

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jure LAZNIK

**STABILNOST ASKORBINSKE KISLINE  
VKLJUČENE V LIPOSOME**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jure LAZNIK

**STABILNOST ASKORBINSKE KISLINE VKLJUČENE V  
LIPOSOME**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**STABILITY OF ASCORBIC ACID ENCAPSULATED INTO  
LIPOSOMES**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za biokemijo in kemijo živil, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan prof. dr. Blaž Cigić in za recenzenta prof. dr. Rajko Vidrih.

Mentor: prof. dr. Blaž Cigić

Recenzent: prof. dr. Rajko Vidrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

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

Jure Laznik

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK UDK 577.164.2 : 577.352.4 : 664.022 (043) = 163.6

KG askorbinska kislina / inkapsulacija / liposomi / dipalmitoil fosfatidilholin / holesterol / *Aeropyrum pernix* / modelne raztopine / bakrovi ioni / termična stabilnost / jabolčni sok / fermentirani mlečni izdelki / spektrofotometrija / visokotlačna tekočinska kromatografija

AV LAZNIK, Jure

SA CIGIĆ, Blaž (mentor) / VIDRIH, Rajko (recenzent)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

LI 2013

IN STABILNOST ASKORBINSKE KISLINE VKLJUČENE V LIPOSOME

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP XII, 65 str., 17 preg., 18 sl., 23 pril., 86 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Askorbinsko kislino (AK) smo stabilizirali z vključitvijo v liposome, pripravljene iz dipalmitoilfosfatidil holina (DPPC), iz mešanice DPPC in holesterola ter iz mešanice DPPC in lipidov arheje *Aeropyrum pernix*. Pripravili smo jih po metodi dehidracije/rehidracije tankega lipidnega filma v raztopini AK in citratnih pufrov. Inkubirali smo jih v modelnih izoosmolarnih raztopinah citratnih, formiatnih in acetatnih pufrov v prisotnosti ali odsotnosti bakrovih ionov. Pripravljene modelne raztopine smo hranili pri 25 °C in določali AK po reakciji z ABTS\*. Razpolovno dobo AK smo z vključitvijo v liposome podaljšali v večini raztopin, zlasti v prisotnosti bakrovih ionov. Liposomi, pripravljeni samo iz DPPC fosfolipidov, so najbolje stabilizirali AK pri 25 °C, medtem ko so pri segrevanju do 60 °C bolj učinkoviti DPPC/hol, saj puščajo počasneje in nimajo očitnega faznega prehoda. Liposome z vključeno AK smo inkubirali tudi v živilih. AK, dodano v živila, smo določali s HPLC. AK smo z vključitvijo v DPPC liposome uspešno stabilizirali v jabolčnem soku pri 25 °C in 4 °C in fermentiranem mlečnem napitku (Actimel) pri 4 °C. Razlika v osmolarnosti raztopin v liposomih in zunaj liposomov je negativno vplivala na stabilnost AK v jabolčnem soku.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 577.164.2 : 577.352.4 : 664.022 (043) = 163.6

CX ascorbic acid / encapsulation / liposomes / dipalmitoyl phosphatidylcholine / cholesterol / *Aeropyrum pernix* / model solutions / copper ions / thermal stability / apple juice / fermented milk product / spectrophotometry / high pressure liquid chromatography

AU LAZNIK, Jure

AA CIGIĆ, Blaž (supervisor) / VIDRIH, Rajko (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology

PY 2013

TI STABILITY OF ASCORBIC ACID ENCAPSULATED INTO LIPOSOMES

DT Graduation thesis (University studies)

NO XII, 65 p., 17 tab., 18 fig., 23 ann., 86 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Ascorbic acid (AA) was stabilised by encapsulation in dipalmitoyl phosphatidyl cholin (DPPC) liposomes, liposomes formed from DPPC and cholesterol (DPPC/chol) and liposomes formed from DPPC and lipids of archaea *Aeropyrum pernix*. Liposomes were prepared by dehydration/rehydration method of thin lipid film in solutions of AA and citrate buffers and later incubated at 25 °C in isoosmolar citrate, formate and acetate buffers in the presence or absence of copper ions. The content of ascorbic acid was determined by radical ABTS'. The result of encapsulation of AA was that we have extended its half life in comparison with a free ascorbic acid, especially in the presence of copper ions. DPPC liposomes were more efficient in stabilization of AA than DPPC/chol or DPPC/*A. pernix* liposomes at 25 °C. DPPC/chol showed better thermal stability when heated to 60 °C as the leakage of AA was slower than from DPPC liposomes. We successfully stabilised AA incorporated in DPPC liposomes also in apple juice at 25 °C and 4 °C and in a fermented milk product (Actimel) at 4 °C. AA incorporated in real food samples was determined by HPLC. The differences in osmolarity of solutions inside liposomes and solutions outside liposomes have a negative influence on the stability of AA in apple juice.

**KAZALO VSEBINE**

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG.....</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN NALOGE.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>3</b>
2.1 ASKORBINSKA KISLINA .....	3
<b>2.1.1 Kemijske lastnosti AK .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2 Fizikalne lastnosti AK.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.3 Biološko delovanje AK.....</b>	<b>5</b>
2.1.3.1 Antioksidant in reducent .....	5
2.1.3.2 Encimski kofaktor .....	5
2.1.3.3 Prooksidativno delovanje .....	6
2.1.3.4 Biosinteza AK v živalski in rastlinski celici .....	6
2.1.3.5 Vloga AK v človeškem organizmu .....	7
<b>2.1.4 AK v živilih .....</b>	<b>9</b>
2.1.4.1 Prehranski viri .....	9
2.1.4.2 Dodajanje AK v živila.....	10
<b>2.1.5 Stabilnost AK.....</b>	<b>11</b>
2.1.5.1 Vpliv predelave živil na stabilnost AK .....	12
2.1.5.2 Razgradnja AK.....	12
<b>2.1.6 Stabilizacija AK.....</b>	<b>14</b>
2.1.6.1 Enostavne metode stabilizacije AK.....	14
2.1.6.2 Tehnološko zahtevnejše metode stabilizacije AK.....	14
<b>2.1.7 Metode določanja AK .....</b>	<b>15</b>

2.2 LIPOSOMI.....	17
2.2.1 Mikroinkapsulacijska tehnologija .....	17
2.2.2 Definicija, kemijske in strukturne lastnosti liposomov.....	18
2.2.3 Stabilnost liposomov .....	19
2.2.4 Metode za pripravo liposomov.....	20
2.2.5 Uporaba liposomov .....	22
2.2.6 Arheosomi .....	23
3 MATERIALI IN METODE .....	24
3.1 MATERIALI.....	24
3.1.1 Ostale kemijske spojine .....	24
3.1.2 Aparature.....	25
3.1.3 Ostala laboratorijska oprema .....	26
3.2 METODE DELA .....	27
3.2.1 Priprava liposomov z vključeno AK.....	27
3.2.1.1 Priprava raztopine AK v citratnem pufru .....	28
3.2.1.2 Priprava liposomov iz mešanice lipidov DPPC/hol in DPPC/A. <i>pernix</i> .....	28
3.2.1.3 Priprava pufrov za dializo .....	28
3.2.2 Priprava modelnih raztopin .....	29
3.2.2.1 Priprava pufrov za modelne raztopine.....	29
3.2.2.2 Priprava raztopine Cu <sup>2+</sup> ionov.....	29
3.2.2.3 Priprava modelnih raztopin s prosto AK .....	29
3.2.2.4 Priprava modelnih raztopin z AK, vključeno v liposome .....	30
3.2.3 Spektrofotometrično določanje AK po reakciji z ABTS'.....	31
3.2.3.1 Priprava reagenta ABTS' .....	32
3.2.3.2 Priprava vzorcev za določanje vsebnosti AK z ABTS' .....	32
3.2.4 AK v realnih raztopinah .....	34
3.2.4.1 Priprava liposomov .....	34
3.2.4.2 Priprava realnih raztopin za spremljanja stabilnosti AK z in brez liposomov .....	35
3.2.4.3 Priprava vzorcev in HPLC analiza .....	35
4 REZULTATI .....	36
4.1 STABILNOST PROSTE AK V PUFRIH BREZ IN OB DODATKU Cu <sup>2+</sup> .....	36
4.2 STABILIZACIJA AK Z VKLJUČITVIVO V LIPOSOME .....	37
4.2.1 AK, raztopljena v citratnem pufru pH 3.....	37
4.2.1.1 Vključena v liposome DPPC.....	37

4.2.1.2 Vključena v liposome, pripravljene iz DPPC in holesterola .....	38
<b>4.2.2 AK, raztopljena v citratnem pufru pH 4.....</b>	<b>38</b>
4.2.2.1 Vključena v liposome DPPC.....	39
4.2.2.2 Vključena v liposome, pripravljene iz DPPC in holesterola .....	39
4.2.2.3 Vključena v liposome, pripravljene iz DPPC in lipidov arheje <i>A. pernix</i> .....	39
<b>4.2.3 Stabilnost liposomov pri segrevanju.....</b>	<b>40</b>
4.2.3.1 Termična stabilnost liposomov DPPC .....	40
4.2.3.2 Termična stabilnost liposomov, pripravljenih iz DPPC in holesterola .....	42
<b>4.2.4 Stabilizacija AK z vključitvijo v DPPC liposome v vzorcih živil .....</b>	<b>43</b>
4.2.4.1 Inkubacija v jabolčnem soku.....	43
4.2.4.2 Inkubacija v fermentiranem mlečnem napitku (Actimel) .....	47
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI .....</b>	<b>48</b>
5.1 RAZPRAVA .....	48
<b>5.1.1 Stabilnost proste AK .....</b>	<b>49</b>
5.1.1.1 Hranjena v modelnih pufernih raztopinah.....	49
5.1.1.2 Hranjena v realnih raztopinah .....	49
<b>5.1.2 Stabilnost AK, vključene v liposome, hranjene v modelnih raztopinah.....</b>	<b>50</b>
5.1.2.1 AK, vključena v liposome DPPC .....	50
5.1.2.2 AK, vključena v liposome DPPC/hol.....	51
5.1.2.3 AK, vključena v liposome DPPC/ <i>A. pernix</i> .....	52
<b>5.1.3 Stabilnost AK, vključene v liposome, hranjene v živilih.....</b>	<b>53</b>
5.2 SKLEPI .....	55
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>56</b>
<b>7 VIRI.....</b>	<b>58</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

**KAZALO SLIK**

Slika 1: Vloga askorbinske kisline pri nevtralizaciji reaktivnih kisikovih zvrsti (Arrigoni in De Tullio, 2002).....	5
Slika 2: Spontani razpad AK ob prisotnosti ali odsotnosti H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Linster in Schaftingen, 2006) ....	13
Slika 3: Kromatogram, ki prikazuje standardno raztopino 50 mg/L AK (Iammarino in Di Taranto, 2012). .....	15
Slika 4: Različne strukture liposomov (Mozafari in sod., 2006).....	18
Slika 5: Model liposoma z membrano iz fosfolipidnega dvosloja (Gopalakrishnan, 2006). ....	19
Slika 6: Strukturna formula sintetičnega fosfolipida dipalmitoil fosfatidilholina (DPPC) (Gopalakrishnan, 2006).....	20
Slika 7: Liposomi prikazani s transmisijskim elektronskim mikroskopom (Thompson in sod., 2007) .....	21
Slika 8: Struktura polarnih dietrskih lipidov, ki sestavlja celično membrano arheje <i>Aeropyrum pernix</i> (Ota in sod., 2012).....	23
Slika 9: Ekstrudor, ki sestoji iz dveh siring in vmesne teflonske nosilne podpore kjer je polikarbonatna membrana (Mozafari in sod., 2008). .....	25
Slika 10: Absorpcijski spekter radikalnskega kationa ABTS <sup>•+</sup> (Re in sod., 1999).....	32
Slika 11: Primerjava stabilnosti proste in v DPPC/A. <i>pernix</i> liposome vključene AK raztopljene v citratnem pufru pH 4. ....	40
Slika 12: Vpliv pH na termično stabilnost svežih (dan 0) in staranih (dan 14) DPPC liposomov pri segrevanju od 25 °C do 60 °C s hitrostjo 1 °C/min.....	41
Slika 13: Termična stabilnost svežih (dan 0) DPPC in DPPC/hol liposomov pri segrevanju od 25 °C do 60 °C s hitrostjo 1 °C/min. ....	42
Slika 14: Termična stabilnost 14 dni starih DPPC in DPPC/hol liposomov pri segrevanju od 25 °C do 60 °C s hitrostjo 1 °C/min. ....	43
Slika 15: Stabilizacija AK – primerjava proste in v liposome DPPC vključene AK (lip AK) v jabolčnem soku v izoosmolarnih pogojih pri 25 °C.....	44
Slika 16: Stabilizacija AK – primerjava stabilnosti proste in v DPPC liposome vključene AK (lip AK), hranjene v jabolčnem soku pri 4 °C in 25 °C.....	45
Slika 17: Stabilizacija AK – primerjava stabilnosti AK vključene v DPPC liposome in proste AK v jabolčnem soku (NR) in 5-krat redčenem jabolčnem soku (R) pri 25 °C. ....	46
Slika 18: Stabilizacija AK – primerjava stabilnosti proste AK in v liposome DPPC vključene AK inkubirane v mlečnem napitku pri 4 °C. ....	47

