

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tomaž POREDOŠ

**STABILNOST ASKORBINSKE IN DEHIDROASKORBINSKE  
KISLINE V VODNIH RAZTOPINAH**  
DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**STABILITY OF ASCORBIC AND DEHYDROASCORBIC ACID IN  
AQUEOUS SOLUTIONS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2006

## POPRAVKI

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za kemijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorja imenovala doc. dr. Blaža Cigića in za recenzentko prof. dr. Terezijo Golob.

Mentor: doc. dr. Blaž Cigić

Recenzentka: prof. dr. Terezija Golob

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tomaž Poredoš

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK UDK 577.15: 544.8 (043)=863  
KG vitamini/vodne raztopine/vitamin C/askorbinska kislina/dehidroaskorbinska kislina/  
redukcija/ oksidacija /kovinski ioni/ kinetika redukcije  
AV POREDOŠ, Tomaž  
SA CIGIČ, Blaž (mentor) / GOLOB, Terezija (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2006  
IN STABILNOST ASKORBINSKE IN DEHIDROASKORBINSKE KISLINE V  
VODNIH RAZTOPINAH  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XII, 54 s., 17 pregl., 24 slik, 28 vir.  
IJ sl  
JI sl / en  
AI Askorbinska kislina (AA) in dehidroaskorbinska kislina (DHA) sta nestabilni v  
vodnih raztopinah. Na stabilnost AA vplivajo pH, prisotnost redoks aktivnih ionov  
in vrsta puфра. AA je najbolj obstojna v metafosforni kislini (MFK), kjer tudi v  
prisotnosti 98  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$  ali  $\text{Cu}^{2+}$  ionov po enem dnevu preostane 95 % AA. Citratni  
ioni, ki koordinativno vežejo kovinske ione, pri pH 3 in pH 5 stabilizirajo AA v  
primerjavi z glicinom pH 3 in acetatom pH 5. AA je zelo obstojna v prečiščeni vodi  
(MiliQ), v prisotnosti 9,8  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  ionov pa se v eni uri popolnoma oksidira. Tako  
kot AA, je tudi raztopljen DHA bolj stabilna v kisljih raztopinah, saj pri  
nevtralnem pH in v alkalnem hitreje razpada. pH vpliva tudi na potek hidratacije  
komercialno dostopne dimerne DHA. V raztopinah, kjer je pH manjši od 5, se iz  
dimerne DHA v nekaj minutah tvori določen delež spojin, ki jih ne moremo  
reducirati v AA. Po raztapljanju DHA pri pH 1, po eni uri preostane le 50 % DHA,  
kot jo določimo po raztapljanju v pH 5. Ugotovili smo, da reducent tris(2-  
karboksietil)fosfin učinkovito reducira DHA v AA tudi v raztopinah, kjer je pH  
manjši od 2. Hitrost redukcije je manjša, vendar je končni izkoristek redukcije  
enak, kot v manj kisljih raztopinah. AA je nestabilna tudi v kompleksnem matriksu,  
kot so homogenizirani jajčevci. Oksidacija, dodane AA v DHA, je potekla tudi v  
MFK, če smo homogenizirali v vodi in šele pred dodatkom AA nakisali z MFK.  
Dodana AA je bila stabilna, ko smo jajčevce homogenizirali v MFK.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 577.15: 544.8 (043)=863  
CX vitamins/aqueous solutions/vitamin C/ ascorbic acid/ dehydroascorbic acid/  
reduction/ oxydation/ metal ions/ kinetics of reduction  
AU POREDOŠ, Tomaž  
AA CIGIĆ, Blaž (supervisor) / GOLOB, Terezija (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and  
Technology  
PY 2006  
TI STABILITY OF ASCORBIC AND DEHYDROASCORBIC ACID IN AQUEOUS  
SOLUTIONS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XII, 54p., 17 tab., 24 fig., 28 ref.  
LA sl  
AL sl / en  
AB Ascorbic acid (AA) and dehydroascorbic acid (DHA) are unstable in aqueous  
solutions. Stability is affected by pH, presence of redox active ions and type of  
buffer used. AA is the most stable in metaphosphoric acid (MFK), where even in  
the presence of 98  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$  or  $\text{Cu}^{2+}$  ions, 95 % of AA remains after one day of  
incubation. Citrate, which coordinatively binds certain metal ions, stabilizes AA at  
pH 3 and pH 5, in comparison to glycinate pH 3 and acetate pH 5. AA is very stable  
in purified water (MiliQ), however in the presence of 9,8  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  ions all AA is  
completely oxidised within an hour. Solubilized DHA is similarly to AA more  
stable in acidic solutions and is degraded faster at neutral and alkaline pH.  
Solvation of dimeric, commercially available, DHA is also affected by pH. When  
DHA is dissolved in solutions with pH lower than 5, certain amount of DHA is  
within minutes transformed into species, that can't be reduced to AA. 50 % of DHA  
dissolved at pH 1 is degraded within an hour in comparison to pH 5, where DHA is  
stable within this period. Reducing agent tris(2-carboxyethyl)phosphine efficiently  
reduces DHA into AA also in solutions, where pH is lower than 2. Rate of  
reduction is lower; yields are nevertheless the same, as in less acidic solutions. AA  
is unstable also in complex matrix, as homogenised eggplants. Externally added  
AA is oxidised into DHA in MFK, if homogenisation is performed in water and  
solution is acidified only before addition of AA. Added AA is stable, when  
eggplants are homogenised in MFK.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>IV</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>VI</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIX</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA.....	1
1.1 DELOVNE HIPOTEZE.....	1
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>3</b>
2.1 ASKORBINSKA KISLINA	
2.1.1 Nomenklatura.....	3
2.1.2 Stabilnost AA.....	5
2.1.3 Vitamin C v živilih.....	5
2.2 DEHIDROASKORBINSKA KISLINA.....	6
2.2.1 Nomenklatura.....	7
2.2.2 Stabilnost DHA.....	7
2.3 REDUKCIJA DHA NAZAJ V AA.....	10
2.3.1 Ditiotreitol.....	10
2.3.2 Tris[2-karboksietil]fosfin.....	10
2.4 ANALITIKA AA IN DHA.....	12
2.4.1 Spektrofotometrično določanje AA in DHA v UV območju.....	12
2.4.2 Kromatografsko določanje AA in DHA.....	12
2.4.3 Ostale metode za določanje AA in DHA.....	13
<b>3 MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>14</b>
3.1 MATERIALI.....	14
3.2 METODE DELA.....	14
3.2.1 Stabilnost AA v modelnih raztopinah.....	14

<b>3.2.2 Stabilnost DHA v modelnih raztopinah</b> .....	15
3.2.2.1 Preliminarni študij stabilnosti komercialno dostopne DHA.....	16
3.2.2.2 Raztapljanje komercialno dostopne DHA v vodi in spremljanje stabilnosti DHA v kislih pufrih.....	16
3.2.2.3 Raztapljanje komercialno dostopne DHA v kislih pufrih in spremljanje stabilnosti DHA v kislih pufrih.....	17
3.2.2.4 Vpliv pH raztapljanja komercialno dostopne DHA na izkoristek z redukcijo pridobljene AA.....	17
3.2.2.5 Vpliv pH redukcije DHA v AA na pravilnost določanja DHA.....	18
<b>3.2.3 Primerjava izkoristkov redukcije DHA v AA v raztopinah z različnimi pH vrednostmi</b> .....	19
3.2.3.1 Spektrofotometrično določanje izkoristkov redukcije encimsko pripravljene DHA.....	19
3.2.3.2 Kromatografsko določanje izkoristkov redukcije komercialno dostopne DHA.....	20
<b>3.2.4 Kinetika redukcije DHA v AA</b> .....	21
3.2.4.1 Spektrofotometrično spremljanje kinetike redukcije DHA pri različnih vrednostih pH.....	21
3.2.4.2 Spektrofotometrično spremljanje kinetike redukcije DHA pri različnih vrednostih pH v prisotnosti Cu <sup>2+</sup> ionov.....	21
<b>3.2.5 Stabilnost AA in DHA v realnih vzorcih</b> .....	22
3.2.5.1 Priprava vzorcev, homogeniziranih v destilirani vodi.....	22
3.2.5.2 Priprava vzorcev, homogeniziranih v metafosforni kislini.....	24
<b>3.2.6 Določevanje vsebnosti askorbinske kisline na HPLC sistemu</b> .....	24
<b>4 REZULTATI</b> .....	<b>26</b>
4.1. STABILNOST AA V MODELNIH RAZTOPINAH	
4.1.1 Vpliv pH na absorbanco askorbinske kisline v UV območju	
4.1.2 Stabilnost AA v različnih medijih v odsotnosti redoks aktivnih ionov.....	27
4.1.3 Stabilnost AA v različnih medijih v prisotnosti Cu <sup>2+</sup> .....	28
4.1.4 Stabilnost AA v različnih medijih v prisotnosti Fe <sup>3+</sup> ionov.....	31
4.2 STABILNOST DHA V VODNIH RAZTOPINAH.....	34
4.2.1 Preliminarni študij stabilnosti komercialno dostopne DHA.....	34
4.2.2 Raztapljanje komercialno dostopne DHA v vodi in spremljanje stabilnosti DHA v kislih pufrih.....	35
4.2.3 Raztapljanje komercialno dostopne DHA v kislih pufrih in spremljanje stabilnosti DHA v kislih pufrih.....	37

4.2.4 Vpliv pH raztapljanja komercialno dostopne DHA na izkoristek z redukcijo pridobljene AA.....	38
4.2.5 Vpliv pH redukcije DHA v AA na pravilnost določanja DHA.....	40
4.3 PRIMERJAVA IZKORISTKOV REDUKCIJE DHA V AA V RAZTOPINAH Z RAZLIČNIMI pH VREDNOSTMI.....	40
4.3.1 Spektrofotometrično določanje izkoristkov redukcije encimsko pripravljene DHA.....	40
4.3.2 Kromatografsko določanje izkoristkov redukcije komercialno dostopne DHA.....	41
4.4 KINETIKA REDUKCIJE DHA V AA.....	42
4.4.1 Spektrofotometrično spremljanje kinetike redukcije DHA pri različnih pH vrednostih.....	42
4.4.2 Spektrofotometrično spremljanje kinetike redukcije DHA pri različnih pH vrednostih v prisotnosti Cu <sup>2+</sup> ionov.....	44
4.5 STABILNOST AA IN DHA V REALNIH VZORCIH.....	45
4.5.1 Vpliv pH na stabilnost AA in DHA, dodanih v homogenizirane jajčevce.....	45
4.5.2 Vpliv pH homogenizacije jajčevcev na stabilnost dodane AA.....	46
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>47</b>
5.1 RAZPRAVA.....	47
5.2 SKLEPI.....	50
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>51</b>
<b>7 VIRI.....</b>	<b>53</b>



## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Vsebnost vitamina C v živilih (Belitz in Grosch, 1999).....	5
<b>Preglednica 2:</b> Redukcija v fosfatnem pufru pH 2 raztopljene DHA.....	20
<b>Preglednica 3:</b> Redukcija v metafosforni kislini raztopljene DHA.....	21
<b>Preglednica 4:</b> Inkubacija vodnega homogenizata jajčevcev v ustreznih pufrih in s standardnimi dodatki.....	23
<b>Preglednica 5:</b> Priprava vzorcev jajčevcev za redukcijo.....	23
<b>Preglednica 6:</b> Priprava točk za umeritveno krivuljo.....	25
<b>Preglednica 7:</b> Stabilnost askorbinske kisline v pufrih brez prisotnosti redoks aktivnih ionov.....	27
<b>Preglednica 8:</b> Stabilnost askorbinske kisline v pufrih v prisotnosti 9,8 $\mu\text{M}$ $\text{Cu}^{2+}$ ionov.....	29
<b>Preglednica 9:</b> Stabilnost askorbinske kisline v pufrih v prisotnosti 98 $\mu\text{M}$ $\text{Cu}^{2+}$ ionov.....	30
<b>Preglednica 10:</b> Stabilnost askorbinske kisline v pufrih v prisotnosti 98 $\mu\text{M}$ $\text{Fe}^{3+}$ ionov.....	32
<b>Preglednica 11:</b> Stabilnost DHA v F2, F6, F13 in 2 % MFK.....	34
<b>Preglednica 12:</b> Primerjava direktne spektrofotometrične metode določitve DHA in kromatografske določitve DHA. V obeh primerih je delež preostale DHA v raztopini izražen kot AA, ki jo dobimo po redukciji s TCEP.....	36
<b>Preglednica 13:</b> Razpad direktno v pufrih raztopljene DHA.....	38
<b>Preglednica 14:</b> Redukcija v A5 raztopljene DHA v različnih pufrih s TCEP.....	40
<b>Preglednica 15:</b> Izkoristki redukcije encimsko pridelane DHA s TCEP in z DTT.....	41
<b>Preglednica 16:</b> Rezultati kromatografsko določene askorbinske kisline po dodatku AA in DHA v homogenizirane jajčevce in naknadni redukciji.....	45
<b>Preglednica 17:</b> Vpliv pH, pri katerem izvajamo homogenizacijo, na stabilnost standardnega dodatka AA v prisotnosti MFK.....	46

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Struktura askorbinske kisline (Deutsch, 2000).....	4
<b>Slika 2:</b> Oksidacija AA v DHA preko radikala (Mahan in Escot-Stump, 2004).....	4
<b>Slika 3:</b> Struktura DHA (Deutsch, 2000).....	7
<b>Slika 4:</b> Dimerna struktura DHA v dehidrirani obliki (Deutsch, 2000).....	7
<b>Slika 5:</b> Razpad DHA v 2,3-diketogulonat (Gibbons in sod., 2001).....	8
<b>Slika 6:</b> Predpostavljena shema razpada DHA v kisli vodni raztopini (Jungbluth in sod., 1997).....	9
<b>Slika 7:</b> Struktura DTT (Getz in sod., 1999).....	10
<b>Slika 8:</b> Struktura TCEP (Getz in sod., 1999).....	11
<b>Slika 9:</b> Mehanizem redukcije DHA v AA s TCEP (Lykkesfeldt, 2000).....	11
<b>Slika 10:</b> Umeritvena krivulja za kromatografsko določitev AA .....	25
<b>Slika 11:</b> Spektri 0,1 mM askorbinske kisline v 100 mM fosfatnem pufru pH 6,5, 100 mM fosfatnem pufru pH 2 ter v MQ vodi .....	26
<b>Slika 12:</b> Stabilnost askorbinske kisline v pufrih brez prisotnosti redoks aktivnih ionov ..	28
<b>Slika 13:</b> Stabilnost askorbinske kisline v pufrih v prisotnosti 9,8 $\mu\text{M}$ $\text{Cu}^{2+}$ ionov .....	29
<b>Slika 14:</b> Stabilnost askorbinske kisline v pufrih v prisotnosti 98 $\mu\text{M}$ $\text{Cu}^{2+}$ ionov .....	31
<b>Slika 15:</b> Stabilnost AA v različnih pufrih v prisotnosti 98 $\mu\text{M}$ $\text{Fe}^{3+}$ ionov.....	33
<b>Slika 16:</b> Kinetika razpada DHA v F2, F6, F 13 in 2 % MFK .....	34
<b>Slika 17:</b> Spektrofotometrično določena stabilnost DHA v 100 mM HCl, 2 % metafosforni kislini, 100 mM citratu pH 3, 100 mM acetatu pH 5 in 100 mM fosfatu pH 7.....	6
<b>Slika 18:</b> Kromatografsko določena stabilnost DHA v 100 mM HCl, 2 % metafosforni kislini, 100 mM citratu pH 3, 100 mM acetatu pH 5 in 100 mM fosfatu pH 7.....	37
<b>Slika 19:</b> Spektrofotometrično določena stabilnost DHA, raztopljen v 100 mM HCl, 2 % metafosforni kislini, 100 mM citratu pH 3, 100 mM acetatu pH 5 in MQ vodi.....	38
<b>Slika 20:</b> Primerjava raztapljanja komercialne DHA v pH 5 in pH 1 na stabilnost	

pri pH 1.....	39
<b>Slika 21:</b> Izkoristek redukcije DHA v AA s TCEP in DTT glede na največji določen izkoristek .....	42
<b>Slika 22:</b> Hitrost redukcije DHA s TCEP in DTT.....	43
<b>Slika 23:</b> Hitrost redukcije DHA s TCEP in DTT v kislem in v prisotnosti 98 $\mu\text{M}$ $\text{Cu}^{2+}$ ionov.....	44

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AA	askorbinska kislina
AO	askorbat-oksidaza
A4	acetani pufer pH 4
A5	acetani pufer pH 5
C3	citratni pufer pH 3
C5	citratni pufer pH 5
DHA	dehidroaskorbinska kislina
DTT	dithiotreitol
F2	fosfatni pufer pH 2
F6	fosfatni pufer pH 6
F7	fosfatni pufer pH 7
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija
MFK	metafosforna kislina
MQ	miliQ (milipore) voda
TCEP	tris(2-karboksietil)fosfin

## 1 UVOD

Askorbinska kislina je v vodnih raztopinah relativno nestabilna in se ob prisotnosti kisika oksidira do dehidroaskorbinske kisline. Proces oksidacije pospešujejo encimi (askorbat oksidaza), nekateri kationi ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) in hidroksidni ioni (Imer in sod., 2003). Nastala dehidroaskorbinska kislina se v nizu reakcij, ki vključujejo hidrolizo laktona, oksidacijo in dekarboksilacijo, pretvarja naprej v produkte, ki še niso popolnoma določeni (Green in Fry, 2005).

Analitika askorbinske in dehidroaskorbinske kisline je zaradi omenjenih pretvorb, ki potekajo v vodnih raztopinah, relativno zahtevna (Deutsch, 2000). Za določitev skupnega vitamina C je potrebno dehidroaskorbinsko kislino reducirati v askorbinsko kislino. Za redukcijo se največkrat uporabljajo različni tioli (ditiotreitol,  $\beta$ -merkaptoletanol), v zadnjem času pa tudi reducent tris-2-karboksietil-fosfin (TCEP) (Lykkesfeldt, 2000).

V okviru naloge želimo določiti stabilnost askorbinske in dehidroaskorbinske kisline tako v modelnih raztopinah kot v realnih vzorcih in preveriti učinkovitost reducenta TCEP pri nizkem pH, kjer je askorbinska kislina obstojna.

### 1.1 NAMEN DELA

- Določiti vpliv  $\text{Cu}^{2+}$  ionov in  $\text{Fe}^{3+}$  ionov na stabilnost askorbinske kisline pri različnih pH vrednostih v modelnih raztopinah.
- Določiti vpliv pH na stabilnost dehidroaskorbinske kisline v modelnih raztopinah.
- Določiti hitrost in izkoristek redukcije dehidroaskorbinske v askorbinsko kislino z nekaterimi reducenti v modelnih raztopinah pri različnih pH vrednostih.
- Primerjati direktno spektrofotometrično metodo določanja koncentracije askorbinske kisline s kromatografskim določanjem koncentracije askorbinske kisline v modelnih raztopinah.
- Ugotoviti vpliv pH homogenizacije živila in pH, pri katerem izvajamo redukcijo dehidroaskorbinske kisline v askorbinsko kislino, na določitev skupnega vitamina C.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo, da bo višanje pH in prisotnost  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{3+}$  ionov pospešilo oksidacijo askorbinske kisline v dehidroaskorbinsko kislino. Dehidroaskorbinska kislina je lakton, zato predvidevamo, da bo pH vplival na stabilnost dehidroaskorbinske kisline v vodnih raztopinah.

Askorbinska kislina bolje absorbira svetlobo v bližnjem UV spektru kot dehidroaskorbinska kislina, zato menimo, da bomo redukcijo dehidroaskorbinske kisline v askorbinsko kislino lahko spremljali na spektrofotometru.

Ustreznost spektrofotometrične metode bomo preverjali kromatografsko. Predvidevamo, da bo pH, pri katerem bomo živilo homogenizirali, in pH redukcije dehidroaskorbinske kisline v askorbinsko kislino vplival na pravilnost določitve skupnega vitamina C.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ASKORBINSKA KISLINA

Askorbinska kislina (AA), reducirana oblika vitamina C, je vodotopen vitamin, ki kot antioksidant vstopa v oksido-redukcijske reakcije, se pretvarja v dehidroaskorbinsko kislino in tem preprečuje oksidacijo pomembnih molekul v organizmu. Preprečuje namreč toksičnost reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), kot so superoksid ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), kisikov atom ( $^1\text{O}_2$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in visoko reaktiven hidroksilni radikal ( $\bullet\text{OH}$ ). Te lahko povzročijo poškodbo proteinov, peroksidacijo lipidov, poškodbe DNA in tako celično smrt (Mahan in Escot-Stump, 2004).

AA je spojina, ki je v telesu vpletena tudi v mnoge hidroksilacijske reakcije. Med te spadajo biosinteza kateholaminov, hidroksiprolina in kortikosteroidov ter biosinteza kolagena. Pri teh reakcijah askorbinska kislina ohranja kovine (npr. železo v fero obliki pri sintezi kolagena), ki so del encimov, v takem oksidacijskem stanju, da encimi lahko delujejo. Sinteza kolagena je v organizmu zelo pomembna, saj je kolagen glavni protein vezivnih tkiv, kot so hrustanec, kosti, zobje, koža in mišične tetive (Mahan in Escot-Stump, 2004).

Med obdobji močnega stresa, ko je aktivnost hormonov nadledvičnice (adrenalina) povečana, se koncentracija AA v krvi zmanjša. Med emocionalnim, psihološkim ali fiziološkim stresom se poveča izločanje AA z urinom (Mahan in Escot-Stump, 2004).

