



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ (HILIC) ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΕ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ**

Μιχαέλα Γ. Δημητροκάλλη

Χημικός

Επιβλέπων Καθηγητής

Μαλλούχος Αθανάσιος

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2019

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΉ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΥΓΡΗΣ
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΔΡΟΦΙΛΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ (HILIC) ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΣΑΚΧΑΡΩΝ ΣΕ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ**

**DEVELOPMENT, VALIDATION AND APPLICATION OF HYDROPHILIC
INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY (HILIC) METHOD FOR
DETERMINATION OF SUGARS IN DAIRY PRODUCTS**

Μιχαέλα Γ. Δημητροκάλλη

Χημικός

Επιβλέπων

Μαλλούχος Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Εξεταστική Επιτροπή

Μαλλούχος Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ταραντίλης Πέτρος, Καθηγητής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μαντάλα Ιωάννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Ελληνικό Κέντρο Έρευνας και Καινοτομίας (HRIC) της εταιρείας Γιώτης Α.Ε. σε συνεργασία με το εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στο χρονικό διάστημα Σεπτέμβριος 2018, έως Απρίλιος 2019.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή μου κ. Μαλλούχο Αθανάσιο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την βοήθεια του σε ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα διπλωματική εργασία. Τον ευχαριστώ για τις υποδείξεις του που με κατεύθυναν σε έναν σωστό τρόπο σκέψης και μου πρόσφεραν σημαντικά εφόδια για την μελλοντική μου πορεία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στα μέλη του εργαστηρίου Hellenic Research & Innovation Centre (HRIC) της εταιρείας Γιώτης για την ευχάριστη συνεργασία μας και τις όμορφες στιγμές που μοιραστήκαμε. Ιδιαίτερως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων του εργαστηρίου κ. Κωμαΐτη Στράτο για την βοήθεια του σε ό,τι χρειάστηκε προκειμένου να ολοκληρωθεί με επιτυχία η συνεργασία μας. Επίσης οφείλω ένα ευχαριστώ και στα διοικητικά μέλη της εταιρείας για την ευκαιρία που μου δόθηκε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία σε ένα εργαστήριο τόσο μεγάλης εμβέλειας όσο αυτό του HRIC.

Τέλος ένα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς μου που με στήριξαν υλικά και κυρίως ψυχολογικά ακόμη και στις δυσκολότερες στιγμές που είχα σε όλο αυτό το χρονικό διάστημα των σπουδών μου, στην αδερφή μου για την μοναδική σχέση που έχουμε και για την βοήθεια που μου προσέφερε τόσο σε επιστημονικό όσο και σε ψυχολογικό επίπεδο αλλά και τις αγαπητές μου φίλες Νικολέτα και Μαρούσα για την κατανόηση και την αγάπη τους σε αυτό το απαιτητικό διάστημα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι υδατάνθρακες αποτελούν βασικά συστατικά της διατροφής του ανθρώπου, περιέχονται σε όλα τα τρόφιμα και αναγράφονται πάντα στην ετικέτα διατροφικής επισήμανσης των τροφίμων. Τα σάκχαρα ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των υδατανθράκων και διακρίνονται σε δισακχαρίτες και μονοσακχαρίτες. Το κυρίαρχο σάκχαρο του γάλακτος είναι η λακτόζη, ενώ σε πολλά γαλακτοκομικά προϊόντα απαντώνται συνήθως γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη, λακτουλόζη (λόγω θερμικής επεξεργασίας) και διάφοροι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS) και φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS). Μέχρι σήμερα, δεν έχουν αναπτυχθεί επίσημες μέθοδοι (π.χ. ISO, IDF, AOAC) για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό μονο- και δισακχαριτών σε γαλακτοκομικά προϊόντα με χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης, ενώ μόνο μία μέθοδος (AOAC 980.13) περιγράφει τον προσδιορισμό διαφόρων σακχάρων σε σοκολάτα γάλακτος και κακάο.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη μιας υγροχρωματογραφικής μεθόδου υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό διαφόρων σακχάρων που απαντώνται σε γαλακτοκομικά προϊόντα και πιο συγκεκριμένα σε βρεφικές φόρμουλες, για λόγους διατροφικής επισήμανσης. Για την επίτευξη του σκοπού αυτού αρχικά μελετήθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες στις οποίες επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των σακχάρων γλυκόζη, φρουκτόζη, σακχαρόζη, λακτόζη, μαλτόζη και λακτουλόζη. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η κατάλληλη επιλογή κινητής φάσης, η ροή αυτής και ο όγκος έγχυσης του δείγματος στο σύστημα. Τον προσδιορισμό των κατάλληλων συνθηκών ακολούθησε η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης κάθε σακχάρου. Πραγματοποιήθηκαν σειρές πειραμάτων για τον προσδιορισμό του είδους των σακχάρων στο βρεφικό γάλα υπό μορφή σκόνης και ακολούθησε η ποσοτικοποίηση τους. Ταυτόχρονα σειρές πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν και σε πιστοποιημένο υλικό αναφοράς για την επαλήθευση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου. Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου ελέγχθηκαν μέσω πειραμάτων επικύρωσης. Τελικώς η μέθοδος δοκιμάστηκε και σε άλλης κατηγορίας τρόφιμα πέραν των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Τα πειράματα έδειξαν πως η μέθοδος λειτουργεί ικανοποιητικά με τη χρήση κινητής φάσης ακετονιτρίλιου-νερού (75:25 v/v) και 0,2% (v/v) τριαιθυλαμίνη ως τροποποιητής με ροή 1mL/min και όγκο έγχυσης δείγματος τα 10 μ L. Στο βρεφικό γάλα υπό μορφής σκόνης ανιχνεύθηκε μόνο λακτόζη, η οποία ποσοτικοποιήθηκε

επιτυχώς με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης. Ταυτόχρονα μελετήθηκε και η ανάκτηση της λακτόζης, η μέση τιμή της οποίας ήταν 84%, ενώ η επαναληψιμότητα της μεθόδου ήταν πολύ καλή. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν με επιτυχία και σε πιστοποιημένο υλικό αναφοράς όπου η ανάκτηση βρέθηκε ίση με 91,2%. Σε συνέχεια αυτών, τα πειράματα επικύρωσης της μεθόδου έδειξαν καλή ανάκτηση ειδικά για τη λακτόζη (87,01% - 104,73%) που είναι το κύριο σάκχαρο της βρεφικής φόρμουλας ενώ για όλα τα σάκχαρα η επαναληψιμότητα ήταν πολύ καλή (S.E. <12%). Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) κυμάνθηκαν σε ικανοποιητικά επίπεδα (LOD: 0,05 – 0,08 g/L και LOQ: 0,14 - 0,24 g/L). Τέλος η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμάστηκε και σε βρεφικές τροφές με βάση τα δημητριακά με ικανοποιητικά αποτελέσματα ανάκτησης και επαναληψιμότητας, δίνοντας θετικά στοιχεία για χρήση της μεθόδου και σε άλλες κατηγορίες τροφίμων πέραν των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Λέξεις Κλειδιά: Σάκχαρα, Χρωματογραφία Υδρόφιλης Αλληλεπίδρασης

ABSTRACT

Carbohydrates are essential components of human nutrition and are always listed on the nutrition labeling of foods. Sugars belong to the broader category of carbohydrates and are divided into disaccharides and monosaccharides. Lactose is the main sugar of milk while other sugars like glucose, fructose, sucrose, lactulose (due to severe thermal food processing), GOS (galactoligosaccharides) and FOS (fructoligosaccharides) are contained in the milk. Official methods (ISO, IDF, AOAC) for the simultaneous determination of monosaccharides and disaccharides in dairy products have not been developed yet. The only analytical method applied in dairy products for sugars determination is AOAC 980.13 for milk chocolate and cocoa.

The purpose of the present study was the development of a Hydrophilic Interaction Liquid Chromatographic method (HILIC) using refractive index detector, for the simultaneous determination of more than one sugars in infant formulas and similar products. First the appropriate conditions for the separation of the sugars fructose, glucose, sucrose, lactose, maltose and lactulose were studied. Specifically the appropriate composition of mobile phase, its flow and the volume of sample injection were studied. Calibration curves were constructed afterwards. Additionally a series of experiments were performed on certified reference material for method validation. The repeatability and reproducibility were determined by validation experiments. Finally the proposed method was tested on foods other than dairy products.

According to the results, the appropriate mobile phase was acetonitrile-water (75:25 v/v) and 0,2% (v/v) TEA as modifier with a flowrate of 1mL/min and injection volume of 10 μ L. Lactose was the only sugar detected in the infant formula under study successfully quantified. Its recovery reached 84% while method's repeatability was adequate. The experiments were repeated successfully in certified reference material where recovery was found to be 91.2%. Subsequently, the method validation experiments showed good recovery especially for lactose (87.01% - 104.73%) which is the major sugar of the infant formula, whereas for all sugars the reproducibility was very good (S.E. <12%). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were at satisfactory levels (LOD: 0,05 – 0,08 g/L and LOQ: 0,14 - 0,24 g/L). Finally, the proposed method was also tested on cereal-based infant foods with satisfactory recovery and reproducibility. These results provided positive evidence for the use of the method in other food categories beyond dairy products.

Key Words: Sugar, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatographic

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	16
1.1	Σάκχαρα σε τρόφιμα	16
1.2	Διάκριση Σακχάρων στο Γάλα.....	17
1.2.1	Μονοσακχαρίτες	17
1.2.1.1	Γλυκόζη.....	17
1.2.1.2	Φρουκτόζη.....	18
1.2.1.3	Γαλακτόζη.....	19
1.2.2	Δισακχαρίτες	20
1.2.2.1	Λακτόζη	20
1.2.2.2	Σουκρόζη.....	21
1.2.2.3	Λακτουλόζη.....	22
1.2.2.4	Μαλτόζη.....	23
1.3	Μέθοδοι Προσδιορισμού Σακχάρων.....	24
1.3.1	Υγρή Χρωματογραφία Υδρόφιλης Αλληλεπίδρασης	25
1.4	Στήλες για χρήση HILIC	28
1.4.1	Στήλες Αμιδίου.....	29
1.5	Σκοπός.....	30
2.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	31
2.2	Αντιδραστήρια	32
2.3	Όργανα και Συσκευές.....	32
2.4	Εκχύλιση Σακχάρων από τη σκόνη βρεφικού γάλακτος.....	33
2.5	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης.....	33
2.6	Κατασκευή Πρότυπης Καμπύλης	34
2.7	Δοκιμές Επικύρωσης.....	35
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
3.1	Εκχύλιση Σακχάρων.....	37
3.2	Προσδιορισμός Χρωματογραφικών Συνθηκών του Συστήματος	37
3.3	Εξέταση χρωματογραφικών παραμέτρων	42
3.4	Γραμμικότητα.....	43
3.5	Προσδιορισμός σακχάρων σε βρεφικές τροφές	51
3.6	Επικύρωση της Μεθόδου	53
3.7	Προσδιορισμός Ορίου ανίχνευσης και Ποσοτικοποίησης	57

3.8 Εφαρμογή μεθόδου σε βρεφική τροφή με βάση τα δημητριακά.....	59
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	62
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	63

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σάκχαρα σε τρόφιμα

Οι υδατάνθρακες είναι μια κατηγορία μορίων με σκελετούς από άτομα άνθρακα στα οποία συνδέονται υδροξυλομάδες και έχουν εμπειρικό τύπο $(-C_n(H_2O)_n-)$. Οι απλοί υδατάνθρακες ονομάζονται μονοσακχαρίτες και είναι κετόνες ή αλδεΐδες με δύο ή περισσότερα υδροξύλια. Επειδή οι μονοσακχαρίτες φέρουν υδροξυλομάδες, η δημιουργία γλυκοζιτικών δεσμών ευνοείται με αποτέλεσμα να ενώνονται μεταξύ τους σχηματίζοντας ολιγοσακχαρίτες [1]. Τα σάκχαρα ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των υδατανθράκων και είναι παρόντα σε όλα τα τρόφιμα είτε σε μεγάλα είτε σε μικρότερα ποσοστά. Για τον ανθρώπινο οργανισμό είναι η κύρια πηγή ενέργειας, ωστόσο όταν λαμβάνονται σε μεγάλες ποσότητες μπορούν να αποτελέσουν κίνδυνο για την υγεία καθώς σχετίζονται με ασθένειες όπως ο διαβήτης κι η παχυσαρκία

Η συγκέντρωση των σακχάρων στα τρόφιμα έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς πέρα από τη γεύση φαίνεται να επηρεάζει την υφή, το χρώμα αλλά και το ιξώδες του τροφίμου [2]. Το μητρικό γάλα περιέχει ένα μίγμα ολιγοσακχαριτών σε συγκέντρωση 8-13 g/L, το οποίο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη και την καλή λειτουργία του οργανισμού του βρέφους [3]. Ωστόσο συχνά για πρακτικούς λόγους όπως η πολύωρη εργασία της μητέρας ή λόγους υγείας όπως η ελλιπής παραγωγή μητρικού γάλακτος, η κατανάλωση αποκλειστικά μητρικού γάλακτος από το βρέφος είναι αδύνατη. Για την επίλυση αυτών των προβλημάτων αναπτύχθηκαν βρεφικά γάλατα υπό μορφή σκόνης με επιτυχία σε αναλογία με τα πρότυπα του μητρικού γάλακτος από τη βιομηχανία τροφίμων. Οι βρεφικές φόρμουλες γάλακτος είναι προϊόντα τα οποία παρασκευάζονται έτσι ώστε να προσομοιάζουν όσο το δυνατόν περισσότερο στο μητρικό γάλα τόσο σε γεύση αλλά κυρίως σε θρεπτικό και ενεργειακό περιεχόμενο. Ως εκ τούτου περιέχουν όλα τα σημαντικά θρεπτικά συστατικά του μητρικού γάλακτος όπως είναι το λίπος, οι πρωτεΐνες, κάποιες βιταμίνες και ιχνοστοιχεία αλλά και τους απαραίτητους υδατάνθρακες που περιέχονται υπό τη μορφή σακχάρων. Μελέτες εκτιμούν ότι η συνολική ποσότητα σακχάρων σε τέτοια προϊόντα κυμαίνεται από 1,28 g έως 11,16 g ανά μερίδα ανάλογα και με την εταιρεία παραγωγής του

προϊόντος [4]. Το γάλα σκόνης για βρέφη φαίνεται να επεξεργάζεται πριν την ξήρανση προκειμένου οι συγκεντρώσεις ορισμένων συστατικών να τροποποιηθούν. Πιο συγκεκριμένα πριν την ξήρανση, πολλές εταιρείες εμπλουτίζουν το γάλα με υδατάνθρακες, όπως η λακτόζη και η σακχαρόζη, προκειμένου να μειώσουν το σχετικό ποσοστό των πρωτεϊνών και των μετάλλων στο γάλα. Ταυτόχρονα με αυτή τη μέθοδο το γάλα εμπλουτίζεται σε σάκχαρα τα οποία βοηθούν στην ανάπτυξη των βρεφών [5]. Ωστόσο η επεξεργασία του βρεφικού γάλακτος είναι μια διαδικασία που πρέπει να επιτελείται με προσοχή, ιδιαίτερα όσον αφορά τη θερμική του επεξεργασία καθώς μέσα σε αυτό περιέχονται αρκετά συστατικά, τα οποία είναι πολύ ευαίσθητα ως προς τις αντιδράσεις Maillard. Πιο συγκεκριμένα τα ανάγοντα σάκχαρα που περιέχονται και οι πρωτεΐνες οι οποίες είναι πλούσιες στο αμινοξύ λυσίνη είναι συστατικά στα οποία πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή. Η υψηλή θερμοκρασία που εφαρμόζεται κατά την θερμική επεξεργασία του γάλακτος καθώς και η μακροχρόνια αποθήκευσή τους είναι οι δύο κυριότεροι παράγοντες που μπορεί να ευνοήσουν την πραγματοποίηση των αντιδράσεων Maillard από αυτά τα συστατικά. Η υποβάθμιση αυτή του τροφίμου δεν σχετίζεται μόνο με την εμφάνιση του αλλά και με την απώλεια απαραίτητων συστατικών για τα βρέφη καθώς η συγκέντρωση των διαθέσιμων πρωτεϊνών και σακχάρων μειώνεται [6].

1.2 Διάκριση Σακχάρων στο Γάλα

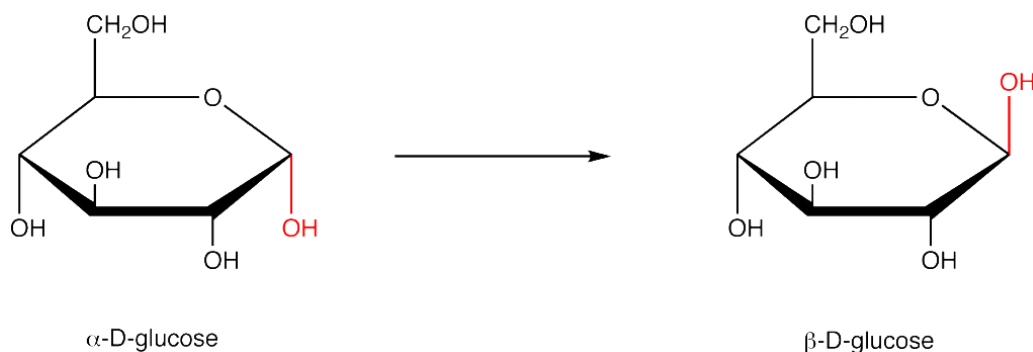
Η κυριότερη διάκριση των σακχάρων γίνεται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες τους μονοσακχαρίτες που περιλαμβάνουν μόρια όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη, τους δισακχαρίτες όπως η λακτόζη και η σακχαρόζη, τους ολιγοσακχαρίτες και τους πολυσακχαρίτες όπως το άμυλο. Οι ολιγοσακχαρίτες συχνά μπορούν επίσης να διακριθούν σε άλλες κατηγορίες όπως οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS) και οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS) ανάλογα με την κύρια δομική μονάδα που φέρουν.

1.2.1 Μονοσακχαρίτες

1.2.1.1 Γλυκόζη

Η γλυκόζη είναι ο πιο ευρέως γνωστός μονοσακχαρίτης καθώς συνδέεται με τη γλυκόλυση και ως εκ τούτου θεωρείται η κυριότερη πηγή ενέργειας για τον ανθρώπινο οργανισμό. Κατά τη διαδικασία της γλυκόλυσης ένα μόριο γλυκόζης

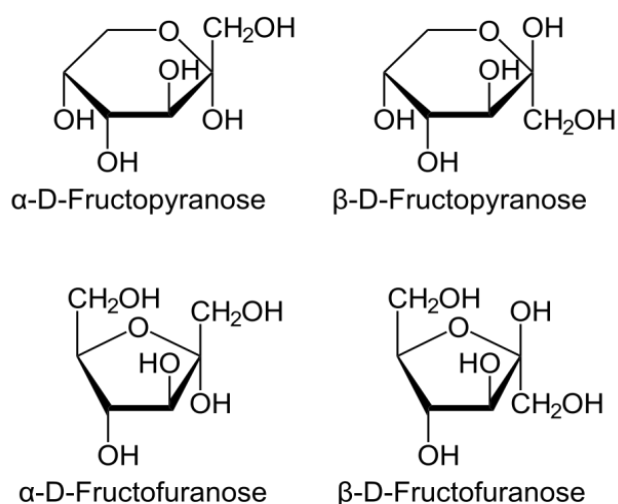
μετατρέπεται σε δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος με ταυτόχρονη παραγωγή δύο μορίων ATP. Η συνήθης μορφή της γλυκόζης είναι το εναντιομερές D-γλυκόζη της οποίας τα δύο ανωμερή φαίνονται στην Εικόνα 1.1 [1].