**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1: Vsebnost vitamina C (v mg na 100 g živila) v določenem svežem sadju in zelenjavi (Lee in Kader, 2000) .....	9
Preglednica 2: Priprava modelnih raztopin za spremljanje stabilnosti proste AK z ABTS' .....	29
Preglednica 3: Priprava modelnih raztopin za spremljanje stabilnosti proste AK pri 250 nm.....	29
Preglednica 4: Priprava modelnih raztopin za spremljanje stabilnosti AK vključene v DPPC ali DPPC/hol liposome. AK je bila vključena v liposome v citratnem pufru pH 3 (C3) in dializirana v formiatnem pufru pH 3.....	30
Preglednica 5: Priprava modelnih raztopin za spremljanje stabilnosti AK vključene v DPPC liposome. AK je bila vključena v liposome v citratnem pufru pH 4 (C4) in dializirana v formiatnem pufru pH 4 .....	30
Preglednica 6: Priprava modelnih raztopin za spremljanje stabilnosti AK vključene v DPPC/hol liposome. AK je bila vključena v liposome v citratnem pufru pH 4 (C4) in dializirana v formiatnem pufru pH 4 .....	31
Preglednica 7: Priprava modelnih raztopin za spremljanje stabilnosti AK vključene v DPPC/A. <i>pernix</i> liposome. AK je bila vključena v liposome v citratnem pufru pH 4 (C4) in dializirana v formiatnem pufru pH 4.....	31
Preglednica 8: Priprava vzorcev za določanje AK brez liposomov v modelnih raztopinah. ....	33
Preglednica 9: Priprava vzorcev za določanje skupne AK v modelnih raztopinah.....	33
Preglednica 10: Priprava vzorcev za spektrofotometrično določanje AK zunaj liposomov pripravljenih v citratnem pufru pH 3.....	33
Preglednica 11: Priprava vzorcev za spektrofotometrično določanje AK zunaj liposomov pripravljenih v citratnem pufru pH 4.....	33
Preglednica 12: Priprava vzorcev za določanje reducentov, ki niso AK z encimom askorbat oksidaza (AO). .....	34
Preglednica 13: Priprava vzorcev za termično določanje stabilnosti liposomov z vključeno AK ..	34
Preglednica 14: Razpolovni časi (ocenjeni iz grafičnih podatkov v Prilogah A-P) proste AK v različnih pufrih, z in brez dodanih bakrovih ionov .....	36
Preglednica 15: Primerjava razpolovnih časov (ocenjenih iz grafičnih podatkov v Prilogah A-P) proste in v liposome vključene AK v C3 (notranje okolje liposomov), pri inkubaciji v C3, C5 in A5, brez in z dodatkom bakrovih ionov (zunanje okolje). ....	37
Preglednica 16: Primerjava razpolovnih časov (ocenjenih iz grafičnih podatkov v Prilogah A-P) proste in v liposome vključene AK v C4 (notranje okolje liposomov), pri inkubaciji v C4, For3, For4, C5 in A5, brez in z dodatkom bakrovih ionov (zunanje okolje).....	38
Preglednica 17: Ocena razpolovnih časov (dan) proste in v DPPC liposome vključene AK v jabolčnem soku, 5-krat redčenem jabolčnem soku in mlečnem napitku Actimel .....	46

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v citratnem pufru pH 3 (C3) in v liposome DPPC vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 3, hranjene v citratnem pufru pH 3 (lip AK C3-C3).

Priloga B: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v citratnem pufru pH 5 (C5) in v liposome DPPC vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 3, hranjene v citratnem pufru pH 5 (lip AK C3-C5).

Priloga C: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v acetatnem pufru pH 5 (A5) in v liposome DPPC vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 3, hranjene v acetatnem pufru pH 5 (lip AK C3-A5).

Priloga D: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v citratnem pufru pH 3 (C3) in v liposome DPPC/hol vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 3, hranjene v citratnem pufru pH 3 (lip AK C3-C3).

Priloga E: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v citratnem pufru pH 5 (C5) in v liposome DPPC/hol vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 3, hranjene v citratnem pufru pH 5 (lip AK C3-C5).

Priloga F: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v acetatnem pufru pH 5 (A5) in v liposome DPPC/hol vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 3, hranjene v acetatnem pufru pH 5 (lip AK C3-A5).

Priloga G: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v citratnem pufru pH 4 (C4) in v liposome DPPC vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v citratnem pufru pH 4 (lip AK C4-C4).

Priloga H: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v formiatnem pufru pH 3 (For3) in v liposome DPPC vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v formiatnem pufru pH 3 (lip AK C4-For3).

Priloga I: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v formiatnem pufru pH 4 (For4) in v liposome DPPC vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v formiatnem pufru pH 4 (lip AK C4-For4).

Priloga J: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v acetatnem pufru pH 5 (A5) in v liposome DPPC vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v acetatnem pufru pH 5 (lip AK C4-A5).

Priloga K: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v citratnem pufru pH 5 (C5) in v liposome DPPC vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v citratnem pufru pH 5 (lip AK C4-C5).

Priloga L: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v citratnem pufru pH 4 (C4) in v liposome DPPC/hol vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v citratnem pufru pH 4 (lip AK C4-C4).

Priloga M: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v formiatnem pufru pH 3 (For 3) in v liposome DPPC/hol vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v formiatnem pufru pH 3 (lip AK C4-For3).

Priloga N: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v formiatnem pufru pH 4 (For 4) in v liposome DPPC/hol vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v formiatnem pufru pH 4 (lip AK C4-For4).

Priloga O: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v acetatnem pufru pH 5 (A5) in v liposome DPPC/hol vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v acetatnem pufru pH 5 (lip AK C4-A5).

Priloga P: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v citratnem pufru pH 5 (C5) in v liposome DPPC/hol vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v citratnem pufru pH 5 (lip AK C4-C5).

Priloga Q: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v citratnem pufru pH 4 (C4) in v liposome DPPC/A. *pernix* vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v citratnem pufru pH 4 (lip AK C4-C4).

Priloga R: Primerjava stabilnosti AK, vključene v DPPC in DPPC/hol liposome v citratnem pufru pH 3.

Priloga S: Primerjava stabilnosti AK, vključene v DPPC in DPPC/hol liposome v citratnem pufru pH 4.

Priloga T: Primerjava stabilnosti AK, raztopljene v citratnem pufru pH 3 ali citratnem pufru pH 4 vključene v DPPC liposome.

Priloga U: Vpliv pH na termično stabilnost svežih (dan 0) in staranih (dan 20) DPPC liposomov pri segrevanju od 25 °C do 60 °C s hitrostjo 1 °C/min.

Priloga V: Termična stabilnost DPPC liposomov z vključeno AK, raztopljeno v citratnem pufru pH 4 inkubiranih v acetatnem pufru pH 5 v daljšem časovnem obdobju.

Priloga W: Termična stabilnost svežih (dan 0) ter 5 in 14 dni starih DPPC/hol liposomov z vključeno AK v citratnem pufru pH 3, inkubiranih v citratnem pufru pH 3 (C3) in citratnem pufru pH 5 (C5).

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A4	acetatni pufer pH 4
A5	acetatni pufer pH 5
ABTS	2,2-azino-bis(3-etylbenztiazolin-6-sulfonska kislina)
AK	L-askorbinska kislina
AO	askorbat-oksidaza
C3	citratni pufer pH 3
C4	citratni pufer pH 4
C5	citratni pufer pH 5
DHA	L-dehidroaskorbinska kislina
DKG	2,3-diketogulonska kislina
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DPPC	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholin
DPPC/hol	liposomi pripravljeni iz mešanice DPPC in holesterola
DPPC/ <i>A. pernix</i>	liposomi pripravljeni iz mešanice DPPC in lipidov izoliranih iz arheje <i>Aeropyrum pernix</i>
DTT	ditiotreitol
For3	formiatni pufer pH 3
For4	formiatni pufer pH 4
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija
LUV	veliki unilamelarni vezikli
MDHA	monodehidroaskorbinska kislina
MFK	metafosforna kislina
MilliQ voda	prečiščena (destilirana in deionizirana) voda s sistemom MilliQ proizvajalca Millipore
MLV	multilamelarni vezikli
MVV	multivezikularni vezikli
ROS	reaktivne kisikove spojine
SUV	majhni unilamelarni vezikli
TCEP	tris-2-karboksietil fosfin
ULV	unilamelarni vezikli

## 1 UVOD

Askorbinska kislina (AK) je esencialna molekula in se vključuje v življenjsko pomembne metabolne procese v organizmu. Glavni viri so sveže sadje in zelenjava. Dejavniki, kot so temperatura, pH, prisotnost kisika in kisikovih spojin (oksidanti), določeni encimi (askorbat oksidaza, askorbat peroksidaza), redoks aktivni kovinski ioni, svetloba in relativna vlažnost močno vplivajo na obstojnost askorbinske kisline, ki velja za občutljivo molekulo in se hitro oksidira do dehidroaskorbinske kisline (DHA) ter naprej preko hidrolize in ostalih reakcij razgradi do prehransko nepomembnih spojin. Tako AK kot DHA imata vitaminski učinek. V živilih je vitamin C podvržen številnim negativnim vplivom, ki rezultirajo v zmanjšani vsebnosti. Med njimi so topotna obdelava, blanširanje in zmrzovanje, sušenje in drugi postopki predelave in podaljševanja obstojnosti živila. Pomembno vpliva tudi čas in temperatura skladiščenja in trženja na policah trgovin. Pri pripravi živil doma se prav tako zmanjša vsebnost vitamina C, predvsem z dolgotrajnim kuhanjem v velikih količinah vode. Težnja po stabilizaciji vitamina C in zagotovitev manjših izgub v tehnologiji je zato zelo prisotna. Inkapsulacija AK v notranjost liposomov predstavlja možnost stabilizacije vitamina, saj AK, ki je polarna, slabo prehaja fosfolipidni dvosloj.

### 1.1 NAMEN NALOGE

- Pripraviti liposome po metodi tankega filma iz sintetičnih dipalmitoil fosfatidilholin (DPPC) fosfolipidov in mešanice DPPC in holesterola ter mešanice DPPC in arhejnih lipidov izoliranih iz arheje *Aeropyrum pernix*.
- Vključiti AK, raztopljeno v citratnem pufru in tako pripravljene v liposome inkubirati v različnih pufrih v prisotnosti in odsotnosti bakrovih ionov.
- Z oksidirano obliko reagenta 2,2-azino-bis-3-etilbenztiazolin-6-sulfonska kislina (ABTS<sup>+</sup>) preveriti učinkovitost liposomalne stabilizacije AK v modelnih raztopinah.
- Preveriti, kako vključitev holesterola in arhejnih lipidov *Aeropyrum pernix* v membrano DPPC liposomov vpliva na stabilizacijo AK.
- Preveriti termično stabilnost liposomov s segrevanjem do 60 °C in ugotoviti, kateri od pripravljenih liposomov se izkažejo za bolj termično stabilne.
- Preveriti učinkovitost liposomalne stabilizacije AK v jabolčnem soku in fermentiranem mlečnem napitku.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo, da bomo z izbrano metodo AK vključili v liposome in podaljšali njen obstojnost. Na ta način predvidevamo stabilizacijo v primerjavi s prosto AK, ki ni vključena v liposome. Predvsem pričakujemo vidnejšo stabilizacijo ob prisotnosti bakrovih ionov v zunanjem okolju.

Pričakujemo, da bodo liposomi DPPC s prisotnim holesterolom ali z arhejnimi lipidi *Aeropyrum pernix* v membrani bolj termostabilni, kot liposomi pripravljenimi samo iz DPPC fosfolipidov.

Predvidevamo, da bomo dosegli stabilizacijo AK z vključitvijo v liposome tudi v realnih živilskih vzorcih jabolčnega soka in fermentiranega mlečnega napitka.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ASKORBINSKA KISLINA

L-askorbinska kislina (AK, L-askorbat) predstavlja reducirano obliko vitamina C. Prisotna je v različnih živilih, predvsem v tistih rastlinskega izvora. V živih bitjih se tvori iz ogljikovih hidratov po dokaj enostavni biokemijski poti. AK predstavlja vitamin samo za določena bitja, ki nimajo lastne sposobnosti sinteze v celicah (Linster in Schaftingen, 2006). Od Szent-Gyorgii-jevega odkritja leta 1928 je AK postala zelo preučevana molekula, predvsem zaradi svojih pomembnih vplivov na človekovo zdravje. Je vitamin, ki se ga na leto največ proizvede in zaužije (Vislisel in sod., 2007). Je dobro topna v vodi in deluje kot učinkovit reducent. Pomembno vlogo ima tudi kot kofaktor pri delovanju oksidativnih encimov, predvsem hidroksilaz in dioksigenaz (Kojo, 2004). Nahaja se predvsem v rastlinah, sadje in zelenjava pa predstavljata glavni vir v človekovi prehrani. Raziskovanje vitamina C je posebno pomembno zaradi spoznavanja povezave med prehranskim vnosom in vplivi na zdravje ljudi (Gökmen in sod., 2000). Ker je vitamin C esencialen za biosintezo nekaterih življenjsko pomembnih beljakovin in hormonov, kronično pomankanje privede do smrtno nevarnega skorbuta. Predvsem s svojim antioksidativnim delovanjem preprečuje oksidativne poškodbe celic in zavira bolezni, kot so rak, bolezni srca in ožilja in diabetes (Li in Schellhorn, 2007; Podsedek, 2007). Ravno tako ščiti organizem pred svetlobnim sevanjem, zavira tvorbo melanina v podkožju in krepi imunski sistem (Jang in Lee, 2008). Omenjajo se tudi antibakterijski učinki AK. Antibakterijsko lahko deluje na več različnih načinov, z nižanjem pH vrednosti, s tvorbo vodikovega peroksida pri spontani oksidaciji in z redukcijo kisika, ki ustavi rast striktnih aerobnih mikroorganizmov (Myrvik in Volk, 1954).

Vitamin C predstavljata AK, ki ima antioksidativne lastnosti in je biološko aktivna, ter njena oksidirana oblika dehidroaskorbinska kislina (DHA), ki je tudi vključena v metabolno delovanje, vendar nima antioksidativnih sposobnosti. DHA je pomembna predvsem, ker se v človeškem telesu enostavno pretvarja nazaj v AK. Zato pri določanju vsebnosti vitamina C v živilih merimo obe oblike (Wawire in sod., 2011). V celice prehajata obe obliki vitamina C, vendar z različnimi transportnimi mehanizmi. DHA se prenaša skozi celične membrane z olajšano difuzijo ob pomoči GLUT1, GLUT3 in GLUT4 glukoznih prenašalnih proteinov. Poteka pri večini celic, zlasti pri eritrocitih, možganskem tkivu in celičnih organelih, kot so mitohondriji. Prenos AK je aktivен in odvisen od natrijevih ionov ter metabolne energije. Poteka preko natrijevih askorbatnih kotransporterjev SVCT1 in SVCT2 (Rivas in sod., 2008). Absorpcija AK in DHA poteka preko enterocitov, ki sestavljajo epitelij, skozi celotno dolžino tankega črevesja. Pri človeku enterociti vsebujejo reduktaze, ki znotraj celic reducirajo DHA v AK. Tako ohranjajo nizko raven DHA v celici in spodbujajo njen prehajanje skozi celično membrano (Wilson, 2005).

