

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Špela ZORMAN

**HIDRATACIJA DIMERNE DEHIDROASKORBINSKE KISLINE V
KISLEM pH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**HIDRATATION OF DIMERIC DEHYDROASCORBIC ACID AT ACID
pH**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

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 doc. dr. Leo Pogačnik.

Mentor: doc. dr. Blaž Cigić

Recenzentka: doc. dr. Lea Pogačnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Špela Zorman

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 577.164.2 : 544.431 (043) = 863
KG vitamin C /askorbinska kislina / dimerna dehidroaskorbinska kislina / redukcija / oksidacija / tris(2-karboksietil)fosfin (TCEP) / nastanek različnih zvrsti / hidracija
AV ZORMAN, Špela
SA CIGIČ, Blaž (mentor) / POGAČNIK, Lea (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2008
IN HIDRACIJA DIMERNE DEHIDROASKORBINSKE KISLINE V KISLEM pH
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 55 s., 3 pregl., 36 slik, 51 vir.
IJ sl
JI sl / en
AI V diplomskem delu je bila raziskana hidracija dimerne dehidroaskorbinske kisline (DHA). Le-ta pri pH 2 poteka drugače kot pri pH 5. Pri višjem pH nastane med hidracijo le monomerna DHA, medtem ko pri pH 2 nastane še najmanj 5 različnih zvrsti, ki jih je mogoče detektirati s HPLC sistemom. Od šestih identificiranih spojin je le ena kinetično stabilna. Koncentracija te spojine se povečuje med staranjem ostalih izoliranih spojin. Nekatere izolirane spojine se med inkubacijo delno pretvarjajo tudi v monomerno DHA. Po dodatku reducenta v raztopino dimerne DHA določimo več askorbinske kisline pri pH 5 kot pri nižjih pH-jih. Kljub manjšim izkoristkom pri nižjih pH vrednostih, se tu, za razliko od pH 5, tvori največ askorbinske kisline skozi daljše časovno obdobje. Hidracija dimerne DHA, ki smo jo sami sintetizirali, v kislem poteka enako kot hidracija komercialno dosegljive spojine.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 577.164.2 : 544.431 (043) = 863
CX vitamin C / ascorbic acid / dimeric dehydroascorbic acid / reduction / oxydation / tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) / formation of other species / hidratation
AU ZORMAN, Špela
AA CIGIĆ, Blaž (supervisor) / POGAČNIK, Lea (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2008
TI HYDRATATION OF DIMERIC DEHYDROASCORBIC ACID AT ACID pH
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 55 p., 3 tab., 36 fig., 51 ref.
LA sl
AL sl / en
AB Dimeric dehydroascorbic acid is hydrated at pH 2 differently than at pH 5. At higher pH only monomeric dehydroascorbic acid is formed, whereas at pH 2 at least five different other species are formed and can be detected by HPLC. Only one of the six identified compounds is kinetically stable. Concentration of this compound is steadily increasing during the ageing of other isolated substances. Some of the isolated compounds are partially transforming also into the monomeric dehydroascorbic acid. More ascorbic acid is determined at pH 5 than at lower pH values, when reducing agent is added to the solution of dimeric dehydroascorbic acid. Despite lower yields at more acidic solution, concentration of ascorbic acid is increasing over longer period compared to pH 5, where more ascorbic acid is formed. Synthesized dimeric dehydroascorbic acid is hydrated at acidic pH in the same way as commercially available substance.

KAZALO VSEBINE

KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 VITAMIN C.....	3
2.1.1 Vitamin C v živilih.....	3
2.1.2 Prehranski pomen vitamina C.....	3
2.2 ASKORBINSKA KISLINA.....	4
2.2.1 Nomenklatura	4
2.2.2 Stabilnost AA	4
2.2.3 Funkcije AA	5
2.2.4 AA kot dodatek živilom.....	6
2.3 DEHIDROASKORBINSKA KISLINA	7
2.3.1 Nomenklatura	7
2.3.2 Dimerna DHA	7
2.3.3 Stabilnost monomerne DHA.....	9
2.3.4 Priprava dimerne DHA iz AA	10
2.3.5 Redukcija DHA v AA	11
2.3.6 Razpad DHA v DKG	12
2.4 ANALITIKA ASKORBINSKE IN DEHIDROASKORBINSKE KISLINE	15
2.4.1 Spektrofotometrično določanje AA in DHA v UV območju.....	15
2.4.2 Kromatografsko določanje AA in DHA.....	15
3 MATERIALI IN METODE.....	16
3.1 MATERIALI	16
3.2 METODE DELA.....	16
3.2.1 Stabilnost DHA	16
3.2.1.1 Preliminarni študij stabilnosti komercialno dostopne dimerne DHA	16
3.2.1.2 Raztapljanje komercialno dostopne DHA v 5 mM H ₂ SO ₄ in študij stabilnosti tako pripravljene DHA v 5 mM H ₂ SO ₄ in acetatnem pufru pH 5.....	16
3.2.2 Vpliv koncentracije dimerne DHA na raztapljanje.....	17
3.2.3 Spektrofotometrično določanje AA, ki jo pripravimo z dodatkom reducenta TCEP v raztopine dimerne DHA.....	17
3.2.4 Preparativna kromatografija in analiza pretvorb spojin, ki nastanejo pri hidrataciji dimerne DHA.....	18
3.2.4.1 Preparativna kromatografija in analiza pretvorb spojin brez dodanega reducenta	18
3.2.4.2 Preparativna kromatografija in analiza pretvorb spojin z dodanim reducentom	18
3.2.5 Raztapljanje dimerne DHA pri različnih pH vrednostih in redukcija v AA po dodatku TCEP	19
3.2.6 Raztapljanje dimerne DHA v DMSO in metanolu z majhno vsebnostjo vode.....	19
3.2.7 Sinteza in analiza dimerne DHA v organskih topilih	20
3.2.7.1 Sinteza dimerne DHA v organskih topilih.....	20
3.2.7.2 Raztapljanje sintetizirane dimerne DHA v MFK, redukcija v AA po dodatku TCEP in spektrofotometrična določitev AA	21

3.2.7.3	Raztapljanje sintetizirane dimerne DHA v MFK, redukcija v AA po dodatku TCEP in kromatografska določitev AA	21
3.2.7.4	Raztapljanje sintetizirane dimerne DHA pri različnih pH vrednostih in kromatografska analiza nastalih zvrsti	21
3.2.8	Določevanje vsebnosti AA na HPLC sistemu	22
4	REZULTATI	24
4.1	STABILNOST DHA	24
4.1.1	Preliminarni študij stabilnosti komercialno dostopne DHA	24
4.1.2	Raztapljanje komercialno dostopne DHA v 5 mM H ₂ SO ₄ in študij stabilnosti tako pripravljene DHA v 5 mM H ₂ SO ₄ in acetatnem pufri pH 5	28
4.2	VPLIV KONCENTRACIJE DIMERNE DHA NA RAZTAPLJANJE	30
4.3	SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE AA, KI JO PRIPRAVIMO Z DODATKOM REDUCENTA TCEP V RAZTOPINE DIMERNE DHA	32
4.4	PREPARATIVNA KROMATOGRAFIJA IN ANALIZA PRETVORB SPOJIN, KI NASTANEJO PRI HIDRACIJI DIMERNE DHA	33
4.4.1	Preparativna kromatografija in analiza pretvorb spojin brez dodanega reducenta	33
4.4.2	Preparativna kromatografija in analiza pretvorb izoliranih spojin v AA po dodatku reducenta TCEP	38
4.4.2.1	Kinetika nastajanja AA po dodatku reducenta v izolirane spojine iz vrha 1, vrha 2, vrha 4, vrha 5 in DHA	38
4.5	RAZTAPLJANJE DIMERNE DHA PRI RAZLIČNIH pH VREDNOSTIH IN REDUKCIJA V AA PO DODATKU TCEP	40
4.6	RAZTAPLJANJE DIMERNE DHA V METANOLU IN DIMETILSULFOKSIDU	42
4.7	KARAKTERIZACIJA SINTEZIRANE DIMERNE DHA	44
4.7.1	Hidracija sintetizirane dimerne DHA v kislem in naknadna redukcija do AA	44
4.7.2	Kromatografska analiza sintetizirane dimerne DHA, raztopljen v MFK in v acetatnem pufri pH 5	44
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	46
5.1	RAZPRAVA	46
5.2	SKLEPI	50
6	POVZETEK	51
7	VIRI	52
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vsebnost vitamina C (mg/100 g) v nekaterem sadju in zelenjavi (Vanderslice in sod., 1990)	3
Preglednica 2: Priprava točk za umeritveno krivuljo	23
Preglednica 3: Kinetika nastajanja AA po dodatku reducenta TCEP v izolirane spojine iz vrha 1, vrha 4, vrha 5 in DHA	39

KAZALO SLIK

Slika 1: L-AA (Klofutar in sod., 1998)	4
Slika 2: Funkcije vitamina C (Levine in sod., 1999).....	5
Slika 3: Struktura DHA (Deutsch, 2000)	7
Slika 4: Dimerna struktura DHA v dehidrirani obliki (Deutsch, 2000)	8
Slika 5: Različne oblike DHA: oznaka a prikazuje dvojno simetrijo dimerne oblike, oznaka b prikazuje γ -laktonski obroč, oznaka c prikazuje furanozni obroč (Hvoslef in sod., 1979)	9
Slika 6: Struktura DHA, ki nastane pri oksidaciji AA v metanolu (2-metil hemiketalna oblika) (Tsigoulis in sod., 2004).....	11
Slika 7: Mehanizem redukcije DHA v AA s TCEP (Lykkesfeldt, 2000).....	11
Slika 8: Razpad DHA v 2,3-diketogulonat (Gibbons in sod., 2001).....	12
Slika 9: Razgradnja AA in DHA v vodnih raztopinah (Nishikawa in sod., 2001).....	13
Slika 10: Kinetične konstante, ki opisujejo pretvorbo AA in DHA (Serpen in Gokmen, 2007).....	14
Slika 11: Umeritvena krivulja za kromatografsko določitev AA	23
Slika 12: Elucijski diagram, ki je rezultat nanosa dimerne DHA v različnem časovnem obdobju po raztapljanju v 5 mM H ₂ SO ₄ , merjeno pri pretoku 2 mL/min in absorbanči 200 nm.....	25
Slika 13: Elucijski diagram, ki je rezultat nanosa dimerne DHA v različnem časovnem obdobju po raztapljanju v 5 mM H ₂ SO ₄ , merjeno na RI detektorju.....	26
Slika 14: Kromatografsko določanje dimerne DHA v 5 mM H ₂ SO ₄ v prvih dveh urah po raztapljanju (A) in v daljšem časovnem intervalu (B), merjeno z UV detektorjem pri pretoku 2 mL/min.....	27
Slika 15a: Rezultati kromatografske analize v 5 mM H ₂ SO ₄ raztopljene dimerne DHA po določenih časih inkubacije	28
Slika 15b Rezultati kromatografske analize v 5 mM H ₂ SO ₄ raztopljene dimerne DHA, ki smo jo po 20 minutah prenesli v raztopino s pH 5, po določenih časih inkubacije.....	29
Slika 16: Rezultati kromatografske analize v 5 mM H ₂ SO ₄ raztopljene dimerne DHA s koncentracijo 5 mg/L po določenih časih inkubacije	30

Slika 17: Rezultati kromatografske analize v 5 mM H ₂ SO ₄ raztopljene dimerne DHA s koncentracijo 2 mg/L po določenih časih inkubacije	31
Slika 18: Rezultati kromatografske analize v 5 mM H ₂ SO ₄ raztopljene dimerne DHA s koncentracijo 0,5 mg/L po določenih časih inkubacije	31
Slika 19: Delež AA, pridobljene z redukcijo DHA, po različnih časih hidracije dimerne DHA v 0,1 M HCl, 5 mM H ₂ SO ₄ , fosfatnem pufru pH 2, citratnem pufru pH 2,8, miliQ vodi in acetatnem pufru pH 5.....	32
Slika 20: Rezultati kromatografske analize frakcije, ki se izloči kot vrh 6 po enem dnevu od raztapljanja dimerne DHA v kisli raztopini.....	33
Slika 21: Rezultati kromatografske analize frakcije, ki se izloči kot vrh 5, po različnih časih inkubacije	34
Slika 22: Deleži posameznih spojin, ki nastanejo iz spojine eluirane v vrhu 5, določeni po različnih časih inkubacije	34
Slika 23: Rezultati kromatografske analize frakcije, ki se izloči kot vrh 4, po različnih časih inkubacije	35
Slika 24: Deleži posameznih spojin, ki nastanejo iz spojine eluirane v vrhu 4, določeni po različnih časih inkubacije	35
Slika 25: Rezultati kromatografske analize frakcije, ki se izloči kot vrh 2, po različnih časih inkubacije	36
Slika 26: Deleži posameznih spojin, ki nastanejo iz spojine eluirane v vrhu 2, določeni po različnih časih inkubacije	36
Slika 27: Rezultati kromatografske analize frakcije, ki se izloči kot DHA, po različnih časih inkubacije	37
Slika 28: Deleži posameznih spojin, ki nastanejo iz DHA, določeni po različnih časih inkubacije	37
Slika 29: Rezultati kromatografske analize frakcije, ki se izloči kot vrh 1, po različnih časih inkubacije	38
Slika 30: Kinetika tvorbe AA po dodatku reducenta TCEP v raztopine dimerne DHA pri različnih pH vrednostih	40
Slika 31: Delež prirasta AA z redukcijo DHA v različnih pufrih	41
Slika 32: Delež z redukcijo DHA pridobljene AA po različnih časih hidracije dimerne DHA v DMSO, redukcija je bili izvedena v MFK in acetatnem pufru pH 5 ter merjena na spektrofotometru pri 260 nm	42

- Slika 33: Delež z redukcijo DHA pridobljene AA po različnih časih hidracije dimerne DHA v metanolu, redukcija je bili izvedena v MFK in acetatnem pufu pH 5 ter merjena na spektrofotometru pri 260 nm 43
- Slika 34: Delež z redukcijo DHA pridobljene AA po različnih časih hidracije sintetizirane dimerne DHA v MFK, kjer je bila redukcija izvedena v acetatnem pufu pH 5 in merjena na spektrofotometru pri 260 nm 44
- Slika 35: Elucijski diagram, ki je rezultat nanosa sintetizirane dimerne DHA 60 minut po raztapljanju v 2 % MFK, acetatnem pufu pH 5 in samega acetatnega pufra, pri pretoku 1 mL/min in absorbanci 200 nm 45

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AA	askorbinska kislina
A5	acetani pufer pH 5
C 2,2	citratni pufer pH 2,2
C 2,4	citratni pufer pH 2,4
C 2,6	citratni pufer pH 2,6
C 2,8	citratni pufer pH 2,8
C 3	citratni pufer pH 3
C 3,2	citratni pufer pH 3,2
C 4	citratni pufer pH 4
C 5	citratni pufer pH 5
CA	celulozni acetat
DHA	dehidroaskorbinska kislina
DKG	2,3-diketogulonska kislina
DTT	dithiotreitol
DMSO	dimetilsulfoksid
F 2	fosfatni pufer pH 2
F 2,2	fosfatni pufer pH 2,2
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija
MFK	metafosforna kislina
MQ	miliQ (milipore) voda
TCEP	tris(2-karboksietil)fosfin

1 UVOD

L-askorbinska kislina (AA) je vodotopni vitamin, ki se v območju rahlo kislega do nevtralnega pH ob prisotnosti raztopljenega kisika, temperature, svetlobe, askorbat oksidaze, kinonov in kovinskih ionov (Cu^{2+} , Fe^{3+}) (Tolbert in sod., 1982; Losito in sod., 1996) hitro oksidira v dehidroaskorbinsko kislino (DHA). Obe obliki se ob zaužitju absorbirata v gastrointestinalnem traktu in se *in vivo* encimsko pretvarjata iz ene oblike v drugo, zato vsota obeh koncentracij v bioloških vzorcih predstavlja totalni vitamin C.

Pri oksidaciji AA v metanolu in prisotnosti aktivnega oglja kot katalizatorja nastane DHA, ki se po odparevanju metanola in termični obdelavi v aprotičnih organskih topilih pretvori v dimerno DHA (Ohmori in sod., 1982). Tako pripravljena DHA, ki je tudi edini komercialno dosegljivi vir DHA, naj bi se po hidraciji v vodnih raztopinah popolnoma pretvorila v monomerno DHA (Hvoslef in sod., 1979). Znano je, da je hidratizirana DHA nestabilna molekula, ki se v reakcijah enolizacije, odpiranja laktonskega obroča in adicije ter eliminacije vode pretvarja v mnogo različnih spojin (Jungbluth in sod., 1997).

Kljub navedbam v literaturi, da se dimerna DHA pri raztapljanju popolnoma pretvori v monomerno DHA, so opazili, da ima pH topila velik vpliv na izkoristek reakcije, kjer reduciramo DHA v AA (Poredoš, 2006). Ko je pH raztapljanja nižji od 5, so ugotovili manjše izkoristke, kar bi lahko pomenilo, da pri teh pogojih poleg monomerne DHA nastajajo tudi druge zvrsti, ki jih z redukcijo ni možno pretvoriti v AA.

V okviru naloge nameravamo potrditi, da poleg monomerne DHA nastajajo tudi druge zvrsti. Nastale zvrsti nameravamo kromatografsko ločiti in spremljati kinetiko njihovega nastanka in pretvorbe v nove produkte. Ugotoviti nameravamo, ali lahko z redukcijo v AA poleg monomerne DHA pretvorimo še kakšno od nastalih molekul.

1.1 NAMEN DELA

- Določiti vpliv pH topila v območju od pH 2 do pH 5 na izkoristek pretvorbe dimerne DHA v monomerno DHA pri raztapljanju.
- Določiti vpliv pH topila v območju od pH 2 do pH 5 na nastanek različnih zvrsti pri raztapljanju dimerne DHA.
- Spremljati kinetiko nastanka in razpada različnih zvrsti po raztapljanju dimerne DHA pri pH 2.
- Izolirati posamezne zvrsti in spremljati pretvorbe izoliranih zvrsti.
- Ugotoviti, ali koncentracija dimerne DHA vpliva na potek hidracije.
- Spremljati potek hidracije dimerne DHA v DMSO in metanolu.

- Ugotoviti, ali lahko v AA reduciramo še kakšno zvrst razen DHA.
- Sintetizirati dimerno DHA in preveriti istovetnost s komercialno dostopno dimerno DHA.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo, da bo pri pH nižjem od 5 pri raztapljanju dimerne DHA nastalo več zvrsti in ne samo monomerna DHA. Menimo, da bo pri nižjem pH delež teh zvrsti večji. Ker so raztopljena DHA in njej sorodne zvrsti nestabilne molekule, pričakujemo, da bomo lahko kromatografsko spremljali njihovo pretvorbo. DHA ima majhen molarni absorpcijski koeficient v bližjem UV spektru, zato bomo morali uporabiti detekcijo pri valovnih dolžinah okoli 200 nm. Ker ne vemo, ali vse zvrsti absorbirajo pri tej valovni dolžini, bomo uporabili tudi refraktometrični detektor. Predvidevamo, da bomo v AA lahko reducirali le monomerno DHA, medtem ko ostalih zvrsti ne bomo mogli reducirati. Menimo, da bomo uspeli sintetizirati dimerno DHA, ki bo pri raztapljanju tvorila enake produkte kot komercialno dosegljiva dimerna DHA.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VITAMIN C

2.1.1 Vitamin C v živilih

Vitamin C lahko dobimo s hrano v dveh oblikah, in sicer kot L-AA, ki je močan reducent, in v oksidirani obliki kot L-DHA. Čeprav se vitamin C nahaja v telesnih tekočinah večinoma v reducirani obliki, imata tako AA kot DHA biološko aktivnost (Basu in Dickerson, 1996). Razen ledvic in jeter nobeno živilo živalskega izvora ni pomemben vir vitamina C. Več kot 90 odstotkov vitamina C dobimo iz živil rastlinskega izvora (preglednica 1), predvsem s sadjem zaužijemo več vitamina C kot z zelenjavo, saj ga večinoma uživamo nepredelanega. Vsebnost tega vitamina je pogojena z različnimi faktorji kot so genotipske razlike, del in vrsta rastline, osvetlitev v fazi rasti, stopnja zrelosti, klima, metode obiranja, skladiščenje in ravnanje po skladiščenju (Lee in Kader, 2000; Mali, 1999).

Preglednica 1: Vsebnost vitamina C (mg/100 g) v nekaterem sadju in zelenjavi (Vanderslice in sod., 1990)

proizvod	AA	DHA	skupen vit.C
banana	4,5-7,7	3,3-7,7	12-19
brokoli	89,0-148,0	7,7-15,2	97-163
zelje	60,7-67,0	5,7-6,7	66-74
rdeča grenivka	8,7-27,0	4,0-7,3	13-31
pomaranča	44,0-78,0	3,2-12,0	52-78
krompir	6,7-23,7	3,3-5,3	11-27
špinača	22,5-67,7	1,3-3,2	25-70
paradižnik	15,7-17,3	2,0-4,3	18-21

2.1.2 Prehranski pomen vitamina C

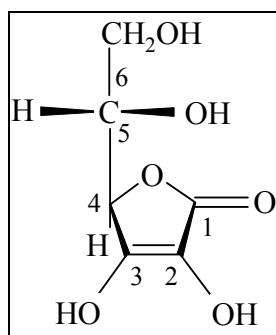
Dnevne potrebe po vitaminih pri ljudeh se razlikujejo in so odvisne od stanja metabolizma posameznika, od starosti in spola. Tako je priporočena dnevna doza (RDA-recommended dietary allowance) za odrasle okoli 100 mg na dan, nosečnice naj bi zaužile 110 mg, doječe matere 150 mg in kadilci vsaj 150 mg na dan. Mnogi strokovnjaki priporočajo, da naj bi se zaradi dokazano pozitivnih učinkov za zdravje priporočena dnevna doza povečala na 200 mg na dan (Ausman, 1999), saj ima ta vitamin obrambno funkcijo, ker ščiti telo pred rakom debelega črevesa, želodca, pljuč in ustne votline (Yong in sod., 1997). Prekoračitev navedenih količin ni priporočljiva, kajti človeške celice niso sposobne absorbirati večjih količin (Levine in sod., 1999). Diete z dodatki vitamina C naj ne bi imele vpliva na zmanjševanje pogostnosti raka na želodcu in danki (Greenberg in sod., 1994).

