτών) που παρουσιάζουν τη βιολογική δράση αυτού.

Πηγές

Τα ρετινοειδή βρίσκονται σε ζωικά προϊόντα. Κυριότερες πηγές τους είναι το συκώτι βοοειδών, τα γαλακτοκομικά προϊόντα (πλήρες γάλα, τυρί, βούτυρο), λιπαρά ψάρια όπως ο τόνος και οι σαρδέλες. Η ρετινόλη της τροφής απαντάται κυρίως υπό τη μορφή εστέρων της, συνήθως με το παλμιτικό οξύ, σε οποίους υδρολύονται κατά την πέψη. Η κύρια μορφή ρετινόλης στα τρόφιμα είναι η all-trans και το κυριότερο ισομερές της η 13-cis-ρετινόλη (νεοβιταμίνη Α). Cis ισομερή ρετινόλης απαντώνται κυρίως σε ιχθυέλαια. Η ρετινάλη (90% δραστηριότητα σε σχέση με την all-trans-ρετινόλη) βρίσκεται κυρίως στο αυγοτάραχο και στα αυγά κότας.

Μεταφορά & μεταβολισμός

Τα χυλομικρά παραδίδουν τους εστέρες της ρετινόλης, την ελεύθερη ρετινόλη και τα καροτενοειδή σε διάφορους εξω-ηπατικούς ιστούς όπως το μυελό των οστών, ερυθροκύτταρα, σπλήνα, λιπώδη ιστό, σκελετικούς μυς, πνεύμονες, νεφρούς. Τα υπόλοιπα ποσά εστέρων ρετινόλης και καροτενοειδών που δεν παραλαμβάνονται από τους περιφερειακούς ιστούς αποδίδονται στο ήπαρ.

Τα καροτενοειδή που φθάνουν στο ήπαρ μπορούν να ακολουθήσουν τρεις οδούς: α) να μετατραπούν σε ρετινόλη, β) να ενσωματωθούν στις VLDL που

συντίθενται στο ήπαρ και στη συνέχεια να βρεθούν στην κυκλοφορία ως τμήμα των VLDL και γ) να αποθηκευτούν στο ήπαρ. Η περίσσεια των καροτενοειδών που δεν αποθηκεύονται στο ήπαρ καταλήγουν στο λιπώδη ιστό.

Οι εστέρες ρετινόλης που φθάνουν στο ήπαρ παραλαμβάνονται από τα ηπατικά παρεγχυματικά κύτταρα όπου υδρολύονται και η ρετινόλη συνδέεται με μια CBRP1. Στη συνέχεια μπορεί ακολουθηθούν οι ακόλουθες μεταβολικές πορείες: α) εστεροποίηση από ένζυμα όπως η LRAT ή ARAT, β) οξείδωση προς ρετινάλη από την αφυδρογονάση της ρετινόλης και γ) φωσφορυλίωση προς φωσφορικό εστέρα ρετινόλης. Η ρετινόλη που δε μεταβολίζεται και δεν απομακρύνεται από το ήπαρ μπορεί να αποθηκευτεί σε αυτό (εστεροποιημένη).

Καταβολισμός & απέκκριση

Αν και ρετινόλη και ρετινάλη αλληλομετατρέπονται, η οξείδωση της ρετινάλης προς ρετινοϊκό οξύ είναι μη-αντιστρεπτή. Το ρετινοϊκό οξύ στη συνέχεια οξειδώνεται προς 4-υδροξυ-ρετινοϊκό οξύ, μέσω μιας αντίδρασης που απαιτεί NADPH. Στη συνέχεια μετατρέπεται σε 4-οξο-ρετινοϊκό οξύ, το οποίο οξειδώνεται προς πληθώρα μεταβολιτών που απεκκρίνονται.

Λειτουργίες & μηχανισμοί δράσης

Η βιταμίνη Α εμπλέκεται σε μια σειρά διεργασιών του οργανισμού:

- Στον μηχανισμό της όρασης μέσω της 11-cis-ρετινάλης, η οποία παράγεται μέσα στο κύτταρο από τη ρετινόλη.
- Στην ανάπτυξη του οργανισμού. Έλλειψη βιταμίνης Α έχει βρεθεί ότι προκαλεί ατελή ανάπτυξη σε ζώα. Ειδικότερα, έχει βρεθεί ότι η βιταμίνη Α ενεργοποιεί την ανάπτυξη των επιθηλιακών κυττάρων.
- Στις λειτουργίες της επιφάνειας του κυττάρου κατά πάσα πιθανότητα μέσω επίδρασής της στη σύνθεση των γλυκοπρωτεϊνών.
- Υπό τη μορφή ρετινόλης (αλλά όχι ρετινοϊκού οξέος) στην αναπαραγωγική διαδικασία και των δύο φύλων, χωρίς όμως να έχει γίνει ακόμη γνωστός ο μηχανισμός δράσης της.
- Στο ανοσολογικό σύστημα (λειτουργία T -λεμφοκυττάρων και αντίδραση σε βακτηριακές λοιμώξεις).
- Υπό τη μορφή ρετινοϊκού οξέος στην ανάπτυξη των κυττάρων επηρεάζοντας

την έκφραση κάποιων γονιδίων.

Τα καροτενοειδή εμφανίζουν επίσης σημαντικές δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό:

- Δρουν ως αντιοξειδωτικά. Μελέτες έχουν δείξει ότι το β-καροτένιο δρα συνεργειακά με τη βιταμίνη Ε στη δέσμευση ελευθέρων ριζών και άρα στην αποφυγή της οξείδωσης των λιπιδίων.
- Δρουν προστατευτικά έναντι καρδιαγγειακών παθήσεων και καρκίνου.

Διαιτητικές Προσλήψεις Αναφοράς

Η συνιστώμενη διαιτητική πρόσληψη του 1989 για τη βιταμίνη Α ήταν 800 μg ισοδύναμα με ενεργότητα ρετινόλης για τις ενήλικες γυναίκες και 1000 μg για τους ενήλικες άνδρες. Η νέα έκδοση των Συνιστώμενων Διαιτητικών Προσλήψεων για τη βιταμίνη Α προτείνει 900 μg και 700 μg για τους ενήλικες άνδρες και γυναίκες αντίστοιχα.

2.3.2 Βιταμίνη D

Υπό τον όρο βιταμίνη D τίθεται μια σειρά ενώσεων με κύριες την εργοκαλσιφερόλη (βιταμίνη D₂) και την χοληκαλσιφερόλη (βιταμίνη D₃). Από την κατάταξη λείπει η βιταμίνη D₁. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι την εποχή που απομονώθηκαν και ονομάστηκαν οι βιταμίνες η ουσία που είχε ονομαστεί βιταμίνη D₁ ήταν απλά ένα μίγμα των υπολοίπων βιταμινών D και έτσι αποκλείστηκε από τον κατάλογο.

Στα φυτά υπάρχει το στεροειδές εργοστερόλη το οποίο ενεργοποιούμενο από την υπεριώδη ακτινοβολία οδηγεί στην εργοκαλσιφερόλη (βιταμίνη D₂). Στα ζώα δεν υπάρχει εργοστερόλη αλλά ένα άλλο στεροειδές, η 5,7-χολεστανοδιενόλη (7-δεϋδροχοληστερόλη). Η 7-δεϋδροχοληστερόλη υπάρχει στην επιδερμίδα των ζώων και ανθρώπου. Η παρουσία συζυγικών διπλών δεσμών στο μόριο επιτρέπει την απορρόφηση UV ακτινοβολίας (UV-B, 290-315 nm) υπό την παρασκευή της προβιταμίνης D₃ (προκαλσιφερόλη). Το μεγαλύτερο ποσοστό της προ βιταμίνης D₃ ισομερίζεται εντός 1-3 ημερών προς τη βιταμίνη D₃ (χοληκαλσιφερόλη ή καλσιόλη). Από την 7-δεϋδροχοληστερόλη παράγεται επίσης λουμιστερόλη υπό την επίδραση UV, ενώ η επιπλέον ακτινοβολία της προβιταμίνης D₃ οδηγεί στο σχηματισμό ταχυστερόλης.

Κατά την έκθεση του ανθρώπινου σώματος στην ηλιακή ακτινοβολία, το λευκό δέρμα απορροφά περίπου το 80% των φωτονίων UV-B που προσπίπτουν σε αυτό, ενώ το μαύρο απορροφά το 95% περίπου. Εάν η παραγωγή προβιταμίνης D₃ σχετιζόταν γραμμικά με την απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας, αυτό θα εγκυμονούσε σοβαρούς κίνδυνους για την υγεία καθώς υψηλές συγκεντρώσεις βιταμίνης D είναι τοξικές για τον οργανισμό. Στην πραγματικότητα αυτό δε συμβαίνει, καθώς στο δέρμα υπάρχει φωτοχημική ρύθμιση της σύνθεσης της προβιταμίνης. Ως ασπίδα προστασίας από την υπερπαραγωγή προβιταμίνης D δρα η μελανίνη του δέρματος, η οποία συναγωνίζεται την 7-δεϋδροχοληστερόλη για τα UV-B φωτόνια. Επιπλέον, η ίδια η ηλιακή ακτινοβολία δρα ρυθμιστικά στην παραγωγή της προβιταμίνης. Όταν η προβιταμίνη D₃ συντεθεί στο δέρμα μπορεί να ακολουθήσει 2 οδούς: είτε να ισομεριστεί προς τη βιταμίνη D₃, είτε να απορροφήσει ακτινοβολία και να μετατραπεί σε βιολογικά αδρανή μόρια (π.χ. ταχυστερόλη). Έτσι, ανάλογα με την εκτεταμένη ή όχι επίδραση ηλιακής ακτινοβολίας.

Πηγές

Η βιταμίνη D παρέχεται κυρίως από τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όπως συκώτι, αυγά, γαλακτοκομικά προϊόντα (γάλα, βούτυρο, τυρί) και από κάποια ψάρια του αλμυρού νερού όπως σολομός, σαρδέλα, τόνος. Τα φρούτα και οι ξηροί καρποί είναι τροφές πολύ φτωχές σε βιταμίνη D ενώ οι σπόροι και τα φυτικά έλαια περιέχουν μικρά ποσά εργοκαλσιφερόλης (D₂). Εάν η χοληκαλσιφερόλη (D₃) βρίσκεται σε κάποιο φυτό, είναι σε τόσο μικρή ποσότητα ώστε είναι δύσκολα ανιχνεύσιμη. Εντούτοις, η παρουσία βιταμίνης D₃ έχει διαπιστωθεί σε κάποια πράσινα φυλλώδη λαχανικά.

Σε αρκετές χώρες, κάποιες τροφές ενισχύονται σε βιταμίνη D. Στις ΗΠΑ προστίθεται βιταμίνη D κυρίως στο γάλα, ενώ σε κάποιες Ευρωπαϊκές χώρες προστίθεται βιταμίνη D σε δημητριακά, μαργαρίνη, ψωμί.

Απορρόφηση, μεταβολισμός και αποθήκευση

Η βιταμίνη D που λαμβάνεται από την τροφή απορροφάται από τα εντερικά κύτταρα με παθητική μεταφορά υπό τη μορφή μικκυλίων (σε συνδυασμό με το λίπος και παρουσία χολικών αλάτων). Το ποσοστό απορρόφησης ανέρχεται στο 50%. Μέσα στο εντερικό κύτταρο η βιταμίνη D ενσωματώνεται σε χυλομικρά τα οποία εισέρχονται στο λεμφικό σύστημα και ακολουθώντας στο αίμα. Το 40% της βιταμίνης D

μεταφέρεται μέσα στο αίμα από τα χυλομικρά, ενώ κάποια ποσότητα βιταμίνης D μπορεί να μεταφερθεί από τα χυλομικρά στη DBP (vitamin D binding protein, πρωτεΐνη δέσμευσης της βιταμίνης D). Τελική κατάληξη των χυλομικρών είναι το ήπαρ.

Η χοληκαλσιφερόλη (βιταμίνη D₃) που συντίθεται στο δέρμα, διαχέεται αργά από το δέρμα μέσα στο αίμα όπου παραλαμβάνεται από τη DBP. Περίπου το 60% της χοληκαλσιφερόλης του πλάσματος βρίσκεται συνδεδεμένη σε DBP. Η βιταμίνη D που είναι συνδεδεμένη με DBP αποδίδεται αρχικά στους μυς και το λιπώδη ιστό και καταλήγει τελικά στο ήπαρ.

Η χοληκαλσιφερόλη που φθάνει στο ήπαρ είτε από τα υπολείμματα χυλομικρών είτε από μεταφορά της με τη DBP υδροξυλιώνεται στη θέση 25 από την 25-υδροξυλάση (ή μονοοξυγεννάση) υπό παρασκευή της 25-υδροξυ-D₃ (καλσιδιόλη). Η 25-υδροξυλάση είναι NADPH-εξαρτώμενη και η δραστηριότητά της εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα βιταμίνης D. Το ένζυμο είναι πιο δραστικό σε περιόδους στέρησης βιταμίνης D παρά όταν λαμβάνονται φυσιολογικά ποσά βιταμίνης. Το μεγαλύτερο ποσοστό της 25-0H-D₃ που συντίθεται στο ήπαρ εκκρίνεται στο αίμα μεταφερόμενη από τη DBP. Καθώς μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό 25-0H-D₃ παραμένει στο ήπαρ και πολύ μικρό ποσοστό της παραλαμβάνεται από άλλους ιστούς, κύριος «χώρος αποθήκευσης» της 25-0H-D₃ είναι το αίμα.

Η συνδεδεμένη σε DBP 25-0H-D₃ μεταφέρεται μέσω του αίματος στους νεφρούς όπου υπόκειται σε μια δεύτερη υδροξυλίωση στη θέση 1 υπό παρασκευή της 1,25-διυδροξυ-D₃ (καλσιτριόλη, 1,25-(OH)₂-D₃). Η καλσιτριόλη θεωρείται ότι είναι η δραστική βιταμίνη. Η υδροξυλίωση γίνεται από την 1-α-υδροξυλάση της 25-0H-D₃ (1-υδροξυλάση, 1-μονοοξυγεννάση), η οποία βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και απαιτεί NADPH για τη δράση της. Η δραστηριότητα της 1-υδροξυλάσης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες:

- α. Ενεργοποιείται από την PTH (παραθορμόνη) και από χαμηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου στο πλάσμα (υποασβεστιαιμία)
- β. Υψηλές συγκεντρώσεις 1,25-(OH)₂-D₃ (προϊόν της αντίδρασης) την αναστέλλουν ενώ χαμηλές την ενεργοποιούν
- γ. Επηρεάζεται από τα ποσοστά φωσφόρου της διατροφής. Πρόσληψη μεγάλων ποσοτήτων φωσφόρου προκαλεί ελάττωση της συγκέντρωσης 1,25-(OH)₂-D₃ στο πλάσμα, ενώ λήψη μικρών ποσοτήτων ενεργοποιούν τη σύνθεσή της.

Όταν υπάρχουν ικανοποιητικά ποσά καλσιτριόλης, η δράση της 1-υδροξυλάσης στους νεφρούς αναστέλλεται, ενώ συγχρόνως ενεργοποιείται η 24-υδροξυλάση (σύνθεση της $24,25\text{-OH}_2\text{-D}_3$). Ο ρόλος αυτής της ένωσης δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένος. Πιστεύεται ότι είτε αποτελεί ένα ενδιάμεσο μεταβολίτη για την αποικοδόμηση της βιταμίνης, είτε ότι παίζει κάποιο ρόλο στην εναπόθεση ασβεστίου και φωσφόρου στα οστά.

Η καλσιτριόλη που παράγεται συνδέεται με μικρή συγγένεια στη DBP μέσω της οποίας μεταφέρεται στους ιστούς-στόχους. Καθώς η σύνδεση της καλσιτριόλης με τη DBP είναι «χαλαρή», όταν φθάσει στον ιστό-στόχο απελευθερώνεται και συνδέεται με κατάλληλο υποδοχέα της.

Καταβολισμός & απέκκριση

Όπως αναφέρθηκε, ένα μεταβολικό προϊόν της 25-OH-D_3 είναι η $24,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$. Η ένωση αυτή εκτός από τους νεφρούς βρίσκεται επίσης και στο έντερο και παράγεται όταν υπάρχει επάρκεια 25-OH-D_3 και ασβεστίου.

Υδροξυλίωση της καλσιτριόλης ($1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$) στη θέση 24 οδηγεί στην $1,24,25\text{-(OH)}_3\text{-D}_3$. Η ένωση αυτή μπορεί στη συνέχεια να οξειδωθεί προς την $1,25\text{-(OH)}_2\text{ 24-οξο-D}_3$. Ακολουθεί μια σειρά αντιδράσεων στις οποίες περιλαμβάνεται διάσπαση της πλευρικής αλυσίδας του στεροειδούς και τελικά παράγεται το καλσιτροϊκό οξύ το οποίο οδηγείται στη χολή και αποτελεί το κύριο προϊόν απέκκρισης. Υπάρχει μια σειρά ακόμη μεταβολιτών της βιταμίνης D που παρασκευάζονται μέσω αντιδράσεων υδροξυλίωσης και οξείδωσης οι οποίοι εκκρίνονται στη χολή. Λιγότερο από το 5% αυτών των μεταβολιτών καταλήγουν τελικά στα ούρα.

Γενικά, η 25-OH-D_3 και $1,25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ αποτελούν υποστρώματα για πολλές υδροξυλάσες μέσα στον οργανισμό. Στην πλευρική αλυσίδα, κύρια κέντρα αντίδρασης είναι οι C 23,24 και 26. Οι τροποποιήσεις σε αυτές τις θέσεις σχετίζονται κατά πάσα πιθανότητα με αδρανοποίηση της καλσιτριόλης. Αξίζει να σημειωθεί ότι έχουν ταυτοποιηθεί περισσότεροι από 25 μεταβολίτες της βιταμίνης D.

Λειτουργίες & μηχανισμοί δράσης

Η βιταμίνη D ως καλσιτριόλη:

- Αυξάνει την απορρόφηση του ασβεστίου και του φωσφόρου (δράση στο έντερο).

- Εμπλέκεται στην επαναπορρόφηση ασβεστίου και φωσφόρου από τα νεφρικά σωληνάκια (δράση στους νεφρούς).
- Δρα σε συνδυασμό με την PTH για την κινητοποίηση ασβεστίου και φωσφόρου από τα οστά ώστε να διατηρηθεί σταθερή η συγκέντρωση ασβεστίου στο αίμα (δράση στα οστά).
- Δρα ως στεροειδής ορμόνη.
- Επηρεάζει τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων και τελικά τη σύνθεση ορισμένων πρωτεϊνών, αλληλεπιδρώντας όχι μόνο με υποδοχείς που βρίσκονται στον πυρήνα του κυττάρου.
- Ως ορμόνη δρα συνεργειακά με την PTH στην ομοίωση του ασβεστίου στο αίμα.
- Παίζει ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη.

Διαιτητικές Προσλήψεις Αναφοράς

Αν και οι ακριβείς απαιτήσεις για τη βιταμίνη D δεν έχουν καθοριστεί, οι Διαιτητικές Προσλήψεις Αναφοράς που εκδόθηκαν το 1997 και οι οποίες ισχύουν και σήμερα προτείνουν ως Επαρκή Πρόσληψη για βρέφη άνω των 6 μηνών, παιδιά και εφήβους την τιμή των 5 μg ή 200 Διεθνών Μονάδων (International Units, IU). Μια IU ορίζεται ως η δραστηριότητα που περιέχεται σε 0,025 μg χοληκαλσιφερόλης. Η Επαρκής Πρόσληψη για τους ενήλικες άνω των 19 ετών είναι 5 μg (200 IU) ημερησίως. Η ποσότητα αυτή της βιταμίνης D φαίνεται ότι μπορεί να παραληφθεί από την έκθεση στο ηλιακό φως. Στις ηπειρωτικές Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής περίπου 1,5 IU βιταμίνης D/ cm^2 /ώρα κατά τη διάρκεια του χειμώνα και περίπου 6 IU/ cm^2 /ώρα κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού μπορεί να συντεθεί στην επιδερμίδα. Εναλλακτικά, απαιτούνται περίπου 10 λεπτά έκθεσης του προσώπου και των χεριών στον καλοκαιρινό ήλιο για να παραχθούν 10 μg (400 IU) χοληκαλσιφερόλης. Ένα συμπλήρωμα της βιταμίνης D το οποίο παρέχει 400 έως 800 IU μπορεί να είναι απαραίτητο για τους περισσότερους ηλικιωμένους, ειδικότερα αυτούς που πίνουν λίγο γάλα και βρίσκονται συνέχεια μέσα στο σπίτι τους. Η Επαρκής Πρόσληψη για αυτούς τους ηλικιωμένους μεταξύ 51 και 70 ετών και άνω των 70 ετών έχει οριστεί στα 10 μg και 15 μg αντίστοιχα.

2.3.3 Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E περιλαμβάνει 8 ενώσεις (βιταμερή) που συντίθενται από τους φυτικού οργανισμούς. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να διακριθούν σε 2 κατηγορίες τις τοκοφερόλες, οι οποίες περιλαμβάνουν κορεσμένη πλευρική αλυσίδα και τις τοκοτριενόλες, στις οποίες η πλευρική ανθρακική αλυσίδα είναι ακόρεστη.

Κάθε κατηγορία περιλαμβάνει 4 ενώσεις που διαφέρουν μεταξύ τους στη θέση των ομάδων μεθυλίου στο δακτύλιο της χρωμανόλης (χρωμανίου). Κάθε μια διαφορετική ένωση της κάθε κατηγορίας χαρακτηρίζεται με ένα από τα γράμματα α, β, γ, δ και διαθέτει χαρακτηριστική βιολογική δραστηριότητα. Η α-τοκοφερόλη παρουσιάζει τη μεγαλύτερη βιταμινική δραστηριότητα και ακολουθούν β-τοκοφερόλη, η γ-τοκοφερόλη και η δ-τοκοφερόλη. Η α-τοκοτριενόλη έχει λίγο μικρότερη δραστηριότητα από τη β-τοκοφερόλη ενώ για τις υπόλοιπες τοκοτριενόλες δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα.