### 2.1.1 Kemijske lastnosti AK

AK ima med vitamini najbolj enostavno kemijsko strukturo, ki je podobna sladkorjem s šestimi ogljikovimi (C) atomi. Imenujemo jo aldono-1,4-lakton heksoske kisline, ki vsebuje endiolno skupino na drugem (C-2) in tretjem (C-3) ogljikovem atomu. V kislem pH območju pri prvi izoelektrični točki se vodikov atom iz hidroksilne skupine, vezane na C-3 atomu, odcepi in daje kisle lastnosti AK. V fizioloških pogojih tako prevladuje AK v obliki monovalentnega aniona. Odcep drugega vodika iz hidroksilne skupine, vezane na C-2 atomu, se zgodi pri bazičnem pH. AK lahko najdemo v obliki naravnih derivatov, kot je askorbil-2-sulfat in v obliki sintetičnih derivatov, med katerimi sta najbolj znana askorbil-2-fosfat in askorbil-6-palmitat (Davey in sod., 2000). Bistvena kemijska značilnost so reduktivne lastnosti, zaradi katerih je AK odličen donor elektronov v bioloških sistemih. Najprej odda en elektron in se oksidira do monodehidroaskorbinske kisline (MDHA), ko odda še drugi elektron, se tvori DHA. Oksidacija AK je reverzibilna reakcija, saj se v celicah DHA enostavno reducira nazaj v AK. Lahko pa se ireverzibilno hidrolizira v 2,3-diketogulonsko kislino (DKG), s prekinjivo laktionskega obroča (Rumsey in Levine, 1998). Zaradi 2,3-endiolne skupine ima AK lastnosti kisline in reducenta. Je zelo polarna in se odlično topi v vodnih raztopinah, netopna pa je v nepolarnih topilih. AK je optično aktivna molekula z dvema kiralnima ogljikovima atomoma na mestu C-4 in C-5. Glede na to jo zasledimo v dveh izomernih oblikah, kot D-askorbinska kislina ali izoaskorbinska kislina. Oba izomera imata antioksidativne lastnosti, vendar nimata aktivnosti vitamina C in sta brez prehranske vrednosti (Gregory, 2008).

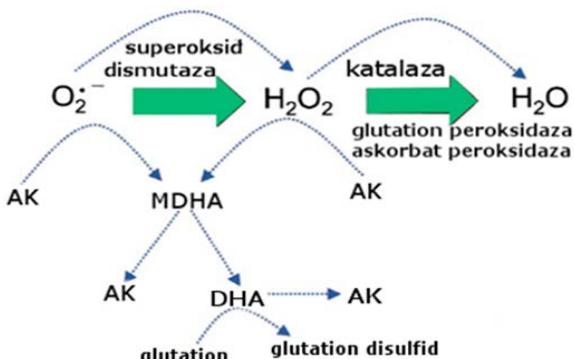
### 2.1.2 Fizikalne lastnosti AK

Na izgled je AK bela kristalinična snov, brez vonja, z močnim kislim okusom. Kemijska formula je  $C_6H_8O_6$ , z molsko maso 176,13 g/mol in gostoto 1,65 g/mL. Tališče ima med 190 in 192 °C. Pri koncentraciji 5 mg/mL je pH AK 3, pri koncentraciji 50 mg/mL pa 2. Ima dve izoelektrični točki, in sicer  $pK_1$  je 4,17 in  $pK_2$  je 11,57. AK je dobro topna v vodi (0,33 g/mL), v maščobah in oljih pa je netopna. V 1 mL 95 % etanola se raztopi 0,033 g AK, v 1 mL glicerolu pa 0,01 g. Svetloba absorbira v UV območju, absorbcijski maksimum pa je odvisen od pH. Pri pH 2, kjer je AK v protonirani obliki, je absorbacija UV svetlobe največja pri 245 nm, pri pH 6,4, kjer prevladuje ionizirana oblika AK, pa pri 265 nm (Davey in sod., 2000). Nizka redoks napetost, ki znaša 0,05 V pri 30 °C in pH 7, omogoča antioksidativno delovanje v širokem območju (Rivas in sod., 2008).

## 2.1.3 Biološko delovanje AK

### 2.1.3.1 Antioksidant in reducent

Reaktivne kisikove spojine (ROS), ki nastajajo pri aerobnem metabolizmu, pretežno v mitohondriih sprožijo začetek radikalnih reakcij. Reagirajo lahko skoraj z vsemi celičnimi spojinami, kot so lipidi, proteini in DNK. Radikalne reakcije so odgovorne za staranje, razvoj rakavih obolenj, ateroskleroze in nekatere ostale degenerativne bolezni. (Kojo, 2004). Oksidativni stres, ki ga povzročajo ROS bistveno vpliva na nastanek in napredovanje bolezni srca in ožilja. Antioksidanti, med katerimi igra pomembno vlogo vitamin C, lahko prestrežejo in nevtralizirajo proste radikale in preprečijo oksidativne poškodbe celičnih biomolekul. Vitamin C sinergistično sodeluje z vitaminom E, omogoča njegovo redukcijo in preventivno zaščito pred radikali ter tako ohranja njegovo antioksidativno delovanje (Li in Schellhorn, 2007). Reducira železove ione v fero obliko ( $\text{Fe}^{2+}$ ), ki je bolj topna in se iz črevesja lažje absorbira v krvni obtok kot oksidirana feri oblika ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Lee in sod., 2004).



Slika 1: Vloga askorbinske kisline pri nevtralizaciji reaktivnih kisikovih zvrsti (Arrigoni in De Tullio, 2002).

### 2.1.3.2 Encimski kofaktor

AK je ključna pri aktivaciji dioksigenaz in encimskem lovljenju reaktivnih kisikovih spojin. Omogoča delovanje skupine encimov hidroksilaz, ki katalizirajo reakcijo sinteze hidroksiprolina in hidroksilizina. Ti dve aminokislini sta bistveni za nastanek kolagena (Arrigoni in De Tullio, 2002). Tako zagotavlja normalno delovanje celic vezivnega tkiva, kot so fibroblasti in osteoblasti. AK sodeluje pri biosintezi hormonov nadledvične žleze (cateholaminov), kot so adrenalin in noradrenalin, ter pri biosintezi karnitina. Večje koncentracije AK zasledimo predvsem v endokrinih žlezah in centralnem živčnem sistemu. Pri rastlinah je vkjučena v sintezo rastlinskih hormonov, kot sta etilen in giberlinska kislina. Sodeluje pri sintezi ekstenzina, ki je pomemben gradnik celične stene in tako omogoči hitro celjenje ran rastline in preprečuje napad patogenih mikroorganizmov. Aktivira mirozinaze, ki katalizirajo encimsko hidrolizo glukozinolatov v D-glukozo in sodeluje pri rasti in delitvi celic (Davey in sod., 2000).

Raziskave kažejo tudi, da naj bi AK sodelovala pri spremnjanju izražanja določenih genov. V novejših odkritijih so ugotovili delovanje AK kot kofaktor v nukleinskih kislinah in demetilaciji histonov. Preučuje pa se tudi vpliv na redoks homeostazo v posameznih celičnih organelih (Mandl in sod., 2009).

#### 2.1.3.3 Prooksidativno delovanje

Poleg antioksidativnega delovanja pa lahko AK deluje tudi kot prooksidant. Do tega pride ob nizki koncentraciji L-AK in visoki vsebnosti prostih redoks aktivnih kovinskih ionov v organizmu. Prooksidacija privede do tvorbe ROS in glikacije proteinov (Mandl in sod., 2009). Običajno AK reducira proste železove ( $Fe^{3+}$ ) ali bakrove ( $Cu^{2+}$ ) ione, ki nato donirajo elektron vodikovemu peroksidu, ki se pretvori v visoko reaktivni hidroksilni radikal ( $OH^{\cdot}$ ) v Fentonovi reakciji (van Duijn, 2001).

Ob prisotnosti kisika AK lahko povzroči razprtje DNK vijačnice. S tvorbo vodikovega peroksida ( $H_2O_2$ ), ki nastaja pri razgradnji AK, pa lahko sproži celično smrt v tkivnih kulturah. Prooksidativne lastnosti AK so lahko tudi posledica tvorbe MDHA $^{\cdot}$  pri oksidaciji v DHA (Deutsch, 1998).

#### 2.1.3.4 Biosinteza AK v živalski in rastlinski celici

Začetna molekula pri biosintezi L-AK v živalski in rastlinski celici je D-glukoza (Davey in sod., 2000). V živalskih celicah poteka preko D-glukoronata, ki nastane z hidrolizo UDP-glukoronata. D-Glukoronat se v encimski reakciji, ob delovanju aldehid reduktaze pretvori v L-gulonat, encim laktonaza pa ga poveže v L-gulonolakton. Zadnji korak je oksidacija L-gulonolaktona v L-askorbat, reakcijo pa katalizira L-gulonolakton oksidaza, ki nastaja v endoplazemskem retikulumu (Linster in Schaftingen, 2007). V rastlinskih celicah pa je najverjetnejša biosintetična pot preko GDP-manoze, GDP-L-galaktoze, L-galaktoze in L-galaktono-1,4-laktona, ki se ob delovanju L-galaktono-1,4- lakton dehidrogenaze pretvori v L-askorbat (Smirnoff in Wheeler, 2000).

Vse rastline in večina živali imajo sposobnost samosinteze AK. Organizmi naj bi razvili sposobnost sinteze AK pri prehodu iz morja na kopno, ko se je vsebnost kisika v ozračju močno povečala. Pri človeku, primatih, morskem prašičku ter nekaterih ribah in pticah je vrsta mutacij tekom evolucije preprečila delovanje gena, ki kodira sintezo encima L-gulonolakton oksidaze. Ta encim pa je ključen za katalizo zadnjega koraka sinteze AK iz glukoze. Zato smo ljudje popolnoma odvisni od vnosa AK s hrano (Arrigoni in De Tullio, 2002; Rivas in sod., 2008). Tako je AK postala vitamin, ki je esencialen za antioksidativno homeostazo in delovanje številnih encimov v organizmu (Mandl in sod. 2009).

Dolgotrajno pomankanje vitamina C ima lahko tragične posledice, saj se razvije bolezen imenovana skorbut. V preteklosti so zboleli predvsem mornarji, raziskovalci, vojaki in rudarji, ki so imeli slabo prehrano. Zdravnik James Lind je v 18. stoletju prvi ugotovil, da uživanje citrusov prepreči razvoj bolezenskih znakov skorbuta (Davey in sod., 2000). Za prve simptome skorbuta je krivo pomankanje karnitina. Razvoj bolezni pa pripisujemo pomankaju kolagena. Za preventivno preprečevanje skorbuta je dovolj 10 mg askorbata dnevno, vendar pa je za vključevanje AK v druge metabolne procese potrebno to količino povečati (Mandl in sod., 2009).

V celicah se odvija tudi reciklacija AK iz že oksidiranih in razgrajenih produktov. MDHA<sup>•</sup> (imenovana tudi askorbatni prosti radikal) in DHA se v celicah reducirata nazaj v AK. MDHA<sup>•</sup> reagira s sebi enakim radikalom in tako se tvori ena molekula AK in ena DHA. Poteka tudi encimska redukcija MDHA<sup>•</sup> nazaj v AK. Sodelujejo encimi, kot sta citokrom b<sub>5</sub> reduktaza in tioredoksin reduktaza, ki sta odvisna od koencima NADH ali NADPH. DHA pa se lahko reducira po kemijski poti z glutationom ali pa encimsko z DHA reduktazami, kot sta glutaredoksin in protein disulfid izomeraza (Linster in Schaftingen, 2006). V živalski celici je ugotovljena pot, kjer se DKG dekarboksilira do L-liksonata in L-ksilonata. V pentoza fosfatno pot vstopa kot ksiluloza 5-fosfat in se preko encimsko kataliziranih reakcij pretvori v fruktozo 6-fosfat, ki je substrat za biosintezo askorbata (Davey in sod., 2000).

Reichstein in sodelavci so prvi dosegli kemijsko sintezo AK že leta 1932 (Davey in sod., 2000). Vodilni način sintetičnega trgovskega pridobivanja AK je Reichsteinov proces, kjer je začetna spojina D-glukoza. Uporablja se več oksidacijskih korakov in fermentacija, glavni prekurzorji sinteze pa so L-sorbitol, L-sorboza in 2-keto-L-gulonska kislina. Takšno kemijsko pridobivanje pa v določenih korakih zahteva visoke temperature in visok tlak, zato je energijsko potratno. Poleg tega se porabijo velike količine organskih in anorganskih topil in drugih reagentov, kar zahteva velik strošek za odstranitev odpadnih snovi. Nova odkritja v fermentacijskih procesih, napredek v biokemiji in tehnologiji rekombinantne DNK so razširila možnosti uporabe biotehnologije za produkcijo AK. Izkoriščajo se lahko bakterije, kvasovke in alge, ki iz določenih ogljikovih substratov v svojem metabolizmu tvorijo AK (Survase in sod., 2006).

#### 2.1.3.5 Vloga AK v človeškem organizmu

Zaradi vpletenosti v biosintezo kolagena vitamin C posredno prispeva k ojačanju kožnega tkiva in ga zaščiti pred neugodnimi zunanjimi vplivi, k manjši izgubi kožnega pigmenta in deluje proti prostim radikalom (Lee in sod., 2004). Pri tem sodeluje z vitaminom E, ki je antioksidant v lipidnih sistemih. Ohranja njegovo aktivnost, tako da oksidiran tokoferilni radikal reducira v bioaktivni tokoferol (Choi in sod., 2004).