Ljudje ga moramo uživati v priporočenih količinah, saj ga ne moremo sintetizirati iz glukoze zaradi pomanjkanja encima gulonolakton oksidaza. Za odraslega človeka (moškega in žensko) je priporočljiv dnevni vnos (RDA) 75 – 90 mg (Mahan in Escot-Stump, 2004).

Pomanjkanje vitamina C povzroča skorbut. Pri odraslih se znaki pomanjkanja pojavijo po 45 do 80 dneh primanjkovalja vitamina.

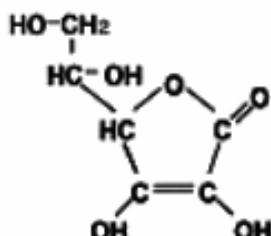
Dlesni otečejo in krvavijo, zobje izpadajo, pojavijo se slabost, bolečine v nogah, kožni izpuščaj in psihološke spremembe (npr. depresija). Če se to stanje ne zdravi, je izid smrten. Bolezen je danes pri odraslih zelo redka, saj jemo dovolj sadja in zelenjave.

Skorbut se pogosteje pojavlja pri dojenčkih, ki jih hranijo s formulami, ki niso obogatene z vitaminom C. Slabše se celijo rane, pojavljajo se otekline, medtem ko so kosti, zobje ter vezivno tkivo šibkejši (Mahan in Escot-Stump, 2004).

#### 2.1.1 Nomenklatura

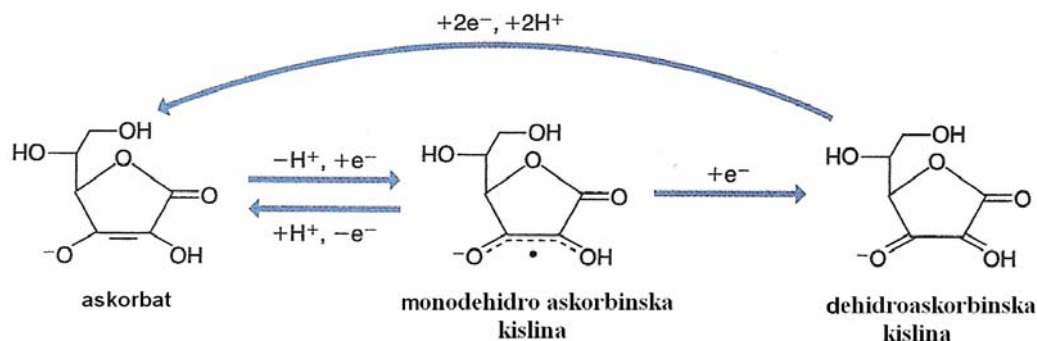
L-askorbinska kislina je po kemijski zgradbi aldono-1,4 lakton heksuronske kisline. Delokalizacija elektronov na segmentu C2-C3, kjer ima L-AA dvojno vez, stabilizira molekulo in naredi hidroksilno skupino na C3 močno kislno ( $\text{pK}_1=4,13$ ,  $\text{pK}_2=11,6$ ). Zaradi tega je pri fiziološkem pH (okoli 7) L-AA v obliki L-askorbata (Davey in sod., 2000).

Absorpcijski maksimum askorbinske kisline v UV območju je odvisen od pH. Pri pH 2 ima maksimume absorbance pri 244 nm, pri pH 6 - 10 pri 266 nm ter pri pH nad 10 pri 294 nm (Belitz in Grosch, 1999).



Slika 1: Struktura askorbinske kisline (Deutsch, 2000)

Pri fiziološkem pH (okoli pH 7) se AA pod vplivom kisika postopoma oksidira do dehidroaskorbinske kisline. Ta pretvorba ima 2 stopnji:



Slika 2: Oksidacija AA v DHA preko radikala (Mahan in Escot-Stump, 2004)

Askorbilni prosti radikal (monodehidroaskorbinska kislina), ki nastane v prisotnosti kovinskih ionov, kot sta železo in baker, lahko povzroči, da AA že v majhnih koncentracijah ( $10^{-5}$  mol/L) deluje prooksidativno (Belitz in Grosch, 1999).



### 2.1.2 Stabilnost askorbinske kisline

Askorbinska kislina je najbolj stabilna v kislem pH, v medijih brez ionov in v suhi obliki (Davey in sod., 2000). Zato moramo vzorce, v katerih želimo določiti vsebnost AA, homogenizirati v kislem. Kot najboljši medij za homogenizacijo se je izkazala metafosforna kislina, ki stabilizira AA ob prisotnosti kisika. Če vzorec pred homogenizacijo nakisamo s trikloroacetno kislino v prisotnosti bakrovih ionov in kisika, pride do oksidacije AA do DHA (Musulin in King, 1936).

V prisotnosti bakrovih ionov se AA pospešeno oksidira v DHA. Zelo verjetno je, da pri dodatku bakrovih ionov pride do nastanka razmeroma dolgoživega askorbatnega prostega radikala, ki deluje prooksidativno (Davey in sod., 2000).

Sama oksidacija AA teče kot reakcija prvega reda. Logaritem koncentracije askorbinske kisline se linearno zmanjšuje s časom. Hitrost reakcije je večja pri večjem dodatku bakrovih ionov (Imer in sod., 2003).

Če damo AA v pitno vodo, ki je kontaminirana z bakrovimi ioni iz cevi, bo AA razpadla v DHA v roku treh ur (Jansson in sod., 2004).

Koncentracija AA v krvni plazmi je pokazatelj antioksidativne aktivnosti, saj se pri oksidativnem stresu koncentracija AA v krvni plazmi zmanjša (Chung in sod., 2001). Določanje koncentracije AA in DHA v krvni plazmi je ena od metod, s katero se lahko določi stopnja oksidativnega stresa. Metoda, s katero se določa AA v plazmi, mora biti takšna, da se med pripravo vzorca AA ne oksidira v DHA, saj bi to lahko privedlo do lažnih rezultatov. V prisotnosti heparina, ki se uporablja kot antikoagulant, in metafosforne kisline, s katero se zakisa krvna plazma, je AA stabilna do 10 dni pri -70 °C. EDTA, ki je dober kelator ionov in veže redoks aktivno železo, je manj učinkovit in AA ne stabilizira tako dobro kot heparin in MFK (Chung in sod., 2001).

### 2.1.3 Vitamin C v živilih

Preglednica 1: Vsebnost vitamina C v živilih (Belitz in Grosch, 1999)

Vir vitamina C	Vsebnost vitamina C (mg/100 g)
acerola	1300
jabolko	2 - 10
jagoda	64
črni ribez	177
pomaranča	50
zeleni poper	128
zelje	105
krompir	30
špinača	51
paradižnik	20 - 25
jajčevci	5

Poglavitni vir vitamina C so živila rastlinskega izvora. Vitamin C v rastlinah uravnava redoks potencial, predstavlja kofaktor določenih encimov in vpliva na kontrolo celične rasti. Pojavlja se v vseh zelenih rastlinah ter v sadju. Največ ga vsebujejo citrusi (pomaranče, acerola), kapusnice, paprika, črni ribez in guava (Davey in sod., 2000).

Zelenjava kljub relativno veliki vsebnosti vitamina C prispeva manjši delež k skupni količini zaužitega vitamina C v vsakdanji prehrani. Veliko zelenjave zaužijemo toplotno obdelane, hkrati pa je tudi pH zelenjave v večini primerov višji od pH sadja. Oba faktorja prispevata k zmanjševanju vsebnosti vitamina C med pripravo hrane. Glede na količino zaužite zelenjave predstavlja krompir najpomembnejši vir vitamina C v prehrani povprečnega Evropejca.

S sadjem zaužijemo več vitamina C kot z zelenjavo, saj ga v večinoma uživamo nepredelanega. V sadju je tudi dovolj nizek pH, da stabilizira vitamin C.

Znotraj ene vrste sadja in zelenjave so v vsebnosti vitamina C velike razlike, saj na vsebnost vitamina C vplivajo tako podnebje kot tudi lega rastline, osvetljenost, tla in zrelost. Pri sadju se začne z dozorevanjem po fiziološki zrelosti zmanjševati vsebnost vitamina C.

Pri listnati zelenjavi, ki je po pobiranju najbolj občutljiva, se lahko vsebnost vitamina C v zelo kratkem času zmanjša tudi do 20 %. Če jo obdelujemo s sterilizacijo, pasterizacijo in z blanširanjem, se vsebnost vitamina C še dodatno zmanjšuje.

Pri sušenju sadja lahko pride tudi do 75 % izgub vitamina C. Zelenjavo doma pogosto kuhamo v veliki količini vode, ki jo nato odlijemo. V njej se med kuhanjem raztaplja vitamin C, tako da njegova koncentracija v vodi narašča. Vsebnost v živilu posledično pade in tako osiromašeno živilo vsebuje tudi za polovico manj vitamina C (Davey in sod., 2000).

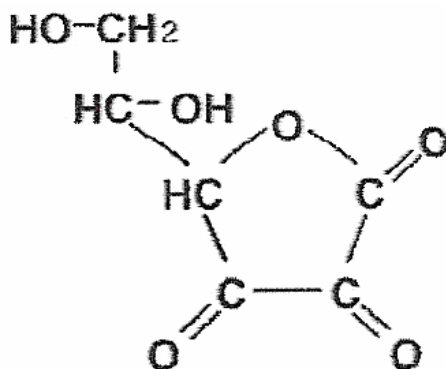
## 2.2 DEHIDROASKORBINSKA KISLINA

Dehidroaskorbinska kislina skupaj z askorbinsko kislino predstavlja vitamin C, saj se v telesu v oksido-redukcijskih reakcijah reverzibilno pretvarjata. Ko DHA zaužijemo, preide v želodcu v kislino okolje (HCl), nato pa se pomakne v nevtralno okolje dvanajstnika (bikarbonat).

Ker DHA *in vitro* razpada pod vplivom bikarbonata v diketogulonat (Koshiishi in sod. 1998a), lahko sklepamo, da je nekaj razpade tudi v prebavnem traktu. DHA nato z olajšano difuzijo preide v celice stene tankega črevesa in se resorbira v kri. V eritrocitih se z encimom DHA-reduktazo pretvori v AA. Nereducirana DHA lahko skozi glukozne transporterje preide v vse telesne celice, absorpcija pa je motena pri diabetesu, ko je koncentracija glukoze v krvi velika in koncentracija inzulina majhna (Wilson, 2002).

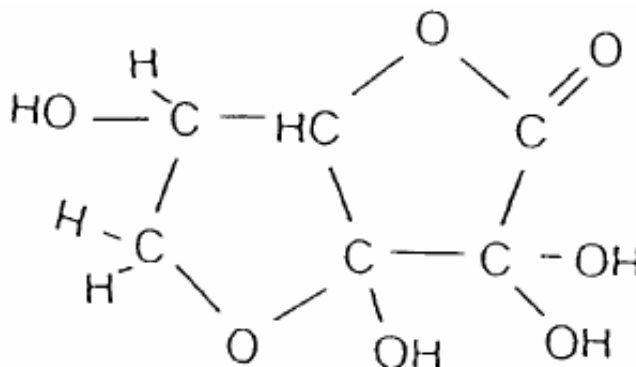
### 2.2.1 Nomenklatura

Dehidroaskorbinska kislina je po svoji strukturi  $\gamma$ -lakton treo-2,3-heksadilusonske kisline in nastane po reverzibilni oksidaciji iz AA. V vodi najdemo DHA v hemiacetalni obliki (Deutsch, 2000), kar so potrdili z jedrsko magnetno resonanco (Kurata in Nishikawa, 2000).



Slika 3: Struktura DHA (Deutsch, 2000)

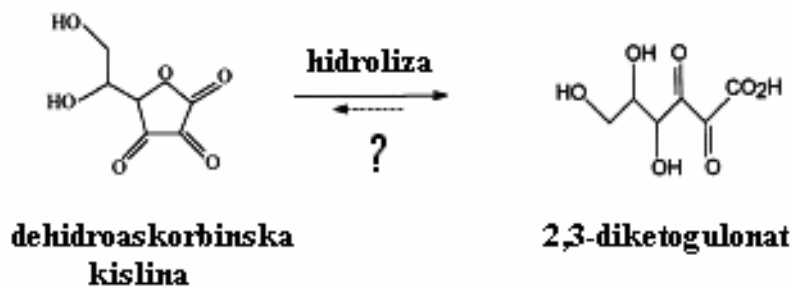
V kristaliničnem stanju (dehidrirana) pa se nahaja v dimerni obliki. Zato se verjetno težje raztaplja v vodi (Deutsch, 2000).



Slika 4: Dimerna struktura DHA v dehidrirani obliki (Deutsch, 2000)

### 2.2.2 Stabilnost DHA

Pri fiziološkem pH prihaja do hidrolize DHA v diketogulonat, ki ga ne moremo reducirati nazaj v askorbinsko kislino in posledično nima vitaminskega učinka (Deutsch, 2000).



Slika 5: Razpad DHA v 2,3-diketogulonat (Gibbons in sod., 2001)

V krvni plazmi DHA zelo hitro razpade v diketogulonat (slika 5). Odkrili so, da na stabilnost DHA vplivajo predvsem hidrogenkarbonatni ioni ( $\text{HCO}_3^-$ ), ki so kot fiziološki puffer prisotni v 30 mM koncentraciji. Razpolovni čas DHA v krvni plazmi je le 2 minuti. Zato so predpostavili, da ob redukciji DHA v AA poteka tudi hidroliza laktona do diketogulonata (Koshiishi in sod., 1998a).

To so potrdili tako, da so podgani vbrizgali raztopino DHA. Skoraj 90 % DHA, ki so jo vbrizgali v podganino veno, se je izločilo z urinom. Od tega je diketogulonat predstavljal 55 % in AA 31 % (Koshiishi in sod., 1998b).

Podobno kot pri fiziološkem pH v organizmu se DHA do diketogulonata razgrajuje v mešanici uporabljeni za paraenteralno prehrano. Na razgradnjo vpliva temperatura, medtem ko redoks aktivni kovinski ioni nimajo vpliva. Z višanjem temperature se večja hitrost razpada DHA. Razgradnja DHA poteka v okolju brez  $\text{O}_2$ , kar pomeni, da razpad DHA v diketogulonat ni odvisen od prisotnosti kisika, kot je to pri AA (Gibbons in sod., 2001).

V nekaterih prejšnjih študijah so, nasprotno, opazili, da je razgradnja DHA v vodnih raztopinah hitrejša v prisotnosti kovinskih ionov (Jungbluth in sod., 1997, cit. po Terada in sod., 1966).

Opravljenih je bilo kar nekaj raziskav, kjer so študirali stabilnost dehidroaskorbinske kisline v modelnih raztopinah. Tako so ugotovili, da je hitrost razpada DHA odvisna od temperature in pH. Pri pH, nižjem od 5, je le-ta relativno stabilna, medtem ko pri pH, višjem od 5, že v nekaj urah razpade znaten delež dehidroaskorbinske kisline (Bode in sod., 1990).

Nekateri avtorji so z uporabo tekočinske kromatografije (Deutsch in Santosh-Kumar, 1996) in plinske kromatografije (Jungbluth in sod., 1997) študirali, v katere spojine dehidroaskorbinska kislina spontano razpade v vodnih raztopinah. Na osnovi analize produktov so ugotovili, da se DHA v reakcijah enolizacije, odpiranja laktonskega obroča in adicije ter eliminacije vode pretvarja v 13 različnih spojin (Jungbluth in sod., 1997).

Glede na rezultate plinske kromatografije so tudi postavili teoretično pot razgradnje DHA v kislom (slika 7).

Že zgodnje študije so pokazale (Penny in Zilva, 1943), da je odpiranje laktonskega obroča dehidroaskorbinske kisline ireverzibilen proces in da ta s tem izgubi vitaminski učinek.



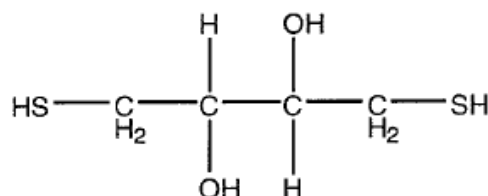
## 2.3 REDUKCIJA DHA V AA

Ta pretvorba je mogoča z močnimi reducenti. Najbolj uporabljani so ditiotreitol (DTT), 2-merkaptoetanol, tris(2-karboksietil)fosfin (TCEP), glutation in homocistein. Med njimi zaradi zelo širokega spektra uporabe dobiva vse večji pomen TCEP. Doslej se je v večini primerov uporabljal DTT. Ta dva bom reducenta tudi opisal.

### 2.3.1 Ditiotreitol

Ditiotreitol je eden najbolj uporabljanih reducentov, ki dobro deluje v nevtralnem ali rahlo alkanem in rahlo kislem pH območju. Ko DTT vstopa v reakcije kot reducent, nastaja oksidirana oblika, stabilen ciklični disulfid (reakcija je intramolekularna). Uporaba DTT je poleg pH omejena tudi s stabilnostjo vodnih raztopin, saj že sledovi kovinskih ionov, kot sta na primer  $\text{Fe}^{3+}$  ali  $\text{Ni}^{2+}$ , katalizirajo oksidacijo DTT, tako da je pogosto potrebno pripravljati sveže raztopine reducenta. Če raztopino DTT shranimo pri nizki temperaturi, bo oksidacija počasnejša, s čimer lahko podaljšamo čas uporabnosti reagenta (Getz in sod. 1999).

DTT je najpogosteje uporabljan reducent za pretvorbo DHA v AA, največkrat v nevtralnem ali rahlo kislem okolju, kjer pa sta tako DHA kot AA relativno nestabilni. Uporaba DTT za redukcijo DHA posledično ni optimalna. Pri pH okoli 6 se DTT še lahko kosa s TCEP, novo odkritim reducentom, pri nižjih pH vrednostih pa je TCEP mnogo boljši reducent (Lykkesfeldt, 2000).



Slika 7: Struktura DTT (Getz in sod., 1999)

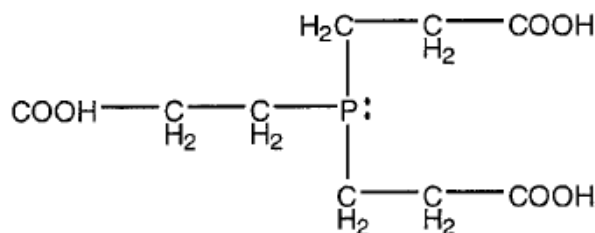
V marsikaterih starejših študijah so v krvni plazmi zdravih ljudi določili velike koncentracije DHA, ki so lahko posledica artefaktne oksidacije AA. Do te je prišlo zaradi priprave vzorca v nevtralnem ali rahlo kislem pH območju, ki je potrebno za redukcije z DTT (Lykkesfeldt, 2000).

### 2.3.2. Tris(2-karboksietil)fosfin

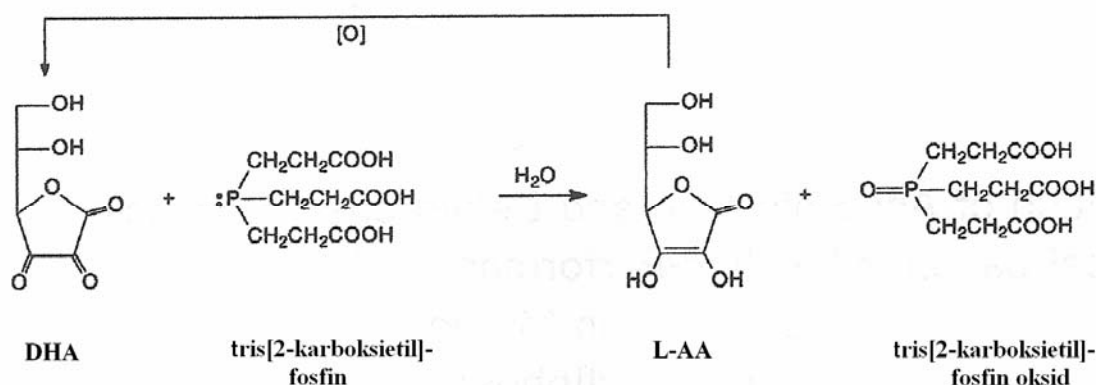
TCEP (slika 8) je razmeroma nov reducent, ki se ga v analitiki askorbinske kisline še ne uporablja dosti. Prednost TCEP-ja je predvsem ta, da ga lahko uporabljamo v mnogo širšem pH območju. Tako TCEP učinkovito reducira disulfidne vezi v proteinih v pH območju od 1,5 do 8,5 (Getz in sod., 1999). Prednost TCEP je tudi v tem, da redoks aktivni ioni ne vplivajo na oksidacijo TCEP v tolikšni meri kot na DTT. Podobno kot pri DTT pa

je stabilnost odvisna od temperature. Pri nižji temperaturi je TCEP bolj obstojen in se ga manj oksidira (Getz in sod., 1999).

Mehanizem redukcije TCEP lahko vidimo na sliki 9.



Slika 8: Struktura TCEP (Getz in sod., 1999)



Slika 9: Mehanizem redukcije DHA v AA s TCEP (Lykkesfeldt, 2000)

TCEP se je izkazal kot boljša izbira od DTT tudi zaradi večje stabilnosti vzorcev po redukciji DHA v AA. Koncentracija AA v HPLC vialah, v katerih je bil TCEP, se ni spremenila tudi po 96 urah na 4 °C. Če so uporabili DTT, pa je že po 48 urah razpadlo 20 % AA (Lykkesfeldt, 2000).

Pri pH 4,3 so s TCEP uspeli reducirati približno 95 % DHA v AA, medtem ko je bil z uporabo DTT pri enakih pogojih izkoristek le 10 %.