Εικόνα 1.1 : Μόρια α -D-γλυκόζης και β -D-γλυκόζης [7].

1.2.1.2 Φρουκτόζη

Η φρουκτόζη είναι μια εξουλόζη (κετοεξόζη), η οποία στα κύτταρα, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί από τον ανθρώπινο οργανισμό, μετατρέπεται σε παράγωγα της γλυκόζης. Όπως και οι περισσότεροι μονοσακχαρίτες στα τρόφιμα απαντάται στην μορφή D η οποία φαίνεται στην Εικόνα 1.2 και έχει δύο ανωμερή. Η φρουκτόζη μπορεί να σχηματίσει δακτυλίους φουρανόζης ή πυρανόζης. Η μορφή φουρανόζης φαίνεται να είναι πιο διαδεδομένη ενώ η μορφή πυρανόζης απαντάται όταν η φρουκτόζη είναι μόνη της στο διάλυμα [1].

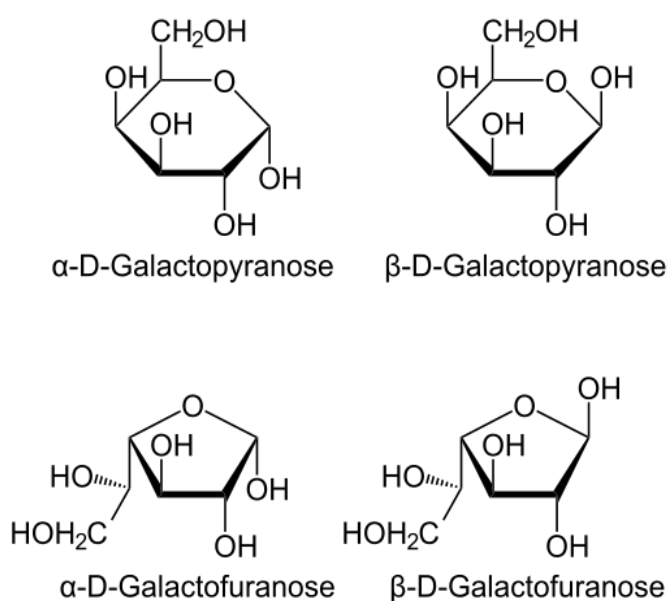


Εικόνα 1.2: Ανωμερείς μορφές φρουκτοπυρανόζης και φρουκτοφουρανόζης [8].

Το μητρικό γάλα περιέχει πολύ μικρή ποσότητα φρουκτόζης (7 $\mu\text{g/mL}$), η οποία ωστόσο είναι ανιχνεύσιμη με χρήση συγκεκριμένων μεθόδων, συγκριτικά με την ποσότητα γλυκόζης, η οποία συνήθως είναι τριάντα φορές μεγαλύτερη. Παρά τη μικρή αυτή περιεκτικότητα της, μελέτες δείχνουν ότι η φρουκτόζη που βρίσκεται στο μητρικό γάλα έχει ιδιαίτερα θετικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη βρεφών ηλικίας από ενός έως έξι μηνών. Μάλιστα, φαίνεται να σχετίζεται θετικά με την αύξηση του βάρους του βρέφους, την μυϊκή του μάζα και την συγκέντρωση μετάλλων στα οστά βοηθώντας ουσιαστικά στην ανάπτυξη του [9].

1.2.1.3 Γαλακτόζη

Η γαλακτόζη είναι ένας μονοσακχαρίτης γνωστός κυρίως για τον ρόλο του στην σύνθεση της λακτόζης, καθώς αποτελεί ένα από τα δύο μονομερή της. Ομοίως με τη φρουκτόζη, η D- μορφή της έχει δύο ανωμερή και μπορεί να σχηματίσει δακτυλίους πυρανόζης και φουρανόζης όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.3.

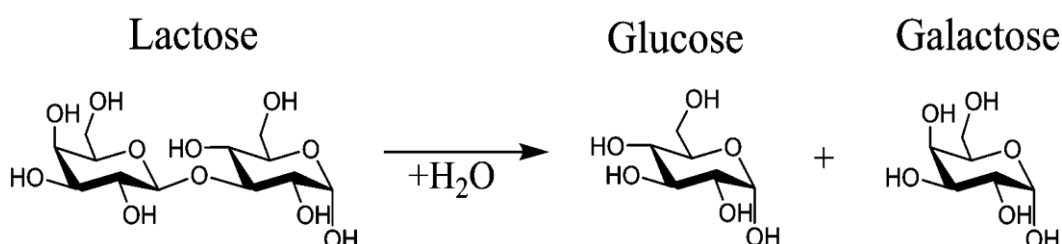


Εικόνα 1.3: Ανωμερείς μορφές γαλακτοπυρανόζης και γαλακτοφουρανόζης [10].

1.2.2 Δισακχαρίτες

1.2.2.1 Λακτόζη

Η λακτόζη είναι το κύριο σάκχαρο της πλειοψηφίας των γαλακτοκομικών προϊόντων και σε ξηρά γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως οι βρεφικές τροφές, απαντάται σε ποσοστά περίπου από 2% έως και 100% όταν πρόκειται για προϊόντα όπως οι πούδρες λακτόζης [11]. Η λακτόζη είναι ένας δισακχαρίτης που αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο γαλακτόζης και η υδρόλυση στα μονομερή του γίνεται με τη βοήθεια ενός ενζύμου που καλείται λακτάση (β-γαλακτοσιδάση) [1].



Εικόνα 1.4: Υδρόλυση λακτόζης στα μονομερή της [12].

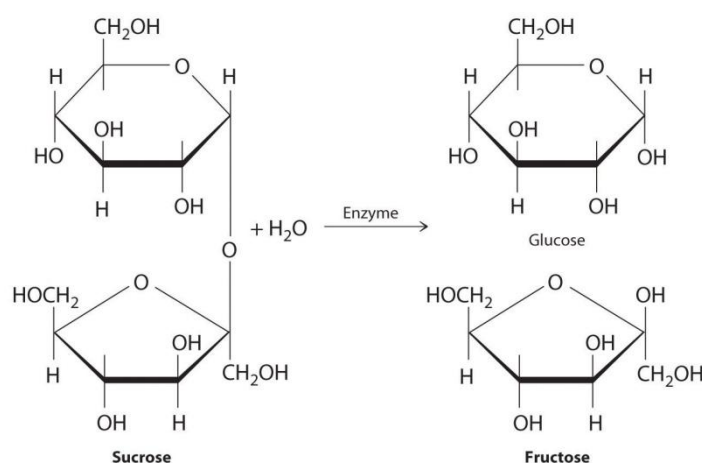
Η λακτόζη απαντάται σε δύο ισομερείς μορφές την α και β – λακτόζη. Οι δύο μορφές της λακτόζης διαφέρουν στο σημείο τήξεως, στην στροφική ικανότητα, στην διαλυτότητα κ.α.. Η γλυκύτητα της είναι μικρότερη από αυτήν της γλυκόζης, φρουκτόζης και σουκρόζης, για αυτό και τα γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν ελαφρώς γλυκιά γεύση [13]. Η παρουσία της λακτόζης σε ξηρά γαλακτοκομικά προϊόντα επηρεάζει την σταθερότητα τους κυρίως εξαιτίας των αντιδράσεων Maillard. Η λακτόζη μπορεί να συμμετέχει σε αυτές ως ανάγον σάκχαρο αντιδρώντας με ελεύθερες αμινομάδες πρωτεϊνών, πεπτιδίων και άλλων ενώσεων, για αυτό και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της είναι ιδιαίτερα σημαντικός καθώς αποτελεί και δείκτη της επεξεργασίας ενός τροφίμου [11].

Η παρουσία της λακτόζης στα τρόφιμα, παρά τον ωφέλιμο χαρακτήρα της, συχνά συνδέεται με αρνητικές επιπτώσεις στον οργανισμό εξαιτίας της δυσανεξίας στη λακτόζη, μιας πάθησης η οποία εντοπίζεται σε πολύ μεγάλο ποσοστό του παγκόσμιου πληθυσμού. Η δυσανεξία στην λακτόζη οφείλεται στην απουσία του ενζύμου λακτάση (β-γαλακτοσιδάση), το οποίο παράγεται φυσικά στο λεπτό έντερο, με αποτέλεσμα ο ανθρώπινος οργανισμός να μην μπορεί να διασπάσει το μόριο της λακτόζης. Αποτέλεσμα αυτού είναι συμπτώματα όπως το κοιλιακό άλγος, το πρήξιμο,

η ναυτία και η διάρροια. Ο αποκλεισμός τροφίμων πλούσια σε λακτόζη από την ανθρώπινη διατροφή, για την αποφυγή των δυσάρεστων συμπτωμάτων, μπορεί να προκαλέσει ταυτόχρονα έλλειψη πρόσληψης σημαντικών θρεπτικών συστατικών όπως οι βιταμίνες και το ασβέστιο. Το αποτέλεσμα της απώλειας των συστατικών αυτών μπορεί να συνδεθεί με διάφορες ασθένειες όπως η οστεοπόρωση για αυτό και το πρόβλημα συχνά αντιμετωπίζεται είτε με χρήση δισκίων λακτάσης που βοηθούν στην διάσπαση του μορίου είτε με κατανάλωση επεξεργασμένων τροφίμων χωρίς λακτόζη. Το γεγονός αυτό έχει οδηγήσει την βιομηχανία τροφίμων στην παραγωγή τροφίμων κατάλληλα επεξεργασμένων προκειμένου να μην περιέχουν λακτόζη ή ίχνη αυτής ακόμη και σε προϊόντα όπως το βρεφικό γάλα υπό μορφή σκόνης. Η ύπαρξη συνεπώς παθήσεων όπως η δυσανεξία στη λακτόζη ενισχύει την ιδιαίτερη σημασία που έχει η διαθρεπτική επισήμανση των τροφίμων και η δυνατότητα προσδιορισμού των θρεπτικών συστατικών όπως τα σάκχαρα.

1.2.2.2 Σουκρόζη

Η σουκρόζη ή αλλιώς σακχαρόζη είναι ένας δισακχαρίτης που αποτελείται από ένα μόριο γλυκόζης κι ένα μόριο φρουκτόζης, τα οποία συνδέονται με γλυκοζιτικό δεσμό. Η διαμόρφωση του δεσμού αυτού είναι α για το μόριο της γλυκόζης και β για το μόριο της φρουκτόζης. Η σακχαρόζη (α-D-Γλυκοπυρανοζυλο-(1→2)-β-D-φρουκτοφουρανόζη) μπορεί να υδρολυθεί στα συστατικά της με τη βοήθεια του ενζύμου σακχαράση [1].

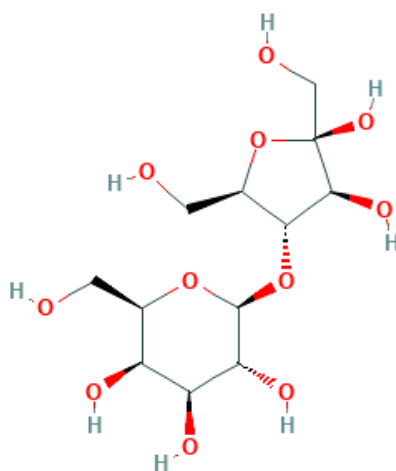


Εικόνα 1.5: Υδρόλυση μορίου σουκρόζης [14].

Η συγκέντρωση της σουκρόζης στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι σημαντικό να ελέγχεται καθώς μπορεί να επηρεάσει την υφή τους, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για συμπυκνωμένα τρόφιμα όπως το συμπυκνωμένο γάλα. Κατά την θερμική επεξεργασία, η σουκρόζη προκαλεί ζελατινοποίηση των πρωτεϊνών του γάλακτος με αποτέλεσμα το τρόφιμο να αποκτά μια ανεπιθύμητη μορφή. Ταυτόχρονα, όπως και όλα τα σάκχαρα, η αυξημένη συγκέντρωση σουκρόζης, σε γαλακτοκομικά προϊόντα μπορεί έπειτα από έντονη θερμική επεξεργασία να οδηγήσει στην αλλαγή του χρώματος του τροφίμου εξαιτίας των αντιδράσεων καραμελοποίησης [15].

1.2.2.3 Λακτουλόζη

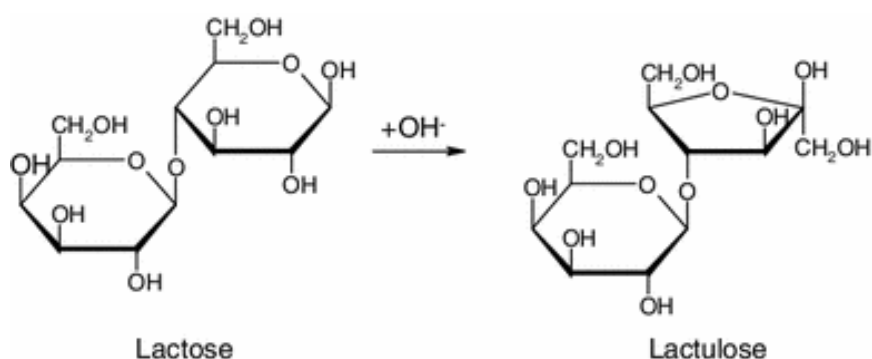
Η λακτουλόζη (4-O-β-D-γαλακτοπυρανοζυλο-D-φρουκτοφουρανόζη) όπως και η λακτόζη είναι ένας δισακχαρίτης γνωστός για την πρεβιοτική του δράση. Αποτελείται από ένα μόριο γαλακτόζης και ένα μόριο φρουκτόζης τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικό δεσμό (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6: Δομή μορίου Λακτουλόζης [16].

Ημερήσια δόση 2 έως 10 g λακτουλόζης συνδέεται με την καλή πρεβιοτική του δράση, ενώ από το 1957 χρησιμοποιείται ως συστατικό λειτουργικών τροφίμων. Η λακτουλόζη είναι απύσασε σε μη επεξεργασμένο γάλα και παράγεται μέσω ισομερίωσης της λακτόζης κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας του, υπό αλκαλικές συνθήκες όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.7 . Ωστόσο πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την εύρεση εναλλακτικών τρόπος παρασκευής της. Μια εξ΄

αυτών προτείνει τη χρήση του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση με τη χρήση φρουκτόζης και γαλακτόζης ως υποστρώματα, η οποία όμως είναι ακόμη οικονομικά ασύμφορη διεργασία [17].

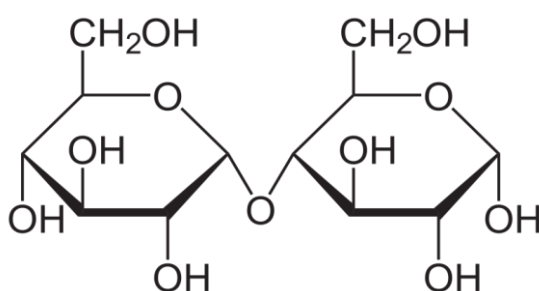


Εικόνα 1.7: Ισομερίωση λακτόζης σε λακτουλόζη [18].

Συνήθως τα βρεφικά γάλατα σε σκόνη περιέχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση λακτουλόζης από αυτή που περιέχεται στο κοινό γάλα. Μελέτες δείχνουν ότι η συγκέντρωση λακτουλόζης στα βρεφικά γάλατα κυμαίνεται περίπου από 29 έως 108 mg/L. Στη νομοθεσία δεν υπάρχει κάποιο όριο για τη συγκέντρωση της στα βρεφικά γάλατα σε αντίθεση με το γάλα υψηλής παστερίωσης (UHT), για το οποίο το νομοθετικό όριο 600 mg/L [19]. Ωστόσο, καθώς η συγκέντρωση της συνδέεται με την έντονη θερμική επεξεργασία, η παρουσία της σε υψηλές συγκεντρώσεις σε βρεφικό γάλα δεν είναι ιδιαίτερα επιθυμητή.

1.2.2.4 Μαλτόζη

Η μαλτόζη (α-D-Γλυκοπυρανοζυλο-(1→4)-α-D-γλυκοπυρανόζη) είναι ένας δισακχαρίτης όπου δύο μόρια D-γλυκόζης ενώνονται με έναν γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ της ανωμερικής μορφής α του C-1 στο ένα σάκχαρο και του υδροξυλικού οξυγόνου στον C-4 του παρακείμενου σακχάρου όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.8.



Εικόνα 1.8: Μόριο Μαλτόζης [20].

Η μαλτόζη, είναι ένας δισακχαρίτης ο οποίος δεν είναι πολύ διαδεδομένος στα γαλακτοκομικά προϊόντα, ωστόσο μπορεί να βρεθεί σε μικρά ποσοστά. Στις φόρμουλες βρεφικών τροφών απαντάται σε περιεκτικότητα περίπου 0,30 mg/100g προϊόντος [21].

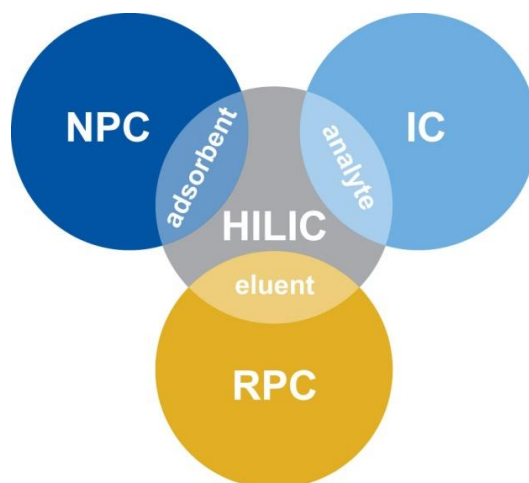
1.3 Μέθοδοι Προσδιορισμού Σακχάρων

Τα τελευταία χρόνια η αναλυτική χημεία έχει προσφέρει πολλές μεθόδους για την ανάλυση σακχάρων. Μονοσακχαρίτες όπως η φρουκτόζη κι η γλυκόζη και δισακχαρίτες όπως η λακτόζη κι η σουκρόζη είναι δυνατόν να προσδιοριστούν με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (AEC). Πολύ διαδεδομένη επίσης είναι και η χρήση της μεθόδου αέριας χρωματογραφίας (GC) όπου πέρα από τον ποιοτικό προσδιορισμό μπορεί να πραγματοποιηθεί και ποσοτικοποίηση των σακχάρων. Η αέρια χρωματογραφία (GC) είναι μέθοδος με μεγάλη ευαισθησία ωστόσο μειονεκτεί ως προς την παρασκευή των δειγμάτων η οποία είναι πολύπλοκη. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για ανάλυση σακχάρων φαίνεται να είναι αυτή της υγρής χρωματογραφίας (LC), η οποία είναι γρήγορη και χαρακτηρίζεται από καλή ακρίβεια [22].