2.2 ASKORBINSKA KISLINA

2.2.1 Nomenklatura

L-AA je v vodi topna, optično aktivna bela kristalinična snov in dober reducent z molekulsko formulo $C_6H_8O_6$ in relativno molekulsko maso 176,13 (Kuellmer, 1999), ki nastane v reakcijah biosinteze iz glukoze v jetrih pri večini odraslih sesalcev, razen pri morskih prašičkih, primatih in človeku, saj ga ne moremo sintetizirati iz glukoze zaradi pomanjkanja encima gulonolakton oksidaze, zato ga moramo zaužiti s hrano, prehranskimi dodatki ali farmacevtskimi pripravki (Wilson, 2002).

Po kemijski zgradbi je L-AA 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 ($pK_1=4,13$). Zaradi tega je pri fiziološkem pH (okoli 7) L-AA v obliki L-askorbata (Davey in sod., 2000).



Slika 1: L-AA (Klofutar in sod., 1998)

2.2.2 Stabilnost AA

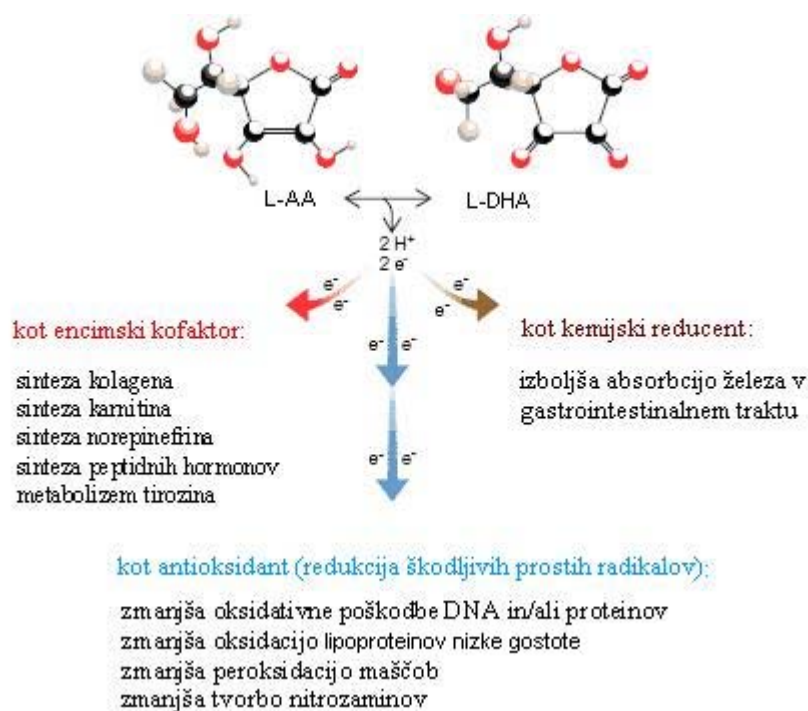
Temperatura je eden izmed pomembnejših faktorjev, ki vplivajo na stabilnost AA. Pri merjenju AA v aseptično pakiranem sadnem soku so avtorji ugotovili, da je po 64 dneh hranjenja pri $4^{\circ}C$ ostalo 60,4 % AA, pri $20^{\circ}C$ 48,6 % AA, pri $37^{\circ}C$ 11,9 % AA. Pri temperaturah nad $76^{\circ}C$ je bil razpad še hitrejši, saj je že po nekaj dneh razpadla praktično vsa AA. Hitrost razpada AA ni bila linearna, saj je bil največji padec koncentracije pri vseh merjenih temperaturah največji v prvih dneh shranjevanja. Avtorji predvidevajo, da je to verjetno posledica raztopljenega kisika, kar so tudi potrdili z merjenjem koncentracije (Kennedy in sod., 1992).

AA 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. AA je najbolj obstojna v metafosforni kislini (MFK), ki zelo upočasni oksidacijo AA tudi v prisotnosti Cu^{2+} in Fe^{3+} ionov. V kislem pH oksidacijo AA z Cu^{2+} in Fe^{3+} kot dober kompleksant upočasni tudi citrat (Poredoš, 2006). L-AA se ob prisotnosti kisika oksidira proporcionalno z dvigovanjem temperature. Oksidacija poteče preko začetnega produkta L-DHA, ki se ireverzibilno hidrolizira v 2,3-dioksi-L-gulonsko kislino. Ta se

naprej oksidira v oksalno kislino in L-treonično kislino. Nekateri kovinski ioni, med njimi Cu (II) in Fe (III), katalizirajo oksidacijo L-AA. Oksidacija AA je reakcija prvega reda. Logaritem koncentracije AA se linearno zmanjšuje s časom. Hitrost reakcije je večja pri večjem dodatku redoks aktivnih ionov (Imer in sod., 2003). Oksalna kislina in Cu (II) tvorita kelatni kompleks, ki preprečuje tvorbo kompleksa med AA in Cu (II), zato oksalna kislina uspešno preprečuje oksidacijo L-AA. L-AA lahko stabiliziramo z MFK, aminokislinami, 8-hidroksikinolinom, glikoli, sladkorji in triklorocetno kislino (Kuellmer, 1999).

2.2.3 Funkcije AA

Funkcije AA v telesu so prikazane na sliki 2. AA je najpomembnejši antioksidant v ekstracelularni tekočini. Organizem varuje pred reaktivnimi prostimi radikali, saj z njimi reagira in s tem ščiti biološko pomembne molekule pred poškodbami. Kot antioksidant je AA vključena tudi v različne cikle, v katerih se regenerirajo antioksidanti (Guyton, 1988). AA je specifičen donor elektronov v nekaterih encimskih reakcijah, ki potekajo pri hidrolizaciji kolagena in pri biosintezi karnitina (Levine in sod., 1999). 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). AA kot reducent izboljša absorpcijo železa, saj reducira Fe (III) v Fe (II), ki je mnogo bolj topen in se zato lažje absorbira. Ljudje, ki imajo povišano raven železa v krvi zaradi bolezni (hemokromatoza), se morajo izogibati vitaminu C (Cook s sod, 1984). Ena izmed pomembnih funkcij AA je zaščita lipoproteinov nizke gostote pred oksidacijo. Zadnja lahko privede do bolezni srca in ožilja (Valko in sod., 2004).



Slika 2: Funkcije vitamina C (Levine in sod., 1999)

Pomanjkanje vitamina C povzroča skorbut. Pri odraslih se znaki pomanjkanja pojavijo po 45 do 80 dneh primanjkovanja vitamina. Dlesni otečejo in krvavijo, zobje izpadajo, pojavijo se slabost, bolečine v nogah, kožni izpuščaji 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.

2.2.4 AA kot dodatek živilom

V svetu se AA uporablja kot prehrabeni dodatek, tako zaradi povečanja zaužitja vitamina, kakor tudi zaradi antioksidativne aktivnosti in stabilizacije živil med skladiščenjem (Kobovc, 2000). V živilski industriji se AA uporablja kot stabilizator v proizvodnji pijač, vin in mesnih izdelkov (Ball, 1998) ter kot dodatek predvsem pri predelavi sadja, s katero inhibiramo encimsko oksidacijo fenolnih spojin, ki povzročajo porjavenje.

AA je na voljo kot vitaminski dodatek v obliki tablet ali praška v velikem razponu odmerkov. Absorpcija AA iz multivitaminskih dodatkov je odvisna od prisotnosti ostalih komponent, odmerka in hrane, ki jo zaužijemo (Levine in sod., 1999).

2.3 DEHIDROASKORBINSKA KISLINA

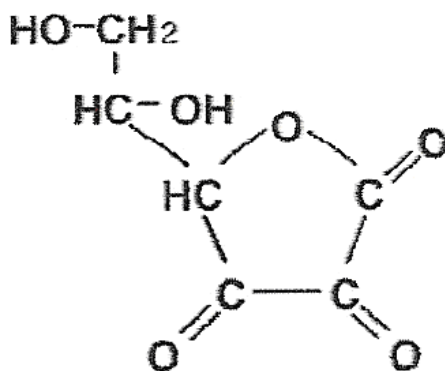
AA in DHA predstavljata vitamin C in se v organizmu v encimsko kataliziranih reakcijah oksidacije in redukcije medsebojno reverzibilno pretvarjata. Ko DHA zaužijemo, preide v želodcu v kislno okolje (HCl), nato pa se pomakne v nevtralno okolje dvanajstnika (bikarbonat).

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.

In vivo se DHA reducira do AA neencimsko z glutationom ali encimsko s pomočjo proteinov, ki imajo DHA reduktazno aktivnost, ki uporablja tudi glutation kot reducent (Food and Agriculture ... , 2002). Nereducirana DHA vstopi v celico s pomočjo olajšanega glukoznega transporta, ki se nahaja v plazmi membrane in se nato blizu celične membrane hitro reducira nazaj v AA, ki se nalaga kot AA⁻ (askorbatni ion), kar je pomembno za konstantno vzdrževanje koncentracije AA (Deutsch, 2000). Pri diabetesu tipa 1, kjer pride do pomanjkanja insulina in je posledično preveč glukoze, insulin povzroči inhibicijo vstopa DHA. S tem nastane pomanjkanje AA⁻, ki je potreben za sintezo kolagena in ostalih snovi, kar lahko pripelje tudi do osteoporoze (Wilson, 2002).

2.3.1 Nomenklatura

DHA je po svoji strukturi γ -1,4 lakton treo-2,3-heksadilusonske kisline in nastane po reverzibilni oksidaciji iz AA (Madaj in sod., 2000). V vodi najdemo DHA v hemiacetalni obliki (Deutsch, 2000), kar so potrdili z jedrsko magnetno resonanco (Kurata in Nishikawa, 2000).



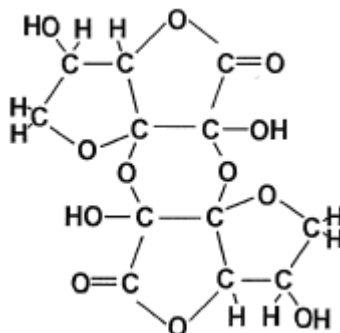
Slika 3: Struktura DHA (Deutsch, 2000)

2.3.2 Dimerna DHA

DHA se nahaja v kristaliničnem stanju kot dimer. Kristali dimerne dehidrirane DHA, ki so jih pripravili s kristalizacijo v nevodnih raztopinah (Muller-Mulot, 1970), se relativno težko

raztapljajo v vodnih raztopinah. Po raztapljanju nastane iz dimerne DHA monomerna oblika, ki se med staranjem pretvarja v nekatere druge produkte (Tolbert in sod., 1982).

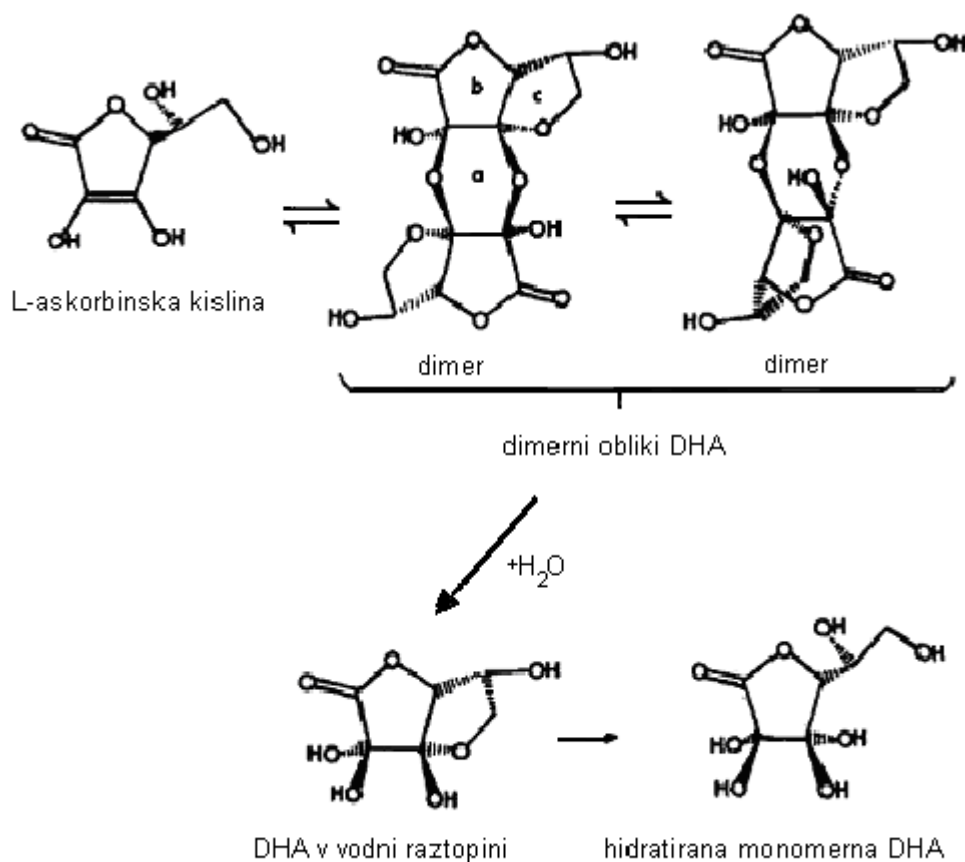
Pri raztapljanju in staranju trdne DHA v kislem so s tekočinsko kromatografijo z masnim detektorjem ugotovili tako dimerno kot monomerno obliko DHA, ki se je razlikovala v številu vezanih molekul vode (Pastore in sod., 2001). V primeru, da so v raztopini direktno oksidirali AA, pri staranju niso opazili dimernih zvrsti. V tej študiji se niso ukvarjali z začetnimi fazami raztapljanja.



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

Kristalna dimerna DHA je dejansko zmes dveh kristalnih spojin (slika 5). V dimetilformamidu in DMSO se pri sobni temperaturi vzpostavi ravnotežje med simetričnim in asimetričnim anomerom. Obe obliki ob prisotnosti vode tvorita biciklično, hidratirano monomerno obliko. V vodnih raztopinah pri sobni temperaturi se furanozni obroč monomerne oblike začne odpirati in nastane hidratirana monomerna DHA (Hvoslef in sod., 1979).

Komercialno dostopna dimerna DHA 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 monomerno DHA, hkrati pa nastajajo tudi druge zvrsti, ki jih z redukcijo ni možno pretvoriti v AA (Poredoš, 2006).



Slika 5: Različne oblike DHA: oznaka a prikazuje dvojno simetrijo dimerne oblike, oznaka b prikazuje γ -laktonski obroč, oznaka c prikazuje furanozni obroč (Hvoslef in sod., 1979)

2.3.3 Stabilnost monomerne DHA

Opravljenih je bilo kar nekaj raziskav, kjer so študirali stabilnost DHA v modelnih raztopinah. Tako so ugotovili, da je hitrost razpada monomerne DHA odvisna od temperature in pH. Pri pH, nižjem od 5, je le-ta relativno stabilna, najbolj stabilna je pri pH 2 ali manj (Poredoš, 2006), medtem ko pri pH višjem od 5, že v nekaj urah razpade znaten delež DHA (Bode in sod., 1990).

Nekateri avtorji so z uporabo tekočinske (Deutsch in Santosh-Kumar, 1996) in plinske kromatografije (Jungbluth in sod., 1997) študirali, v katere spojine DHA 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).

Zanimiva je tudi raziskava, v kateri so ugotovili, da DHA, raztopljena v 0,1 M NaOH, skoraj trenutno razpade. Pride namreč do odprtja laktonskega obroča in pretvorbe DHA v 2,3-diketogulonat. Tudi v rahlo kislem, pri pH 6 (fosfat), je hitrost razgradnje večja kot v kisli raztopini s pH 2 (fosfat) (Poredoš, 2006). Podobno so ob prisotnosti bikarbonata v nevtralnem pH odkrili tudi ostali (Koshiishi in sod., 1998a; Koshiishi in sod., 1998b).

Kinetiko razgradnje DHA pri nevtralnem pH so analizirali tudi z masno spektrometrijo (Cioffi in sod., 2000) in potrdili, da poteka razgradnja DHA in hidratiziranih oblik DHA preko diketogulonata.

2.3.4 Priprava dimerne DHA iz AA

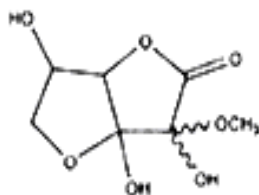
Monomerno DHA je mogoče pripraviti iz AA z encimskimi oksidacijami ob prisotnosti askorbat oksidaze (Deutsch, 1998 in Deutsch, 2000) in z neencimskimi oksidacijami. Pri slednjih imajo različni halogeni elementi npr. jod ali klor, raztopljen v metanolu, vodikov peroksid, železov klorid, zrak ali kisik vlogo oksidantov, p-benzokinon, N,N-dimetilacetamid, DMSO vlogo topila ter aktivno oglje, raztopljeno v metanolu in različne kovine vlogo katalizatorjev (Tsivgoulis in sod., 2004). Nekaj izmed mnogih metod za pripravo dimerne DHA iz AA je opisanih spodaj.

AA so raztopili v absolutnem metanolu ter kasneje dodali presežek svinčevega karbonata, ki je ob prisotnosti klora v plinastem stanju oksidirala AA do DHA. Raztopini metanola in DHA z dvema izomeroma 2-metil hemiketala (slika 6) so nato dodali metil-izobutil keton in 18 ur hladili na 0°C. Med ohlajanjem je nastala brezbarvna oborina, ki so jo kasneje filtrirali in spirali z mrzlim metil izobutil ketonom in etrom ter sušili v vakuumu. Izkoristek nastale dimerne DHA je bil 69 %.

Po podobnem postopku je potekala oksidacija AA ob prisotnosti svinčevega karbonata. Poleg tega so postopoma v 40 minutah dodajali še metanol in brom kot oksidant ter vzdrževali temperaturo med -7 in -5°C. Kasnejša izolacija dimerne DHA je potekala na enak način, kot je opisano pri prvem poskusu, le izkoristek je bil nekoliko manjši (30%). V primeru, ko so namesto broma uporabili jod, so se izkoristki povečali na 61% (Pecherer, 1951).

90 % izkoristek nastale dimerne DHA pa so dobili v primeru, ko so sirupu DHA in metanola slednjega odstranili z vakuumom pri 100°C in segrevali v nitrometanu, vendar je imel proizvod rožnato barvo in prisotno topilo (Dietz, 1970; cit. po Hvoslef in Pedersen, 1979).

Dietz (1970) je s preprosto metodo z oksidacijo AA ob uporabi platine kot katalizatorja, ki je vezan na aktivno oglje in s prepihanjem zraka pripravil raztopino DHA in metanola. Podobno so storili Ohmori in sod. (1983), ki so pri oksidaciji AA v metanolu namesto platine, vezane na aktivno oglje za katalizator, uporabili cenejše aktivno oglje. Nastala je monomerna DHA, ki so jo po odparevanju metanola prepihovali s kisikom, kar je zmanjšalo nečistoče iz zraka in čas oksidacije za petino v primerjavi z metodo po Dietzu (1970). Po termični obdelavi v aprotičnih organskih topilih so pretvorili monomerno DHA v dimerno.



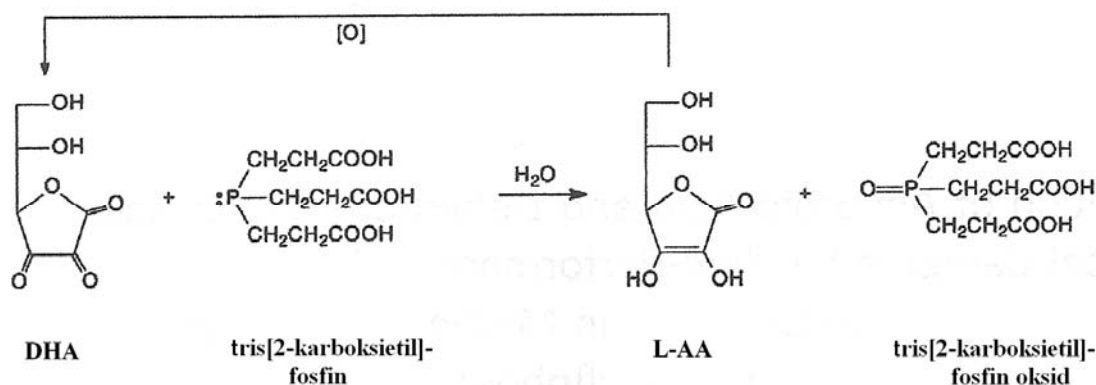
Slika 6: Struktura DHA, ki nastane pri oksidaciji AA v metanolu (2-metil hemiketalna oblika) (Tsivgoulis in sod., 2004)

2.3.5 Redukcija DHA v AA

Ta pretvorba je mogoča s pomočjo različnih reducentov. Najbolj uporabni so ditiotritol (DTT), tris(2-karboksietil)fosfin (TCEP), glutation in homocistein.

DTT je reducent, ki se veliko uporablja pri bioloških raziskavah in reducira DHA do AA pri nevtralnih ali nekoliko kislih pogojih. Vendar sta DHA in AA pri teh pogojih nestabilni molekuli, zato uporaba DTT ni najboljša. Nedavno odkrit TCEP dobiva vedno večji pomen pri biokemičnih raziskavah proteinov, saj je bolj stabilen in učinkovito reducira proteinske tiole (Lykkesfeldt, 2000). Prednost omenjenega reducenta je predvsem ta, da ga lahko uporabljamo v mnogo širšem pH območju in pri nižjih temperaturah, kjer je bolj obstojen in se manj oksidira (Getz in sod., 1999).

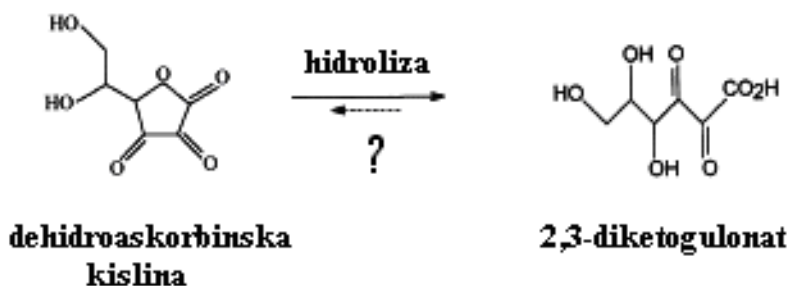
Na osnovi podatkov iz literature smo razbrali, da TCEP učinkovito reducira disulfidne vezi v proteinih v pH območju od 1,5 do 8,5, torej pri nižjem pH kot ostali reducenti, kar je prednost, saj sta tako askorbinska kot DHA pri nizkem pH bolj stabilni (Lykkesfeldt, 2000).