Πηγές

Η βιταμίνη E βρίσκεται τόσο σε φυτικά όσο και σε ζωικά τρόφιμα. Η πλουσιότερη πηγή βιταμίνης E είναι τα φυτικά έλαια. Το μεγαλύτερο ποσοστό βιταμίνης E που παρέχεται από τη διατροφή προέρχεται από τα φυτικά έλαια που χρησιμοποιούνται στο μαγείρεμα και στις σαλάτες σε συνδυασμό με κάποια φρούτα και λαχανικά. Το επίπεδο βιταμίνης E γενικά συμβαδίζει με το επίπεδο πολυακόρεστων λιπιδίων της τροφής.

Οι τοκοφερόλες βρίσκονται στα φύλλα και σε άλλα πράσινα μέρη των φυτών. Τα φύλλα και οι χλωροπλάστες των φυτών περιέχουν κυρίως α-τοκοφερόλη και μικρότερα ποσά της γ-, ενώ οι γ, δ, β τοκοφερόλες βρίσκονται κυρίως σε περιοχές του φυτού εκτός των χλωροπλάστων. Οι τοκοτριενόλες βρίσκονται κυρίως στα λαχανικά και τα σιτηρά.

Στις ζωικές τροφές η βιταμίνη E (κυρίως η α-τοκοφερόλη) βρίσκεται στους λιπαρούς ιστούς του ζώου. Πάντως σε σχέση με τα φυτικά τρόφιμα, τα ζωικά τρόφιμα αντιπροσωπεύουν φτωχή πηγή βιταμίνης E (π.χ. τα ιχθυέλαια είναι φτωχά σε βιταμίνη E).

Η κατεργασία και η αποθήκευση των τροφών μπορεί να επηρεάσει το επίπεδο περιεχόμενης βιταμίνης E.

Πέψη, απορρόφηση, μεταφορά και αποθήκευση

Οι τοκοφερόλες βρίσκονται ελεύθερες στις τροφές, ενώ οι τοκοτριενόλες είναι συνήθως εστεροποιημένες και για να απορροφηθούν πρέπει πρώτα να υδρολυθούν. Η υδρόλυση των τοκοτριενολών πιστεύεται ότι γίνεται από την παγκρεατική εστεράση και/ή την δωδεκαδακτυλική εστεράση του βλεννογόνου.

Η απορρόφηση της βιταμίνης E (υπό τη μορφή ελευθέρων αλκοολών) γίνεται κυρίως στη νήστιδα με παθητική διάχυση. Για την απορρόφησή της απαιτούνται χολικά άλατα και παγκρεατικό υγρό που θα σχηματίσουν μικκύλια, επιτρέποντας έτσι την είσοδο της βιταμίνης E στο εντεροκύτταρο. Η σύγχρονη πέψη και απορρόφηση των λιπιδίων της δίαιτας αυξάνει και την απορρόφηση της βιταμίνης E. Κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι για την απορρόφηση της βιταμίνης E είναι πιθανόν να απαιτείται ένας ειδικός παράγοντας μη-σχετιζόμενος με την απορρόφηση των λιπιδίων. Η απορρόφηση της βιταμίνης E κυμαίνεται από 20-50% (πιθανόν να φθάνει και το 80%). Γενικά, καθώς αυξάνει η πρόσληψη βιταμίνης E, ελαττώνεται η απορρόφηση της (έχει βρεθεί ότι κατά τη χορήγηση δόσεων της τάξεως των 200 mg, η απορρόφηση της βιταμίνης είναι περίπου 10%).

Η βιταμίνη E που φέρεται στο εντερικό κύτταρο, ενσωματώνεται σε χυλομικρά και μεταφέρεται μέσω της λέμφου στην κυκλοφορία. Από τα χυλομικρά η βιταμίνη E μπορεί να μεταφερθεί σε άλλες λιποπρωτεΐνες του πλάσματος (HDL, LDL) και τα ερυθροκύτταρα. Για τη μεταφορά της βιταμίνης E στις VLDL είναι πιθανόν να απαιτείται μια ειδική πρωτεΐνη μεταφοράς βιταμίνης E που συντίθεται στο ήπαρ. Η τοκοφερόλη που φθάνει στα ερυθροκύτταρα εγκαθίσταται κυρίως στην κυτταρική μεμβράνη (έχουν βρεθεί μεμβρανικές πρωτεΐνες δέσμευσης της τοκοφερόλης). Η βιταμίνη E του πλάσματος σχετίζεται άμεσα με το ολικό ποσό λιπιδίων του πλάσματος.

Η διάθεση της βιταμίνης E στους διάφορους ιστούς γίνεται κυρίως από τις LDL. Επιπλέον είναι πιθανόν η βιταμίνη E να παίζει κάποιο προστατευτικό ρόλο έναντι της οξείδωσης των LDL. Η πρόσληψη βιταμίνης E από τα κύτταρα μπορεί να γίνει είτε με μεσολάβηση του υποδοχέα των LDL, είτε μέσω της υδρόλυσης των VLDL και των χυλομικρών από την λιποπρωτεϊνική λιπάση, είτε πιθανόν με κάποιον άλλο μηχανισμό.

Για τη μεταφορά της μέσα στο κυττόπλασμα (αλλά και σε άλλα μέρη του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένου κατά πάσα πιθανότητα και του πυρήνα) η βιταμίνη E συνδέεται με ειδικές πρωτεΐνες (TBP, tocopherol binding proteins). Η βιταμίνη E

βρίσκεται κυρίως στις κυτταρικές μεμβράνες (πλασματική, μιτοχονδριακή, μικροσωμική). Πιστεύεται ότι στις μεμβράνες αυτές τοποθετείται έτσι ώστε ο χρωμανικός δακτύλιος να εκτίθεται προς την επιφάνεια της μεμβράνης (κοντά στις φωσφορικές ομάδες του φωσφολιπιδίου) ενώ η υδρόφοβη αλυσίδα κατανέμεται στην περιοχή των υδρογονανθρακικών αλυσίδων του φωσφολιπιδίου.

Το μεγαλύτερο ποσοστό βιταμίνης E βρίσκεται στο λιπώδη ιστό. Μικρότερα ποσά υπάρχουν στο ήπαρ, την καρδιά, τους μυς, τον εγκέφαλο, τα επινεφρίδια. Η συγκέντρωση βιταμίνης E στο λιπώδη ιστό αυξάνει γραμμικά με την πρόσληψη βιταμίνης E, ενώ στους άλλους ιστούς η συγκέντρωσή της είναι σταθερή (ή αυξάνει με αργούς ρυθμούς). Σε περιόδους χαμηλής διαιτητικής πρόσληψης η παροχή βιταμίνης E από τους χώρους αποθήκευσης γίνεται αργά από το λιπώδη ιστό (δηλ. μάλλον δεν είναι άμεσα διαθέσιμη) και γρήγορα από το ήπαρ και το πλάσμα. Από την καρδιά και τους μυς κινητοποιείται με ενδιάμεσους ρυθμούς.

Καταβολισμός & απέκκριση

Η μεταβολική τύχη της βιταμίνης E στους ανθρώπους δεν είναι πλήρως κατανοητή. Κύρια οδός απέκκρισης της βιταμίνης E είναι μέσω των κοπράνων. Με τα κόπρανα απεκκρίνεται η βιταμίνη E που δεν απορροφήθηκε, η βιταμίνη που εκκρίθηκε από τα εντεροκύτταρα πίσω στον εντερικό αυλό και αυτή που προέρχεται από έκκριση στη χολή. Η βιταμίνη E που απεκκρίνεται στη χολή βρίσκεται υπό τη μορφή ενός μεταβολίτη συζευγμένου με γλυκουρονικό οξύ. Από τα ούρα εκκρίνονται 2 υδατοδιαλυτοί μεταβολίτες (α-τοκοφερονικό οξύ και α-τοκοφερονολακτόνη) οι οποίοι παρασκευάζονται με οξείδωση της πλευρικής αλυσίδας της α-τοκοφερόλης και σύζευξη με γλυκουρονικό οξύ. Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι μεταβολίτες αυτοί αποτελούν μόλις το 1 % της πρόσληψης βιταμίνης E. Όταν η διαιτητική πρόσληψη είναι μεγάλη, η απέκκριση μέσω των ούρων αυξάνει. Πιθανόν επίσης το δέρμα να δρα ως οδός απέκκρισης (ή έκκρισης) α-τοκοφερόλης.

Λειτουργίες & μηχανισμοί δράσης

Ο κύριος ρόλος της βιταμίνης E στον οργανισμό είναι ο αντιοξειδωτικός της ρόλος. Η βιταμίνη E συμβάλλει στην προστασία των κυτταρικών μεμβρανών από την οξείδωση καθώς εμποδίζει την οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων που περιλαμβάνονται στα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών. Μέσα στον οργανισμό δημιουργούνται συχνά, από διάφορες αιτίες, ελεύθερες ρίζες. Μια πολύ

δραστική ελεύθερη ρίζα είναι η ρίζα υδροξυλίου (OH[•]) η οποία, όντας δραστικότητα, λαμβάνει γρήγορα ηλεκτρόνια από το «περιβάλλον» της, από τα γειτονικά οργανικά μόρια, υπό το σχηματισμό μιας νέας ελεύθερης ρίζας. Εάν το οργανικό μόριο είναι ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ (τμήμα των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης) προκαλείται βλάβη στη μεμβράνη.

Άλλοι ρόλοι της βιταμίνης E είναι οι εξής:

- Οι τοκοτριενόλες επιδρούν στο μεταβολισμό της χοληστερόλης.
- Οι τοκοτριενόλες συμβάλλουν στην καταστολή της ανάπτυξης όγκων και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (χωρίς να έχουν συσχετιστεί με αντικαρκινική δράση).

Διαιτητικές Προσλήψεις Αναφοράς

Οι Διαιτητικές Προσλήψεις Αναφοράς που εκδόθηκαν το 200 ανεβάζουν τις απαιτήσεις για τη βιταμίνη E στα 15 mg, τόσο για τους άνδρες όσο και για τις γυναίκες. Η τυπική διαίτα στις ΗΠΑ, που παρέχει 2000 έως 3000 kcal προσδίδει 7 έως 11 mg ισοδυνάμων α-τοκοφερόλης.

2.3.4 Βιταμίνη K

Υπάρχει μια σειρά ενώσεων που διαθέτουν δραστικότητα βιταμίνης K. Όλες αυτές οι ενώσεις διαθέτουν ένα δακτύλιο 2-μεθυλο 1, 4-ναφθοκινόνης.

Από τα φυτά απομονώνονται ενώσεις που κατατάσσονται στην κατηγορία K₁, με κυριότερο εκπρόσωπο τη φυλλοκινόνη. Οι βιταμίνες της σειράς K₂ συντίθενται από βακτήρια και ανήκουν στην οικογένεια των μενακινονών (K₂ ή MK). Οι περισσότερες μενακινόνες περιλαμβάνουν 6-10 ισοπrenoειδείς ομάδες οι οποίες συνδέονται στον C₃ του δακτυλίου της υποκατεστημένης ναφθοκινόνης. Μια τρίτη κατηγορία βιταμινών K αποτελεί η μεναδιόνη (K₃), η οποία δεν απαντάται στη φύση αλλά αποτελεί τη συνθετική μορφή βιταμίνης K και η οποία πρέπει να αλκυλωθεί προκειμένου να αποκτήσει βιταμινική δράση.

Πηγές

Η βιταμίνη K της τροφής παρέχεται υπό τη μορφή φυλλοκινόνης από τα φυτικά τρόφιμα και ως μίγμα μενακινονών από τα ζωικά. Κύρια πηγή βιταμίνης K

από την τροφή είναι τα φυτικά τρόφιμα, όπως το σπανάκι, το μπρόκολο, το λάχανο. Η βιταμίνη K φαίνεται ότι σχετίζεται με τα επίπεδα χλωροφύλλης. Καλές πηγές βιταμίνης K₁ αποτελούν επίσης κάποια φυτικά έλαια. Το ελαιόλαδο περιέχει 55 mg φυλλοκινόνης / 100 g, το ηλιέλαιο και το σησαμέλαιο 6-15 mg φυλλοκινόνης / 100 g, το αραβοσιτέλαιο < 3 mg φυλλοκινόνης / 100 g. Σε σχέση με το ήπαρ άλλων ζώων, το ήπαρ βοοειδών παρέχει υψηλά ποσά βιταμίνης K.

Πέψη, απορρόφηση και μεταφορά

Οι μενακινόνες (της τροφής και αυτές που συντίθενται από αναερόβια βακτήρια στο παχύ έντερο) και η μεναδιόνη απορροφώνται με παθητική μεταφορά. Η ικανότητα απορρόφησης της βακτηριακά παραγόμενης βιταμίνης διαφέρει από άνθρωπο σε άνθρωπο. Η απορρόφηση της βιταμίνης K αυξάνεται παρουσία χολικών αλάτων και παγκρεατικού υγρού. Η απορρόφηση της διαιτητικής βιταμίνης K κυμαίνεται από 40-80%, ενώ αυτοί που παρουσιάζουν προβλήματα απορρόφησης του λίπους μπορεί να απορροφούν το περίπου 20-30%.

Μέσα στο εντερικό κύτταρο, η βιταμίνη K ενσωματώνεται σε χυλομικρά τα οποία εισέρχονται στο λεμφικό σύστημα και στη συνέχεια στην κυκλοφορία του αίματος. Τα υπολείμματα των χυλομικρών παραδίδουν τη βιταμίνη K στο ήπαρ, όπου όμως δεν παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα. Στο ήπαρ γίνεται η αλκυλίωση της μεναδιόνης η οποία στη συνέχεια, μαζί με τις φυλλοκινόνες και τις μενακινόνες, ενσωματώνονται στις VLDL. Εξωηπατικοί ιστοί που αποθηκεύουν βιταμίνη K είναι τα επινεφρίδια, οι πνεύμονες, τα οστά, οι νεφροί. Η βιταμίνη K που περιλαμβάνεται στις αποθήκες του οργανισμού κυμαίνεται μεταξύ 50-100 μg (ποσοστό πολύ μικρό για λιποδιαλυτή βιταμίνη).

Μεταβολισμός και απέκκριση

Η φυλλοκινόνη αποικοδομείται βραδύτερα από τις μενακινόνες. Η πορεία περιλαμβάνει το σχηματισμό του αντιστοίχου 2,3-εποξειδίου (βλ. κύκλο βιταμίνης K) το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε 3-υδροξυκινόνη και ακολούθως παράγονται διάφοροι άλλοι μεταβολίτες. Οι μεταβολίτες αυτοί της φυλλοκινόνης απεκκρίνονται κυρίως υπό τη μορφή γλυκουρονιδίων από τα κόπρανα και τα ούρα. Ο μεταβολισμός και η απέκκριση των μενακινονών δεν είναι γνωστός σε βάθος. Η μεναδιόνη μεταβολίζεται σε μεναδιόλη, η οποία σχηματίζει φωσφορικούς, σουλφονικούς και

γλυκουρονικούς εστέρες, οι οποίοι εκκρίνονται από τη χολή και τελικά απεκκρίνονται με τα ούρα και τα κόπρανα.

Λειτουργίες & μηχανισμοί δράσης

Η βιταμίνη K επιδρά:

- Στην πήξη του αίματος καθώς είναι απαραίτητη για την καρβοξυλίωση μιας σειράς γλουταμινικών οξέων υπό το σχηματισμό γ-καρβοξυγλουταμινικού (Gla) , στους 4 από τους 13 πρωτεϊνικούς παράγοντες που απαιτούνται για την πήξη του αίματος. Οι 4 παράγοντες που απαιτούν τη βιταμίνη K για να δράσουν είναι: η προθρομβίνη (II), και οι παράγοντες VII, IX, X.
- Στις πρωτεΐνες των οστών, BGP (bone Gla protein, οστεοκαλσίνη) και MGP (matrix Gla protein) και στην πρωτεΐνη KGP (kidney Gla protein) που έχει βρεθεί στους νεφρούς.

Διαιτητικές Προσλήψεις Αναφοράς

Οι Συνιστώμενες Διαιτητικές Προσλήψεις του 1989 περιείχαν για πρώτη φορά συστάσεις για την πρόσληψη της βιταμίνης K με τη μορφή καθορισμένων τιμών. Με βάση τις συστάσεις αυτές, οι απαιτήσεις για έναν ενήλικα άνδρα 79 κιλών είχαν καθοριστεί στα 80 μg/ημέρα και για μια ενήλικη γυναίκα 63 κιλών στα 65 μg/ημέρα. Η βακτηριακή σύνθεση των μενακινονών φαίνεται να είναι ανεπαρκής για την κάλυψη των απαιτήσεων του οργανισμού σε βιταμίνη K όταν η διαιτητική πρόσληψη είναι μικρότερη των 50 μg/ημέρα. Με βάση σειρά διαιτητικών μελετών πρόσληψης βιταμίνης K έχει βρεθεί ότι για να διατηρηθεί ο φυσιολογικός ρυθμός πήξης του αίματος απαιτείται περίπου 1 μg/kg βάρους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ

3.1 Υδατοδιαλυτές βιταμίνες

3.1.1 Θειαμίνη

Εκχύλιση θειαμίνης

Η βιταμίνη B1 στους ιστούς συναντάται ως ελεύθερη θειαμίνη, μονοφωσφορική θειαμίνη, διφωσφορική θειαμίνη, τριφωσφορική θειαμίνη καθώς και δεσμευμένη σε πρωτεΐνες. Ο πιο κοινός τρόπος προσδιορισμού της βιταμίνης B1 στα τρόφιμα είναι η απελευθέρωση και η εκχύλιση της θειαμίνης και των φωσφορικών της εστέρων με όξινη υδρόλυση ακολουθούμενη από ενζυμική αποφωσφορυλίωση των εστέρων της και στη συνέχεια προσδιορισμό της ολικής θειαμίνης. Επομένως, το πρώτο κρίσιμο στάδιο στον προσδιορισμό της θειαμίνης είναι η αποτελεσματική εκχύλιση της θειαμίνης και των φωσφορικών της εστέρων από τα τρόφιμα και η επακόλουθη αποφωσφορυλίωση των εστέρων της. Στον παρακάτω πίνακα (3.1) φαίνονται επιλεγμένες διαδικασίες εκχύλισης για τη θειαμίνη σε διάφορα τρόφιμα.

Πίνακας 3.1. Επιλεγμένες διαδικασίες εκχύλισης θειαμίνης από διάφορα τρόφιμα.

Δείγμα	Διαδικασία εκχύλισης	Πηγή
Όλα τα τρόφιμα	121°C για 30 min με 0,1M HCl επώαση με Τακαδιαστάση στους 37°C για μια νύχτα	Bell (1984)
Όλα τα τρόφιμα	95-100°C ή 121°C για 30 min διαστατική ή αποφωσφορυλιωτική ενζυμική διαδικασία στους 45-50°C για 3 ώρες, pH 4-4,5	AOAC (1990c)
Ενισχυμένα δημητριακά πρωινού	α)Reflux με 1:1 MeOH-0,2 M HCl για 15 min β)120°C για 30 min με 0,13 M H ₂ SO ₄ επώαση με Τακαδιαστάση για 45 min, ppt πρωτεΐνη με TCA γ) 95°C για 60 min με 0,13 M H ₂ SO ₄ επώαση με παγκρεατίνη, λιπάση και Τακαδιαστάση στους 60°C για 45 min δ)120°C για 15 min με 0,1 M H ₂ SO ₄ επώαση με Κλαραδιαστάση στους	Nicolson et al. (1984)

	45°C για 2 ώρες ε) 121°C για 1 ώρα με 0,03 M H₂SO₄ επώαση με Τακαδιαστάση στους 45°C για 3 ώρες στ) 100°C για 30 min με 0,1M HCl επώαση με α-αμυλάση στους 45°C για 2 ώρες ζ) 90°C για 45 min με 0,1M HCl επώαση με α-αμυλάση στους 65°C για 45 min	
Ολόκληρες δίαιτες	Ομογενοποιημένα δείγματα+0,1 M H ₂ SO ₄ στους 45°C για 1 ώρα, επώαση με Κλαραδιαστάση για 2 ώρες στους 45°C	Botticher & Botticher (1986)
Κοτόπουλο	121°C για 20 min με 0,1M HCl επώαση με Τακαδιαστάση και παπαΐνη στους 45°C, pH 4,5 για 3 ώρες	Bertelsen et al. (1988)
Όσπρια, γάλα σε σκόνη, χοιρινό	121°C για 15 min με 0,1M HCl επώαση με Τακαδιαστάση στους 48°C, pH 4,45 για 3 ώρες	Vidal-Valverde & Reche (1990b)
Διάφορα τρόφιμα	100°C για 30 min με 0,1M HCl, επώαση με 500 mg Τακαδιαστάση και 50 mg β-αμυλάση, σε pH 4,5 στους 37°C για 18 ώρες	Arella et al. (1996)
Διάφορα τρόφιμα	α) 121°C για 30 min με 0,1M HCl, επώαση με 500mg Τακαδιαστάση ή Κλαραδιαστάση, σε pH 4,5 στους 37°C για 18 ώρες β) Ίδιο πρωτόκολλο με το α αλλά χωρίς προσθήκη ενζύμου γ) Δείγμα + CH₃COOH (pH 4,5), επώαση με 500mg Τακαδιαστάση ή Κλαραδιαστάση στους 37°C για 18 ώρες δ) Ίδιο πρωτόκολλο με το γ αλλά χωρίς προσθήκη ενζύμου ε) Ίδιο πρωτόκολλο με το γ αλλά επώαση με μείγμα παπαΐνης, 1% γλουταθειόνης, όξινης φωσφατάσης και α-αμυλάσης στ) Ίδιο πρωτόκολλο με το γ αλλά επώαση με μείγμα παπαΐνης, 1% γλουταθειόνης και α-αμυλάσης	Ndaw et al. (2000)
Χουρμάδες	121°C για 30 min με 0,1M H ₂ SO ₄ , επώαση με 0,1g Τακαδιαστάση, σε pH 4,5 στους 37°C για μια νύχτα	Chaira et al. (2006)

Μερικές από τις διαδικασίες εκχύλισης είναι πιο αυστηρές από άλλες. Το θειικό οξύ έχει χρησιμοποιηθεί στο στάδιο της όξινης υδρόλυσης σε αρκετές περιπτώσεις αλλά ο McRoberts (1960) αναφέρει ότι αυτό μπορεί να επηρεάσει το περιεχόμενο σε θειαμίνη και οι Fellman et al. (1982) αναφέρουν ότι το υδροχλωρικό οξύ είναι προτιμότερο για το στάδιο αυτό.