Prednost TCEP je tudi ta, da ga pred analizo na HPLC sistemu ni potrebno odstraniti, ker analize ne moti. V določenih primerih uporabljan reducent, 2,3-dimerkapto-1-propanol, je

potrebno pred analizo npr. odstraniti s trikratno ekstrakcijo. Poleg dodatnega dela odstranitev reducenta predstavlja še dodaten problem, saj se na ta način zmanjša stabilnost AA (Lykkesfeldt, 2000).

## 2.4 ANALITIKA AA IN DHA

### 2.4.1 Spektrofotometrično določanje AA in DHA v UV območju

Koncentracijo DHA težko določimo spektrofotometrično, saj DHA dobro absorbira UV svetlobo le pri valovnih dolžinah pod 200 nm, nad 220 nm pa le malo. V območju, kjer ima DHA svoj absorpcijski maksimum, absorbirajo tudi druge moteče snovi, npr. komponente pufrov in raztopljeni plini, tako da tam meritve niso natančne. Če hočemo določiti vsebnost DHA, jo je poprej največkrat potrebno z reducentom pretvoriti v AA (Deutsch, 2000).

AA v nasprotju z DHA dobro absorbira UV svetlobo v območju med 200 nm in 300 nm. Njen absorpcijski maksimum je odvisen od pH: v kislem (pH 2) ima absorpcijski maksimum pri 245 nm, pri pH 6 pri 265 nm ter pri pH nad 10 pri 294 nm (Belitz in Grosch, 1999). Valovno dolžino, pri kateri spektrofotometrično določamo koncentracijo askorbinske kisline, je torej potrebno prilagoditi pH raztopine.

### 2.4.2 Kromatografsko določanje AA in DHA

V zadnjem času se za določanje koncentracije DHA in AA uporablja predvsem HPLC (visokotlačna tekočinska kromatografija). Prednost metode je predvsem ta, da spojine, katerih koncentracijo želimo določiti, ločimo od ostalih komponent in jih zaznamo z detektorjem. Koncentracijo AA in DHA lahko določamo direktno ali indirektno. Pri uporabi spektrofotometričnih detektorjev je pomembno, da istočasno merimo absorbanco pri valovnih dolžinah okoli 250 nm, kjer AA najbolj absorbira, in pri valovnih dolžinah okoli 210 nm, kjer še absorbira DHA (Nisperos-Carriedo in sod., 1992).

Kljub istočasnemu merjenju absorbance in istočasni uporabi dveh kolon pri direktnem določanju koncentracije DHA z metodo HPLC in UV-Vis detektorjem pa predstavlja problem predvsem občutljivost te metode. Občutljivost določanja koncentracije DHA je boljša pri uporabi elektrokemičnih in fluorimetričnih detektorjev. Najpogosteje se koncentracija DHA določa indirektno, to je s predhodno redukcijo in z merjenjem razlike v koncentraciji AA v vzorcu pred in po redukciji. Za redukcijo DHA v AA se uporabljajo različni reducenti, npr. homocistein, treitol, L-cistein, DTT in TCEP (Gökmen in sod., 2000).



### **2.4.3 Ostale metode za določanje AA in DHA**

Večina ostalih metod temelji na redukcijskih lastnostih AA (Farooqui in sod., 1990). Titracijska metoda temelji na redukciji barvila 2,6-diklorofenolindofenola s kislom raztopino AA. V končni točki titracije je presežek nereduciranega barvila rožnate barve (Nisperos-Carriedo in sod., 1992).

Za spektrofotometrično določanje koncentracije AA je opisanih več različnih postopkov. Pri uporabi barvila 2,4-dinitrofenilhidrazina nastane ob reakciji z AA oranžno obarvan osazon, katerega absorbanco merimo v spektru rdeče svetlobe. Na podoben način spektrofotometrično določamo koncentracijo AA z redukcijo Fe(III) v Fe(II), ki reagira z 1,10-fenantrolinom tako, da nastane produkt, ki absorbira pri 515 nm. Koncentracijo AA oziroma DHA pa lahko določimo tudi s Folin-Ciocalteaujevim reagentom (Wechtersbach, 2005).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### Melancani

Večina raziskave je potekala na modelnih raztopinah askorbinske in dehidroaskorbinske kisline. Za testiranje stabilnosti askorbinske kisline v živilih pa smo uporabili sveže melancane (*Solanum melongena*), kupljene v trgovini.

##### Reagenti

Pri delu smo uporabljali analitsko čiste reagente in kemikalije podjetij Aldrich, Merck, Sigma in Fluka. Kemikalije, ki smo jih uporabljali pri posameznih eksperimentih, so navedene v opisu različnih eksperimentalnih metod.

#### 3.2 METODE DELA

##### 3.2.1 Stabilnost AA v vodnih raztopinah

###### Princip:

Askorbinska kislina ima absorpcijski maksimum med 245 in 292 nm. Valovna dolžina maksimuma je odvisna od pH raztopine (Belitz in Grosch, 2000).

Dehidroaskorbinska kislina, ki nastane pri oksidaciji askorbinske kisline v vodnih raztopinah, pri tej valovni dolžini praktično ne absorbira (Deutsch, 2000).

Razpad askorbinske kisline v modelnih raztopinah lahko zato v odsotnosti nečistoč, ki pri tej valovni dolžini absorbirajo, spremljamo spektrofotometrično.

$\text{Cu}^{2+}$  ioni in  $\text{Fe}^{3+}$  ioni pospešijo oksidacijo askorbinske kisline v dehidroaskorbinsko kislino. Hitrost reakcije je odvisna od pH raztopine, vrste pufru in koncentracije kovinskih ionov.

###### Reagenti:

- 3 mM askorbinska kislina v MQ vodi
- MQ voda, 2 % metafosforna kislina, 100 mM fosfat pH 3 in pH 6, 100 mM acetat pH 4 in pH 5, 100 mM citrat pH 3 in pH 5, 100 mM glicin pH 3
- 0,2 mM  $\text{CuSO}_4$ , 2 mM  $\text{CuSO}_4$  in 2 mM  $\text{FeCl}_3$ , pripravljene v MQ vodi.

###### Izvedba:

*Brez dodatka kovinskih ionov:* V kivetu zmešamo 950  $\mu\text{L}$  ustreznega pufru in 20  $\mu\text{L}$  3 mM askorbinske kisline ter tako pripravimo askorbinsko kislino s koncentracijo 62  $\mu\text{mol/L}$ . Tako pripravljeno raztopino prelijemo v kiveto in pomerimo absorbanco pri 250 nm in

temperaturi 25 °C. Po končani meritvi posamezne vzorce shranimo pri 25 °C in merimo absorbanco v ustreznih časovnih intervalih. Zadnje meritve opravimo po 46 urah inkubacije.

*Z dodatkom kovinskih ionov:* V kiveti zmešamo 950 µL ustreznega pufra, 20 µL 3 mM askorbinske kisline in 50 µL raztopine kovinskih ionov. Začetna koncentracija askorbinske kisline je 59 µmol/L. Tako pripravljene raztopine poleg askorbinske kisline in ustreznega pufra vsebujejo tudi 9,8 µmol/L Cu<sup>2+</sup> ali 98 µmol/L Cu<sup>2+</sup> ali 98 µmol/L Fe<sup>3+</sup>. Posamezno raztopino prelijemo v kiveto in pomerimo absorbanco pri 250 nm in temperaturi 25 °C. Po končani meritvi shranimo posamezne vzorce pri 25 °C in merimo absorbanco v ustreznih časovnih intervalih. V primerih, ko je oksidacija zaradi prisotnih kovinskih ionov hitra, spremljamo absorbanco kontinuirno.

### 3.2.2 Stabilnost DHA v vodnih raztopinah

Princip:

Dehidroaskorbinska kislina je nestabilna molekula, ki se v reakcijah enolizacije, odpiranja laktonskega obroča in adicije ter eliminacije vode pretvarja v mnogo različnih spojin (Jungbluth in sod., 1997).

S prehranskega stališča je pomembna predvsem reakcija odpiranja laktonskega obroča dehidroaskorbinske kisline in nastanek 2,3-diketogulonata, kar je nepovraten proces. S tem se izgubi tudi vitaminski učinek, saj se 2,3-diketogulonat v organizmu ne more pretvoriti v askorbinsko kislino (Penny in Zilva, 1943).

Znano je, da ima na stabilnost dehidroaskorbinske kisline velik vpliv pH, v katerem je raztopljena (Bode in sod. 1990).

Ker je s prehranskega stališča pomembna predvsem reverzibilnost pretvorbe v AA, smo se odločili, da koncentracije DHA ne bomo spremljali direktno, ampak posredno preko redukcije v AA.

Pripravili smo raztopine DHA, ki so se razlikovale v vrednosti pH in/ali viru DHA (raztapljanje trdne DHA ali encimska oksidacija AA do DHA v raztopini) ter v določenih časovnih intervalih vzorčili alikvote teh raztopin in jih prenesli v raztopino reducenta. Pri tem je iz DHA in zvrsti, pri katerih ni prišlo do odprtja laktonskega obroča, nastala askorbinska kislina.

Askorbinska kislina ima absorpcijski maksimum pri valovnih dolžinah okoli 250 nm, kar pa ne velja za dehidroaskorbinsko kislino in razgradne produkte le-te, zato smo koncentracijo AA lahko določali spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri tej valovni dolžini. Da bi preverili ustreznost direktne spektrofotometrične metode, smo koncentracijo askorbinske kisline v nekaterih primerih določali tudi na HPLC sistemu.

### 3.2.2.1 Preliminarni študij stabilnosti komercialno dostopne DHA

#### Reagenti:

- 100 mM fosfatni pufri pH 2, pH 6, pH 13 in 2 % metafosforna kislina
- 3 mM DHA (Aldrich), raztopljena v ustreznih pufrih, v katerih smo določali stabilnost
- 10 mM TCEP v 100 mM fosfatnem pufri pH 6,5

#### Izvedba:

V plastično centrifugirko smo odtehtali DHA, dodali ustrezno prostornino pufru, da je bila raztopina DHA 3 mM, ter na vrtničniku intenzivno mešali 30 sekund. Nato smo v ustreznih časovnih intervalih odpipetirali po 50  $\mu$ L raztopine DHA v mikrocentrifugirko, ki je že vsebovala 1,05 mL 10 mM TCEP v 100 mM fosfatnem pufri pH 6,5, dobro premešali in počakali 1 uro, da je potekla redukcija DHA v AA. Po končani redukciji smo vsebine mikrocentrifugirk prelili v kivete in pomerili absorbanco pri 250 nm proti slepemu vzorcu. Slepri vzorec smo pripravili tako, da smo namesto raztopine DHA v raztopino reducenta dodali 50  $\mu$ L ustreznega pufru. Izkoristke redukcije smo izrazili kot deleže določene koncentracije askorbinske kisline po določenem času vzorčenja v primerjavi s prvim vzorčenjem ( $t = 0$ ).

### 3.2.2.2 Raztapljanje komercialno dostopne DHA v vodi in spremljanje stabilnosti DHA v kisljih pufrih

#### Reagenti:

- 100 mM HCl, 2 % metafosforna kislina, 100 mM citrat pH 3, 100 mM citrat pH 5, 100 mM fosfat pH 7
- 6 mM DHA (Aldrich), raztopljena v vodi
- 10 mM TCEP v 200 mM acetatu pH 5

#### Izvedba:

V plastično centrifugirko smo odtehtali DHA, dodali ustrezno prostornino MQ vode, da je bila raztopina DHA 6 mM, ter na vrtničniku intenzivno mešali 30 sekund. Takoj nato smo odpipetirali 200  $\mu$ L raztopine DHA v mikrocentrifugirko, v kateri je bilo 200  $\mu$ L ustreznega pufru, ter dobro premešali. Nato smo v ustreznih časovnih intervalih iz mikrocentrifugirke odpipetirali po 50  $\mu$ L raztopine DHA v drugo mikrocentrifugirko, ki je že vsebovala 1,05 mL 10 mM TCEP v 200 mM acetatu pH 5. Raztopino smo dobro premešali in počakali 1 uro, da je potekla redukcija DHA v AA. Po končani redukciji smo vsebine mikrocentrifugirk prelili v kivete in pomerili absorbanco pri 250 nm proti slepemu vzorcu. Slepri vzorec smo pripravili tako, da smo namesto raztopine DHA v raztopino reducenta dodali 50  $\mu$ L ustreznega pufru. Izkoristke iz DHA pridobljene AA smo določili po primerjavi merjenih signalov, ki jih je dala askorbinska kislina z ekvimolarno koncentracijo.

Poleg direktne spektrofotometrične analize smo vzorce analizirali tudi na HPLC sistemu po metodi, ki je opisana pod točko 3.2.6.

### 3.2.2.3 Raztapljanje komercialno dostopne DHA v kisljih pufrih in spremljanje stabilnosti DHA v kisljih pufrih

#### Reagenti:

- 100 mM HCl, 2 % metafosforna kislina, 100 mM citrat pH 3, 100 mM acetat pH 5, MQ voda
- DHA (Aldrich)
- 10 mM TCEP v 200 mM acetatu pH 5

#### Izvedba:

Pripravili smo več plastičnih centrifugirk, v katere smo odtehtali DHA. V posamezno centrifugirko smo odpipetirali ustrezno prostornino posameznega pufrja, da je bila koncentracija DHA 2 mM, ter na vrtničniku intenzivno mešali 30 sekund. Nato smo v ustreznih časovnih intervalih iz centrifugirke odpipetirali po 50  $\mu$ L raztopine DHA v mikrocentrifugirko, v kateri je že bilo 1,05 mL 10 mM TCEP raztopljenega v 200 mM acetatu pH 5. Raztopino smo dobro premešali in počakali 1 uro, da je potekla redukcija DHA v AA. Po končani redukciji smo vsebine mikrocentrifugirk prelili v kivete in pomerili absorbanco pri 250 nm proti slepemu vzorcu. Slepri vzorec smo pripravili tako, da smo namesto raztopine DHA v raztopino reducenta dodali 50  $\mu$ L ustreznega pufrja. Izkoristke redukcije smo izrazili kot deleže koncentracije določene askorbinske kisline po določenem času vzorčenja v primerjavi s prvim vzorčenjem ( $t = 0$ ).

### 3.2.2.4 Vpliv pH raztapljanja komercialno dostopne DHA na izkoristek z redukcijo pridobljene AA

#### Reagenti:

- 200 mM HCl, 50 mM acetat pH 5, MQ voda
- DHA (Aldrich)
- 10 mM TCEP v 200 mM acetatu pH 5
- 10 mM TCEP v 200 mM citratu pH 3

#### Izvedba:

Eksperimente smo izvedli zato, da bi lahko ocenili hitrost pretvorb komercialno dostopne DHA v raztopinah s pH 5 in pH  $\approx$ 1.

V ta namen smo v centrifugirko odtehtali DHA, dodali ustrezno prostornino 50 mM acetata pH 5 (raztapljanje v pH 5), da je bila raztopina DHA 4 mM, ter na vrtničniku intenzivno mešali 30 sekund. Takoj nato smo iz centrifugirke odvzeli 400  $\mu$ L 4 mM DHA in v mikrocentrifugirki zmešali s 600  $\mu$ L 200 mM HCl. Tako pripravljena raztopina je imela pH  $\approx$ 1 in je bila 1,6 mM glede na DHA.

V centrifugirko smo odtehtali DHA in raztopili v predhodno pripravljene mešanici 50 mM acetata pH 5 in 200 mM HCl (volumsko razmerje 4:6). Raztopino smo na vrtničniku intenzivno mešali 30 sekund. Tako pripravljena raztopina je imela pH  $\approx$ 1 in je bila 1,6 mM glede na DHA.

Iz obeh raztopin smo v ustreznih časovnih intervalih odpipetirali po 50  $\mu$ L raztopine DHA v mikrocentrifugirke, v katerih je že bilo 1,05 mL 10 mM TCEP, raztopljenega v 200 mM acetatu pH 5. Raztopino smo dobro premešali in počakali 1 uro, da je potekla redukcija DHA v AA. Po končani redukciji smo vsebine mikrocentrifugirk prelili v kivete in pomerili absorbanco pri 250 nm proti slepemu vzorcu. Slepni vzorec smo pripravili tako, da smo namesto raztopine DHA v raztopino reducenta dodali 50  $\mu$ L ustreznega puфра. Izkoristke iz DHA pridobljene AA smo določili po primerjavi merjenih signalov, ki jih je dala askorbinska kislina z ekvimolarno koncentracijo.

### 3.2.2.5 Vpliv pH redukcije DHA v AA na pravilnost določanja DHA

Reagenti:

- 200 mM HCl, 50 mM acetat pH 5, MQ voda
- DHA (Aldrich)
- 10 mM TCEP v 200 mM acetatu pH 5
- 10 mM TCEP v 200 mM citratu pH 3
- 10 mM TCEP v 2 % metafosforni kislini

V centrifugirko smo odtehtali DHA, dodali ustrezen volumen 50 mM acetata pH 5, da je bila raztopina DHA 4 mM, ter na vrtničniku intenzivno mešali 30 sekund. Takoj nato smo iz centrifugirke odvzeli 400  $\mu$ L 4 mM DHA in v mikrocentrifugirki zmešali s 600  $\mu$ L 200 mM HCl. Tako pripravljena raztopina je imela pH  $\approx$ 1 in je bila 1,6 mM glede na DHA. Nato smo v ustreznih časovnih intervalih alikvote po 50  $\mu$ L odpipetirali v mikrocentrifugirke, v katerih je potekala redukcija. Redukcijo smo izvajali v 1,05 mL 10 mM TCEP, raztopljenega v 200 mM acetatu pH 5, v 1,05 mL 10 mM TCEP, raztopljenega v 200 mM citratu pH 3, in v 1,05 mL 10 mM TCEP, raztopljenega v 2 % metafosforni kislini. Raztopine smo dobro premešali in počakali 2 uri, da je potekla redukcija DHA v AA. Po končani redukciji smo vsebine mikrocentrifugirk prelili v kivete in pomerili absorbanco pri 250 nm proti slepemu vzorcu. Slepni vzorec smo pripravili tako, da smo namesto raztopine DHA v raztopino reducenta dodali 50  $\mu$ L ustreznega puфра. Izkoristke iz DHA pridobljene AA smo določili po primerjavi merjenih signalov, ki jih je dala askorbinska kislina z ekvimolarno koncentracijo.

### 3.2.3 Primerjava izkoristkov redukcije DHA v AA v raztopinah z različnimi pH vrednostmi

Princip:

Za določanje koncentracije skupnega vitamina C se največkrat uporabljajo metode, ki temeljijo na predhodni redukciji DHA v AA z ustreznimi reducenti. Za redukcijo se največkrat uporabljajo različni tioli in v zadnjem času tudi reducent TCEP.

Na osnovi podatkov iz literature smo razbrali, da je TCEP uporaben pri nižjem pH kot ostali reducenti, kar je prednost, saj sta tako askorbinska kot dehidroaskorbinska kislina pri nizkem pH bolj stabilni (Lykkesfeldt, 2000).

Najnižji pH, pri katerem so za redukcijo DHA do sedaj uporabljali TCEP, je 4,3, medtem ko se tiolni reducenti kot DTT uporabljajo pri pH 5 do pH 6 (Lykkesfeldt, 2000).

Ker TCEP učinkovito reducira določene spojine tudi pri nižjem pH (Getz in sod., 1999), smo se odločili preveriti, ali lahko DHA kvantitativno reduciramo tudi pri nižjem pH.

Kot vira DHA za analizo smo izbrali encimsko pripravljeno DHA in raztopljeno komercialno DHA. Izkoristek redukcije smo za encimsko pripravljeno DHA določali spektrofotometrično, za raztopljeno komercialno DHA pa kromatografsko.

#### 3.2.3.1 Spektrofotometrično določanje izkoristkov redukcije encimsko pripravljene DHA

Ker je askorbat oksidaza aktivna le v šibko kislem in nevtralnem pH (Farver in sod., 1994), smo oksidacijo AA izvajali pri pH 6,5.

Da encim pri postopku redukcije DHA v AA z reducenti ne bi motil, smo pri vsakem eksperimentu po končani encimski oksidaciji denaturirali askorbat oksidazo z dodatkom HCl, tako da se je pH znižal na 2.

V primeru, ko smo hoteli izvajati redukcijo pri tej pH vrednosti, smo neposredno v raztopino dodali reducent. Za študij izkoristkov redukcije pri pH 6,5 smo raztopino predhodno nevtralizirali z NaOH.

Izkoristke redukcije smo določili na osnovi primerjave absorbanca z ekvimolarno koncentracijo askorbinske kisline pri ustreznem pH.

Reagenti:

- 100 mM fosfat pH 6,5 in 100 mM fosfat pH 2
- 2 M NaOH, 2 M HCL
- 100 mM TCEP, 100 mM DTT
- 5 mM askorbinska kislina v MQ
- askorbat-oksidaza, raztopljena v vodi (125 U/mL)

Izvedba:

V kiveto smo odpipetirali 1 mL 100 mM fosfata pH 6,5, dodali 20 µl 5 mM AA ter 20 µl askorbat oksidaze (125 U/mL). Nato smo pri 250 nm spremljali padec absorbance na nič (kar pomeni, da se je vsa AA oksidirala). Po končani oksidaciji smo dodali 50 µl 2 M HCl, premešali in počakali 2 minuti, da se encim denaturira.

V primeru, ko smo določali izkoristek redukcije pri pH 2, smo neposredno v raztopino dodali 50 µl 100 mM TCEP in po 1 uri izmerili absorbanco pri 250 nm.