Slika 7: Mehanizem redukcije DHA v AA s TCEP (Lykkesfeldt, 2000)

2.3.6 Razpad DHA v DKG

Pri fiziološkem pH prihaja do hidrolize DHA v 2,3-diketogulonsko kislino (threo-2,3-heksodiolosonska kislina), ki je ne moremo reducirati nazaj v AA in posledično nima vitaminskega učinka (Deutsch, 2000).



Slika 8: Razpad DHA v 2,3-diketogulonat (Gibbons in sod., 2001)

V krvni plazmi DHA zelo hitro razpade v diketogulonat. Odkrili so, da na stabilnost DHA vplivajo predvsem hidrogenkarbonatni ioni (HCO_3^-), ki so kot fiziološki pufer 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).

V eni izmed študij so, nasprotno, opazili, da v kislem poteče hitra tvorba laktonov, kakršno strukturo ima tudi DHA (γ -1,4 lakton). Ugotovili so, da se z nižanjem pH povečuje vrednost DHA, ki naj bi nastala iz DKG (Miyake in sod., 1998).

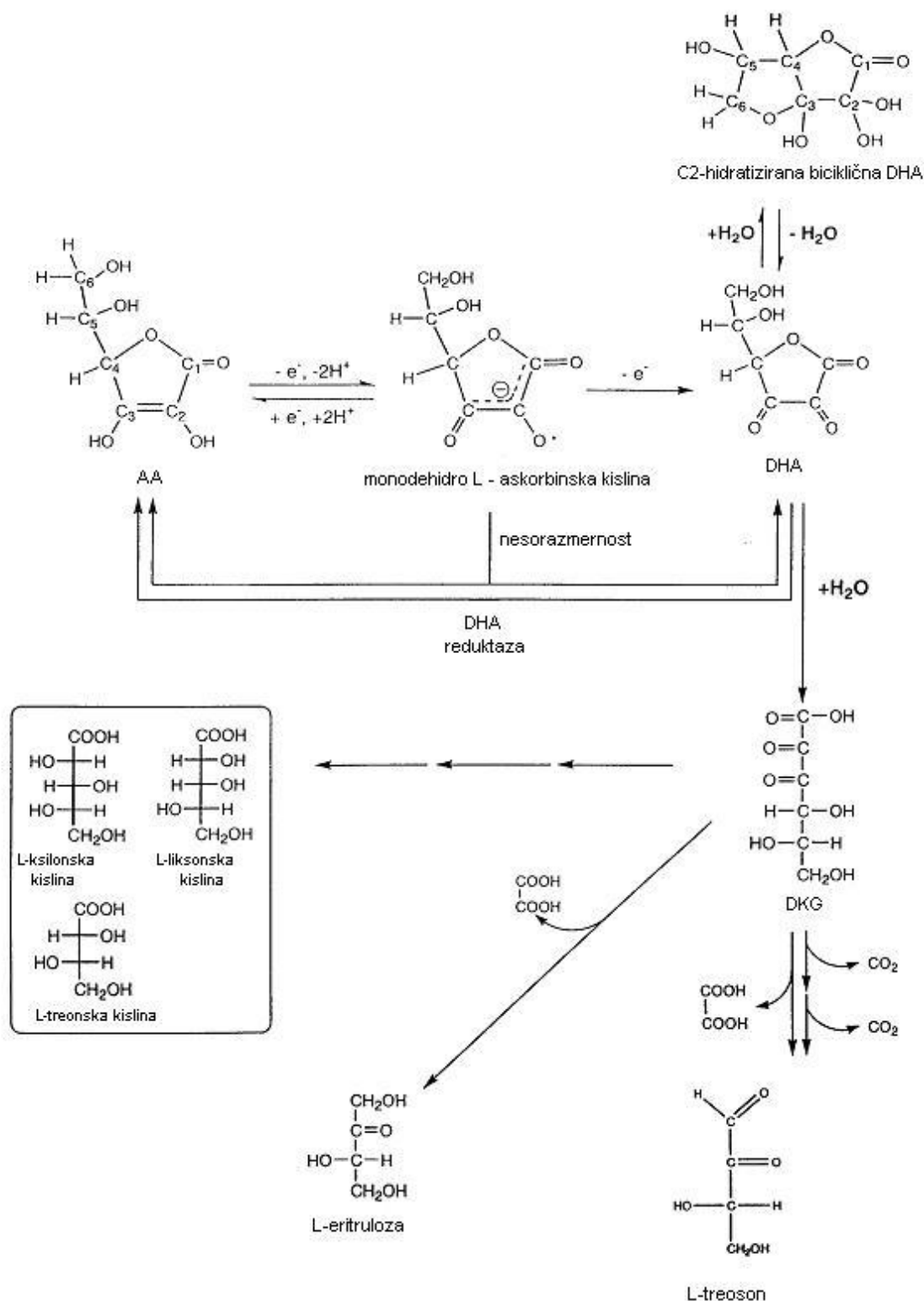
Podobno kot pri fiziološkem pH v organizmu se DHA do diketogulonata razgrajuje v mešanici uporabljeni za paraenteralno prehrano. Na razgradnjo vpliva temperatura, medtem ko redoks aktivni kovinski ioni nimajo vpliva. Z višanjem temperature se večja hitrost razpada DHA. Razgradnja DHA poteka v okolju brez 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 (Terada in sod., 1966; cit. po Jungbluth in sod., 1997).

Najbolj značilna kemijska lastnost L-AA je reverzibilna oksidacija v L-DHA preko L-MDHA (L-monoDHA) (slika 9). L-DHA se ireverzibilno hidrolizira v 2,3-diketogulonsko kislino, ki nima več funkcije vitamina (Matthews in Hall, 1978). Ta se naprej oksidira v oksalno, L-ksilonsko, L-treonično in ostale kisline (Kuellmer, 1999). Določene vrste zelenjave so dovezetnejše za oksidacijo L-AA. L-DHA in vmesni produkt L-MDHA imata enak vitaminski učinek kot L-AA (Kuellmer, 1999).

Zorman Š. Hidracija dimerne dehidroaskorbinske kisline v kislem pH.

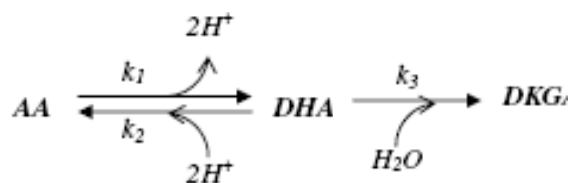
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za živilstvo, 2008



Slika 9: Razgradnja AA in DHA v vodnih raztopinah (Nishikawa in sod., 2001)

Nekateri avtorji so določili, da redukcija DHA do AA teče kot reakcija prvega reda in ugotovili, da je bila konstanta k_2 pri redukciji DHA v AA skoraj nič, pri oksidaciji AA do DHA k_1 in hidrolizi DHA v DKG k_3 pa sta bili konstanti po vrednostih zelo blizu. Ob

podatku vedno večjih količin cisteina se je k_2 vedno bolj povečevala. Ob dodatku železovih ionov kot oksidanta le-ta ni imel vpliva na k_2 , ampak sta se povečali k_1 in k_3 (Serpen in Gokmen, 2007).



Slika 10: Kinetične konstante, ki opisujejo pretvorbo AA in DHA (Serpen in Gokmen, 2007)

2.4 ANALITIKA ASKORBINSKE IN DEHIDROASKORBINSKE KISLINE

AA in DHA se analizirata z UV-VIS spektrometrijo, z encimskimi, elektrokemijskimi, kromatografskimi in fluorimetričnimi tehnikami. Vse omenjene metode zaznajo DHA šele pri relativno veliki koncentraciji, zato poteka analitika DHA večinoma preko redukcije do AA (Pastore in sod., 2001).

2.4.1 Spektrofotometrično določanje AA in DHA v UV območju

AA dobro absorbira svetlobo med 200 nm in 300 nm v kislem (pH 2) ter ima absorpcijski maksimum pri 245 nm (Jung in sod., 1998). DHA relativno slabo absorbira svetlobo valovnih dolžin, višjih od 215 nm, absorpcijski maksimum ima pri 185 nm. 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 želimo določiti vsebnost DHA, jo je poprej največkrat potrebno z reducentom pretvoriti v AA (Deutsch, 2000).

2.4.2 Kromatografsko določanje AA in DHA

Veliko je kromatografskih metod, ki ločijo askorbinsko in DHA. Ena izmed pogosto uporabljenih je HPLC (visokotlačna tekočinska kromatografija) z uporabo oktadecilnih kolon C₁₈ (Esteve in sod., 1997). Zelo dobro ločbo med AA in DHA omogoča tudi plinska kromatografija z uporabo dimetiloksanske kolone (Deutsch in sod., 1996). Za ločevanje s plinsko kromatografijo je potrebno vzorce predhodno derivatizirati.

Pri direktnem določanju koncentracije DHA uporabimo UV-VIS detektor, vendar tukaj naletimo na problem občutljivosti metode. Občutljivost določanja koncentracije DHA je boljša pri uporabi elektrokemičnih in fluorimetričnih detektorjev. DHA se lahko detektira s pomočjo benzamidina ali dimetil-o-fenilenediamina, ki z DHA tvorita fluorescentne produkte (Koshiishi in sod., 1998a; Tessier in sod., 1996).

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, L-cistein, DTT in TCEP (Gökmen in sod., 2000). AA pa se določi spektrofotometrično po predhodni kromatografski separaciji.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Raziskava je potekala na modelnih raztopinah AA in DHA. Vse analize so bile opravljene pri sobni temperaturi.

Reagenti

Pri delu smo uporabljali analitsko čiste spojine 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 DHA

3.2.1.1 Preliminarni študij stabilnosti komercialno dostopne dimerne DHA

Reagenti:

- dimerna DHA (Sigma)
- 5 mM H₂SO₄

Izvedba:

Zatehtali smo 2 mg dimerne DHA in jo raztopili v 1 mL 5 mM H₂SO₄ ter na vrtinčniku intenzivno mešali 1 minuto. Po mešanju smo raztopino prefiltrirali skozi 0,45 µm filter (CA) v vialo in po 4 minutah od raztapljanja prvič nanesli 20 µL vsebine vialo na kolono SynergieC₁₈ 250 mm × 4 mm. Kolona je bila uravnotežena s 5 mM H₂SO₄. Po nanosu smo vzorec izokratsko spirali z mobilno fazo pri pretoku 2 mL/min. Eluirane spojine smo v okviru 7-minutnega programa detektirali z merjenjem absorbance pri 200 nm in z zaporedno vezanim RI detektorjem.

3.2.1.2 Raztapljanje komercialno dostopne DHA v 5 mM H₂SO₄ in študij stabilnosti tako pripravljene DHA v 5 mM H₂SO₄ in acetatnem pufru pH 5

Reagenti:

- dimerna DHA (Sigma)
- 5 mM H₂SO₄, MQ voda
- 1 M acetatni pufer pH 5

Izvedba:

Zatehtali smo 4 mg dimerne DHA in jo raztopili v 2 mL 5 mM H₂SO₄ ter na vrtinčniku intenzivno mešali 3 minute. Po mešanju smo raztopino prefiltrirali in po 20 minutah odpipetirali v prvo vialo 1600 µL raztopine ter 64 µL MQ, v drugo vialo pa 1600 µL raztopine ter 64 µL 1 M acetatnega pufera pH. V ustreznih časovnih intervalih smo nanegli po 20 µL vsebine vsake vialo na kolono SynergieC₁₈ 250 mm × 4 mm. Kolona je bila uravnotežena s 5 mM H₂SO₄. Po nanosu smo vzorec izokratsko spirali z mobilno fazo pri pretoku 1 mL/min. Eluirane spojine smo v okviru 10 minutnega programa detektirali z merjenjem absorbance pri 200 nm.

3.2.2 Vpliv koncentracije dimerne DHA na raztapljanje

Da bi preverili, ali na potek hidracije v kislem pH vpliva koncentracija dimerne DHA, smo pripravili raztopino DHA s tremi različnimi koncentracijami, jo raztopili v 5mM H₂SO₄ ter morebitne spremembe kromatografsko ovrednotili.

Reagenti:

- dimerna DHA (Sigma)
- 5mM H₂SO₄

Izvedba:

Zatehtali smo 0,5 mg, 2 mg ali 5 mg DHA ter jo raztopili v 1 mL 5 mM H₂SO₄. Na vrtinčniku smo intenzivno mešali 1 minuto, nato raztopino prefiltrirali ter preseli v vialo. V ustreznih časovnih intervalih smo nanegli po 20 µL vsebine vialo na kolono SynergieC₁₈ 250 mm × 4 mm. Kolona je bila uravnotežena s 5 mM H₂SO₄. Po nanosu smo vzorec izokratsko spirali z mobilno fazo pri pretoku 2 mL/min. Eluirane spojine smo v okviru 7-minutnega programa detektirali z merjenjem absorbance pri 200 nm.

3.2.3 Spektrofotometrično določanje AA, ki jo pripravimo z dodatkom reducenta TCEP v raztopine dimerne DHA

Hidratizirano monomerno DHA lahko z dodatkom ustreznih reducentov pretvorimo v AA. Ker ta absorbira v bližnjem UV spektru, zvrsti, ki nastanejo s hidracijo dimerne DHA pa ne, lahko z merjenjem absorbance pri 260 nm določimo vsebnost AA (Poredoš, 2006). Iz koncentracije nastale AA, lahko posredno sklepamo na koncentracijo zvrsti, ki se reducira v AA. Za hitro in popolno redukcijo je primerna uporaba reducenta TCEP pri pH 5 (Wechtersbach, 2007).

Reagenti:

- DHA (Aldrich)
- 100 mM HCl, 100 mM fosfatni pufer pH 2, 100 mM citratni pufer pH 2,8, 100 mM H₂SO₄, MQ voda, 100 mM acetatni pufer pH 5
- 5 mM TCEP raztopljen v 1 M acetatne pufru pH 5

Izvedba:

Zatehtali smo 1 mg DHA in jo raztopili v 3 mL ustreznih pufrov (0,1 M HCl, 100 mM fosfatni pufer pH 2, 100 mM citratni pufer pH 2,8, 100 mM H₂SO₄, MQ voda, 100 mM acetatnem pufru pH 5). Na vrtinčniku smo intenzivno mešali 30 sekund, nato vsebino prefiltrirali ter v različnih časovnih obdobjih odpipetirali 50 µL raztopine v mikrocentrifugirko, kjer je bilo 1050 µL 5 mM TCEP raztopljenega v 1 M acetatnem pufru pH 5. 30 minut po dodatku reducenta smo na spektrofotometru merili absorbanco pri 260 nm.

3.2.4 Preparativna kromatografija in analiza pretvorb spojin, ki nastanejo pri hidraciji dimerne DHA

Da bi podrobneje raziskali potek hidracije dimerne DHA, smo izvedli preparativno kromatografijo. Posamezne spojine, ki so nastale med hidracijo, smo po kromatografski separaciji ločeno zbirali v mikrocentrifugirke. Ustrezne frakcije smo v ustreznih časovnih intervalih rekromatografirali in na osnovi pojavljanja in izginevanja kromatografskih vrhov sklepali na potek reakcij.

Da bi preverili, katere frakcije se lahko reducirajo v AA, smo izvedli tudi eksperimente, kjer smo ločenim frakcijam dodali reducent TCEP in na osnovi koncentracije in kinetike nastajana AA sklepali, ali se z redukcijo lahko pretvorijo v AA.

3.2.4.1 Preparativna kromatografija in analiza pretvorb spojin brez dodanega reducenta

Reagenti:

- dimerna DHA (Sigma)
- 5 mM H₂SO₄

Izvedba:

Raztopili smo 20,78 mg dimerne DHA v 1,5 mL 5 mM H₂SO₄ in na vrtinčniku intenzivno mešali 3 minute. Nato smo raztopino prefiltrirali v vialo in po 20 µL raztopine nanašali na kolono, uravnoveženo s 5 mM H₂SO₄. Na osnovi merjenja absorbance pri 200 nm smo ločeno zbirali ustrezne frakcije. Nanos vzorca in zbiranje frakcij smo prilagodili kinetiki nastajanja in izginevanja posameznih spojin. Vsebinsko izbranih frakcij smo v ustreznih časovnih intervalih rekromatografirali v 5 mM H₂SO₄ in jih analizirali z UV detektorjem pri 200 nm in pretoku 1 mL/min.

3.2.4.2 Preparativna kromatografija in analiza pretvorb spojin z dodanim reducentom

Reagenti:

- dimerna DHA (Sigma)
- 5 mM H₂SO₄
- 100 mM TCEP

Izvedba:

Dimerno DHA smo raztopili in posamezne frakcije ločili, kot je opisano pri točki 3.2.4.1. 900 μL posamezne frakcije smo dodali 100 μL 100 mM TCEP. Vsebino izbranih frakcij smo v ustreznih časovnih intervalih rekromatografirali v 5 mM H_2SO_4 in jih analizirali z UV detektorjem pri 200 nm in 260 nm ter pretoku 2 mL/min.

3.2.5 Raztapljanje dimerne DHA pri različnih pH vrednostih in redukcija v AA po dodatku TCEP

Da bi ugotovili, kako pH vpliva na potek hidracije in s tem na možnost pretvorb nastalih zvrsti v AA po dodatku reducenta, smo raztopili dimerno DHA v različnih pufrih. V ustreznih časovnih intervalih smo odvzeli alikvote posamezne raztopine in jim dodali reducent. Nastalo AA smo kromatografsko analizirali.

Reagenti:

- dimerna DHA (Sigma)
- 100mM TCEP, MQ voda
- 100 mM HCl s pH 1
- 200 mM citratni pufer pH 2,2; 2,4; 2,6; 2,8; 3,0; 3,2; 4,0 in 5,0
- 200 mM fosfatni pufer pH 2,2
- 2 % metafosforna kislina s pH 1,9

Izvedba:

Zatehtali smo po 1 mg dimerne DHA in jo raztopili v 1440 μL ustreznih pufrov. Na vrtinčniku smo intenzivno mešali in po 3 minutah filtrirali. V ustreznih časovnih intervalih smo odpipetirali 140 μL raztopine v mikrocentrifugirke, kjer je bilo 140 μL 100 mM TCEP in 1220 μL MQ vode. Na vrtinčniku smo ponovno premešali in po dveurni redukciji nanесли raztopino na kromatografsko kolono, uravnoreženo s 5 mM H_2SO_4 pri pretoku 1 mL/min. Nastalo AA smo detektirali pri 260 nm.

3.2.6 Raztapljanje dimerne DHA v DMSO in metanolu z majhno vsebnostjo vode

Hidracija dimerne DHA, pri kateri nastane monomerna DHA, poteka tudi v organskih topilih, če ta vsebujejo več kot 0,4 % dodane H_2O (Hvoslef in sod., 1979). Da bi preverili, kako poteka hidracija v organskih topilih (DMSO in metanol), ki vsebujejo še manjši delež vode, smo dimerno DHA raztopili v teh topilih in preko nastale AA po redukciji spektrofotometrično spremljali potek hidracije. Direktna kromatografska analiza zvrsti po raztapljanju v DMSO in metanol s sistemom, ki smo ga imeli, ni bila mogoča, saj pri nanosu vzorca v organskem topilu ni prišlo do separacije na koloni.

Reagenti:

- dimerna DHA (Aldrich), AA (Sigma)
- DMSO (0,51 mg $\text{H}_2\text{O}/\text{mL}$ določen z metodo po Karl-Fisherju), metanol (0,17 mg $\text{H}_2\text{O}/\text{mL}$ določen z metodo po Karl-Fisherju)
- MQ voda, 2 % metafosforna kislina, 1M acetatni pufer pH 5
- 100 mM TCEP v MQ

Izvedba:

V plastično centrifugirko smo odtehtali 0,70 mg DHA ter dodali 2 mL ustreznega topila (DMSO, metanol). Na vrtničniku smo intenzivno mešali 2 minuti, zatem smo raztopino prefiltrirali. Nato smo v ustreznih časovnih intervalih alikvote po 50 μ L odpipetirali v mikrocentrifugirke, v katerih je bilo po 200 μ L 2 % metafosforne kisline ali po 200 μ L acetatnega pufru pH 5 in dobro premešali. Po 30 minutah smo v prvi sklop mikrocentrifugirk, ki so vsebovale 2 % metafosforno kislino, dodali 650 μ L 1M acetata pH 5 in 100 μ L 100 mM TCEP. V drugi sklop mikrocentrifugirk, ki so vsebovale acetatni pufer pH 5 pa 200 μ L 2 % metafosforne kisline, 450 μ L 1 mM acetata pH 5 in 100 μ L 100 mM TCEP. Raztopine smo dobro premešali in počakali 30 minut, da je potekla redukcija DHA v AA. Po končani redukciji smo vsebine mikrocentrifugirk prelili v kivete in pomerili absorbanco pri 260 nm proti slepemu vzorcu. Slepri vzorec smo pripravili tako, da smo namesto raztopine DHA v raztopino reducenta dodali 50 μ L ustreznega topila. Kot standard smo za kvantifikacijo uporabili komercialno dostopno AA in jo pripravili na enak način, kot je opisano zgoraj.

3.2.7 Sinteza in analiza dimerne DHA v organskih topilih

Pri oksidaciji AA v metanolu in prisotnosti aktivnega oglja kot katalizatorja nastane monomerna DHA, ki se po odparevanju metanola in termični obdelavi v aprotičnih organskih topilih pretvori v dimerno DHA (Ohmori in sod., 1983). Tako pripravljena DHA, ki je tudi edini komercialno dosegljivi vir DHA, naj bi se po hidrataciji v vodnih raztopinah popolnoma pretvorila v monomerno DHA (Hvoslef in sod., 1979).