Μετά την απελευθέρωση της θειαμίνης και των εστέρων της από το υπόστρωμα μέσω της όξινης υδρόλυσης, προτείνεται η ενζυμική αποφωσφορυλίωση χρησιμοποιώντας εμπορικά ένζυμα, όπως η Τακαδιαστάση και η Κλαραδιαστάση, τα οποία αποτελούν μίγματα από αμυλάσες αλλά περιέχουν φωσφατάσες ως πρόσθετα.

Το α πρωτόκολλο που προτάθηκε από τους Nicolson et al. (1984) μπορεί να είναι κατάλληλο για εκχύλιση ελεύθερης θειαμίνης από ενισχυμένα προϊόντα αλλά δεν μπορεί να δώσει στοιχεία για το συνολικό περιεχόμενο σε θειαμίνη.

Τα πρωτόκολλα στ και ζ χρησιμοποίησαν α-αμυλάση για την ενζυμική υδρόλυση. Η α-αμυλάση είναι καθαρή και επομένως η δραστηριότητά της ως φωσφατάση είναι χαμηλή.

Οι Bell & Christie (1973) ακολούθησαν επώαση για μια νύχτα με Τακαδιαστάση. Όμως οι πηγές της Τακαδιαστάσης, της Κλαραδιαστάσης και άλλων παρόμοιων μειγμάτων ποικίλουν όσον αφορά την δραστηριότητά τους ως φωσφατάση. Ο AOAC (1990c) προτείνει ότι τα ενζυμικά παρασκευάσματα πρέπει να ελέγχονται για την ικανότητά τους να μετατρέπουν την μονο-, δι-, και τρι-φωσφορική θειαμίνη σε θειαμίνη πριν από την χρήση τους. Για να είναι κατάλληλο το ενζυμικό παρασκεύασμα για χρήση θα πρέπει να επιτευχθεί μια μετατροπή κατά 85% και άνω.

Προσδιορισμός θειαμίνης

Ο προσδιορισμός της θειαμίνης επιτυγχάνεται παραδοσιακά με φθορισμομετρία έπειτα από οξείδωσή της προς θειόχρωμα, χρησιμοποιώντας μικροβιολογική μέθοδο (microbiological assay-MBA) και πιο πρόσφατα Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC).

Ο φθορισμομετρικός προσδιορισμός της θειαμίνης περιλαμβάνει εκχύλιση της θειαμίνης όπως περιγράφεται παραπάνω, διαχωρισμό της θειαμίνης από προσμίξεις με ιοντο-ανταλλακτική στήλη, οξείδωση της βιταμίνης προς θειόχρωμα και μέτρηση φθορισμού απέναντι σε πρότυπα θειαμίνης μετά από την οξειδωτική διαδικασία. Όμως, διάφορες άλλες ενώσεις μπορούν να συνεκλουστούν με τη θειαμίνη, να παρέμβουν στη διαδικασία της οξείδωσης και να δώσουν φθορισμό.

Επομένως, δεν είναι η μέθοδος επιλογής για γενική εφαρμογή σε τρόφιμα. Παρόλη την κριτική που έχει δεχθεί η μέθοδος αυτή, ακόμα προτείνεται από τον AOAC (1990c) για τον προσδιορισμό της θειαμίνης σε τρόφιμα.

Η μικροβιολογική μέθοδος προσφέρει το πλεονέκτημα της ευαισθησίας και της ευρύτερης εφαρμογής σε πολλά τρόφιμα καθώς δεν φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από άλλες ενώσεις και προσμίξεις του υποστρώματος.

Αναφορικά με την Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC), η HPLC ανεστραμμένης φάσης είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη για το διαχωρισμό της θειαμίνης από άλλα συστατικά των τροφίμων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ανίχνευση UV ή φθορισμού, με τη δεύτερη να είναι προτιμότερη. Η οξείδωση της θειαμίνης στο φθορίζον παράγωγό της θειόχρωμα με επακόλουθη ανίχνευση φθορισμού αποτελεί την μόνη διαδικασία HPLC που μπορεί να εφαρμοστεί σε μια ευρεία γκάμα δειγμάτων τροφίμων (Lumley, 1993)

Οι Vidal-Valverde & Reche (1990b) περιγράφουν μια διαδικασία HPLC η οποία περιλαμβάνει ένα στάδιο καθαρισμού της θειαμίνης από άλλες προσμίξεις έτσι ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ανίχνευση του UV. Μετά την εκχύλιση της θειαμίνης και το φιλτράρισμα, ένα μέρος του εκχυλίσματος περνά μέσα από μια στήλη ρητίνης Amberlite CG-50, η στήλη πλένεται με νερό και η θειαμίνη εκλούεται με διάλυμα HCl.

Μετά την οξείδωση, μερικοί ερευνητές εκχυλίζουν το θειόχρωμα σε βουταν-2-όλη και ακολουθεί ανάλυση HPLC. Οι Hasselmann et al. (1989) πέρασαν το οξειδωμένο μείγμα μέσα από μια στήλη C18 Sep Pak η οποία εκπλύθηκε με 0,05M οξικό οξύ και το θειόχρωμα εκλούστηκε με μεθανόλη-νερό (60:40 v/v) πριν τη χρωματογραφία.

3.1.2. Ριβοφλαβίνη

Εκχύλιση ριβοφλαβίνης

Η ριβοφλαβίνη συναντάται στα τρόφιμα είτε ως ελεύθερη ριβοφλαβίνη είτε ως φλαβινο-μονονουκλεοτίδιο (FMN) και φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτιδιο (FAD). Η εκχύλιση αυτών των συνδεδεμένων με πρωτεΐνες τύπων της βιταμίνης επιτυγχάνεται με όξινη υδρόλυση με έναν διαλυτό οξύ, όπως 0,1M HCl. Στο στάδιο αυτό επιτυγχάνεται και η υδρόλυση του μεγαλύτερου ποσοστού του FAD σε FMN. Στη

συνέχεια, απαιτείται η χρήση ενζυμικών παρασκευασμάτων, όπως Τακαδιαστάση και Κλαράση για περαιτέρω υδρόλυση.

Οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση της ριβοφλαβίνης από τα τρόφιμα είναι παρόμοιες με αυτές που χρησιμοποιούνται για τη θειαμίνη. Έτσι και οι δύο αυτές βιταμίνες μπορούν να εκχυλιστούν με μια κοινή μέθοδο. Στον παρακάτω πίνακα (3.2) φαίνονται διάφορες μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση της ριβοφλαβίνης από διάφορα τρόφιμα.

Πίνακας 3.2. Επιλεγμένες διαδικασίες εκχύλισης ριβοφλαβίνης από διάφορα τρόφιμα.

Δείγμα	Διαδικασία εκχύλισης	Πηγή
Διάφορα τρόφιμα	121°C για 30 min με 0,1M HCl, επώαση με (10% w/v) Τακαδιαστάση στους 40°C για 2-4 ώρες	Lumley & Wiggins (1981)
Φρούτα & λαχανικά	99°C για 30 min με 0,1M HCl, επώαση με (5% w/v) αμυλάση στους 38°C για μια νύχτα	Watada & Tran (1985)
Διάφορα τρόφιμα	121°C για 30 min με 0,1M HCl, επώαση με Κλαράση στους 45-50°C για 3 ώρες	Wills et al. (1985)
Πατάτες	Reflux για 30 min με 0,1M HCl, επώαση με Τακαδιαστάση σε pH 4,6 στους 50°C για 2 ώρες	Stancher & Zonta (1986)
Διαιτητικά τρόφιμα	100°C για 30 min με 0,1M HCl, επώαση με 500 mg Τακαδιαστάση και 50 mg β-αμυλάση, σε pH 4,5 στους 37°C για μια νύχτα	Hasselmann et al. (1989)
Όσπρια, γάλα	121°C για 15 min με 0,1M HCl, επώαση με Τακαδιαστάση (6%) σε pH 4-4,5 στους 48°C για 3 ώρες. Sep-Pak εκχύλιση	Vidal-Valverde & Reche (1990a)
Διάφορα τρόφιμα	121°C για 20 min με 0,2 M H ₂ SO ₄ , επώαση με Τακαδιαστάση σε pH 4,5 στους 45°C για μια νύχτα	Ollilainen et al. (1990)
Διάφορα τρόφιμα	100°C για 30 min με 0,1M HCl, επώαση με 500 mg Τακαδιαστάση και 50 mg β-αμυλάση, σε pH 4,5 στους 37°C για 18 ώρες	Arella et al. (1996)
Διάφορα τρόφιμα	α) 121°C για 30 min με 0,1M HCl, επώαση με 500mg Τακαδιαστάση ή Κλαραδιαστάση, σε pH 4,5 στους 37°C για 18 ώρες β) Ίδιο πρωτόκολλο με το α αλλά χωρίς προσθήκη ενζύμου γ) Δείγμα + CH ₃ COOH (pH 4,5), επώαση με 500mg Τακαδιαστάση ή Κλαραδιαστάση στους 37°C για 18 ώρες δ) Ίδιο πρωτόκολλο με το γ αλλά χωρίς	Ndaw et al. (2000)

	προσθήκη ενζύμου ε) Ίδιο πρωτόκολλο με το γ αλλά επώαση με μείγμα παπαΐνης, 1% γλουταθειόνης, όξινης φωσφατάσης και α-αμυλάσης στ) Ίδιο πρωτόκολλο με το γ αλλά επώαση με μείγμα παπαΐνης, 1% γλουταθειόνης και α-αμυλάσης	
Χουρμάδες	121°C για 30 min με 0,1M H ₂ SO ₄ , επώαση με 0,1g Τακαδιαστάση, σε pH 4,5 στους 37°C για μια νύχτα	Chaira et al. (2006)

Προσδιορισμός ριβοφλαβίνης

Η Χρωματογραφία HPLC ανεστραμμένης φάσης χρησιμοποιείται σχεδόν πάντα για τον διαχωρισμό της ριβοφλαβίνης από άλλα συστατικά των τροφίμων και η ανίχνευση φθορισμού αποτελεί την πιο ευρέως αποδεκτή μέθοδο ανίχνευσης.

Οι Stancher & Zonta (1986) χρησιμοποίησαν ανίχνευση του UV για τον προσδιορισμό της ριβοφλαβίνης σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι Vidal-Valverde & Reche (1990a) επίσης αναφέρουν τη χρήση της ανίχνευσης UV για τον προσδιορισμό της ριβοφλαβίνης σε αρακά, φασόλια και σκόνη γάλακτος.

3.1.3. Νιασίνη

Εκχύλιση νιασίνης

Η νιασίνη περιλαμβάνει το νικοτινικό οξύ και το νικοτιναμίδιο. Το νικοτινικό οξύ μετατρέπεται στην φυσιολογικά δραστική μορφή του, το νικοτιναμίδιο, το οποίο λειτουργεί ως συστατικό των συνενζύμων νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (NAD) και νικοτιναμιδο-αδενινο-φωσφορικο-δινουκλεοτίδιο (NADP). Το νικοτινικό οξύ, το NAD και το NADP υπάρχουν σχεδόν σε όλα τα τρόφιμα και αποτελούν πηγές της βιταμίνης για τον ανθρώπινο οργανισμό. Ωστόσο, η βιταμίνη υπάρχει στα τρόφιμα και με τη μορφή εστέρων της σε πολυσακχαρίτες, πεπτίδια και γλυκοπεπτίδια, τα οποία δεν μεταβολίζονται από τον άνθρωπο. Επομένως, υπάρχουν δυο μέθοδοι προσδιορισμού της νιασίνης ανάλογα με το αν θέλουμε να προσδιορίσουμε την νιασίνη που είναι βιοδιαθέσιμη ή την συνολική νιασίνη που εμπεριέχεται στο τρόφιμο. Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιείται όξινη υδρόλυση ενώ στη δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιείται αλκαλική υδρόλυση. Στον παρακάτω πίνακα (3.3) φαίνονται διάφορες μέθοδοι προσδιορισμού της νιασίνης που έχουν χρησιμοποιηθεί.

Πίνακας 3.3. Επιλεγμένες διαδικασίες εκχύλισης νιασίνης από διάφορα τρόφιμα.

Δείγμα	Διαδικασία εκχύλισης	Πηγή
Όλα τα τρόφιμα	1M HCl στους 121°C για 15 min, θ. δωματίου, pH 4,5, φιλτράρισμα	Bell (1984)
Δημητριακά	Δείγμα + Ca(OH) ₂ θέρμανση για 30 min στους 100°C, αυτόκαυστο για 30 min στους 121°C, ψύξη σε θ. δωματίου, φυγοκέντρωση	Tyler & Shrago (1980)
Πατάτες	0,5 M H ₂ SO ₄ στους 121°C για 30 min, εξουδετέρωση με CaCO ₃ , φυγοκέντρωση, εξάτμιση μέχρι ξηρού	Finglas & Faulks (1984b)
Διάφορα τρόφιμα	1) 0,1 M H ₂ SO ₄ στους 121°C για 1 ώρα, επώαση με διαστάση για 3 ώρες στους 45°C 2) Ca(OH) ₂ θέρμανση για 30 min στους 100°C, αυτόκαυστο για 30 min στους 121°C, ψύξη σε θ. δωματίου, φυγοκέντρωση	van Niekerk et al. (1984)
Όσπρια & κρέας	0,1M HCl (30 ml) + 6M HCl (1ml) στους 121°C για 15 min, pH 4-4,5, επώαση με 6% Τακαδιαστάση στους 48°C για 3 ώρες	Vidal-Valverde & Reche (1991)
Διάφορα τρόφιμα	Δείγμα + 40% NaOH σε ατμόλουτρο για 30 min. Σε θ. δωματίου εξουδετέρωση με HCl + MeOH, φιλτράρισμα, εξάτμιση μέχρι ξηρού	Hirayama & Maruyama (1991)
Διάφορα τρόφιμα	0,5 M H ₂ SO ₄ αυτόκαυστο στους 121°C για 30 min	AOAC (1990e)
Διάφορα τρόφιμα	0,1M HCl, υδρόλουτρο στους 100°C για 1 ώρα + 5M NaOH στους 120°C για 1 ώρα, pH 4,5, φιλτράρισμα	Lahély et al. (1999)
Διάφορα τρόφιμα	1) Δείγμα + phosphate buffer pH 6,8 + NAD γλυκοϋδρολάση, επώαση στους 37°C για 18 ώρες 2) Δείγμα + CH ₃ COONa pH 4,5 + NAD γλυκοϋδρολάση, επώαση στους 37°C για 18 ώρες 3) Δείγμα + CH ₃ COONa pH 4,5 + NAD γλυκοϋδρολάση + παπαΐνη + γλουταθειόνη 1% + α-αμυλάση, επώαση στους 37°C για 18 ώρες 4) Δείγμα + 0,1M HCl, υδρόλουτρο στους 100°C για 1 ώρα, pH 4,5, φιλτράρισμα	Ndaw et al. (2002)

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, οι περισσότερες διαδικασίες όξινης υδρόλυσης περιλαμβάνουν τη χρήση 1M HCl ή 0,5 M H₂SO₄ με αυτόκαυστο στους

121°C για 15-30 min. Αυτή η διαδικασία οδηγεί στην απελευθέρωση της διατροφικά διαθέσιμης νιασίνης ως νικοτινικό οξύ.

Οι Lahely et al. (1999) χρησιμοποίησαν και όξινη και αλκαλική υδρόλυση με σκοπό τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας νιασίνης που περιέχεται στα τρόφιμα είτε είναι διαθέσιμη στον άνθρωπο είτε όχι.

Οι Ndaw et al. (2002) χρησιμοποίησαν τέσσερις διαφορετικές μεθόδους για την εκχύλιση της νιασίνης από διάφορα τρόφιμα και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ενζυμική υδρόλυση δεν επέφερε επιπλέον μετατροπή νικοτιναμιδίου σε νικοτινικό οξύ. Αναφορικά με τη χρήση τριών ενζύμων ταυτόχρονα, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι απλά η χρησιμοποίηση μόνο της NAD γλυκοϋδρολάσης ήταν επαρκής για τον προσδιορισμό της νιασίνης είτε σε τρόφιμα πλούσια σε άμυλο (ρύζι, αλεύρι σίτου) είτε σε τρόφιμα πλούσια σε πρωτεΐνες (φιστίκια, φιλέτο μοσχάρι, φύτρο σιταριού).

3.1.4 Βιταμίνη B6

Εκχύλιση βιταμίνης B6

Η βιταμίνη B6 βρίσκεται στους βιολογικούς ιστούς σε έξι ελεύθερες μορφές: πυριδοξαμίνη, πυριδοξίνη, πυριδοξάλη, φωσφορική πυριδοξαμίνη, φωσφορική πυριδοξίνη και φωσφορική πυριδοξάλη. Οι σχετικές ποσότητες αυτών των μορφών ποικίλουν από τρόφιμο σε τρόφιμο. Για παράδειγμα, η πυριδοξίνη κυριαρχεί στα δημητριακά, τα λαχανικά και τα φρούτα, ενώ στο κρέας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα υπάρχουν κυρίως η πυριδοξαμίνη, η πυριδοξάλη και οι φωσφορικές τους μορφές. Επιπλέον, οι διάφορες μορφές της βιταμίνης μπορούν να είναι συνδεδεμένες με πρωτεΐνες σε κάποια τρόφιμα και μπορεί να είναι ή όχι διαθέσιμες στον άνθρωπο. Η βιταμίνη B6 παραδοσιακά εκχυλίζεται από τα τρόφιμα χρησιμοποιώντας HCl ή H₂SO₄, αλλά η ισχύς του οξέος, ο χρόνος υδρόλυσης και η θερμοκρασία ποικίλουν. Στον παρακάτω πίνακα (3.4) φαίνονται διάφορες μέθοδοι προσδιορισμού της βιταμίνης B6 που έχουν χρησιμοποιηθεί.

Πίνακας 3.4. Επιλεγμένες διαδικασίες εκχύλισης βιταμίνης B6 από διάφορα τρόφιμα.

Δείγμα	Διαδικασία εκχύλισης	Πηγή
Φυτικά τρόφιμα	0,44 M HCl για 2 ώρες στους 121°C	AOAC (1990f)
Ζωικά τρόφιμα	0,055 M HCl για 5 ώρες στους 121°C	AOAC (1990f)
Όλα τα τρόφιμα	0,22 M H ₂ SO ₄ για 5 ώρες στους 121°C	Bell (1984)
Πατάτες	0,44 M HCl για 2 ώρες	Addo & Augustin (1988)
Διάφορα τρόφιμα	Δείγμα + 0,05M CH ₃ COONa + 1M γλυοξυλικό οξύ + θειικός σίδηρος + όξινη φωσφατάση, επώαση στους 37°C για μια νύχτα, τμήμα δείγματος + 0,1M βοροϋδρίδιο του νατρίου + CH ₃ COOH, φιλτράρισμα	Bergaentzle et al. (1995)
Διάφορα τρόφιμα	α) Δείγμα + 0,1M HCl στους 100°C, pH 4,5 με 2,5M CH ₃ COONa + 1M γλυοξυλικό οξύ + θειικός σίδηρος (2%) + όξινη φωσφατάση, επώαση στους 37°C για 18 ώρες, τμήμα δείγματος + 0,1M βοροϋδρίδιο του νατρίου + 0,2M NaOH + CH ₃ COOH, φιλτράρισμα β) Δείγμα + 0,05M CH ₃ COOH (pH 4,5) + 1M γλυοξυλικό οξύ + θειικός σίδηρος (2%) + όξινη φωσφατάση, επώαση στους 37°C για 18 ώρες γ) Ίδιο πρωτόκολλο με το β αλλά επώαση με μείγμα παπαΐνης, 1% γλουταθειόνης, όξινης φωσφατάσης και α-αμυλάσης δ) Ίδιο πρωτόκολλο με το β αλλά χωρίς ένζυμα ε) Ίδιο πρωτόκολλο με το β αλλά επώαση με β-γλυκοζιδάση στ) Ίδιο πρωτόκολλο με το ε αλλά στη β-γλυκοζιδάση προστίθενται όξινη φωσφατάση και Τακαδιαστάση	Ndaw et al. (2000)
Διάφορα τρόφιμα	Δείγμα + 0,1M HCl στους 121°C για 5 λεπτά, pH 4,5 με 2M CH ₃ COONa ογκ. φιάλη των 100 ml και συμπλήρωση με H ₂ O μέχρι χαραγής, προσθήκη όξινης φωσφατάσης και β-γλυκοζιδάσης, επώαση για μια νύχτα στους 45°C	Kall (2003)

Η ανίχνευση UV δεν είναι επαρκώς ευαίσθητη ή εκλεκτική για την ανίχνευση των βιταμερών της βιταμίνης B6 στα τρόφιμα και γι' αυτό χρησιμοποιείται ανίχνευση φθορισμού.