Παρά την έντονη ανάγκη για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό ενός συνδυασμού μονοσακχαριτών και δισακχαριτών σε γαλακτοκομικά προϊόντα μέχρι πρότινος δεν είχε αναπτυχθεί μέθοδος από διεθνείς οργανισμούς όπως η Ευρωπαϊκή Επιτροπή Τυποποίησης (CEN), η Διεθνής Ομοσπονδία Γάλακτος (IDF), ο Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης (ISO) και η Ένωση Αναγνωρισμένων Αναλυτικών Χημικών (AOAC International). Η μόνη μέθοδος η οποία αφορά προσδιορισμό των σακχάρων και δεν περιορίζεται μόνο στη λακτόζη, είναι η μέθοδος 980.13 από την Ένωση Αναγνωρισμένων Αναλυτικών Χημικών (AOAC International), η οποία περιλαμβάνει προσδιορισμό γλυκόζης, φρουκτόζης, μαλτόζης, λακτόζης και σουκρόζης. Παρόλα αυτά, η μέθοδος 980.13 είναι αναγνωρισμένη μόνο για σπόρους κακάο και σοκολατούχο γάλα, και δεν καλύπτει όλα τα γαλακτοκομικά προϊόντα [23]. Το τελευταίο χρονικό διάστημα αναπτύχθηκε η μέθοδος ISO 22184 για προσδιορισμό σακχάρων σε γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και χρήση ανιχνευτή PAD.

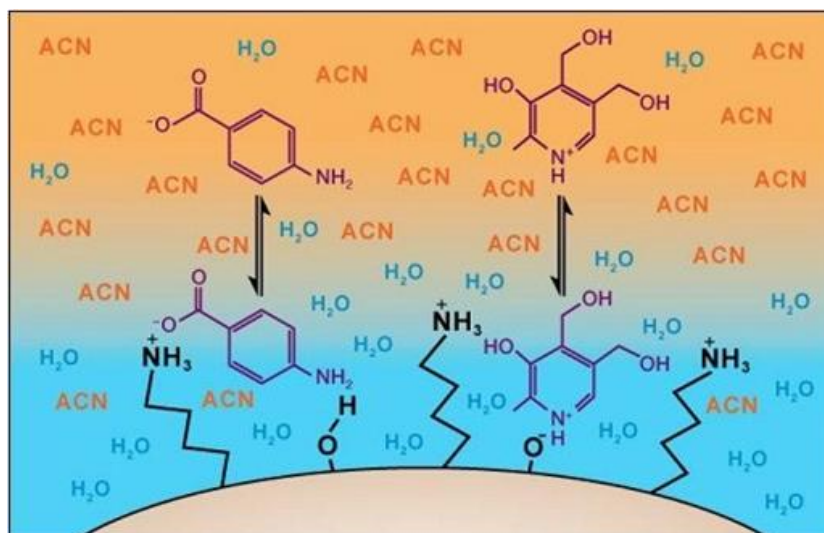
1.3.1 Υγρή Χρωματογραφία Υδρόφιλης Αλληλεπίδρασης

Η υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης, η οποία διεθνώς είναι γνωστή με το ακρωνύμιο “HILIC” (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) πήρε το όνομα της το 1990 από τον Alpert. Η χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης είναι μια μέθοδος ανάλογη της χρωματογραφίας κανονικής φάσης, στην οποία η στατική φάση είναι πολική ενώ η κινητή φάση είναι μίγμα οργανικού διαλύτη με νερό. Σκοπός είναι η κατακράτηση μέσω της στατικής φάσης των πολικών ουσιών που εμπεριέχονται στο δείγμα [24]. Η χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα συγκριτικά με τα υπόλοιπα είδη χρωματογραφίας (Εικόνα 1.9). Αρχικά η χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης είναι κατάλληλη για την ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων που είναι αδύνατον να αναλυθούν με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Για παράδειγμα, δείγματα τα οποία εμφανίζουν μικρή διαλυτότητα στο νερό ή στην κινητή φάση (υψηλή περιεκτικότητα σε νερό) που χρησιμοποιείται στην χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Ακόμα, δείγματα που περιέχουν πολύ πολικές ενώσεις οι οποίες δεν κατακρατούνται επαρκώς στην υδρόφοβη στατική φάση της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης. Επίσης στην HILIC δεν απαιτούνται τα ακριβά αντιδραστήρια όπως στην χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και η μέθοδος μπορεί εύκολα να συνδυαστεί με φασματομετρία μάζας (MS) για ακριβέστερα αποτελέσματα. Συνολικά η χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης έχει εδραιωθεί ως μέθοδος διαχωρισμού ουδέτερων πολύ υδρόφιλων ενώσεων και αμφίφιλων ενώσεων, οι οποίες είναι πολύ πολικές για να διαχωριστούν σωστά με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης αλλά ταυτόχρονα είναι και ανεπαρκώς φορτισμένες για να διαχωριστούν με χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής [25].



Εικόνα 1.9: Σύγκριση χρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης με άλλες μεθόδους υγρής χρωματογραφίας [26].

Ο ακριβής μηχανισμός της χρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης είναι ένα πεδίο το οποίο βρίσκεται ακόμη υπό μελέτη. Η πλειοψηφία των ερευνητών υποστηρίζει ότι ο κύριος μηχανισμός περιλαμβάνει έναν πολικό αναλύτη του οποίου ένα κομμάτι βρίσκεται εντός μιας στρώσης νερού, η οποία προσροφάται στην επιφάνεια της πολικής στατικής φάσης, ενώ το υπόλοιπο κομμάτι βρίσκεται εκτός αυτής της στρώσης νερού αναμεμιγμένο με την κινητή φάση. Ταυτόχρονα με αυτή την συμπεριφορά στην χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης λαμβάνουν μέρος και αλληλεπιδράσεις διπόλου – διπόλου καθώς και ηλεκτροστατικής φύσεως δυνάμεις που βοηθούν στον διαχωρισμό όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.10, όπου παρουσιάζεται ένας προτεινόμενος μηχανισμός δράσης. Μάλιστα οι αλληλεπιδράσεις ηλεκτροστατικής φύσεως είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες όταν το pH κατά την έκλυση ρυθμίζεται ώστε η στατική φάση να είναι φορτισμένη [27]. Στην χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης, σε αντίθεση με αυτή της αντίστροφης φάσης το νερό της κινητής φάσης αποτελεί τον ισχυρό διαλύτη έκλυσης, ενώ ο οργανικός διαλύτης (π.χ. το ακετονιτρίλιο) αποτελεί τον ασθενή διαλύτη. Αυξάνοντας το υδατικό περιεχόμενο της κινητής φάσης, αυξάνεται η δύναμη έκλυσης. Επομένως οι αναλύτες εκλύονται με σειρά αυξανόμενης υδροφιλικότητας.

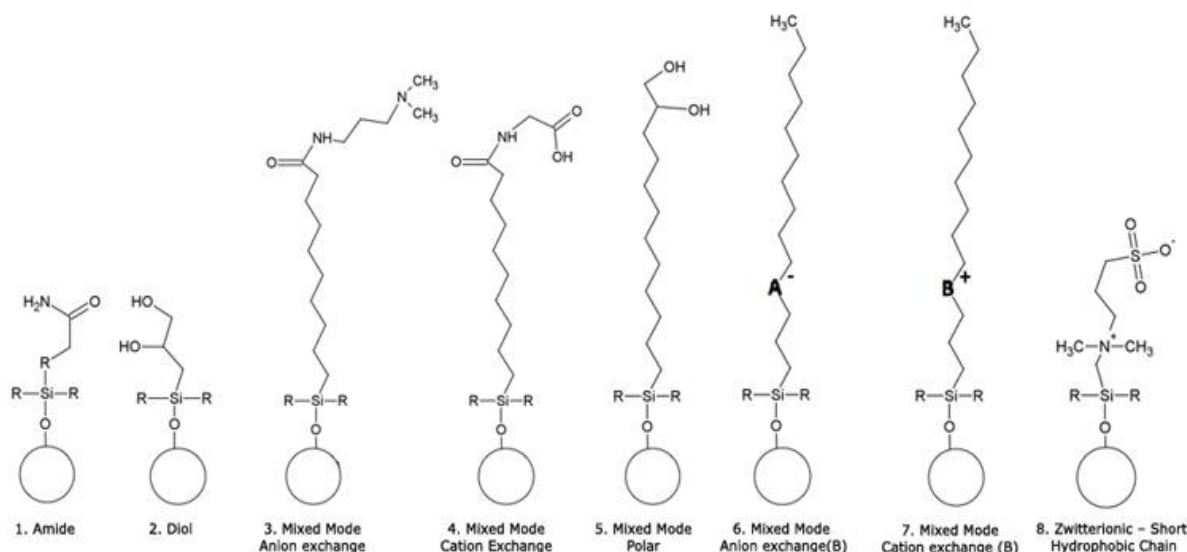


Εικόνα 1.10: Γραφική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης της χρωματογραφίας υδρόφιλης αλληλεπίδρασης. Με γαλάζιο χρώμα αναπαριστάται η υδατική στιβάδα που σχηματίζεται κοντά στην επιφάνεια της πολικής στατικής φάσης ενώ με πορτοκαλί χρώμα αναπαρίσταται η οργανική φάση (αποτελούμενη από ακετονιτρίλιο στην παρούσα εικόνα) [28].

Στην χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης συνηθίζεται η οργανική φάση της κινητής φάσης να έχει ποσοστό τουλάχιστον 70%. Συνήθως, χρησιμοποιούνται ασθενείς οργανικοί διαλύτες με κυριότερη τη χρήση του ακετονιτρίλιου. Το πλεονέκτημα του ακετονιτρίλιου είναι το γεγονός ότι έχει ενδιάμεση πολικότητα, συνεπώς μπορεί να αλληλεπιδρά τόσο με πολικά όσο και με μη πολικά μόρια ενώ ταυτόχρονα μπορεί να αποκτήσει αρνητικό φορτίο χάνοντας ένα πρωτόνιο. Αντί του ακετονιτρίλιου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ενώσεις με ανάλογα χαρακτηριστικά, όπως η ακετόνη και το διοξάνιο. Μάλιστα η ακετόνη μπορεί να αντικαταστάσει σε πολύ καλό βαθμό το ακετονιτρίλιο ειδικά όταν απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος κατακράτησης των ουσιών. Ωστόσο μειονεκτεί συγκριτικά με το ακετονιτρίλιο καθώς όταν ο ανιχνευτής που χρησιμοποιείται είναι UV, η χρήση της είναι ακατάλληλη. Η χρήση διαλυτών με πρωτικό χαρακτήρα, όπως η μεθανόλη ή η αιθανόλη, αποφεύγεται (ως ασθενείς διαλύτες) καθώς οδηγούν σε μικρούς χρόνους κατακράτησης εξαιτίας του πολικού τους χαρακτήρα. Πιο συγκεκριμένα ο πολικός τους χαρακτήρας αυξάνει τον ανταγωνισμό με την επίσης πολική στατική φάση, οδηγώντας στην καταστροφή του υδατίνου στρώματος που περιγράφηκε στο μηχανισμό δράσης της HILIC [27].

1.4 Στήλες για χρήση HILIC

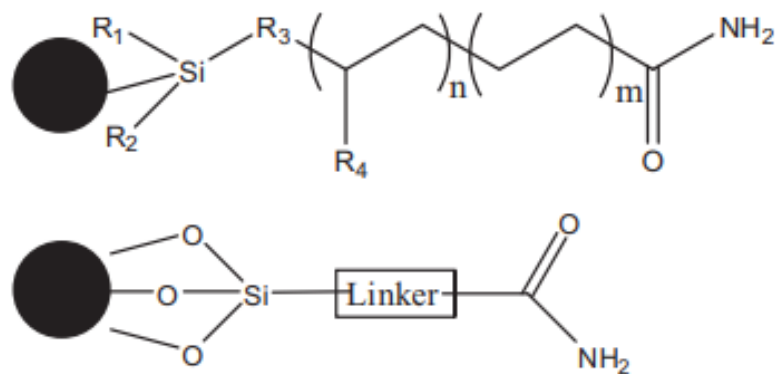
Στην χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης συνήθως χρησιμοποιούνται πολικές στατικές φάσεις όπως αυτές που είναι κατασκευασμένες από πηκτή πυριτίας (silica) και φέρουν αμινομάδες [29]. Γενικά οι στατικές φάσεις που προτείνονται για χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, σε αυτές που έχουν ουδέτερο φορτίο και είναι πολικές και σε αυτές που είναι ιοντισμένες. Η πρώτη γενιά στατικών φάσεων για HILIC περιελάμβανε στατικές φάσεις από πυριτία με προσδεδεμένες αμινοπροπυλο ομάδες (amino-silica), για τον διαχωρισμό υδατανθράκων με χρήση κινητής φάσης ακετονιτριλίου - νερού σε αναλογία 75:25 v/v. Τη γενιά αυτή ακολούθησε η δημιουργία στατικών φάσεων διολών (diol), για το διαχωρισμό κυρίως πρωτεϊνών και αμιδο-silica στατικών φάσεων για το διαχωρισμό πεπτιδίων. Οι στατικές φάσεις διολών παρουσιάζουν υψηλή πολικότητα και καλή ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου ενώ δεν περιέχουν ιοντισμένες ομάδες εκτός από ορισμένα κατάλοιπα σιλανόλης που δεν έχουν αντιδράσει. Όταν οι αναλύτες παρουσιάζουν βασικό pH εξαιτίας του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και των αλληλεπιδράσεων ιοντοανταλλαγής με τις ομάδες σιλανόλης προτιμώνται στατικές φάσεις όπως οι DIOL-silica. Στην αντίθετη περίπτωση όπου ο αναλύτης είναι όξινη ένωση οι αμινο-silica στατικές φάσεις επιλέγονται καθώς εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια. Πέρα από τις προαναφερθείσες στατικές φάσεις οι οποίες είναι οι πιο διαδεδομένες στην χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης στην περίπτωση πιο πολύπλοκων διαχωρισμών συχνά είναι ανάγκη να χρησιμοποιηθούν διαφορετικού είδους στατικές φάσεις. Πιο συγκεκριμένα, όταν χρησιμοποιείται το pH του αναλύτη ή της στατικής φάσης για να μεταβληθεί ο χρόνος κατακράτησης ή η εκλεκτικότητα του διαχωρισμού, υποκαταστάτες οι οποίοι φέρουν ιοντισμένα τμήματα συνδέονται πάνω σε silica για τη δημιουργία στατικών φάσεων κατάλληλων για τέτοιου είδους διαχωρισμό. Μια μεγάλη ποικιλία τέτοιων ενώσεων χρησιμοποιούνται στην δημιουργία στηλών κατάλληλων για HILIC και παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.11 φέροντας το όνομα “mixed mode” στήλες [27]. Συνολικά τα τελευταία χρόνια εξαιτίας της ευρείας χρήσης της HILIC στον διαχωρισμό πολλών ενώσεων, η ανάπτυξη στηλών για την μέθοδο αυτή έχει αναπτυχθεί ταχέως με αποτέλεσμα την ύπαρξη μεγάλης ποικιλίας στηλών με διαφορετικές στατικές φάσεις [25].



Εικόνα 1.11: Παραδείγματα στατικών φάσεων που χρησιμοποιούνται για χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης [27].

1.4.1 Στήλες Αμιδίου

Μεταξύ των πολλών στατικών φάσεων που χρησιμοποιούνται στην χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης οι στατικές φάσεις αμιδίου είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες. Η ομάδα αμιδίου αποτελείται από έναν άνθρακα, ο οποίος συνδέεται από το ένα άκρο μέσω διπλού δεσμού με ένα άτομο οξυγόνου, από το άλλο άκρο με ένα άτομο αζώτου και το τέταρτο άκρο του συνδέεται με άτομο άνθρακα το οποίο μπορεί να είναι συνδεδεμένο με διάφορες ομάδες. Σε αυτές τις στατικές φάσεις, κατά κύριο λόγο, το ένα άκρο της αμιδομάδας είναι προσδεδεμένο στην silica μέσω μιας ομάδας όπως η προπυλομάδα που χρησιμοποιείται ως σύνδεσμος [30]. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.12 οι ομάδες που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή στηλών αμιδίου μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των εταιρειών κατασκευής τους ωστόσο φέρουν κοινά χαρακτηριστικά όπως η σύνδεση της ομάδας πάνω σε silica και φυσικά η ύπαρξη ομάδας αμιδίου που χρησιμοποιείται για την αλληλεπίδραση με τον αναλύτη.



Εικόνα 1.12: Δομές λειτουργικών ομάδων από στήλες αμιδίου διαφορετικών εταιρειών [30].

Οι στήλες αμιδίου προτιμώνται συγκριτικά με άλλες στήλες όπως των άμινο-στηλών καθώς εμφανίζουν το πλεονέκτημα μη εμφάνισης σχηματισμού βάσεων Schiff με αποτέλεσμα την βελτιωμένη ποσοτικοποίηση του αναλύτη.