3.2.7.1 Sinteza dimerne DHA v organskih topilih

Reagenti:

- AA
- metanol
- 0,5 g aktivnega oglja
- metiletilketon (MEK)

Izvedba:

V zaprto čašo smo zatehtali 333 mg AA in ji dodali 10 mL metanola ter na vrtničniku mešali, dokler se AA ni raztopila. Nato smo raztopini dodali 0,5 g aktivnega oglja ter na vrtničniku pustili mešati čez noč. Med mešanjem smo vsake toliko časa prezračili za 30 sekund, da je potekla izmenjava plinov, ter čašo ponovno zaprli. Naslednji dan smo raztopino prelili v 15 mL plastično centrifugirko in centrifugirali 10 minut na 3000 obr/min. Po končanem centrifugiranju smo raztopino prefiltrirali skozi 0,45 μ m CA filtre. Po 500 μ L metanolne raztopine smo odpipetirali v mikrocentrifugirke ter jo prepihovali z dušikom, dokler metanol ni odparel. Pri tem je nastala sirupu podobna tekočina. Nato smo v mikrocentrifugirko dodali 2 mL MEK in segrevali na 95°C. Med segrevanjem smo sproti dopolnjevali izpareli MEK. Sčasoma se je vsebina mikrocentrifugirke začela kosmičiti. Po 100 minutah prepihovanja smo nehali dodajati MEK. Ko smo topilo popolnoma odstranili, je preostal bel prah.

3.2.7.2 Raztapljanje sintetizirane dimerne DHA v MFK, redukcija v AA po dodatku TCEP in spektrofotometrična določitev AA

Reagenti:

- AA
- sintetizirana dimerna DHA
- 2 % metafosforna kislina, 200 mM acetatni pufer pH 5
- 100 mM TCEP, raztopljen v MQ

Izvedba:

V plastično centrifugirko smo odtehtali 0,70 mg DHA ter dodali 2120 μL 2 % metafosforne kisline. Na vrtničniku smo intenzivno mešali 30 sekund, zatem smo raztopino prefiltrirali. Nato smo v ustreznih časovnih intervalih alikvote po 100 μL odpipetirali v mikrocentrifugirke, v katerih je bilo po 800 μL 200 mM acetatnega pufru pH 5 in 100 μL 100 mM TCEP. Počakali smo 30 minut, da je potekla redukcija DHA v AA. Po končani redukciji smo vsebine mikrocentrifugirk prelili v kivete in pomerili absorbanco pri 260 nm proti slepemu vzorcu. Slep vzorec smo pripravili tako, da smo namesto raztopine DHA v raztopino reducenta in acetatnega pufru dodali 50 μL 2 % MFK.

Za standard smo uporabili komercialno dostopno AA in jo pripravili po enakem postopku, kot je opisano zgoraj.

3.2.7.3 Raztapljanje sintetizirane dimerne DHA v MFK, redukcija v AA po dodatku TCEP in kromatografska določitev AA

Reagenti:

- 20 mM acetat pH 5, 2 % metafosforna kislina
- 100 mM TCEP
- DHA, nastala z oksidacijo AA

Izvedba:

Zatehtali smo 2 mg DHA in jo v centrifugirki raztopili v 1 mL 20 mM acetatnega pufru pH 5 ali pa v 1 mL 2 % metafosforne kisline. Na vrtničniku smo intenzivno mešali 3 minute, zatem smo raztopino prefiltrirali. Nato smo 42 μL raztopine DHA odpipetirali v mikrocentrifugirko, v kateri je že bilo 858 μL 20 mM acetatnega pufru pH 5 in 100 μL 100 mM TCEP. Raztopino smo intenzivno premešali in jo kvantitativno prenesli v vialo za HPLC. Po 30 minutah smo po 20 μL raztopine nanegli na kolono uravnoteženo s 5 mM H_2SO_4 pri pretoku 1 mL/min in eluirane spojine analizirali z UV detektorjem pri 260 nm.

3.2.7.4 Raztapljanje sintetizirane dimerne DHA pri različnih pH vrednostih in kromatografska analiza nastalih zvrsti.

Reagenti:

- 20 mM acetat pH 5, 2 % metafosforna kislina
- sintetizirana dimerna DHA

Izvedba:

Zatehtali smo 2 mg DHA in jo v centrifugirki raztopili v 1 mL 20 mM acetatnega pufru pH 5 ali pa v 1 mL 2 % metafosforne kisline. Na vrtinčniku smo intenzivno mešali 3 minute, zatem smo raztopino prefiltrirali in prenesli v vialo za HPLC. Po 60 minutah smo po 20 μ L vzorca nanесли na kolono uravnoteženo s 5 mM H₂SO₄ in eluirane spojine analizirali z UV detektorjem pri 200 nm in pretoku 1 mL/min.

3.2.8 Določevanje vsebnosti AA na HPLC sistemu

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.

Izvedba:

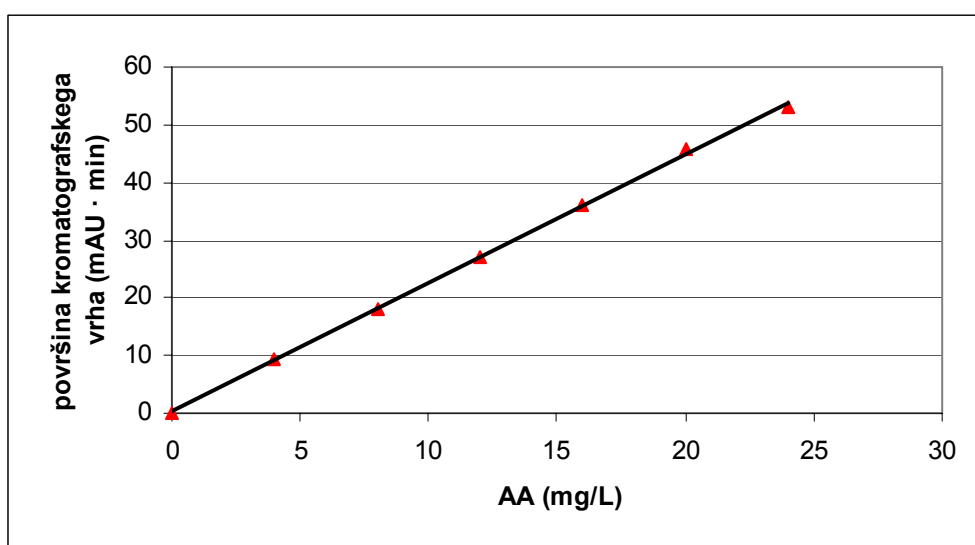
Vsebnost AA smo določali na koloni SynergieC₁₈ 250 mm \times 4 mm, napolnjeni z delci stacionarne faze dimenzije 4 μ m. Vzorce, ki smo jih pripravili, kot je opisano pri posameznih postopkih, smo skozi filtre za enkratno uporabo z velikostjo por 0,45 μ m prefiltrirali v steklene vialo. Vialo smo naložili na avtomatski podajalnik in pričeli z analizo. Na kolono, uravnoteženo s 5 mM H₂SO₄, smo nanесли 20 μ L prefiltriranega vzorca. Kolono smo po nanosu vzorca še 12 minut spirali pri konstantnem pretoku 1 mL/min. AA, ki se je eluirala pri 4,9 min, smo detektirali s spektrofotometričnim detektorjem pri 260 nm. Koncentracijo AA smo določili s pomočjo umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili na isti aparaturi z različnimi koncentracijami standardov AA.

Priprava umeritvene krivulje za HPLC s standardnimi raztopinami AA:

Ustrezne prostornine standardne raztopine 1 mM AA raztopljene v 5 mM H₂SO₄ smo v vialah za HPLC zmešali z ustreznimi volumni 5 mM H₂SO₄ (preglednica 2), dobro premešali ter analizirali na HPLC sistemu.

Preglednica 2: Priprava točk za umeritveno krivuljo

Koncentracija AA (mg/L)	$V_{1 \text{ mM AA}}$ (μL)	$V_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ (μL)
0	0	900
4	17	883
8	33	867
12	50	850
16	67	833
20	83	817
25	100	800



Slika 11: Umeritvena krivulja za kromatografsko določitev AA

4 REZULTATI

4.1 STABILNOST DHA

V predhodnih študijah (Poredoš, 2006) so ugotovili, da je komercialno dostopna dimerna DHA v kislih raztopinah nestabilna, saj lahko po dodatku reducenta v AA pretvorimo le okoli polovico raztopljene dimerne DHA. Da bi preverili, ali poleg monomerne DHA pri hidraciji dimerne DHA nastajajo še kakšne druge spojine, smo raztopino dimerne DHA pri pH 2 analizirali na HPLC sistemu. Za detekcijo smo izbrali univerzalen RI detektor in spektrofotometrični detektor pri valovni dolžini 200 nm, kjer absorbira monomerna DHA.

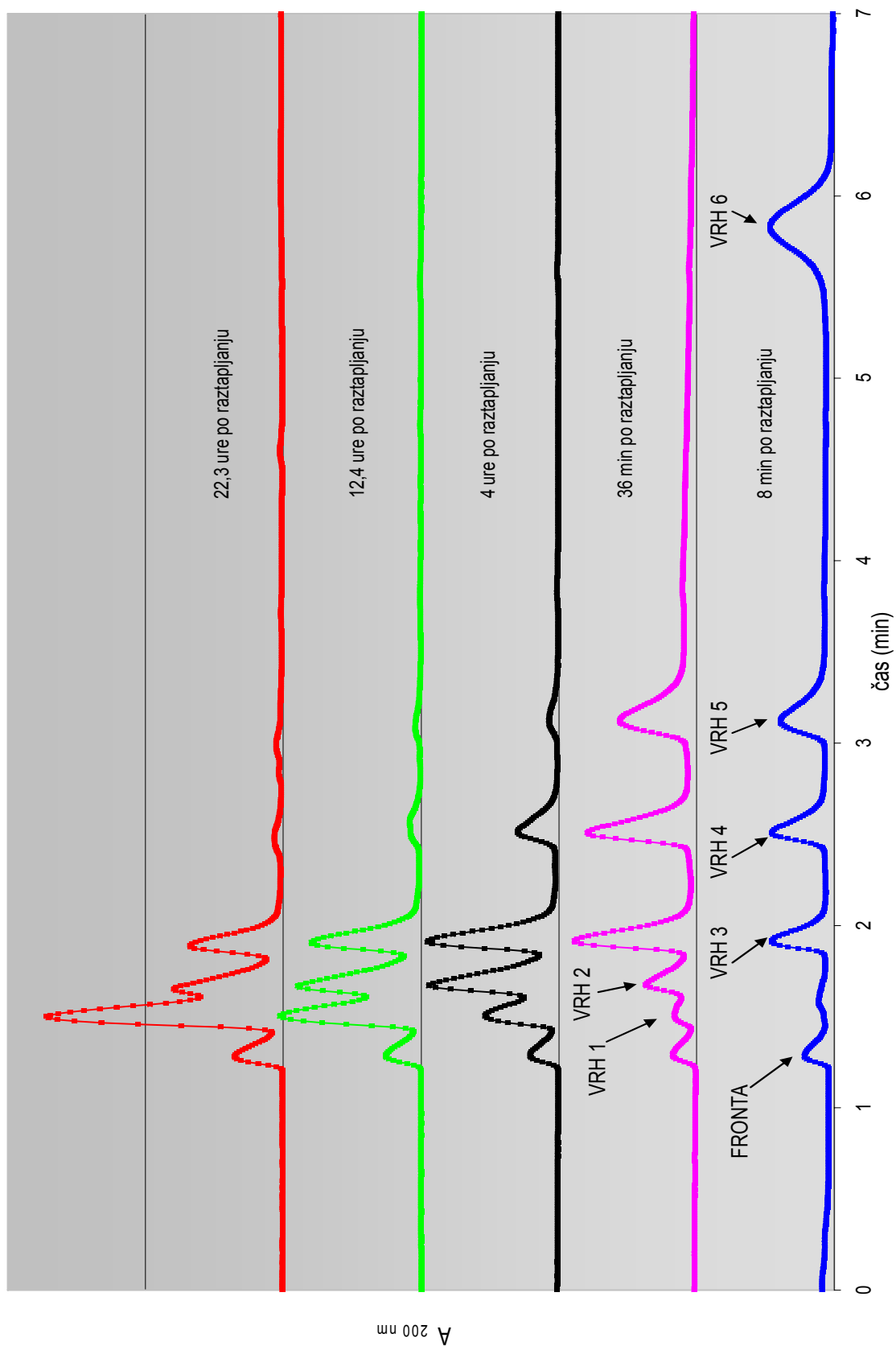
4.1.1 Preliminarni študij stabilnosti komercialno dostopne DHA

Dimerno DHA smo raztopili v 5 mM H₂SO₄ in jo v ustreznih časovnih intervalih analizirali na HPLC sistemu s spektrofotometričnim detektorjem pri 200 nm. Iz kromatograma na sliki 12 je razvidno, da pri hidraciji dimerne DHA nastane mnogo različnih spojin. 8 minut po hidraciji (slika 12) lahko identificiramo najmanj 4 različne spojine. Največji integral ima spojina, označena kot vrh 6. Ta spojina je kinetično zelo nestabilna, saj je že 36 minut po hidraciji ne zaznamo več (slika 12). Po 36 minutah opazimo novi spojin (vrh 1 in vrh 2), katerih koncentracija je bila po 8 minutah še premajhna, da bi jo zaznali. Po celodnevni inkubaciji (slika 12) spojin, ki jih označimo kot vrh 4 in vrh 5, praktično ne zaznamo več. Močno pa se poveča koncentracija spojine, ki je označena kot vrh 1.

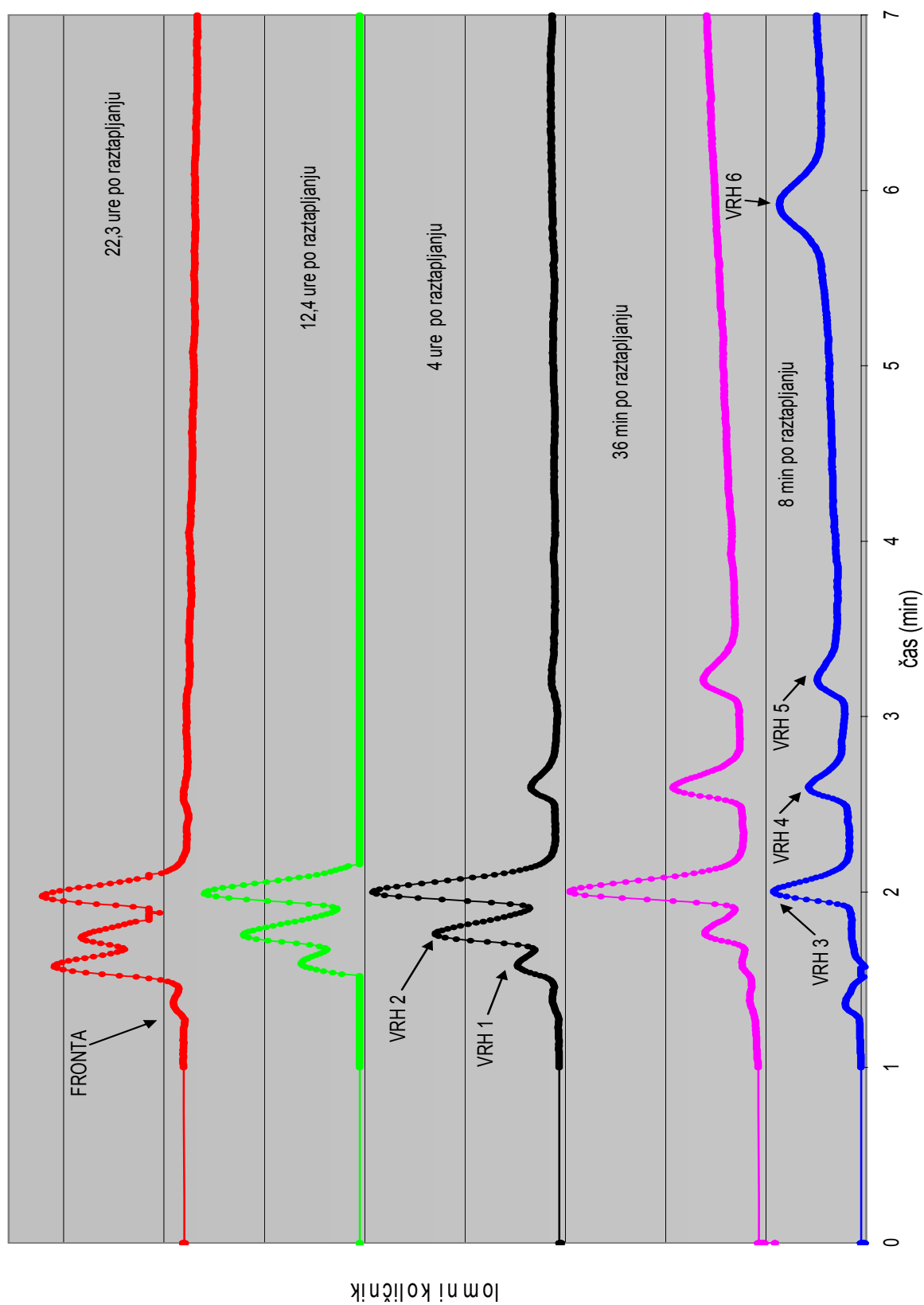
Spojina, ki se eluira kot vrh 3, predstavlja monomerno obliko DHA, saj pri encimski oksidaciji AA in hidraciji dimerne DHA pri pH 5 dobimo le ta kromatografski vrh (rezultat ni prikazan).

V nadaljevanju bodo imena vseh vrhov, razen vrha 3, ki ga bomo poimenovali DHA, ostala nespremenjena.

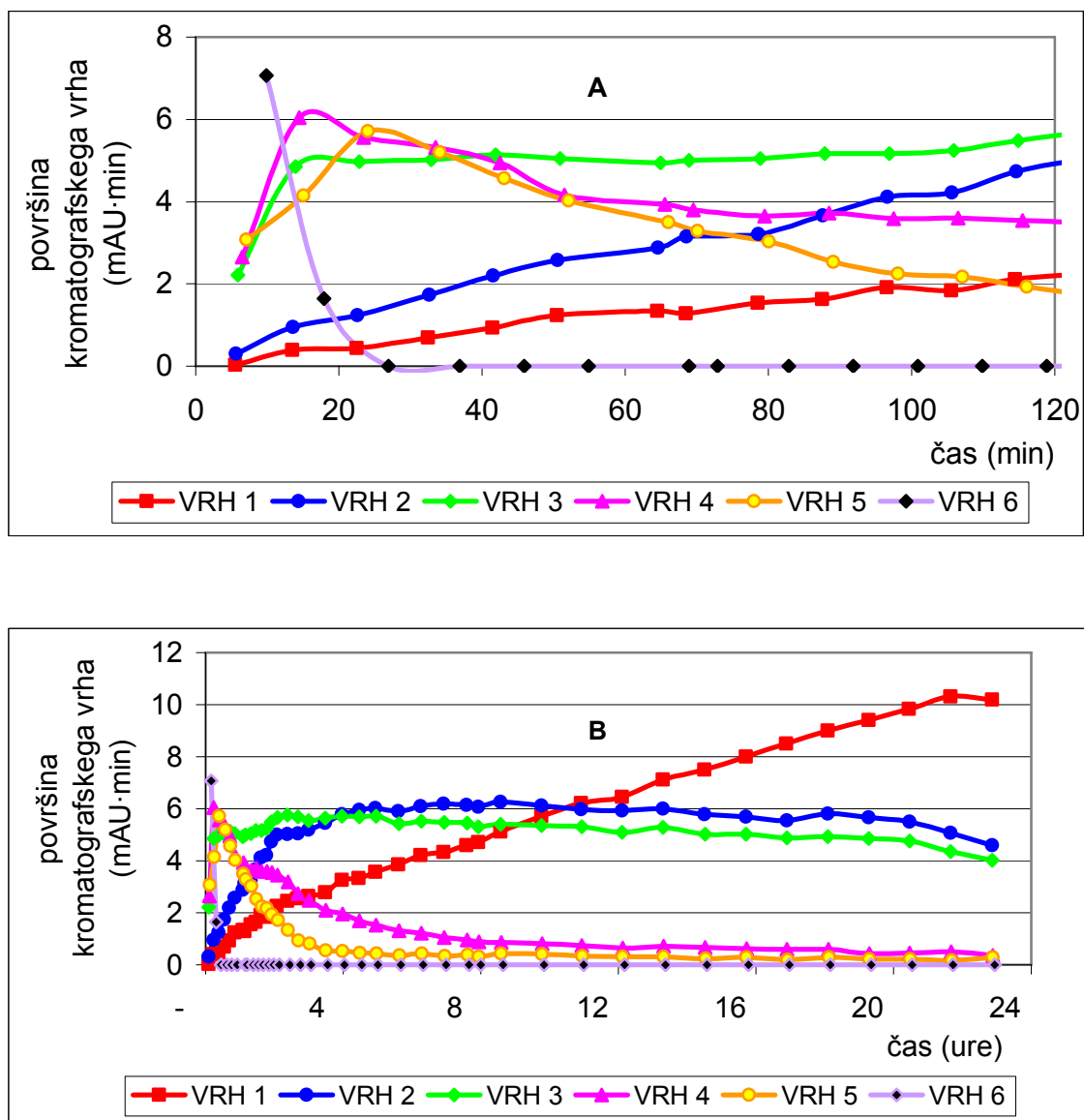
Dimerno DHA, ki smo jo raztopili v 5 mM H₂SO₄, smo analizirali tudi z univerzalnim RI detektorjem. Iz kromatograma na sliki 13 je razvidno, da smo identificirali enake spojine, ki pa so imele različne relativne intenzitete v primerjavi s spektrofotometričnim detektorjem pri valovni dolžini 200 nm. Ker pa so absolutne intenzitete signalov manjše, smo se odločili, da bomo v nadaljevanju uporabljali le UV detekcijo, saj na ta način zagotovimo nižjo mejo detekcije za posamezne spojine.



Slika 12: Elucijski diagram, ki je rezultat nanosa dimerne DHA v različnem časovnem obdobju po raztapljanju v 5 mM H_2SO_4 , merjeno pri pretoku 2 mL/min in absorbanci 200 nm



Slika 13: Elucijski diagram, ki je rezultat nanosa dimerne DHA v različnem časovnem obdobju po raztapljanju v 5 mM H₂SO₄, merjeno na RI detektorju



Slika 14: Kromatografsko določanje dimerne DHA v 5 mM H₂SO₄ v prvih dveh urah po raztapljanju (A) in v daljšem časovnem intervalu (B), merjeno z UV detektorjem pri pretoku 2 mL/min

Iz slike 14A je razvidno, da pri prvem nanosu (to je po 4 minutah) prevladuje spojina, ki se eluira kot vrh 6. Pri drugem nanosu po 17 minutah je koncentracija te spojine precej manjša. Ustrezno pa se poveča koncentracija spojin, označenih kot vrh 5, vrh 4 in DHA (vrh 3). V začetnih fazah hidracije je koncentracija spojin, ki se eluirajo kot vrh 2 in vrh 1, majhna. Ko po nekaj deset minutah dosežeta vrh 4 in vrh 5 maksimum, se začne njuna koncentracija hitro zmanjševati. Pri tem pride do naglega povečanja koncentracije spojine, ki se eluira kot vrh 2.