Vpliv ima na številna bolezenska stanja in predvsem zavira njihov razvoj. Pospeši okrevanje pri vnetjih (sepsa), preprečuje nastanek degenerativnih kroničnih bolezni, povezanih z diabetesom in debelostjo, kot so ateroskleroza in hiperholisterolemija. V sodelovanju z ostalimi antioksidativnimi vitaminimi in minerali upočasnuje razvoj sive mrene pri starostnikih. S svojim prooksidativnim delovanjem pa selektivno ubija rakave celice, in sicer preko vodikovega peroksida, ki nastaja pri oksidaciji. Askorbat se uporablja pri alternativnem zdravljenju določenih oblik raka (pljučni rak) (Mandl, 2009). Celice ščiti pred začetnimi poškodbami DNK, kot tudi pred napredovanjem raka. Lahko inhibira tvorbo kancerogenih nitrozaminov v organizmu, krepi imunski sistem in aktivira encime v jetrih, ki razstrupljajo in pretvarjajo kancerogene molekule (van Poppel in van der Berg, 1997). Vitamin C s svojo biološko aktivnostjo preprečuje ali blaži številne bolezni, kot so skorbut, anemija, prehlad, težave s krvavitvami, neplodnost. Je esencialen pri razvoju in obnavljanju mišic, kosti, kože in zob (Arya in sod., 1998).

Kljub številnim celičnim funkcijam, v katere je AK vključena, so dnevne potrebe po vnosu vitamina C nizke. Priporočeni dnevni vnos je 100 mg na dan, ki rezultira v koncentraciji okoli 50 µM v krvni plazmi. Pri zdravem človeku se v plazmi nahaja samo AK, in sicer od 30 do 60 µM, DHA je samo v sledovih (Rivas in sod., 2008). Priporočeni dnevni vnos vitamina C se v številnih državah zadnjih 20 let povečuje. Splošno velja, da visok vnos ni škodljiv, saj se vitamin C, kot vodotopni vitamin daljši čas ne shranjuje v telesu, prekomerna vsebina pa se izloči z urinom (Jansson in sod., 2004). Idealna priporočila za dnevne potrebe po vitaminu C pri ljudeh naj bi upoštevala absorpcijo in razporeditev askorbata v telesu. Kljub enakemu vnosu se koncentracija vitamina C v krvi razlikuje glede na genetiko in razlike v delovanju našega organizma, ki so lahko povezane s spolom, starostjo ali bolezenskimi stanji človeka. Celotna pot AK v telesu vključuje dostopnost in absorpcijo v gastrointestinalnem traktu, koncentracijo v krvnem obtoku, razporeditev v posameznih tkivih, izločanje preko ledvic z urinom in metabolizem v celicah (Rumsey in Levine, 1998). Vsebnost AK v našem telesu je višja, če jo vnesemo intravensko kot pa če jo zaužijemo oralno. AK in DHA se absorbirata skozi celoten človeški prebavni trakt. Višja dostopnost je običajna pri manjših in zmernih vnosih (80 % pri 100 mg/dan ), pri večjih pa se izkoristek niža. (Mandl in sod., 2009). Nepovratna izguba vitamina C, ki jo moramo nadomestiti s prehrano, je manj kot 5 % dnevno. DHA, ki nastaja pri oksidativnem celičnem metabolizmu iz AK, se v citoplazmi, mitohondrijih in endoplazemskem retikulumu reducira nazaj v AK. Te ugotovitve kažejo na to, da imamo ljudje učinkovit sistem recikliranja in ohranjanja biološke aktivnosti vitamina C (Rivas in sod., 2008).

## 2.1.4 AK v živilih

Izpostavimo lahko dve glavni vlogi AK v živilih. Izboljša prehransko vrednost živil, saj je esencialna za človeka. Kot drugo pa s svojim antioksidativnim delovanjem podaljša obstojnost živila z ohranjanjem ustreznih senzoričnih lastnosti (Righetto in Netto, 2006). Je eden izmed najpogostejših dodatkov, ki jih dodajamo živilom. S spremeljanjem vsebnosti AK lahko določamo obstojnost živil. Tako je AK, ravno zaradi svoje velike občutljivosti na postopke obdelave in pogoje shranjevanja, pokazatelj prehranske vrednosti in stabilnosti živila (Hiatt in sod., 2010).

### 2.1.4.1 Prehranski viri

Krompir in sadje iz družine citrusov so najpomembnejši vir vitamina C v prehrani človeka, ki živi v razvitem zahodnem svetu. Bistvene so velike količine teh dveh predstavnikov, ki jih zaužijemo in ne toliko visoka vsebnost vitamina C v njih (Lee in Kader, 2000). Krompir je v večini evropskih držav najpogosteje uživana zelenjava in spada med živila s skromno vsebnostjo vitamina C, ki je od 10-30 mg na 100 g krompirja. S staranjem pa se vsebnost AK zmanjšuje, in sicer v treh mesecih za 30-45 % (Tudela in sod., 2002). Pomemben vir AK v človekovi prehrani so tudi sadni sokovi (Kabasakalis in sod., 2000). Vidnejša predstavnika, ki imata visoko vsebnost vitamina C, sta kaki pri sadju in paprika ter križnice pri zelenjavi (Lee in Kader, 2000). Zelenjava rodu *Brassica*, kamor sodi zelje, repa, brokoli, cvetača, kitajsko zelje in ogrščica je bogat vir. Značilno za njih je, da se lahko pri kratkem kuhanju vsebnost vitamina C celo zviša. Segrevanje razgradi spojino asorbigen, ki nastane iz AK in glukozinolatov pri mehanskem procesiranju, kar se kaže v povečanju vsebnosti po razgradnji (Hrncirik in sod., 2001).

Preglednica 1: Vsebnost vitamina C (v mg na 100 g živila) v določenem svežem sadju in zelenjavi (Lee in Kader, 2000).

ŽIVILO	Vsebnost AK	Vsebnost DHA	Skupno (vitamin C)
Banana	15,3	3,3	18,6
Robida	18	3	21
Črni ribez	86	6	92
Kivi	59,6	5,3	64,9
Mandarina	34	3,7	37,7
Pomaranča (Kalifornija)	75	8,2	83,2
Jagoda	60	5	65
Malina	27	2	29
Brokoli	89	7,7	96,7
Zelje	42,3	/	42,3
Cvetača	54	8,7	62,7
Rdeča paprika	151	4	155
Zelena paprika	129	5	134
Krompir	8	3	11
Špinača	62	13	75
Paradižnik	10,6	3	13,6

Vsebnost vitamina C znotraj ene vrste je lahko zelo spremenljiva in se razlikuje glede na sorto, posamezno tkivo in področje, kjer rastlina raste. Običajno se v površinskem kožnem tkivu rastlin nahaja največ vitamina C, saj se tako rastlina ščiti pred zunanjimi oksidativnimi poškodbami in vplivom svetlobe (Lee in Kader, 2000).

#### 2.1.4.2 Dodajanje AK v živila

AK in njene derivate dodajamo v živila iz različnih razlogov. S svojimi antioksidativnimi lastnostmi izboljšajo prehransko vrednost živila in preprečujejo encimsko porjavenje v sadju, zelenjavni in sokovih (Özkan in sod., 2004). AK in nekateri njeni derivati sodijo med najbolj učinkovite in varne zaviralce encimskega porjavenja. Pri sadju in zelenjavni, kot so jabolka, banane, krompir in številnih ostalih živilih, se pri obtolčenem ali narezanem plodu pojavi encimsko porjavenje. Ob prisotnosti kisika encimi polifenol-oksidaze oksidirajo fenolne substrate vobarvane kinone, ki polimerizirajo v melanine. AK reducira kinone nazaj v fenolne spojine in preprečuje nastanek spojin, ki absorbirajo v vidnem delu spektra (Roig in sod., 1999). Vitamina C, kot vodotopen antioksidant, pogosto dodajamo v brezalkoholne in negazirane pijače, predvsem v sokove. Na ta način nadomestimo delež, ki se je pri tehnološki predelavi razgradil (Imer in sod., 2003). Pri velikih dodanih količinah pa je lahko AK odgovorna za neencimsko porjavenje predvsem v sadnih sokovih in suhih produktih. Med razgradnimi produkti AK, ki se tvorijo pri obdelavi živil, so tudi rjavo obarvani melanoidi. Zato je stabilizacija AK v živilih med shranjevanjem in tehnološko obdelavo pomemben problem za tehnologe in nutricioniste (Chauhan in sod., 1998).

AK se pogosto dodaja moki za peko kruha. S tem izboljšamo elastičnost in povečamo vsebnost plinov v krušnem testu. Takšni pekovski izdelki imajo večji volumen in boljšo teksturo (Fayle in sod., 2000). Melville in Shatock sta že leta 1938 trdila, da žitna moka vsebuje encim askorbat oksidazo (AO), ki katalizira oksidacijo AK v DHA. Ravno DHA pa naj bi imela bistven vpliv na izboljšanje lastnosti testa, medtem ko DKG pri tem ne sodeluje (Elkassabany in sod., 1980). Uporablja se tudi pri izdelavi testenin iz durum pšenice. Zavira aktivnost lipoksidaz in tako preprečuje oksidacijo rumenih barvil, ki so pretežno ksantofili ter tako ohranja ustrezno svetlo rumeno barvo testenin (Walsh in sod., 1970).

V proizvodnji vina se AK dodaja pred stekleničenjem. Vinu podaljša obstojnost okusa in arome. Podobno vpliva tudi na stabilnost piva, kjer nevtralizira kisikove spojine in podaljša njegovo obstojnost. Za maksimalen antioksidativni učinek naj bi pivo vsebovalo 10 mg/L AK (Chauhan in sod., 1998).

Pomembno vlogo ima vitamin C v človeškem mleku, kjer sodeluje pri vzdrževanju naravne zaščite pred vnetji, spodbuja antimikrobnو delovanje levkocitov, pospeši sintezo interferonov in protiteles ter na te načine krepi imunski sistem. Je ključen za preživetje, rast in normalen razvoj novorojenčka (Nadal in sod., 2006). AK je primerno dodajati v mlečne formule skupaj z železovimi ioni, saj izboljša njegovo absorbcojo, zavira peroksidacijo lipidov in ohranja barvo ter okus (Lee in sod., 2004).

AK in njene soli se dodajajo obdelanim svežim mesnim izdelkom z namenom izboljšati njihove senzorične lastnosti in podaljšati obstojnost tekom shranjevanja. Sodeluje pri razvoju in ohranjanju ustrezne rdeče barve mesa, tako da pospeši redukcijo nitrozometmioglobina v nitrozomioglobin in hkrati s svojimi antioksidativnim delovanjem preprečuje oksidacijo v mesu naravno prisotnega mioglobina v metmioglobin. Reducira nitrate v dušikov oksid, ki ne reagira s sekundarnimi amini in na ta način zavira tvorbo nitrozaminov. Preprečuje oksidacijo v mesu prisotnih lipidov, ker reagira s kisikom (Iammarino in Di Taranto, 2012).

Sol natrijev askorbat se pogosto dodaja v živila in prehranske dodatke, kot vir vitamina C (Hiatt in sod., 2008). Poleg tega pa v živilih zasledimo še kalijev in kalcijev askorbat, ki imata ravno tako antioksidativno delovanje. Za izboljšanje in podaljšanje antioksidativnega delovanja v živilih je koristna kombinacija z drugimi antioksidanti, ki delujejo sinergistično z AK (Nagymate in Fodor, 2008). Tako AK ščiti tudi folate in ostale vitamine pred oksidacijo (Oey in sod., 2006).

### 2.1.5 Stabilnost AK

V živilih so vitamin C in ostali vitamini slabo obstojni. Pri predelavi in kuhanju živil so izgube velike in so odvisne od metode priprave in vrste živila. Parametri, ki vplivajo na razgradnjo med pripravo hrane so temperatura, prisotnost kisika, vlaga, svetloba, pH, prisotnost kovinskih ionov in drugih pospeševalcev oksidacije. Bistven je tudi čas izpostavljenosti živila neugodnim pogojem, ki mora biti čim krajši (Lešková in sod., 2006). Prisotnost določenih antioksidativnih spojin, kot je vitamin E ali fenolne spojine pa omogoča zaščito AK (Righetto in Netto, 2006).

V pitni vodi iz vodovodne pipe se lahko AK hitro oksidira. Zaradi korozije vodovodnih cevi je v vodi večja vsebnost železovih ionov, ki pospešijo oksidacijo. Pri oksidaciji AK sodelujejo tudi v vodi prisotni bikarbonati. Reakcija je povod za nastanek vodikovega peroksidu in visoko reaktivnega hidroksilnega radikalha. V MilliQ vodi je oksidacija AK manj opazna in počasnejša. Ob dodatku bikarbonatnega pufra in bakrovih ionov v MilliQ vodo pa lahko posnemamo oksidacijski proces, ki se dogaja v vodi iz vodovodne pipe (Jansson in sod., 2004).

Encim askorbat oksidaza (AO) je specifičen za encimsko razgradnjo AK. V svojih aktivnih mestih vsebuje bakrove ione, ki ob prisotnosti molekularnega kisika oksidirajo AK v DHA. AO se nahaja v rastlinskih celicah vezana na celično steno ali pa kot topen protein v citosolu. Ob izpostavljenosti rastline patogenim mikroorganizmom, določenim kemijskim spojinam in ob drugih stresnih pogojih se vsebnost AO v celicah poviša (Lee in Kader, 2000). Izražanje encima vzpodbuja rastlinski rastni hormon avksin, večjo prisotnost pa zasledimo v hitro rastočih tkivih (Davey in sod., 2000). Izoliran encim se uporablja pri analitiki AK, pri tem pa je ovira njegova visoka cena in nestabilnost. Zaradi hitre izgube aktivnosti moramo pripravljati dnevno svežo raztopino encima (Vislisel in sod., 2007).