3.1.5 Παντοθενικό οξύ

Εκχύλιση παντοθενικού οξέος

Το παντοθενικό οξύ συναντάται σε μια ευρεία ποικιλία φυτικών και ζωικών τροφίμων είτε στην ελεύθερη μορφή του είτε ως συστατικό του συνενζύμου A και της ακυλο-φέρουσας πρωτεΐνης (ACP). Επομένως, για να προσδιοριστεί η συνολική ποσότητα του παντοθενικού οξέος απαιτείται η απελευθέρωσή του από τις δεσμευμένες μορφές του. Εξαιτίας της αστάθειας του παντοθενικού οξέος στην όξινη ή την αλκαλική υδρόλυση, χρησιμοποιείται η ενζυμική υδρόλυση. Η εκχύλιση των δειγμάτων γίνεται συνήθως χρησιμοποιώντας Tris buffer σε συνθήκες αυτόκαυστου ακολουθούμενο από επώαση με αλκαλική φωσφατάση και ενζυμικό παρασκεύασμα από ήπαρ περιστεριού όλη τη νύχτα. Στον **πίνακα 3.5** φαίνονται διάφορες διαδικασίες εκχύλισης παντοθενικού οξέος από διάφορα τρόφιμα.

Πίνακας 3.5. Επιλεγμένες διαδικασίες εκχύλισης παντοθενικού οξέος από διάφορα τρόφιμα.

Δείγμα	Διαδικασία εκχύλισης	Πηγή
Εκχυλίσματα ιστών	Δείγμα+ fresh pigeon liver extract + intestinal phosphatase + 0.12 M Na ₂ CO ₃ , επώαση για 3 ώρες στους 37°C.	Novelli et al. (1949)
Διάφορα τρόφιμα	1) Δείγμα + 0,5 M acetate buffer (pH 4.5), επώαση για 2 ώρες στους 50°C (control) 2) Δείγμα + 0,5 M acetate buffer + αμυλάση, επώαση για 2 ώρες στους 50°C. 3) Δείγμα + 0,5 M acetate buffer + παπαΐνη + Τακαδιαστάση, επώαση στους 42°C όλο το βράδυ 4) Δείγμα + αλκαλική φωσφατάση + 0.2 M Tris buffer (pH 8) + 10% εκχύλισμα ήπατος περιστεριού, ομογενοποίηση, επώαση στους 37°C όλο το βράδυ	Gonthier et al. (1998)
Διάφορα τρόφιμα + Πλάσμα αίματος	Φιλτραρισμένο δείγμα ή πλάσμα αποστειρώνεται στους 120 °C για	Richlik (2000)

	15 min και ψύχεται στους 37°C. Προστίθενται δ/μα παντοθενίνης, αλκαλική φωσφατάση, NaHCO ₃ , Tris buffer, toluene και ένα υδατικό δ/μα calcium [15N,13C3]-(R)-pantothenate, επώαση για 8 h στους 37°C, ξέπλυμα με διχλωρομεθάνιο και οξίνιση με υδροχλωρικό οξύ, προσθήκη ammonium sulfate και εκχύλιση με ethyl acetate (Αέρια Χρωματογραφία)	
Διάφορα τρόφιμα	Δείγμα + 200 mM Tris buffer (pH8), φυγοκέντρωση για 10 min στις 11.500 στροφές, φιλτράρισμα (προσδιορισμός ελεύθερου παντοθενικού οξέος) Δείγμα + 50mM acetate buffer (PH 4,5) + πεψίνη, επώαση στους 50°C για 3 ώρες, pH 8 + αλκαλική φωσφατάση + παντοθενίνης, επώαση στους 20°C για 18 ώρες, φυγοκέντρωση (προσδιορισμός συνολικής ποσότητας παντοθενικού)	Pakin et al. (2004)

Προσδιορισμός παντοθενικού οξέος

Ο προσδιορισμός του παντοθενικού οξέος γίνεται κυρίως με μικροβιολογικές μεθόδους. Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται συνήθως για τον προσδιορισμό του είναι ο *Lactobacillus plantarum*.

3.1.6 Βιοτίνη

Εκχύλιση βιοτίνης

Η βιοτίνη συναντάται στα τρόφιμα κυρίως σε δεσμευμένη μορφή, όπως η βιοκυτίνη και τα ενζυμικά συμπλέγματα στα οποία η βιταμίνη είναι προσδεδεμένη με πρωτεΐνες και πεπτίδια. Η βιοτίνη πρέπει να απελευθερωθεί από τους τύπους αυτούς με υδρόλυση και συνήθως όξινη υδρόλυση. Στον **πίνακα 3.6** φαίνονται διάφορες διαδικασίες εκχύλισης βιοτίνης από διάφορα τρόφιμα.

Πίνακας 3.6. Επιλεγμένες διαδικασίες εκχύλισης βιοτίνης από διάφορα τρόφιμα.

Δείγμα	Διαδικασία εκχύλισης	Πηγή
Διάφορα τρόφιμα	Δείγμα + 1,5M H ₂ SO ₄ στους 121°C για 30 min	Bell (1984)
Διάφορα τρόφιμα	Δείγμα + Reduced glutathione + EDTA + citrate buffer + papain (Εάν το δείγμα περιέχει υψηλές ποσότητες αμύλου προστίθεται τακαδιαστάση), συνεχής ανάδευση, επώαση στους 37°C για μια νύχτα, φιλτράρισμα	Lahély et al (1999)

Προσδιορισμός βιοτίνης

Ο προσδιορισμός της βιοτίνης γίνεται κυρίως με μικροβιολογικές μεθόδους. Ο *Saccharomyces cerevisiae* χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της βιοτίνης αλλά φάνηκε ότι έδινε θετικά αποτελέσματα και με μερικά συστατικά που σχετίζονταν με τη βιοτίνη εκτός από την ίδια τη βιοτίνη. Επομένως, ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιείται σήμερα για τον προσδιορισμό της βιοτίνης είναι ο *Lactobacillus plantarum*.

3.1.7 Ασκορβικό οξύ

Εκχύλιση ασκορβικού

Η βιταμίνη C αποτελείται από δυο βιολογικά ενεργές ουσίες το L-ασκορβικό οξύ και το L-δευδρο-ασκορβικό οξύ. Η πιο άφθονη μορφή είναι το ασκορβικό οξύ, αλλά το δευδρο-ασκορβικό οξύ υπάρχει όταν οι συνθήκες αποθήκευσης των τροφίμων ευνοούν την οξείδωση. Το ασκορβικό οξύ οξειδώνεται εύκολα προς δευδρο-ασκορβικό οξύ (DHAA), το οποίο στη συνέχεια υποβαθμίζεται στο μη-βιολογικά δραστικό δικετογουλονικό οξύ, επομένως οι συνθήκες εκχύλισης πρέπει να είναι επιλεγμένες έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται η οξείδωση και η υποβάθμιση. Η εκχύλιση εφαρμόζεται συνήθως σε έναν αναμεικτήρα υψηλής ταχύτητας με ένα κατάλληλο διάλυμα. Οξέα όπως οξαλικό, τριχλωροξικό, οξικό, κιτρικό, μεταφοσφορικό (MPA) και μείγματα μεταφοσφορικού και οξικού, και διαλύματα EDTA και ομοκυστεΐνης έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση του ασκορβικού οξέος. Στο **πίνακα 3.7** φαίνονται μέθοδοι εκχύλισης που έχουν χρησιμοποιηθεί.

Πίνακας 3.7. Επιλεγμένες διαδικασίες εκχύλισης ασκορβικού οξέος από διάφορα τρόφιμα.

Δείγμα	Διαδικασία εκχύλισης	Πηγή
Φρούτα	Δείγμα + 4.5% μεταφωσφορικό, ομογενοποίηση, φυγοκέντρωση στα 22,100g για 15 min στους 4°C, φιλτράρισμα	Odriozola-Serrano et al (2007)
Τροπικά φρούτα	Δείγμα + 2.5 ml από το δ/μα εκχύλισης (3% MPA και 8% οξικό οξύ για την εκχύλιση με MPA-οξικό και 0.1% οξαλικό οξύ για την εκχύλιση με οξαλικό), ομογενοποίηση σε ένα μπλέντερ υψηλής ταχύτητας στα 18000 g για 1 min, φυγοκέντρωση στα 9000 για 20 min. (μειωμένο φως και 4°C) Για τη σταθεροποίηση της βιταμίνης C προστίθεται 1mM TBHQ στα δ/τα που εκχυλίζονται.	Hernández et al (2006)
Χυμοί φρούτων	Δείγμα + 50 mM δ/μα DTT ¹ για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου, τοποθέτηση σε ένα Ultrafree-MC-Durapore (0,22 μm), φυγοκέντρωση στα 5000 g για 5 min.	Naoto Furusawa (2001)
Διάφορα τρόφιμα	Δείγμα + 4,5M buffer οξικού νατρίου + 0,1% OPDA ² + 14,77 mg/ml AAPH ³ , ανάμειξη, θέρμανση για 36 min στους 56°C	Burini (2007)
Τρόφιμα & Βιολογικά Δείγματα	α) Δείγμα τροφίμου + buffer εκχύλισης (1% (w/v) MPA + 0,5 (w/v) οξαλικό οξύ, pH 2), ανάμειξη σε ένα Waring blender για 5 min, φυγοκέντρωση για 10 min στα 9000 g και τους 4°C, φιλτράρισμα β) 5 πολυβιταμινούχες ταμπλέτες + 5% (w/v) MPA και 1% (w/v) οξαλικό, διάλυση των εκχυλισμάτων 20–50 φορές με 1% (w/v) MPA και 0.5% οξαλικό οξύ (pH 2), φυγοκέντρωση για 10 min στα 9000 g και 4°C, φιλτράρισμα γ) Δείγμα πλάσματος + 10% MPA, κατάψυξη στους -80°C, φυγοκέντρωση στα 14 000 g και 4°C για 10 min, προσθήκη 0.4M buffer οξικών, pH 3,9, φυγοκέντρωση στα 10 000 g	Kall & Andersen (1999)

	στους 4°C για 5–10 min	
Ποτά	Δείγμα + τριχλωροξικό οξύ, φυγοκέντρηση, προσθήκη δινιτροφαινυλδραζίνη, θέρμανση για 1 ώρα στους 60°C, αφού κρυώσει προσθήκη θεικού οξέος	Schlesier et al (2002)
Βερίκοκα	Δείγμα + 0,5M υπερχλωρικό οξύ, vortex, φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 8 min στους 4°C, φιλτράρισμα	Munzuroglu et al (2003)

1. DTT: dithiothreitol

2. OPDA: benzene-1,2-diamine (o-phenyldiamine)

3. AAPH: 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride

Προσδιορισμός ασκορβικού οξέος

1) Χημικές μέθοδοι: Πολλές χημικές μέθοδοι είναι διαθέσιμες για τον προσδιορισμό του ασκορβικού οξέος, οι περισσότερες από τις οποίες χρησιμοποιούν την μειούμενη δύναμη της βιταμίνης. Η 2,6-διχλωρο-φαινυλο-ινδο-φαινόλη (DPI ή DCP) είναι η πιο δημοφιλής και παρέχει γρήγορη εκτίμηση του AA χρησιμοποιώντας απλό εξοπλισμό. Η DCP έχει χρώμα βαθύ μπλε και τα εκχυλίσματα από το δείγμα τιτλοδοτείται μέχρι την εμφάνιση ροζ χρώματος. Υπάρχουν πολλές ουσίες που μπορούν να παρεμποδίσουν την τιτλοδότηση με DCP, όπως ο σίδηρος, ο χαλκός, χρωστικές ουσίες, διοξείδιο του θείου και οι ταννίνες. Η μέθοδος αυτή είναι ικανή να προσδιορίσει μόνο το ασκορβικό οξύ και όχι το δεϋδροασκορβικό οξύ.

Μια από τις πιο ειδικές μεθόδους για τον προσδιορισμό της συνολικής βιταμίνης C είναι ο φθορισμομετρικός προσδιορισμός των Deutsch and Weeks (1965). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αντίδραση της ο-φαινυλενοδιαμίνης με τις *cis* υδροξυλιωμένες ομάδες του δεϋδροασκορβικού και σχηματίζεται ένα φθορίζον παράγωγο.

2) HPLC: Μερικές δημοσιευμένες διαδικασίες προσδιορίζουν μόνο το AA, ενώ άλλες είναι σχεδιασμένες για να προσδιορίζουν το AA και το DHAA (δεϋδροασκορβικό οξύ). Το τελευταίο μπορεί να επιτευχθεί είτε μετατρέποντας το DHAA σε AA είτε διαχωρίζοντας και προσδιορίζοντας χρωματογραφικά το AA και το DHAA. Το AA έχει μια ισχυρή UV απορρόφηση και μπορεί να ανιχνευτεί εύκολα αλλά το DHAA παρουσιάζει μικρή απορρόφηση στο UV.

3.1.8 Φυλλικό οξύ

Εκχύλιση φυλλικού οξέος

Το φυλλικό οξύ στους φυτικούς και ζωικούς ιστούς βρίσκεται υπό τη μορφή του τετραϋδροφυλλικού οξέος (THF), N⁵-μεθυλο-THF, N¹⁰-μεθυλο-THF και N⁵-φορμυλο-THF. Η ποσότητα φυλλικού οξέος δεν είναι σημαντική στους βιολογικούς ιστούς αλλά σε μερικά εκχυλίσματα δειγμάτων μπορεί να είναι παρούσα ως αποτέλεσμα της οξειδωσης του THF. Οι διάφορες μορφές φυλλικού εκχυλίζονται συνήθως από τα τρόφιμα χρησιμοποιώντας buffers με ουδέτερο ή ελαφρά όξινο pH στους 100°C και 120°C για 60 λεπτά έως 3 ώρες. Κατά την εκχύλιση πρέπει να είναι παρόν ένα αντιοξειδωτικό ώστε να προληφθεί η υποβάθμιση των ευμετάβλητων μορφών φυλλικού οξέος. Στον **πίνακα 3.8** παρατίθενται επιλεγμένες διαδικασίες εκχύλισης φυλλικού οξέος από διάφορα τρόφιμα.

Πίνακας 3.8. Επιλεγμένες διαδικασίες εκχύλισης φυλλικού οξέος από διάφορα τρόφιμα.

Δείγμα	Διαδικασία εκχύλισης	Πηγή
Βιολογικά δείγματα	Δείγμα + 0,05M buffer οξικού νατρίου (+ 1% ασκορβικό οξύ) σε pH 4,9 στους 100°C για 60 min	Gregory et al (1984)
Διάφορα τρόφιμα	Δείγμα + buffer εκχύλισης (calcium [¹⁵ N, ¹³ C ₃] (R)-pantothenate και [² H ₄] folic acid), ανάδευση για 1 ώρα στους 20°C, φιλτράρισμα	Rychlik (2003)

Προσδιορισμός φυλλικού οξέος

Το συνολικό περιεχόμενο της πλειοψηφίας των τροφίμων σε φυλλικό είναι πολύ χαμηλό, ωστόσο ο προσδιορισμός τόσο του συνολικού όσο και των διαφόρων μορφών του είναι πολύ δύσκολος. Η μικροβιολογική μέθοδος είναι ο πιο συχνός τρόπος προσδιορισμού του συνολικού περιεχομένου των τροφίμων σε φυλλικό χάρη στην ευαισθησία της μεθόδου. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται είναι ο *Streptococcus faecalis* και ο *Lactobacillus casei*. Διαδικασίες προσδιορισμού με HPLC έχουν δημοσιευτεί αλλά δεν χρησιμοποιούνται ευρέως λόγω των πολύ χαμηλών επιπέδων ανίχνευσης που απαιτούνται και των προσμίξεων των υποστρωμάτων.

3.2 Λιποδιαλυτές βιταμίνες

3.2.1 Βιταμίνη Α

Εκχύλιση βιταμίνης Α

Ο όρος βιταμίνη Α χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη ρετινόλη και τα ισομερή της. Η ρετινόλη συναντάται κυρίως σε προϊόντα ζωικής προέλευσης, με πιο συνηθισμένες μορφές την *all-trans* ρετινόλη και την *13-cis*-ρετινόλη. Η βιταμίνη Α υπάρχει με τη μορφή εστέρων μακράς αλυσίδας λιπαρών οξέων, αλλά μπορεί να υπάρχει και σε μη εστεροποιημένη «ελεύθερη» μορφή. Η βιταμίνη Α παραλαμβάνεται από τα τρόφιμα με σαπωνοποίηση και εκχύλιση του μη-σαπωνοποιημένου υλικού (όπου εμπεριέχεται η βιταμίνη Α) με διαλύτη. Κατά τη διάρκεια της αλκαλικής υδρόλυσης είναι σημαντικό το μείγμα που αντιδρά να προστατεύεται από το φως, να υπάρχουν αντιοξειδωτικές ουσίες και να χρησιμοποιείται έκπλυσή του από το άζωτο.

Οι εστέρες της βιταμίνης Α οι οποίοι είτε βρίσκονται φυσικά σε ένα τρόφιμο είτε ως διατροφικό συμπλήρωμα μπορούν να παραληφθούν με διάλυση του δείγματος σε διαλύτη πριν από την Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Στον παρακάτω πίνακα (3.9) περιγράφονται διάφορες διαδικασίες εκχύλισης που έχουν χρησιμοποιηθεί από διάφορους ερευνητές.

Πίνακας 3.9. Επιλεγμένες διαδικασίες εκχύλισης βιταμίνης Α από διάφορα τρόφιμα.

Δείγμα	Διαδικασία εκχύλισης	Πηγή
Γάλα	Δείγμα + αιθανόλη + εξάνιο, φυγοκέντρωση	Thompson et al (1980)
Σκόνη γάλακτος	Δείγμα + μείγμα διμεθυλ-σουλφοξειδίου/ διμεθυλ-φορμαμίδιου/ χλωροφορμίου	Woollard & Woollard (1981)
Βερίκοκα	Δείγμα + αιθανόλη, vortex, φυγοκέντρωση στις 4500 στροφές για 5 min στους 4°C, φιλτράρισμα, προσθήκη εξανίου, εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου, προσθήκη μεθανόλης	Karatas et al (2007)

Εκχύλιση καροτενοειδών

Τα καροτενοειδή εκχυλίζονται από τα τρόφιμα χρησιμοποιώντας μεθόδους παρόμοιες με αυτές που χρησιμοποιούνται για την βιταμίνη Α. Τα καροτενοειδή είναι

ιδιαίτερα ευαίσθητα στο φως, την οξείδωση και τους καταλύτες, όπως ο σίδηρος και ο χαλκός και γι' αυτό πρέπει να λαμβάνονται μέτρα για τον περιορισμό της υποβάθμισης. Οι εστέρες των καρτενοειδών μπορούν να εκχυλιστούν χρησιμοποιώντας οργανικούς διαλύτες αλλά η σαπωνοποίηση είναι η διαδικασία επιλογής είτε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είτε σε ποικίλες θερμοκρασίες. Στον **πίνακα 3.10** περιγράφονται επιλεγμένες διαδικασίες εκχύλισης καρτενοειδών από διάφορα τρόφιμα.

Πίνακας 3.10. Επιλεγμένες διαδικασίες εκχύλισης καρτενοειδών από διάφορα τρόφιμα.

Δείγμα	Διαδικασία εκχύλισης	Πηγή
Λαχανικά, Φρούτα, Μούρα	Δείγμα + ακετόνη (Omni-Mixer, Na ₂ SO ₄ , MgCO ₃), συμπύκνωση, σαπωνοποίηση με KOH, αιθανόλη & H ₂ O όλη τη νύχτα σε θωρακισμένο δοματίου, εκχύλιση καρτενοειδών με <i>n</i> -εξάνιο και διαιθυλ-αιθέρα (70:30) με BHT.	Heinonen et al (1989)
Κολοκύθα	α) Δείγμα + 95% αιθανόλη (BHT), vortex, προσθήκη εξανίου, παραλαβή στοιβάδας εξανίου (επανάληψη εκχύλισης 3 φορές), εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου, προσθήκη δ/τος ακετονιτρίλιο/τετραϋδροφουράνιο/μεθανόλη/1% υδατικό δ/μα θειικού αμμωνίου (55:35:5:5, v/v/v/v)	Seo et al (2005)

3.2.2 Βιταμίνη D

Εκχύλιση βιταμίνης D

Οι διαιτητικές πηγές της βιταμίνης D είναι η εργοκαλσιφερόλη ή βιταμίνη D₂ και η χοληκαλσιφερόλη ή βιταμίνη D₃. Η βιταμίνη D₂ παράγεται από τη δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας στην προβιταμίνη εργοστερόλη, η οποία συναντάται στα φυτά, τη μαγιά και τους μύκητες. Η βιταμίνη D₃ συναντάται στα ζώα και παράγεται από τη δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας στην προβιταμίνη 7-δεϋδροχοληστερόλη.

Σαπωνοποίηση των δειγμάτων με αιθανολικό KOH είναι η συνήθης διαδικασία που χρησιμοποιείται για την υδρόλυση των λιποειδών, την υποβάθμιση κάποιων πιθανών προσμίξεων και την απελευθέρωση της βιταμίνης D από το δείγμα. Η σαπωνοποίηση εφαρμόζεται σε θερμοκρασία δοματίου ή κάτω από θέρμανση σε reflux με την παρουσία αντιοξειδωτικών. Μείγμα αιθέρων, για παράδειγμα διαιθυλ-αιθέρα και

πετρελαιοκού αιθέρα (40:60) χρησιμοποιείται παραδοσιακά για την εκχύλιση της βιταμίνης D από το σαπωνοποιημένο μείγμα. Το εξάνιο επίσης χρησιμοποιείται για την εκχύλιση της βιταμίνης D και έχει το πλεονέκτημα ότι δεν εκχυλίζει τα σαπωνοποιημένα λιπαρά σε τέτοιο βαθμό όπως ο διαιθυλ-αιθέρας. Διάφορες μέθοδοι εκχύλισης της βιταμίνης D που έχουν χρησιμοποιηθεί παρατίθενται στον **πίνακα 3.11**.