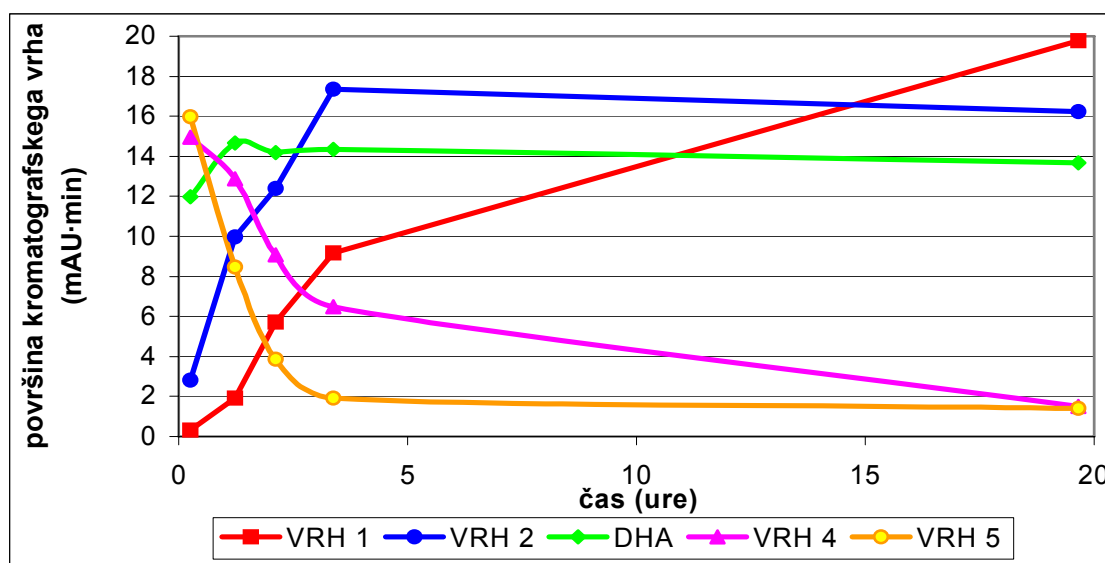
Skozi daljše obdobje nekaj ur (slika 14B) je razvidno, da se koncentracija spojin, ki se eluirata kot vrh 4 in vrh 5, približuje vrednosti nič. Koncentracija spojin označenih kot vrh 2 in DHA se po doseženem maksimumu le počasi zmanjšuje. Opazno pa je konstantno povečevanje koncentracije spojine, označene kot vrh 1.

4.1.2 Raztapljanje komercialno dostopne DHA v 5 mM H₂SO₄ in študij stabilnosti tako pripravljene DHA v 5 mM H₂SO₄ in acetatnem pufru pH 5

Ugotovili smo, da pri hidraciji dimerne DHA pri pH 2 nastanejo še druge zvrsti in ne samo monomerna DHA. Razlika v hidraciji pri pH 2 in pH 5 bi bila lahko posledica razlik v poteku hidracije dimerne DHA ali pa v kinetiki pretvorb nastalih zvrsti, ki bi lahko bila občutno hitrejša pri pH 5. Da bi to preverili, smo dimerno DHA raztopili v 5 mM H₂SO₄ in počakali 20 minut, da je potekla delna hidracija. Alikvote tako pripravljene raztopine smo potem prenesli v pH 2 in pH 5 in jih v časovnih intervalih analizirali na HPLC sistemu.

Iz rezultatov, prikazanih na sliki 15a in 15b, so razvidne manjše razlike v hitrosti pretvorb posameznih zvrsti. Posebej izstopa hitrejšo zmanjševanje koncentracije spojine, ki se eluira kot vrh 4, pri pH 5. Pri pH 5 nastane tudi občutno več spojine, ki se eluira kot vrh 1. Po drugi strani pa pri pH 5 nastane manj spojine, ki se eluira kot vrh 2. Na koncentracijo DHA v merjenem obdobju razlika v pH bistveno ne vpliva.

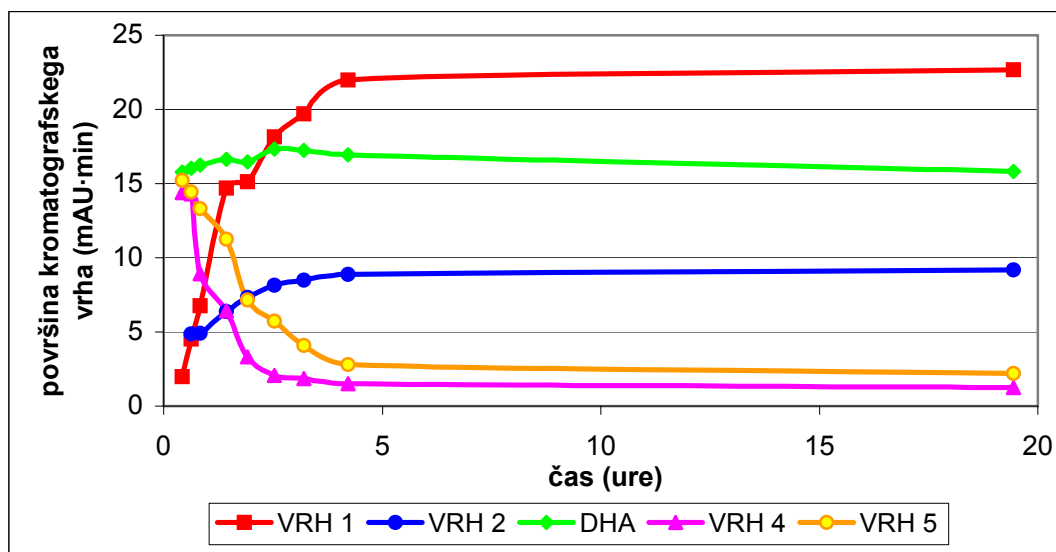
Kljub opaženim razlikam v hitrosti pretvorb med pH 2 in pH 5 lahko nedvomno trdimo, da razlika v hitrosti pretvorb posameznih zvrsti ni takšna, da bi s tem lahko razložili praktično dvakrat večje izkoristke nastale monomerne DHA pri direktni hidraciji dimerne DHA pri pH 5 v primerjavi s pH 2 (Poredoš, 2006).



Slika 15a: Rezultati kromatografske analize v 5 mM H₂SO₄ raztopljene dimerne DHA po določenih časih inkubacije

Zorman Š. Hidracija dimerne dehidroaskorbinske kisline v kislem pH.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za živilstvo, 2008

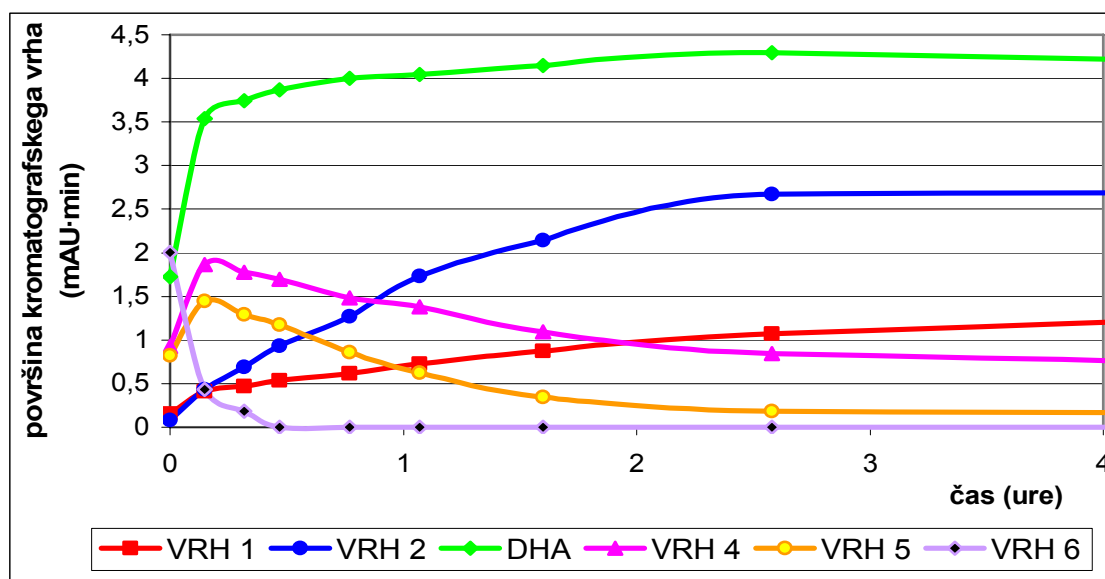


Slika 15b: Rezultati kromatografske analize v 5 mM H₂SO₄ raztopljene dimerne DHA, ki smo jo po 20 minutah prenesli v raztopino s pH 5, po določenih časih inkubacije

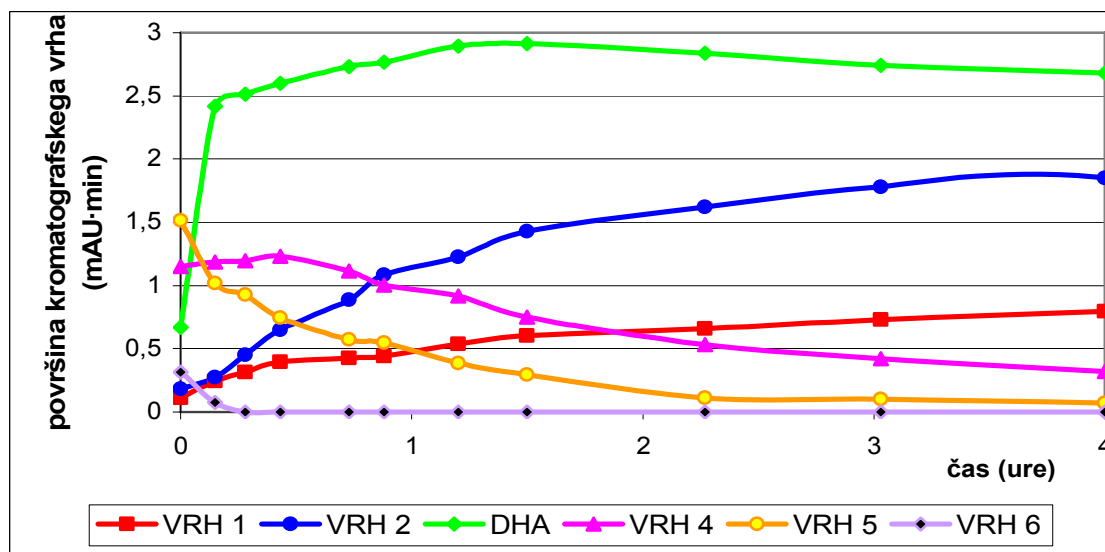
4.2 VPLIV KONCENTRACIJE DIMERNE DHA NA RAZTAPLJANJE

Hitrost reakcije prvega in višjih redov je odvisna od koncentracije reaktantov. Da bi preverili, ali koncentracija dimerne DHA vpliva na hitrost pretvorb in potek hidracije dimerne DHA, smo pripravili raztopine dimerne DHA v 5 mM H_2SO_4 s koncentracijami 0,5 mg/mL, 2 mg/L in 5 mg/L ter na HPLC sistemu v ustreznih časovnih intervalih spremljali razpad in nastanek posameznih zvrsti.

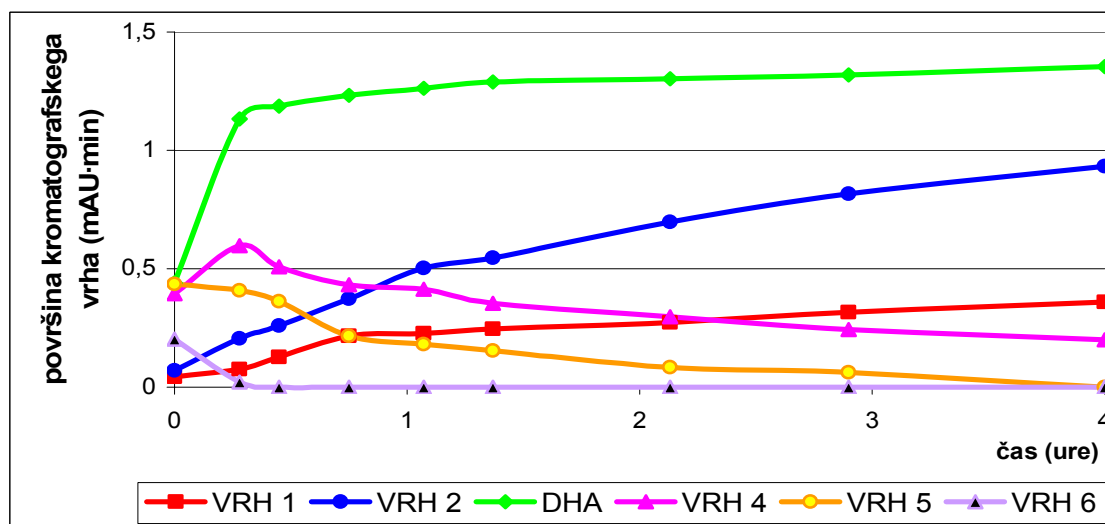
Iz rezultatov, prikazanih na slikah 16, 17 in 18, ki smo jih dobili z merjenjem absorbance pri 200 nm, lahko ugotovimo, da koncentracija nima večjega vpliva na potek reakcije, saj se kinetika pretvorb posameznih zvrsti pri različnih koncentracijah dimerne DHA le malo spreminja. Velike razlike pa so opazne v koncentraciji posameznih zvrsti, kjer posamezni integrali kromatografskih vrhov pri obeh večjih koncentracijah niso večkratniki ustrezno večje zatehte dimerne DHA ($4\times$, oziroma $10\times$), saj so izmerjene vrednosti precej manjše. Pri centrifugiranju raztopine DHA pred filtriranjem smo pri obeh večjih koncentracijah dimerne DHA na steni mikrocentrifugirke opazili oborino. Slednje bi bilo lahko povezano z manjšo topnostjo pri večjih koncentracijah in relativno kratkim mešanjem (1 min), kar bi lahko vplivalo na manjše absolutne koncentracije posameznih zvrsti od pričakovanih.



Slika 16: Rezultati kromatografske analize v 5 mM H_2SO_4 raztopljenе dimerne DHA s koncentracijo 5 mg/L po določenih časih inkubacije



Slika 17: Rezultati kromatografske analize v 5 mM H₂SO₄ raztopljene dimerne DHA s koncentracijo 2 mg/L po določenih časih inkubacije

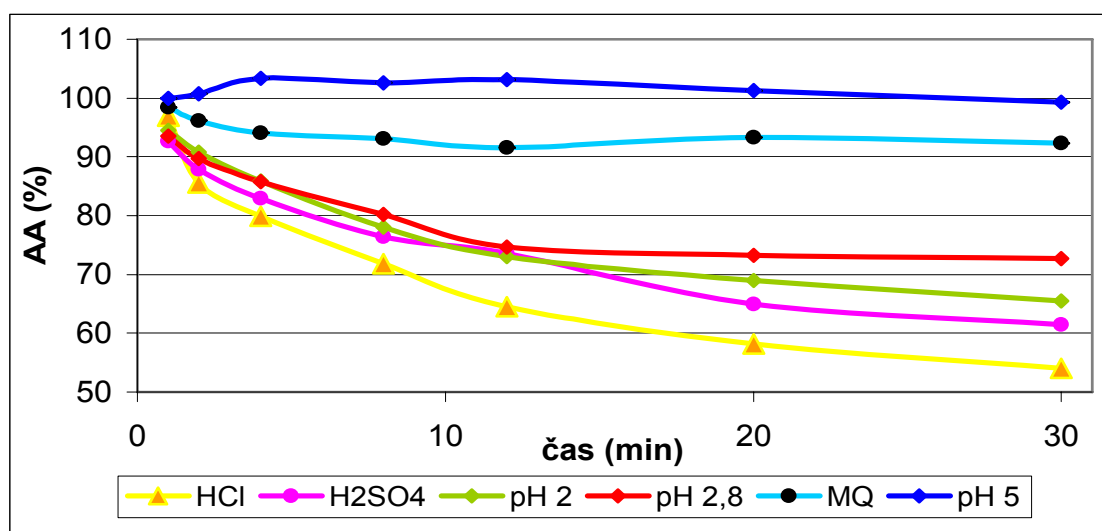


Slika 18: Rezultati kromatografske analize v 5 mM H₂SO₄ raztopljene dimerne DHA s koncentracijo 0,5 mg/L po določenih časih inkubacije

4.3 SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE AA, KI JO PRIPRAVIMO Z DODATKOM REDUCENTA TCEP V RAZTOPINE DIMERNE DHA

Po dodatku reducenta v raztopino monomerne DHA nastane ekvimolarna količina AA. Pri predhodnih raziskavah so ugotovili, da pri raztapljanju dimerne DHA pri pH vrednostih, ki so nižje od 5, po dodatku reducenta nastane manj AA (Poredoš, 2006).

Iz rezultatov, prikazanih na sliki 19, je razvidno, da pri nižjih pH vrednostih določimo manjše vsebnosti AA. Količina nastale AA, se s časom hidracije pred dodatkom reducenta zmanjšuje, kar se sklada s predhodnimi ugotovitvami (Poredoš, 2006). Pri raztapljanju v raztopini HCl dobimo po 30 minutah le nekaj več kot 50 % začetne koncentracije AA, oziroma AA, ki jo dobimo po 30 minutni hidracije dimerne DHA v raztopini s pH 5.



Slika 19: Delež AA, pridobljene z redukcijo DHA, po različnih časih hidracije dimerne DHA v 0,1 M HCl, 5 mM H₂SO₄, fosfatnem pufru pH 2, citratnem pufru pH 2,8, miliQ vodi in acetatnem pufru pH 5.

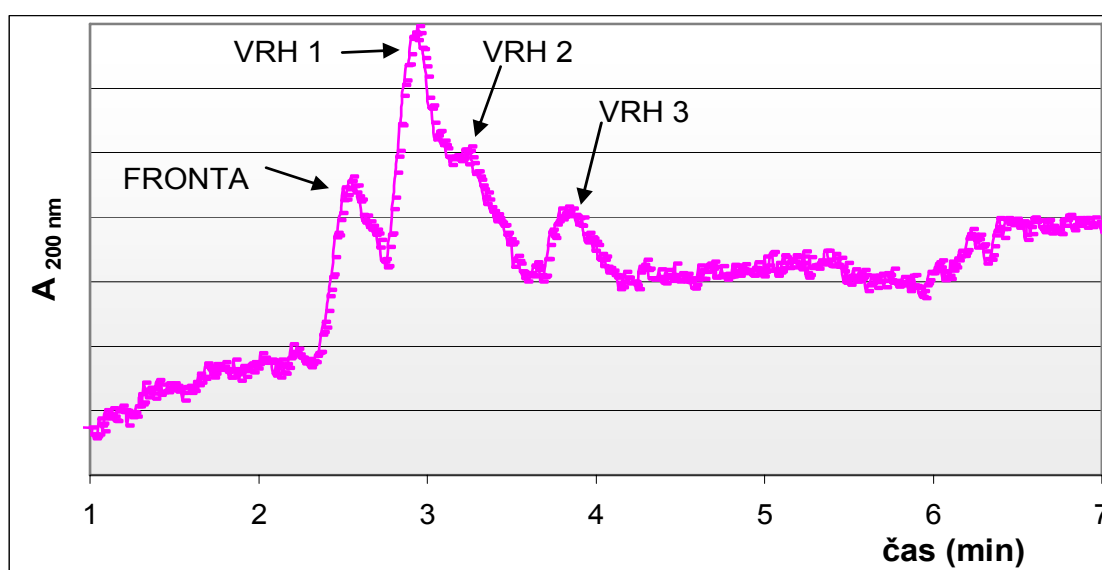
4.4 PREPARATIVNA KROMATOGRAFIJA IN ANALIZA PRETVORB SPOJIN, KI NASTANEJO PRI HIDRATACIJI DIMERNE DHA

4.4.1 Preparativna kromatografija in analiza pretvorb spojin brez dodanega reducenta

Pripravili smo raztopino dimerne DHA v 5 mM H₂SO₄. Tako pripravljen vzorec smo ob različnih časih kromatografirali in zbirali posamezne frakcije. Vzorčenje smo prilagodili časovnemu poteku pretvorb (slika 14), da smo pridobili čim večje koncentracije posameznih zvrsti. Posamezne frakcije smo po določenem času rekromatografirali na HPLC sistemu.

Vrh 6:

8 minut po hidraciji dimerne DHA v kislem mediju (slika 12) lahko med drugim zaznamo spojino, označeno kot vrh 6, ki ima največji integral. Ta spojina je kinetično zelo nestabilna, saj je že 36 minut po hidraciji ni več mogoče detektirati. Na osnovi analize čiste spojine smo po enem dnevu od raztapljanja dimerne DHA dobili kromatogram (slika 20), ki nam prikazuje, da se omenjena spojina pretvarja v spojine, označene kot vrh 1, vrh 2 in DHA, medtem ko spojin vrh 4 in vrh 5 nista opazni. Retencijski časi omenjenih spojin se skladajo z retencijskimi časi pri analizah posameznih spojin, s čimer lahko potrdimo nastanek zgornjih zvrsti.