#### 2.1.5.1 Vpliv predelave živil na stabilnost AK

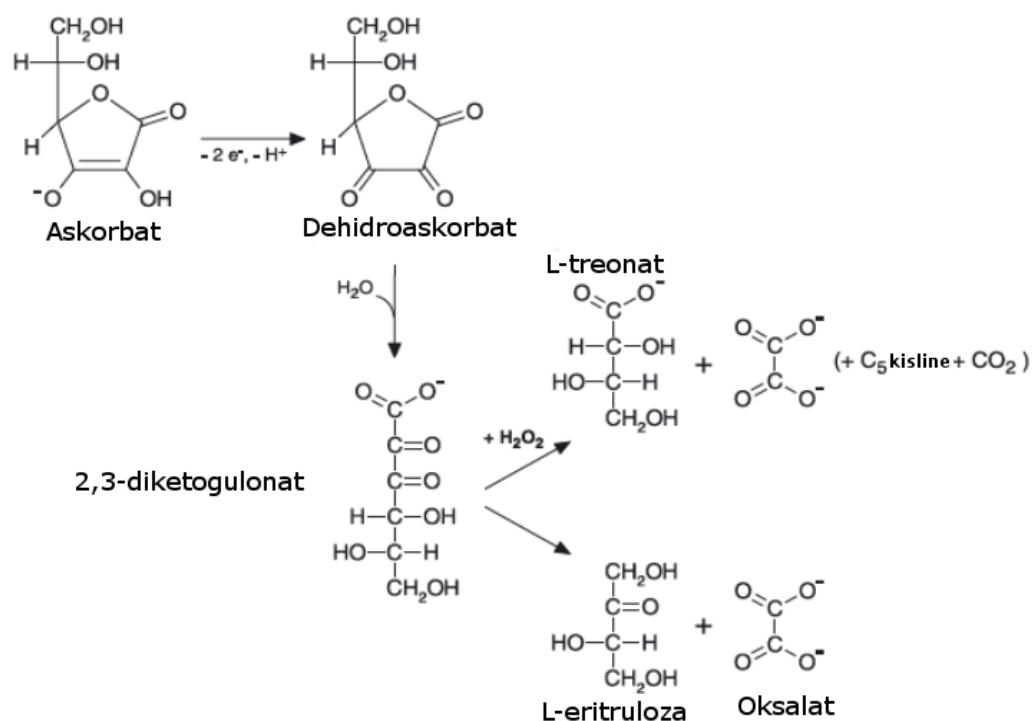
Pri kuhanju se vitamin C izgublja z encimsko in kemijsko razgradnjo. Visoka temperatura razgradnjo pospeši, veliko izgub pa lahko pripisemo tudi raztpljanju in izločanju vitamina C v vodo (Wawire in sod., 2011). Velik vpliv na vsebnost AK imajo genotipske lastnosti določenih vrst, ki jih selekcioniramo. Ostali dejavniki so razdeljeni glede na pridelavo, predelavo in shranjevanje ter pripravo živil. Pri pridelavi vplivajo klimatski pogoji (temperatura, osvetljenost), in sicer velja, da višja temperatura povzroči upad, izpostavljenost sončni svetlobi pa povišanje vsebnosti AK. Uporaba dušikovih gnojil in pesticidov zniža vsebnost AK pri gojenih rastlinah, medtem ko dodajanje rastlinskih rastnih hormonov in kalijevih gnojil njeni vsebnosti poviša. Slediti je potrebno tudi fiziološki zrelosti in ustrezni metodi obiranja plodov. Preprečiti moramo poškodbe na površini, saj s tem plod ohrani AK. Pri predelavi in shranjevanju moramo biti zlasti pozorni na dovolj nizko temperaturo in čas, ki mora biti čim krajši. Vsak postopek predelave vpliva na stabilnost vitamina C, vendar pomeni dolgoročno podaljšanje obstojnosti živila. Blanširanje ali kuhanje v velikih količinah vode zmanjša vsebnost, saj se AK raztplja v vodi in izhaja iz živila, hkrati pa je podvržena termični razgradnji (Lee in Kader, 2000). Dobro ohranjanje pa omogoča kuhanje v pari in cvrtje v olju. Priporoča se tudi, da zmrznenih živil predhodno ne tajamo, saj tajanje zniža vsebnost AK (Lešková in sod., 2006).

#### 2.1.5.2 Razgradnja AK

Pogoji v okolju, kot so temperatura, pH, prisotnost kisika in kovinskih ionov, svetloba (predvsem UV in X-žarki) in delež vlage ključno vplivajo na razgradnjo AK. Oksidacija do DHA poteka hitro, ravno tako pa nadaljnja hidroliza, ki jo pospeši višja temperatura in pH vrednosti blizu nevtralnega območja (Erenturk in sod., 2005; Righetto in Netto, 2006).

AK v vodni raztopini zelo hitro razpade na številne produkte. Razgradnja je kompleksna in sestavljena iz številnih oksido-reduktijskih in intermolekularnih reakcij. Začne se z ionizacijo hidroksilnih skupin na drugem in tretjem C atomu v molekuli AK. Prvi produkt

oksidacije je DHA, oksidirana oblika vitamina C. Tudi DHA je nestabilna v vodnih raztopinah in hitro hidrolizira do DKG (Lee in sod., 2004). Hidrolizo pospeši visoka temperatura in nevtralno pH območje, prisotnost kisika pa nanjo ne vpliva. Pri tem pride do irreverzibilne reakcije odprtja laktonskega obroča in izgube biološke aktivnosti vitamina C, ki je značilna za AK in DHA. Pri nadaljnji razgradnji pa se tvorijo številni neaktivni in prehransko nepomembni produkti, ki lahko povzročajo neželjene senzorične spremembe na živilu, kot so neencimsko porjavenje in vpliv na okus (Righetto in Netto, 2006). Razcep vezi med C-2 in C-3 atomi v molekuli AK vodi do nastanka L-eritruoze in oksalata. Kot razgradni produkt se tvori tudi L-treonat, in sicer v primeru prisotnosti vodikovega peroksida ( $H_2O_2$ ) (Linster in Schaftingen, 2006). Oksidacija L-treonata privede do nastanka L-tartrata, v rastlinah, kot so vinikovke (grozdje), pa L-tartrat nastaja pri razcepu vezi med ogljikoma C-4 in C-5 v molekuli AK (Davey in sod., 2000). V živalskih celicah se DKG razgradi v spojine s 4 in 5 ogljikovimi atomi, med njimi se tvori liksoza in ksiloza ter liksonska in ksilonska kislina. Številne spojine, ki tudi nastajajo, pa še niso znane (Arrigoni in De Tullio, 2002). Navaja se, da nastane preko 50 spojin, ki vsebujejo 5 ali manj ogljikovih atomov. Med njimi so številni, ki so dovezni za oksidacijo, kar kaže, da imajo antioksidativne lastnosti, tudi nekateri kasnejši razgradni produkti AK (Deutsch, 1998).



Slika 2: Spontani razpad AK ob prisotnosti ali odsotnosti  $H_2O_2$  (Linster in Schaftingen, 2006).

Poleg aerobne razgradnje AK, ki se pojavi predvsem pri obdelavi in predelavi živil, poteka tudi anaerobna razgradnja, do katere pride običajno med shranjevanjem živil. Pri anaerobnih pogojih se AK preko keto askorbinske kisline pretvori v DKG (Wawire in sod., 2011). Izgube AK po anaerobni poti se lahko pojavijo v zelo kislem mediju ob prisotnosti fruktoze, njenih derivatov in posredno tudi aminokislín, ki povzročijo tvorbo obarvanih pigmentov in neželenih arom (Bastos in sod., 2009). Anaerobni razgradni produkti, kot je hidroksimetil furfural se povezujejo z aminokislínami in povzročajo neencimsko porjavenje (Burdurlu in sod., 2006).

### 2.1.6 Stabilizacija AK

Glavni razlog za nestabilnost AK v vodnih raztopinah je reaktivna endiolna skupina, kjer se začne oksidacija. Pomembno je vedeti, da z zaščito endiolne skupine lahko stabiliziramo AK v vodnih raztopinah. Pomankljivost AK je občutljivost na vrsto dejavnikov. Metode, kot so kemijska modifikacija, mikroinkapsulacija in tvorba kompleksov z drugimi spojinami omogočajo njeno stabilizacijo (Lee in sod., 2004).

#### 2.1.6.1 Enostavne metode stabilizacije AK

V vodnih raztopinah lahko upočasnimo oksidacijo AK, če dodamo ustrezne pufre, ki nase vežejo katalitične kovinske ione. Dobro sposobnost kompleksiranja in tvorbe kelatov z bakrovimi ioni ima citronska kislina (Imer in sod., 2003). Lahko tudi inaktiviramo delovanje določenih encimov, kot so askorbat oksidaza, askorbat peroksidaza, citokrom-oksidaze in fenolaze. Delovanje AO ustavimo z blanširanjem ali pasterizacijo (Lee in Kader, 2000). Razgradnjo AK upočasnimo tudi z odstranjevanjem kisika iz atmosfere pri shranjevanju živil (Chauhan in sod., 1998). Pri analitičnem določanju AK in DHA se že več desetletij uporablja metafosforna kislina. Ob pripravi in shranjevanju vzorca zagotavlja nizek pH in dobro stabilnost (Wechtersbach in Cigić, 2007).

#### 2.1.6.2 Tehnološko zahtevnejše metode stabilizacije AK

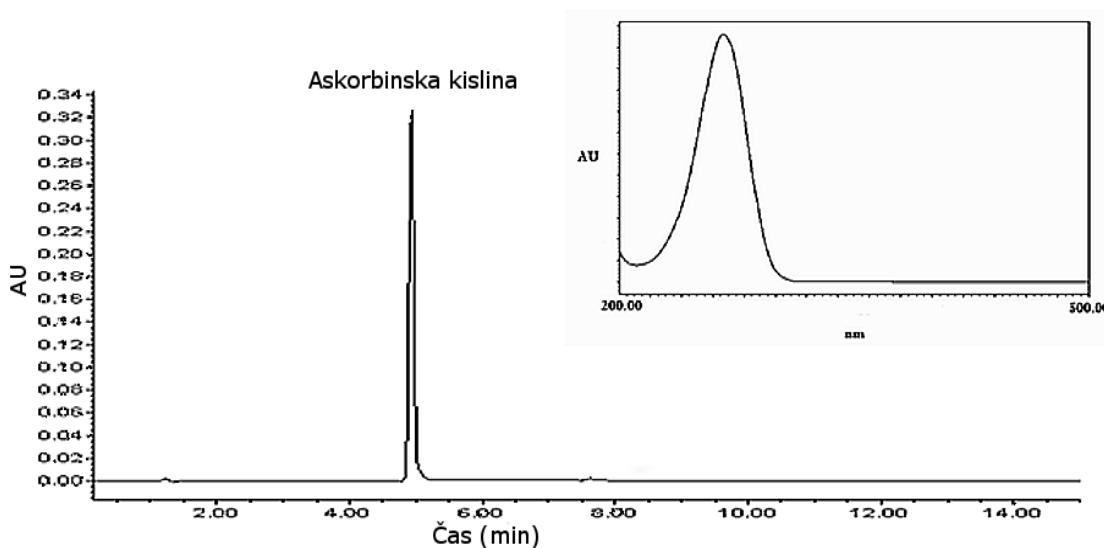
AK lahko vključimo v različne emulzijske sisteme in upočasnimo njeno razgradnjo v vodnih raztopinah. Sistem veziklov dobimo pri emulziji vode v olju v vodi, kjer v notranjem vodnem okolju raztopimo AK. Takšni vezikli se lahko uporabljajo za podaljšanje obstojnosti AK v zdravilih in kozmetični industriji (Gallarate in sod., 1999). Stabilnost AK podaljšamo z vključitvijo v nanodelce, ki so uporabni v živilih in lahko sestojijo iz hitozana, maltodekstrinov, pektina, proteinov izoliranih iz graha, fosfolipidov in ostalih snovi, ki tvorijo vezikle (Jang in Lee, 2008; Righetto in Netto, 2006; Pierucci in sod., 2006; Kirby in sod., 1991). Za izboljšanje stabilnosti AK, v pufernih raztopinah in celicah, se uporablja tudi derivatizacija v askorbat 2-fosfat, ki je topen v vodi in askorbat 6-palmitat, ki se lahko vključuje v lipidne sisteme (Vislisel in sod., 2007).

### 2.1.7 Metode določanja AK

Določanje vitamina C je zahtevno ne toliko z analitskega stališča, ampak predvsem zaradi stabilizacije vzorca pred analizo, saj sta tako AK kot DHA nestabilni in se pretvarjata do DKG, ki nima vitaminskega učinka (Wechtersbach in Cigic, 2007). Objavljenih je bilo veliko število metod za določanje AK in DHA. Metode, kot so spektrofotometrija, titracija, flourimetrija, voltametrija, elektroforeza in encimske tehnike pogosto ne omogočajo točnih meritev. Analizo motijo ostale redoks aktivne snovi v vzorcu, ki niso AK.

Kljub številnim novejšim metodam je spektrofotometrija še vedno pogosto v uporabi za določanje vitamina C. Prednosti, ki jih imajo spektrofotometrične metode, so lahka dostopnost in hitra uporabnost v rutinskih analizah. Z AK reagirajo različna barvila, med njimi pa je najbolj poznan 2,6-diklorofenol indofenol (DCIP), ki se uporablja pri uradni titrimetrični metodi za določanje vitamina C. Oksidirana oblika DCIP je v kislem okolju roza barve, ob prisotnosti AK pa se reducira in razbarva. (Arya in sod., 1998). Spektrofotometrične metode za določanje AK lahko razdelimo v dve skupini. V prvo sodi direktno merjenje absorbance AK, ki običajno poteka v kislem mediju pri 245 nm valovne dolžine. V drugi skupini pa so metode, kjer merimo absorpcijo svetlobe barvnega produkta, ki nastane pri redukciji različnih reagentov z AK (Zaporozhets in Krushinskaya, 2002).