1.5 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη και επικύρωση μιας απλής υγροχρωματογραφικής μεθόδου υδρόφιλης αλληλεπίδρασης για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό σακχάρων σε γαλακτοκομικά προϊόντα και πιο συγκεκριμένα σε σκόνη βρεφικού γάλακτος. Ο προσδιορισμός των σακχάρων είναι μία από τις πλέον αναγκαίες αναλύσεις σε εταιρείες τροφίμων και αναλυτικά εργαστήρια για λόγους διαθρεπτικής επισήμανσης. Η περιεκτικότητα σακχάρων, σε σκόνες βρεφικού γάλακτος συνδέεται άμεσα με την καλή ανάπτυξη του βρέφους. Παράλληλα η γνώση του είδους και της συγκέντρωσης σε σάκχαρα είναι απαραίτητη καθώς κίνδυνοι όπως η κατανάλωση τους στην περίπτωση της δυσανεξίας σε λακτόζη συνδέονται με αυτή. Η αναγκαιότητα αυτή σε συνδυασμό με την έλλειψη ύπαρξης μιας επίσημης μεθόδου για ταυτόχρονο προσδιορισμό σακχάρων σε γαλακτοκομικά προϊόντα καθιστά την παρούσα μελέτη και τα ευρήματα της ιδιαίτερα ενδιαφέροντα.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Δείγματα Μελέτης

Ως δείγματα μελέτης χρησιμοποιήθηκαν σκόνη βρεφικού γάλακτος της εταιρείας Γιώτης Α.Ε. (Sanilac I) καθώς και πιστοποιημένο υλικό αναφοράς (NIST 1849). Επιπλέον για τις δοκιμές της μεθόδου σε διαφορετικής κατηγορίας τρόφιμα πέραν των γαλακτοκομικών τροφίμων χρησιμοποιήθηκε βρεφική τροφή σε μορφή σκόνης με βάση τα δημητριακά της εταιρείας Γιώτης Α.Ε. Το βρεφικό γάλα σε σκόνη που χρησιμοποιήθηκε στο σύνολο των πειραμάτων, για τον προσδιορισμό του είδους και της ποσότητας των σακχάρων, παράχθηκε από την ελληνική εταιρεία Γιώτης Α.Ε.. Η εταιρεία Γιώτης Α.Ε. παράγει πολλές σειρές βρεφικών τροφών μεταξύ αυτών και η σειρά βρεφικού γάλακτος σε σκόνη με την ονομασία Sanilac. Η σειρά Sanilac περιλαμβάνει επτά διαφορετικά προϊόντα με γνωστότερα τα Sanilac 1, 2 και 3 καθένα από τα οποία περιέχει όμοια σύσταση με ελαφρές τροποποιήσεις ώστε να καλύπτει τις ανάγκες όλων των βρεφών. Η σύσταση του γάλακτος σύμφωνα με την οποία παράγεται είναι καθορισμένη και αναγράφεται στην διαθρεπτική ετικέτα του τροφίμου. Περίπου το 50% του Sanilac αποτελείται από λακτόζη γεγονός που επισημαίνει την σημασία προσδιορισμού των σακχάρων σε βρεφικά γάλατα. Το Sanilac φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των σακχάρων το Sanilac 1 και για τα πειράματα επικύρωσης το Sanilac free lactose. Ως πιστοποιημένο υλικό αναφοράς (Certified Reference Material, CRM) χρησιμοποιήθηκε η φόρμουλα βρεφικού γάλακτος με κωδικό 1849 από το ινστιτούτο NIST (National Institute of Standards and Technology). Το πιστοποιημένο υλικό αναφοράς φυλάσσεται σε βαθειά κατάψυξη σε θερμοκρασία μικρότερη των $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Το 50,2% ($\pm 0,3\%$) του προϊόντος ήταν υδατάνθρακες και η λακτόζη αποτελούσε το 49,3% ($\pm 1,9\%$) του προϊόντος. Όσον αφορά τις δοκιμές σε διαφορετικής κατηγορίας τρόφιμα από τα γαλακτοκομικά προϊόντα χρησιμοποιήθηκε βρεφική τροφή υπό μορφή σκόνης με βάση τα δημητριακά της οποίας το κύριο συστατικό ήταν το σιτάλευρο. Η βρεφική αυτή τροφή ανήκει σε σειρά βρεφικών προϊόντων της εταιρείας Γιώτης Α.Ε.

2.2 Αντιδραστήρια

- ❖ Υπερκάθαρο Νερό
- ❖ Απόλυτη Αιθανόλη, Fisher Chemical (>99,8%)
- ❖ Carrez I, Titolchimica
- ❖ Carrez II, Titolchimica
- ❖ Ακετονιτρίλιο, Fisher Chemical (>99,9% HPLC Gradient Grade)
- ❖ Τριαιθυλαμίνη, Sigma Aldrich (>99%)
- ❖ Πρότυπο φρουκτόζης (D-(-)-Fructose, M.B. = 180,16), Sigma Aldrich (>99%)
- ❖ Πρότυπο γλυκόζης (D-(+)-Glucose, M.B. = 180,16), Sigma Aldrich (>99,5%)
- ❖ Πρότυπο λακτόζης (D-Lactose Monohydrate, M.B. = 360,31), Sigma Aldrich (>98,0%)
- ❖ Πρότυπο σουκρόζης (Sucrose, M.B. = 342,30), Sigma Aldrich (>99,5%)
- ❖ Πρότυπο λακτουλόζης (Lactulose, M.B. = 342,30), Sigma Aldrich (>98,0%)
- ❖ Βρεφικό Γάλα σε σκόνη Sanilac, Γιώτης Α.Ε.

2.3 Όργανα και Συσκευές

- ✓ Αναλυτικός Ζυγός Ακριβείας (KERN ADB, ακρίβειας $\pm 0,0001$)
- ✓ Υδατόλουτρο με δυνατότητα ανάδευσης (Techne Shaking Bath SB-16)
- ✓ Ογκομετρικές φιάλες των 10, 25 και 500 mL
- ✓ Ογκομετρικοί κύλινδροι διάφορων χωρητικοτήτων
- ✓ Ποτήρια ζέσεως διαφόρων χωρητικοτήτων
- ✓ Μηχανικές πιπέτες (Eppendorf, Physiocare Concept)
- ✓ Πλαστικά φιαλίδια falcon
- ✓ Φίλτρα Σύριγγας PVDF (0,22 μm)
- ✓ Φυγόκεντρος (Hettich Rotofix 32A)
- ✓ Συσκευή παραγωγής υπερκάθολου νερού (Water Purification - Suez, Purite Select Fusion)
- ✓ Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης διακριβωμένος, HPLC High Performance Liquid Chromatography (Agilent Technologies 1260 Infinity) με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (RI G1362A), εξάπορτη βαλβίδα υψηλής έγχυσης

(G1328C), φούρνο θερμοστάτησης στήλης (G131A) και αντλία ανάμιξης έως τεσσάρων διαλυτών με απαερωτή (Q1311C)

- ✓ Στήλη Waters XBridge BEH Amide (250 mm x 4,6 mm, μέγεθος σωματιδίων 3,5 μm)

2.4 Εκχύλιση Σακχάρων από τη σκόνη βρεφικού γάλακτος

Η εκχύλιση των σακχάρων από τη βρεφική τροφή πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Chavez-Servin et al. (2004) με μερικές τροποποιήσεις. Αρχικά ζυγίζονται 0,25 g (με ακρίβεια 0,1 mg) αντιπροσωπευτικού δείγματος από το βρεφικό γάλα σε σκόνη, εντός ογκομετρικής φιάλης 25 mL. Κατόπιν προστίθενται 15 mL μείγματος αιθανόλης – νερού (1:1 v/v) και η ογκομετρική φιάλη τοποθετείται σε υδατόλουτρο, υπό ανάδευση, στους 60 °C για 25 min μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση της σκόνης. Μετά το πέρας των 25 min το διάλυμα αφήνεται να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθενται αρχικά 250 μL διαλύματος Carrez I, το οποίο ακολούθως αναδεύεται για 1 min και στη συνέχεια 250 μL διαλύματος Carrez II με επακόλουθη ανάδευση για 1 min. Το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή της ογκομετρικής φιάλης με μείγμα αιθανόλης: νερού (1:1 v/v). Μετά από επαρκή ανάδευση μεταφέρεται σε σωλήνες φυγοκέντρου, στους οποίους το διάλυμα αφήνεται για 1 ώρα υπό ηρεμία και ακολούθως φυγοκεντρείται στις 4.000 rpm/min για 30 min. Κατόπιν, πραγματοποιείται κατάλληλη αραιώση 1:5 (v/v) με μείγμα ακετονιτρίλιου – νερού (1:1 v/v) και το διάλυμα διηθείται μέσω φίλτρων σύριγγας PVDF με διάμετρο πόρων 0,2 μm .

2.5 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

Για την ανάλυση των δειγμάτων έπειτα από πολλές δοκιμές προέκυψε ότι η καταλληλότερη κινητή φάση έχει αναλογία 75:25 (v/v) ακετονιτρίλιο – νερό με προσθήκη 0,2% (v/v) τριαιθυλαμίνης ως τροποποιητή (ισοκρατικό σύστημα έκλουσης). Η εξισορρόπηση της στήλης γίνεται με σταδιακή άνοδο της ροής έως την τιμή λειτουργίας για την εκάστοτε ανάλυση στην οποία και παραμένει για

τουλάχιστον για 30 min. Έπειτα από ένα σύνολο δοκιμών, βρέθηκε ότι με χρήση ροής 1,0 mL/min, επιτυγχάνεται ο βέλτιστος διαχωρισμός των υπό μελέτη σακχάρων. Στο σύστημα ενίονται χειροκίνητα, μέσω εξάπορτης βαλβίδας έγχυσης, 10 μ L δείγματος. Η ποσότητα δείγματος καθορίστηκε έπειτα από δοκιμές καθώς επηρεάζει τη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών. Η στήλη θερμοστατείται στους 40 °C ενώ η θερμοκρασία του ανιχνευτή δείκτη διάθλασης διατηρείται στους 35 °C.



Εικόνα 2.1 : Το σύστημα HPLC.

2.6 Κατασκευή Πρότυπης Καμπύλης

Για την ποσοτικοποίηση των σακχάρων σε οποιοδήποτε δείγμα τροφίμων είναι απαραίτητη η κατασκευή πρότυπης καμπύλης. Αρχικά παρασκευάστηκε πολύ-πρότυπο διάλυμα με συγκέντρωση 20 mg/mL (για κάθε σάκχαρο) το οποίο περιείχε φρουκτόζη, γλυκόζη, σουκρόζη, λακτόζη και λακτουλόζη. Εδώ να σημειωθεί ότι η πρότυπη καμπύλη κάθε σακχάρου προέκυψε από το πολυπρότυπο διάλυμα ώστε να ληφθούν υπόψη και τυχόν αλληλεπιδράσεις που μπορεί να έχουν τα σάκχαρα μεταξύ τους όπως συμβαίνει και στην πραγματική μήτρα ενός τροφίμου. Τα συγκεκριμένα

σάκχαρα επιλέχθηκαν καθώς συναντώνται συχνότερα σε γαλακτοκομικά τρόφιμα όπως το βρεφικό γάλα σε σκόνη και η διαχωριστική τους ικανότητα έπειτα από δοκιμές κρίθηκε ικανοποιητική. Τα σάκχαρα ζυγίσθηκαν εντός ογκομετρικής φιάλης 10 mL στην οποία προστέθηκαν 5 mL νερού. Προκειμένου να είναι εφικτή η διαλυτοποίηση των σακχάρων στην συγκεκριμένη ποσότητα νερού, είχε μελετηθεί η διαλυτότητα τους σε μείγμα ακετονιτριλίου – νερού (1:1 v/v). Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων προκειμένου να επιταχυνθεί η διαλυτοποίηση. Ακολούθως προστέθηκαν στο διάλυμα 5 mL ακετονιτριλίου ώστε τελικώς τα σάκχαρα να είναι διαλυμένα σε ένα μείγμα ακετονιτριλίου – νερού (1:1 v/v). Από το πυκνό αυτό πολύ-πρότυπο παρασκευάσθηκαν πρότυπα διαλύματα με συγκέντρωση 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL, 2,0 mg/mL, 4,0 mg/mL και 5,0 mg/mL. Όλα τα διαλύματα αραιώθηκαν με μείγμα ακετονιτριλίου – νερού (1:1 v/v). Η πρότυπη καμπύλη εξετάστηκε ως προς τη γραμμικότητα της.

2.7 Δοκιμές Επικύρωσης

Για τις δοκιμές επικύρωσης, κατασκευάσθηκαν πρότυπα διαλύματα για τα σάκχαρα γλυκόζη, φρουκτόζη, σουκρόζη, λακτόζη και λακτουλόζη. Για τα σάκχαρα φρουκτόζη, γλυκόζη και λακτουλόζη παρασκευάσθηκαν πρότυπα διαλύματα με συγκεντρώσεις 10 mg/mL, 15 mg/mL και 25 mg/mL. Για τη λακτόζη παρασκευάσθηκαν πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 25 mg/mL, 50 mg/mL και 60 mg/mL ενώ για την σουκρόζη τα πρότυπα διαλύματα είχαν συγκέντρωση 10 mg/mL, 25 mg/mL και 50 mg/mL. Τα επίπεδα συγκεντρώσεων των πρότυπων διαλυμάτων καθορίστηκαν με βάση τις κατώτερες και ανώτερες συγκεντρώσεις που συνήθως ανευρίσκονται στα περισσότερα τρόφιμα. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε βρεφικό γάλα σε σκόνη χωρίς λακτόζη (Sanilac FL) της εταιρείας Γιώτης Α.Ε.. Σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL ζυγίζονται 0,25 g (με ακρίβεια $\pm 0,0001$ g) αντιπροσωπευτικού δείγματος από τη φόρμουλα βρεφικού γάλακτος σε σκόνη χωρίς λακτόζη. Στην σκόνη γάλακτος προστίθεται η καθορισμένη ποσότητα πρότυπου διαλύματος του εκάστοτε σακχάρου ανάλογα με το επίπεδο για το οποίο πραγματοποιούνται τα πειράματα. Το σύστημα αφήνεται σε ηρεμία για 30 min προκειμένου το πρότυπο διάλυμα να ενσωματωθεί στην μήτρα του τροφίμου. Ακολούθως η πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται με πανομοιότυπο τρόπο όπως περιγράφηκε παραπάνω για δείγματα βρεφικού γάλακτος σε σκόνη. Η

πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε έξι φορές μέσα στην ίδια μέρα για τον καθορισμό της επαναληψιμότητας της μεθόδου. Για τον καθορισμό της αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου, η πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες έξι φορές μία διαφορετική ημέρα και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά της αρχικής μέρας.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Εκχύλιση Σακχάρων

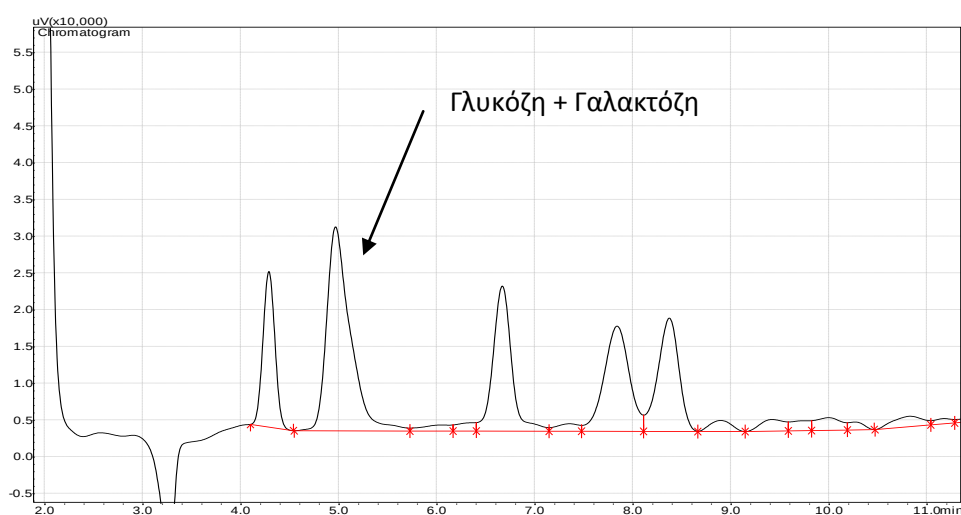
Η εκχύλιση των σακχάρων από τη βρεφική τροφή πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Chavez-Servin et al. (2004) με μερικές τροποποιήσεις. Η εκχύλιση της μεθόδου στηρίζεται κυρίως στην χρήση αιθανόλης μιας οργανικής ένωσης με πολικό χαρακτήρα χάρη στην υδροξυλομάδα που φέρει. Ο χαρακτήρας αυτός την κάνει ιδανική για την εκχύλιση πολικών ουσιών από τα τρόφιμα όπως τα σάκχαρα. Ωστόσο ταυτόχρονα με τα σάκχαρα, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι εκχυλίζονται και άλλες ομάδες ουσιών, όπως οι πρωτεΐνες. Ταυτόχρονα η αιθανόλη δρα και ως αντιμικροβιακός παράγοντας, προστατεύοντας τους δισακχαρίτες (ή/και ανώτερα μέλη) από τυχόν υδρόλυσή τους λόγω μικροβιακής δράσης. Η διαλυτοποίηση του δείγματος και η εκχύλιση των ουσιών υποβοηθούνται από την ανάδευση αλλά και την θέρμανση του διαλύματος καθώς οι αντιδράσεις επιταχύνονται. Επίσης, κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιούνται διαλύματα Carrez, τα οποία βοηθούν στην καταβύθιση ουσιών που έχουν εκχυλιστεί λόγω της αιθανόλης, πέραν των σακχάρων, όπως οι πρωτεΐνες. Οι ουσίες αυτές είναι απαραίτητο να καταβυθιστούν καθώς θα παρεμποδίσουν την ανάλυση των σακχάρων και επιμολύνουν τη χρωματογραφική στήλη. Ωστόσο πρέπει να σημειωθεί ότι χρησιμοποιήθηκε μια μέση ποσότητα διαλυμάτων Carrez καθώς προσθήκη μεγάλης ποσότητας μπορεί να οδηγήσει στην ενίσχυση θορύβου στο χρωματογράφημα. Τέλος το δείγμα είναι απαραίτητο να περνάει μέσω φίλτρων σύριγγας PVDF καθώς η αραίωση με μίγμα ακετονιτριλίου-νερού 1:1 (v/v) μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω καταβύθιση ουσιών επιμολύνοντας τη χρωματογραφική στήλη.

3.2 Προσδιορισμός Χρωματογραφικών Συνθηκών του Συστήματος

Για να επιτευχθεί ο προσδιορισμός των σακχάρων σε ένα τρόφιμο θα πρέπει αρχικά να είναι χρωματογραφικά εφικτός ο διαχωρισμός των σακχάρων που περιέχονται σε αυτό. Ο διαχωρισμός όλων των σακχάρων με τη χρήση συγκεκριμένης στήλης ή συγκεκριμένης κινητής φάσης δεν είναι πάντα δυνατός. Συχνά τυχαίνει δύο σάκχαρα υπό συγκεκριμένες συνθήκες να εκλούνται στον ίδιο χρόνο ή η παρουσία γαλακτολιγосακχαριτών και φρουκτολιγосακχαριτών στη μήτρα του τροφίμου να

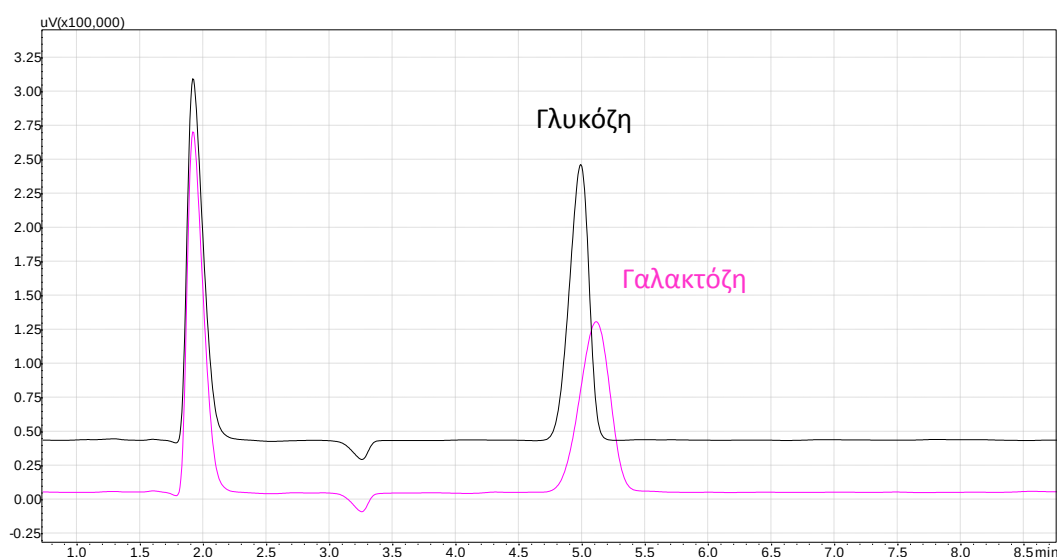
δυσχεραίνει τον σωστό χρωματογραφικό διαχωρισμό. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η ποσοτικοποίηση των σακχάρων ενός τροφίμου δεν είναι εφικτή και θα πρέπει να μελετηθούν οι σωστές συνθήκες ανάλυσης ώστε να επιτευχθεί. Δεν είναι ασύνηθες, να χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερες διαφορετικές συνθήκες ανάλυσης (π.χ. χρήση δύο διαφορετικών στηλών) προκειμένου να προσδιορισθούν όλα τα σάκχαρα ενός τροφίμου.