Πίνακας 3.11. Επιλεγμένες διαδικασίες εκχύλισης βιταμίνης D από διάφορα τρόφιμα.

Δείγμα	Διαδικασία εκχύλισης	Πηγή
Γάλα	Δείγμα + 1% αιθανολική πυρογαλλόλη + 6 g KOH, 18 ώρες στο σκοτάδι στο περιβάλλον, εκχύλιση με εξάνιο	Thompson et al (1982)
Διάφορα τρόφιμα	Δείγμα + πυρογαλλόλη + 34% (w/v) αιθανολικό KOH, reflux για 30 min, εκχύλιση με διαιθυλαιθέρα: πετρελαιοκού αιθέρα (1:1)	Lumley & Lawrance (1990)
Σκόνη γάλακτος	Δείγμα + αιθανόλη + 25% ασκορβικό νάτριο + 50% (w/v) KOH, reflux για 45 min σε ατμόλουτρο, εκχύλιση με αιθέρα και πεντάνιο	AOAC (1990)

Προσδιορισμός βιταμίνης D

Με την εκχύλιση με διαλύτη ενός σαπωνοποιημένου δείγματος δεν παραλαμβάνεται μόνο βιταμίνη D αλλά και άλλα συστατικά των λιποειδών, όπως στερόλες και άλλες λιποδιαλυτές βιταμίνες. Το γεγονός αυτό καθιστά την ανάλυση μέσω HPLC δύσκολη.

3.2.3 Βιταμίνη E

Εκχύλιση βιταμίνης E

Ο όρος βιταμίνη E περιλαμβάνει την α-τοκοφερόλη, τη β-τοκοφερόλη, τη γ-τοκοφερόλη, τη δ-τοκοφερόλη και τις τοκοτριενόλες. Οι τοκοφερόλες και οι τοκοτριενόλες έχουν διαφορετική βιολογική δραστηριότητα και γι' αυτό είναι σημαντικό να προσδιορίζονται χωριστά. Η βιταμίνη E προσδιορίζεται παραδοσιακά στα τρόφιμα με χρωματομετρία μετά από αντίδραση με σιδηρούχο χλώριο και παρουσία 1,1-διπυριδυλ ή 4,7-διφαινυλ-1,10-φαινανθρολίνη. Τα δείγματα σαπωνοποιούνταν για να απομακρυνθούν τα λιποειδή, οι κύριες προσμίξεις

απομακρύνονταν με χρωματογραφία και τα ισομερή της τοκοφερόλης διαχωρίζονταν πριν από την χρωματομετρία. Η διαδικασία αυτή είναι επιρρεπής στις προσμίξεις και απαιτεί εντατική εργασία. Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιούταν με επιτυχία για αρκετά χρόνια αλλά απαιτούσε μεγάλη προετοιμασία των δειγμάτων και οι β- και γ-τοκοφερόλες δεν μπορούσαν να διαχωριστούν εύκολα. (Bell and Christie, 1973) Η HPLC αποτελεί μια αξιόπιστη και γρήγορη μέθοδο διαχωρισμού και προσδιορισμού των τοκοφερολών και των τοκοτριενολών στα τρόφιμα. Πριν από την HPLC χρησιμοποιούνται ποικίλοι συνδυασμοί διαλυτών που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη διαδικασία για την εκχύλιση της βιταμίνης Ε περιλαμβάνει αλκαλική υδρόλυση των δειγμάτων ακολουθούμενη από εκχύλιση με διαλύτη του μη-σαπωνοποιημένου υλικού όπου εμπεριέχεται η βιταμίνη Ε. Ο ακόλουθος πίνακας (3.12) περιγράφει μεθόδους εκχύλισης της βιταμίνης Ε σε διάφορα τρόφιμα.

Πίνακας 3.12. Επιλεγμένες διαδικασίες εκχύλισης βιταμίνης Ε από διάφορα τρόφιμα.

Δείγμα	Διαδικασία εκχύλισης	Πηγή
Σκόνη γάλακτος	Δείγμα + μείγμα διμεθυλ-σουλφοξειδίου, διμεθυλ-φορμαμίδιου και χλωροφορμίου (2:2:1) παρουσία ασκορβικού οξέος ως αντιοξειδωτικό, εκχύλιση της βιταμίνης με εξάνιο	Woollard & Blott (1986)
Βερίκοκα	Δείγμα + αιθανόλη, vortex, φυγοκέντρωση στις 4500 στροφές για 5 min στους 4°C, φιλτράρισμα, προσθήκη εξανίου, εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου, προσθήκη μεθανόλης	Karatas et al (2007)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 Υλικά & όργανα

Για την πραγματοποίηση της παρούσας πτυχιακής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά και όργανα.

4.1.1 Υλικά

A) Αντιδραστήρια

Οι διαλύτες και τα ενζυμικά παρασκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία των δειγμάτων είναι τα εξής:

- Απεσταγμένο νερό (Ionel)
- Δις- απεσταγμένο νερό (Easypure RF)
- Methanol, Dichloromethane, n-Hexane, Chloroform (Merck)
- Meta-phosphoric acid (MPA Merck)
- Potassium hydroxide (Merck)
- Sodium acetate trihydrate (Carlo Erba)
- Potassium dihydrogen phosphate pro analysi (Merck)
- Acetic acid glacial 100% anhydrous (Merck)
- Hydrochloric acid fuming 37% pro analysi (Merck)
- Thiamine monophosphate chloride (T8637-1G Sigma)
- Thiamine hydrochloride (T4625-5G Sigma)
- Thiamine pyrophosphate (C8754- 1G Sigma)
- Riboflavin (R-4500 25g Sigma)
- L-Ascorbic acid (A-7506 10g Sigma)
- Pyridoxine hydrochloride, 99% (A12041/L12523 25g Alfa Aesar)
- Pyridoxal hydrochloride (P9130-500MG Sigma)
- Pyridoxamine dihydrochloride, minimum 98% (P9380-250MG Sigma)
- Taka-diastase from Aspergillus oryzae concentrate (Serva)
- BHT (B-1378 Sigma)
- Acid phosphatase (P-3627 1g Sigma)
- β -glucosidase (G-0395 2.500 units Sigma)

- 2,6-Dichloroindophenol sodium salt (DPI) (A10107/L04410 5g Alfa Aesar)
- Potassium dihydrogen phosphate (Panreac)
- Oxalic acid (Merck)
- Sodium thiosulfate (Merck)
- Potassium iodide (Carlo Erba)
- Potassium ferricyanide (Merck)

B) Σκεύη

- Δοκιμαστικοί σωλήνες με πόμα των 10 & 50 ml
- Σωλήνες φυγοκέντρου των 50 ml
- Κωνικές και ογκομετρικές φιάλες
- Σιφόνιο του 1 ml, των 5 ml και των 10 ml
- Πιπέτες Pasteur
- Πουαρ για σιφόνιο και πιπέτες Pasteur
- Πιπέτες των 100 και 1000 μl
- Πλαστικά tips για τις πιπέτες των 100 και 1000 μl
- Φιλτράκια-δίσκοι για τη διήθηση των διαλυμάτων πριν τη μέθοδο HPLC
- Vials των 2 ml με πόμα και πλαστικό septum, κατάλληλα για τη συσκευή HPLC
- Γουδί (ιγδίο), σπάτουλα
- Οικιακός αναδευτήρας (mixer-multi)

4.1.2 Όργανα

- Συσκευή Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης. Για τον προσδιορισμό των βιταμινών με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC) χρησιμοποιήθηκε ο χρωματογράφος HPLC 1050 (Agilents). Το σύστημα ήταν εφοδιασμένο με αυτόματο δειγματολήπτη και η ανίχνευση και ο προσδιορισμός έγιναν χρησιμοποιώντας ανιχνευτή σειράς φωτοδιόδων (DAD) και φθορισμομετρικό ανιχνευτή (FLD). Τα μήκη κύματος απορρόφησης, διέγερσης και εκπομπής επιλέχθηκαν ανάλογα με τη βιταμίνη που επρόκειτο να προσδιοριστεί και φαίνονται στα επιμέρους τμήματα παρακάτω.

- Φυγόκεντρος Hermle Z320
- Συσκευή υπερήχων Elmasonic S60
- Αναλυτικός ζυγός Ohaus, ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
- Ζυγός Ohaus, ακρίβειας δύο δεκαδικών ψηφίων
- Φούρνος
- Υδρόλουτρο
- Αέριο άζωτο

4.2 Δείγματα σταφίδας

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 4 είδη επεξεργασμένης σταφίδας Βοστίτσας (Vostizza):

- A) Συμβατική επεξεργασμένη (3/2008)
- B) Συμβατική επεξεργασμένη μικρή (small 2008)
- Γ) Συμβατική επεξεργασμένη μεσαία (medium 2008)
- Δ) Βιολογική επεξεργασμένη (2007)

4.3 Πειραματικές διαδικασίες

4.3.1 Σύγχρονος Προσδιορισμός 7 Υδατοδιαλυτών Βιταμινών

Αρχικά, έγινε προσπάθεια να προσδιοριστεί μια ομάδα από επτά υδατοδιαλυτές βιταμίνες (Θειαμίνη, Ριβοφλαβίνη, Νιασίνη, Πυριδοξίνη, Παντοθενικό οξύ, Ασκορβικό οξύ & Φυλλικό οξύ) σύμφωνα με τη μέθοδο που προτείνεται από τους Ekinici and Kadakal (2005). Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε στον προσδιορισμό των βιταμινών αυτών σε τραχανά.

1. Σε δοκιμαστικό σωλήνα των 50 ml ζυγίζονται 5g σταφίδας (μετά από πολτοποίηση με ιγδίο) και προστίθενται 20 ml απεσταγμένο νερό
2. Ακολουθεί vortex και τοποθέτηση στη συσκευή υπερήχων (sonicator) για 10 λεπτά
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος στις 3000 στροφές για 10 min και παραλαμβάνεται το υπερκείμενο

4. Στη συνέχεια ακολουθείται εκχύλιση στερεής φάσης (SPE) ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία:
 - i. Ενεργοποίηση της στήλης με 10 ml μεθανόλη και 10 ml απεσταγμένο νερό (pH= 4,2)
 - ii. Τοποθέτηση του δείγματος (9 ml)
 - iii. Έκλουση και απομάκρυνση του δ/τη υπό ελαττωμένη πίεση (κενό)
 - iv. Παραλαβή των βιταμινών αρχικά με 5 ml απεσταγμένο νερό (pH= 4,2) και ακολούθως με 10 ml μεθανόλη σε δύο ξεχωριστούς δοκιμαστικούς σωλήνες με πώμα
 - v. Ακολουθεί δημιουργία κενού για 3-4 min έτσι ώστε να στεγνώσει η στήλη και να γίνει παραλαβή όλου του δ/τη.
5. Μετά την παραπάνω διαδικασία ακολουθεί συμπύκνωση των περιεχομένων των δοκιμαστικών σωλήνων σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού
6. Τέλος προστίθεται 1 ml από τον διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε σωλήνα (μεθανόλη ή νερό) και μεταφέρονται σε vials
7. Ακολουθεί ανάλυση με HPLC

Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)

Κινητή φάση: KH_2PO_4 80mM, pH=7,8

Στήλη: C18 Kromazil (4,6 x 250 nm, 5 μm)

4.3.2 Προσδιορισμός Ριβοφλαβίνης

Για τον προσδιορισμό της ριβοφλαβίνης ακολουθήθηκε η διαδικασία που προτείνεται από τους Arella et al (1996) ελαφρώς τροποποιημένη, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της βιταμίνης σε διάφορα τρόφιμα.

1. Σε κωνική φιάλη των 200 ml ζυγίζονται περίπου 15g επεξεργασμένης σταφίδας (μετά από πολτοποίηση με ιγδίο)
2. Στο δείγμα προστίθενται 25 ml υδροχλωρικό οξύ 0,1M
3. Ακολουθεί ανάδευση της φιάλης και reflux στους 120° C για 30 min
4. Ακολουθεί ψύξη του δείγματος σε θ. δωματίου και παραλαβή σε ποτήρι ζέσης, ξεπλένοντας την κωνική φιάλη με 10 ml υδροχλωρικό οξύ 0,1 M

5. Στο δείγμα ρυθμίζεται το pH στο 4,5 με 2,5M οξικό νάτριο (CH_3COONa)
6. Προστίθενται 0,5g τακα-διαστάσης
7. Το διάλυμα επωάζεται για μια νύχτα στους 37°C σε υδρόλουτρο
8. Μετά την επώαση, το δείγμα αραιώνεται σε τελικό όγκο 50 ml με υπερκαθαρό νερό
9. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 3000 στροφές
10. Παραλαμβάνεται 1 ml από το υπερκείμενο
11. Διηθείται, τοποθετείται σε vial και αναλύεται με HPLC

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε με 2 δείγματα σταφίδας:

- i. Βιολογική επεξεργασμένη σταφίδα (2007)
- ii. Συμβατική επεξεργασμένη σταφίδα (3/2008)

Παρασκευή προτύπων ριβοφλαβίνης:

- i. $C = 0,1 \text{ mg/ml}$ σε οξικό οξύ (CH_3COONa) 0,02 M (αρχικό)
- ii. $C = 0,01 \text{ mg/ml}$ σε υδροχλωρικό οξύ (HCl) 0,1 M (αραιωμένο)

Παρασκευή δειγμάτων ενισχυμένων με πρότυπο ριβοφλαβίνης (standard addition of riboflavin) για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς μέσα στο υπόστρωμα:

- i. spike 1: 10 μl προτύπου ριβοφλαβίνης 0,01 mg/ml + 490 μl δείγματος
- ii. spike 2: 20 μl προτύπου ριβοφλαβίνης 0,01 mg/ml + 480 μl δείγματος
- iii. spike 3: 40 μl προτύπου ριβοφλαβίνης 0,01 mg/ml + 460 μl δείγματος

Η παραπάνω διαδικασία έγινε και στα δύο δείγματα σταφίδας.

Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)

Στήλη: C18 Kromazil (4,6 x 250 nm, 5 μm)

Ροή: 0,7 ml/ min

Έκλουση: ισοκρατική με δ/τη έκλουσης $\text{MeOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 30:70 (v/v)

Φθορισμός: 422 nm ($\lambda_{\text{διέγερσης}}$), 522 nm ($\lambda_{\text{εκπομπής}}$)

4.3.3 Προσδιορισμός Θειαμίνης (ως Θειόχρωμα)

Για τον προσδιορισμό της θειαμίνης ακολουθήθηκε η διαδικασία που προτείνεται από τους Arella et al (1996) ελαφρώς τροποποιημένη, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της βιταμίνης σε διάφορα τρόφιμα.

- Σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα προστίθενται 1 ml από το υπερκείμενο του προηγούμενου πειράματος ή 1 ml προτύπου υδροχλωρικής θειαμίνης και 3 ml αλκαλικού διαλύματος σιδηρικυανούχου καλίου $[K_3Fe(CN)_6]$.
- Το διάλυμα αναδεύεται καλά και στη συνέχεια 1 ml τοποθετείται σε vial και αναλύεται με HPLC.

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 2 δείγματα σταφίδας:

- i. Βιολογική επεξεργασμένη σταφίδα (2007)
- ii. Συμβατική επεξεργασμένη σταφίδα (3/2008)

Παρασκευή προτύπων υδροχλωρικής θειαμίνης για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς:

Αρχικό πρότυπο: $C = 1 \text{ mg/ml}$ σε μεθανόλη/νερό (1:4)

Από το πρότυπο αυτό παρασκευάστηκαν οι ακόλουθες συγκεντρώσεις για τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς:

- i. $C_1 = 0,001 \text{ mg/ml}$
- ii. $C_2 = 0,01 \text{ mg/ml}$
- iii. $C_3 = 0,02 \text{ mg/ml}$
- iv. $C_4 = 0,03 \text{ mg/ml}$
- v. $C_5 = 0,04 \text{ mg/ml}$

Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)

Στήλη: C18 Kromazil (4,6 x 250 nm, 5 μm)

Ροή: 0,7 ml/ min

Έκλουση: ισοκρατική με δ/τη έκλουσης MeOH/CH₃COONa 30:70 (v/v)

Φθορισμός: 366 nm ($\lambda_{\text{διέγερσης}}$), 435 nm ($\lambda_{\text{εκπομπής}}$)

4.3.4 Προσδιορισμός βιταμίνης B6

Για τον προσδιορισμό της βιταμίνης B6 ακολουθήθηκε η διαδικασία που προτείνεται από τον Kall M. (2003) ελαφρώς τροποποιημένη. Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε από τον Kall για τον προσδιορισμό της βιταμίνης B6 σε διάφορα τρόφιμα.

1. Σε κωνική φιάλη των 200 ml ζυγίζονται περίπου 30g επεξεργασμένης σταφίδας (μετά από πολτοποίηση με ιγδίο)
2. Στο δείγμα προστίθενται 50 ml υδροχλωρικό οξύ 0,1M
3. Ακολουθεί ανάδευση της φιάλης και reflux στους 120° C για 5 min
4. Στο δείγμα ρυθμίζεται το pH στο 4,5 με 2M οξικό νάτριο (CH₃COONa)
5. Το δ/μα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 100 ml και συμπληρώνεται με νερό μέχρι τη χαραγή
6. Σε 4 δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται από 10 ml δείγματος και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 3000 στροφές για 10 λεπτά
7. Σε 4 δοκιμαστικούς σωλήνες παραλαμβάνονται 5 ml από το υπερκείμενο
8. Προστίθενται τα ένζυμα *
9. Ακολουθεί vortex των 4 δειγμάτων
10. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται για μια νύχτα στους 40° C σε υδρόλουτρο
11. Μετά την επώαση, προστίθεται από 1 ml υδροχλωρικό οξύ 0,1M για τη διακοπή της ενζυμικής αντίδρασης
12. Ακολουθεί vortex
13. Οι 4 δοκιμαστικοί σωλήνες φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στις 3000 στροφές
14. Παραλαμβάνεται 1 ml από το υπερκείμενο
15. Διηθείται, τοποθετείται σε vial και αναλύεται με HPLC

*Για το πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες ποσότητες ενζύμων:

Δ1: 0,0504 g όξινης φωσφατάσης (acid phosphatase)

Δ2: 0,0255 g » »

Δ3: 0,0501 g όξινης φωσφατάσης + 0,0206 g β-γλυκοζιδάσης (β-glucosidase)

$\Delta 4: 0,0256 \text{ g} \gg \gg + 0,0205 \text{ g} \gg$

Επίσης, παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα πρότυπα βιταμινών:

- i. 0,0103 g/ml πυριδοξίνης σε 10 ml HCl 0,1 M, c= 1mg/ml
- ii. 0,0107 g/ml πυριδοξάλης σε 10 ml HCl 0,1 M, c= 1mg/ml
- iii. 0,0102 g/ml πυριδοξαμίνης σε 10 ml HCl 0,1 M, c= 1mg/ml

Από τα παραπάνω πρότυπα παρασκευάστηκαν αραιωμένα δείγματα με συγκέντρωση 0,05mg/ml καθώς ένα μίγμα των 3 μορφών της βιταμίνης B6:

- Mix 0: 200μl πυριδοξίνης 0,05 mg/ml + 200μl πυριδοξάλης 0,05 mg/ml + 200μl πυριδοξαμίνης 0,05 mg/ml (Κάθε βιταμερούς =0,017 mg/ml)

Παρασκευή μιγμάτων προτύπων των 3 μορφών (βιταμερή) βιταμίνης B6 για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς:

- Mix 1: 30 μl από δ/μα πυριδοξίνης 0,05 mg/ml + 30 μl από δ/μα πυριδοξάλης 0,05 mg/ml + 30 μl από δ/μα πυριδοξαμίνης 0,05 mg/ml + 910 μl από δ/μα HCl 0,1 M (Κάθε βιταμερούς =1,5 μg/ml)
- Mix 2: 60 μl από δ/μα πυριδοξίνης 0,05 mg/ml + 60 μl από δ/μα πυριδοξάλης 0,05 mg/ml + 60 μl από δ/μα πυριδοξαμίνης 0,05 mg/ml + 820 μl από δ/μα HCl 0,1 M (Κάθε βιταμερούς =3μg/ml)
- Mix 3: 150 μl από δ/μα πυριδοξίνης 0,05 mg/ml + 150 μl από δ/μα πυριδοξάλης 0,05 mg/ml + 150 μl από δ/μα πυριδοξαμίνης 0,05 mg/ml + 550 μl από δ/μα HCl 0,1 M (Κάθε βιταμερούς =7,5 μg/ml)

Επίσης, παρασκευάστηκαν τα παρακάτω δείγματα ενισχυμένα με μίγμα προτύπων των 3 μορφών βιταμίνης B6:

- Spike 1: 50 μl από mix 2 + 450 μl δείγματος σταφίδας (Κάθε βιταμερούς = 0,3 μg/ml)
- Spike 2: 50 μl από mix 2 + 450 μl δείγματος σταφίδας + 100 μl από mix 0 (Κάθε βιταμερούς = 2,8 μg/ml)

Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)

Στήλη: C18 Kromazil (4,6 x 250 nm, 5 μm)

Βαθμιδωτή έκλυση χρησιμοποιώντας 2 διαλύτες:

A: KH_2PO_4 80mM, pH=7,8

B: MeOH/ CH_3COONa 30:70 (v/v)

t=0 min 100% A

t=20 min 90% A

t=30 min 60% A

t=35 min 100% A

Φθορισμός: 320 nm (διέγερσης), 392 nm (εκπομπής)

4.3.5 Προσδιορισμός Ασκορβικού οξέος

Ο προσδιορισμός του ασκορβικού οξέος πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μια ογκομετρική μέθοδο, η οποία περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια.