Za določanje antioksidativnega potenciala v vodnih raztopinah se uporablja tudi ABTS, ki ga pred določanjem oksidiramo v reaktivni kationski radikal. Ob reakciji z antioksidanti se radikal  $\text{ABTS}^{+}$ , ki je modro zelene barve, razbarva. Svetlobo absorbira v vidnem delu absorpcijskega spektra in ima več absorpcijskih maksimumov (Re in sod., 1999).



Slika 3: Kromatogram, ki prikazuje standardno raztopino 50 mg/L AK. V okviru desno zgoraj je prikazan absorpcijski spekter AK (Iammarino in Di Taranto, 2012).

Kromatografske metode, zlasti visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC), se bolj pogosto uporabljajo za določanje vitamina C. AK lahko določamo z UV-Vis detektorjem, masnim spektrometrom, elektrokemijskim detektorjem in fluorimetrom, ki je povezan s HPLC ločevalnim sistemom. DHA pa detektorji slabu zaznavajo, zato jo derivatiziramo ali pa reduciramo v AK. To lahko storimo pred ali po ločevanju na koloni. Običajno DHA določimo kot razliko med skupno AK, izmerjeno po redukciji DHA in AK v originalnem vzorcu pred redukcijo (Karlsen in sod., 2005; Gökmen in sod., 2000). Za redukcijo se uporabljajo spojine, ki vsebujejo žveplo, kot so cistein, homocistein, dimerkaptoetanol, dimerkaptopropanol, glutation in ditiotreitol (DTT). Še bolj učinkovit pa je fosfor vsebujoči reducent tris-[2-karboksietil] fosfin (TCEP), ki omogoča redukcijo DHA tudi pri nizkem pH in je veliko manj občutljiv na prisotnost  $\text{Fe}^{3+}$  ionov od DTT (Wechtersbach in Cigic, 2007). HPLC metoda omogoča dobro občutljivost in specifičnost merjenja AK, vendar ima tudi številne slabosti. Analiza je dolgotrajna, naprava ni enostavno dostopna za določene laboratorije in prinaša številne stroške vzdrževanja (Vislisel in sod., 2007).

## 2.2 LIPOSOMI

### 2.2.1 Mikroinkapsulacijska tehnologija

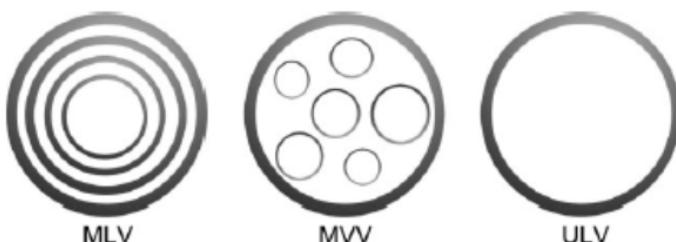
Mikroinkapsulacijska tehnologija pomeni obdajanje določenih spojin z različnimi ovojnimi materiali, z namenom zmanjšati ali preprečiti reakcije vključene spojine z zunanjim okoljem. Spojine vključene v takšne ovoje so zaščitene pred svetlobo, oksidacijo in drugimi neugodnimi reagenti, hkrati pa jim je omogočen kontroliran izpust na želenem mestu. Ovoj sestoji iz različnih naravnih in sintetičnih polimerov, ki imajo običajno lastnost tvorbe filma. Uporabljajo se lahko ovoji iz ogljikovih hidratov, kot so maltodekstrini in guma arabika (Righetto in Netto, 2006). Primeren ovojni material v živilski panogi je tudi alginat, ki je hidrofilni koloidni ogljikovodik pridobljen iz rjavih morskih trav in je užiten v prehrani (Bastos in sod., 2009). Podobno velja za hitozan, ki je kationski polisaharid, pridobljen iz hitina in je prav tako naravni polimer. Tudi sirotkini proteinski izolati, ki so stranski produkt proizvodnje sira, imajo dobre lastnosti za tvorbo gela in emulzije (Han in sod., 2008). Lahko se uporablja proteini, izolirani iz graha, ki imajo ustrezne lastnosti emulzije, tvorijo gel in sposobnost oblikovanja tankega sloja, ki ga imenujemo film. V farmacevtiki kot ovojni material pogosto zasledimo karboksi metil celulozo. Snov, ki jo uporabimo kot mikroinkapsulacijski material, mora biti ekonomsko upravičena in kemijsko skladna z živilom. Na stabilnost vplivajo tudi lastnosti inkapsulacijskih delcev, predvsem njihova velikost, molekularna sestava in mikrostruktura. (Pierucci in sod., 2006).

V prehrani se mikroinkapsulacijska tehnologija uporablja že od leta 1951, ko je Griffin pripravil oljne koncentrate v trdnem stanju. Danes se uporablja v panogah, kot so farmacija, agronomija, medicina, biotehnologija, biologija (Uddin in sod., 2001). V ovoj lahko vključimo različne prehranske dodatke, ko so antioksidanti, protimikrobne snovi, barvila, ojačevalci okusa in ostale snovi, ki ohranjajo senzoročne lastnosti in podaljšajo obstojnost živil (Bastos in sod., 2009). Industrijska predelava živil pogosto zahteva dodajanje bioaktivnih snovi, ki zagotovijo ustrezen okus, barvo, teksturo, podaljšajo obstojnost živila in zmanjšujejo tveganja za nastanek določenih bolezni. Z mikroinkapsulacijo lahko izboljšamo stabilnost funkcionalnih snovi med predelavo in shranjevanjem živil ter preprečimo interakcije z zunanjim okoljem. Zagotovimo boljšo stabilnost bioaktivnih snovi v živilu in v gastrointestinalnem traktu, kjer z nadzorovanim tarčnim izpustom lahko dosežemo pozitivne vplive na zdravje (Champagne in Fustier, 2007). Pri predelavi živil je najpogostejsa mikroinkapsulacijska tehnika sušenje z razprševanjem, ki je enostavna in dostopna. Takšni ovoji so uporabni v živilih z nizko vodno aktivnostjo (aw), kot je puding prah, mleko v prahu, žitarice ali briketi za domače živali. Tehnologija se uporablja tudi v tekočih prehranskih sistemih, kjer lahko zaščitimo vsebino z vključitvijo v liposome (Finotelli in Miguez da Rocha Leao, 2005).

Z vključitvijo AK v ovoj lahko preprečimo tudi nekatere njene pomanjkljivosti, kot so vpliv na senzorične lastnosti živila (diskoloracije, kislota) in občutljivost na tehnološko obdelavo ter omogočimo njeni boljši obstojnost. Izberite ovojnega materiala je odvisna od kemijskih in fizikalnih lastnosti vključene snovi ter od metode, s katero tvorimo vezikle (Lee in sod., 2003).

### 2.2.2 Definicija, kemijske in strukturne lastnosti liposomov

Liposome sestavlja en ali več lipidnih dvoslojev. Običajno so to fosfolipidi, ki pa imajo lahko v strukturo primešane tudi druge molekule, kot so ostali lipidi, proteini ali polimeri. Beseda liposom izvira iz grškega jezika, kjer *lipos* pomeni maščobo, *soma* pa telo oziroma strukturo. Označuje strukturo, kjer lipidni ovoj obdaja vodno vsebino. V liposomologiji jih definirajo kot zaprte neprekinjene dvoslojne strukture, narejene iz lipidov (Mozafari in sod., 2006). So kroglaste oblike, narejene iz lipidnega dvosloja, ki ga tvorijo amfifilne molekule. V vodi niso topni, ampak tvorijo koloidne disperzije. Veliki so od 10 nm do nekaj deset mikrometrov. V vodnih raztopinah se orientirajo tako, da so polarne skupine (hidrofilne glave) v stiku z vodo, nepolarne skupine (hidrofobni repi) pa se skrivajo v notranjosti dvosloja (Gopalakrishnan, 2006). Liposome lahko delimo glede na velikost in število membran. Pri metodi rehidracije lipidnega filma se tvorijo večslojni vezikli (MLV) s premerom med 0,5 µm in 20 µm. Pripravimo lahko tudi majhne enoslojne vezikle (SUV), ki imajo en fosfolipidni dvosloj in premer od 20 nm do 100 nm. Večjo učinkovitost vključitve vodotopnih snovi omogočajo veliki enoslojni vezikli (LUV) velikosti med 100 nm in 1 µm (Taylor in Morris, 1995). Poznamo tudi večvezikularne vezikle (MVV), kjer je več manjših nekoncentričnih veziklov ujetih v eno lamelo lipidnega dvosloja in enoslojni vezikli (Mozafari in sod., 2006).



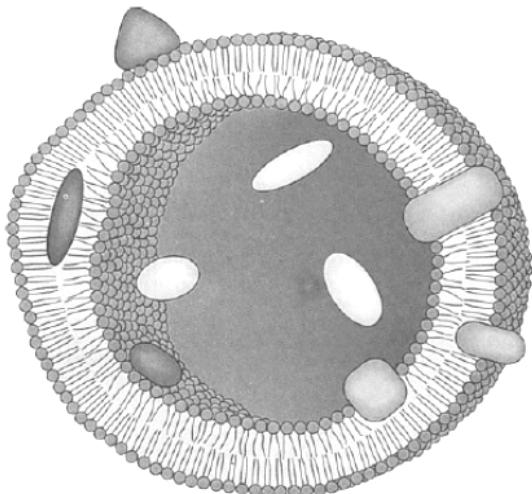
Slika 4: Različne strukture liposomov. Večslojni vezikli (MLV) z več lipidnimi dvosloji, večvezikularni vezikli (MVV), kjer je več manjših veziklov ujetih v eno lamelo lipidnega dvosloja in enoslojni vezikli (ULV), ki jih sestavlja samo en lipidni dvosloj (Mozafari in sod., 2006).

Fosfolipidi so glavni gradniki bioloških membran in se običajno uporabljajo za tvorbo liposomov. Liposomi se že skoraj pol stoletja uporabljajo za prenašanje in zaščito hidrofilnih in hidrofobnih aktivnih snovi (Khan in sod., 2008). Številni lipidi, ki so prisotni v celičnih membranah, se organizirajo v različne strukture. Lipidi s polarnimi glavami in dolgimi hidrofobnimi repi se v vodnih raztopinah formirajo v lipidni dvosloj. Pri tem zajamejo del vodne faze in jo obdajo z dvoslojnim ovojem, tako da se tvorijo vezikli, ki jih

imenujemo liposomi (Hull in sod., 2004). Fosfolipid s holinom (PC), imenovan tudi lecitin, je najpogosteje prisoten fosfolipid. Sestavljen je iz glicerola, ki ima na prvem in drugem ogljiku preko hidroksilne skupine zaestreni dve acilni ogljikovodikovi verigi. Na tretjem ogljiku pa je pripet fosfat, ki je povezan še s holinom. Obe ogljikovodikovi verigi predstavljata nepolarni del molekule, ki ga imenujemo hidrofobni rep. Fosfoholin pa je polarni del imenovan hidrofilna glava. Značilno je, da glede na temperaturo in lipidno sestavo liposomi obstajajo v različnih oblikah. Bistven parameter je temperatura, pri kateri pride do prehoda iz gel faze v tekočo kristalinično fazo. Segrevanje nad določeno temperaturo povzroči izgubo urejene kompaktne strukture. Pri lipidih z daljšimi ogljikovodikovimi verigami je temperatura faznega prehoda višja. Vpliv ima tudi stopnja nenasičenosti maščobnih kislin, in sicer velja, da več kot je dvojnih vezi pri nižji temperaturi se struktura fosfolipidov spremeni. Liposomi v tekočem kristaliničnem stanju so bolj občutljivi, struktura razpade in pride do izpusta vključenih snovi. Večina naravnih fosfolipidov ima vezane maščobne kisline z različno dolgimi ogljikovodikovimi verigami, kar pomeni, da fazni prehod poteka pri različnih temperaturah (Taylor in sod., 2005).

### 2.2.3 Stabilnost liposomov

Liposomi so občutljivi na osmotski pritisk. V hipoosmolarnem okolju v notranjost liposomov vdira voda. Membrana se napne in v določeni točki se odprejo pore, skozi katere prehaja vsebina liposomov. Ko je osmolarnost na obeh straneh membrane izenačena, se pore zopet zaprejo (Hull in sod., 2004).



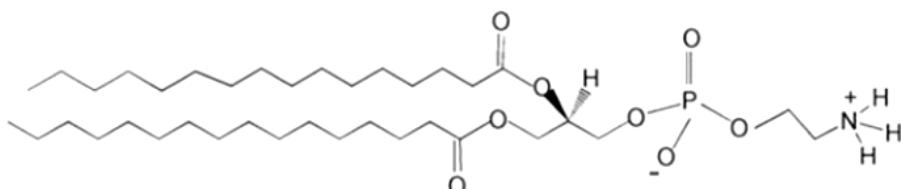
Slika 5: Model liposoma z membrano iz fosfolipidnega dvosloja. V notranjem okolju so hidrofilne molekule v vodni raztopini, v membrano liposomov pa so vključene hidrofobne molekule, ki so zasidrane med maščobnokislinske repe fosfolipidov (Gopalakrishnan, 2006).

Na prepustnost liposomalne membrane vplivajo še drugi dejavniki. Pri temperaturi faznega prehoda se prepustnost poveča. Vključitev holesterola v fosfolipidno membrano pa poveča rigidnost in zmanjša prepustnost dvosloja pri segrevanju. Amfifilni detergenti povzročijo razpad fosfolipidnega dvosloja in spustitev vključenih snovi v zunanje okolje (Lin in Thomas, 2004). Fosfolipidna membrana liposomov je v kislem in bazičnem okolju podvržena hidrolizi, katere stopnja je odvisna od temperature in pH. Produkti, ki se prvotno tvorijo, so lizolipidi in proste maščobne kisline, kasneje pa še glicerol-3-fosfatidilholin in glicerol-3-fosforna kislina. Pojav teh produktov spremeni strukturo fosfolipidnega dvosloja in povzroči puščanje liposomov ter njihovo spajanje in preoblikovanje v spremenjene skupke (Ickenstein in sod., 2006).