Τα σάκχαρα που επιδιώχτηκε αρχικά να διαχωριστούν ήταν η φρουκτόζη, η γλυκόζη, η γαλακτόζη, η σουκρόζη, η μαλτόζη κι η λακτόζη. Η επιλογή τους έγινε τόσο εμπειρικά όσο και βιβλιογραφικά με βάση την αυξημένη τους πιθανότητα να περιέχονται σε γαλακτοκομικά τρόφιμα, όπως το βρεφικό γάλα. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκε ένα πολυπρότυπο διάλυμα το οποίο περιείχε τα έξι αυτά σάκχαρα σε γνωστή συγκέντρωση. Ταυτόχρονα παρασκευάστηκαν και ξεχωριστά πρότυπα διαλύματα του κάθε σακχάρου προκειμένου να προσδιορισθεί ο χρόνος έκλουσης του καθενός από αυτά. Για το διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε ισοκρατικό σύστημα έκλουσης με ανάμιξη δύο κινητών φάσεων σε αναλογία 90% κινητή φάση Α και 10% κινητή φάση Β. Η σύσταση της κινητής φάσης Α ήταν 80:20 (v/v) ακετονιτρίλιο – νερό με 0,2% (v/v) τριαιθυλαμίνη ενώ η σύσταση της κινητής φάσης Β ήταν 30:70 (v/v) ακετονιτρίλιο – νερό με 0,2% (v/v) τριαιθυλαμίνη. Με την ίδια κινητή φάση αναλύθηκαν και τα πρότυπα των επιμέρους σακχάρων.



Εικόνα 3.1 : Χρωματογράφημα πολυπρότυπου των σακχάρων φρουκτόζη, γλυκόζη, γαλακτόζη, σουκρόζη, μαλτόζη και λακτόζη με χρήση ισοκρατικού συστήματος με αναλογία 90% κινητή φάση Α και 10% κινητή φάση Β. Η σύσταση της κινητής φάσης Α ήταν 80:20 (v/v) ακετονιτρίλιο – νερό με 0,2% (v/v) τριαιθυλαμίνη ενώ η σύσταση της κινητής φάσης Β ήταν 30:70 (v/v) ακετονιτρίλιο – νερό με 0,2% (v/v) τριαιθυλαμίνη.

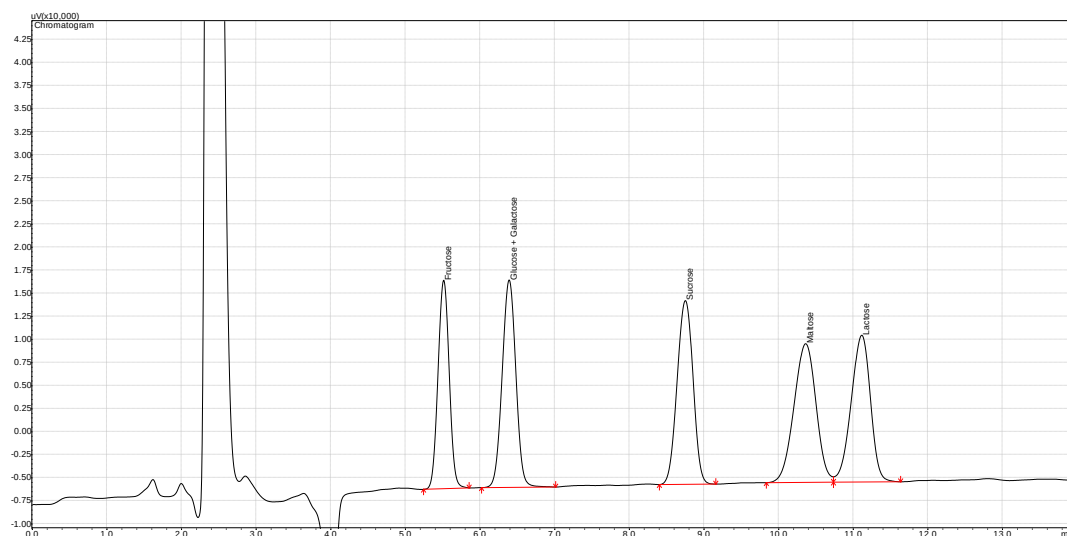
Όπως παρατηρείται και από την Εικόνα 3.1 ο διαχωρισμός ήταν επιτυχής εκτός του ζεύγους των σακχάρων γλυκόζη και γαλακτόζη που εκλούνται σε κοντινούς χρόνους (Εικόνα 3.2). Η διερεύνηση της κορυφής που εκλούεται περίπου στα 5 min (υποδεικνύεται με βέλος) οφείλεται στην γαλακτόζη η οποία εκλούεται ελαφρώς δεξιότερα της γλυκόζης με αποτέλεσμα οι δύο κορυφές σχεδόν να συμπίπτουν (Εικόνα 3.2). Επίσης, από το χρωματογράφημα της Εικόνας 3.1 παρατηρείται η ύπαρξη έντονου θορύβου, ο οποίος οφειλόταν στην ανάμιξη των δύο κινητών φάσεων που χρησιμοποιήθηκαν. Είναι γενικώς γνωστή η επίδραση αυτού του τύπου σε ανιχνευτές δείκτη διάθλασης. Ωστόσο, προς αποφυγή εκτεταμένης κατανάλωσης διαλυτών, επιλέχθηκε αρχικά (διερεύνηση βέλτιστων συνθηκών ανάλυσης) αυτός ο τρόπος λειτουργίας.



Εικόνα 3.2: Χρωματογράφημα Γλυκόζης (μαύρη γραμμή) και Γαλακτόζης (ροζ γραμμή)

Η ανάλυση του χρωματογραφήματος της Εικόνας 3.1 αντιστοιχεί σε ροή 1,0 mL/min. Για τον διαχωρισμό του ζεύγους γλυκόζης – γαλακτόζης δοκιμάστηκε και μικρότερη ροή (0,8 mL/min) χωρίς όμως αποτέλεσμα.

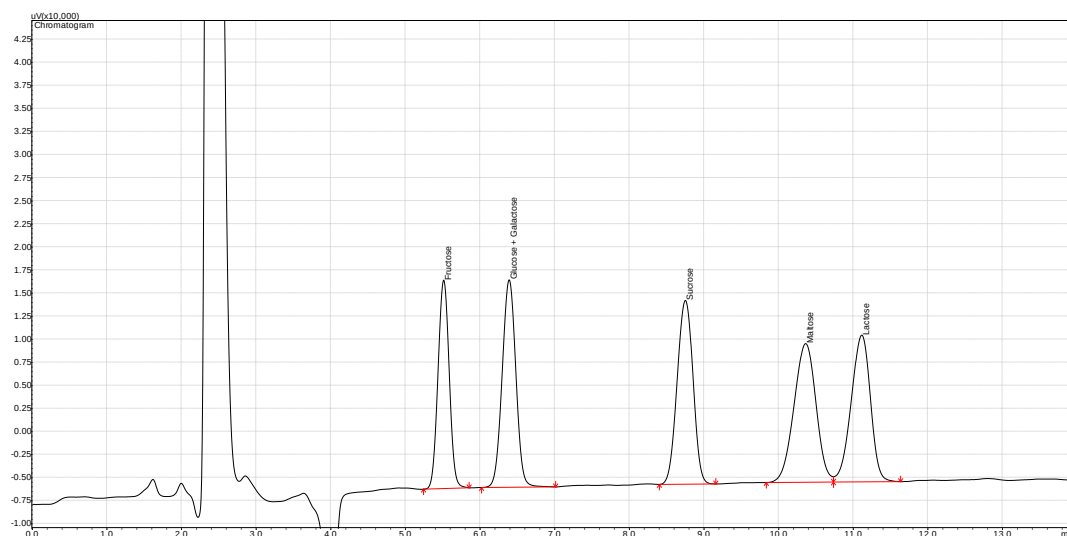
Προς μείωση του θορύβου αποφασίστηκε η χρήση κινητής φάσης η οποία δεν προέκυπτε από ανάμιξη στο σύστημα. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε είχε αναλογία 80:20 ακετονιτρίλιο – νερό με 0,2% (v/v) τριαιθυλαμίνη και ροή 0,8 mL/min. Το αντίστοιχο χρωματογράφημα παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.3.



Εικόνα 3.3: Χρωματογράφημα πολυπροτύπου των σακχάρων φρουκτόζη, γλυκόζη, γαλακτόζη, σουκρόζη, μαλτόζη και λακτόζη με αναλογία 80:20 (v/v) ακετονιτρίλιο – νερό και 0,2% (v/v) τριαιθυλαμίνη.

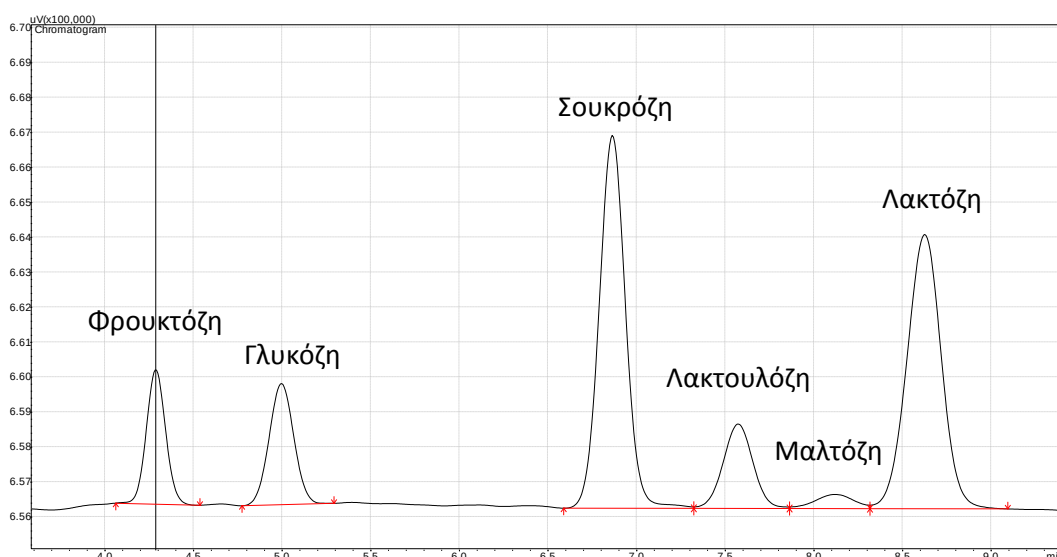
Όπως παρατηρείται από το χρωματογράφημα της Εικόνας 3.3, ο θόρυβος στο χρωματογράφημα είναι μειωμένος συγκριτικά με αυτόν που παρατηρείται στο χρωματογράφημα της Εικόνας 3.1 λόγω της απουσίας ανάμιξης κινητών φάσεων. Ο διαχωρισμός των σακχάρων γλυκόζη και γαλακτόζη συνεχίζει να μην είναι επιτυχής παρά την ταυτόχρονη μείωση της ροής σε 0,8 mL/min. Επίσης η χαμηλή αυτή ροή κρίνεται ακατάλληλη καθώς δεν βοηθά στο διαχωρισμό του ζεύγους σακχάρων και παράλληλα δημιουργεί και έντονη διεύρυνση των κορυφών των υπόλοιπων σακχάρων, γεγονός ανεπιθύμητο για την επίτευξη σωστής ποσοτικοποίησης.

Στην Εικόνα 3.4 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του πολυπροτύπου με κινητή φάση 75:25 (v/v) ακετονιτρίλιο – νερό και 0,2% (v/v) τριαιθυλαμίνη και ροή 1,0 mL/min. Οι κορυφές του χρωματογραφήματος είναι πιο οξείες από αυτές του χρωματογραφήματος 3.3 για αυτό και η χρήση αυτών των συνθηκών κρίθηκαν καταλληλότερες. Επίσης, μειώνεται ελαφρώς και ο χρόνος ανάλυσης.



Εικόνα 3.4: Χρωματογράφημα πολυπρωτύπου των σακχάρων φρουκτόζη, γλυκόζη, γαλακτόζη, σουκρόζη, μαλτόζη και λακτόζη με αναλογία 75:25 (v/v) ακετονιτρίλιο – νερό και 0,2% (v/v) τριαιθυλαμίνη.

Με βάση τις ανωτέρω δοκιμές, βρέθηκε ότι οι βέλτιστες συνθήκες διαχωρισμού ήταν: κινητή φάση ακετονιτρίλιου-νερού (75:25 v/v) και 0,2% (v/v) τριαιθυλαμίνη ως τροποποιητή με ροή 1 mL/min. Επίσης πραγματοποιήθηκαν και δοκιμές για την εύρεση της κατάλληλης ποσότητας δείγματος που ενιόταν στο σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε το χρωματογραφικό αποτέλεσμα της έγχυσης 20, 10 και 5 μ L. Η κατάλληλη ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε τελικώς ήταν τα 10 μ L δείγματος λόγω συμβιβασμού μεταξύ μικρού εύρους κορυφών και ορίου ποσοτικοποίησης, καθώς και της αποφυγής επιμόλυνσης της χρωματογραφικής στήλης. Δυστυχώς παρά τις δοκιμές πολλών και διαφορετικών κινητών φάσεων αλλά και ροών το ζεύγος γλυκόζης γαλακτόζης δεν κατάφερε να διαχωριστεί με τη χρήση της συγκεκριμένης στήλης. Εκ των δύο αποφασίστηκε να χρησιμοποιείται στα πρότυπα διαλύματα η γλυκόζη καθώς είναι πιο διαδεδομένη στα περισσότερα τρόφιμα. Σύμφωνα με την εταιρεία κατασκευής της στήλης (Waters), ο συγκεκριμένος διαχωρισμός είναι εφικτός αλλά απαιτείται η χρησιμοποίηση βαθμιδωτού συστήματος έκλυσης, το οποίο είναι ασύμβατο με τον ανιχνευτή δείκτη διάθλασης. Τέλος, παρασκευάστηκε ένα πολυπρότυπο, το οποίο περιείχε τα ανωτέρω σάκχαρα (εκτός γαλακτόζης) και λακτουλόζη. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.5 ο διαχωρισμός κρίνεται επαρκής.



Εικόνα 3.5: Χρωματογράφημα πολυπροτύπου των σακχάρων φρουκτόζη, γλυκόζη, σουκρόζη, λακτουλόζη, μαλτόζη και λακτόζη στις καταλληλότερες συνθήκες ανάλυσης (κινητή φάση ακετονιτρίλιο/νερό 75:25 (v/v) και 0,2% (v/v) τριαιθυλαμίνη, ροή 1 mL/min).

3.3 Εξέταση χρωματογραφικών παραμέτρων

Έπειτα από τον καθορισμό των σωστών συνθηκών για την επίτευξη του διαχωρισμού των σακχάρων που επιλέχθηκαν, εξετάστηκαν κάποιες χρωματογραφικές παράμετροι ώστε να κριθεί η επιτυχία του διαχωρισμού αυτού. Αυτές οι παράμετροι συνήθως εξετάζουν την ποιότητα των κορυφών, τον σωστό διαχωρισμό τους και άλλα ποιοτικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με το χρωματογράφημα που λαμβάνεται. Ο όρος *Διαχωριστικότητα* ή *Διαχωριστική Ικανότητα* (resolution) είναι ένα ποσοτικό μέτρο της ικανότητας της στήλης να διαχωρίσει δύο αναλύτες. Ορίζεται σύμφωνα με το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ως:

$$R_s = (2,35/2) \cdot (t_{R2} - t_{R1}) / (w_{b1} + w_{b2})$$

Όπου t_R ο χρόνος κατακράτησης μιας κορυφής και w_b το πλάτος μιας κορυφής. Γενικά είναι επιθυμητό η διαχωριστικότητα να λαμβάνει τιμές >1 . Συχνά επίσης εξετάζεται ο παράγοντας συμμετρίας των κορυφών, ο οποίος σχετίζεται με δύο βασικές παραμορφώσεις των χρωματογραφικών κορυφών: την εμφάνιση «μετώπου» (fronting) και την εμφάνιση «ουράς» (tailing). Η εμφάνιση «μετώπου» αναφέρεται σε διεύρυνση του αριστερού τμήματος της κορυφής και μπορεί να οφείλεται στην

εισαγωγή μεγάλης ποσότητας δείγματος. Μπορεί επίσης να οφείλεται στην χρήση πολύ «ασχυρού» διαλύτη ή σε χαμηλή θερμοκρασία στήλης. Η εμφάνιση «ουράς» αναφέρεται σε διεύρυνση του δεξιού τμήματος της κορυφής και σχετίζεται με ένα πολύ συχνό φαινόμενο, την επιμόλυνση του συστήματος ή της στήλης. Ιδανικά είναι επιθυμητό ο παράγοντας συμμετρίας μιας κορυφής να παρουσιάζει τιμή κοντά στη μονάδα. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται ενδεικτικά οι τιμές συμμετρίας και διαχωριστικής ικανότητας για πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 5 mg/mL (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1: Παράγοντας συμμετρίας και διαχωριστική ικανότητα της κορυφής κάθε σακχάρου. Οι τιμές προέκυψαν από χρωματογράφημα πολυπρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης 5 mg/mL.

Σάκχαρο	Παράγοντας Συμμετρίας	Διαχωριστική Ικανότητα
Φρουκτόζη	1,051	-
Γλυκόζη	1,020	3,073
Σουκρόζη	1,031	7,059
Λακτουλόζη	1,009	2,465
Μαλτόζη	0,907	1,530
Λακτόζη	0,988	1,321

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 3.1 οι κορυφές παρουσιάζουν καλή συμμετρία με τιμή κοντά στη μονάδα ενώ αντίστοιχα οι τιμές διαχωριστικής ικανότητας είναι αρκετά μεγάλες. Συνεπώς το χρωματογράφημα φαίνεται να έχει μία καλή εικόνα και ο διαχωρισμός των κορυφών να είναι επιτυχής.