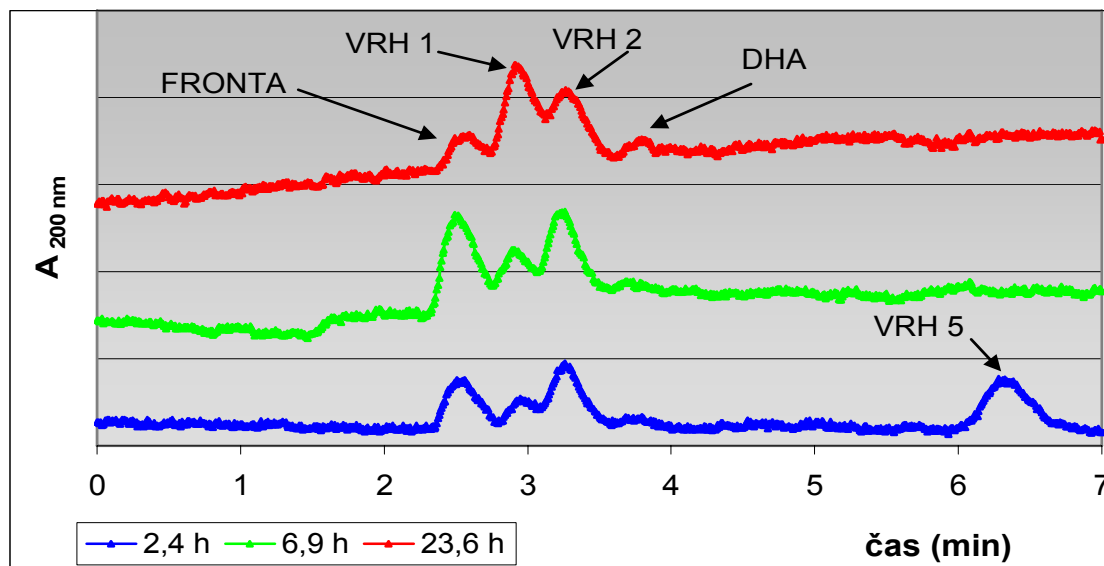


Slika 20: Rezultati kromatografske analize frakcije, ki se izloči kot vrh 6 po enem dnevu od raztapljanja dimerne DHA v kisli raztopini

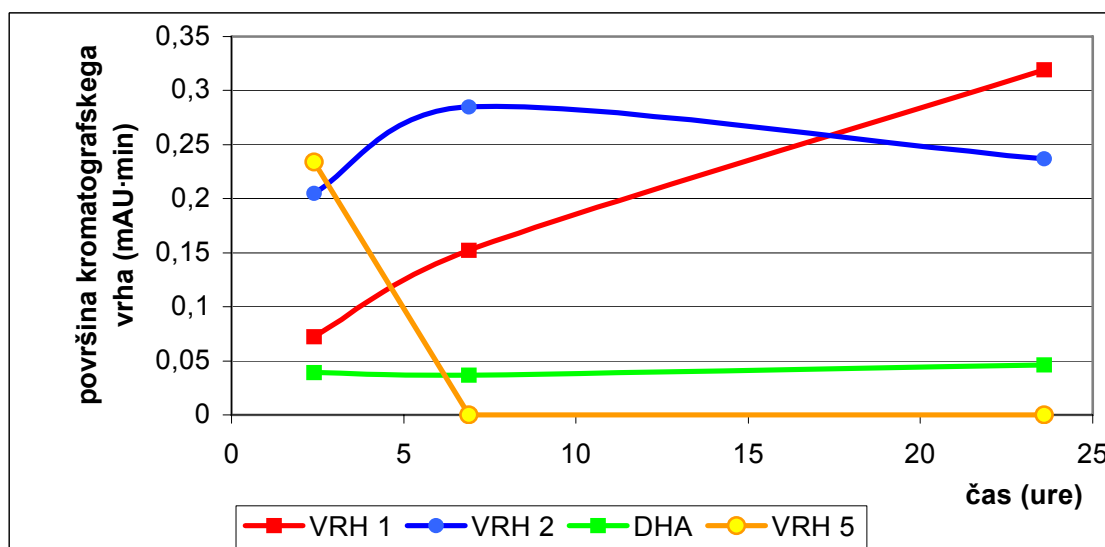
Vrh 5:

Iz slike 14, kjer smo spremljali hidracijo dimerne DHA, je po začetnem naraščanju razvidno hitro zmanjševanje koncentracije spojine, ki se eluira kot vrh 5, saj že po 5 urah pade koncentracija te spojine praktično na vrednost nič. Hitro zmanjševanje koncentracije te spojine je razvidno tudi, ko smo analizirali pretvorbo čiste spojine, ki se izloči kot vrh 5 (sliki 21 in 22). Že po 144 minutah (ali po 2,4 ure) se poleg vrha 5 pojavijo še spojine, ki se izločijo kot vrh 1, vrh 2 in morda DHA. Koncentracija določene DHA je na meji detekcije,

zato nedvoumnega odgovora, ali se spojina v vrhu 5 pretvarja v DHA, ni mogoče podati. Po sedmih urah pade koncentracija spojine v vrhu 5 na nič, vsebnost ostalih se poveča. Po celodnevem shranjevanju se koncentracije spojine, ki se izloči kot vrh 1 poveča, ostalih pa zmanjša.



Slika 21: Rezultati kromatografske analize frakcije, ki se izloči kot vrh 5, po različnih časih inkubacije



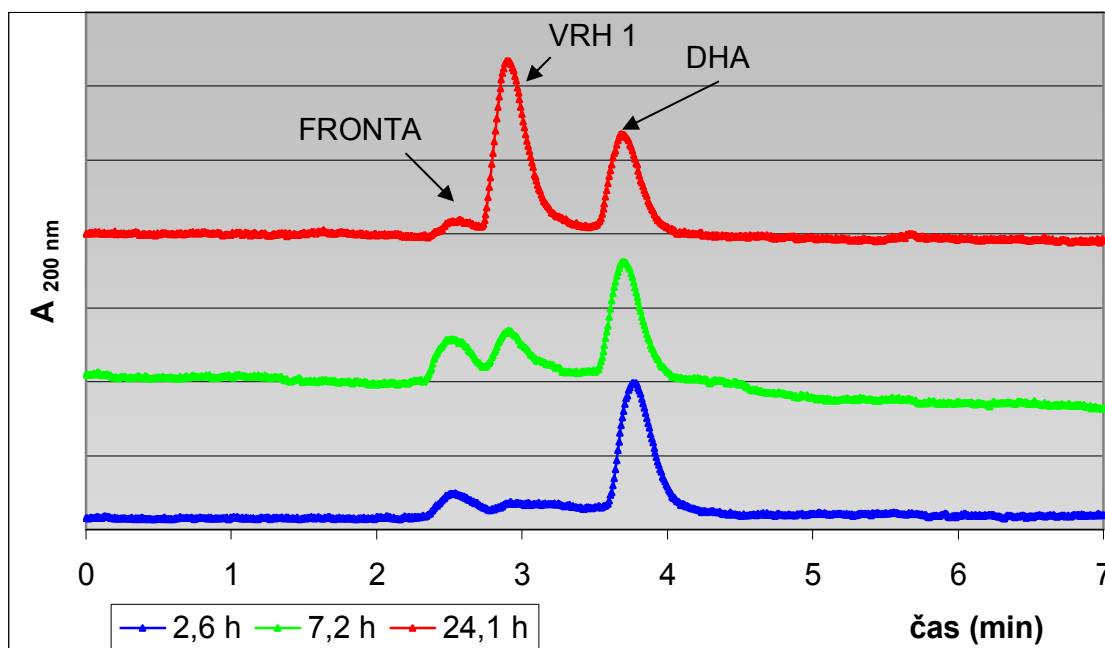
Slika 22: Deleži posameznih spojin, ki nastanejo iz spojine eluirane v vrhu 5, določeni po različnih časih inkubacije

Vrh 4:

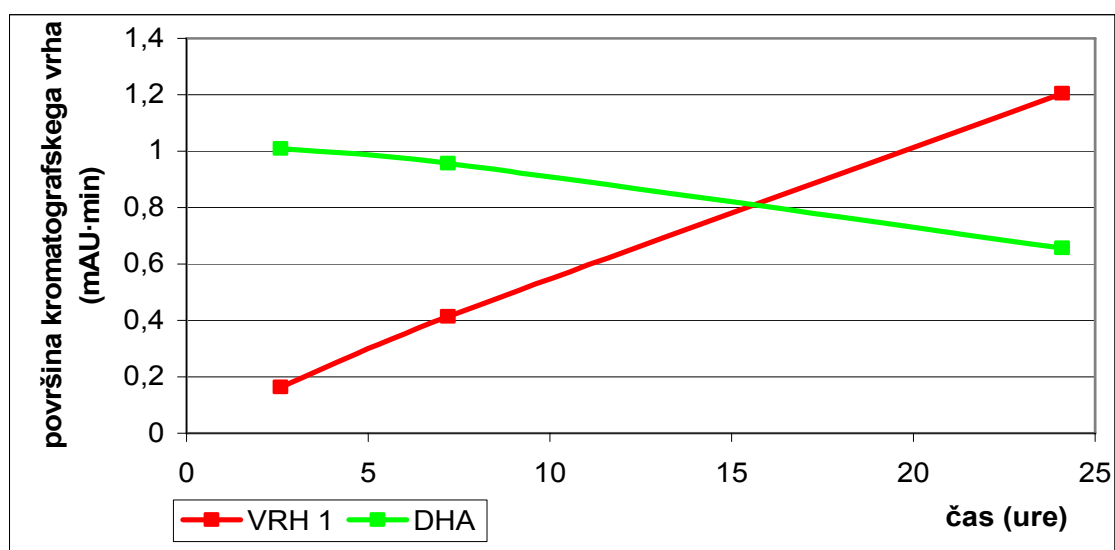
Pri kromatografski analizi frakcije, ki se izloči kot vrh 4, dobimo podobne rezultate, kot pri pretvorbi frakcije vrh 5. Opazna je le počasnejša kinetika pretvorb spojine v vrhu 4 kot spojine v vrhu 5, saj po sedmih urah inkubacije določimo še vedno nekaj spojine, ki se eluira v vrhu 4. Ker smo zaradi relativno ozkega kromatografskega vrha spojine vrh 4 uspeli

DHA:

Iz rezultatov, prikazanih na slikah 27 in 28, je razvidno, da se DHA med 24 urno inkubacijo pretvarja izključno v spojino, izločeno kot vrh 1. Zmanjševanje koncentracije DHA je sorazmerno s povečevanjem koncentracije spojine v vrhu 1. Spojin, ki se izločijo v kromatografskem vrhu 2, 4 ali 5 med inkubacijo, nismo detektirali.



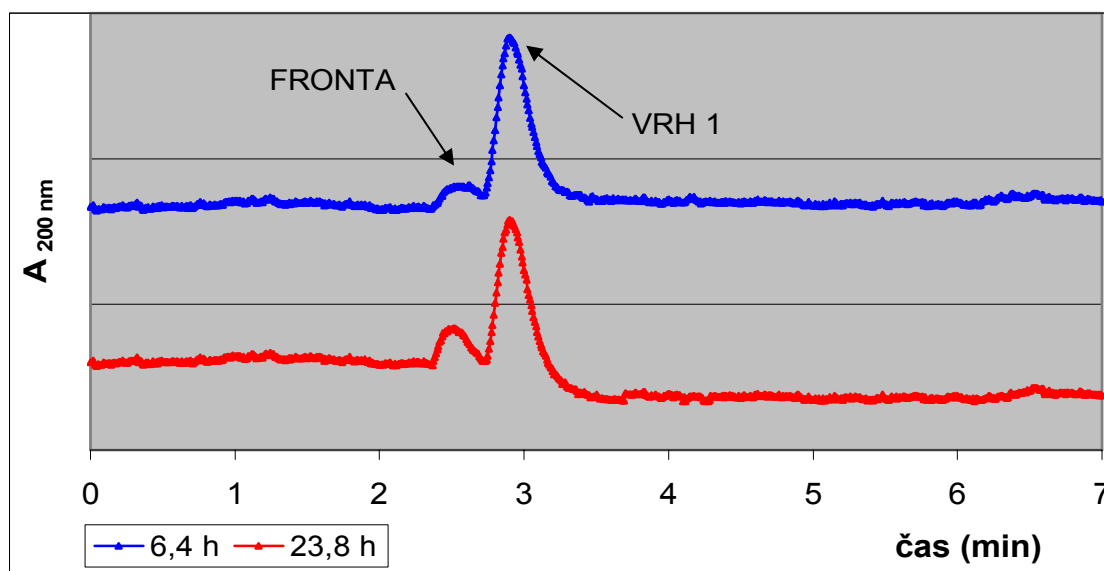
Slika 27: Rezultati kromatografske analize frakcije, ki se izloči kot DHA, po različnih časih inkubacije



Slika 28: Deleži posameznih spojin, ki nastanejo iz DHA, določeni po različnih časih inkubacije

Vrh 1:

Spojina, ki se izloči v kromatografskem vrhu 1, je edina, katere koncentracija se povečuje skozi celoten čas 20-urne inkubacije, ko raztopimo dimerno DHA v 5 mM H₂SO₄ (slika 14). Izolirana spojina je kinetično stabilna, saj tudi po 24 urni inkubaciji ne opazimo nobene novonastale zvrsti. Površina kromatografskega vrha je konstantna v omenjenem časovnem obdobju, kar še dodatno potrjuje njeno stabilnost v omenjenih pogojih.



Slika 29: Rezultati kromatografske analize frakcije, ki se izloči kot vrh 1, po različnih časih inkubacije

4.4.2 Preparativna kromatografija in analiza pretvorb izoliranih spojin v AA po dodatku reducenta TCEP

Pri študiju stabilnosti posameznih spojin izoliranih s preparativno kromatografijo smo ugotovili, da iz določenih spojin najverjetneje nastaja tudi nekaj DHA. Da bi to potrdili, smo v posamezne frakcije dodali reducent TCEP in opazovali kinetiko nastajanja AA. Nastalo AA smo poizkusili detektirati pri valovni dolžini 200 nm in z RI detektorjem, saj bi tako poleg AA lahko opazovali tudi preostale zvrsti, ki dajo signal pri teh pogojih. S preliminarni študijami smo ugotovili, da to ni mogoče, saj se TCEP koeluirava z nekaterimi preiskovanimi spojinami. Zaradi velikega signala reducenta pri 200 nm in na RI detektorju (velika koncentracija) je bilo praktično nemogoče določiti kromatografske vrhove ostalih zvrsti. Ker spojin, ki nastanejo po hidraciji dimerne DHA, po dodatku reducenta z razpoložljivo opremo nismo mogli določiti, smo detekcijo izvajali pri valovni dolžini 260 nm, kjer TCEP in zvrsti, ki nastanejo po hidraciji dimerne DHA ne absorbirajo, absorbira pa AA.

4.4.2.1 Kinetika nastajanja AA po dodatku reducenta v izolirane spojine iz vrha 1, vrha 2, vrha 4, vrha 5 in DHA

V preglednici 3 je prikazan nastanek AA iz posameznih zvrsti po dodatku reducenta. Iz rezultatov je razvidno, da pri dodatku reducenta TCEP v frakcijo DHA dobimo velike

količine AA. Vrednost integrala je relativno konstantna, saj vsa AA nastane že po 2 urah po dodatku reducenta.

Po dodatku reducenta TCEP v spojine, izolirane kot vrh 4 in vrh 5, opazimo manjše količine nastale AA že 2 uri po dodatku TCEP. Za razliko od DHA, pa v omenjenih primerih opazimo povečevanje koncentracije AA tudi pri podaljšani inkubaciji. Slednje je posebej razvidno pri redukciji spojine eluirane kot vrh 4, kjer po 7 urah opazimo dvakratno povečanje začetne koncentracije, po 62 urah pa kar štirikratno povečanje začetne koncentracije AA. Ker je redukcija s TCEP v MFK relativno hitra (Wechstersbach in sod., 2007), je počasno naraščanje vsebnosti AA najverjetneje posledica nastajanja DHA iz spojin, eluiranih v vrhu 4 in vrhu 5 (sliki 21 in 23), kot pa direktne redukcije obeh spojin v AA.

Po dodatku reducenta TCEP v spojino, eluirano kot vrh 1, opazimo le manjše količine nastale AA, ki so praktično na meji detekcije. Izmerjene vrednosti, bi lahko pripisali tudi onečiščenju s spojino, ki se eluirana kot vrh 2, saj se slednja pretvarja v DHA.

Preglednica 3: Kinetika nastajanja AA po dodatku reducenta TCEP v izolirane spojine iz vrha 1, vrha 4, vrha 5 in DHA

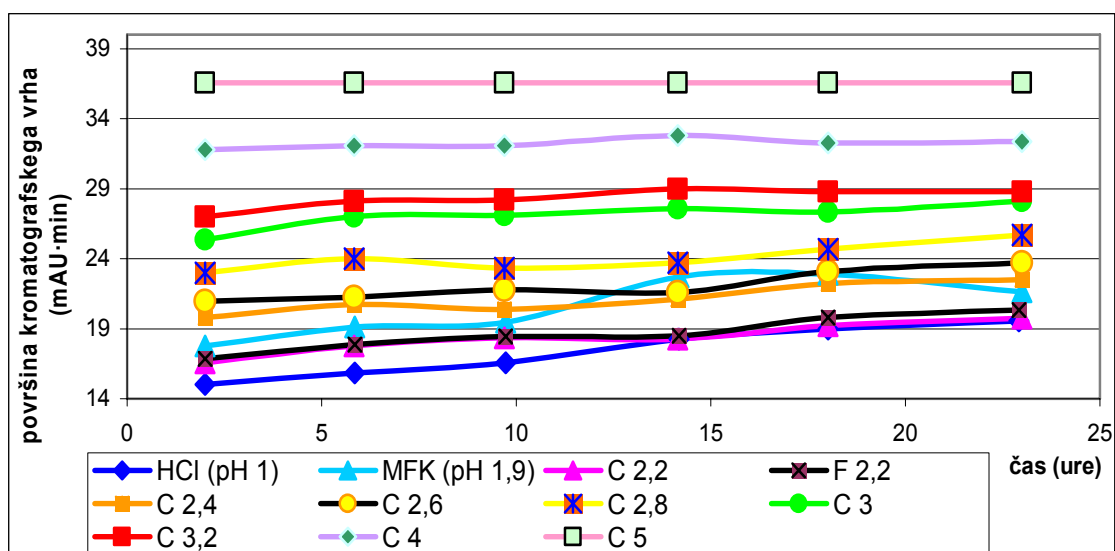
ČAS (ure)	VRH 1 (mAU·min)	DHA (mAU·min)	VRH 4 (mAU·min)	VRH 5 (mAU·min)
2	0,000	19,223	0,678	1,109
4	0,096	19,199	1,077	1,128
6	0,149	19,201	1,375	1,221
9	0,152	19,231	1,588	1,345
64	1,191	19,234	2,642	2,224

Analize spojine, ki se eluira na vrhu 2, nismo mogli opraviti, saj je bila zaradi slabe ločbe na koloni le-ta onečiščena s spojinama vrh 1 in DHA.

4.5 RAZTAPLJANJE DIMERNE DHA PRI RAZLIČNIH pH VREDNOSTIH IN REDUKCIJA V AA PO DODATKU TCEP

Na sliki 30 je predstavljena kinetika tvorbe AA po dodatku reducenta TCEP v raztopine z različnimi pH vrednostmi, v katerih smo predhodno raztopili dimerno DHA. Začetne nižje vrednosti nastale AA v bolj kislih raztopinah se skladajo s pojavom različnih zvrsti pri teh pogojih (slika 14). Manjše izkoristke pri nižjih pH vrednostih smo predhodno ugotovili tudi s spektrofotometričnim spremljanjem tvorbe AA med 30 minutno hidracijo dimerne DHA (slika 19).

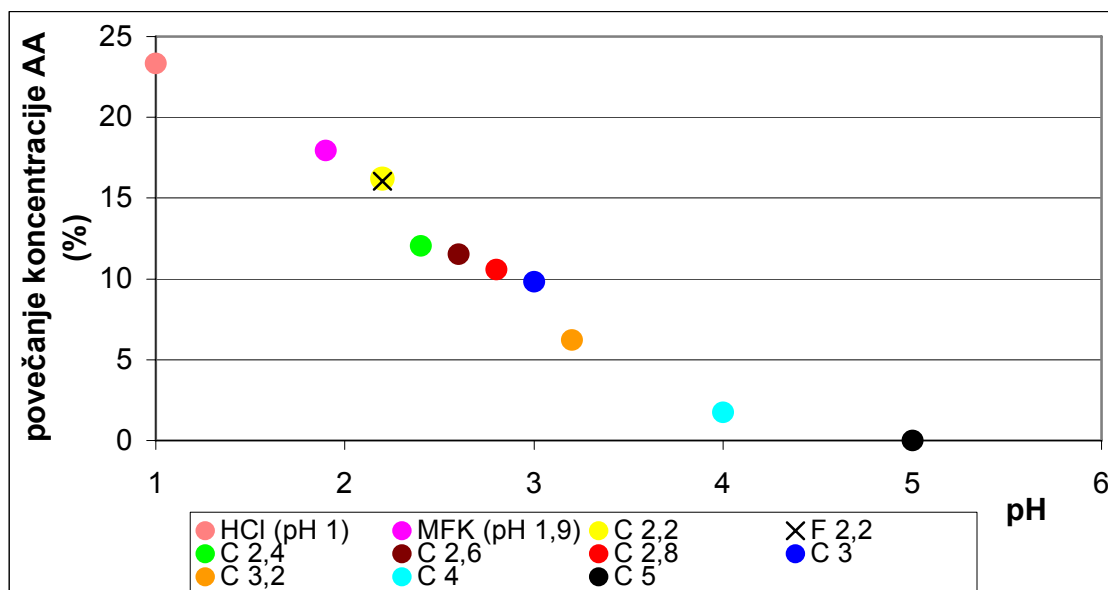
Pri pH 5, kjer dosežemo največje začetne izkoristke, se koncentracija DHA med 23 urno inkubacijo ne spreminja. V bolj kislih raztopinah pa lahko opazimo naraščanje vsebnosti AA med inkubacijo. Prirastek, izražen kot delež nastale AA, med prvo meritvijo po dveh urah in zadnjo meritvijo po 23 urah, je prikazan na sliki 31. Iz grafa je razvidno, da je delež prirasta odvisen od pH. V najbolj kisli raztopini, 0,1 M HCl, znaša več kot 20 %. Pri pH 4, kjer še opazimo prirastek, ta znaša manj kot 5 % vrednosti, določene po 2 urah.