S časom na liposome vedno bolj vplivajo oksidacijski procesi in hidroliza. Lahko rečemo, da so sveži liposomi najstabilnejši, s staranjem pa se njihova struktura spreminja in stabilnost zmanjša. Tvorba hidroliznih produktov povzroči nastanek večjih liposomov in poveča njihovo prepustnost. Fizično stabilnost liposomov, ki je povezana s kemijsko hidrolizo merimo z različnimi metodami. Z dinamičnim sipanjem svetlobe merimo velikost veziklov, motnost suspenzije določamo s turbidimetrijo, s fluorescentno anizotropijo lahko ocenimo rigidnost fosfolipidnega dvosloja, z nuklearno magnetno resonanco pa lipidno sestavo liposomov (Zuidam in sod., 1995).

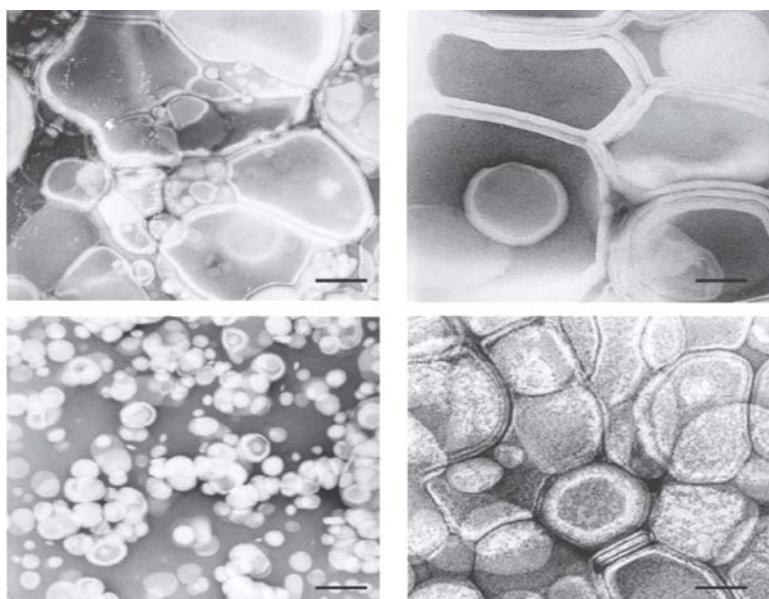
#### 2.2.4 Metode za pripravo liposomov

Liposome lahko pripravimo iz naravnih ali sintetičnih fosfolipidov. Naravne običajno pridobivamo iz soje ali jajčnega rumenjaka, značilni pa so, poleg fosfatidilholina, še fosfatidilserin in fosfatidilglicerol (Taylor in Morris, 1995). Med naravnimi so pomembni tudi fosfolipidi, ki sestavljajo mlečne maščobne kroglice, saj so primerni za pripravo stabilnih liposomov (Thompson in sod., 2009). Glede na opisane metode se za tvorbo liposomov pretežno uporabljajo fosfolipidi, glikolipidi in holesterol. Priprava liposomov iz sintetičnih fosfolipidov, med katerimi se najpogosteje uporablja dipalmitoil fosfatidilholin (DPPC) pa omogoča boljšo stabilnost pri višjih temperaturah. Prav tako dodatek holesterola stabilizira liposomalno membrano in preprečuje reakcije z lipidi v okolju (Sułkowski in sod., 2005).



Slika 6: Strukturna formula sintetičnega fosfolipida dipalmitoil fosfatidilholina (DPPC) (Gopalakrishnan, 2006).

Za pripravo liposomov uporabljamo različne tehnike. Izbera tehnike določa velikost liposomov, njihovo učinkovitost vključitve vodne raztopine v notranjost veziklov in število membran, ki tvorijo vezikle. Med tehnikami priprave zasledimo tradicionalno metodo dehidracije in rehidracije tankega lipidnega filma, ki je v uporabi že več desetletij. Temelji na uporabi organskega topila, v katerem raztopimo fosfolipide. Z rotacijskim evaporatorjem odstranimo topilo in dobimo tanek lipidni film na steni steklene bučke. Sledi rehidracija filma v vodni raztopini nad temperaturo faznega prehoda lipidov ob stresanju in mešanju bučke. Problem dehidracijsko/rehidracijske metode je uporaba nevarnih in za živilstvo neprimernih organskih topil, kot sta kloroform in metanol. Za uporabo v prehrani je zato primerna mikrofluidizacija, ki temelji na homogenizaciji lipidne disperzije pod visokim tlakom, brez organskih topil. S to metodo pripravimo vezikle manjšega premera in večji delež enoslojnih veziklov kot z ostalimi tehnikami. Tudi pri metodi priprave liposomov s segrevanjem ne uporabljamo organskih topil in je zato bolj varna v prehrani. Lipide rehidrirane v vodi in zmešane z glicerolom segrevamo do nastanka koncentriranega gela, ki ga sestavljajo lipidni vezikli (Thompson in sod., 2007).



Slika 7: Liposomi prikazani s transmisijskim elektronskim mikroskopom. Merilo na desni strani slike je 0,5  $\mu\text{m}$ , na levi strani pa 0,1  $\mu\text{m}$ . Zgornji sliki prikazujeta liposome pripravljene po tradicionalni metodi rehidracije tankega lipidnega filma, spodnji sliki pa liposome pripravljene z mikrofluidizacijo (Thompson in sod., 2007).

Metode za pripravo liposomov izbiramo glede na namen njihove uporabe. Naslednja znana metoda je elektroformacija, kjer se liposomi tvorijo na površini elektrode v vodni raztopini ob spodbujanju z električnim poljem. Primerna je za pridobivanje homogenih vzorcev ogromnih enoslojnih liposomov (Gopalakrishnan, 2006). Med fizikalne tehnike sodi tudi ekstruzija, s katero pripravimo enoslojne liposome kontrolirane velikosti, ki je odvisna od premera por polikarbonatne membrane, skozi katero potiskamo raztopino liposomov (Lapinski in sod., 2007).

## 2.2.5 Uporaba liposomov

Molekule, vključene v liposome, so zaščitene pred vplivom zunanjega okolja. Liposomi jim omogočajo prenos, razporeditev in izpust na točno določenem mestu v organizmu (Bastiat in sod., 2007). Pomembna prednost liposomov je, da jih sestavljajo užitne in nenevarne spojine, kar omogoča njihovo uporabo v živilstvu. Služijo predvsem za zaščito funkcionalnih spojin, kot so proteini, encimi, vitamini in aromatične spojine v različnih živilih. Potrebno je vedeti, da je uporaba liposomov v živilski tehnologiji na začetku razvoja in za večjo ekonomsko upravičenost se je potrebno osredotočiti na pripravo liposomov iz naravnih neprečiščenih virov polarnih lipidov, ki so veliko cenejši (Taylor in sod., 2005).

V živilih se uporabljam za zaščito nestabilnih molekul in za izboljšanje učinkovitosti različnih dodanih snovi. Vključene snovi so bolj stabilne na kemijske in encimske spremembe, kot tudi na neugodno temperaturo in pH v okolju (Mozafari in sod., 2008). Liposomi omogočajo vključitev hidrofilnih in hidrofobnih molekul ter njihovo enakomerno razporeditev v različnih neugodnih živilskih matriksih (Keller, 2001). Uporaba liposomov v živilstvu temelji na njihovih koloidnih lastnostih in tvorbi emulzije. Vključevanje in zaščita želenih molekul ima velik vpliv v predelavi živil. Liposomi lahko sodelujejo v proizvodnji sira, kjer v njih vključimo proteolitične encime in tako skrajšamo čas fermentacije (Gopalakrishnan, 2006). Preučuje se tudi vključevanje protimikrobnih sredstev, ki omogočijo boljšo mikrobiološko varnost in podaljšano obstojnost živil (Mozafari in sod., 2008). Zasledili smo tudi uporabo lipidnih veziklov v mleku in mlečnih izdelkih, kjer so z vključitvijo v liposome zaščitili AK in železo. Tako preprečimo železu, da se oksidira in zamaskiramo neželeni kovinski okus. S stabilizacijo AK pa zagotovimo, da ohranja železo v reducirani obliki, ki se lažje absorbira in tako zdravimo anemijo (Lee in sod., 2003).

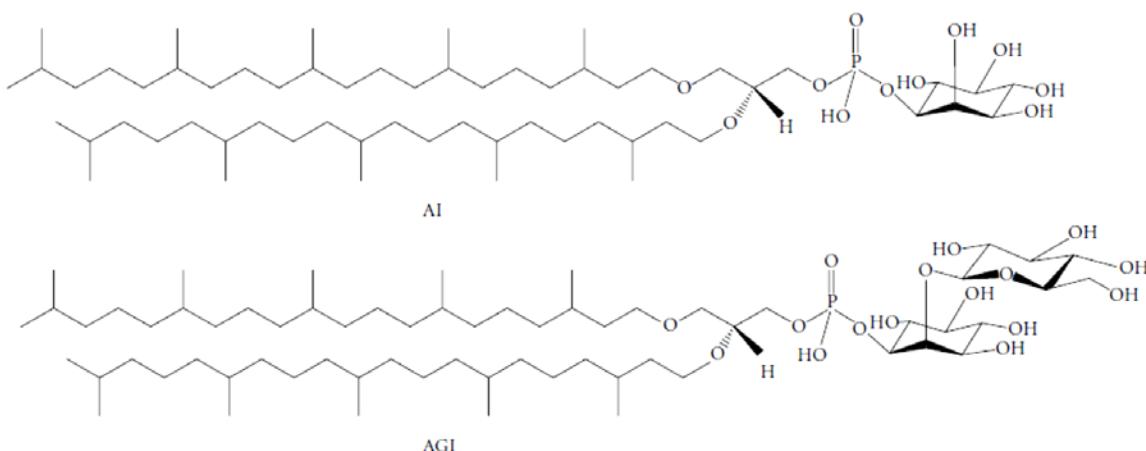
V začetku so liposomi služili kot model za preučevanje lastnosti bioloških membran. Razvoj in nova odkritja so omogočila vključevanje in zaščito snovi tudi v drugih panogah. Tako liposomi predstavljajo prenašalni sistem za nekatere zdravila, genski material, encime, pesticide in druge funkcionalne snovi (Taylor in sod., 2005). Navaja se uporaba v biokemiji, molekularni biologiji, živilski tehnologiji, farmaciji in medicini (Silva in sod., 2010).

Fosfolipidni liposomi imajo, kljub množični uporabi, nekatere slabosti. Predvsem reaktivnost z biološkimi spojinami, njihova relativna nestabilnost ter visoki stroški ekstrakcije in sinteze. To so glavni razlogi za pripravo liposomov iz nefosfolipidnih amfifilnih lipidov. Uporabili so že sfingolipide, proste maščobne kisline in nekatere polimere (Bastiat in sod., 2007).

## 2.2.6 Arheosomi

Arheosomi so liposomi, narejeni iz polarnih etrskih lipidov, ki so ekstrahirani iz celične membrane arhej. Za razliko od liposomov z esterskimi vezmi so arheosomi bolj termostabilni, odpornnejši na oksidacijo in na kemijsko ter encimsko hidrolizo. Arheje živijo v okoljih z ekstremnimi razmerami, kot so visoke temperature, visoke koncentracije soli in nizke pH vrednosti. To jim omogoča unikatna sestava membranskih lipidov (Mozafari in sod., 2006). Tako so se arhejni lipid izkazali kot odličen vir za pripravo liposomov, ki pri visokih temperaturah preprečujejo spuščanje snovi v okolico. Morfološke raziskave so pokazale, da imajo arhejni lipid bolj tesno urejene in manj prožne lipidne verige v primerjavi z običajno fosfolipidno membrano. So primerna alternativa za uporabo kot prenašalni sistem genetskega materiala, zdravil in ostalih snovi, saj so varni za uživanje. Bistvene značilnosti v kemijski strukturi arhejnih lipidov so, da imajo ogljikovodikove verige priključene na glicerol na drugem in tretjem ogljikovem atomu, na prvem pa je fosfatna skupina. Ogljikovodikove verige predstavljajo z etrsko vezjo vezane izoprenoidne skupine (Poklar-Ulrich in sod., 2009).

Predstavnik hipertermofilnih arhej je striktno aerobna vrsta *Aeropyrum pernix*, ki ima celično membrano sestavljenou iz dietrskih polarnih lipidov. Arheosomi, pripravljeni iz takšnih lipidov nimajo faznega prehoda iz gel stanja v tekoče kristalinično stanje v območju od 0 °C do 100 °C. Na stabilnost arheje *A. pernix* pa vpliva pH okolja. Raziskave so pokazale, da je rast najboljša pri nevtralnem pH, bazično območje pri pH 8 je manj primerno, v kislem območju pri pH 5 pa se rast ustavi (Ota in sod., 2012).



Slika 8: Struktura polarnih dietrskih lipidov, ki sestavlja celično membrano arheje *Aeropyrum pernix*. Zgornja formula predstavlja C<sub>25,25</sub>- arhetidilinozitol (AI), formula spodaj pa C<sub>25,25</sub>-arhetidil(glukozil)inozitol (AGI) (Ota in sod., 2012).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

Glavne spojine za pripravo liposomov so bile:

- 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoholin (DPPC) proizvajalca NOF (Coatsome),
- holesterol (Avanti polar lipids, ZDA),
- arhejni lipidi izolirani iz hipertermofilne arheje *Aeropyrum pernix* (izolat),
- askorbinska kislina (Merck, Nemčija).

Pufre za modelne raztopine smo pripravili iz:

- citronske kisline (Merck, Nemčija),
- ocetne kisline (Merck, Nemčija),
- mravljične kisline (Merck, Nemčija),
- vode prečiščene s sistemom MilliQ, (Millipore, ZDA),
- natrijevega hidroksida (NaOH) (Merck, Nemčija).