Τιτλοδότηση του δ/τος της 2,6-διγλωρο-φαινυλο-ινδο-φαινόλης (DPI)

1. Σε κωνική φιάλη των 100 ml φέρονται κατά σειρά 10 ml δ/τος 0,04 % w/v DPI, 5 ml δ/τος KI 50% w/v και 10 ml δ/τος 0,1 N HCl.
2. Αναδεύεται καλά και μετά παραμένει σε ηρεμία για 2 min
3. Προστίθενται 2-3 σταγόνες δείκτη αμύλου 1% και το δ/μα μετά από ανάδευση χρωματίζεται έντονα κυανό
4. Στη συνέχεια προστίθεται υπό ανάδευση από προχοΐδα 0,01 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ μέχρι να εξαφανιστεί το κυανό χρώμα
5. Η ογκομέτρηση επαναλαμβάνεται 2-3 φορές και εξάγεται ο μέσος όρος των καταναλώσεων του $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Ογκομέτρηση του ασκορβικού οξέος

1. Σε οικιακό αναδευτήρα (mixer multi) προστίθενται περίπου 25 g επεξεργασμένης σταφίδας
2. Προστίθενται 50 ml οξαλικού οξέος 0,4% w/v και ακολουθεί ανάδευση

3. Το μίγμα μεταφέρεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5 min στις 3000 στροφές
4. Παραλαμβάνεται το υπερκείμενο και διηθείται με διήθηση Buchner
5. Από το διήθημα μεταφέρονται 10 ml σε κωνική φιάλη των 250 ml και προστίθενται 15 ml δ/τος οξαλικού οξέος 0,4% w/v
6. Το όλο ογκομετρείται με το τιτλοδοτημένο δ/μα 0,04% w/v DPI από προχοΐδα μέχρις ότου εμφανιστεί ένα ελαφρό ρόδινο χρώμα
7. Η παραπάνω ογκομέτρηση επαναλαμβάνεται 2-3 φορές και εξάγεται ο μέσος όρος των μετρήσεων

Για το παραπάνω πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες ποσότητες σταφίδας:

Σταφίδα Βοστίτσα 3/08: 26,315g

Σταφίδα Μικρή (Small) 2008: 27,769g

Σταφίδα Μεσαία (Medium) 2008: 26,081g

Επίσης πραγματοποιήθηκε το πείραμα με πρότυπο ασκορβικού οξέος 0,01 mg/ml

4.3.6 Προσδιορισμός Λιποδιαλυτών βιταμινών

1. Σε δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα ζυγίζονται 5g βιολογικής επεξεργασμένης σταφίδας
2. Προστίθενται 15 ml εξάνιο
3. Ακολουθεί ανάδευση σε συσκευή Vortex για 5 περίπου λεπτά
4. Το δείγμα τοποθετείται στη συσκευή υπερήχων (sonicator) για 5 λεπτά
5. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 2500 στροφές
6. Παραλαμβάνεται το υπερκείμενο με πιπέτα Pasteur και μεταφέρεται σε σωλήνα των 50 ml.
7. Επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία άλλες 2 φορές (3 εκχυλίσσεις επί του συνόλου)
8. Ακολουθεί εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού
9. Προστίθεται 1ml χλωροφόρμιο/ μεθανόλη 1:1 (με BHT)
10. Το δείγμα διηθείται, τοποθετείται σε vial και αναλύεται με HPLC

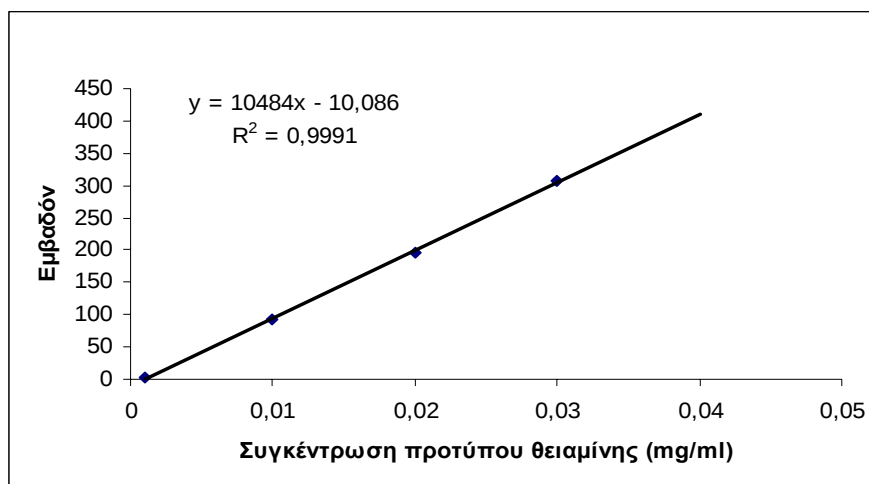
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Περιεκτικότητα της σταφίδας σε θειαμίνη

Ο προσδιορισμός της θειαμίνης (υδροχλωρικής) έγινε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC) μετά από παραγωγοποίηση. Στο σχήμα που ακολουθεί φαίνεται η καμπύλη αναφοράς της θειαμίνης.

Σχήμα 5.1 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για την θειαμίνη



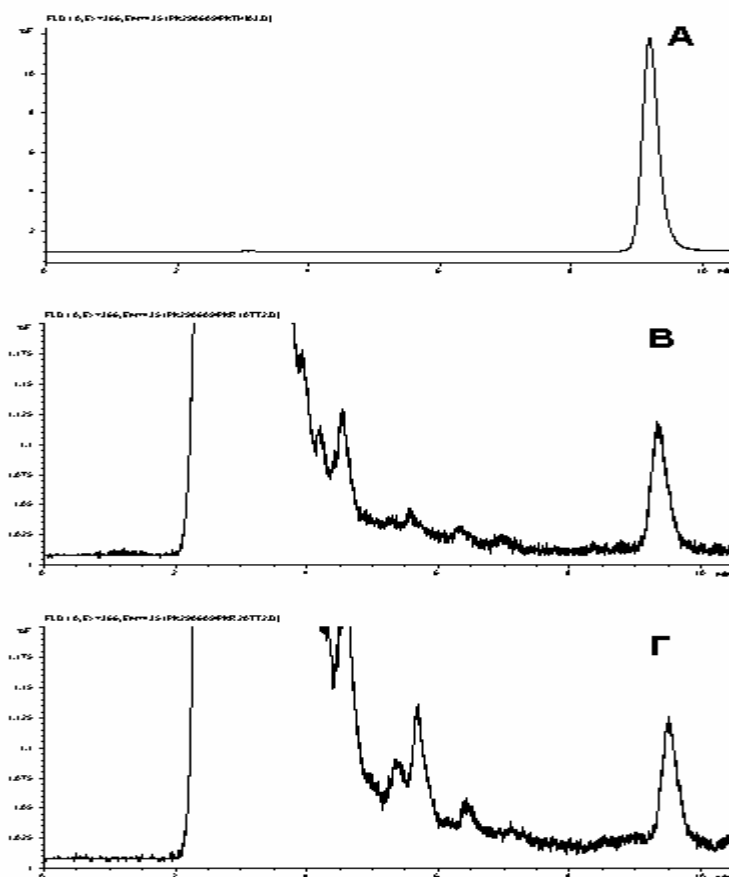
Στο σχήμα 5.2 παρουσιάζονται τυπικά χρωματογραφήματα από την ανάλυση της θειαμίνης (ως θειόχρωμα) με HPLC.

Σχήμα 5.2 Τυπικά χρωματογραφήματα από την ανάλυση θειαμίνης

A: Πρότυπο θειαμίνης (0,02 mg/ml)

B: Δείγμα βιολογικής σταφίδας

Γ: Δείγμα συμβατικής σταφίδας



Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα, στο χρωματογράφημα A που αντιστοιχεί στο πρότυπο υδροχλωρικής θειαμίνης φαίνεται η κορυφή της βιταμίνης. Στα χρωματογραφήματα B και Γ, τα οποία αντιστοιχούν στα δείγματα της βιολογικής και συμβατικής σταφίδας αντίστοιχα είναι εμφανείς οι κορυφές στον ίδιο χρόνο και επομένως συμπεραίνουμε ότι οι κορυφές αυτές αντιστοιχούν στη θειαμίνη.

Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σταφίδας σε θειαμίνη φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα. Όπως φαίνεται, δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά στο περιεχόμενο θειαμίνης ανάμεσα στη συμβατική και βιολογική σταφίδα.

Πίνακας 5.1: Περιεχόμενο συμβατικής και βιολογικής σταφίδας σε θειαμίνη

Δείγμα σταφίδας	Εμβαδόν κορυφής	Συγκέντρωση θειαμίνης (μg/ml)	Συγκέντρωση θειαμίνης μg/ 100 g σταφίδας
Βιολογική επεξεργασμένη	1,9	0,229	76,2
Συμβατική επεξεργασμένη	1,5	0,221	84,2
Συμβατική επεξεργασμένη ενισχυμένη (fortified)	27,7	3,604	-

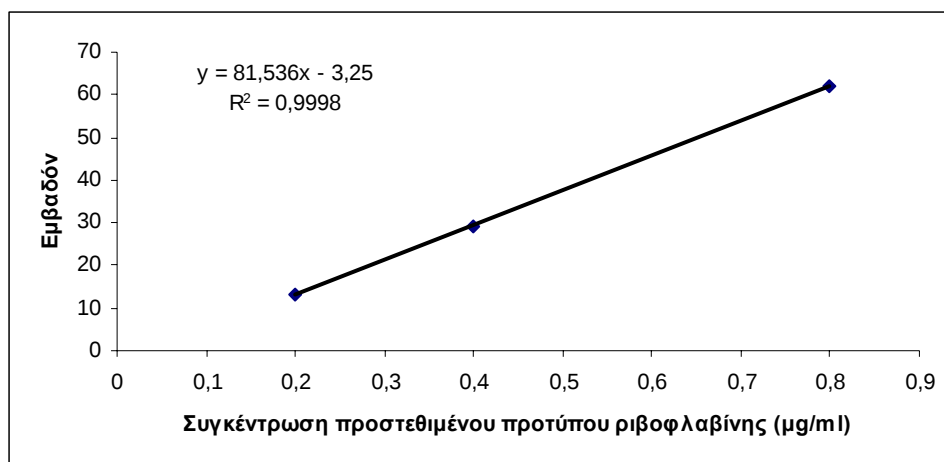
Στον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι στο ενισχυμένο δείγμα σταφίδας (fortified) η συγκέντρωση της θειαμίνης είναι μόλις 3,6 μg/ml. Με βάση τους υπολογισμούς η συγκέντρωση της βιταμίνης από το πρότυπο που προστέθηκε (χωρίς την ποσότητα θειαμίνης που περιέχεται στο δείγμα σταφίδας) θα έπρεπε να είναι περίπου 20 μg/ml. Αυτή η διαφορά πιθανότατα να οφείλεται στην καταστροφή της βιταμίνης λόγω της θέρμανσης (121°C) που υφίσταται κατά τη πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε. Βέβαια, το γεγονός αυτό εγείρει το ερώτημα αν κάποια ποσότητα της θειαμίνης που περιέχεται στη σταφίδα μπορεί να καταστραφεί κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Αυτό είναι πιθανόν να συμβαίνει, αλλά απαιτείται περαιτέρω μελέτη για να εξαχθούν ακριβή συμπεράσματα. Πάντως, μπορούμε να πούμε ότι η θειαμίνη που εμπεριέχεται στη σταφίδα πιθανότατα προστατεύεται από την καταστροφή από την υψηλή θερμοκρασία στην οποία υποβάλλεται καθώς η μέθοδος που ακολουθήθηκε αποτελεί μια μέθοδο ευρέως χρησιμοποιούμενη για τον προσδιορισμό της θειαμίνης σε διάφορα τρόφιμα.

5.2 Περιεκτικότητα της σταφίδας σε ριβοφλαβίνη

Ο προσδιορισμός της ριβοφλαβίνης έγινε χρησιμοποιώντας την Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης. Επειδή από την ανάλυση των δειγμάτων σταφίδας με HPLC δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός της ποσότητας ριβοφλαβίνης σε αυτά, καθώς βρίσκεται κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης (βλ. χρωματογραφήματα Α στα σχήματα 5.6 και 5.7) ακολουθήθηκε η διαδικασία παρασκευής ενισχυμένων δειγμάτων σταφίδας με διάφορες συγκεντρώσεις προτύπου ριβοφλαβίνης (standard addition).

Στο ακόλουθο σχήμα φαίνεται το διάγραμμα που ελήφθη μετά τη διαδικασία σταθερής προσθήκης προτύπου στο δείγμα συμβατικής επεξεργασμένης σταφίδας.

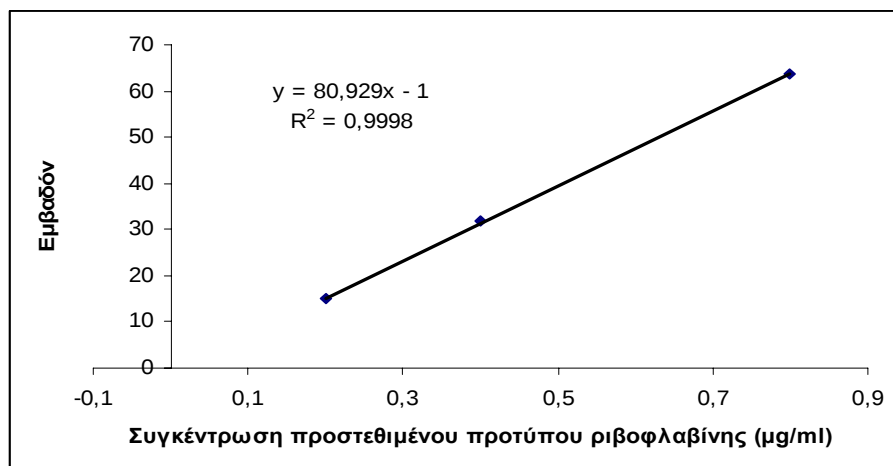
Σχήμα 5.3 Διάγραμμα μετά τη διαδικασία σταθερής προσθήκης προτύπου στο δείγμα συμβατικής επεξεργασμένης σταφίδας



Όπως φαίνεται από το σχήμα, η εξίσωση που προέκυψε δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ριβοφλαβίνης στο δείγμα σταφίδας (αρνητική τιμή του β στην εξίσωση $y=ax+\beta$). Για να αποκτήσουμε μια ένδειξη για το περιεχόμενο της σταφίδας σε ριβοφλαβίνη το εμβασδόν της κορυφής της ριβοφλαβίνης προσδιορίστηκε με άλλο πρόγραμμα (Adobe Acrobat).

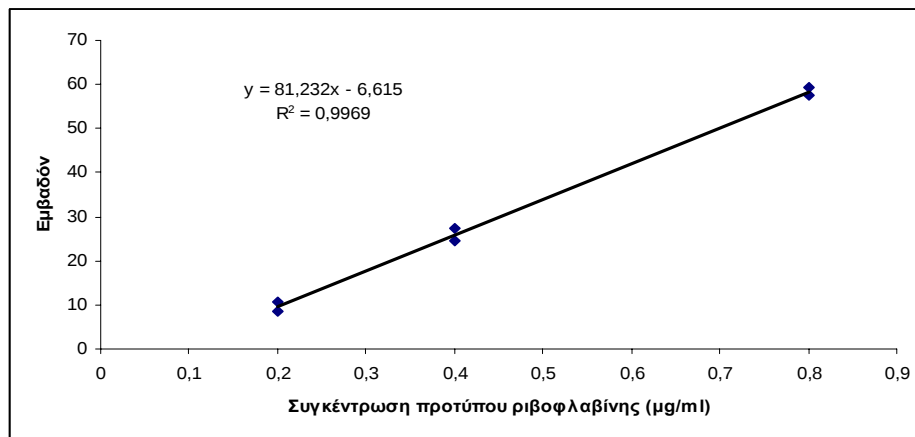
Στο ακόλουθο σχήμα φαίνεται το διάγραμμα που ελήφθη μετά τη διαδικασία σταθερής προσθήκης προτύπου στο δείγμα βιολογικής επεξεργασμένης σταφίδας.

Σχήμα 5.4 Διάγραμμα μετά τη διαδικασία σταθερής προσθήκης προτύπου στο δείγμα βιολογικής επεξεργασμένης σταφίδας



Στο ακόλουθο σχήμα (σχήμα 5.5) φαίνεται η καμπύλη αναφοράς της ριβοφλαβίνης. Η καμπύλη αναφοράς προέκυψε μετά από αφαίρεση του εμβαδού της κορυφής του δείγματος από το εμβαδόν της κορυφής του κάθε ενισχυμένου δείγματος και ακολούθως με αντιστοίχιση της συγκέντρωσης του εκάστοτε προτύπου.

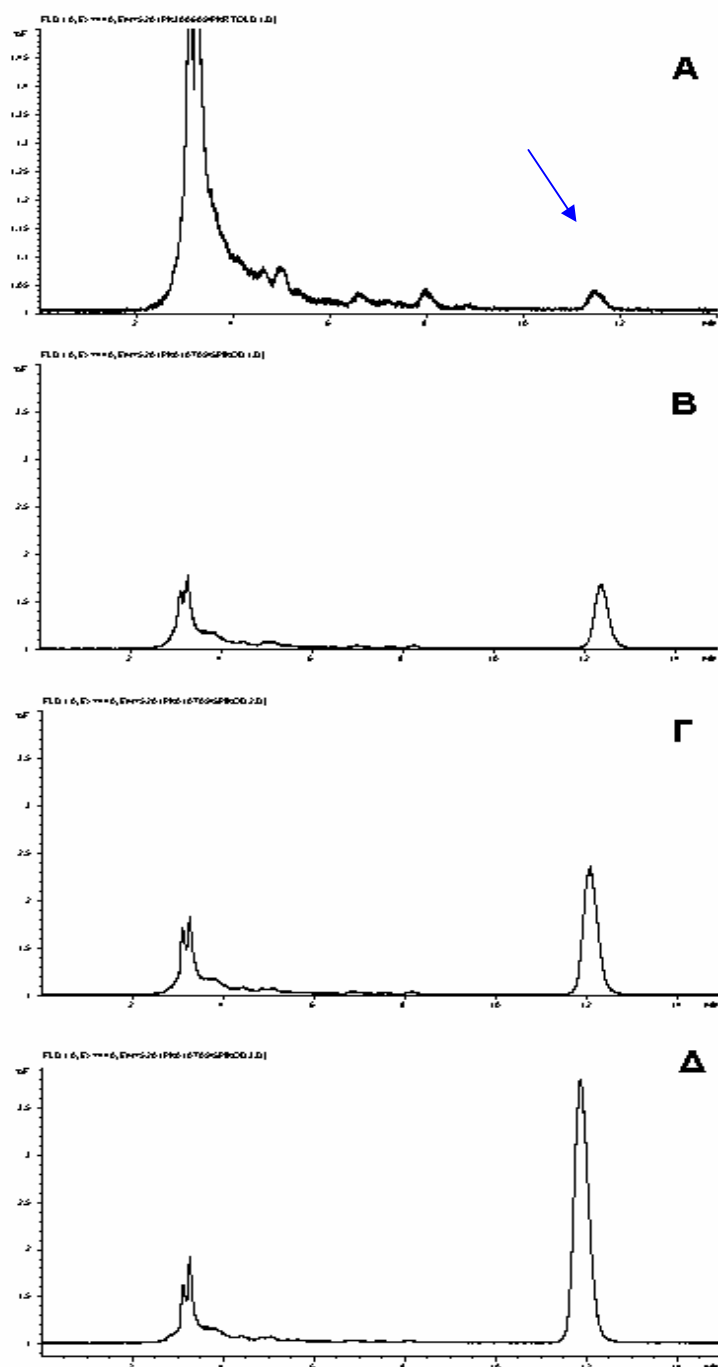
Σχήμα 5.5 Καμπύλη αναφοράς ριβοφλαβίνης



Στα ακόλουθα σχήματα φαίνονται τα τυπικά χρωματογραφήματα από την ανάλυση της ριβοφλαβίνης σε δείγματα βιολογικής και συμβατικής σταφίδας.