Slika 30: Kinetika tvorbe AA po dodatku reducenta TCEP v raztopine dimerne DHA pri različnih pH vrednostih

Zorman Š. Hidracija dimerne dehidroaskorbinske kisline v kislem pH.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za živilstvo, 2008



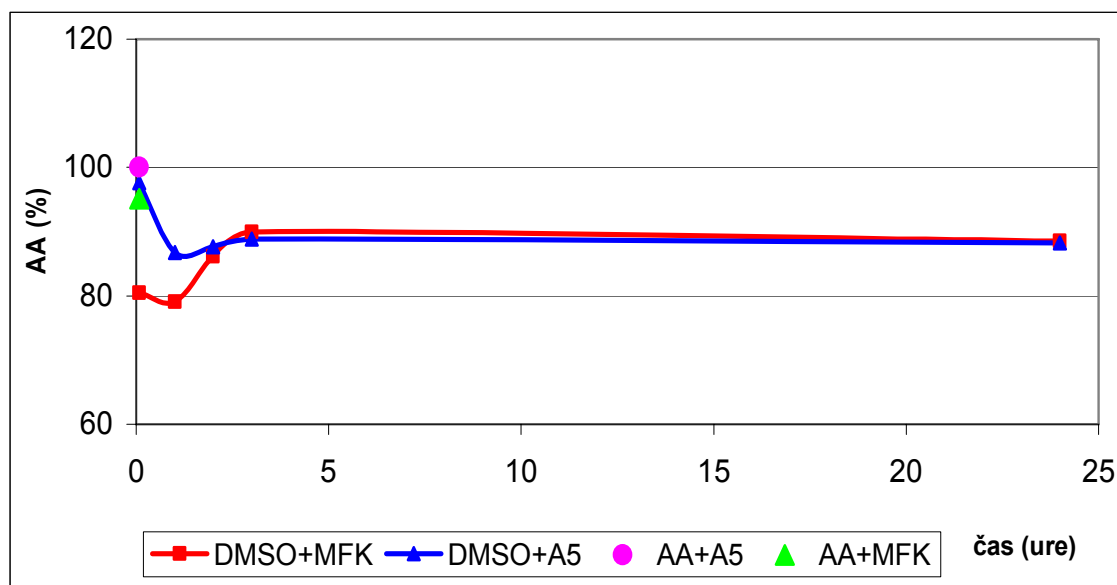
Slika 31: Delež prirasta AA z redukcijo DHA v različnih pufrih

4.6 RAZTAPLJANJE DIMERNE DHA V METANOLU IN DIMETILSULFOKSIDU

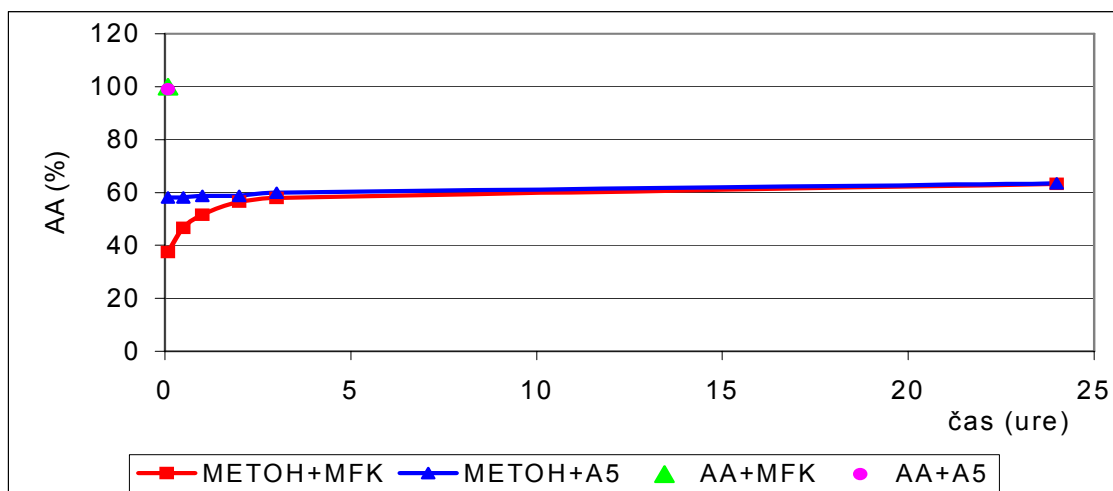
V predhodnih študijah so ugotovili, da je dimerna DHA obstojna v aprotičnih organskih topilih, če ta vsebujejo manj kot 0,4 % dodane H₂O (Hvoslef in sod., 1979). Da bi to preverili, smo dimerno DHA raztopili v DMSO, ki je vseboval 0,51 mg H₂O/mL in v metanolu, ki je vseboval 0,17 mg H₂O/mL. Vsebnosti vode v topilih so določili z metodo po Karl-Fisherju. Alikvot tako raztopljene DHA smo nato ob določenem času prenesli v raztopino 2 % MFK (pH 1,9) in v acetatni pufer pH 5, inkubirali v teh raztopinah 30 minut in nato dodali TCEP. Vrednosti absorbance pri 260 nm, ki je merilo za nastalo AA, so prikazane na slikah 32 in 33.

Iz slike 32, kjer so prikazani rezultati inkubiranja v DMSO, je razvidno, da ob krajših časih inkubacije določimo po prenosu v acetatni pufer več AA, kot po prenosu v MFK. Razlika v določeni AA v obeh pufrih se manjša, saj po 3 urah inkubacije v DMSO razlike ne opazimo več. Iz rezultatov je mogoče sklepati, da tudi v skoraj brezvodnem DMSO poteka hidracija dimerne DHA. Začetno zmanjševanje določene AA bi lahko pripisali nastajanju ostalih zvrsti in ne samo monomerni DHA, naknadno povečevanje pa delnim pretvorbam teh zvrsti v monomerno DHA.

Po raztapljanju dimerne DHA v metanolu (slika 33), se razlika med acetatnim pufrom in MFK s časom zmanjšuje podobno kot pri DMSO. Za razliko od raztapljanja v DMSO, pa ne opazimo začetnega zmanjševanja in naknadnega povečevanja koncentracije AA po prenosu v acetatni pufer pH 5. V tem primeru najverjetneje poteka hidracija, pri kateri nastane predvsem monomerna DHA, podobno kot pri direktnem raztapljanju v pufru s pH 5. Manjšo hitrost hidracije kot v vodnem mediju (Poredoš, 2006) lahko pripišemo manjši koncentraciji vode v organskem topilu. Poleg tega je opazna razlika v deležu z redukcijo DHA pridobljene AA, ki je pri raztapljanju v metanolu nižja kot pri raztapljanju v DMSO, kar je najverjetneje posledica slabše topnosti dimerne DHA.



Slika 32: Delež z redukcijo DHA pridobljene AA po različnih časih hidracije dimerne DHA v DMSO, redukcija je bili izvedena v MFK in acetatnem pufru pH 5 ter merjena na spektrofotometru pri 260 nm



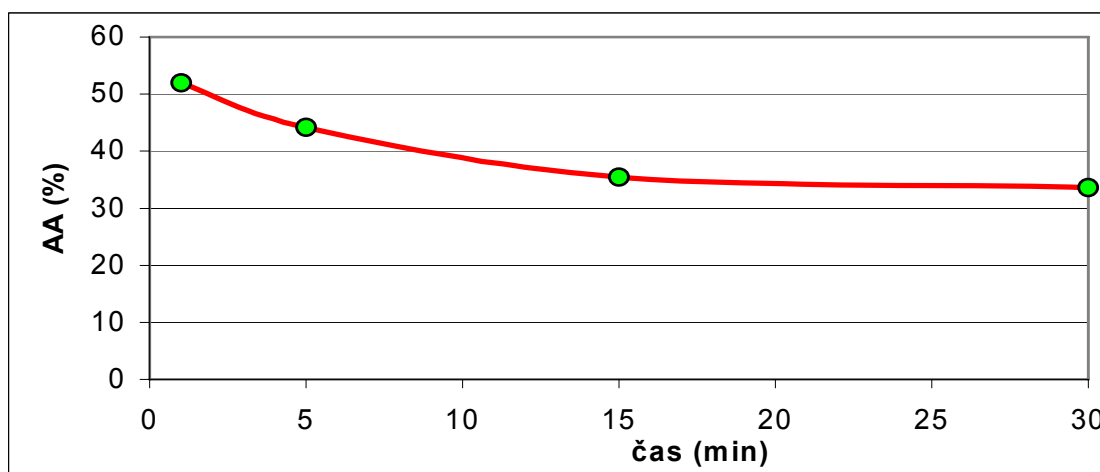
Slika 33: Delež z redukcijo DHA pridobljene AA po različnih časih hidracije dimerne DHA v metanolu, redukcija je bili izvedena v MFK in acetatnem pufru pH 5 ter merjena na spektrofotometru pri 260 nm

4.7 KARAKTERIZACIJA SINTEZIRANE DIMERNE DHA

Poleg komercialno dosegljive DHA smo tudi sami pripravili dimerno DHA. Postopek priprave je opisan v materialih in metodah. Z namenom, da bi ugotovili, ali smo uspeli pripraviti spojino, ki je identična komercialno dosegljivi DHA, smo naredili ustrezne analize, kjer smo preverjali hidrolizo pripravljene DHA v kislih raztopinah in izkoristke z redukcijo pripravljene DHA.

4.7.1 Hidracija sintetizirane dimerne DHA v kislem in naknadna redukcija do AA

Iz rezultatov, prikazanih na sliki 34, je razvidno, da se s podaljšanjem hidracije v kislem zmanjšuje izkoristek nastale AA, kar se sklada z predhodnimi ugotovitvami (Poredoš, 2006). 52 % izkoristek, prikazan na sliki 34, ustreza koncentraciji AA, ki smo jo določili po 1-minutni hidraciji sintetizirane dimerne DHA v MFK. To je manj od 76 %, kot so ugotovili za komercialno dimerno DHA (Poredoš, 2006).



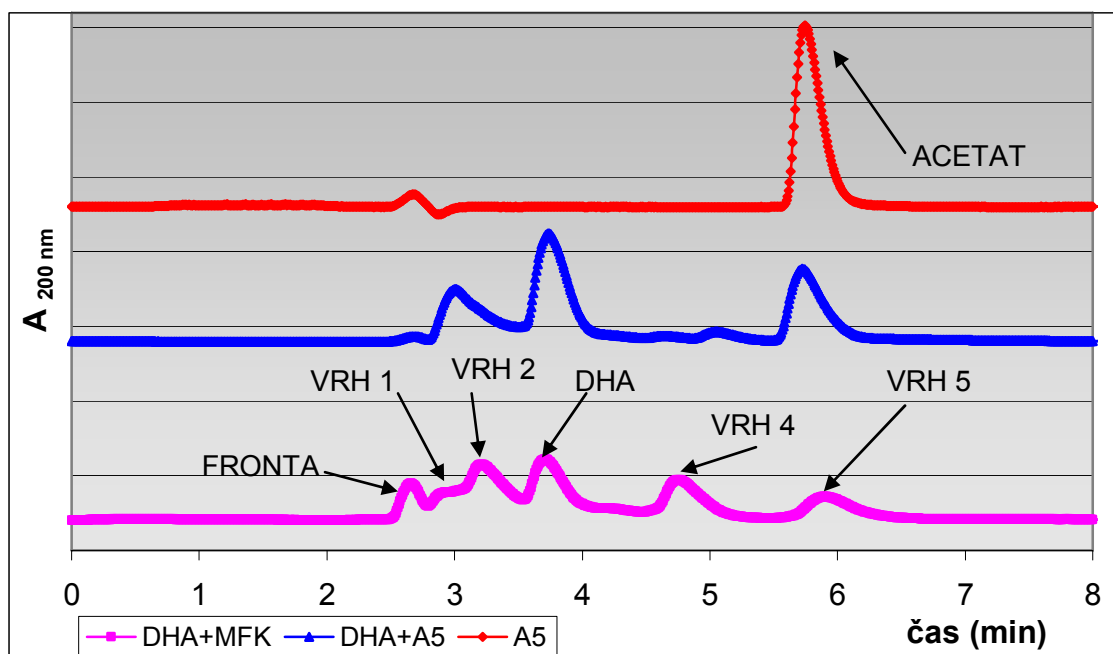
Slika 34: Delež z redukcijo DHA pridobljene AA po različnih časih hidracije sintetizirane dimerne DHA v MFK, kjer je bila redukcija izvedena v acetatnem pufru pH 5 in merjena na spektrofotometru pri 260 nm

Študij kinetike, prikazane na sliki 34, smo potrdili tudi s kromatografsko analizo nastale AA. Po hidraciji sintetizirane dimerne DHA v acetatnem pufru pH 5 in redukciji do AA z reducentom TCEP, smo določili le 62 % enake zatehte AA, po 30 minutni hidraciji v MFK pa le 30 % enake zatehte AA. Za 50 % manjši izkoristki po hidraciji v kislem se skladajo z rezultati, prikazanimi na sliki 19, ki veljajo za komercialno dosegljivo dimerno DHA.

4.7.2 Kromatografska analiza sintetizirane dimerne DHA, raztopljene v MFK in v acetatnem pufru pH 5

Iz rezultatov, prikazanih na sliki 35, je razvidno, da poteka hidracija drugače pri pH 2 kot pri pH 5. Razporeditev kromatografskih vrhov po raztapljanju v 2 % MFK je podobna kot pri komercialni dimerni DHA (slika 12). Seveda je potrebno upoštevati razliko v retencijskih časih, saj smo kromatografijo izvajali pri različnih pretokih.

Po raztapljanju v acetatnem pufru pH 5 dobimo manjše število vrhov in precej več monomerne DHA, ki se eluira malo pred štirimi minutami. Spojina, ki se eluira malo pred šestimi minutami, najverjetneje ustreza očetni kislini.



Slika 35: Elucijski diagram, ki je rezultat nanosa sintetizirane dimerne DHA 60 minut po raztapljanju v 2 % MFK, acetatnem pufru pH 5 in samega acetatnega pufra, pri pretoku 1 mL/min in absorbanci 200 nm

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Že v predhodnih študijah so ugotovili (Poredoš, 2006), da je komercialno dostopna dimerna DHA v kislem mediju nestabilna, saj lahko po dodatku reducenta, v AA pretvorimo le okoli polovico raztopljenе dimerne DHA. Dimerno DHA smo zato raztopili v 5 mM H₂SO₄ in jo v ustreznih časovnih intervalih analizirali na HPLC sistemu z univerzalnim RI detektorjem (slika 13) ter s spektrofotometričnim detektorjem pri valovni dolžini 200 nm (slika 12). Za to valovno dolžino smo se odločili zato, ker vemo, da DHA absorbira UV svetlobo pri valovnih dolžinah okoli 200 nm.

S pomočjo spektrofotometričnega detektorja na HPLC sistemu smo ugotovili, da pri raztapljanju dimerne DHA v kislem mediju v daljšem časovnem obdobju nastane več različnih spojin (slika 12). Po 8 minutah od raztapljanja nastanejo štiri različne spojine, poimenovane vrh 3, vrh 4, vrh 5 in vrh 6. Po 36 minutah po hidraciji vrh 6 izgine, pojavita se novi spojini, imenovani vrh 1 in vrh 2, ki ju v predhodnem merjenju ni bilo mogoče detektirati, saj je bila njuna koncentracija premajhna. Med kasnejšo inkubacijo smo ugotovili, da se vrhova 4 in 5 najprej povečata, nato se njuna koncentracija začne zmanjševati, po 24 urah je ni več mogoče detektirati. Z zniževanjem koncentracije vrha 4 in 5 se povečuje koncentracija vrha 2, iz česar lahko sklepamo, da se spojine iz vrhov 4 in 5 pretvarjajo v spojino, ki se izloči v vrhu 2. Spojina, ki se eluira kot vrh 1, se skozi celotno analizo konstantno povečuje. Predvidevamo, da tudi tukaj obstaja povezava z ostalimi zvrstmi.

Spojino, ki se eluira približno pri retencijskem času 3.7, smo poimenovali vrh 3 in predstavlja monomerno obliko DHA, saj pri encimski oksidaciji AA in hidraciji dimerne DHA pri pH 5, dobimo le ta kromatografski vrh (rezultat ni prikazan).

Spojina, ki se eluira kot vrh 1, je najverjetneje 2,3-diketogulonska kislina, prvi razgradni produkt monomerne DHA (Deutsch, 2000).

Že v uvodni analizi (slika 12) smo ugotovili, da se pri hidraciji dimerne DHA v kislil raztopini poleg monomerne DHA tvorijo še druge zvrsti. Zato smo podrobneje raziskali razlike v pretvorbi zvrsti pri pH 2 in pH 5. Dimerno DHA smo raztopili v 5 mM H₂SO₄ in počakali 20 minut, da je potekla delna hidracija. S tem smo zagotovili, da je v raztopini že prišlo do določenih sprememb, ki smo jih po izvedbi eksperimenta določili s HPLC sistemom. Rezultati na slikah 15a in 15b prikazujejo manjše razlike v hitrosti pretvorb med raztopinami z različnim pH. Kot je znano, je DHA v kislem mediju veliko bolj stabilna, zato se pretvorbe iz ene zvrsti v drugo odvijajo počasneje in manj intenzivneje v raztopini s pH 2 kot v raztopini s pH 5. Posledično nastane manjša količina različnih zvrsti, kar je omenjena analiza tudi pokazala.

Zanimalo nas je, ali na stabilnost in potek hidracije dimerne DHA poleg pH vpliva tudi koncentracija. Nekateri avtorji so namreč ugotovili, da koncentracija monomerne DHA raztopljenе v kislem mediju (pH 3), ne vpliva na njeno stabilnost (Bode in sod., 1990).

Da bi preverili, kako vpliva koncentracija dimerne DHA na pretvorbe v kislil raztopinah, smo pripravili raztopine dimerne DHA s koncentracijami 5 mg/mL, 2 mg/mL in 0,5 mg/mL. Z uporabo HPLC sistema smo v različnih časovnih intervalih sledili nastankom in razpadom

posameznih spojin ter na slikah 16, 17 in 18 dognali, da koncentracija nima večjega vpliva na kinetiko razpada dimerne DHA v kislem mediju. Velike razlike smo opazili le v koncentracijah posameznih zvrsti, kjer niso bili integrali kromatografskih vrhov pri koncentraciji 2 mg/mL za ustrezen faktor nižje kot bi morale biti v primerjavi s koncentracijo 5 mg/mL. Pri omenjeni analizi smo raztopino dimerne DHA pred filtriranjem centrifugirali, saj smo pri obeh večjih koncentracijah na steni mikrocentrifugirke opazili oborino. Slednje bi bilo lahko povezano s slabšo topnostjo dimerne DHA (Deutsch, 2000) pri večjih koncentracijah in relativno kratkim mešanjem (1 min), kar bi lahko vplivalo na manjše absolutne koncentracije posameznih zvrsti od pričakovanih.

Pri predhodnih raziskavah so ugotovili, da pri raztapljanju dimerne DHA pri pH vrednostih, ki so nižje od 5, po dodatku reducenta nastane manj AA (Poredoš, 2006). Da bi omenjeno trditev preverili, smo izvedli poskus, kjer smo dimerno DHA raztopili v ustreznih pufrih in MQ vodi ter v določenem časovnem obdobju dodali reducent TCEP ter spremljali razpad DHA s pomočjo spektrofotometra pri 260 nm. Izkazalo so je, da se količina nastale AA s časom hidratacije pred dodatkom reducenta zmanjšuje, kar se sklada s predhodnimi ugotovitvami (Poredoš, 2006). Tako smo pri raztapljanju v 0,1 M HCl raztopini po 30 minutah določili dobro polovico začetne koncentracije AA, v fosfatnem pufru pH 2 dve tretjini, v mili Q vodi 93 %, v acetatnem pufru pH 5 pa kar 99 %. Končne nižje vrednosti nastale AA v bolj kislih raztopinah se skladajo s pojavom različnih zvrsti pri teh pogojih.

Eden izmed ciljev naloge je bil izolirati posamezne zvrsti in spremljati pretvorbe izoliranih zvrsti. Na HPLC sistemu smo s pomočjo kromatogramov podrobneje raziskali pot pretvorbe teh zvrsti in povezavo med njimi. Tako smo ugotovili, da se 36 minut po začetku raztapljanja dimerne DHA v kislem mediju najprej razgradi zvrst vrh 6 (slika 12). Po naših predvidevanjih se omenjena zvrst pretvarja v vrh 1, 2 in 3, mogoče tudi v spojini vrh 4 in vrh 5, vendar je bila njuna koncentracija prenizka, saj je nismo uspeli detektirati (slika 20).

Na sliki 14, kjer smo spremljali hidratacijo dimerne DHA, je med drugim vidno začetno naraščanje ter nato hitro zniževanje koncentracije spojine eluirane kot vrh 5. Po analizi čiste spojine smo opazili hitro zmanjševanje koncentracije vrha 5 (sliki 21 in 22), saj se po 144 minutah poleg vrha 5 tvorijo še druge zvrsti poimenovane vrh 1, vrh 2 in DHA. Pri slednji je bila koncentracija na meji detekcije, zato jasnega odgovora, ali se spojina vrh 5 pretvarja samo v vrh 1 in 2 ali tudi do monomerne DHA, ne moremo zagotovo podati.

Podobno dogajanje smo opazili tudi za spojino, eluirano kot vrh 4 (slika 24), kjer prihaja do počasnejšega zniževanja koncentracije vrha 4, saj je po sedmih urah inkubacije še vedno mogoče določiti nekaj spojine vrh 4, medtem ko pri zvrsti vrh 5 tega ni bilo mogoče. Na osnovi pridobljenih podatkov smemo trditi, da je spojina vrh 4 v kislem nekoliko bolj stabilna kot vrh 5. Poleg tega smo ugotovili, da so pretvorbe iz vrha 4 enake pretvorbam vrha 5, razlika je le v količini nastale monomerne DHA, ki smo jo pri spojini vrh 4 lahko detektirali in posledično lahko trdimo, da se omenjena zvrst pretvarja tudi do monomerne DHA.

Pri kromatografski analizi čiste spojine vrha 2 (slika 25) smo ugotovili, da se koncentracija te spojine po 24 urni inkubaciji manjša, istočasno se skoraj simetrično povečuje koncentracija vrha 1, kar dokazuje povezavo pri pretvorbah med zvrstmi iz vrha 2 v vrh 1. Poleg omenjene pretvorbe se spojina vrh 2 najverjetneje pretvarja tudi v monomerno DHA, vendar smo tudi tukaj naleteli na problem nizkih koncentracij, ki so bile na meji detekcije in zato ne moremo zagotovo trditi, da pretvorba dejansko poteka.