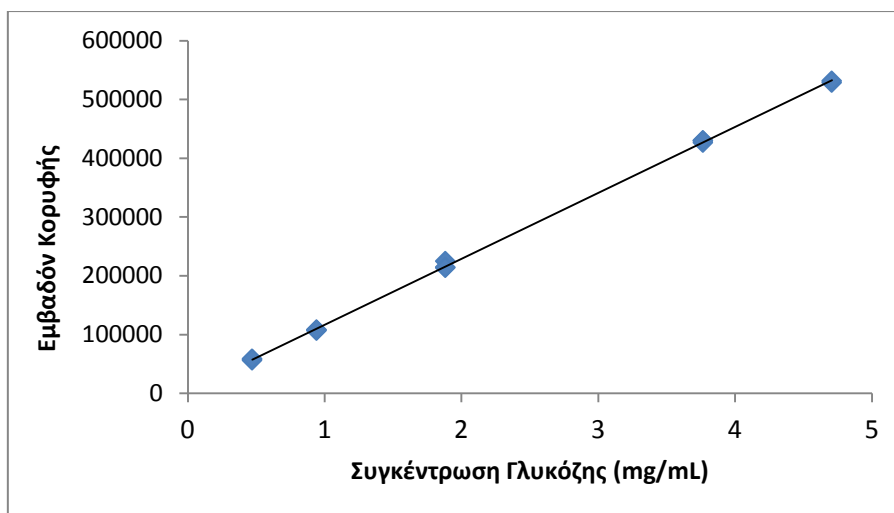
3.4 Γραμμικότητα

Για την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου σακχάρου το οποίο μπορεί να βρεθεί σε ένα δείγμα είναι απαραίτητη η κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Τα σάκχαρα τα οποία επιλέχθηκαν για την κατασκευή ενός πολύ-πρότυπου διαλύματος ήταν η φρουκτόζη, η γλυκόζη, η σουκρόζη, η λακτόζη και η λακτουλόζη

καθώς απαντώνται συχνά όχι μόνο σε γαλακτοκομικά τρόφιμα αλλά και γενικότερα στο μεγαλύτερο ποσοστό των τροφίμων. Για τα συγκεκριμένα σάκχαρα κατασκευάστηκαν και πρότυπες καμπύλες. Η πρότυπη καμπύλη κάθε σακχάρου κατασκευάστηκε με βάση το εμβαδόν (area) της αντίστοιχης κορυφής. Το πολύ-πρότυπο διάλυμα κάθε συγκέντρωσης εγχύθηκε στο σύστημα τρεις φορές προκειμένου να υπάρχει μεγαλύτερη ακρίβεια και να απορριφθούν τιμές οι οποίες θα κριθούν ακατάλληλες.

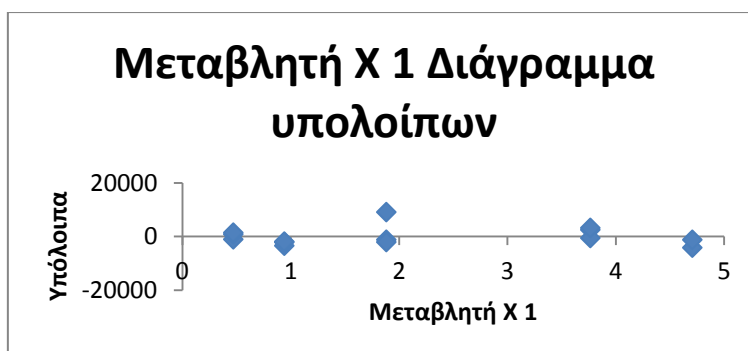
Η πρότυπη καμπύλη προκειμένου να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση δειγμάτων θα πρέπει να αξιολογηθεί με αναλυτικά δεδομένα. Για την αξιολόγηση της πρότυπης καμπύλης αρχικά εξετάζεται ο συντελεστής συσχέτισης (r) καθώς και ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2). Προκειμένου να θεωρηθεί ότι η γραμμικότητα μιας πρότυπης καμπύλης είναι καλή, δηλαδή ότι τα δεδομένα ταιριάζουν καλά σε μία ευθεία, θα πρέπει ο συντελεστής συσχέτισης να είναι όσο το δυνατόν πιο κοντά στη μονάδα ($0,9970 \leq r$). Ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2) εκφράζει το ποσοστό της διασποράς του μετρούμενου μεγέθους (y) που μπορεί εξηγηθεί από τη γραμμική προσαρμογή αυτού σε σχέση με τη συγκέντρωση και είναι επιθυμητό να έχει τιμή επίσης κοντά στη μονάδα. Είναι αυτονόητο ότι σε κάθε περίπτωση εξετάστηκε η γραμμικότητα και οπτικώς από το διάγραμμα της ευθείας παλινδρόμησης. Επίσης για την πρότυπη καμπύλη κάθε σακχάρου εξετάστηκε το διάγραμμα υπολοίπων. Η ανάλυση των υπολοίπων μπορεί να δείξει την επιτυχία της προσαρμογής του γραμμικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα και να δείξει εάν οι προϋποθέσεις του μοντέλου είναι ορθές.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι πρότυπες καμπύλες για όλα τα σάκχαρα, τα διαγράμματα υπολοίπων και η στατιστική ανάλυση των δεδομένων τους για την αξιολόγηση της γραμμικότητάς τους.



Εικόνα 3.6: Πρότυπη καμπύλη γλυκόζης.

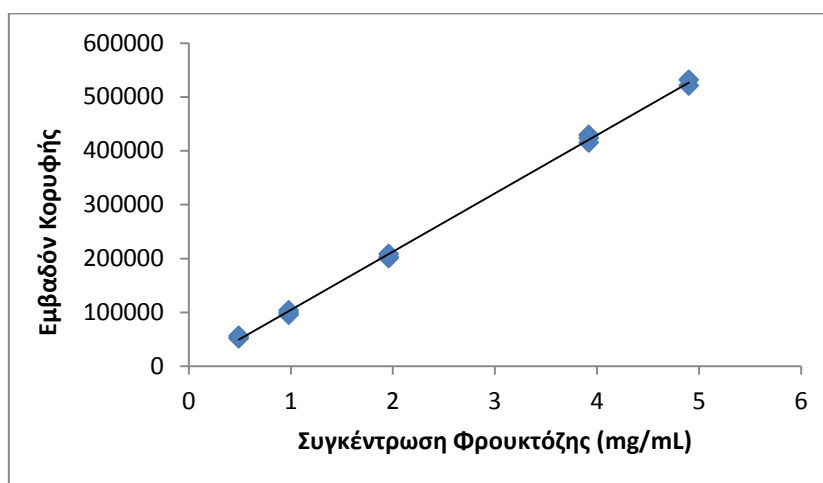
Η πρότυπη καμπύλη γλυκόζης κρίθηκε ως προς τη γραμμικότητα της βάση στοιχείων παλινδρόμησης. Η εξίσωση που προέκυψε για την γλυκόζη από τα σημεία ήταν η $y = 112253x + 4500,6$. Ο συντελεστής συσχέτισης (r) είναι ίσος με 0,9998 ενώ το τυπικό σφάλμα (S.E.) έχει τιμή 3509. Ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2) που αντιστοιχεί στην ευθεία έχει τιμή 0,9997 δηλαδή το 99,97% της διασποράς του μετρούμενου μεγέθους (εμβαδό) μπορεί να εξηγηθεί από το γραμμικό μοντέλο (την εξίσωση της ευθείας). Σύμφωνα με τα ανωτέρω, η γραμμικότητα της πρότυπης καμπύλης αναφοράς μπορεί να θεωρηθεί καλή. Να σημειωθεί πως για το πυκνότερο διάλυμα έχει απορριφθεί μια σειρά τιμών με το σφάλμα να οφείλεται πιθανόν σε λάθος κατά την έγχυση του δείγματος.



Εικόνα 3.7: Διάγραμμα Υπολοίπων για την μεταβλητή X.

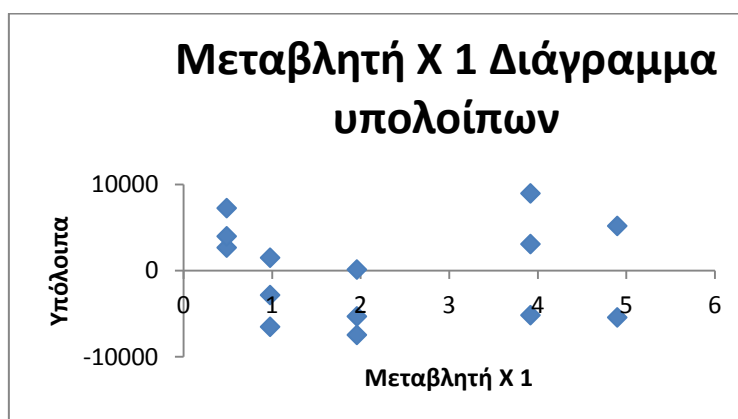
Όπως φαίνεται και από το Διάγραμμα Υπολοίπων της Εικόνας 3.7 οι τιμές των υπολοίπων είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες γύρω από τον άξονα x και δεν

υπάρχει κάποια τάση στη διασπορά των υπολοίπων σε σχέση με την συγκέντρωση. Επομένως το γραμμικό μοντέλο φαίνεται να προσαρμόζεται επιτυχώς στα πειραματικά δεδομένα.



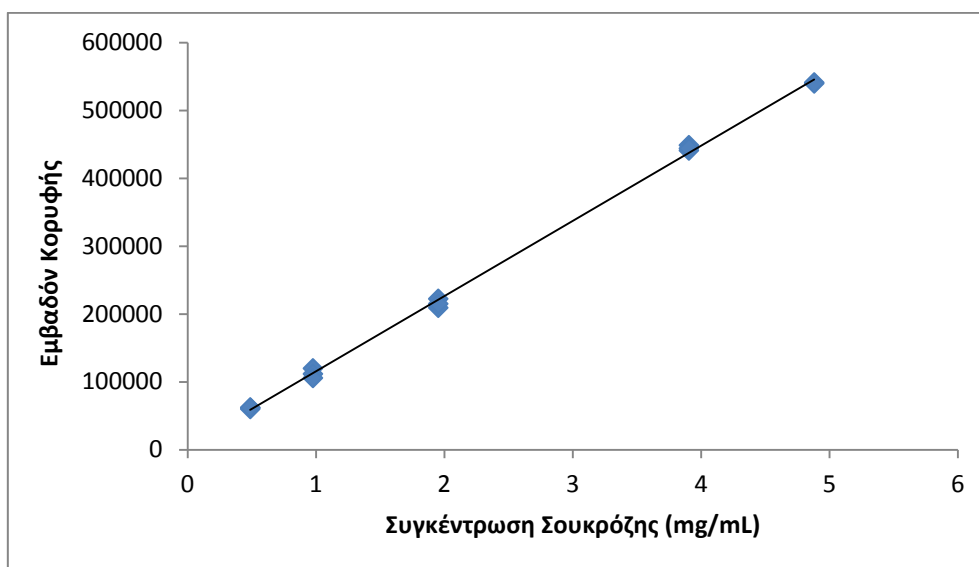
Εικόνα 3.8: Πρότυπη Καμπύλη φρουκτόζης.

Η πρότυπη καμπύλη φρουκτόζης κρίθηκε ως προς τη γραμμικότητα της βάση στοιχείων παλινδρόμησης. Η εξίσωση που προέκυψε για την φρουκτόζη από τα σημεία ήταν η $y = 108263x - 3898,8$. Ο συντελεστής συσχέτισης (r) είναι ίσος με 0,9996, ενώ το τυπικό σφάλμα (S.E.) έχει τιμή 5664. Ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2) που αντιστοιχεί στην ευθεία έχει τιμή 0,9991 δηλαδή το 99,91% της διασποράς του μετρούμενου μεγέθους (εμβαδό) μπορεί να εξηγηθεί από το γραμμικό μοντέλο (την εξίσωση της ευθείας). Σύμφωνα με τα ανωτέρω, η γραμμικότητα της πρότυπης καμπύλης μπορεί να θεωρηθεί καλή. Να σημειωθεί πως για το πυκνότερο διάλυμα έχει απορριφθεί μια σειρά τιμών με το σφάλμα να οφείλεται πιθανόν σε λάθος κατά την έγχυση του δείγματος.



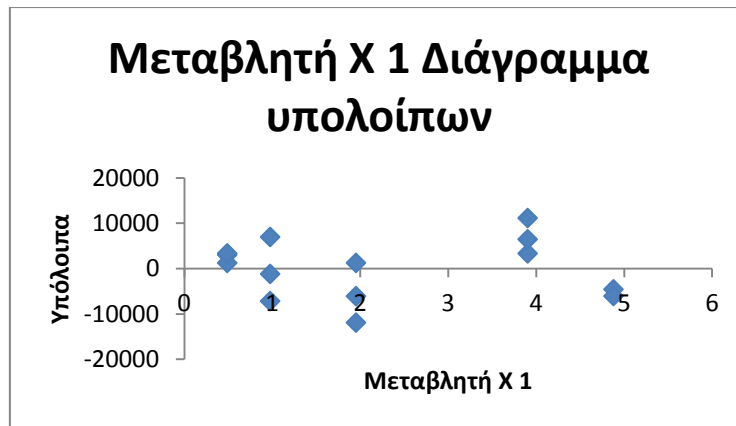
Εικόνα 3.9: Διάγραμμα Υπολοίπων για την μεταβλητή X.

Όπως φαίνεται και από το Διάγραμμα Υπολοίπων της Εικόνας 3.9 οι τιμές των υπολοίπων είναι ομοιόμορφα κατανομημένες γύρω από τον άξονα χ και δεν υπάρχει κάποια τάση στη διασπορά των υπολοίπων σε σχέση με την συγκέντρωση. Επομένως το γραμμικό μοντέλο φαίνεται να προσαρμόζεται επιτυχώς στα πειραματικά δεδομένα.



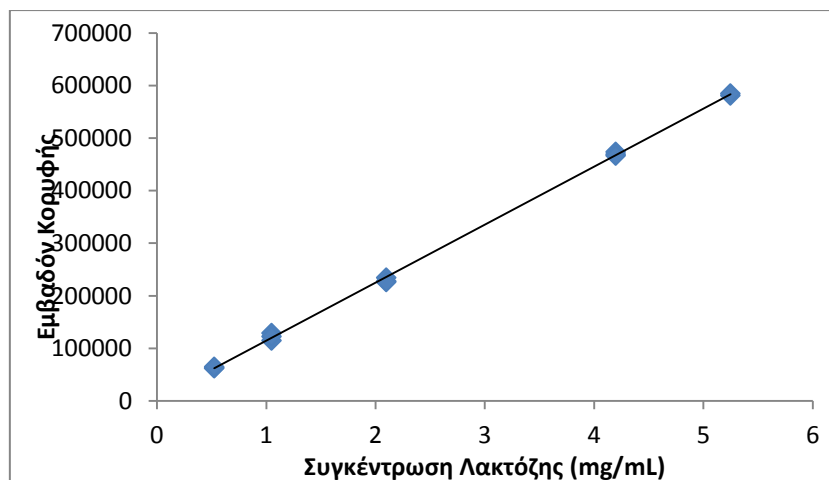
Εικόνα 3.10: Πρότυπη Καμπύλη σουκρόζης.

Η πρότυπη καμπύλη φρουκτόζης κρίθηκε ως προς τη γραμμικότητα της βάση στοιχείων παλινδρόμησης. Η εξίσωση που προέκυψε για την σουκρόζη από τα σημεία ήταν η $y = 110874x + 4570,3$. Ο συντελεστής συσχέτισης (r) είναι ίσος με 0,9994, ενώ το τυπικό σφάλμα (S.E.) έχει τιμή 6700. Ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2) που αντιστοιχεί στην ευθεία έχει τιμή 0,9988 δηλαδή το 99,88% της διασποράς του μετρούμενου μεγέθους (εμβαδό) μπορεί να εξηγηθεί από το γραμμικό μοντέλο (την εξίσωση της ευθείας). Σύμφωνα με τα ανωτέρω, η γραμμικότητα της πρότυπης καμπύλης μπορεί να θεωρηθεί καλή. Να σημειωθεί πως για το πυκνότερο διάλυμα έχει απορριφθεί μια σειρά τιμών με το σφάλμα να οφείλεται πιθανόν σε λάθος κατά την έγχυση του δείγματος.



Εικόνα 3.11: Διάγραμμα Υπολοίπων για την μεταβλητή X.

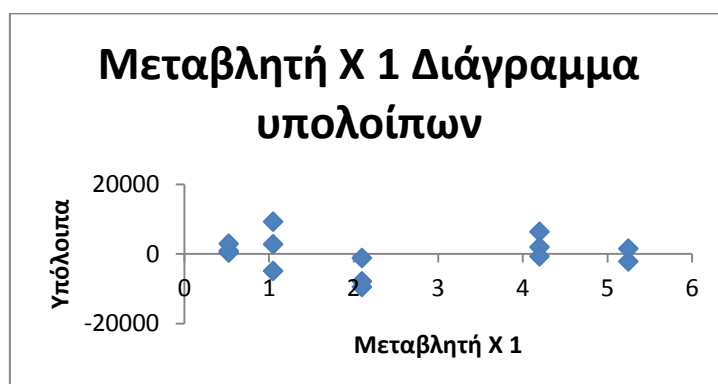
Όπως φαίνεται και από το Διάγραμμα Υπολοίπων της Εικόνας 3.11 οι τιμές των υπολοίπων είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες γύρω από τον άξονα x και δεν υπάρχει κάποια τάση στη διασπορά των υπολοίπων σε σχέση με την συγκέντρωση. Επομένως το γραμμικό μοντέλο φαίνεται να προσαρμόζεται επιτυχώς στα πειραματικά δεδομένα.



Εικόνα 3.12: Πρότυπη Καμπύλη λακτόζης.

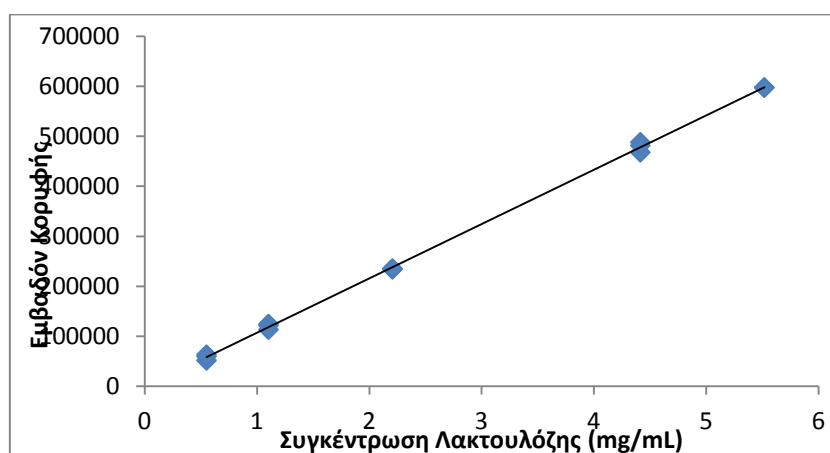
Η πρότυπη καμπύλη λακτόζης κρίθηκε ως προς τη γραμμικότητα της βάση στοιχείων παλινδρόμησης. Η εξίσωση που προέκυψε για την λακτόζη από τα σημεία ήταν η $y = 110403x + 4071,7$. Ο συντελεστής συσχέτισης (r) είναι ίσος με 0,9997, ενώ το τυπικό σφάλμα (S.E.) έχει τιμή 5259. Ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2) που αντιστοιχεί στην ευθεία έχει τιμή 0,9994 δηλαδή το 99,94% της διασποράς του μετρούμενου μεγέθους (εμβάδο) μπορεί να εξηγηθεί από το γραμμικό μοντέλο (την εξίσωση της ευθείας). Σύμφωνα με τα ανωτέρω, η γραμμικότητα της πρότυπης

καμπύλης μπορεί να θεωρηθεί καλή. Να σημειωθεί πως για το πυκνότερο διάλυμα έχει απορριφθεί μια σειρά τιμών με το σφάλμα να οφείλεται πιθανόν σε λάθος κατά την έγχυση του δείγματος.