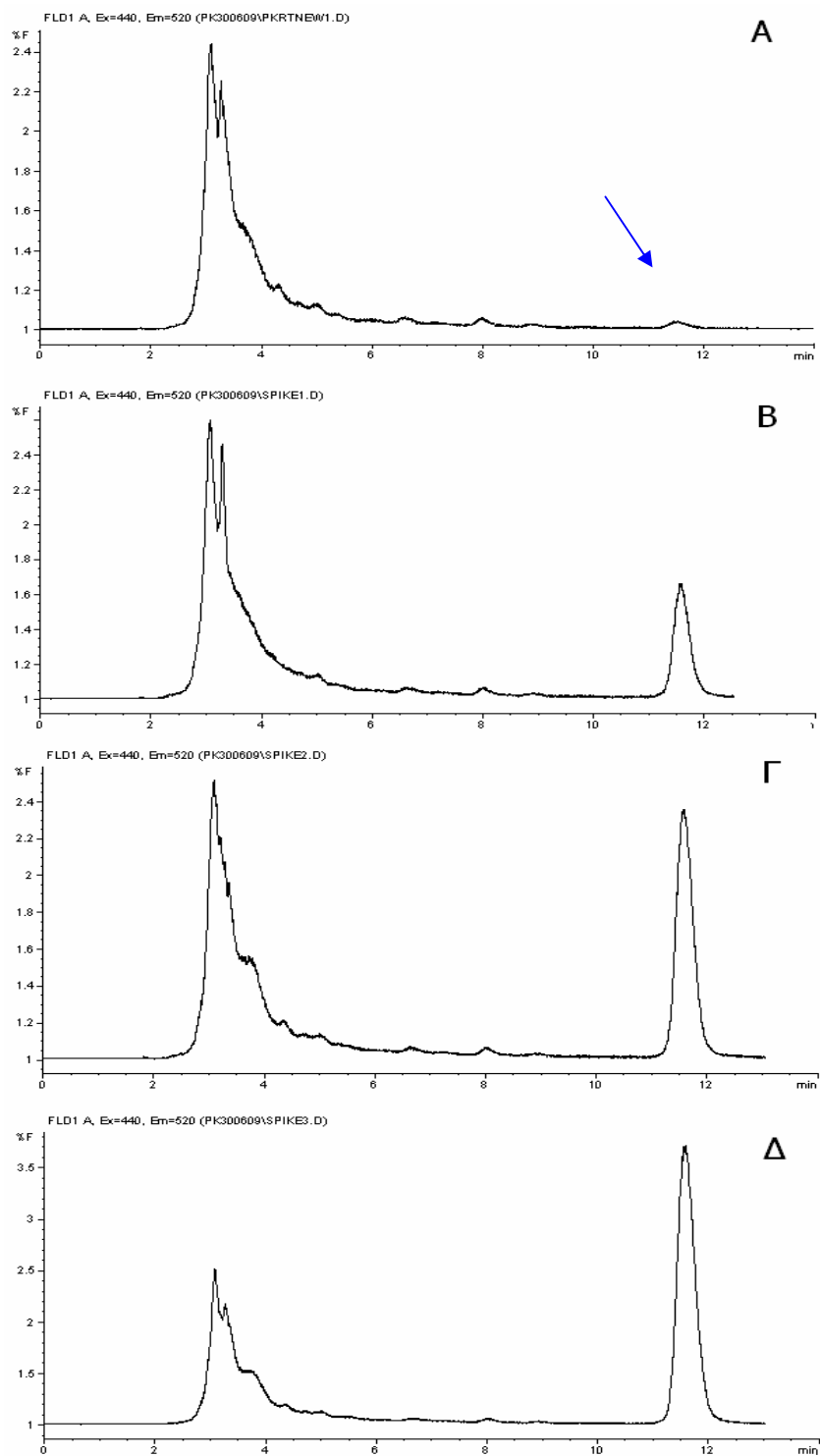
Σχήμα 5.6 Τυπικά χρωματογραφήματα από την ανάλυση ριβοφλαβίνης σε δείγματα βιολογικής σταφίδας

A: Δείγμα βιολογικής σταφίδας B: Δείγμα με προσθήκη προτύπου ($C=0,2 \text{ mg/ml}$) (Spike 1) Γ: Δείγμα με προσθήκη προτύπου ($C=0,4 \text{ mg/ml}$) (Spike 2) Δ: Δείγμα με προσθήκη προτύπου ($C=0,8 \text{ mg/ml}$) (Spike 3)



Σχήμα 5.7 Τυπικά χρωματογραφήματα από την ανάλυση ριβοφλαβίνης σε δείγμα συμβατικής επεξεργασμένης σταφίδας

A: Δείγμα συμβατικής σταφίδας B: Δείγμα με προσθήκη προτύπου ($C=0,2 \text{ mg/ml}$) (Spike 1) Γ: Δείγμα με προσθήκη προτύπου ($C=0,4 \text{ mg/ml}$) (Spike 2) Δ: Δείγμα με προσθήκη προτύπου ($C=0,8 \text{ mg/ml}$) (Spike 3)



Όπως φαίνεται από τα παραπάνω σχήματα, στα χρωματογραφήματα Α, τα οποία αντιστοιχούν στα δείγματα βιολογικής και συμβατικής σταφίδας φαίνονται οι κορυφές της ριβοφλαβίνης (βέλη). Ωστόσο, τα εμβαδά των κορυφών είναι πολύ μικρά και μη μετρήσιμα μέσω του προγράμματος ανάλυσης και επεξεργασίας δεδομένων του HPLC. Τα χρωματογραφήματα Β, Γ και Δ αντιστοιχούν σε δείγματα σταφίδας όπου ακολουθήθηκε η διαδικασία σταθερής προσθήκης προτύπου ριβοφλαβίνης (standard addition). Στα χρωματογραφήματα αυτά παρατηρούμε την αύξηση του εμβαδού της κορυφής καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του προτύπου ριβοφλαβίνης στο δείγμα.

Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζεται το περιεχόμενο της συμβατικής και βιολογικής σταφίδας σε ριβοφλαβίνη. Η ποσοτικοποίηση έγινε χρησιμοποιώντας τα εμβαδά των κορυφών της ριβοφλαβίνης που μετρήθηκαν με το πρόγραμμα Adobe Acrobat και την εξίσωση που προέκυψε από την καμπύλη αναφοράς της ριβοφλαβίνης.

Πίνακας 5.2: Περιεχόμενο συμβατικής & βιολογικής σταφίδας σε ριβοφλαβίνη

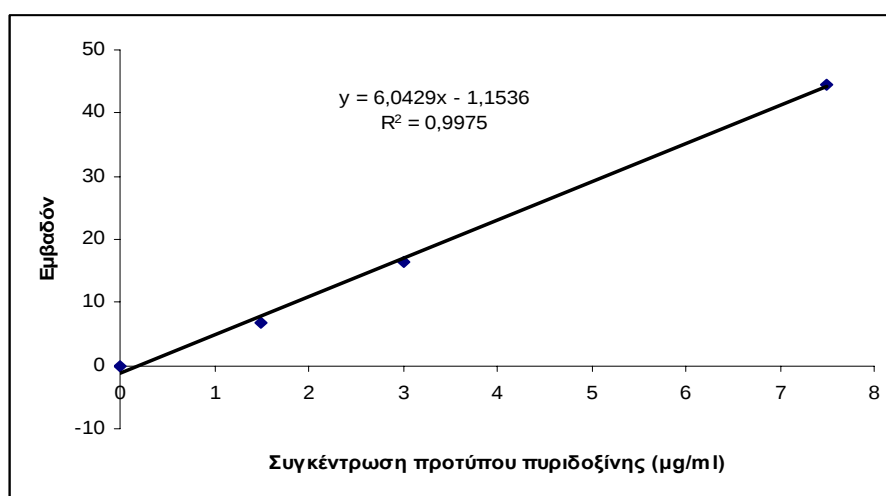
Δείγμα σταφίδας	Εμβαδόν κορυφής	Συγκέντρωση ριβοφλαβίνης (μg/ml)	Συγκέντρωση ριβοφλαβίνης μg/ 100 g σταφίδας
Βιολογική επεξεργασμένη	4,38	0,1353	45,1
Συμβατική επεξεργασμένη	4,60	0,1381	52,6

5.3 Περιεκτικότητα της σταφίδας σε Βιταμίνη B6

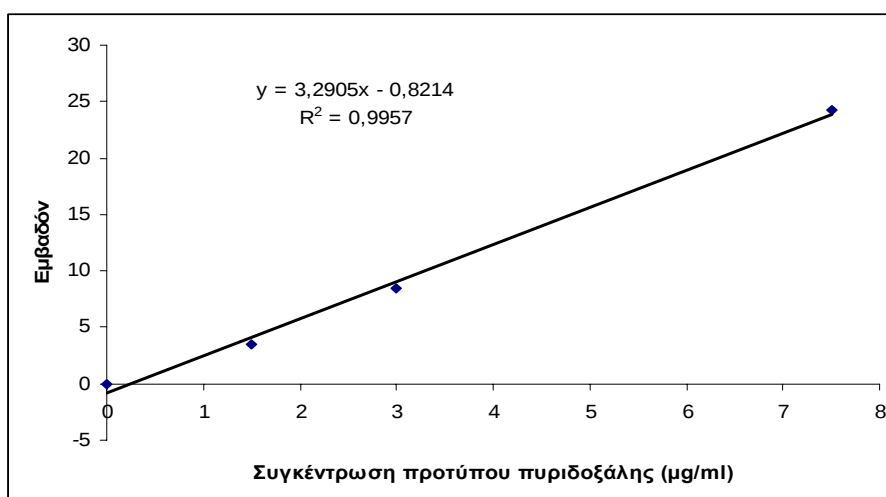
Ο προσδιορισμός της βιταμίνης B6 πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC).

Στα σχήματα που ακολουθούν φαίνονται οι καμπύλες αναφοράς για την πυριδοξίνη, πυριδοξάλη και πυριδοξαμίνη, τις 3 κύριες μορφές (βιταμερή) της βιταμίνης B6.

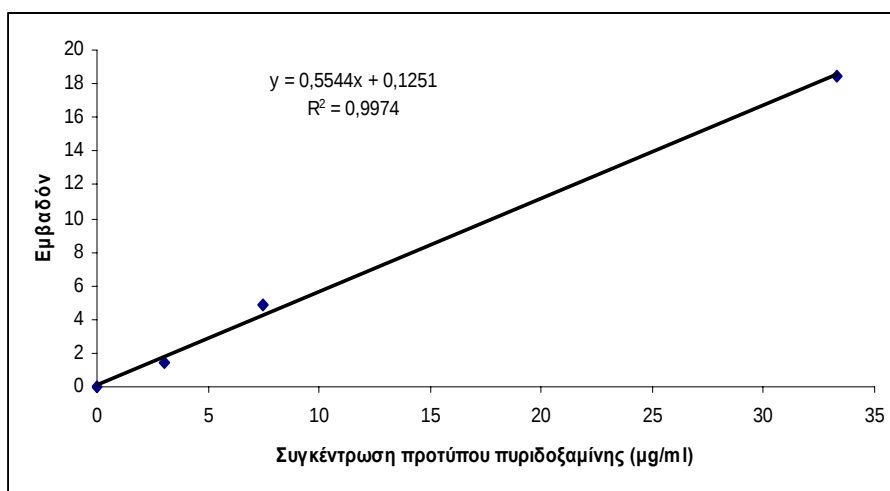
Σχήμα 5.8 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για την πυριδοξίνη



Σχήμα 5.9 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για την πυριδοξάλη



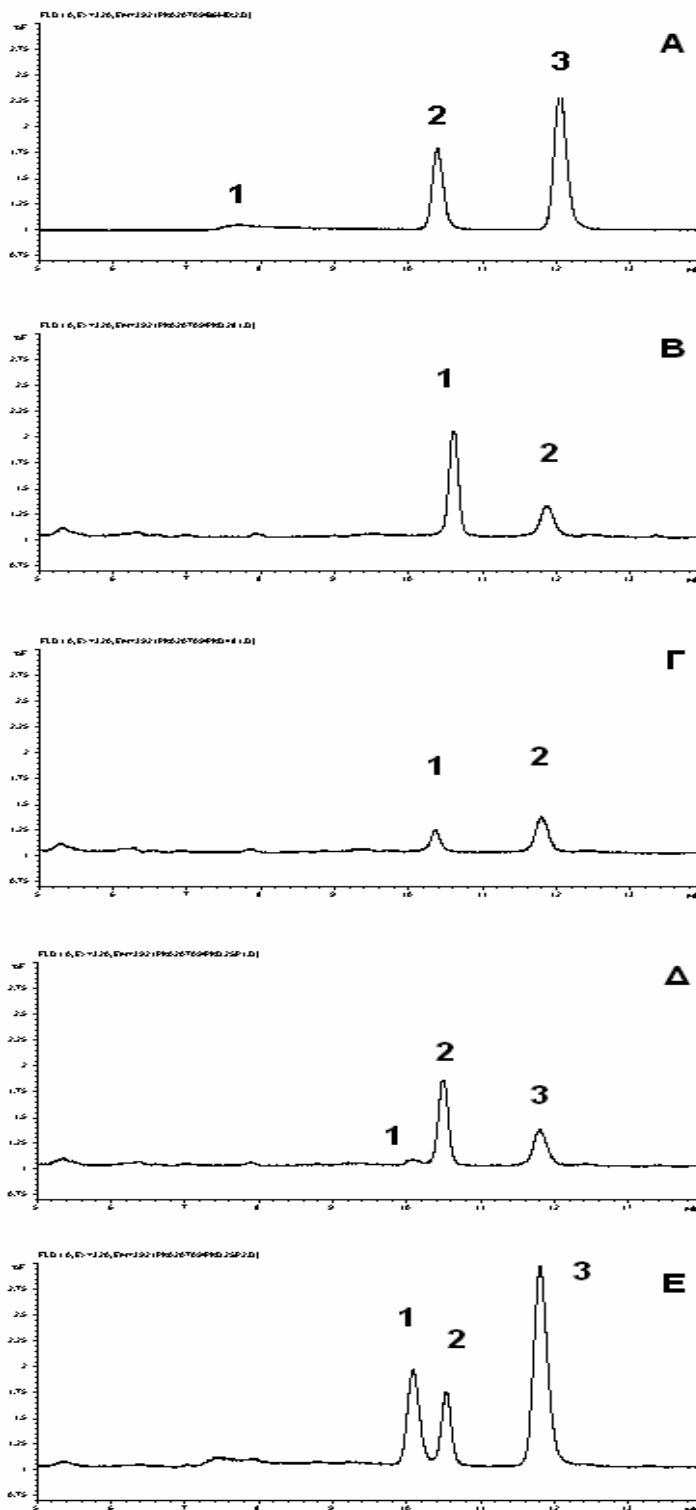
Σχήμα 5.10 Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για την πυριδοξαμίνη



Στο σχήμα που ακολουθεί φαίνονται τα τυπικά χρωματογραφήματα που προέκυψαν από την ανάλυση της βιταμίνης B6 σε δείγμα συμβατικής σταφίδας.

Σχήμα 5.11 Τυπικά χρωματογραφήματα από την ανάλυση βιταμίνης B6 σε δείγμα συμβατικής σταφίδας.

A: Πρότυπο βιταμίνης B: Δείγμα σταφίδας μετά από ενζυμική κατεργασία με όξινη φωσφατάση (Δ2) Γ: Δείγμα σταφίδας μετά από ενζυμική κατεργασία με όξινη φωσφατάση & β-γλυκοζιδάση (Δ4) Δ: Δείγμα με προσθήκη προτύπου (Cκάθε βιταμερούς = 0,3 μg/ml) (Spike 1) E: Δείγμα με προσθήκη προτύπου (Cκάθε βιταμερούς = 2,8 μg/ml) (Spike 2)



Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα, στο χρωματογράφημα Α (πρότυπο) φαίνονται οι 3 κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν στις 3 μορφές (βιταμερή) της βιταμίνης Β6. Συγκεκριμένα, η κορυφή 1 αντιστοιχεί στην πυριδοξαμίνη, η κορυφή 2 στην πυριδοξάλη και η κορυφή 3 στην πυριδοξίνη.

Στα χρωματογραφήματα Δ και Ε, τα οποία αντιστοιχούν στα δείγματα σταφίδας όπου έγινε προσθήκη μίγματος προτύπων των 3 βιταμερών, παρατηρείται η εμφάνιση της κορυφής 1, η οποία πιθανότατα αντιστοιχεί στην πυριδοξάλη, ενώ οι κορυφές 2 και 3 αντιστοιχούν στις γλυκοζυλιωμένες μορφές της βιταμίνης και την πυριδοξίνη αντίστοιχα. Επομένως, είναι φανερό ότι δεν υπάρχει πυριδοξάλη στο δείγμα σταφίδας ή ενδεχομένως δεν ήταν δυνατή η ανίχνευσή της με τη μέθοδο που ακολουθήθηκε.

Επιπλέον, στο χρωματογράφημα Γ (δείγμα σταφίδας μετά από ενζυμική κατεργασία με όξινη φωσφατάση & β-γλυκοζιδάση) παρατηρούμε ότι το εμβαδόν της κορυφής 1 μειώνεται αρκετά σε σχέση με το εμβαδόν της κορυφής 1 στο χρωματογράφημα Β (δείγμα σταφίδας μετά από ενζυμική κατεργασία μόνο με όξινη φωσφατάση), ενώ το εμβαδόν της κορυφής 2 αυξάνεται. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί ως εξής: Η κορυφή 1 στα χρωματογραφήματα Β και Γ αντιστοιχεί κατά πάσα πιθανότητα στις γλυκοζυλιωμένες μορφές της βιταμίνης Β6 και επομένως μετά από τη δράση της β-γλυκοζιδάσης κάποια ποσότητα των μορφών αυτών μετατράπηκε σε πυριδοξίνη.

Επομένως, είναι φανερό από τα παραπάνω ότι στο δείγμα σταφίδας που μελετήθηκε διαπιστώθηκε η παρουσία μόνο πυριδοξίνης και πιθανόν κάποιων γλυκοζυλιωμένων μορφών της βιταμίνης και η απουσία τόσο πυριδοξάλης όσο και πυριδοξαμίνης.

Στον ακόλουθο πίνακα φαίνεται το περιεχόμενο της συμβατικής επεξεργασμένης σταφίδας σε πυριδοξίνη, καθώς και η απουσία των δύο άλλων βιταμερών της βιταμίνης Β6.

Πίνακας 5.3: Περιεχόμενο συμβατικής σταφίδας σε πυριδοξίνη, πυριδοξάλη & πυριδοξαμίνη

Δείγμα σταφίδας	Συγκέντρωση πυριδοξίνης μg/100 g σταφίδας	Συγκέντρωση πυριδοξάλης μg/100 g σταφίδας	Συγκέντρωση πυριδοξαμίνης μg/100 g σταφίδας
Δ1	327,9	-	-
Δ2	327,9	-	-
Δ3	354,4	-	-
Δ4	374,2	-	-

5.4 Περιεκτικότητα της σταφίδας σε ασκορβικό οξύ

Για τον προσδιορισμό του ασκορβικού οξέος δε χρησιμοποιήθηκε η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC) αλλά μια ογκομετρική μέθοδος.

Ο ακόλουθος πίνακας παρουσιάζει τους όγκους του 0,01N Na₂S₂O₃ που καταναλώθηκαν κατά τη τιτλοδότηση του διαλύματος της 2,6-διχλωρο-φαινυλο-ινδο-φαινόλης (DPI) και τους όγκους του τιτλοδοτημένου διαλύματος DPI που καταναλώθηκαν κατά την ογκομέτρηση του ασκορβικού οξέος στα τρία δείγματα σταφίδας που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 5.4: Τιτλοδότηση δ/τος DPI και ογκομέτρηση ασκορβικού οξέος

	Τιτλοδότηση DPI (β)	Ογκομέτρηση προτύπου Asc. Ac.(α _π)	Ογκομέτρηση δείγματος συμβατικής Βοστίτσας (α ₁)	Ογκομέτρηση δείγματος small (α ₂)	Ογκομέτρηση δείγματος medium (α ₃)
1	1,2 ml	0,9 ml	0,9 ml	0,5 ml	0,8 ml
2	1 ml	0,9 ml	0,7 ml	0,5 ml	0,9 ml
3	1 ml	0,9 ml	-	-	-
M.O.	1,06 ml	0,9 ml	0,8 ml	0,5 ml	0,85 ml

Για τον υπολογισμό του ασκορβικού οξέος χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος:

$$\text{mg As.Ac./ ml} = \alpha \times \beta \times 0,088 \times 1/10$$

Αντικαθιστώντας στον παραπάνω τύπο τις τιμές που προέκυψαν για κάθε δείγμα (πίνακας 5.4) προκύπτουν τα αποτελέσματα για το περιεχόμενο σε ασκορβικό οξύ των τριών δειγμάτων σταφίδας που χρησιμοποιήθηκαν, τα οποία παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 5.5: Περιεχόμενο 3 δειγμάτων συμβατικής σταφίδας Βοστίτσας σε ασκορβικό οξύ

Δείγμα σταφίδας	Συγκέντρωση ασκορβικού οξέος mg/100g σταφίδας
Συμβατική σταφίδα Βοστίτσα 3/08	1,42
Συμβατική σταφίδα Βοστίτσα Small 2008	0,84
Συμβατική σταφίδα Βοστίτσα Medium 2008	1,52

Παρατηρείται μια μεγάλη διαφορά στη συγκέντρωση ασκορβικού οξέος ανάμεσα στα δείγματα της σταφίδας small και medium. Αυτό είναι πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι η σταφίδα small είναι πιο επιρρεπής στην καταστροφή των βιταμινών που περιέχει λόγω της μεγαλύτερης επιφάνειάς της για μια δεδομένη μάζα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δεδομένου του υπάρχοντος κενού στην επιστημονική βιβλιογραφία, με την παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να προσδιοριστούν (ποιοτικά και ποσοτικά) οι βιταμίνες στην Κορινθιακή σταφίδα και μάλιστα στη σταφίδα Βοστίτσα (vostizza).

Είναι γνωστό ότι η χώρα μας εξακολουθεί να παράγει το 80-90% της παγκόσμιας παραγωγής Κορινθιακής σταφίδας. Κατά συνέπεια μπορούμε να πούμε ότι η Κορινθιακή Σταφίδα αποτελεί μονοπωλιακό προϊόν για τη χώρα μας και το γεγονός αυτό αυξάνει τις ευθύνες και τις υποχρεώσεις για τη συνέχεια της καλλιέργειας αυτής, όχι τόσο για την ιστορία του προϊόντος, αλλά για τη διατροφική του αξία. Το γεγονός αυτό ενισχύει ακόμα περισσότερο τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής καθώς φανερώνουν τη σημασία του εγχειρήματος της ενασχόλησης με αυτό το προϊόν.

Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι για πρώτη φορά ανιχνεύτηκαν στην Κορινθιακή σταφίδα *vostizza* 4 υδατοδιαλυτές βιταμίνες (θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, πυριδοξίνη και ασκορβικό οξύ).

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη μπορούν να συνοψιστούν στα εξής:

- ✓ Παρουσία θειαμίνης και ριβοφλαβίνης τόσο στη βιολογική όσο και στη συμβατική σταφίδα
- ✓ Παρουσία πυριδοξίνης στη συμβατική σταφίδα (Η βιολογική σταφίδα δεν μελετήθηκε)
- ✓ Απουσία των άλλων δυο μορφών βιταμίνης Β6 (πυριδοξάλης και πυριδοξαμίνης) στη συμβατική σταφίδα
- ✓ Παρουσία ασκορβικού οξέος και στα 3 διαφορετικά δείγματα συμβατικής επεξεργασμένης σταφίδας που μελετήθηκαν, αλλά σε διαφορετικές συγκεντρώσεις
- ✓ Καταστροφή πρόσθετου προτύπου θειαμίνης στο δείγμα σταφίδας μετά από θέρμανση που υπέστη κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας
- ✓ Πιθανή παρουσία γλυκοζυλιωμένων μορφών της βιταμίνης Β6 και συγκεκριμένα της πυριδοξίνης στα δείγματα σταφίδας που μελετήθηκαν.

Άλλωστε είναι γνωστή η παρουσία γλυκοζυλιωμένων μορφών της βιταμίνης στα φυτικά τρόφιμα.

Στο σημείο αυτό θα ήταν χρήσιμη μια σύγκριση της συγκέντρωσης των 4 βιταμινών που ανιχνεύτηκαν στην Κορινθιακή σταφίδα *vostizza* με τις συγκεντρώσεις που δίνονται από τον USDA για την ποικιλία Κορινθιακής σταφίδας *zante*. Να σημειωθεί, ωστόσο, ότι τα δεδομένα του USDA χρησιμοποιούνται για τη σύγκριση καθώς δεν υπάρχουν ελληνικές πηγές για την περιεκτικότητα της Κορινθιακής σταφίδας σε βιταμίνες.

Πίνακας 6.1: Σύγκριση τιμών περιεχομένου σε θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, πυριδοξίνη και ασκορβικό οξύ με τις τιμές που δίνονται από τη βάση τροφίμων του USDA.

Βιταμίνη	Σταφίδα Βοστίτσα συμβατική	Σταφίδα Βοστίτσα βιολογική	Currants, zante, dried (Vitis Vinifera)
Θειαμίνη μg/ 100 g σταφίδας	84,2	76,2	160
Ριβοφλαβίνη μg/ 100 g σταφίδας	52,6	45,1	142
Πυριδοξίνη μg/ 100 g σταφίδας	364,3	-	296
Ασκορβικό οξύ mg/ 100 g σταφίδας	1,3	-	4,7

Από τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνεται ότι οι τιμές που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη είναι τις ίδιες τάξης μεγέθους με αυτές που αναφέρονται στη βάση τροφίμων του USDA. Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη, επίσης, ότι τα δύο είδη σταφίδας που συγκρίνονται είναι λογικό να παρουσιάζουν διαφορές όσον αφορά το περιεχόμενό τους σε θρεπτικά συστατικά για τους εξής λόγους:

Πρώτον, τα εδάφη στα οποία καλλιεργούνται παρουσιάζουν διαφορές με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η περιεκτικότητά των δύο ποικιλιών σε θρεπτικά συστατικά. Επίσης, η ξήρανση και η κατεργασία του προϊόντος πιθανόν να μη γίνεται στις ίδιες συνθήκες περιβάλλοντος (θερμοκρασία, υγρασία κτλ.). Επιπλέον, δε γνωρίζουμε εάν το δείγμα σταφίδας που μελετήθηκε από τον USDA είχε καλλιεργηθεί στον ελλαδικό χώρο ή απλά πρόκειται για ποικιλία της Κορινθιακής σταφίδας *zante* που καλλιεργήθηκε στις ΗΠΑ.

Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη όλους τους παραπάνω περιορισμούς, δεν μπορούμε να κάνουμε ακριβή σύγκριση των τιμών των βιταμινών αλλά απλά μια παρατήρησή τους.

Μια άλλη σύγκριση που μπορούμε να επιχειρήσουμε, με τους περιορισμούς που αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι αυτή του περιεχομένου σε βιταμίνες της Κορινθιακής σταφίδας και διαφόρων άλλων φρούτων που καταναλώνονται ευρέως στη χώρα μας. Παρά το γεγονός ότι οι διαδικασίες επεξεργασίας της σταφίδας δεν υπόσχονται την παρουσία βιταμινών σε αυτό το προϊόν σε μεγάλες ποσότητες, από τους παρακάτω πίνακες φαίνεται ότι η σταφίδα μπορεί να συγκριθεί με άλλα φρούτα ευρείας κατανάλωσης.

Πίνακας 6.2: Σύγκριση περιεχομένου σε ασκορβικό οξύ διαφόρων φρούτων (Πηγή USDA)

Φρούτο	Συγκέντρωση βιταμίνης mg/100 g
Φράουλες	58,8
Πορτοκάλι	45,0
Σταφύλι	10,8
Βερίκοκα	10,0
Μπανάνα	8,7
Κεράσια	7,0
Ροδάκινα	6,6
Σταφίδα zante	4,7
Μήλα	4,6
Αχλάδι	4,2
Σταφίδα vostizza	1,3
Δαμάσκηνα αποξηραμένα	0,0

Πίνακας 6.3: Σύγκριση περιεχομένου σε θειαμίνη διαφόρων φρούτων (Πηγή USDA)

Φρούτο	Συγκέντρωση βιταμίνης mg/100 g
Σταφίδα zante	0,160
Δαμάσκηνα αποξηραμένα	0,118
Πορτοκάλι	0,100
Σταφίδα vostizza	0,084
Σταφύλι	0,069
Μπανάνα	0,031
Βερίκοκα	0,030
Κεράσια	0,027
Ροδάκινα	0,024
Φράουλες	0,024
Μήλα	0,017
Αχλάδι	0,012

Πίνακας 6.4: Σύγκριση περιεχομένου σε ριβοφλαβίνη διαφόρων φρούτων
(Πηγή USDA)

Φρούτο	Συγκέντρωση βιταμίνης mg/100 g
Δαμάσκηνα αποξηραμένα	0,165
Σταφίδα zante	0,142
Μπανάνα	0,073
Σταφύλι	0,070
Σταφίδα vostizza	0,053
Πορτοκάλι	0,040
Βερίκοκα	0,040
Κεράσια	0,033
Ροδάκινα	0,031
Μήλα	0,026
Αχλάδι	0,025
Φράουλες	0,022

Πίνακας 6.5: Σύγκριση περιεχομένου σε βιταμίνη B6 διαφόρων φρούτων
(Πηγή USDA)

Φρούτο	Συγκέντρωση βιταμίνης mg/100 g
Δαμάσκηνα αποξηραμένα	0,745
Μπανάνα	0,367
Σταφίδα vostizza	0,364
Σταφίδα zante	0,296
Σταφύλι	0,086
Βερίκοκα	0,054
Πορτοκάλι	0,051
Κεράσια	0,049
Φράουλες	0,047
Μήλα	0,041
Αχλάδι	0,028
Ροδάκινα	0,025

Συμπεράσματα

1. Αναπτύχθηκαν μέθοδοι για τον προσδιορισμό υδατοδιαλυτών βιταμινών στη σταφίδα Βοστίτσα.
2. Ανιχνεύτηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν για πρώτη φορά 4 υδατοδιαλυτές βιταμίνες στη σταφίδα Βοστίτσα.
3. Βρέθηκε ότι παρότι πρόκειται για αποξηραμένο φρούτο, εξακολουθεί να περιέχει υδατοδιαλυτές βιταμίνες και μάλιστα ενίοτε σε ποσότητες που είναι αντίστοιχες ή και μεγαλύτερες αυτών που περιέχονται σε ευρέως καταναλούμενα φρούτα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Addo C. and Augustin J.: Changes in the vitamin B6 content in potatoes during storage. *J. Food Sci.* **1988**, 53(3): 749-752.
2. AOAC (1990a) Vitamin D in fortified milk and milk powder. Official Methods of Analysis 15th edition, Method 981.17, pp. 1068-1069.
3. AOAC (1990c) Official Methods of Analysis, 15th Edition, Section 943.23, pp. 1049-1051.
4. AOAC (1990e) Official Methods of Analysis, 15th Edition. Section 944.13, pp. 1084-1085.
5. AOAC (1990f) Official Methods of Analysis, 15th Edition. Section 961.15, pp. 1089-1091.
6. Arella F., Lahely S., Bourguignon J. B., Hasselman C.: Liquid chromatographic determination of vitamins B1 and B2 in foods. A collaborative study. *Food Chem.* **1996**, 56 (1): 81-86.
7. Bell J.G.: Microbiological assay of vitamins of the B-group in foodstuffs. *Laboratory Prac.* **1984**, 23: 235-42.
8. Bell J.G. and Christie A.A.: Gas-liquid chromatographic determination of vitamin D in cod-liver oil. *Analyst* **1973**, 98: 268-273.
9. Bergaentzle' M. Arella F., Bourguignon J.B., Hasselmam C.: Determination of vitamin B6 in foods by HPLC-a collaborative study. *Food Chem.* **1995**, 52: 81-86.
10. Bertelsen G, Finglas P.M, Loughridge J., Faulks R.M., Morgan M.R.A.: Investigation into the effects of conventional cooking on levels of thiamin and pantothenic acid in chicken. *Food Sci. Nutr.* **1988**, 42F: 83-96.
11. Botticher B. and Botticher D.: Simple rapid determination of thiamin by HPLC method in foods, body fluids and faeces. *Internat. J. Vitamin Nutr. Res.* **1986**, 56: 155-159.
12. Burini Giovanni: Development of a quantitative method for the analysis of total L-ascorbic acid in foods by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **2007**, 1154: 97-102.

13. Chaira N., Ferchichi A., Mrabet A. Sghairoun M.: HPLC determination of Thiamin and Riboflavin in date of Tunisia date palm varieties (*Phoenix dactylifera* L.), *SIPAM* 2006.
14. Chiou A., Karathanos V. T., Mylona A., Salta F. N., Preventi F., Andrikopoulos N. K.: Currants (*Vitis vinifera* L.) content of simple phenolics and antioxidant activity *Food Chem* **2007**, 102: 516–522.
15. De Lorgeril M., Salen P., Paillard P., Laporte P., Boucher P., De Leiris J.: Mediterranean diet and the French Paradox: Two distinct biogeographic concepts for one consolidated scientific theory on the role of nutrition in coronary heart disease. *Cardiovasc. Res.* **2002**, 54: 503-515.
16. Deutsch M.J. and Weeks C.E.: Microfluorimetric Assay for Vitamin C. *J. Assoc. Official Anal. Chem.* **1965**, 48(6): 1249-1256.
17. Fellman J.K., Artz W.E., Tassinari P.D., Cole C.I., Augustin J.: Simultaneous determination of thiamin and riboflavin in selected foods by high performance liquid chromatography. *J. Food Sci.* **1982**, 47: 2048-2050.
18. Finglas P.M. and Faulks R.M.: Nutritional composition of UK retail potatoes, both raw and cooked. *J. Sci. Food Agric.* **1984**, 35: 1347-1356.
19. Furusawa Naoto: Rapid high-performance liquid chromatographic identification/quantification of total vitamin C in fruit drinks. *Food Control* **2001**, 12: 27-29.
20. Gonthier A., Fayol V., Viollet J., Hartmann D. J.: Determination of pantothenic acid in foods: influence of the extraction method. *Food Chem.* **1998**, 63(2): 287-294.
21. Gregory J.F., Sartain D.B., Day B.P.F.: Fluorometric determination of folacin in biological materials using high performance liquid chromatography. *J. Nutr.* **1984**, 114: 341-353.
22. Hasselmann C., Franck D., Grimm P., Diop P.A, Soules C.: High performance liquid chromatographic analysis of thiamin and riboflavin in dietetic foods. *J. Micro Anal.* **1989**, 5: 269-279.
23. Heinonen M.I., Ollilainen V., Linkola E.K., Varo R.T., Koivistoinen R.E.: Carotenoids in Finnish Foods: Vegetables, Fruits and Berries. *J. Agric. Food. Chem.* **1989**, 37: 655-659.

24. Hernández Y., Gloria Lobo M., González M.: Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods. *Food Chem* **2006**, 96: 654-664.
25. Hirayama S. and Maruyama M.: Determination of a small amount of niacin in foodstuffs by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **1991**, 588: 171-175.
26. Howard A, Chorpa M, Thurnham D.I., Strain J.J, Fuhrman B., Aviram M: Red wine consumption and inhibition of LDL oxidation: what are the important components? *Medical Hypoth* **2002**, 59(1): 101-104.
27. <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>
28. Kaliora A. C., Kountouri A. M., Karathanos V. T.: Effect of Greek Raisins (*Vitis Vinifera* L.) from different origins on gastric cancer cell growth. *Nutrition and Cancer* **2008**, 60(6): 792-799.
29. Kall M. A.: Determination of total vitamin B6 in foods by isocratic HPLC: a comparison with microbiological analysis. *Food Chem* **2003**, 82: 315-327.
30. Kall M. A., Andersen C.: Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples. *J Chromatogr B*, **1999**, 730: 101–111.
31. Karadeniz F., Durst RW, Wrolstad RE: Polyphenolic composition of raisins. *J Agric Food Chem* **2000**, 48: 5343-5350.
32. Karatas F. and Kamisli F.: Variations of vitamins (A, C and E) and MDA in apricots dried in IR and microwave. *J Food Eng*, **2007**, 78: 662-668.
33. Karathanos V.T.: Determination of water content of dried food by drying kinetics. *J Food Eng*. **1999**, 39: 337-344.
34. Lahély S, Bergaentzle M., Hasselmann C.: Fluorimetric determination of niacin in foods by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization. *Food Chem.* **1999**, 65: 129-133.
35. Lahély S., Ndaw S., Arella F., Hasselmann C.: Determination of biotin in foods by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorimetric detection. *Food Chem* **1999**, 65: 253-258.
36. Lumley I.D.: Vitamin analysis in foods, *The technology of Vitamins in Food*, **1993**.

37. Lumley I.D. and Lawrance P.R.: Advances in the determination of vitamins in foodstuffs-methods used at the Laboratory of the Government Chemist. *J. Micro Anal.* **1990**, 7: 301-313.
38. Lumley I.D. and Wiggins R.A.: Determination of riboflavin and flavinmononucleotide in foodstuffs using high performance liquid chromatography and a column enrichment technique. *Analyst* **1981**, 106:1103-1108.
39. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C.: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans: I. review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* **2005**, 81: 230-242.
40. McRoberts L.H.: Determination of thiamin in enriched cereal and bakery products. *J. Assoc. Official Anal. Chem.* **1960**, 43: 47-57.
41. Munzuroglu O., Karatas F. Geckil H.: The vitamin and selenium contents of apricot fruit of different varieties cultivated in different regions. *Food Chem* **2003**, 83: 205-212.
42. Ndaw S., Bergaentzle' M., Aoudé-Werner D., Hasselmann C.: Extraction procedures for the liquid chromatographic determination of thiamin, riboflavin and vitamin B6 in foodstuffs. *Food Chem.* **2000**, 71: 129–138.
43. Ndaw S., Bergaentzle M., Aoudé'-Werner D., Hasselmann C.: Enzymatic extraction procedure for the liquid chromatographic determination of niacin in foodstuffs. *Food Chem.* **2002**, 78: 129–134.
44. Nicolson L.A., Macrae R., Richardson D.P.: Comparative assessment of high performance liquid chromatographic methods for the determination of ascorbic acid and thiamin in foods. *Analyst* **1984**, 109: 267-271.
45. Novelli G.D., Kaplan N.O., Lipmann F.: The liberation of pantothenic acid from coenzyme A. *J. Biol. Chem.* **1949**, 177: 97-107.
46. Odriozola-Serrano I., Hernández-Jover T., Martín-Belloso O.: Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chem* **2007**, 105:1151–1158.
47. Ollilainen V., Mattila P., Varo P., Koivistoinen P., Huttunen J.: The HPLC determination of total riboflavin in foods. *J. Micro Ana* **1990**, 8: 199-207.
48. Pakin C., Bergaentzle M., Hubscher V, Aoudé-Werner D., Hasselmann C.: Fluorimetric determination of pantothenic acid in foods by liquid

- chromatography with post-column derivatization. *J Chromatogr A* **2004**, 1035: 87–95.
49. Rychlik Michael: Quantification of Free and Bound Pantothenic Acid in Foods and Blood Plasma by a Stable Isotope Dilution Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48: 1175-1181.
 50. Rychlik Michael: Simultaneous analysis of folic acid and pantothenic acid in foods enriched with vitamins by stable isotope dilution assays. *Analytica Chimica Acta* **2003**, 495: 133–141.
 51. Schlesier K., Harwat M, Bohm V., Bitsch R.: Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods. *Free Radical Research*, **2002**, 36 (2): 177–187.
 52. Seo J.S., Burri B.J., Quan Z., Neidlinger T.R.: Extraction and chromatography of carotenoids from pumpkin. *J. Chromatogr A*, **2005**, 1073: 371-375.
 53. Stancher B. and Zonta F.: High performance liquid chromatographic analysis of riboflavin (Vitamin B2) with visible absorbance detection in Italian Cheeses. *J. Food Sci.* **1986**, 51(3): 857-858.
 54. Thompson J.N., Hatina G., Maxwell W.B.: High performance liquid chromatographic determination of vitamin A in margarine, milk and skimmed milk. *J. AOAC*, **1980**, 63(4): 894-898.
 55. Thompson J.N., Hatina G., Maxwell W.B., Duval S.: High performance liquid chromatographic determination of vitamin D in fortified milks, margarine, infant formulas. *J. Assoc. Official Anal. Chem.* **1982**, 65(3): 624-631.
 56. Tyler T.A. and Shrago R.R.: Determination of niacin in samples by HPLC. *J. Liq. Chromatogr.* **1980**, 3(2): 269-277.
 57. van Niekerk P.J., Smit S.C.C., Strydom E.S.P., Armbruster G.: Comparison of high performance liquid chromatographic and microbiological method for the determination of niacin in foods. *J Agric. Food Chem.* **1984**, 32: 304-307.
 58. Vidal-Valverde C. and Reche A: An improved high performance liquid chromatographic method for thiamin analysis in foods. *Lebensrn Unters Forsch.* **1990**, 191: 313-318.
 59. Vidal-Valverde C. and Reche A.: Reliable system for the analysis of riboflavin in foods by high performance liquid chromatography and UV detection. *J Liq. Chromatogr.* **1990**, 13(10): 2089-2101.

60. Vidal-Valverde C. and Reche A.: Determination of available niacin in legumes and meat by high performance liquid chromatography. *J Agric. Food Chem.* **1991**, 39: 116-121.
61. Watada A.E. and Tran T.T.: A sensitive high performance liquid chromatographic method for analyzing riboflavin in fresh fruit and vegetables. *J Liq. Chromatogr.* **1985**, 8(9): 1651-166.
62. Wills R.B.H., Wimalasiri P., Greenfield H.: Comparative determination of thiamin and riboflavin in foods by high performance chromatography and fluorimetric methods. *J Micro Anal.* **1985**, 1: 23-29.
63. Woollard D.C. and Blott A.D.: The routine determination of vitamin E acetate in milk powder formulations using high performance liquid chromatography. *J Micro Anal* **1986**, 2: 97-115.
64. Woollard D.C. and Woollard G.A.: Determination of vitamin A in fortified milk powders high performance liquid chromatography. *N.Z. J Dairy Sci. Technol.* **1981**, 16: 99-112.
65. Κωνσταντίνου Χάρης: Προσδιορισμός ανθοκυανινών στην κορινθιακή σταφίδα πριν και μετά από θερμική της επεξεργασία. Πτυχιακή εργασία. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Αθήνα **2008**.
66. Κριμπά Β.Δ.: Ελληνική Αμπελογραφία, Αθήνα **1943**, 1^{ος} τόμος.
67. Μπακουνάκης Νίκος: Πάτρα 1828-1860, εκδ. Καστανιώτη, σελ 140-145, Αθήνα **1988**.
68. Νταβίδης Ξ.: Ελληνική Αμπελολογία, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο, Αθήνα **1982**.
69. Παναιγιάλειος Ένωση Συνεταιρισμών, Προδιαγραφές Κορινθιακής σταφίδας. Αίγιο **2001**.
70. Σάββα Άννα: Επίδραση της επεξεργασίας στη διατήρηση των αντιοξειδωτικών λειτουργικών συστατικών της σταφίδας. Πτυχιακή εργασία. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Αθήνα **2006**.
71. Συντώσης Λάμπρος: Διατροφή και Μεταβολισμός, Αθήνα **2005**.
72. Στατιστικό δελτίο κίνησης Κορινθιακής Σταφίδας, Σ.Κ.Ο.Σ., Πάτρα.
73. Σταυρακάκης Μ.: Σταφιδοποιία, έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου, Αθήνα **1986**.

74. Σταύρακας Δ.: Σημειώσεις Αμπελογραφίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο, Αθήνα **1993**.
75. Χαλουλάκος Τζανέτος-Ιωάννης: Μελέτη μεγεθών και διεργασιών που επηρεάζουν την αποθήκευση και τη διακίνηση της Σουλτανίνας. Πτυχιακή εργασία. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωργικών Βιομηχανιών, Αθήνα **1993**.
76. Χίου Π. Αντωνία: Μέταλλα, βιταμίνες και διατροφή, Σημειώσεις Μαθήματος, Αθήνα **2001**.