V primeru, ko smo spremljali redukcijo pri pH 6,5, smo raztopino po dodatku HCl in denaturaciji encima nevtralizirali s 50 µl 2 M NaOH. Tej raztopini smo nato dodali 50 µl 100 mM TCEP/DTT in po 1 uri izmerili absorbanco pri 250 nm.

### 3.2.3.2 Kromatografsko določanje izkoristkov redukcije komercialno dostopne DHA

Učinkovitost redukcije DHA v šibko kislem in močno kislem območju smo želeli preveriti tudi na komercialno dostopni DHA. Izkazalo se je, da ima raztapljanje DHA v različnih medijih velik vpliv na njeno obstojnost v vodnih raztopinah. V kislem so pretvorbe hitre, vendar je pri pH 2 DHA dolgoročno bolj stabilna (glej slika 16).

Zato smo se odločili, da bomo učinkovitost redukcije preverili z DHA, ki smo jo raztopili v kislem (fosfat pH 2 in 2 % metafosforna kislina) in pustili čez noč na sobni temperaturi. Na ta način smo si pripravili kinetično stabilen vir DHA (minimizirali smo napake, ker vseh eksperimentov nismo mogli narediti hkrati), čeprav z nižjo koncentracijo DHA od tiste, ki smo jo raztopili. Vse eksperimente smo ponovili v treh paralelkah. Po končani redukciji smo vsebnost AA določali kromatografsko na HPLC sistemu. Izkoristke redukcije smo izrazili kot delež določene meritve v primerjavi z največjo določeno povprečno vrednostjo askorbinske kisline.

Reagenti:

- 100 mM fosfat pH 6,5, 100 mM fosfat pH 2, 2 % metafosforna kislina
- 200 mM TCEP, 200 mM DTT
- 3 mM DHA v 100 mM fosfatu pH 2 in 3 mM DHA v 2 % metafosforni kislini

Izvedba:

50 µl 3 mM DHA (raztopljene v 100 mM fosfatu pH 2 ali 2 % metafosforni kislini) smo odpipetirali k 900 µl ustreznega pufru (100 mM fosfat pH 6,5 ali 100 mM fosfat pH 2 ali 2 % metafosforna kislina) in dodali 50 µl ustreznega reducenta (200 mM TCEP ali 200 mM DTT). Vsebino centrifugirali smo nato dobro premešali, kvantitativno prenesli v vialo za HPLC in določili koncentracijo askorbinske kisline. Vsi eksperimenti so bili opravljeni v treh paralelkah.

Preglednica 2: Redukcija v fosfatnem pufru pH 2 raztopljene DHA

	F2 + TCEP	MFK + TCEP	F6 + TCEP	F6 + DTT
reducent	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
pufer	900 µl	900 µl	900 µl	900 µl
DHA (F2)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
	3 paralelke	3 paralelke	3 paralelke	3 paralelke



Preglednica 3: Redukcija v metafosforni kislini raztopljene DHA

	F2 + TCEP	MFK + TCEP	F6 + TCEP	F6 + DTT
reducent	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
puffer	900 µl	900 µl	900 µl	900 µl
DHA (MFK)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
	3 paralelke	3 paralelke	3 paralelke	3 paralelke

### 3.2.4 Kinetika redukcije DHA v AA

Uporabnost reducenta za pripravo AA iz DHA pri določenih pogojih ni omejena le z izkoristkom redukcije, ampak tudi s hitrostjo redukcije. Ta mora biti dovolj hitra, da ni omejujoč dejavnik v postopku določevanja skupnega vitamina C. V ta namen smo izbrali določene pufre in reducente ter spektrofotometrično spremljali potek redukcije. Da bi simulirali realne pogoje, smo hitrost redukcije v določenih primerih spremljali tudi v prisotnosti  $\text{Cu}^{2+}$  ionov, ki vplivajo na stabilnost askorbinske kisline.

#### 3.2.4.1 Spektrofotometrično spremljanje kinetike redukcije DHA pri različnih vrednostih pH

Materiali:

- 3 mM DHA raztopljena v MQ vodi
- 2 % metafosforna kislina, 100 mM fosfat pH 2, 100 mM fosfat pH 6, 100 mM acetat pH 4, 100 mM citrat pH 4
- 200 mM TCEP, 200 mM DTT

Izvedba:

V kiveto smo odpipetirali 950 µl ustreznega pufra, 50 µl 3 mM DHA, raztopljene v vodi, in 50 µl 200 mM raztopine reducenta (TCEP ali DTT) ter dobro premešali. Hitrost redukcije smo kontinuirano spremljali na spektrofotometru z merjenjem absorbance pri 250 nm. Celica z vzorcem je bila termostatorirana pri 25 °C.

#### 3.2.4.2 Spektrofotometrično spremljanje kinetike redukcije DHA pri različnih vrednostih pH v prisotnosti $\text{Cu}^{2+}$ ionov

Materiali:

- 3 mM DHA, raztopljena v MQ vodi
- 2 % metafosforna kislina, 100 mM fosfat pH 2, 100 mM fosfat pH 6, 100 mM acetat pH 4, 100 mM citrat pH 4
- 2 mM  $\text{CuSO}_4$
- 200 mM TCEP, 200 mM DTT

Izvedba:

V kiveto smo odpipetirali 950  $\mu$ l ustreznega puфра, 50  $\mu$ l 3 mM DHA, raztopljene v vodi, 50  $\mu$ l 2 mM  $\text{CuSO}_4$  in 50  $\mu$ l 200 mM raztopine reducenta (TCEP ali DTT) ter dobro premešali. Hitrost redukcije smo kontinuirano spremljali na spektrofotometru z merjenjem absorbance pri 250 nm. Celica z vzorcem je bila termostatirana pri 25  $^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.5 Stabilnost AA in DHA v realnih vzorcih

Informacije o stabilnosti AA in DHA, kinetiki in izkoristkih redukcije DHA, ki smo jih pridobili na modelnih raztopinah, smo izkoristili pri študiju stabilnosti AA in DHA v realnem vzorcu.

Izbrali smo melancane, saj je to zelenjava z relativno nizko vsebnostjo vitamina C (Belitz in Grosch, 1999), vendar pa vsebuje ustrezne encime in kovinske ione, ki pospešijo oksidacijo askorbinske kisline.

Stabilnost askorbinske in dehidroaskorbinske kisline smo določali po metodi standardnega dodatka AA in DHA v homogenizirane melancane. Količino standardnega dodatka smo ovrednotili tako, da smo pripravili ustrezno koncentracijo AA v metafosforni kislini in jo direktno analizirali na HPLC sistemu. Tako določena količina je predstavljala 100 % dodatka.

Izplen standardnega dodatka v vzorcu smo določili tako, da je ta predstavljal razliko med določeno AA v vzorcu, kateremu smo dodali standardni dodatek, in vzorcem, kateremu standardnega dodatka nismo dodali.

Pri realnih vzorcih smo preverili, kako na izplen standardnega dodatka AA in DHA vplivajo naslednji parametri: pH homogenizacije jajčevcev, pH homogenata, v katerega dodamo standardni dodatek AA ali DHA, in pH, pri katerem poteka redukcija DHA v AA, ter izbor reducenta.

#### 3.2.5.1 Priprava vzorcev, homogeniziranih v destilirani vodi

Materiali:

- jajčevci
- MQ voda
- 1 M fosfatni pufer pH 2 (F2)
- 1 M acetatni pufer pH 5 (A5)
- 20 % metafosforna kislina (MFK)
- 150 mM TCEP
- 150 mM DTT
- DHA, raztopljena v vodi, v koncentraciji 1 mg/mL
- AA, raztopljena v vodi, v koncentraciji 1 mg/mL

Izvedba:

V plastični posodici smo odtehtali 50 g olupljenih jajčevcev in dodali 50 mL MQ vode ter dve minuti homogenizirali z ultraturaxom. Po končani homogenizaciji smo po 5 g homogenata (predpostavili smo, da je njegova gostota 1,0 g/mL) dodali v vsako od devetih centrifugirk (preglednica 4), v katere smo predhodno odpipetirali ustrezne prostornine standardnih dodatkov in pufrov, dobro premešali ter pustili na sobni temperaturi 60 minut.

Preglednica 4: Inkubacija vodnega homogenizata jajčevcev v ustreznih pufrih in s standardnimi dodatki

	Brez stand. dodatka	Dodamo DHA (1 mg/mL)	Dodamo AA (1 mg/mL)
Inkubacija v fosfatnem pufri pH 2	1 mL 1 M F2 4 mL MQ vode  5 g vzorca	1 mL 1 M F2 3,5 mL MQ vode 0,5 mL DHA  5 g vzorca	1 mL 1 M F2 3,5 mL MQ vode 0,5 mL AA  5 g vzorca
Inkubacija v acetatnem pufri pH 5	0,5 mL 1 M A5 4,5 mL MQ vode  5 g vzorca	0,5 mL 1 M A5 4 mL MQ vode 0,5 mL DHA  5 g vzorca	0,5 mL 1 M A5 4 mL MQ vode 0,5 mL AA  5 g vzorca
Inkubacija v 2 % metafosfor ni kislini	0,5 mL 20 % MFK 4,5 mL MQ vode  5 g vzorca	0,5 mL 20 % MFK 4 mL MQ vode 0,5 mL DHA  5 g vzorca	0,5 mL 20 % MFK 2,1 mL MQ vode 0,5 mL AA  5 g vzorca

Tik pred iztekom enourne inkubacije smo posamezne vzorce centrifugirali in iz vsake od devetih centrifugirk z vzorci odpipetirali 4-krat po 0,5 mL supernatanta v mikrocentrifugirke, ki so vsebovale že pripravljene mešanice ustreznih pufrov in reductentov (preglednica 5). Po končani redukciji (1 ura), smo v mikrocentrifugirke, kjer je redukcija potekala pri pH 5, zaradi primerljivejših pogojev analize na HPLC sistemu dodali metafosforno kislino in jih tako nakisali. Vse vzorce smo pred analizo na HPLC sistemu prefiltrirali skozi filtre iz celuloze-acetata z velikostjo por 0,45 µm.

Preglednica 5: Priprava vzorcev jajčevcev za redukcijo

Brez reducenta v MFK	MFK s TCEP	v A5 s TCEP	A5 z DTT
0,15 mL 20 % MFK 0,700 mL MQ vode + 0,5 mL vzorca + po eni uri 0,15 mL MQ vode	0,15 mL 20 % MFK 0,1 mL 150 mM TCEP 0,600 mL MQ vode + 0,5 mL vzorca + po eni uri 0,15 mL MQ vode	0,15 mL 1 M A5 0,1 mL 150 mM TCEP 0,600 mL MQ vode + 0,5 mL vzorca + po eni uri 0,15 mL 20 % MFK	0,15 mL 1 M A5 0,1 mL 150 mM DTT 0,600 mL MQ vode + 0,5 mL vzorca + po eni uri 0,15 mL 20 % MFK

### 3.2.5.2 Priprava vzorcev, homogeniziranih v metafosforni kislini

Želeli smo preveriti, ali na stabilnost standardnega dodatka vpliva tudi pH homogenizacije in ne samo pH raztopine, v katero dodamo AA. Zato smo za razliko od postopka, opisanega v točki 3.2.5.1, jajčevce homogenizirali tudi v 2 % MFK. Nadaljnji postopek smo skrčili na inkubacijo le v MFK in acetatu pH 5, s standardnim dodatkom ali brez njega (4 centrifugirke in ne 9). Tudi pri izvedbi redukcije smo se omejili le na redukcijo v MFK s TCEP ter seveda določili vsebnost AA v vzorcu brez redukcije.

### 3.2.6 Določevanje vsebnosti askorbinske kisline na HPLC sistemu

Princip: Z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC) ločujemo vzorec na posamezne komponente, ki potujejo po koloni in prehajajo med mobilno in stacionarno fazo, pri čemer se premikajo le v mobilni fazi z določeno hitrostjo  $u_x$ .

$$u_x = 1/t_r$$

$t_r$  je retencijski čas, ki ga potrebuje komponenta, da pride skozi kolono oziroma jo zapusti. Ta čas je za določeno komponento karakterističen in ga lahko pri konstantnem pretoku uporabimo za identifikacijo in kvantifikacijo te komponente. Spojino lahko na izhodu iz kolone detektiramo na različne načine. Pogosto uporabljamo spektrofotometrični detektor, kjer merimo absorbanco eluirane raztopine pri tisti valovni dolžini, kjer analizirana spojina absorbira svetlobo.

*Postopek določitve vsebnosti askorbinske kisline:* Vsebnost askorbinske kisline smo določali na koloni SynergieC<sub>18</sub> 250 mm x 4 mm, napolnjeni z delci stacionarne faze dimenzije 4  $\mu$ m. Vzorce, ki smo jih pripravili, kot je opisano pri posameznih postopkih, smo skozi filtre za enkratno uporabo z velikostjo por 0,45  $\mu$ m prefiltrirali v steklene viale. Vialo smo naložili na avtomatski podajalnik in pričeli z analizo. Na kolono, ekvilibrirano s fosfatnim pufrom s koncentracijo 3,54 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2,9, smo nanесли 20  $\mu$ L prefiltriranega vzorca. Kolono smo po nanosu posameznega vzorca 20 minut spirali pri konstantnem pretoku 0,6 mL/min. Eluirane komponente smo spektrofotometrično detektirali pri 250 nm.

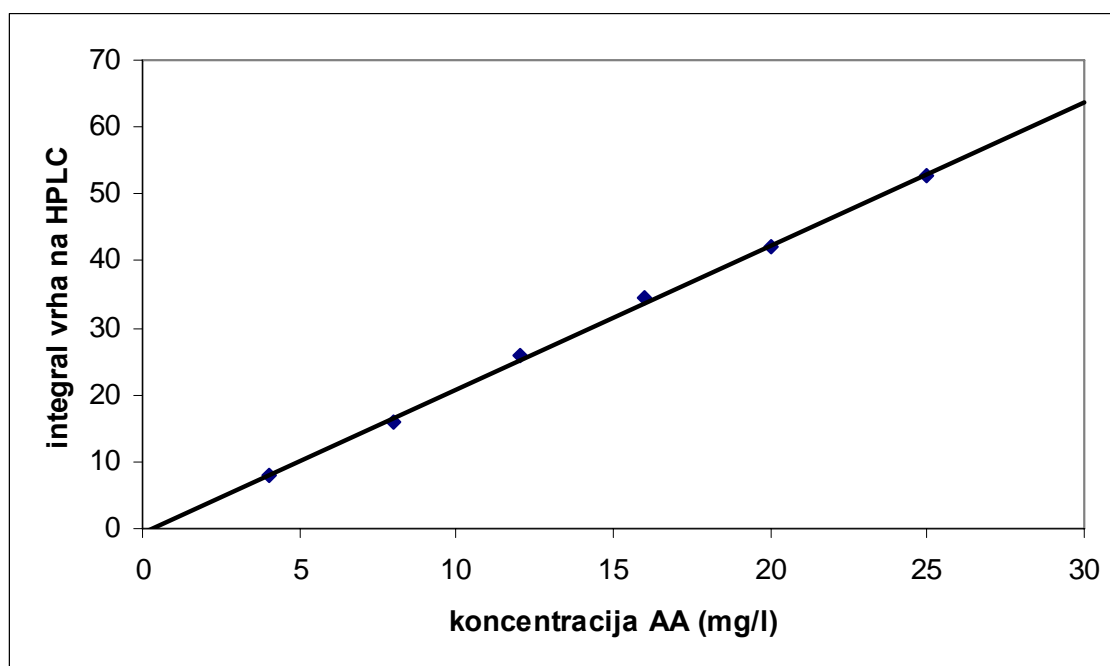
Koncentracijo askorbinske kisline v ekstraktu smo določili s primerjavo vrednosti integralov na spektrogramu in umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili na isti aparaturi z različnimi koncentracijami standardov askorbinske kisline.

*Priprava umeritvene krivulje za HPLC s standardnimi raztopinami AA:*

Ustrezne prostornine standardne raztopine 1 mM askorbinske kisline v vialah za HPLC zmešamo z ustreznimi volumni MQ vode (preglednica 9), dobro premešamo ter analiziramo na HPLC sistemu.

Preglednica 6: Priprava točk za umeritveno krivuljo

Koncentracija AA (mg/l)	V <sub>1 mM AA</sub> (μl)	V <sub>H<sub>2</sub>O</sub> (mL)
4	22,7	997,3
8	44,5	955,5
12	68,2	932,8
16	90,9	909,1
20	113,6	886,4
25	142	858



Slika 10 : Umeritvena krivulja za kromatografsko določitev AA

S HPLC smo analizirali vzorce pri naslednjih točkah:

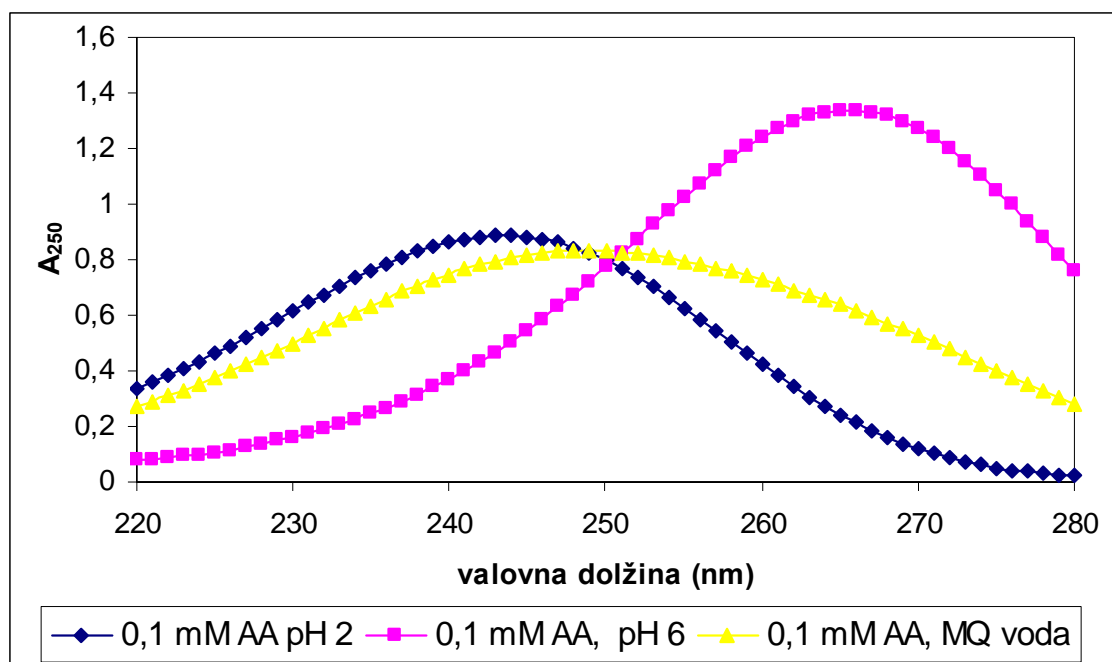
- Stabilnost DHA: 4.2.2.
- Redukcija DHA: 4.3.2
- Realni vzorci: 4.5.2 in 4.5.3
- Umeritvena krivulja za HPLC: 3.2.6 in 4.5.1,

## 4 REZULTATI

### 4.1 STABILNOST AA V MODELNIH RAZTOPINAH

#### 4.1.1 Vpliv pH na absorbanco askorbinske kisline v UV območju

Znano je, da ima pH velik vpliv na absorbanco askorbinske kisline v vodnih raztopinah (Belitz in Grosch, 1999). Absorpcijski maksimum in molarni absorpcijski koeficient sta odvisna od tega, ali je askorbinska kislina v ionizirani obliki (pri pH, večjem od  $p_{K_{a1}}$ ), ali pa je protonirana, v nedisociirani obliki (pri pH, manjšem od  $p_{K_{a1}}$ ). Ker je bil eden od namenov eksperimentalnega dela spektrofotometrično spremljati stabilnost askorbinske kisline pri različnih pH vrednostih, je bilo potrebno najti valovno dolžino, kjer je molarni absorpcijski koeficient vseh oblik približno enak, s čimer bi bile napake pri eksperimentalnem delu čim manjše.



Slika 11: Spektri 0,1mM askorbinske kisline v 100 mM fosfatnem pufru pH 6,5, 100 mM fosfatnem pufru pH 2 ter v MQ vodi

Na sliki 11 so prikazani absorpcijski spektri 0,1 mM askorbinske kisline pri pH vrednostih 6,5, pH 2 in v MQ vodi pri pH 3 - 4, kjer sta v pomembnem deležu prisotni tako njena disociirana kot tudi nedisociirana oblika. Iz slike 11 lahko razberemo, da je najprimernejša valovna dolžina 250 nm, saj so tu razlike v molarnih absorpcijskih koeficientih najmanjše (krivulje se sekajo). To valovno dolžino smo zato uporabljali v nadaljnjem delu. Pri tej valovni dolžini pride do najmanjših napak merjenja, če merimo koncentracijo AA pri različnih pH vrednostih.