Εικόνα 3.13: Διάγραμμα Υπολοίπων για την μεταβλητή X.

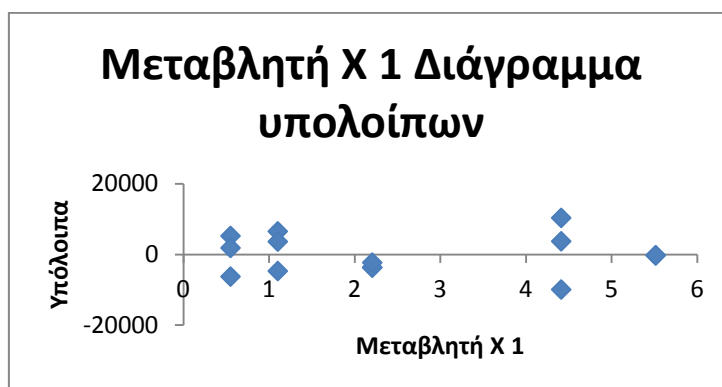
Όπως φαίνεται και από το Διάγραμμα Υπολοίπων της Εικόνας 3.13 οι τιμές των υπολοίπων είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες γύρω από τον άξονα χ και δεν υπάρχει κάποια τάση στη διασπορά των υπολοίπων σε σχέση με την συγκέντρωση. Επομένως το γραμμικό μοντέλο φαίνεται να προσαρμόζεται επιτυχώς στα πειραματικά δεδομένα.



Εικόνα 3.14: Πρότυπη Καμπύλη λακτουλόζης.

Η πρότυπη καμπύλη λακτουλόζης κρίθηκε ως προς τη γραμμικότητα της βάση στοιχείων παλινδρόμησης. Η εξίσωση που προέκυψε για την λακτουλόζη από τα σημεία ήταν η $y = 108750x - 1833,9$. Ο συντελεστής συσχέτισης (r) είναι ίσος με 0,9996, ενώ το τυπικό σφάλμα (S.E.) έχει τιμή 5773. Ο συντελεστής προσδιορισμού (r^2) που αντιστοιχεί στην ευθεία έχει τιμή 0,9993 δηλαδή το 99,93% της διασποράς

του μετρούμενου μεγέθους μπορεί να εξηγηθεί από το γραμμικό μοντέλο (την εξίσωση της ευθείας). Σύμφωνα με τα ανωτέρω, η γραμμικότητα της πρότυπης καμπύλης μπορεί να θεωρηθεί καλή. Να σημειωθεί πως για το πυκνότερο διάλυμα έχει απορριφθεί μια σειρά τιμών με το σφάλμα να οφείλεται πιθανόν σε λάθος κατά την έγχυση του δείγματος.



Εικόνα 3.15: Διάγραμμα Υπολοίπων για την μεταβλητή X.

Όπως φαίνεται και από το Διάγραμμα Υπολοίπων της Εικόνας 3.15 οι τιμές των υπολοίπων είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες γύρω από τον άξονα x και δεν υπάρχει κάποια τάση στη διασπορά των υπολοίπων σε σχέση με την συγκέντρωση. Επομένως το γραμμικό μοντέλο φαίνεται να προσαρμόζεται επιτυχώς στα πειραματικά δεδομένα.

Παρακάτω παρουσιάζεται ένας συνοπτικός πίνακας με την εξίσωση ευθείας κάθε πρότυπης καμπύλης, τον συντελεστή προσδιορισμού και το εύρος συγκεντρώσεων κάθε πρότυπης καμπύλης (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2: Γραμμικότητα καμπύλης βαθμονόμησης σακχάρων.

Σάκχαρο	Εύρος Συγκέντρωσης (mg/mL)	Συντελεστής προσδιορισμού (r^2)	Εξίσωση Ευθείας
Γλυκόζη	0,5 - 5,0	0,9997	$y = 112253x + 4500,6$
Φρουκτόζη	0,5 - 5,0	0,9991	$y = 108263x - 3898,8$
Σουκρόζη	0,5 - 5,0	0,9988	$y = 110874x + 4570,3$
Λακτόζη	0,5 - 5,0	0,9994	$y = 110403x + 4071,7$
Λακτουλόζη	0,5 - 5,0	0,9993	$y = 108750x - 1833,9$

3.5 Προσδιορισμός σακχάρων σε βρεφικές τροφές

Η κατασκευή πρότυπης καμπύλης επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των σακχάρων σε δείγματα τροφίμων. Επομένως έπειτα από τον καθορισμό των συνθηκών λειτουργίας του συστήματος και τον ακριβή προσδιορισμό του χρόνου έκλουσης κάθε σακχάρου ήταν δυνατή η δοκιμή της μεθόδου σε βρεφικές τροφές. Τα δείγματα επεξεργάστηκαν σύμφωνα με την πειραματική πορεία που περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε εξάδες δειγμάτων ώστε να είναι δυνατός ο έλεγχος της επαναληψιμότητας της μεθόδου. Η αραίωση των δειγμάτων έγινε σε τέτοιο βαθμό (αραίωση 1:5 με μείγμα ακετονιτριλίου – νερού (1:1 v/v)) ώστε οι κορυφές να είναι ευδιάκριτες και η ποσοτικοποίηση τους σωστή αλλά ταυτόχρονα το σύστημα να προστατεύεται από επιμολύνσεις.

Κατά τη διενέργεια πειραμάτων στο βρεφικό γάλα υπό μορφή σκόνης παρατηρήθηκε μέσω των χρωματογραφημάτων ότι σε αυτό περιέχεται κατά κύριο λόγο λακτόζη. Επίσης, παρατηρήθηκε κορυφή γλυκόζης της οποίας ωστόσο το εμβαδόν ήταν κάτω από τα όρια που επιτρέπουν την ποσοτικοποίηση της. Στα πειράματα αυτά ιδιαίτερη σημασία δόθηκε τόσο στην επαναληψιμότητα της μεθόδου όσο και στην ανάκτηση λακτόζης η οποία αντιπροσωπεύει ουσιαστικά την επιτυχία της μεθόδου. Η ανάκτηση λακτόζης υπολογίσθηκε με βάση της τιμές της διαθρεπτικής ετικέτας του προϊόντος.

Για να αξιολογηθεί με μεγαλύτερη αυστηρότητα η επιτυχία της μεθόδου πέραν των δειγμάτων βρεφικού γάλακτος υπό μορφή σκόνης της εταιρείας, αυτή εφαρμόσθηκε και σε πιστοποιημένο υλικό αναφοράς (CRM, Certified Reference Material). Τα πειράματα στο πιστοποιημένο υλικό αναφοράς πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν εξαιτίας της ακριβούς τιμής του υλικού και των θετικών αποτελεσμάτων που είχαν προκύψει προηγουμένως από τις δοκιμές στο βρεφικό γάλα Sanilac I.

Πίνακας 3.3: Μέση τιμή (N=6) περιεκτικότητας λακτόζης ανά 100g ($\pm$ τυπική απόκλιση) σε βρεφική σκόνη Sanilac I και σε πιστοποιημένο υλικό αναφοράς (CRM, Certified Reference Material).

Δείγμα	Λακτόζη (g/ 100g)
Sanilac I	44,77 $\pm$ 3,28
CRM	44,95 $\pm$ 2,35

Ο Πίνακας 3.3 παρουσιάζει τη μέση τιμή της ποσότητας λακτόζης που περιέχονται σε 100g Sanilac I. Το αποτέλεσμα όπως αναφέρθηκε προηγουμένως προέκυψε από έξι επαναλήψεις του πειράματος και δίνει μια εικόνα της ποσότητας λακτόζης που περιέχονται στο βρεφικό γάλα. Τα πειράματα στο πιστοποιημένο υλικό αναφοράς (CRM, Certified Reference Material) έδωσαν περιεκτικότητα λακτόζης στα 44,95 g / 100g δείγματος (Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.4: Ανάκτηση μεθόδου για την λακτόζη σε βρεφικό γάλα υπό μορφή σκόνης Sanilac I και σε πιστοποιημένο υλικό αναφοράς (CRM, Certified Reference Material).

Δείγμα	Μέση τιμή ανάκτησης (%)	Τυπική απόκλιση ανάκτησης (%)	Σχετική Τυπική Απόκλιση ανάκτησης (%)
Sanilac I	83,99	6,15	7,33
CRM	91,2	4,77	5,23

Η ορθότητα της μεθόδου (accuracy) αξιολογήθηκε βάσει της τιμής της ανάκτησης. Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 3.4 η εκατοστιαία ανάκτηση της λακτόζης είναι αρκετή υψηλή φτάνοντας το 83,99%, ενώ ταυτόχρονα η τυπική απόκλιση και η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση της ανάκτησης παρουσιάζουν χαμηλές τιμές. Επομένως, το αποτέλεσμα που λαμβάνεται από τους έξι προσδιορισμούς κρίνεται επαναλήψιμο και η ακρίβεια (precision) της μεθόδου ικανοποιητική. Οι τιμές ανάκτησης που λήφθηκαν για το πιστοποιημένο υλικό αναφοράς ήταν ιδιαίτερα υψηλές φτάνοντας σε ποσοστό το 91,2% (Πίνακας 3.4) γεγονός πολύ ενθαρρυντικό δείχνοντας πως η μέθοδος προσδιορισμού σακχάρων

χαρακτηρίζεται από καλή ορθότητα όσον αφορά τη λακτόζη. Ταυτόχρονα κρίνοντας από τις χαμηλές τιμές της τυπικής απόκλισης και της εκατοστιαίας σχετικής τυπικής απόκλισης η μέθοδος παρουσίασε ιδιαίτερα καλή επαναληψιμότητα.

3.6 Επικύρωση της Μεθόδου

Έπειτα από αρκετές σειρές πειραμάτων σε βρεφικές τροφές και πιστοποιημένα υλικά αναφοράς κρίθηκε ότι η μέθοδος εμφανίζει ικανοποιητικά αποτελέσματα ως προς την ανάκτηση λακτόζης. Προκειμένου όμως να επικυρωθεί για βρεφικά προϊόντα πραγματοποιήθηκαν πειράματα επικύρωσης της μεθόδου. Τα πειράματα επικύρωσης περιελάμβαναν τρία επίπεδα εμβολιασμού (spiking) προτύπων σε σκόνη βρεφικού γάλακτος της εταιρείας Γιώτης Α.Ε. χωρίς λακτόζη (Sanilac Lactose Free). Τα επίπεδα εμβολιασμού καθορίστηκαν με βάση τις κατώτερες και ανώτερες συγκεντρώσεις που συνήθως συναντάται στα περισσότερα τρόφιμα το καθένα σάκχαρο. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε βρεφικό γάλα σε σκόνη χωρίς λακτόζη της εταιρείας Γιώτης Α.Ε. (Sanilac Lactose Free) παρέχοντας απολύτως ίδια μήτρα τροφίμου με το κανονικό προϊόν στο οποίο πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα προσδιορισμού των σακχάρων. Στα πειράματα επικύρωσης εξετάστηκε η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγικότητα της μεθόδου. Για την εξέταση της επαναληψιμότητας το σύνολο της πειραματική πορείας (εκχύλιση, χρωματογραφικός προσδιορισμός) πραγματοποιήθηκε έξι φορές για κάθε επίπεδο εμβολιασμού. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Για την αναπαραγωγικότητα της μεθόδου η προηγούμενη διαδικασία επαναλήφθηκε μια διαφορετική ημέρα.

Πίνακας 3.5: Ανάκτηση και επαναληψιμότητα της μεθόδου προσδιορισμού σακχάρων σε βρεφική σκόνη γάλακτος χωρίς λακτόζη (Sanilac Lactose Free) σε τρία επίπεδα εμβολιασμού.

Σάκχαρο	Μέση Τιμή ανάκτησης (%)	Τυπική Απόκλιση ανάκτησης (%)	(%) Σχετική Τυπική Απόκλιση ανάκτησης
Επίπεδο Εμβολιασμού 1 (n=6)			
Φρουκτόζη	81,68	3,15	3,85
Γλυκόζη	94,34	2,58	2,74
Σουκρόζη	98,21	7,59	7,72
Λακτόζη	104,73	9,80	9,36
Λακτουλόζη	89,45	10,50	11,74
Επίπεδο Εμβολιασμού 2 (n=6)			
Φρουκτόζη	61,76	4,69	7,60
Γλυκόζη	84,02	8,93	10,63
Σουκρόζη	85,58	4,11	4,80
Λακτόζη	89,67	5,43	6,05
Λακτουλόζη	63,25	7,33	11,58
Επίπεδο Εμβολιασμού 3 (n=6)			
Φρουκτόζη	67,73	3,58	5,29
Γλυκόζη	89,04	6,91	7,76
Σουκρόζη	90,18	3,43	3,81
Λακτόζη	87,01	4,53	5,21
Λακτουλόζη	68,08	3,54	5,20

Επίπεδο Εμβολιασμού 1 (g σακχάρου/100g τροφίμου): 25 φρουκτόζης, 25 γλυκόζης, 25 σουκρόζης, 25 λακτουλόζης και 25 λακτόζης

Επίπεδο Εμβολιασμού 2 (g σακχάρου/100g τροφίμου): 10 φρουκτόζης, 10 γλυκόζης, 10 σουκρόζης, 10 λακτουλόζης και 60 λακτόζης

Επίπεδο Εμβολιασμού 3 (g σακχάρου/100g τροφίμου): 15 φρουκτόζης, 15 γλυκόζης, 50 σουκρόζης, 15 λακτουλόζης και 50 λακτόζης

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου εξετάστηκε με μία σειρά δοκιμών ($n=6$ σε κάθε επίπεδο εμβολιασμού) οι οποίες έπρεπε να πραγματοποιηθούν μέσα στην ίδια ημέρα. Συνολικά, πραγματοποιήθηκαν 18 προσδιορισμοί σακχάρων (6 επαναλήψεις x 3 επίπεδα εμβολιασμού) και υπολογίστηκε η εκατοστιαία ανάκτηση κάθε σακχάρου καθώς και η τυπική απόκλιση και η εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση.

Όπως παρατηρείται από τον Πίνακα 3.5, η γλυκόζη, η σουκρόζη και η λακτόζη παρουσιάζουν ικανοποιητική εκατοστιαία ανάκτηση ανεξαρτήτως σε κάθε επίπεδο εμβολιασμού. Πιο συγκεκριμένα η λακτόζη παρουσιάζει ανάκτηση από 87,01% έως 104,73% με την ανώτερη τιμή να αντιστοιχεί στην προσθήκη της μικρότερης ποσότητας λακτόζης και την κατώτερη τιμή στην προσθήκη της μεγαλύτερης ποσότητας λακτόζης. Αντίστοιχα, η σουκρόζη παρουσιάζει ανάκτηση από 85,58% έως 98,21% με την κατώτερη τιμή να αντιστοιχεί στην προσθήκη της μικρότερης συγκέντρωσης (σε αντίθεση με τη λακτόζη) και την ανώτερη στην προσθήκη της ενδιάμεσης συγκέντρωσης. Η γλυκόζη παρουσιάζει ποσοστό ανάκτησης από 84,02% έως 94,34% με την ανώτερη ανάκτηση να αντιστοιχεί στην προσθήκη της μικρότερης ποσότητας (όπως συνέβη και με τη σουκρόζη) και την ελάχιστη ανάκτηση να αντιστοιχεί στην προσθήκη της μεγαλύτερης ποσότητας.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω σάκχαρα η φρουκτόζη και η λακτουλόζη δεν παρουσίασαν ιδιαίτερα ικανοποιητική ανάκτηση. Πιο συγκεκριμένα η φρουκτόζη παρουσίασε ποσοστό ανάκτησης από 61,76% έως 81,68% με ιδιαίτερα χαμηλή ανάκτηση για την προσθήκη μικρών συγκεντρώσεων. Ομοίως, η λακτουλόζη παρουσίασε ανάκτηση από 63,25% έως 89,45% με τα χαμηλά ποσοστά ανάκτησης να αντιστοιχούν στην προσθήκη μικρής ποσότητας σακχάρου. Να σημειωθεί ωστόσο ότι τα ποσοστά ανάκτησης της φρουκτόζης και της λακτουλόζης καλύπτουν τα νομοθετικά όρια (ανάκτηση 60% - 120%, τυπική απόκλιση $\pm 20\%$) και είναι επαρκή προκειμένου μια μέθοδος να θεωρείται λειτουργική και να μπορεί να επικυρωθεί για ένα συγκεκριμένο τρόφιμο όπως το βρεφικό γάλα σε σκόνη. Γενικά η μέθοδος φαίνεται να παρουσιάζει ικανοποιητική ανάκτηση σακχάρων για όλα τα σάκχαρα εξαιρουμένων της φρουκτόζης και της λακτουλόζης για το κατώτερο επίπεδο εμβολιασμού.

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου εξετάστηκε μέσω της τυπικής απόκλισης και της εκατοστιαίας σχετικής τυπικής απόκλισης της ανάκτησης. Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.5, προκύπτει ότι οι τιμές τους είναι αρκετά χαμηλές στις περισσότερες περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα, η τυπική απόκλιση παρουσιάζει τιμές από 2,58 έως

10,50 ενώ η εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση παρουσιάζει τιμές από 2,74 έως 10,63. Βάσει των ανωτέρω αποτελεσμάτων, η μέθοδος χαρακτηρίζεται από ικανοποιητική επαναληψιμότητα.

Πίνακας 3.6: Ανάκτηση και αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου προσδιορισμού σακχάρων σε βρεφική σκόνη γάλακτος χωρίς λακτόζη (Sanilac Lactose Free) σε τρία επίπεδα εμβολιασμού.