Glede na pridobljene eksperimentalne podatke iz slike 28 smo ugotovili, da se DHA med celotno inkubacijo v nasprotju z večino ostalih zvrsti pretvarja izključno v eno spojino,

poimenovano vrh 1, saj ostalih zvrsti kot so vrh 2, 4 ali 5 nismo detektirali (slika 27). Tako kot pri pretvorbi vrha 2, smo tudi tukaj opazili sorazmerno zmanjševanje koncentracije DHA ter povečevanje koncentracije vrha 1. Analiza spojine vrh 1 (slika 14) je pokazala, da je to edina spojina, katere koncentracija se med celotno inkubacijo povečuje. To nam potrjuje kromatogram, nastal po analizi čiste spojine na sliki 29, kjer poleg omenjene spojine ne opazimo ostalih zvrsti. Tako je mogoče trditi, da je vrh 1 tudi po 20 urah inkubacije kinetično močno stabilna spojina, pri kateri ne potekajo nikakršne pretvorbe.

Na osnovi eksperimenta posameznih spojin, ki smo jih izoliranih s preparativno kromatografijo, smo dobili podatke o pretvorbah omenjenih zvrsti, med katerimi se je večina pretvarjala tudi v monomerno DHA. Poleg pretvorb med samimi zvrstmi nas je zanimalo, ali lahko v AA reduciramo še kakšno zvrst razen DHA.

Tudi pri tem eksperimentu smo DHA raztopili v kislem mediju, saj smo s tem zagotovili večje možnosti za nastanek zaželenih zvrsti. Na osnovi predhodnih študij smo se odločili, da analiz ne bomo opravljali z UV detektorjem pri 200 nm temveč pri 260 nm, kjer TCEP in zvrsti, ki nastanejo po hidraciji dimerne DHA, ne absorbirajo, absorbira pa AA.

Rezultati v preglednici 3 kažejo, da se po dodatku reducenta TCEP spojina, izolirana kot DHA, pretvori v AA. Količina nastale AA je konstantna, saj vsa AA nastane že po 2 urah po dodatku reducenta. Po dodatku reducenta v spojini vrh 4 in vrh 5 smo opazili manjše količine nastale AA, ki se je med inkubacijo časovno povečevala. Večje povečevanje koncentracije AA je opazno pri spojini, eluirani kot vrh 4, kjer se koncentracija AA po 60. urah poveča kar za štirikrat, medtem ko se pri vrhu 5 poveča bistveno manj, saj je bila že začetna vrednost na meji detekcije. Ker je redukcija DHA s TCEP v MFK relativno hitra (Wechstersbach in sod., 2007), je počasno naraščanje vsebnosti AA najverjetneje posledica nastajanja DHA iz spojin, eluiranih v vrhu 4 in vrhu 5 (sliki 21 in 23), ne pa posledica direktne redukcije obeh spojin v AA.

V okviru diplomskega dela smo med drugim določili vpliv pH topila v območju od pH 2 do pH 5 na nastanek različnih zvrsti pri raztapljanju dimerne DHA in redukcijo le-te do AA z uporabo reducenta TCEP. Kljub odločitvi, da bomo preverjali vpliv pH topila v območju od pH 2 do pH 5, smo kasneje naredili še nekaj analiz pri HCl s pH 1 ter 2 % MFK s pH 1,9. Za slednjo smo se odločili, saj se največkrat uporablja kot ekstrakcijski pufer pri določevanju AA.

Izsledke, ki smo jih dobili pri raztopinah z različnimi pH vrednostmi, v katerih smo predhodno raztopili dimerno DHA ter ji kasneje dodali reducent, smo predstavili na slikah 30 in 31. 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. Iz navedenih razlogov smo za omenjeno analizo uporabili citratni pufer z različnimi pH vrednostmi. Pri pH 2.2 smo poleg citratnega pufra uporabili še fosfatni pufer z enako pH vrednostjo, da smo preizkusili in potrdili dobljene rezultate.

Pri pH 5 smo dosegli največje začetne izkoristke in tukaj se koncentracija nastale AA med 23 urno inkubacijo ni spreminjala. Pri pH vrednostih 4 ali manj smo določili manjše začetne koncentracije AA, vendar smo pri vseh kasnejših meritvah ugotovili, da prihaja do postopnega povečevanja koncentracije AA. Manjše izkoristke pri nižjih pH vrednostih smo predhodno ugotovili tudi s spektrofotometričnim spremljanjem tvorbe AA med 30 minutno hidracijo dimerne DHA (slika 19). Pri nižjem pH (pod pH 4) smo s pomočjo analiz spoznali, da se količina reducirane AA časovno veča, kar dokazuje trditev, da se v kislem mediju iz dimerne DHA tvorijo različne zvrsti, ki se postopoma pretvarjajo tudi v DHA. Le-

te se kot novo nastala DHA s pomočjo reducenta lahko reducirajo do AA. Na sliki 31 se to pokaže v večanju prirasta AA. V najbolj kisli raztopini, 0,1 M HCl, znaša povečanje koncentracije AA več kot 20 %, pri pH 4, kjer še opazimo prirastek, ta znaša manj kot 5 %, medtem ko ga pri pH 5 ni. Še enkrat se je izkazalo, da je delež preostale DHA, ki jo lahko reduciramo v AA, sorazmeren s pH raztopine.

V predhodnih študijah so ugotovili, da je dimerna DHA obstojna v aprotičnih organskih topilih, če le-ta vsebujejo manj kot 0,4 % dodane H₂O, kar so potrdili z NMR (Hvoslef in sod., 1979). Naš namen je bil preučevati stabilnost in raztapljanje dimerne DHA v brezvodnih medijih, kjer je prisotna voda v majhnih količinah. Rezultati na sliki 32 kažejo, da se v prvi uri količina dimerne DHA, raztopljene v DMSO in kasneje prenesene v acetatni pufer, zmanjšuje v primerjavi s prenosom v MFK, kar pomeni, da do neke mere poteka hidracija dimerne DHA, ki se po 3 urah inkubacije konča.

Pri dimerni DHA, raztopljeni v metanolu (slika 33), ni opaznega zmanjševanja koncentracije AA po prenosu v acetatni pufer pH 5. V tem primeru najverjetneje poteka hidracija, pri kateri nastane predvsem monomerna DHA, podobno kot pri direktnem raztapljanju v pufru s pH 5. Manjšo hitrost hidracije kot v vodnem mediju (Poredoš, 2006) lahko pripišemo manjši koncentraciji vode v organskem topilu.

Eden izmed namenov naših raziskovanj je bila priprava dimerne DHA z oksidacijo AA. Odločili smo se za postopek, ki so ga izvedli Ohmori in sod. (1983). Sintezo dimerne DHA smo potrdili s spektrofotometričnimi (slika 34) in kromatografskimi meritvami (slika 35). S spektrofotometrično analizo smo ugotovili, da se koncentracija monomerne DHA, ki se s pomočjo reducenta TCEP pretvarja v AA, manjša, če raztopimo sintetizirano DHA v pufru pH 2. To pa je po dosedanjih dognanjih posledica pretvarjanja dimerne DHA v monomerno v kislem mediju pred redukcijo. Podobne rezultate smo dobili pri analizi komercialno dostopne dimerne DHA (slika 14), kar nam potrjuje, da ima sintetizirana DHA dimerno obliko. S produkcijo lastne DHA po redukciji le-te smo dobili samo 52 % izkoristek glede na komercialno AA, ki je služila kot standard. Predvidevamo, da je to posledica nečistoč in starih kemikalij. Na slabše izkoristke je lahko vplivala tudi dolgotrajna oksidacija AA v metanolu s pomočjo aktivnega oglja kot katalizatorja, ki je potekala preko cele noči.

Kromatografske analize tako pripravljene DHA v kislem mediju so pokazale podobnosti s komercialno dimerno DHA (slika 12). Pri tem pa moramo upoštevati razliko v retencijskih časih, saj smo kromatografijo izvajali pri različnih pretokih. Ko smo sintetizirano DHA raztapljali v acetatnem pufru pH 5, nas je le-ta motil pri analizi, saj se je eluiral pri enakem retencijskem času kot vrh 5. Po raztapljanju v pH 5 je nastalo precej več monomerne DHA, kar se sklada z ugotovitvami za komercialno dostopno dimerno DHA. Spojina, ki se eluira malo pred šestimi minutami, najverjetneje ustreza očetni kislini.

5.2 SKLEPI

Na osnovi opravljenega dela lahko povzamemo naslednje sklepe:

- Hidracija dimerne DHA poteka drugače pri pH 2 kot pri pH 5. Medtem ko pri pH 5 nastane le monomerna DHA, smo pri pH 2 poleg monomerne DHA detektirali še najmanj pet različnih spojin, katerih koncentracija se med enodnevno inkubacijo spreminja.
- Koncentracija raztopljene dimerne DHA v kislem pH ne vpliva na potek hidracije.
- Najmanj tri od identificiranih zvrsti (vrh 4, vrh 5 in vrh 6) se delno pretvarjajo tudi v monomerno DHA.
- Spojina, ki smo jo identificirali kot vrh 1, nastaja iz vseh izoliranih zvrsti, tudi iz monomerne DHA.
- Koncentracija spojine, identificirane kot vrh 1, se povečuje skozi celotno enodnevno inkubacijo v raztopini dimerne DHA v pH 2. Izolirana spojina iz vrha 1 je stabilna, saj se njena koncentracija med enodnevno inkubacijo ne spreminja.
- V raztopinah spojin, ki smo ju identificirali kot vrh 4 in vrh 5, smo po dodatku reducenta TCEP ugotovili postopno pretvorbo do AA med tridnevno inkubacijo.
- Delež komercialno dostopne dimerne DHA, ki jo lahko reduciramo v AA, je odvisen od pH topila, kjer poteka raztapljanje. V območju od pH 2 do pH 5 določimo večje izkoristke nastale AA pri večjih pH vrednostih.
- Kljub manjšim izkoristkom pri nižjih pH vrednostih tu nastaja AA dalj časa. Počasnejše nastajanje AA je povezano s tvorbo monomerne DHA med enodnevno inkubacijo.
- Z oksidacijo AA v metanolu smo iz nastale monomerne DHA v metiletilketonu uspeli sintetizirati dimerno DHA.
- Sintetizirana dimerna DHA se je enako kot komercialna DHA pretvarjala v več zvrsti, če smo jo raztopili v pufru s pH 2.

6 POVZETEK

V okviru diplomskega dela smo raziskovali hidracijo dimerne DHA v kislem pH in jo spremljali spektrofotometrično preko redukcije do AA pri 260 nm. Ugotovili smo, da se v kislih pufrih zmanjšuje količina dimerne DHA, saj se le-ta pretvarja v različne produkte. V acetatnem pufru pH 5 in MQ vodi se količina nastale DHA skoraj nič ne spreminja.

Če komercialno dostopno dimerno DHA raztopimo v acetatnem pufru pH 5, je ta relativno stabilna. Pri nižjih pH vrednostih ob raztapljanju in hidraciji dimerne DHA potekajo reakcije, ki omogočajo pretvorbo DHA v produkte, ki jih ne moremo reducirati v AA. Analiza dimerne DHA, raztopljene v različnih pufrih, je ob dodatku reducenta TCEP pokazala, da kljub manjšim izkoristkom pri nižjih pH vrednostih, AA nastaja dalj časa. To je povezano s tvorbo monomerne DHA iz različnih spojin med 24 urno inkubacijo.

Ugotovili smo tudi, da se pri raztapljanju komercialno dostopne dimerne DHA v kislem mediju (pH okoli 1,9) poleg monomerne DHA tvori še najmanj pet različnih spojin. Identificirane zvrsti vrh 4, vrh 5 in kinetično nestabilen vrh 6, katerega koncentracije ni več mogoče detektirati po 36 minutah inkubacije, se delno pretvarjajo tudi v monomerno DHA (vrh 3). Koncentracija spojine poimenovane vrh 1 se med 24 urno inkubacijo povečuje, saj nastaja iz vseh izoliranih zvrsti, tudi iz vrha 2 in monomerne DHA. Izolirana spojina je stabilna, saj se ne pretvarja v ostale zvrsti, kar nam med procesom inkubacije potrjuje njena nespremenjena koncentracija.

Posameznim zvrstem smo po izolaciji dodali reducent TCEP in v kislem spremljali pretvorbe izoliranih zvrsti. Ugotovili smo, da se vrh 4 in vrh 5 dejansko obnašata podobno, saj se obe zvrsti v daljšem časovnem obdobju postopoma pretvarjata do z redukcijo nastale AA. Vrhu 6 ni bilo mogoče dodati reducenta, saj se je produkt prehitro pretvoril v ostale zvrsti in zato redukcija ni bila mogoča. Prav tako ni bilo mogoče spremljati pretvorb tako vrha 1 kot tudi vrha 2 po dodatku reducenta, saj je prišlo pri izolaciji omenjenih zvrsti tudi do izolacije vrha 3. Monomerna DHA, ki smo jo prav tako kot ostale zvrsti izolirali iz dimerne DHA, raztopljene v kislem, je dala pričakovane rezultate, saj se vrednost z redukcijo nastale AA med samo analizo ni spreminjala.

Eden izmed ciljev diplomskega dela je bil raziskati, ali koncentracija vpliva na potek raztapljanja dimerne DHA, zato smo v kislem mediju raztopili različne koncentracije dimerne DHA in s pomočjo HPLC sistema ugotovili, da zgornja trditev ne drži.

Kadar ni komercialno dostopne dimerne DHA, jo je mogoče pripraviti preko oksidacije z raztapljanjem AA v metanolu in ob uporabi aktivnega oglja in kisika iz zraka kot oksidanta. Po izpiranju kompleksa DHA-metanol z MEK dobimo dimerno DHA z nekoliko več nečistočami, a podobnimi lastnostmi, kot jih ima komercialna DHA.

7 VIRI

- Ausman L.M. 1999. Criteria and recommendations for vitamin C intake. *Nutrition Reviews*, 57: 222-224
- Ball G.F.M. 1998. Bioavailability and analysis of vitamins in foods. London, Chapman and Hall: 517-560
- Bode A.M., 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
- Davey W.M., Montagu M.V., Inze D., Sanmartin M., Kanelis A. Smirnoff N., Bejzie J.J. 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. 2000. Dehydroascorbic acid. *Journal of Chromatography A*, 881: 299-307
- 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
- Dietz H. 1970. A new preparation of dimer dehydro-L-ascorbic acid and its dissociation in solution. *Annalen der Chemie - Justus Liebig*, 738: 206-208
- Esteve M.J., Farre R., Frigola A., Garsiaa-Cantabella J.M. 1997. Determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in blood plasma and serum by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 688: 345-349
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. 2002. Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, 2002. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization: Chapter 6: Vitamin C: 15 str.
<http://www.fao.org/docrep/004/Y2809E/y2809e00.htm> (22. jun. 2007)
- 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
- Greenberg E.R., Baron J.A., Tosteson T.D., Freeman D.H., Beck J.G., Bond J.H., Colacchio T.A., Collier J.A., Frankl H.D., Haile R.W., Mandel J.S., Nierenberg D.W., Rothstein R., Snover D.C., Stevens M.M., Summers R.W., van Stolk R.U. 1994. A clinical trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma. *New England Journal of Medicine*, 331: 141-147
- Guyton C.A. 1988. *Medicinska fiziologija*. 9. ed. Hrvatskosrbsko izdanje. Beograd, Zagreb, Medicinska knjiga: 1221-1222
- Hvoslef J., Pedersen B. 1979. The structure of dehydroascorbic acid in solution. *Acta Chemica Scandinavica B*, 33: 503-511
- Hvoslef J., Pedersen B. 1980. The structure of the methanol complex of dehydroascorbic acid. *Acta Chemica Scandinavica B*, 34: 285-288
- 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
- Jung C., Wells W.W. 1998. Spontaneous conversion of L-dehydroascorbic acid to L-ascorbic acid and L-erythroascorbic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 355: 9-14
- 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
- Kennedy J.F., Rivera Z., Lloyd L.L., Warner F.P., Jumel K. 1992. L-Ascorbic acid stability in aseptically processed orange juice in Tetra Brik cartons and the effect of oxygen. *Food Chemistry*, 45: 327-331
- Klofutar C., Šmalc A., Rudan-Tasič D. 1998. Kvantitativno določanje vitamina C. V: Klofutar C., Šmalc A., Rudan-Tasič D. *Laboratorijske vaje iz kemije*. 3. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 282-285
- Kobovc T. 2000. Določanje vsebnosti vitamina C v različnih vrstah zelenjave. *Diplomsko delo*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 4-60
- Koshiishi I., Mamura Y., Liu J., Imanari T. 1998a. Dergadation of dehydroascorbate to 2,3-diketogulonate in blood circulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1425: 209-214
- Koshiishi I., Mamura Y., Imanari T. 1998b. Bicarbonate promotes a cleavage of lactone ring of dehydroascorbate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1379: 257-263

- Kueller V. 1999. Vitamins: Ascorbic acid. V: Wiley encyclopedia of food science and technology. 4 volume Set. 2nd ed. Francis F. J. (ed.). Massachusetts, John Wiley & Sons: 2449-2467
- Kurata T., Nishikawa Y. 2000. Chemical characteristics of dehydroascorbic acid. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64: 1651-165
- Lee S.K., Kader A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20: 207-220
- Levine M., Rumsey S.C., Daruwala R., Park J.B., Wang Y. 1999. Criteria and recommendations for vitamin C intake. *Journal of the American Medical Association*, 281: 1415-1423
- Losito I., Zambonin C.G., 1996. Double electropolymer modified platinum electrode to follow the kinetic process $H_2O_2 +$ ascorbic acid. Influence of the reaction on amperometric biosensor applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 410: 181-187
- 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. 11th ed. New York, Saunders: 1321 str.
- Mali B. 1999. Vsebnost L-AA v izdelkih iz paprike. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 4-64
- Matthews R.F., Hall J.W. 1978. Ascorbic acid, dehydroascorbic acid and diketogulonic acid in frozen green peppers. *Journal of Food Science*, 43: 532-534
- Miyake N., Kurata T., 1998. Possible formation of dehydro-L-ascorbic acid from 2,3-diketo-L-gulonic acid in an aqueous solution. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62: 1419-1421
- Muller-Mulot W. 1970. Crystalline dimer dehydroascorbic acid. II. Demonstration of the dimer structure and crystal form. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 351: 52-56
- Nishikawa Y., Toyoshima Y., Kurata T. 2001 Identification of 3,4-dihydroxy-2-oxo-butanal (L-threosone) as an intermediate compound in oxidative degradation of dehydro-L-ascorbic acid and 2,3-diketo-L-gulonic acid in a deuterium oxide phosphate buffer. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65: 1707-1712
- Ohmori M., Higashioka H., Takagi M. 1983. Pure dehydro-L-ascorbic acid prepared by O_2 -oxidation of L-ascorbic acid with active charcoal as catalyst. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47: 607-608

- 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
- Pecherer B. 1951. The preparation of Dehydro-L-ascorbic acid and its methanol complex. Some reactions of Dehydro-L-ascorbic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 73: 3827-3830
- Poredoš T. 2006. Stabilnost AA in DHA v vodnih raztopinah. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 10-10
- Serpen A., Gokmen V. 2007. Reversible degradation kinetics of ascorbic acid under reducing and oxidizing conditions. *Food Chemistry*, 104: 721-725
- Terada K. 1966. *Ninhon Kagaku Kaishi*, 40: 196: Cit. po: 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
- Tessier F., Birlouez-Aragon I., Tjani C., Guillard J.C. 1996. Validation of a micromethod for determining oxidized and reduced vitamin C in plasma by HPLC-fluorescence. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 66: 166-170
- Tolbert B.M., Seib P.A. 1982. *Ascorbic acid: Its chemistry, metabolism and uses*. Washington DC, American Chemical Society: 101-123
- Tsivgoulis G.M., Afroudakis P.A., Ioannou P.V. 2004. Preparation of dehydro-L-ascorbic acid dimer by oxidation of ascorbic acid with arsenic acid/iodine and formation of complexes between arsenious acid and ascorbic acid. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98: 649-656
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266: 37-56
- Vanderslice J.T., Higgs D.J., Hayes J.M., Block G. 1990. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid content of foods-as eaten. *Journal of Food Composition and Analysis*, 3, 2: 105-118
- Wechtersbach L., Cigić B. 2007. Reduction of dehydroascorbic acid at low pH. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70: 767-772
- Wilson X.J. 2002. The physiological role of dehydroascorbic acid. *FEBS Letters*, 527: 5-9
- Yong L.C., Brown C.C., Schatzkin A., Dresser C.M., Slesinski M.J., Cox C.S., Taylor P.R. 1997. Intake of vitamins E, C and A and risk of lung cancer. *American Journal of Epidemiology*, 146: 231-243

ZAHVALA

V prvi vrsti se za dobre ideje iskreno zahvaljujem doc. dr. Blažu Cigiću, ki je s svojo strokovno pomočjo, koristnimi nasveti in predlogi pripomogel k nastanku diplomskega dela. Bil je mentor z veliko potrpežljivosti, ni mu bilo odveč svetovati in vzpodbujati, ko sem to najbolj potrebovala. Skratka, bil je mentor v pravem pomenu besede, od katerega sem se veliko naučila.

Za pomoč pri eksperimentalnem delu, praktične nasvete, klepete in urejanje podatkov se moram posebej zahvaliti neuradnemu mentorju Luki Wechtersbachu, brez katerega bi bila pri laboratorijskem delu velikokrat osamljena in brez posladkov.

Za strokovne popravke se zahvaljujem recezentki doc. dr. Lei Pogačnik ter vsem ostalim zaposlenim na Katedri za kemijo, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani, ki so mi kakorkoli pomagali pri izdelavi diplomskega dela.

Za pregled diplomskega dela in referenc ter svetovanju glede literature se zahvaljujem univ. dipl. inž. živ. tehnol. Ivici Hočevar.

Zahvala gre tudi Adi Kovač, ki je z veliko mero strpnosti do vseh strokovnih izrazov in novosti v pravopisu, opravila lektoriranje.

Velika zahvala gre sestri Lizi, ki mi je stala ob strani ter pomagala pri tehnični izvedbi naloge in družini Katalina za veliko mero strpnosti pri pisanju diplomskega dela.

Mami, oči, hvala, ker sta z razumevanjem sprejemala vse moje muhe ter mi pomagala tako moralno kot tudi finančno. Brez vaju mi ne-bi uspelo. Hvala tudi vsem ostalim sorodnikom, predvsem Zormanovim, ki so mi polepšali študijska leta.

Zadnja, a zagotovo ne najmanj pomembna zahvala pa gre Milanu, ki je imel v času študija veliko mero potrpežljivosti, mi zaupal in me vzpodbujal pri doseganju ciljev, ki sem si jih zadala. Lubi moj, uspelo mi je! Hvala za vse! Mwa!