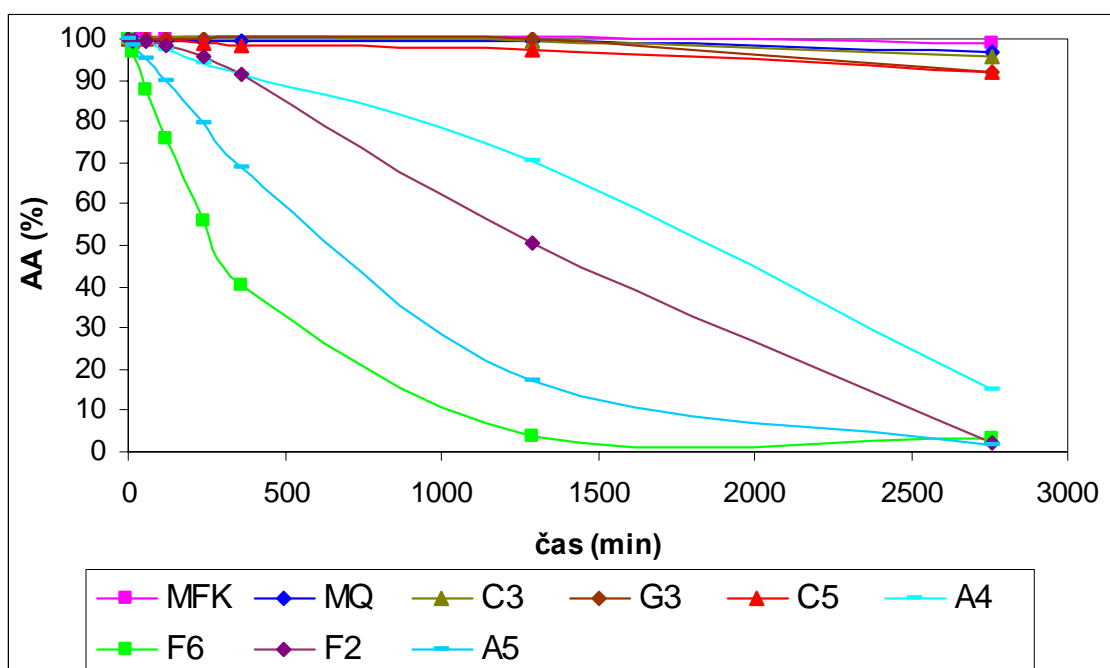
#### 4.1.2 Stabilnost AA v različnih medijih v odsotnosti redoks aktivnih ionov

Askorbinska kislina je občutljiva na pH raztopine. Pri višjih pH vrednostih je bolj nestabilna in se oksidira v DHA. Dehidroaskorbinska kislina, ki nastane pri oksidaciji askorbinske kisline v vodnih raztopinah, pa pri valovni dolžini 250 nm praktično ne absorbira. Zaradi tega lahko razpad askorbinske kisline v odsotnosti tistih nečistoč, ki absorbirajo pri tej valovni dolžini, spremljamo spektrofotometrično.

Namen poskusa je bil spektrofotometrično spremljati kinetiko oksidacije askorbinske kisline v MQ vodi, 2 % metafosforni kislini, 100 mM fosfatnem pufru pH 2, 100 mM fosfatnem pufru pH 6, 100 mM glicinskem pufru pH 3, 100 mM acetatnem pufru pH 4 in pH 5 ter 100 mM citratnem pufru pH 3 in pH 5.

Preglednica 7: Stabilnost askorbinske kisline v pufrih brez prisotnosti redoks aktivnih ionov

Čas (min)	AA (%)								
	MFK	MQ	C3	G3	C5	A4	F6	F2	A5
6	100	100	100	100	100	100	100	100	100
15	100	100	100	100	100	100	97	99	99
60	100	100	100	100	100	99	88	99	95
120	100	99	100	100	99	97	76	98	90
240	100	100	100	100	99	94	56	96	80
360	100	100	101	100	99	91	40	91	69
1290	101	99	100	100	97	71	4	51	17
2760	99	97	96	92	92	15	3	2	1



Slika 12: Stabilnost askorbinske kisline v pufrih brez prisotnosti redoks aktivnih ionov

Na sliki 12 je prikazana kinetika oksidacije askorbinske kisline v času dveh dni in pri temperaturi 25 °C. Hitrost njenega razpada v različnih pufrih smo spremljali z merjenjem absorbance pri 250 nm. Pufre oziroma njihov vpliv na stabilnost askorbinske kisline lahko v grobem razvrstimo v dve skupini.

V prvi skupini, kjer je AA relativno obstojna, so MFK, MQ voda, citratni pufer pH 3, glicinski pufer pH 3 in citratni pufer pH 5. Za večino pufrov, kjer je AA obstojna, je značilen nizek pH (2 - 4), izjema je le citratni pufer pH 5. Zanimivo je, da citratni pufer pH 5 mnogo bolj stabilizira AA kot acetatni pufer z enakim pH. Najverjetnejši razlog za to je, da je citrat dober kelator nekaterih kovinskih ionov (Belitz in Grosch, 1999), ki bi bili v raztopini lahko prisotni kot nečistoče in bi katalizirali oksidacijo AA. Prednost MQ vode je v tem, da ji dodatek AA zniža pH na 3 - 4 in tako se lahko AA sama stabilizira.

V drugi skupini se nahajajo acetatni pufer pH 4 in pH 5 ter fosfatni pufer pH 2 in pH 6. V tej skupini je AA precej manj stabilna kot v prvi skupini, kar je razumljivo, saj je večini primerov pH višji. Glede na pH vrednost izstopa fosfatni pufer pH 2, saj naj bi bila AA pri nizkem pH bolj obstojna.

#### 4.1.3 Stabilnost AA v različnih medijih v prisotnosti Cu<sup>2+</sup>

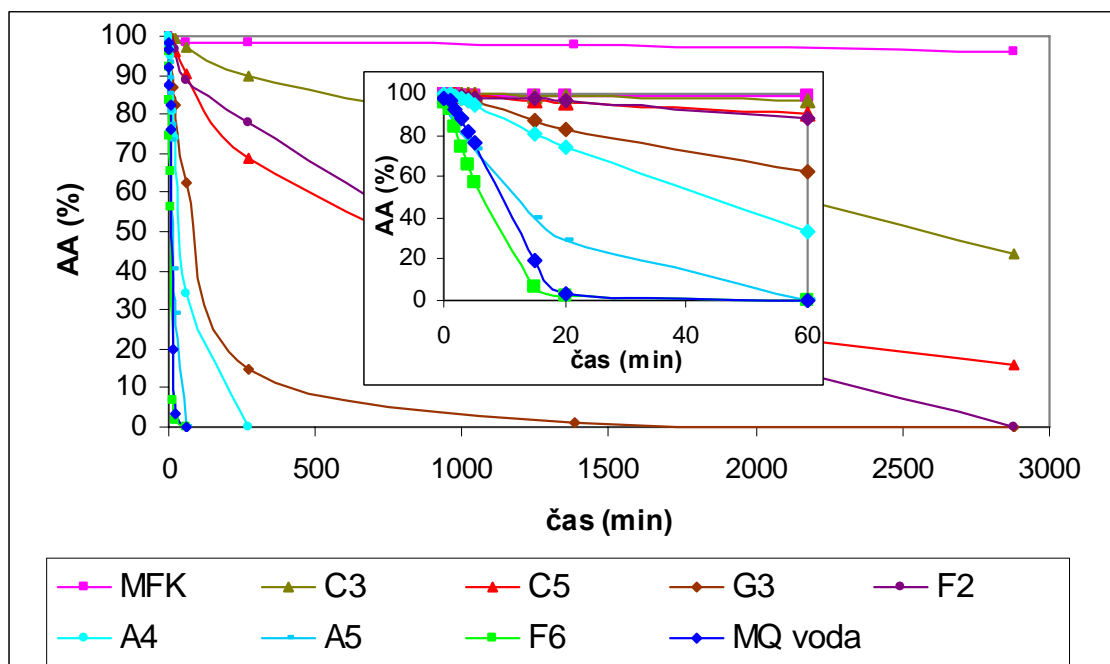
Askorbinska kislina je še bolj kot na pH občutljiva na prisotnost nekaterih redoks aktivnih ionov (Davey in sod., 2000). Odločili smo se, da bomo preverili vpliv Cu<sup>2+</sup> ionov, saj je baker pomemben mikroelement v živih organizmih, in še posebej zato, ker vpliva na obstojnost AA v živilih (Belitz in Grosch, 1999). Preverili smo vpliv Cu<sup>2+</sup> ionov na stabilnost askorbinske kisline v modelnih raztopinah, pri dveh, za velikostni razred različnih koncentracijah Cu<sup>2+</sup> ionov.

V preglednici 8 in na sliki 13 so predstavljeni rezultati meritev stabilnosti AA v pufrih z različnimi pH vrednostmi v prisotnosti 9,8 µM Cu<sup>2+</sup> ionov. Ugotovili smo, da se je v primerjavi s poskusom, kjer nismo dodali bakrovih ionov, stabilnost AA v vseh primerih drastično zmanjšala.

Preglednica 8: Stabilnost askorbinske kisline v pufrih v prisotnosti 9,8 µM Cu<sup>2+</sup> ionov

čas (min)	AA (%)								
	MFK	C3	C5	G3	F2	A4	A5	F6	MQ voda
0,1	100	100	100	100	100	100	93	100	98
1	100	100	100	99	99	100	89	92	97
2	100	100	100	100	99	99	85	84	92
3	99	100	99	98	98	98	81	74	88
4	99	100	99	97	98	96	77	65	82
5	99	100	99	96	98	95	73	57	76
15	99	99	97	87	97	81	40	7	20
20	99	99	96	83	97	74	29	2	3
60	99	97	91	63	89	34	0	0	0
270	98	90	69	15	78	0			
1380	98	72	32	1	31				
2880	96	44	16	0	0				





Slika 13: Stabilnost askorbinske kisline v pufrih v prisotnosti  $9,8 \mu\text{M Cu}^{2+}$  ionov

V grobem lahko na osnovi rezultatov, prikazanih v preglednici 8 in na sliki 13, ločimo tri skupine pufrov, v katerih je AA različno obstojna.

V prvi skupini, kjer je AA relativno obstojna, je le MFK, ki je tudi najprimernejša za stabilizacijo AA v realnih vzorcih (Musulin in King, 1936).

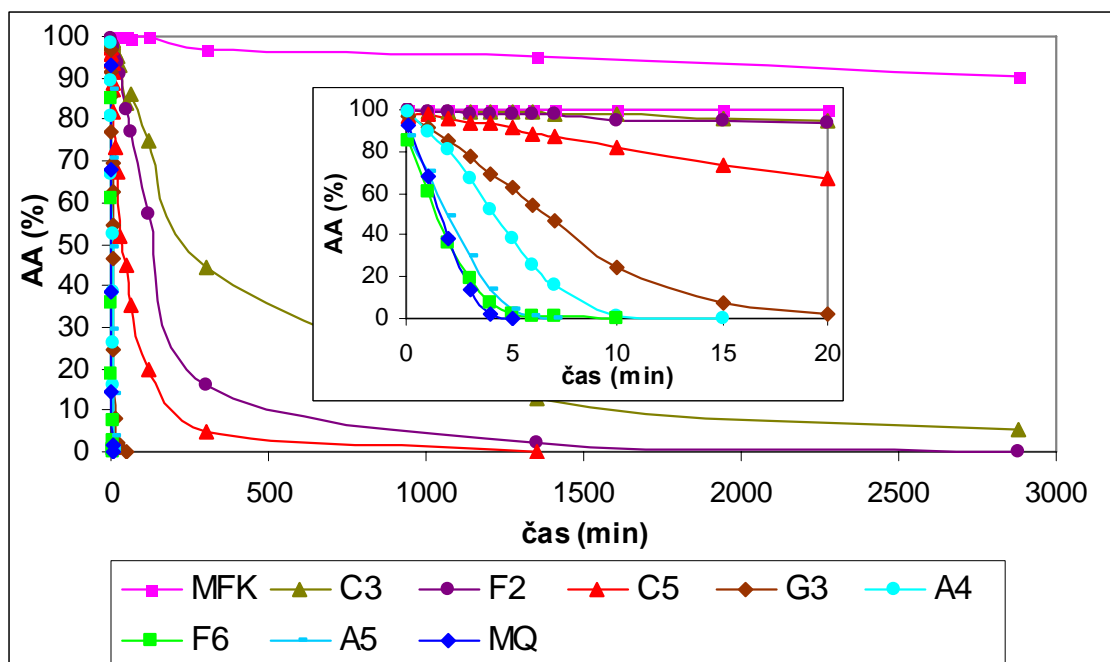
V drugi skupini, kjer je AA srednje obstojna, sta citratna pufera pH 3 in pH 5, kjer na obstojnost najverjetneje vpliva sposobnost citrata, da veže bakrove ione in tako zmanjša koncentracijo prostih ionov, ter fosfatni pufer pH 2.

V tretji skupini, kjer je AA najmanj obstojna, so glicinski pufer pH 3, acetatni pufer pH 4 in pH 5 ter fosfatni pufer pH 6 in MQ voda. Dodatek bakrovih ionov je najbolj vplival na stabilnost askorbinske kisline, raztopljene v vodi. Ta je bila brez dodatka bakrovih ionov stabilna tudi dva dni, ob dodatku manjše koncentracije bakrovih ionov pa se je popolnoma oksidirala že v eni uri. Za razliko od vode, kjer je imel dodatek bakra največji vpliv, je bil ta najmanjši v primeru fosfata pH 2. Možno je, da je bil fosfat kot tak že onesnažen z redoks aktivnimi ioni, ki so vplivali na stabilnost AA, četudi jih nismo dodali. Zaradi boljše preglednosti je potek oksidacije v prvih 20 minutah predstavljen kot graf znotraj slike 13.

V nadaljnjem delu smo določali stabilnost AA v raztopinah z višjo koncentracijo bakra. V preglednici 9 in na sliki 14 so predstavljeni rezultati meritev stabilnosti AA v pufrih z različnimi pH vrednostmi v prisotnosti  $98 \mu\text{M Cu}^{2+}$  ionov.

Preglednica 9: Stabilnost askorbinske kisline v pufrih v prisotnosti 98  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  ionov

Čas (min)	AA (%)								
	MFK	C3	F2	C5	G3	A4	F6	A5	MQ
0,1	100	100	100	97	97	98	85	87	93
1	100	99	99	97	91	89	61	71	68
2	100	99	99	96	86	80	36	49	38
3	100	99	98	94	77	67	19	29	14
4	100	99	98	93	69	53	8	14	2
5	100	99	98	91	63	39	2	4	0
6	100	99	98	89	55	26	1	1	
7	100	98	97	87	47	16	1	0	
10	100	98	95	82	25	1	0		
15	100	96	95	73	8	0			
20	100	95	94	68	2				
30	100	93	91	52	1				
50	100	84	82	45	0				
60	100	86	77	35					
121	100	75	57	20					
300	97	44	16	5					
1353	95	13	2	0					
2880	90	5	0						



Slika 14: Stabilnost askorbinske kisline v pufrih v prisotnosti 98  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  ionov

Razvidno je, da višja koncentracija bakrovih ionov v tem poskusu še zmanjša stabilnost AA. Posamezne pogoje lahko prav tako razdelimo v tri enake skupine kot pri prejšnjem poskusu, le da so hitrosti oksidacije v veliki večini primerov nekajkrat večje.

V prvi skupini, kjer je AA relativno obstojna, je spet le MFK. Glede na vse ostale pufre so imeli bakrovi ioni še najmanjši vpliv na stabilnost v MFK, saj je po dveh dneh ostalo 90 % AA, pri vseh ostalih pa 5 % ali manj.

V drugi skupini, kjer je AA srednje obstojna, sta citratna pufera pH 3 in pH 5 ter fosfatni pufer pH 2. Tu je večja koncentracija bakrovih ionov zelo vplivala na stabilnost, saj v primeru citrata pH 5 in fosfata pH 2 po dveh dneh ni ostalo nič askorbinske kisline.

V tretjo skupino lahko uvrstimo glicinski pufer pH 3, acetatni pufer pH 4 in pH 5 ter fosfatni pufer pH 6 in MQ vodo. Pri omenjenih pogojih po 30 minutah ni ostalo nič askorbinske kisline. Proces je bil spet najhitrejši v vodi, kjer je bila oksidacija AA končana že po 5 minutah. Zaradi boljše preglednosti je potek oksidacije v prvih 20 minutah predstavljen kot graf znotraj slike 14.

#### **4.1.4 Stabilnost AA v različnih medijih v prisotnosti Fe<sup>3+</sup> ionov**

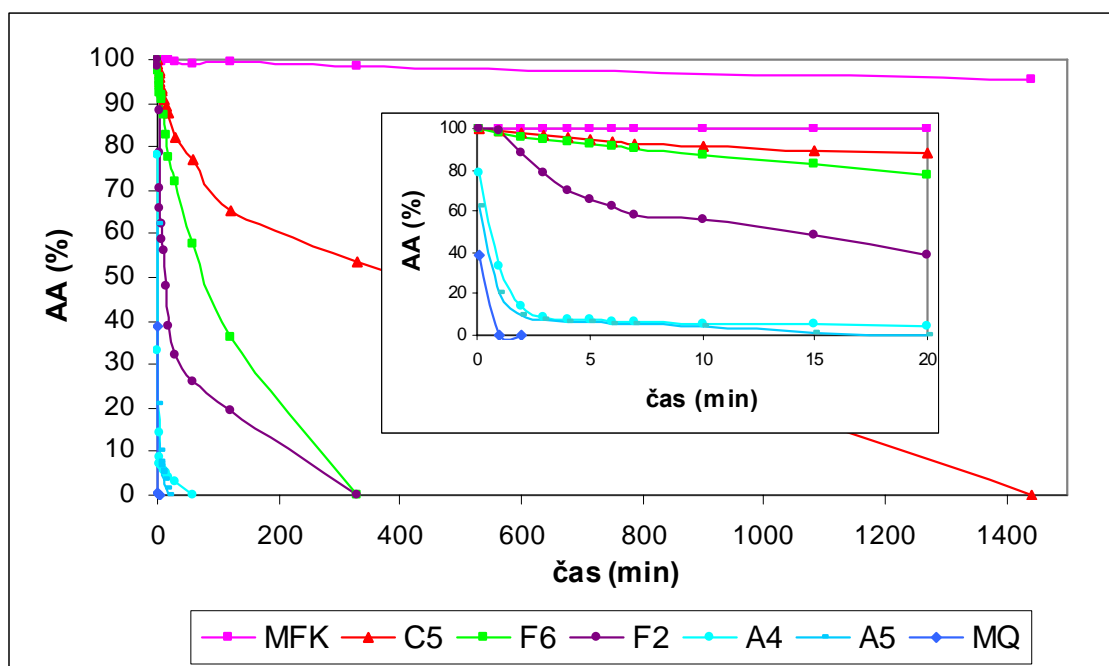
Ker je v organizmu fiziološko prisotno tudi železo, smo naredili test obstojnosti AA pri dodatku Fe<sup>3+</sup> ionov. Fiziološka koncentracija železa je višja od koncentracije bakra, saj so železovi ioni pogosto prisotni kot kofaktorji različnih reduktaz in delov dihalne verige. Vsebnost železa je v živalskem tkivu še posebej velika tudi zaradi koordinativno vezanega železa v hemoglobin in mioglobin (Belitz in Grosch, 1999). Pri pripravi živil pogosto pride do situacije, da se živila živalskega in rastlinskega izvora mešajo. V takšnih primerih imajo železovi ioni lahko velik vpliv na stabilnost askorbinske kisline.

Efektivna koncentracija Fe<sup>3+</sup> ionov v testu, v katerem smo preverjali njihov vpliv na oksidacijo askorbinske kisline, je bila 98 µM. V preglednici 10 in na sliki 15 so predstavljeni rezultati meritev stabilnosti AA v puffrih z različnimi pH vrednostmi v prisotnosti 98 µM Fe<sup>3+</sup> ionov.

Pri meritvah stabilnosti askorbinske kisline v prisotnosti železovih ionov so se pojavili metodološki problemi, saj so nekatere komponente puffrov (citrat, glicin) tvorile z Fe<sup>3+</sup> ioni obarvane komplekse, ki so absorbirali tudi v UV delu spektra, kjer smo spremljali stabilnost askorbinske kisline. Zaradi tega razloga nismo predstavili rezultatov analiz za glicinski pufer in citratni pufer pH 3, kjer je bila absorbanca največja in je bilo zaradi omejitev tehničnih lastnosti instrumenta (absorbanca je večja kot 2) spremembe nemogoče kvantitativno ovrednotiti.

Preglednica 10: Stabilnost askorbinske kisline v pufrih v prisotnosti  $98 \mu\text{M Fe}^{3+}$  ionov

čas (min)	AA (%)						
	MFK	C5	F6	F2	A4	A5	MQ
0,1	100	100	100	100	78	62	39
1	100	99	98	99	33	21	0
2	100	98	96	88	14	10	0
3	100	97	95	79	9	8	
4	100	96	94	70	7	7	
5	100	95	93	66	7	6	
6	100	94	92	62	7	6	
7	100	93	91	59	6	5	
10	100	91	87	56	6	4	
15	100	89	82	48	5	2	
20	100	88	78	38	4	0	
30	100	82	72	32	3		
60	99	77	58	26	0		
120	99	65	36	19			
330	100	54	0	0			
1440	95	0					



Slika 15: Stabilnost AA v različnih pufrih v prisotnosti  $98 \mu\text{M Fe}^{3+}$  ionov

Iz preglednice 10 in slike 15 je mogoče razbrati, da je AA v MFK še vedno najbolj stabilna. Železovi ioni imajo enak vpliv na hitrost oksidacije AA v MFK kot bakrovi ioni,

saj je pri enaki koncentraciji redoks aktivnih ionov (98  $\mu\text{M}$ ) v obeh primerih po enem dnevu preostalo 95 % askorbinske kisline.