Σάκχαρο	Μέση Τιμή ανάκτησης (%)	Τυπική Απόκλιση ανάκτησης (%)	(%) Σχετική Τυπική Απόκλιση ανάκτησης
Επίπεδο Εμβολιασμού 1 (n=12)			
Φρουκτόζη	77,68	5,55	7,14
Γλυκόζη	94,24	3,60	3,82
Σουκρόζη	94,01	7,93	8,43
Λακτόζη	100,95	9,41	9,32
Λακτουλόζη	85,25	10,52	12,34
Επίπεδο Εμβολιασμού 2 (n=12)			
Φρουκτόζη	59,03	9,29	15,73
Γλυκόζη	88,67	9,69	10,93
Σουκρόζη	86,46	11,08	12,82
Λακτόζη	89,38	5,50	6,16
Λακτουλόζη	62,45	8,43	13,49
Επίπεδο Εμβολιασμού 3 (n=12)			
Φρουκτόζη	68,27	2,60	3,81
Γλυκόζη	91,17	6,75	7,41
Σουκρόζη	89,85	3,23	3,60
Λακτόζη	86,33	3,91	4,52
Λακτουλόζη	67,42	3,38	5,01

Επίπεδο Εμβολιασμού 1 (g σακχάρου/100g τροφίμου): 25 φρουκτόζης, 25 γλυκόζης, 25 σουκρόζης, 25 λακτουλόζης και 25 λακτόζης

Επίπεδο Εμβολιασμού 2 (g σακχάρου/100g τροφίμου): 10 φρουκτόζης, 10 γλυκόζης, 10 σουκρόζης, 10 λακτουλόζης και 60 λακτόζης

Επίπεδο Εμβολιασμού 3 (g σακχάρου/100g τροφίμου): 15 φρουκτόζης, 15 γλυκόζης, 50 σουκρόζης, 15 λακτουλόζης και 50 λακτόζης

Η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου εξετάστηκε με δύο σειρές δοκιμών εμβολιασμού ($n=36$, 3 επίπεδα εμβολιασμού x 6 επαναλήψεις x 2 ημέρες) που εκτελούνται ανά 18 σε διαφορετικές ημέρες. Από τις δοκιμές των δύο ημερών υπολογίστηκε η συνολική εκατοστιαία ανάκτηση καθώς και η τυπική απόκλιση αυτής και η εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.6 προέκυψαν ιδιαίτερα καλές τιμές ανάκτησης σε όλα τα επίπεδα εμβολιασμού για τα σάκχαρα γλυκόζη, σουκρόζη και λακτόζη, παρόμοιες με τις αντίστοιχες τιμές που παρατηρήθηκαν κατά την εξέταση της επαναληψιμότητας της μεθόδου (Πίνακας 3.5). Πιο συγκεκριμένα κατά τις δοκιμές εξέτασης της αναπαραγωγιμότητας η λακτόζη παρουσίασε ανάκτηση από 86,33% έως 100,95%, η σουκρόζη παρουσίασε ανάκτηση από 86,46% έως 94,01%, ενώ η γλυκόζη παρουσίασε ποσοστό ανάκτησης από 88,67 % έως 94,24%. Η ανάκτηση των υπολοίπων δύο σακχάρων, φρουκτόζη και λακτουλόζη, κυμάνθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα, ιδιαιτέρως στο ενδιάμεσο και στο κατώτερο επίπεδο εμβολιασμού (< 70%).

Όσον αφορά την τυπική απόκλιση και την εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση προέκυψαν ικανοποιητικές τιμές γεγονός που υποδηλώνει ότι η μέθοδος χαρακτηρίζεται από σχετικά καλή αναπαραγωγιμότητα. Πιο συγκεκριμένα η τυπική απόκλιση της ανάκτησης παρουσίασε τιμές από 3,23 έως 11,08 ενώ η εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση είχε τιμές από 3,60 έως 13,49.

3.7 Προσδιορισμός Ορίου ανίχνευσης και Ποσοτικοποίησης

Οι δοκιμές επικύρωσης της μεθόδου περιελάμβαναν και τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και του ορίου ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ). Το όριο ανίχνευσης αφορά την μικρότερη ποσότητα αναλύτη που μπορεί να ανιχνευθεί από το όργανο χωρίς να μπορεί να ποσοτικοποιηθεί ενώ το όριο ποσοτικοποίησης αφορά τη χαμηλότερη συγκέντρωση η οποία μπορεί να μετρηθεί με αξιοπιστία.

Τα όρια αυτά είναι δυνατόν να υπολογισθούν με διάφορους τρόπους. Το όριο ανίχνευσης προσδιορίζεται ως η συγκέντρωση του αναλύτη για την οποία το σήμα του οργάνου διαφέρει από το σήμα του λευκού δείγματος κατά 3,3 φορές την τυπική

απόκλιση του σήματος του λευκού. Μέσω αυτής της προσέγγισης το όριο ανίχνευσης μπορεί να υπολογισθεί μέσω της τυπικής απόκλισης του λευκού δείγματος. Επίσης μπορεί να υπολογισθεί με την βοήθεια της πρότυπης καμπύλης κάθε σακχάρου με βάση τον τύπο:

$$LOD = 3.3 \cdot s_a / \text{slope}$$

Όπου s_a η τυπική απόκλιση της τεταγμένης επί την αρχή (intercept) της εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης για κάθε σάκχαρο και slope η κλίση της ευθείας. Το όριο ανίχνευσης μπορεί να υπολογισθεί και μέσω του οργάνου όπου ο λόγος σήματος/θόρυβο υπολογίζεται για πρότυπα δείγματα με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και στη συνέχεια πολλαπλασιάζεται με τον παράγοντα 3.3 δίνοντας το LOD. Στην παρούσα διπλωματική εργασία ο υπολογισμός του ορίου ανίχνευσης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της τυπικής απόκλισης της τεταγμένης επί την αρχή και της κλίσης της ευθείας της πρότυπης καμπύλης.

Αντίστοιχα το όριο ποσοτικοποίησης προσδιορίζεται ως η συγκέντρωση του αναλύτη για την οποία το σήμα του οργάνου διαφέρει από το σήμα του λευκού δείγματος κατά 10 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος του λευκού. Με όμοιο τρόπο με το LOD, το όριο ποσοτικοποίησης μπορεί να υπολογισθεί με την βοήθεια της πρότυπης καμπύλης κάθε σακχάρου με βάση τον τύπο:

$$LOQ = 10 \cdot s_a / \text{slope}$$

Όπου s_a η τυπική απόκλιση του intercept της εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης για κάθε σάκχαρο και slope η κλίση της ευθείας. Επίσης μέσω του λόγου σήματος/θόρυβο όπου υπολογίζεται για πρότυπα δείγματα με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις το $LOQ = 10 \cdot \text{σήμα} / \text{θόρυβο}$.

Στον Πίνακα 3.8 παρουσιάζονται οι τιμές του ορίου ανίχνευσης και του ορίου ποσοτικοποίησης για κάθε σάκχαρο.

Πίνακας 3.8: Όριο ανίχνευσης LOD (mg/mL) και όριο ποσοτικοποίησης LOQ (mg/mL) για κάθε σάκχαρο.

Σάκχαρο	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)
Φρουκτόζη	0,08	0,24
Γλυκόζη	0,05	0,14
Σουκρόζη	0,09	0,28
Λακτόζη	0,07	0,22

Σάκχαρο	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)
Λακτουλόζη	0,08	0,24

Οι τιμές των LOD και LOQ που αναφέρονται στον Πίνακα 3.8 αφορούν τη συγκέντρωση του σακχάρου στο δείγμα που ενίεται στο σύστημα υγρής χρωματογραφίας. Αν γίνει υπολογισμός βάσει των συνθηκών εκχύλισης που αναφέρονται στο πειραματικό μέρος (δηλ. αρχική μάζα δείγματος: 0,25 g, αραιώση στα 25 mL και 2^η αραιώση 1:5 v/v) το εύρος του LOD για τα μελετούμενα σάκχαρα κυμαίνεται από 2,4 έως 4,6 g/100 g προϊόντος, ενώ το LOQ κυμαίνεται από 7,2 έως 13,9 g/100 g προϊόντος. Είναι ευνόητο ότι αυξάνοντας την αρχική μάζα δείγματος προς εκχύλιση ή/και μειώνοντας την τελική αραιώση (ελάχιστο 1:1 v/v), τα προαναφερθέντα όρια θα ελαττωθούν.

3.8 Εφαρμογή μεθόδου σε βρεφική τροφή με βάση τα δημητριακά

Έπειτα από πολλές σειρές πειραμάτων σε βρεφικά γάλατα υπό μορφή σκόνης και πειράματα για την επικύρωση της μεθόδου αυτής αποφασίστηκε να διερευνηθεί η εφαρμογή της σε προϊόντα διαφορετικής κατηγορίας από αυτής των γαλακτοκομικών. Η μέθοδος επιλέχθηκε να δοκιμασθεί σε βρεφικές σειρές τροφίμων της εταιρείας Γιώτης Α.Ε. όπου ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση των σακχάρων είναι εξίσου απαραίτητη όπως στα βρεφικά γάλατα. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος εφαρμόστηκε σε μία σειρά βρεφικής τροφής με βάση τα δημητριακά, (για βρέφη άνω των έξι μηνών), της οποίας το κύριο συστατικό τους είναι το σιτάλευρο.

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στη βρεφική αυτή τροφή περιελάμβαναν τέσσερις επαναλήψεις (εκχύλιση και χρωματογραφικός προσδιορισμός) προκειμένου να υπολογιστεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου ενώ η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν απολύτως ίδια με αυτή που εφαρμόστηκε στη Sanilac. Στον Πίνακα 3.9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διενεργήθηκαν στη βρεφική αυτή τροφή.

Πίνακας 3.9: Περιεκτικότητα σακχάρων της βρεφικής τροφής με βάση τα δημητριακά της εταιρείας Γιώτης Α.Ε..

Σάκχαρο	Μέση τιμή περιεκτικότητας (g σακχάρου/ 100g δείγματος)
Σουκρόζη	14,37 ± 0,73
Λακτόζη	24,25 ± 2,28

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 3.9 η βρεφική τροφή με βάση τα δημητριακά βρέθηκε να περιέχει κατά κύριο λόγο δύο δισακχαρίτες την σουκρόζη και τη λακτόζη σε αρκετά μεγάλη περιεκτικότητα. Από τα αποτελέσματα τεσσάρων δειγμάτων η βρεφική τροφή περιέχει περίπου 14,37 g σουκρόζης/ 100g δείγματος και 24,25 g λακτόζης/ 100g δείγματος. Προκειμένου να αξιολογηθεί η ορθότητα των αποτελεσμάτων, η εταιρεία Γιώτης παραχώρησε τις τιμές οι οποίες αντιστοιχούν στην προστιθέμενη ποσότητα σακχάρων στη συγκεκριμένη βρεφική τροφή για να είναι εφικτός ο υπολογισμός της ανάκτησης, της τυπικής απόκλισης και της εκατοστιαίας σχετικής τυπικής απόκλισης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.10.

Πίνακας 3.10: Ανάκτηση μεθόδου για την σουκρόζη και τη λακτόζη σε βρεφική τροφή με βάση τα δημητριακά της εταιρείας Γιώτης Α.Ε.

Σάκχαρο	Μέση Τιμή ανάκτησης (%)	Τυπική Απόκλιση ανάκτησης (%)	Σχετική Τυπική Απόκλιση ανάκτησης (%)
Σουκρόζη	82,66	4,19	5,07
Λακτόζη	93,65	8,82	9,41

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.10 φαίνεται πως επιτυγχάνεται καλή ανάκτηση σακχάρων τόσο για την σουκρόζη όσο και για την λακτόζη ξεπερνώντας σε ποσοστό το 80%. Ταυτόχρονα τα πειράματα παρουσιάζουν χαμηλές τιμές τυπικής απόκλισης και εκατοστιαίας σχετικής τυπικής απόκλισης που δεν ξεπερνούν το 10% και επομένως η μέθοδος φαίνεται να έχει καλή επαναληψιμότητα. Συμπερασματικά, η προτεινόμενη μέθοδος χαρακτηρίζεται από καλή ορθότητα και ακρίβεια και φαίνεται

ότι μπορεί να εφαρμοσθεί και σε άλλες κατηγορίες προϊόντων πέρα των γαλακτοκομικών.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο ταυτόχρονος προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση σακχάρων σε γαλακτοκομικά τρόφιμα για λόγους διαθρεπτικής επισήμανσης, είναι ένα πεδίο έρευνας που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η έλλειψη επίσημης μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό σακχάρων σε συνδυασμό με την ανάγκη αυτή που προέρχεται από τα νομοθετικά πλαίσια για την επισήμανση τροφίμων οδηγεί στην έρευνα νέων μεθόδων που θα επιτύχουν το σκοπό αυτό. Μεταξύ πολλών μεθόδων αναλυτικής χημείας η υγρή χρωματογραφία φαίνεται να είναι μια γρήγορη και απλή μέθοδος για τον προσδιορισμό σακχάρων σε πολλά είδη τροφίμων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, ο διαχωρισμός των σακχάρων φρουκτόζη, γλυκόζη, σουκρόζη, λακτόζη και λακτουλόζη κατέστη επιτυχής με υγρή χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης, χρησιμοποιώντας στατική φάση αμιδίου και κινητή φάση ακετονιτριλίο - νερό (75:25 v/v) με 0,2% (v/v) τριαιθυλαμίνη ως τροποποιητή, ροή 1 mL/min και ποσότητα έγχυσης δείγματος 10 μ L. Με τη χρήση της μεθόδου αυτής διαπιστώθηκε η παρουσία λακτόζης σε φόρμουλες βρεφικού γάλακτος της οποίας η ποσοτικοποίηση επιτεύχθηκε. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν με επιτυχία και σε πιστοποιημένο υλικό αναφοράς. Για την μέθοδο προσδιορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ενώ εξετάστηκε η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα της, η οποία κυμάνθηκε σε ικανοποιητικά επίπεδα. Τέλος η μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία σε διαφορετικού τύπου βρεφική τροφή (με βάση το σιτάλευρο).

Συνολικά η μέθοδος που αναπτύχθηκε φαίνεται να λειτουργεί ικανοποιητικά προσδιορίζοντας με μεγάλη επιτυχία τη λακτόζη, η οποία είναι το κύριο σάκχαρο του βρεφικού γάλακτος σκόνης, αλλά ταυτόχρονα και τα υπόλοιπα σάκχαρα που μελετήθηκαν. Παράλληλα η μέθοδος είναι απλή, γρήγορη, ειδικά στην περίπτωση παρασκευής πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα και σχετικά οικονομική. Ως συμπέρασμα αυτών θα μπορούσε με επιτυχία να χρησιμοποιηθεί από βιομηχανίες τροφίμων και αναλυτικά εργαστήρια για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό σακχάρων σε φόρμουλες βρεφικού γάλακτος.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer (2012). Βιοχημεία
- [2] H. R. McCain, S. Kallipani (2018). Invited review: Sugar reduction in dairy products. Journal of Dairy Science, 101 (10),8619,8640
- [3], Carlos Sabater, Marin Prodanov Agustín Olano, Nieves Corzo , Antonia Montilla (2016). Quantification of prebiotics in commercial infant formulas., 194, 6-11.
- [4] Ryan W. Walker and Michael I. Goran (2015). Laboratory Determined Sugar Content and Composition of Commercial Infant Formulas, Baby Foods and Common Grocery Items Targeted to Children. Nutrients, 7, 5850-5867.
- [5] A. D. Fosbrooke and B. A. Wharton (1975). "Added lactose" and "added sucrose" cow's milk formulae in nutrition of low birthweight babies. Archives of Disease in Childhood, 50(6), 409–418.
- [6] Adriana S. Pereyra Gonzáles, Gabriela B. Naranjo, Laura S. Malec, Maria S. Vigo (2003). Available lysine, protein digestibility and lactulose in commercial infant formulas. International Dairy Journal, 13 (2–3), 2003, 95-99.
- [7] www.ochempal.org
- [8] https://commons.wikimedia.org/wiki/File:D-Fructose_Haworth.svg
- [9] Michael I. Goran, Ashley A. Martin, Tanya L. Alderete, Hideji Fujiwara, and David A. Fields (2017). Fructose in Breast Milk Is Positively Associated with Infant Body Composition at 6 Months of Age. Nutrients, 9(2), 146.
- [10] https://en.wikipedia.org/wiki/Galactose#/media/File:D-Galactose_Haworth.svg
- [11] Thom Huppertz, Inge Gazi (2016). Lactose in dairy ingredients: Effect on processing and storage stability. Journal of Dairy Science, 99 (8), 6842-6851.
- [12] Mark J. Lindsay, Theodore W. Walker, James A. Dumesic, Scott A. Rankin and George W. Huber (2018). Production of monosaccharides and whey protein from acid whey waste streams in the dairy industry. Green Chemistry, 8.
- [13] (Κουτίνας Αθανάσιος, Κανελλάκη Μαρία, 2009, Χημεία και Τεχνολογία Τροφίμων, σελ. 339-347, Πάτρα).
- [14] <https://chem.libretexts.org>
- [15] S.D.Rozycki, M.P.Buera, M.S.Pauletti (2010). Heat-induced changes in dairy products containing sucrose. Food Chemistry, 118 (1), 67-73.
- [16] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

- [17] Eva Rentschler , Katharina Schuh, Manue lKrewinkel, Claudia Baur, Wolfgang Claaßen, Susanne Meyer, Beatrice Kuschel, Timo Stressler, Lutz Fischer (2015). Enzymatic production of lactulose and epilactose in milk. *Journal of Dairy Science*. 98 (10), 6767-6775.
- [18] <https://link.springer.com>
- [19] Adriana S. Pereyra Gonzáles, Gabriela B. Naranjo, Laura S. Malec, Maria S. Vigo (2003). Available lysine, protein digestibility and lactulose in commercial infant formulas. *International Dairy Journal*. 13 (2–3), 95-99
- [20] (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Maltose_Haworth.svg)
- [21] Carlos Sabater, Marin Prodanov, Agustín Olano, Nieves Corzo, Antonia Montilla (2016). Quantification of prebiotics in commercial infant formulas. *Food Chemistry*, 194 (1), 6-1
- [22] Jorge L Chávez-Servín, Ana I Castellote, M. Carmen López-Sabater (2004). Analysis of mono- and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Chromatography A*, 1043 (2), 211-215.
- [23] Peter Sanders, Veronica Ernste-Nota, Klaas Visser, Jeroen van Soest, Kommer Brunt (2017). The Determination of Sugars in Dairy Products: Development of a New Standard Method for the International Dairy Federation and the Internal Organization for Standardization. *Journal of AOAC International*, 100 (5), 1577-1581.
- [24] Getu Kahsay, Huiying Song, Ann Van Schepdael, Deirdre Cabooter, Erwin Adams (2014). Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 142-154.
- [25] Bogusław Buszewski and Sylwia Noga (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(1), 231–247.
- [26] <https://www.sorbtech.com>
- [27] <https://www.chromacademy.com>
- [28] <https://phenomenex.blog>
- [29] Getu Kahsay, Huiying Song, Ann Van Schepdael, Deirdre Cabooter, Erwin Adams (2014). Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, 142-154.

[30] Yong Guo, Sheetal Gaiki. Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 5920–5938