Pri ostalih pogojih se pojavijo določene razlike. Zanimivo je, da smo za fosfatni pufer določili, da je askorbinska kislina v prisotnosti železovih ionov bolj stabilna pri pH 6 kot pri pH 2, kar se ne sklada z rezultati prejšnjih meritev. Najverjetneje, je razlog za takšne meritve nastanek slabo topnega  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , kjer je zaradi večje koncentracije hidroksidnih ionov pri pH 6 kot pri pH 2 prišlo do obarjanja železovih ionov, kar je imelo za posledico manjšo koncentracijo v raztopini pri višjem pH.

Hitrost oksidacije v primeru acetatnih pufrov pH 4 in pH 5 ter v MQ vodi je bila še večja kot pri enaki koncentraciji bakrovih ionov. Tako v vodi že po 1 minuti nismo zaznali nič askorbinske kisline, medtem ko je v acetatnih pufrih koncentracija AA padla v tem času na  $\approx 20\%$  oziroma  $\approx 30\%$  začetne vrednosti.

Glede na rezultate meritev s citratom pri pH 5 lahko sklepamo, da ta učinkoviteje stabilizira askorbinsko kislino v prisotnosti  $\text{Fe}^{3+}$  ionov kot  $\text{Cu}^{2+}$  ionov. Ko smo v raztopino dodali bakrove ione, je po petih urah ostalo le 5 % AA (preglednica 9), medtem ko se je pri enaki koncentraciji železovih ionov delež preostale AA dvignil na 50 % (preglednica 10).

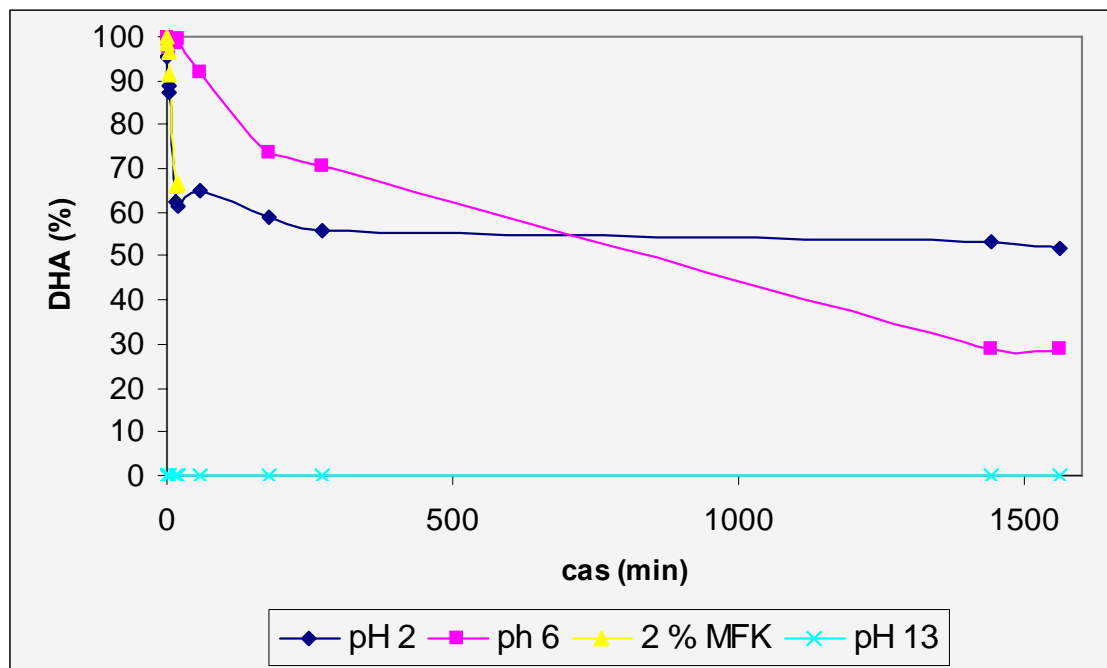
## 4.2 STABILNOST DHA V VODNIH RAZTOPINAH

### 4.2.1 Preliminarni študij stabilnosti komercialno dostopne DHA

Znano je, da ima pH raztopine velik vpliv na stabilnost dehidroaskorbinske kisline, pri čemer je ta precej bolj obstojna v kislem kot v nevtralnem in bazičnem (Wilson, 2002). Za študij stabilnosti smo uporabili komercialno dostopno DHA (Aldrich), ki smo jo raztopili v vodi in takoj nato odpipetirali v pufer z ustreznim pH.

Preglednica 11: Stabilnost DHA v F2, F6, F13 in 2 % MFK

t(min)	DHA (%)			
	pH 2	pH 6	0,1%MFK	pH 13
0	100	100	100	0
1	95	100	98	0
2	88	99	97	0
5	89	98	92	0
15	62	99	66	0
20	62	100	66	0
60	65	92		0
180	59	74		0
270	56	70		0
1440	53	29		0
1560	52	29		0



Slika 16: Kinetika razpada DHA v F2, F6, F13 in 2 % MFK

Kot je razvidno iz preglednice 11 in slike 16, DHA pri pH 13 razpade skoraj v trenutku in je ni več mogoče reducirati v askorbinsko kislino. Pri pH 6 je ta bolj stabilna, vendar se po enem dnevu koncentracija dehidroaskorbinske kisline zmanjša na polovico.

Zelo zanimive rezultate smo dobili, ko smo spremljali stabilnost DHA v kislem (fosfat pH 2 in 2 % metafosforna kislina), kjer smo v obeh primerih v začetni fazi opazili hitro zmanjševanje vsebnosti dehidroaskorbinske kisline. V 20 minutah se je koncentracija dehidroaskorbinske kisline zmanjšala skoraj na polovico, potem pa je bila v okviru enega dne zelo stabilna, tako da je po enem dnevu ostalo več kot pri pH 6, kjer po 20 minutah ni razpadlo praktično nič DHA. Ker v nam dostopnih podatkih iz literature opisov hitrega razpada DHA v kislem nismo opazili, smo se odločili pojav podrobneje raziskati.

#### **4.2.2 Raztapljanje komercialno dostopne DHA v vodi in spremljanje stabilnosti DHA v kisljih pufrih**

Hiter razpad dehidroaskorbinske kisline v kislem smo nameravali podrobneje raziskati z več pufri in ugotoviti, ali sta kinetika in delež preostale DHA odvisna od pH. Ustreznost spektrofotometrične metode za spremljanje kinetike razgradnje DHA (preko naknadne redukcije v AA) smo preverjali tako, da smo jo primerjali s kromatografsko metodo.

Iz rezultatov, prikazanih v preglednici 12, je razvidno, da je direktna spektrofotometrična metoda kar primerna za spremljanje stabilnosti dehidroaskorbinske kisline v modelnih raztopinah, saj med obema metodama ni večjih razlik med določeno vsebnostjo askorbinske kisline v posameznem vzorcu. To še posebej velja za višje koncentracije, kjer je relativna napaka relativno majhna. Spektrofotometrična metoda je manj primerna pri majhnih koncentracijah (fosfatni pufer pH 7, zadnja meritev), kjer je relativna napaka zelo velika.

Tudi kromatografska metoda je imela svoje pomanjkljivosti, saj smo nanašali vzorce v acetatnem pufru pH 5 na kolono, kjer je bila mobilna faza s pH 2,9. Zaradi tega je prišlo do širitve vrhov in slabše separacije na koloni, ki pa v modelnih raztopinah ni bistveno vplivala na kvaliteto meritev. Kljub temu smo vse vzorce pri vseh nadaljnjih meritvah pred nanosom na kolono ustrezno nakisali in tako tvorili nedisociirano obliko askorbinske kisline.

Podobno kot pri točki 4.2.1 smo opazili, da pride do hitrega razpada DHA v kisljih raztopinah (slika 17 in slika 18). V zelo kisljih raztopinah (0,1 M HCl, 2 % MFK) v začetni fazi razpade več DHA kot v manj kisli raztopini (citrati pH 3). Ugotovili smo tudi, da v acetatnem pufru pH 5 ni opazne hitre faze razpada DHA.

Hitrost počasne faze razpada DHA je v skladu s pričakovanji, saj se z višanjem vrednosti pH povečuje. Tako preostane v acetatnem pufru pH 5 po enem dnevu manj DHA kot v citratnem pufru pH 3, čeprav je tu v hitri fazi razpadlo več DHA.

V tem eksperimentu smo za razliko od preliminarne študije delali bolj kvantitativno in opazili, da je že začetna koncentracija DHA v vseh primerih manjša (70 %) kot pa bi

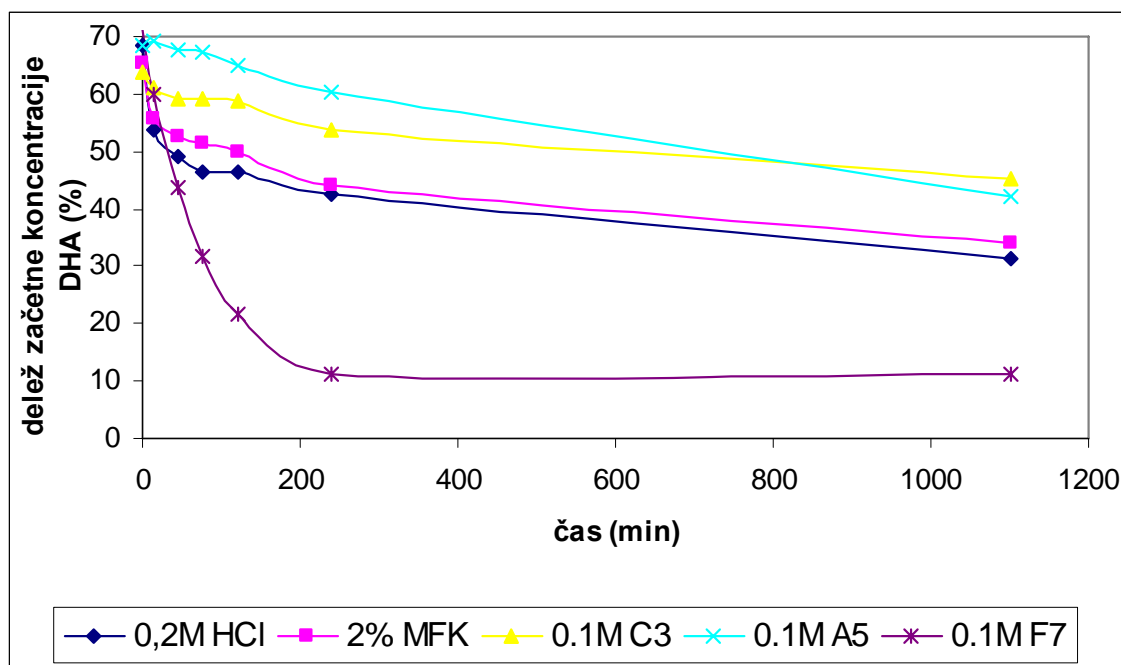
morala biti glede na odtehtu. Nekaj lahko zagotovo pripišemo slabši topnosti dimerne DHA (Deutsch, 2000), nekaj pa tudi morebitnem razpadu že v sami fazi priprave DHA, ki mo jo pred dodatkom v ustrezne pufre raztopili v vodi. Zato smo se odločili, da bomo izvedli tudi eksperimente z direktnim raztapljanjem DHA v pufrih.

Preglednica 12: Primerjava direktne spektrofotometrične metode določitve DHA in kromatografske določitve DHA. V obeh primerih je delež preostale DHA v raztopini izražen kot AA, ki jo dobimo po redukciji s TCEP.

t (min)		1	15	45	75	120	220	1100
delež začetne koncentracije DHA (%)	HCL(S)	68	54	49	47	46	43	31
	HCL(H)	70	56	51	48	45	43	33
	MFK(S)	65	56	53	52	50	44	34
	MFK(H)	68	58	54	53	51	45	35
	C 3 (S)	64	61	59	59	59	54	45
	C 3 (H)	66	64	61	62	60	55	47
	A 5 (S)	69	69	68	67	65	60	42
	A 5 (H)	69	70	68	68	65	60	36
	F 7 (S)	71	60	44	32	22	11	11
	F 7 (H)	67	55	39	28	15	5	4

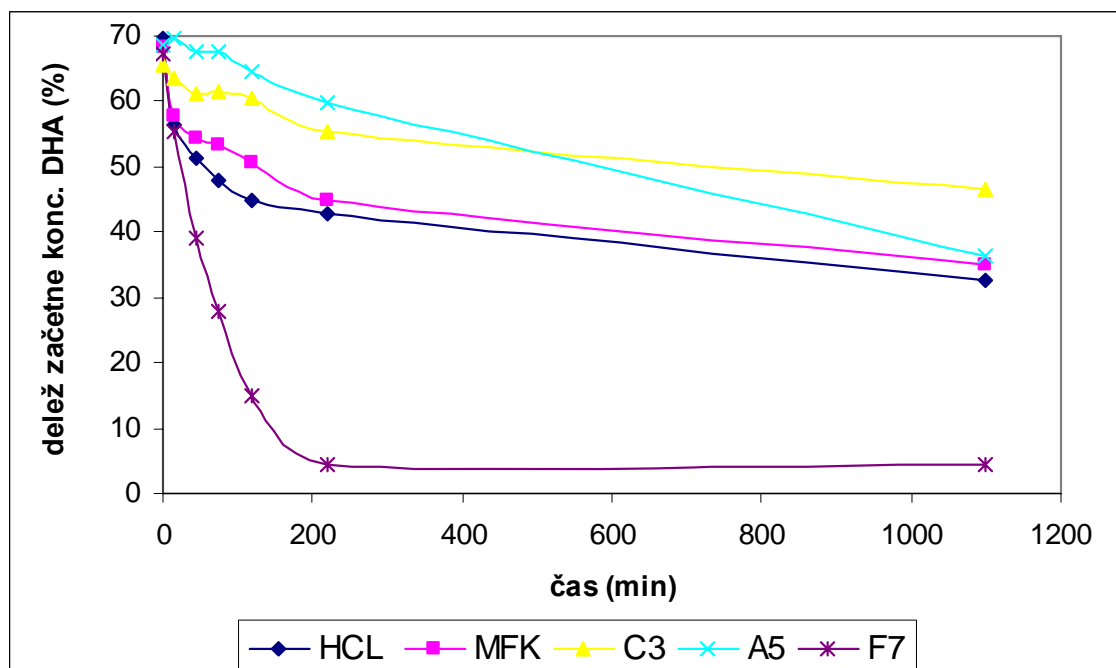
S – spektrofotometrično določanje

H – določanje na HPLC



Slika 17: Spektrofotometrično določena stabilnost DHA v 100 mM HCl, 2 % metafosforni kislini, 100 mM citratu pH 3, 100 mM acetatu pH 5 in 100 mM fosfatu pH 7





Slika 18: Kromatografsko določena stabilnost DHA v 100 mM HCl, 2 % metafosforni kislini, 100 mM citratu pH 3, 100 mM acetatu pH 5 in 100 mM fosfatu pH 7

#### 4.2.3 Raztapljanje komercialno dostopne DHA v kislih pufrih in spremljanje stabilnosti DHA v kislih pufrih

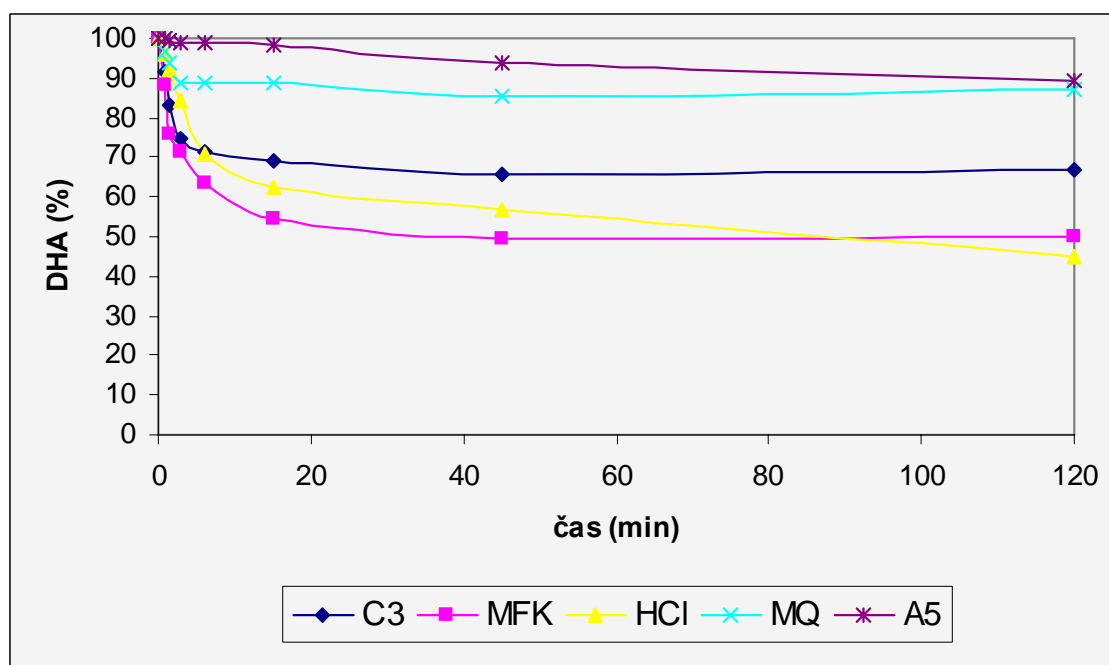
Namen eksperimenta je ugotoviti, kako na stabilnost DHA vpliva, če jo raztopimo v določenem pufri in v tem pufri tudi analiziramo. Na ta način se izognemo fazi raztapljanja v vodi in lahko ugotovimo, če tudi v vodi poteka hitra faza razpada DHA. Ker pa pri takšnem načinu težko zagotovimo popolno primerljivost eksperimentov glede na izkoristek, smo vse vrednosti preračunali na prvo meritev pri posamezni pH vrednosti in jo izrazili v odstotkih.

Iz preglednice 13 in slike 19 je razvidno, da poteka hitra faza razgradnje v vseh pufrih, ki imajo pH manjši od 5, saj le v acetatnem pufri pH 5 ne zaznamo hitre faze. Tudi, če jo raztopimo v vodi, se okoli 10 - 15 % DHA razgradi v nekaj minutah. Sam proces razgradnje laktonskega obroča in tvorbe 2,3-diketogulonske kisline (Gibbons in sod., 2001) najverjetneje tudi pospeši sam proces, saj se pH zaradi nastale kisline zmanjšuje.

Še bolj kot v vodi pa DHA razpada v C3, kjer po nekaj minutah preostane le okoli 70 % DHA, ter v HCl in MFK, kjer preostane le dobra polovica DHA.

Preglednica 13: Razpad direktno v pufrih raztopljenе DHA

t (min)	DHA (%)				
	C3	MFK	HCL	MQ	A5
0	100	100	100	100	100
0,75	91	88	96	97	100
1,5	83	76	92	94	100
3	75	71	84	89	99
6	71	63	71	89	99
15	69	54	62	89	98
45	66	49	57	85	94
120	67	50	45	87	89



Slika 19: Spektrofotometrično določena stabilnost DHA raztopljenе v 100 mM HCl, 2 % metafosforni kislini, 100 mM citratu pH 3, 100 mM acetatu pH 5 in MQ vodi

#### 4.2.4 Vpliv pH raztapljanja komercialno dostopne DHA na izkoristek z redukcijo pridobljene AA

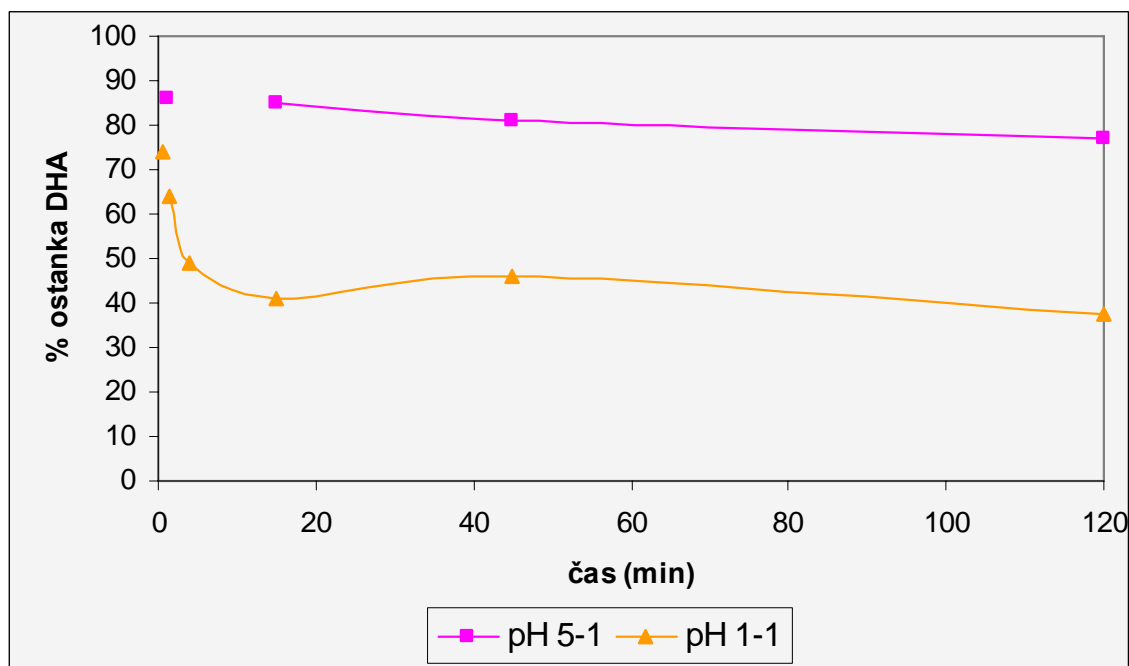
Iz doslej prikazanih rezultatov ni bilo mogoče razbrati, ali je hitra kinetika povezana s hidratacijo komercialne dimerne DHA ali z razgradnjo monomerne DHA v raztopini.

Opaženo zmanjševanje koncentracije DHA, ki jo lahko reduciramo v AA, bi bilo lahko povezano z vplivom nizkega pH na že hidratizirano monomerno DHA, ki bi se hitreje razgrajevala v bolj kislem in počasneje v manj kislem.

Ravno tako bi bila lahko posledica različne hidratacije komercialne DHA, kjer bi v primeru raztapljanja v zelo kislem dobili več oblik DHA ali njenih razgradnih produktov, od katerih bi se le nekateri lahko reducirali v askorbinsko kislino. V pH 5 bi dobili pretežno takšne oblike DHA, ki jih lahko reduciramo v askorbinsko kislino.

To smo poskusili preveriti tako, da smo DHA raztopili v acetatnem pufru pH 5 in nato takoj po raztapljanju pri tej pH vrednosti raztopino zelo nakisali. V primeru, da je hitra faza povezana z vplivom nizkega pH na razgradnjo hidratizirane DHA, pričakujemo, da bomo dobili podobne rezultate, kot če bi komercialno DHA raztopili direktno v zelo kislem pH.

Če pa pH vpliva na hidratacijo dimerne DHA, potem lahko v primeru, da je ta proces v pH 5 zelo hiter, pričakujemo, da se po znižanju pH ne bo nič več zgodilo in bo DHA kljub takojšnjemu dodatku kisline popolnoma stabilna.



Slika 20: Primerjava raztapljanja komercialne DHA v pH 5 in pH 1 na stabilnost pri pH 1

Iz rezultatov, prikazanih na sliki 20, je razvidno, da je DHA, ki smo jo raztopili v acetatnem pufru pH 5 in takoj nato nakisali, zelo stabilna in ne opazimo hitre faze razgradnje DHA, značilne za raztapljanje v kislem. Iz takšnih rezultatov je mogoče sklepati, da je hitra faza razgradnje DHA povezana s procesom hidratacije, ki poteka hitro pri pH 5. Pri nižjem pH je reakcija počasnejša in pri hidrataciji komercialne DHA najverjetneje nastajajo tudi stranski produkti, ki jih ne moremo reducirati v askorbinsko kislino.

#### 4.2.5 Vpliv pH redukcije DHA v AA na pravilnost določanja DHA

Stabilnost dehidroaskorbinske kisline smo določali tako, da smo jo reducirali v askorbinsko kislino in preko koncentracije nastale askorbinske kisline sklepali, koliko DHA je preostalo v raztopini. Ker smo spremljali stabilnost DHA pri različnih pH vrednostih, je bilo potrebno preveriti, ali pH vpliva tudi na redukcijo oziroma na z redukcijo določen delež AA.

V ta namen smo raztopili DHA v acetatnem pufru pH 5, nakisali na pH 1 in alikvote teh raztopin prenesli v pufre z različnimi pH vrednostmi ter izvedli redukcijo s TCEP. Iz rezultatov, prikazanih v preglednici 14, je razvidno, da pH, pri katerem poteka redukcija, ne vpliva bistveno na rezultat, saj so določene koncentracije v okviru standardne deviacije. Z eksperimentom pa smo še enkrat potrdili, da je DHA, ki jo raztopimo v acetatu s pH 5 in nato nakisamo, zelo stabilna. Tudi izkoristki glede na pričakovano koncentracijo z redukcijo nastale AA so med vsemi eksperimenti s komercialno DHA najboljši.

Preglednica 14: Redukcija v A5 raztopljene DHA v različnih pufrih s TCEP

	Izkoristki redukcije DHA (%)				
t (min)	1 min	5 min	20 min	60 min	povpr.
C3	88	87	84	85	86 ± 2
A5	89	92	85	87	88 ± 3
MF	85	84	86	84	85 ± 1

### 4.3 PRIMERJAVA IZKORISTKOV REDUKCIJE DHA V AA V RAZTOPINAH Z RAZLIČNIMI pH VREDNOSTMI

#### 4.3.1 Spektrofotometrično določanje izkoristkov redukcije encimsko pripravljene DHA

Naš namen pri tem eksperimentu je bil določiti izkoristke redukcije encimsko narejene DHA (dobimo jo iz AA z encimom askorbat-oksidozo) nazaj v askorbinsko kislino. Da nas pri redukciji askorbat oksidaza ne bi motila, smo jo denaturirali z dodatkom HCl tako, da se je pH znižal na 2. Ko smo redukcijo izvedli pri pH 6,5, smo morali dodati NaOH. Za redukcijo pri pH 2 smo uporabili TCEP. Pri pH 6,5 smo poleg TCEP preverili tudi učinkovitost reducenta DTT.

Iz rezultatov treh paralelk, prikazanih v preglednici 15, je razvidno, da smo najboljše izkoristke dobili z redukcijo pri pH 2, kjer smo določili praktično vso askorbinsko kislino, ki je bila v vzorcu pred encimsko oksidacijo. Ti rezultati so skladni s hipotezo, da je vzrok za hitro kinetiko pri razpadu DHA v kislem drugačna hidratacija in ne slaba stabilnost hidratizirane DHA v kislem (pri encimski oksidaciji direktno nastane monomerna DHA). Presenetili so nas majhni izkoristki pri pH 6,5, saj so to glede na podatke iz literature optimalni pogoji za redukcijo DHA v AA. Tudi relativna napaka je precej večja kot pri redukciji pri pH 2. Slabi izkoristki najverjetneje niso posledica problemov, povezanih z

redukcijo, ampak pomanjkljive izvedbe eksperimentalnega postopka (to smo ugotovili šele kasneje). Ker smo v vzorce, v katerih smo izvajali redukcijo pri pH 6,5, za nevtralizacijo dodali koncentriran NaOH, je lokalno prišlo do zelo visoke vrednosti pH in s tem najverjetneje do trenutne razgradnje določenega deleža DHA.

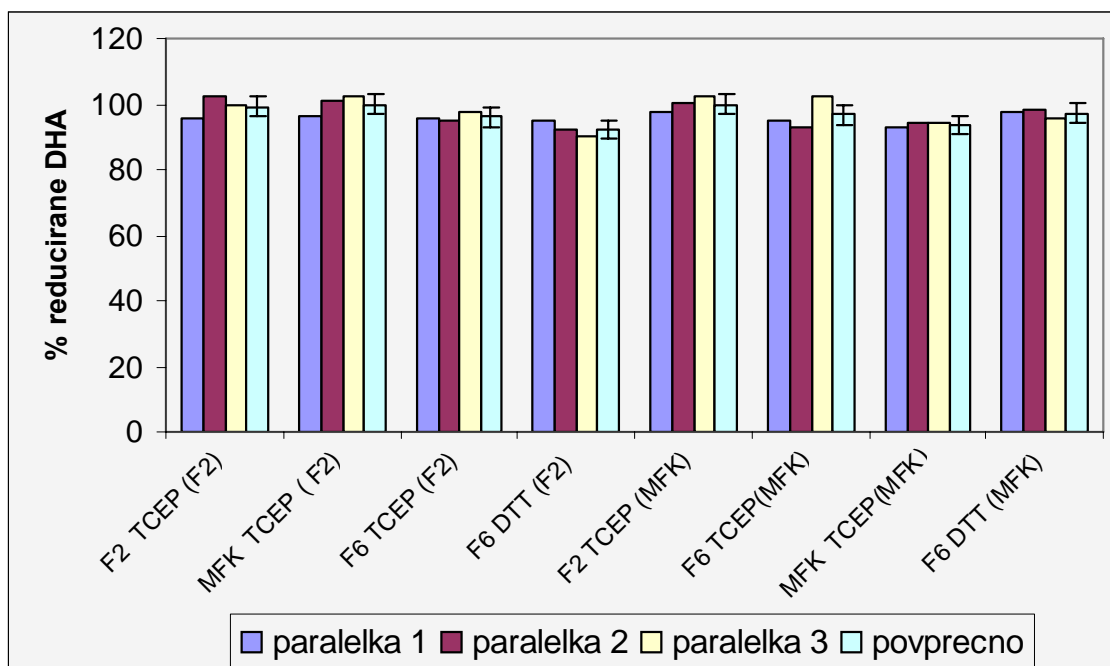
Preglednica 15: Izkoristki redukcije encimsko pripravljene DHA s TCEP in z DTT

Izkoristek redukcije (%)		
pH 2 s TCEP	pH 6,5 s TCEP	pH 6,5 z DTT
98 ± 2	75 ± 6	76 ± 5

#### 4.3.2 Kromatografsko določanje izkoristkov redukcije komercialno dostopne DHA

Ker je bil eden od namenov diplomske naloge ugotoviti, ali je reducent TCEP primeren za redukcijo DHA v AA tudi v zelo kislih raztopinah, smo kromatografsko določili izkoristke redukcije pri teh pogojih in jih primerjali z redukcijo pri optimalnih pogojih.

V ta namen smo pripravili raztopino DHA v metafosforni kislini in v fosfatnem pufru pH 2, počakali, da se je hitra faza končala in nato takšno DHA reducirali pri različnih pogojih. Iz rezultatov, prikazanih na sliki 21, je razvidno, da večjih razlik v izkoristkih ni, saj so povprečja določenih koncentracij askorbinske kisline v okviru standardne deviacije. Izkoristki redukcije pri zelo nizkem pH so torej popolnoma primerljivi z izkoristki redukcije pri višjem pH, blizu nevtralnega.

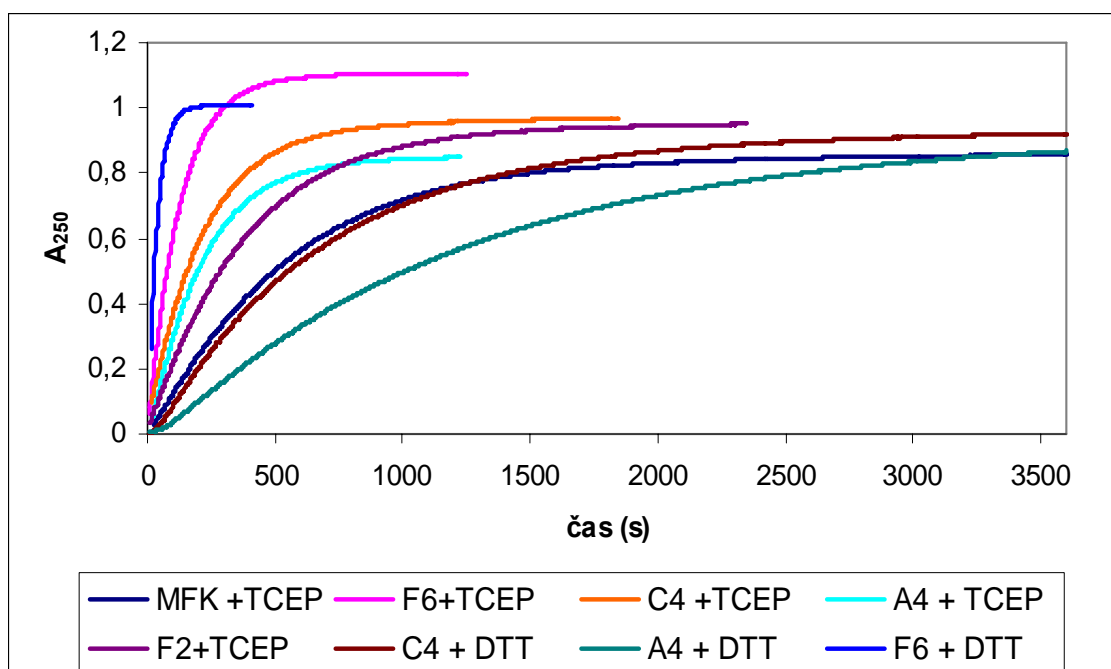


Slika 21: Izkoristek redukcija DHA v AA s TCEP in DTT glede na največji določen izkoristek

#### 4.4 KINETIKA REDUKCIJE DHA V AA

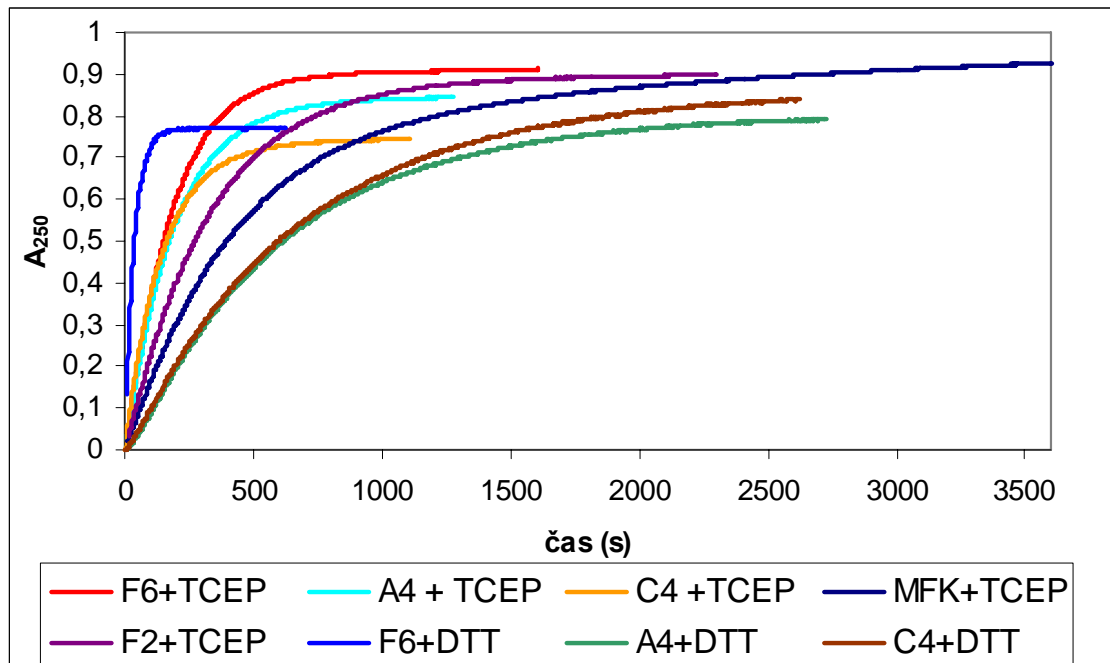
##### 4.4.1 Spektrofotometrično spremljanje kinetike redukcije DHA pri različnih pH vrednostih

Da bi ovrednotili uporabnost reducenta TCEP, smo spektrofotometrično spremljali hitrost redukcije dehidroaskorbinske kisline v askorbinsko kislino pri različnih pH vrednostih. Hitrosti redukcije DHA v AA s TCEP smo primerjali s pogosto uporabljanim reducentom DTT (slika 22). Najhitreje je potekala redukcija z DTT pri pH 6, saj se je v nekaj minutah vsa DHA pretvorila v AA. Malo počasneje je redukcija potekala s TCEP pri enakem pH. Ko smo pH znižali na 4, so se pokazale velike razlike v hitrosti redukcije. Medtem ko pri redukciji s TCEP ni večjih razlik v hitrosti med pH 6 in pH 4, se je hitrost redukcije z DTT pri pH 4 drastično zmanjšala. Pri redukciji izbira pufru (citrata ali acetata) ni imela večjega vpliva na hitrost redukcije. Ko smo pH še dodatno znižali na 2 oziroma delali redukcijo kar direktno v MFK, z DTT nismo uspeli reducirati nič DHA, kar pomeni, da je ta reducent pri tem pH neuporaben. Tako v MFK kot v fosfatnem pufru pH 2, je TCEP za razliko od DTT deloval. Hitrost redukcije pri pH 2 je bila manjša kot pri višjem pH, vendar je bila kljub temu reakcija v eni uri (1 ura) praktično končana.



Slika 22: Hitrost redukcije DHA s TCEP in DTT

#### 4.4.2 Spektrofotometrično spremljanje kinetike redukcije DHA pri različnih pH vrednostih v prisotnosti $\text{Cu}^{2+}$ ionov



Slika 23: Hitrost redukcije DHA s TCEP in DTT v kislem in v prisotnosti  $98 \mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  ionov

Da bi preverili, ali bakrovi ioni vplivajo na hitrost redukcije, smo ponovili eksperiment, prikazan na sliki 23, le da smo v kiveto poleg reducenta in DHA dodali še  $\text{Cu}^{2+}$  ione. Iz rezultatov, prikazanih na sliki 17, je razvidno, da dodani  $\text{Cu}^{2+}$  ioni ne vplivajo značilneje na hitrosti redukcije DHA v AA.

#### 4.5 STABILNOST AA IN DHA V REALNIH VZORCIH

#### 4.5.1 Vpliv pH na stabilnost AA in DHA, dodanih v homogenizirane jajčevce

Večino eksperimentov v okviru diplomske naloge smo opravili na modelnih raztopinah, kjer smo imeli popolnoma definirano sestavo. Da bi preverili vpliv pH na stabilnost askorbinske kisline v realnih vzorcih in uspešnost redukcije DHA v kompleksnem matriksu, smo homogenizirali jajčevce v vodi, alikvote homogenata odpipetirali v pufre z različnim pH ter nato v te raztopine dodali znano količino DHA ali AA. Jajčevci kot takšni imajo zelo malo skupnega vitamina C. Mi smo določili vsebnost 4 mg/100 g, kar se sklada s podatki iz literature (preglednica 1). Količina AA ali DHA, ki smo ju dodali v homogenat, je bila petkrat večja. Na ta način smo tudi minimizirali napake zaradi biološke raznolikosti.

Iz rezultatov, prikazanih v preglednici 16, je razvidno, da sama F2 ali MFK, s katerima smo nakisali homogenat jajčevcev, ni stabilizirala dodatka askorbinske kisline, saj brez dodatka reducenta v vzorcih nismo določili nič askorbinske kisline (prva in tretja vrstica - prvi stolpec), enako velja tudi za acetat pH 5 (druga vrstica - prvi stolpec). Če smo v vzorec dodali askorbinsko kislino in nato še reducent, smo v vseh primerih določili več kot 90 % standardnega dodatka askorbinske kisline (vrstica 1 - 3, stolpec 2 - 4), kar pomeni, da se je ta v vseh primerih oksidirala do dehidroaskorbinske kisline. Izkoristek določene askorbinske kisline ni bil odvisen od pH, v katerega smo dodali AA, ali od pogojev redukcije (pH redukcije, vrsta reducenta).

Pri standardnem dodatku DHA brez reducenta nismo določili nič AA (vrstica 4 - 6, stolpec 1). Izkoristki po redukciji določene AA (vrstica 4 - 6, stolpec 2 - 4) so manjši kot pri dodatku AA, kar je zelo verjetno odraz hitrega razpada dela komercialne DHA v vodi (slika 19) med pripravo standardne raztopine. Podobno kot za AA tudi za DHA velja, da izkoristek določene askorbinske kisline ni bil odvisen od pH, v katerega smo dodali AA, ali od pogojev redukcije (vrstica 4 - 6, stolpec 2 - 4).

Preglednica 16: Kromatografsko določena AA po dodatku AA in DHA v homogenizirane jajčevce

Standardni dodatek dodamo v	Standardni dodatek	delež začetne koncentracije (%)			
		MFK	MFK+ TCEP	A5+TCEP	A5+DTT
F2	AA	0%	96%	93%	96%
A5	AA	0%	93%	91%	94%
MFK	AA	0%	95%	95%	95%
F2	DHA	0%	73%	68%	70%
A5	DHA	0%	70%	69%	70%
MFK	DHA	0%	70%	67%	70%

#### 4.5.2 Vpliv pH homogenizacije jajčevcev na stabilnost dodane AA



Pri eksperimentu, opisanem pod točko 4.5.1, smo ugotovili, da MFK ne more stabilizirati standardnega dodatka askorbinske kisline v jajčevcih, ki jih homogeniziramo v vodi. Zato smo se odločili, da bomo preverili, kako pomembno je za stabilnost askorbinske kisline, da jajčevce homogeniziramo v MFK. Iz rezultatov v preglednici 17 je razvidno, da je to ključno za stabilizacijo naknadno dodane askorbinske kisline. Ko smo jajčevce homogenizirali v metafosforni kislini in naknadno dodali askorbinsko kislino, smo določili 88 % dodane AA. Dodatek reducenta ni bistveno vplival na vsebnost AA (89 %), kar pomeni, da je praktično ves vitamin C ostal v reducirani obliki. V ponovitvi dela eksperimenta, prikazanega pod točko 4.5.2 (drugi stolpec v preglednici 17), ko smo vzorec homogenizirali v vodi in šele nato dodali MFK, smo dobili podobne rezultate. Za razliko od prejšnjega eksperimenta, ko brez reducenta nismo določili nič AA, smo zdaj določili 18 %. Kljub temu pa lahko trdimo, da samo nakisanje z MFK pred dodatkom AA, ne da bi tudi sam vzorec homogenizirali v tem mediju, ni dovolj za stabilizacijo askorbinske kisline.

Preglednica 17: Vpliv pH, pri katerem izvajamo homogenizacijo, na stabilnost standardnega dodatka AA v prisotnosti MFK

homogenizacija jajčevcev	standardni dodatek	delež začetne koncentracije AA (%)	
		redukcija v MFK	redukcija v MFK + TCEP
voda	AA	18	89
MFK	DHA	88	89

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Ugotovili smo, da je AA najbolj obstojna v metafosfori kislini, ki prepreči oksidacijo AA tudi v prisotnosti  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{3+}$ , ki kot dobri oksidanti vplivajo na nestabilnost askorbinske kisline v vodnih raztopinah (Chung in sod., 2001). Z uporabo metafosforne kisline se je tudi v prisotnosti omenjenih ionov po enem dnevu ohranilo 95 % AA.

Askorbinsko kislino so v prisotnosti redoks aktivnih ionov relativno dobro stabilizirali tudi citratni ioni, saj smo tako pri pH 3 kot pri pH 5 ugotovili, da ta razpada počasneje kot v primeru glicinskega in acetatnega pufra z enakim pH. Stabilizacija s citratom je najverjetneje posledica tvorbe kelatnih kompleksov med  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{3+}$  ionov in citratom, kar ima za posledico manjšo koncentracijo prostih ionov v raztopini (Belitz in Grosch, 1999).

Zanimive rezultate smo dobili tudi v primeru, ko smo AA raztopili v MQ vodi. V odsotnosti dodanih redoks aktivnih ionov je bila ta zelo stabilna, toda že v primeru majhnega dodatka bakrovih ionov, je izredno hitro razpadla. Tega ne moremo pripisati spremembi pH zaradi dodanih soli ( $\text{CuSO}_4$  in  $\text{FeCl}_3$ ), ki so pH zagotovo še znižale, ampak najverjetneje večji koncentraciji prostih redoks aktivnih ionov, saj ni prišlo do tvorbe kompleksov.

Dodani  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{3+}$  ioni so v vseh primerih pospešili oksidacijo AA. Hitrost je bila koncentracijsko odvisna, saj se je pri večji koncentraciji  $\text{Cu}^{2+}$  ionov AA hitreje razgrajevala.

Stabilnost dehidroaskorbinske kisline smo preverjali v raztopinah z različnimi pH vrednostmi. Potrdili smo ugotovitve nekaterih drugih avtorjev (Koshiishi in sod., 1998a in Koshiishi in sod., 1998b), da je dehidroaskorbinska kislina zelo nestabilna v alkalnem. Ko smo jo raztopili v 0,1 M NaOH, je DHA skoraj trenutno razpadala. Prišlo je do odprtja laktonskega obroča in pretvorbe DHA v 2,3-diketogulonat. Tudi v rahlo kislem pri pH 6 (fosfat), je bila hitrost razgradnje večja kot v kisli raztopini s pH 2 (fosfat), kjer je po enem dnevu preostalo več DHA. Podobno so ob prisotnosti bikarbonata v nevtralnem pH odkrili tudi (Koshiishi in sod., 1998a in Koshiishi in sod., 1998b).

Kljub relativno boljši stabilnosti v okviru enega dne smo v kislih raztopinah s pH  $\approx 2$  opazili, da del DHA zelo hitro razpade (preglednica 11). Hiter razpad DHA v nam dosegljivi literaturi še ni opisan, saj večina avtorjem trdi, da je DHA v kislem bolj stabilna, kar smo potrdili tudi mi, a le če zanemarimo prvih nekaj minut.

Ko smo pojav podrobneje raziskali, smo ugotovili, da je delež DHA, ki razpade v hitri fazi, večji v bolj kislih raztopinah. Zaradi hitre kinetike je bilo izredno težko pripraviti vzorec DHA. Če smo hoteli zagotoviti dobro primerljivost rezultatov in kvantitativno delo, smo morali DHA raztopiti v vodi in nato alikvote čim hitreje odpipetirati v raztopine z ustreznim pH.

V okviru omenjenega eksperimenta (slika 18 in slika 19) smo poleg vpliva pH na razpad DHA preverjali tudi ustreznost spektrofotometrične metode določanja z redukcijo iz DHA nastale AA. Iz dobre primerljivosti kromatografsko določenih izkoristkov (preglednica 12) z direktno spektrofotometrično metodo lahko sklepamo, da je slednja primerna tudi za kvantitativno delo, a le pri večji koncentraciji nastale AA. Razlog za to je najverjetneje večji signal ozadja, ki ga s kromatografsko metodo lahko ustrezno znižamo.

Da bi preverili, ali poteka hiter razpad DHA tudi v vodi, smo izvedli poskus, kjer smo DHA raztopili v ustreznih pufrih in vodi ter nato spremljali stabilnost v omenjenih raztopinah (slika 19 in preglednica 13). Še enkrat se je izkazalo, da je delež preostale DHA, ki jo lahko reduciramo v AA, sorazmeren s pH raztopine. Tako smo v 0,1 HCl po dveh urah določili slabo polovico začetne koncentracije DHA, v citratu pH 3 dve tretjini, v acetatnem pufru pH 5 pa 90 %.

DHA, katere stabilnost smo študirali, je bila komercialno dosegljiva in naj bi bila v suhem stanju v obliki dimera (Deutsch, 2000). Ker je DHA v vodnih raztopinah pretežno v monomerni obliki (Deutsch, 2000), je faza hidratacije vključevala tudi tvorbo monomerne oblike. Hitra faza razgradnje DHA, ki je potekala v kislem, bi bila lahko posledica vpliva pH na hidratacijo DHA in tvorbo monomerne oblike ali nestabilnosti monomerne oblike kot take.

Na osnovi eksperimenta, kjer smo DHA raztopili v acetatu pH 5 in nato takoj nakisali na pH 1 (slika 20), lahko predvidevamo, da ima pH vpliv na hidratacijo in tvorbo monomerne oblike. Ugotovili smo namreč, da je tako pripravljena DHA zelo stabilna in ne opazimo hitre faze razgradnje. Če bi bila hitra faza odvisna od stabilnosti monomerne oblike pri določenem pH, bi morali najverjetneje opaziti enako hitro fazo kot v primeru, ko smo DHA raztopili direktno v pufru s pH 1.

To hipotezo smo delno potrdili tudi z eksperimentom, v katerem smo DHA pripravili iz AA z encimom askorbat-oksidadzo. V tem primeru je kot rezultat encimsko katalizirane reakcije nastala monomerna DHA. Ko smo tako pripravljeno DHA nakisali na pH 2 in pri teh pogojih izvedli redukcijo, smo določili praktično vso začetno koncentracijo AA (preglednica 15), kar pomeni, da ni praktično nič DHA razpadlo. Slabše izkoristke redukcije DHA v AA pri nevtralnem pH lahko najverjetneje prišemo pomanjkljivi eksperimentalni izvedbi, saj smo v raztopino dodajali koncentriran NaOH in je lahko lokalno prišlo do trenutne hidrolize DHA v 2,3-diketogulonat (Koshiishi in sod., 1998a in Koshiishi in sod., 1998b).

Eden od ciljev naloge je bil preveriti, ali lahko reducent TCEP uporabimo za redukcijo DHA v AA tudi v raztopinah s pH 2 ali manj. Znano je, da TCEP učinkovito reducira disulfidne vezi pri pH do 1,5 (Getz in sod., 1999), a za redukcijo DHA v AA, je v literaturi opisana le redukcija pri pH 4,3 ali več (Lykkelsfeldt, 2000). S kromatografsko analizo koncentracije AA, nastale z redukcijo iz DHA (slika 21), smo ugotovili, da je TCEP enako učinkovit v fosfatnem pufru pH 2 in MFK kot v fosfatnem pufru pH 6.

Za uporabnost reducenta je poleg izkoristka zelo pomembna tudi kinetika same redukcije. Prepočasna redukcija kljub dobrim izkoristkom po daljših časih ni primerna za praktično eksperimentalno delo. Primerjava hitrosti redukcije DHA v AA (slika 16) razkrije, da ta s

pH pada, a je redukcija v MFK ter v fosfatu pH 2 kljub temu končana praktično v eni uri, kar je s stališča analize realnih vzorcev še sprejemljivo. Največje hitrosti redukcije smo ugotovili za reducent DTT pri pH 6, vendar je ta pri pH 4 zaradi velikega zmanjšanja hitrosti redukcije praktično že neuporaben. Dodatek bakrovih ionov v raztopino, v kateri smo izvajali redukcijo, ni značilno vplival na hitrost redukcije.

Izsledke, ki smo jih dobili na modelnih raztopinah, smo preverili tudi na realnem vzorcu. Izbrali smo jajčevce, ki imajo malo lastne askorbinske kisline. V pripravljen homogenat jajčevcev smo dodali znane količine AA in DHA ter spremljali stabilnost standardnih dodatkov. Ugotovili smo, da je za stabilizacijo askorbinske kisline nujno potrebno že sam vzorec homogenizirati v metafosforni kislini, saj je bila AA nestabilna, če smo jo dodali v homogenat, ki smo ga šele naknadno nakisali (preglednica 17). Razlog za to je najverjetneje tvorba reaktivnih kinonov iz polifenolov (Belitz in Grosch, 1999), do katere pride, če z nizkim pH ne denaturiramo polifenol-oksidad. Nastale kinone nato AA reducira nazaj v polifenole in se pri tem oksidira do DHA. Nastala DHA je stabilna v raztopini, saj smo v vseh primerih po dodatku reducenta določili več kot 90 % dodatka AA. pH redukcije in izbor reducenta ni bistveno vplival na izkoristke, kar smo predhodno ugotovili že pri modelnih raztopinah.

## 5.2 SKLEPI

Na osnovi opravljenega dela lahko povzamemo naslednje sklepe:

- Askorbinska kislina je najbolj obstojna v metafosforni kislini, ki zelo upočasnjuje oksidacijo askorbinske kisline tudi v prisotnosti  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{3+}$  ionov.
- V kislem pH oksidacijo askorbinske kisline s  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{3+}$  kot dober kompleksant upočasnjuje tudi citrat.
- Z višanjem pH se zmanjšuje stabilnost raztopljene dehidroaskorbinske kisline. V močno alkalnem pH DHA trenutno razpade.
- Raztopljena monomerna dehidroaskorbinska kislina je najbolj stabilna v raztopinah s pH 2 in manj.
- Komercialno dostopna dimerna dehidroaskorbinska kislina je pri raztapljanju v kisljih raztopinah nestabilna. V nekaj minutah po raztapljanju v raztopinah, kjer je pH nižji od 5, se velik delež dimerne oblike pretvori v produkte, ki jih z redukcijo ne moremo pretvoriti v askorbinsko kislino.
- Nestabilnost dimerne dehidroaskorbinske kisline v kislem je najverjetneje posledica razlik v tvorbi monomerne DHA pri različnih pH vrednostih.
- Z encimsko oksidacijo pripravljena DHA v kisljih raztopinah ne razpada.
- Hitrost redukcije dehidroaskorbinske v askorbinsko kislino se zmanjšuje z nižanjem pH.
- TCEP je boljši reducent kot DTT pri nizkem pH, saj je hitrost redukcije s TCEP pri pH 2 večja kot z DTT pri pH 4.
- Izkoristki redukcije dehidroaskorbinske kisline v askorbinsko kislino pri pH 2 s TCEP so primerljivi z izkoristki redukcije pri višjih pH vrednostih tako v modelnih raztopinah kot tudi pri realnih vzorcih (jajčevci).
- Če jajčevcev ne homogeniziramo v kislji raztopini (metafosforna kislina), kljub naknadnemu nakisanju homogenata, dodana askorbinska kislina ni stabilna in se oksidira v dehidroaskorbinsko kislino.

## 6 POVZETEK

V okviru diplomskega dela smo študirali stabilnost askorbinske kisline in dehidroaskorbinske kisline v vodnih raztopinah. Preverjali smo tudi učinkovitost reducenta TCEP za redukcijo DHA v AA.

Stabilnost askorbinske kisline v vodnih raztopinah smo spremljali spektrofotometrično pri 250 nm, saj je pri tej valovni dolžini molarni absorpcijski koeficient AA v celotnem območju pH, kjer smo določali stabilnost, enak. Askorbinska kislina je v odsotnosti dodanih redoks aktivnih ionov stabilna v metafosforni kislini, miliQ vodi, glicinskem pufri pH 3 ter citratnih pufrih pH 3 in pH 5. Po dveh dneh shranjevanja se vsebnost askorbinske kisline opazno zniža v acetatu pH 4, fosfatu pH 2, acetatu pH 5 in fosfatu pH 6, kjer je najmanj stabilna.

Dodatek 9,8  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  ionov je še dodatno pospešil oksidacijo askorbinske kisline. V primerjavi s poizkusom brez dodatka  $\text{Cu}^{2+}$  ionov se je hitrost oksidacije najbolj povečala v miliQ vodi. Več kot 50 % DHA je po enem dnevu ostalo le v MFK in citratu pH 3. Pri desetkratnem povečanju koncentracije  $\text{Cu}^{2+}$  ionov na 98  $\mu\text{M}$  se je hitrost oksidacije ustrezno povečala. V vseh pufrih, razen v MFK, kjer je po enem dnevu ostalo 95 % askorbinske kisline, se je razgradilo 90 ali več odstotkov AA. Tudi 98  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$  ioni so imeli podoben učinek kot 98  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  ioni, saj so bile hitrosti oksidacije podobne. Razlike smo opazili le pri višjih pH vrednostih, kjer je bila oksidacija v prisotnosti  $\text{Fe}^{3+}$  ionov relativno počasnejša.

Pri komercialno dostopni DHA smo opazili dva procesa, ki vplivata na izkoristek z redukcijo določene AA. V skladu s podatki iz literature smo ugotovili, da je raztopljen DHA bolj stabilna v kislem. V raztopini s pH blizu nevtralnega se koncentracija DHA po enem dnevu zniža na tretjino, medtem ko se v zelo bazičnem pH (13) DHA zelo hitro pretvori v 2,3-diketogulonat, ki ga ne moremo reducirati v AA.

Drug proces, ki je povezan z ireverzibilnimi pretvorbami DHA, poteka v kislih raztopinah. Če trdno, dimerno DHA raztopimo v acetatnem pufri pH 5, je ta relativno stabilna. Pri nižjih pH vrednostih ob raztapljanju in hidrataciji dimerne DHA potekajo reakcije, ki omogočajo pretvorbo DHA v produkte, ki jih ne moremo reducirati v askorbinsko kislino. Delež teh produktov znaša v raztapljanju pri pH 2 ali manj več kot 50 %.

Tako stabilnost AA kot DHA v vodnih raztopinah smo spremljali spektrofotometrično. Ustreznost direktne spektrofotometrične metode merjenja absorbance pri 250 nm smo preverili s kromatografsko analizo. Obe metodi dajeta primerljive rezultate. Do odstopanja obeh metod pride le pri manjših koncentracijah DHA, kjer pri direktni spektrofotometrični analizi komponente pufru in reducenti prispevajo k večji napaki meritve.

Reducent TCEP, ki se vse bolj uveljavlja kot alternativa že uveljavljenim reducentom, kot so DTT, glutation in 2-merkaptetanol, smo testirali pri zelo nizkem pH. Ugotovili smo, da je TCEP učinkovit reducent v primeru pretvorbe DHA v AA, tako s stališča izkoristkov kot tudi kinetike same redukcije. Izkoristki redukcije pri pH 2 so popolnoma enaki izkoristkom

redukcije pri višjih pH vrednostih. Kinetika je resda počasnejša, vendar je proces še vedno končan v eni uri, kar je še sprejemljivo s stališča praktične uporabe.

Reducent TCEP je bil učinkovit tudi, ko smo izvedli eksperimente z jajčevci. Izkoristki redukcije so bili enaki ne glede na to, ali smo redukcijo s TCEP izvajali pri pH 5 ali pH 2. Tudi primerjava z reducentom DTT pri pH 6 je razkrila, da večjih razlik v izkoristkih redukcije ni.

Za stabilizacijo askorbinske kisline je nujno potrebno, da celotno homogenizacijo izvedemo v kislem mediju (metafosforni kislini), saj ni dovolj, da pH znižamo po homogenizaciji. Če smo dodali askorbinsko kislino v homogenat, pripravljen v vodi in naknadno nakisan z MFK, ni do analize na HPLC sistemu preostalo nič askorbinske kisline. Razlog za to je najverjetneje v encimsko katalizirani tvorbi reaktivnih kinonov iz polifenolov, ki dodano AA oksidirajo tudi v prisotnosti metafosforne kisline.

V diplomskem delu so predstavljeni rezultati različnih eksperimentov, povezanih tako z askorbinsko kot tudi z dehidroaskorbinsko kislino. Čeprav v večini primerov zaradi manjšega števila ponovitev eksperimentov ne moremo popolnoma kvantitativno ovrednotiti vseh pridobljenih podatkov, smo pridobili pomembne informacije o uporabnosti reducenta TCEP pri nizkem pH, ki je optimalen glede stabilnosti obeh oblik vitamina C. Pridobili smo tudi podatke o stabilnosti dimerne DHA v odvisnosti od pH. Ker v literaturi o omenjeni problematiki še ni ustreznih podatkov, predstavljajo rezultati diplomske naloge dobro osnovo za bolj poglobljen študij.

## 7 VIRI

- Belitz H.D., Grosch W. 1999. Food chemistry. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Springer: 391-392.
- Bode M.A., Cunningham L., Rose R. 1990. Spontaneous decay of oxidized ascorbic acid (dehydro-L-ascorbic acid) evaluated by high pressure liquid chromatography. *Clinical Chemistry*, 36: 1807-1809.
- Cioffi N., Losito H., Terzano R., Zambonin G. C. 2000. An electrospray ionization trap-mass spectrometric (ESI-MS-MS<sup>n</sup>) study of dehydroascorbic acid hydrolysis at neutral pH. *Analyst*, 125: 2244-2248.
- Chung Y.W., Chung K.O.J., Szeto T.Y., Tomlinson B., Benzie F.F.I. H.R. 2001. Plasma ascorbic acid: measurement, stability and clinical utility revisited. *Clinical Biochemistry* 34: 623-627.
- Davey W.M., Montagu M.V., Inze D., Sanmartin M., Kanelis A. Smirnoff N., Bejzie JJ I., Strain J.J., Favell D., Fletcher J. 2000. Plant l-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 825-860.
- Deutsch J.C. 1998. Spontaneous hydrolysis and dehydration of dehydroascorbic acid in aqueous solution. *Analytical Biochemistry*, 260: 223-229.
- Deutsch J.C., Santosh-Kumar C.R. 1996. Dehydroascorbic acid undergoes hydrolysis on solubilization which can be reversed with mercaptoethanol. *Journal of Chromatography A*, 724: 271-278.
- Deutsch J.C. 2000. Dehydroascorbic acid. *Journal of Chromatography A*, 881: 299-307.
- Farooqui M.I., Anwar J., Khan A., Ali R.M., Mahmood R. 1990. A new sensitive method for the microdetermination of ascorbic acid. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 12: 333-336.
- Farver O., Wherland S., Pecht I. 1994. Intramolecular electron transfer in ascorbate oxidase is enhanced in the presence of oxygen. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 22933-22936.
- Getz B. E., Xiao M., Chakrabarty T., Cooke R., Selvin P. 1999. A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. *Analytical Biochemistry*, 27: 70-80.
- Gibbons E., Allwood M.C., Neal T., Hardy G. 2001. Degradation of dehydroascorbic acid in parenteral nutrition mixtures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25: 605-611.



Gökmen V., Kahraman N., Demir N., Acar J. 2000. Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 881: 309-316

Green A. M., Fry C. S. 2005. Vitamin C degradation in plants via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature*, 433:83-87.

Imer F., Sonmezoglu I.C., Kozcaz M. 2003. The role of buffers on the kinetics of l-ascorbic acid oxidation catalyzed by copper (II). *Italian Journal of Food Science*, 15: 521-529.

Jansson P.J., Jung H.R., Lindqvist C., Nordström T. 2004. Oxidative decomposition of vitamin C in drinking water. *Free Radical Research*, 38: 855-860.

Jungbluth A., Kolloch M., Marx F. Pfeilsticker K. 1997. Initial steps of the metal-catalysed degradation of L-dehydroascorbic acid in acid aqueous solutions. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*, 204: 215-220.

Koshiishi I., Mamura Y., Liu J., Imanari T 1998a. Bicarbonate promotes s cleavage of lactone ring of dehydroascorbate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1379: 257-263.

Koshiishi I., Mamura Y., Liu J., Imanari T 1998b. Degradation of dehydroascorbate to 2,3-diketogulonate in blood circulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1425: 209-214.

Kurata T., Nishikawa Y. 2000. Chemical characteristics of dehydroascorbic acid. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64: 1651-1655.

Lykkesfeldt J. 2000. Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples by high-performance liquid chromatography using subtraction methods: reliable reduction with tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride. *Analytical Biochemistry*, 282: 89-93.

Mahan K.L., Escott-Stump S. 2004. Krause's food, nutrition and diet therapy. 11<sup>th</sup> ed. New York, Saunders: 1321 str.

Musulini R.R., King C.G. 1936. Metaphosphoric acid in the extraction and titration of vitamin C. *Journal of Biological Chemistry*, 116: 409-413.

Nisperos-Carriedo M.O., Buslig B.S., Shaw P.E., 1992. Simultaneous detection of dehydroascorbic, ascorbic, and some organic acids in fruits and vegetables by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1127-1130.

Pastore P, Rizzetto T., Curcuruto O., Dal Cin M., Zaramella A., Marton D. 2001. Characterization of dehydroascorbic acid solutions by liquid chromatography /mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15: 2051-2057.

Penny J.R. in Zilva S. S. 1943. The chemical behaviour of dehydro-*l*-ascorbic acid *in vitro* and *in vivo*. *Biochemical Journal*, 37: 403–417.

Wechtersbach L. 2005. Stabilnost polarnih in nepolarnih antioksidantov v kompleksnem matriksu. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 69 str.

Wilson X.J. 2002. The physiological role of dehydroascorbic acid. *FEBS Letters*, 527: 5-9.