Stabilnost AK, vključene v liposome, smo določali v dveh živilih (realna vzorca). Prvi je bil bistri jabolčni sok Vita fit 1,5 L s 100 % sadnim deležem, proizveden za Lidl. Drugi pa fermentiran mlečni napitek Actimel z navadnim okusom in posneto maščobo, na vsebnost 0,1 %. Proizvajalec je Danone, Francija. Obe živili smo odprli pred uporabo.

Za spremjanje stabilnosti AK v modelnih in nekaterih realnih raztopinah smo pripravili liposome s 124 mOsm notranjim in zunanjim okoljem. Liposome z notranjostjo pH 3 smo pripravili v raztopini s končnimi koncentracijami 50 mM AK in 50 mM citratnim pufrom pH 3. Liposome z notranjostjo pH 4 smo pripravili v raztopini s končnimi koncentracijami 50 mM AK, 25 mM citratnim pufrom pH 4 in 19 mM NaOH. Za inkubacijo v jabolčnem soku smo pripravili tudi liposome s 620 mOsm notranjim okoljem, tako da smo lipide rehidrirali z raztopino 250 mM AK in 250 mM citratnega pufra pH 3.

##### 3.1.1 Ostale kemijske spojine

- kloroform  $\text{CHCl}_3$  (Merck, Nemčija),
- dušik v plinastem stanju  $\text{N}_2$  (Messer, Ruše, Slovenija),
- tekoči dušik (Messer, Griesheim, Nemčija),
- 2,2-azino-bis(3-etilbenztiazolin-6-sulfonska kislina); ABTS (Sigma, ZDA),
- manganov dioksid  $\text{MnO}_2$ ,
- detergent triton x-100,
- vodna raztopina bakrovih ionov ( $\text{CuSO}_4$ ),
- askorbat-oksidaza z aktivnostjo 1,3 U/mL (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija),

- metafosforna kislina,
- tris 2-karboksi etil fosfin (TCEP),
- etil acetat (Merck, Nemčija),
- fruktoza (Matik, Slovenija),
- natrijev hidroksid (NaOH) (Merck, Nemčija),
- žveplova VI kislina ( $H_2SO_4$ ) (Merck, Nemčija),
- natrijev klorid (NaCl) (Merck, Nemčija),
- 96 % etanol ( $C_2H_5OH$ ) (Merck, Nemčija).

### 3.1.2 Aparature

- rotacijski evaporator (rotavapor) z vodno kopeljo B-480 Büchi, Švica,
- ekstrudor Avanti polar lipids, Inc., ZDA,
  - polikarbonatna membrana z 800 nm porami,
  - teflonska podpora membrane z O-obroči,
  - filtrske podpore za polikarbonatno membrano,
  - dve stekleni siringi, 1 mL,



Slika 9: Ekstrudor, ki sestoji iz dveh siring in vmesne teflonske nosilne podpore kjer je polikarbonatna membrana (Mozafari in sod., 2008).

- UV-Vis Spektrofotometer Varian Cary 100 Bio, model 8453, Avstralija,
  - območje valovnih dolžin delovanja od 190 nm – 900 nm z natančnostjo  $\pm 0,2$  nm,
  - dvožarkovno delovanje,
  - Cary WinUV analitska programska oprema,
- HPLC sistem, ki ga sestavlja:
  - X-Act 4-kanalna razplinjevalna enota (Jour research, Švedska),
  - črpalka Knauer K-1001 (Nemčija),
  - avtomatski podajalnik Marathon XT (Spark-Holland, Nizozemska),
  - komunikacijski vmesnik ValueChrome (Bio-Rad, ZDA),
  - detektor Knauer UV-Vis (Nemčija),
  - osebni računalnik s programsko opremo EuroChrom 2002,

- analitska tehnica Mettler Toledo, Švica,
- pH meter HI 221 Hanna instruments, Italija,
- vibracijski stresalnik (vrtinčnik) Vibromix, Tehnica Železniki, Slovenija,
- centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415c, Nemčija,
- centrifuga Hettich Rotanta 460R, Nemčija,
- hladilnik z zamrzovalnikom,
- kuhalnik,
- pečica s termostatom.

### **3.1.3 Ostala laboratorijska oprema**

- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija),
- steklene bučke za rotavapiranje, 100 mL,
- steklene kroglice (Sigma, ZDA) silanizirane z diklorometilsilanom (Fluka, Švica),
- dializno črevo iz celuloze, premera 10 mm (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- polistirenske (PS) kivete 1,5 mL, dolžina optične poti 10 mm (Plastibrand, Nemčija),
- kvarčna kiveta 0,7 mL, dolžina optične poti 2 mm, za termično analizo (Agilent, ZDA),
- viale 2 mL,
- filter 0,20 µm z nastavkom za brizgo in brizga,
- inzulinske brizge,
- plastične centrifugirke 15 mL in 50 mL,
- mikrocentrifugirke 1,5 mL in 2 mL,
- krioviale, 3 mL,
- laboratorijska steklovina (čaše, merilni valji, bučke, erlenmajerice),
- magnetna mešala,
- kapalka,
- spatula,
- pinceta,
- čolniček za tehtanje,
- parafilm,
- lanena vrv,
- alu folija,
- zaščitne rokavice,
- zaščitna očala.

## 3.2 METODE DELA

### 3.2.1 Priprava liposomov z vključeno AK

Liposome pripravimo po tradicionalni metodi rehidracije tankega lipidnega filma v stekleni 100 mL bučki. V silanizirano bučko zatehtamo 10 mg lipidov in dodamo 1 mL kloroformu. Na vibracijskem stresalniku močno stresamo, da se lipidi popolnoma raztopijo. Nato namestimo bučko na rotavapor in ob podtlaku, stalnem vrtenju v vodni kopeli (nad 40 °C) ter prepihovanju z dušikom odparimo kloroform. Ko kloroform ni več, se na dnu in stenah bučke naredi tanek lipidni film, s sušenjem pa nadalujemo še 30 min (Kirby in sod., 1991).

Bučko z lipidi segrevamo v termostatni peči nad 50 °C približno 5 do 10 minut. Dodamo tudi silanizirane steklene kroglice. Sledi rehidracija lipidnega filma z raztopino AK in citratnega pufra. Za boljšo rehidracijo lipidnega filma in tvorbo liposomov bučko večkrat izmenično stresamo na vibracijskem stresalniku in segrevamo v časi vode na kuhalniku pri temperaturi 46 °C. Pomembno je, da so lipidi nad temperaturo faznega prehoda, ki je za DPPC liposome 41,3 °C (Wechtersbach, 2011). To ponavljamo, dokler se ne raztopi ves lipidni film v bučki in se formirajo liposomi.

Raztopino liposomov odpipetiramo v 3 mL kriovialo, zapremo s pokrovčkom in obdamo s parafilmom. Kriovialo izmenično potapljam v tekoči dušik in segreto vodo na kuhalniku (46 °C). Ta postopek, ki ga ponovimo 5-krat, pripomore k večji inkapsulaciji AK (Thompson in sod., 2009). Nato suspenzijo liposomov s siringama potiskamo skozi polikarbonatno membrano z 800 nm velikimi porami na ekstrudorju pri temperaturi nad 40 °C v termostatirani pečici. Raztopino liposomov smo potiskali skozi membrano več kot 20-krat. Pri eksruziji je potrebna previdnost, občutek in dovolj visoka temperatura, da se polikarbonatna membrana ne pretrga. Natančnost zahteva tudi pravilna sestava ekstrudorja. Na obe strani membrane, ki jo omočimo v MilliQ vodi, je potrebno namestiti podpore. Z ekstruzijo dobimo uniformne velike unilamelarne liposome, ki so veliki 800 nm ali manj. Iz siringe jih prenesemo v 15 mL centrifugirko.

Vzorec odpipetiramo v tanko celulozno membrano v obliki črevesa (dializno črevo). Dializno črevo moramo pred tem namakati v vodi in ga na enem koncu zatesniti. Eno stran zavežemo z laneno vrvjo (ali posebnimi stiščki), z drugega odprtrega konca pa ga napolnimo s suspenzijo liposomov in nato zavežemo še ta konec. Napolnjeno dializno črevo potopimo v časo z 1 L formiatnega pufra, ki je pripravljen tako, da zagotovimo izoosmolarne pogoje glede na vsebino dializnega čreva. Dializa poteka ob stalnem mešanju s pomočjo magnetnega mešala v hladilniku do naslednjega dne. Dializno črevo ima pore, skozi katere tekom dialize odstranimo preostalo AK, ki se ni vključila v liposome. Liposomi pa ostanejo v črevu saj ne morejo skozi pore membrane.

### 3.2.1.1 Priprava raztopine AK v citratnem pufru

Suho kristalinično AK raztopimo v citratnem pufru (C) pri različnih pH (3,4) vrednostih. Koncentracija AK v raztopini je v vseh primerih 50 mM.

#### AK v C3 124 mOsm

88 mg AK  
+ 500 µL (1 M C3)  
+ 9500 µL (voda MilliQ)

#### AK v C4 124 mOsm

2,5 mL (100 mM C4)  
+ 190 µL (1 M NaOH)  
+ 7310 µL (voda MilliQ)

stresamo na vibracijskem stresalniku in na koncu dodamo še

88 mg AK

### 3.2.1.2 Priprava liposomov iz mešanice lipidov DPPC/hol in DPPC/*A. pernix*

Glede na lipidno sestavo smo pripravili tri različne vrste liposomov. Poleg zgoraj omenjenih DPPC fosfolipidov smo za pripravo liposomov uporabili še mešanico iz 0,85 masnega deleža DPPC fosfolipidov in 0,15 masnega deleža holesterola ter mešanico DPPC fosfolipidov in arhejnih lipidov v masnem razmerju 9:1. Raztopina arhejnih lipidov s koncentracijo 10 mg/mL je bila predhodno pridobljena iz hipertermofilne arheje *Aeropyrum pernix*. Postopek priprave liposomov je enak kot je opisano v poglavju 3.2.1, le da arhejnih lipidov zaradi majhnih količin nismo tehtali direktno, ampak smo jih pipetirali že raztopljene v kloroformu. Tako smo jih s pipeto dodali DPPC fosfolipidom, ki smo jih tudi predhodno raztoplili v kloroformu. V DPPC/hol liposome smo vključili AK, raztopljeno v citratnem pufru pH 3 in v citratnem pufru pH 4, v DPPC/*A. pernix* liposome pa smo vključili AK, raztopljeno v citratnem pufru pH 4.

### 3.2.1.3 Priprava pufrov za dializo

Za dializo smo pripravili 108 mM formiatni pufer pH 3 in 75 mM formiatni pufer pH 4 (osmolarnost obeh pufrov je 124 mOsm). Pufra smo pripravili iz koncentrirane mravljične kisline, ki smo jo raztoplili v MilliQ vodi in nato uravnali pH do 3 oziroma 4 z dodajanjem NaOH.

### 3.2.2 Priprava modelnih raztopin

#### 3.2.2.1 Priprava pufrov za modelne raztopine

Pripravili smo različne raztopine za preverjanje stabilnosti AK. Koncentracije pufrov so preračunane tako, da so v notranjosti liposomov in v zunanjem okolju izoosmolarni pogoji. Končne koncentracije pufrov v modelnih raztopinah (v 15 mL centrifugirki) so: 87 mM C3, 57 mM C4, 43 mM C5, 108 mM For3, 75 mM For4, 75 mM A5. Vsi pufri imajo osmolarnost 124 mOsm, ki je enaka tisti v notranjosti liposomov. Pufre smo pripravili tako, da smo raztopinam kislin pH uravnali z NaOH.

#### 3.2.2.2 Priprava raztopine Cu<sup>2+</sup> ionov

Bakrov sulfat (CuSO<sub>4</sub>) smo raztopili v MilliQ vodi in pripravili 1 mM raztopino, ki smo jo hranili v 15 mL plastični centrifugirki.

#### 3.2.2.3 Priprava modelnih raztopin s prosto AK

V 15 mL plastične centrifugirke smo odpipetirali ustrezne volumne koncentriranih pufrov, MilliQ vodo, raztopino bakrovega sulfata (le v nekatere) in na koncu raztopino askorbinske kisline. Končna koncentracija AK po redčenju je bila 23 mg/L.

Preglednica 2: Priprava modelnih raztopin za spremljanje stabilnosti proste AK. Raztopine smo odpipetirali v 15 mL centrifugirke. Skupni volumen je bil 8 mL. AK smo dodali na koncu in spektrofotometrično z reagentom ABTS\* določali koncentracijo AK v daljšem časovnem obdobju (počasnejša kinetika oksidacije AK).

Modelne raztopine	Pufer (µL)	1 mM CuSO <sub>4</sub> (µL)	Voda MilliQ (µL)	1 g/L AK (µL)
1 M C3	680	/	7136	184
1 M C3 / Cu <sup>2+</sup>	680	128	7008	184
0,5 M C4	891	/	6925	184
0,5 M C5	672	/	7144	184
1 M For3	844	/	6972	184
1 M For4	586	/	7230	184

Preglednica 3: Priprava modelnih raztopin za spremljanje stabilnosti proste AK. Raztopine smo odpipetirali v 15 mL centrifugirke. Skupni volumen je bil 4 mL. AK smo dodali na koncu in spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 250 nm določali koncentracijo AK (hitra kinetika oksidacije AK).

Modelne raztopine	Pufer (µL)	1 mM CuSO <sub>4</sub> (µL)	Voda MilliQ (µL)	1 g/L AK (µL)
0,5 M C4 / Cu <sup>2+</sup>	445	64	3399	92
0,5 M C5 / Cu <sup>2+</sup>	336	64	3508	92
1 M For3 / Cu <sup>2+</sup>	422	64	3422	92
1 M For4 / Cu <sup>2+</sup>	294	64	3550	92
0,5 M A5	586	/	3322	92
0,5 M A5 / Cu <sup>2+</sup>	586	64	3258	92

### 3.2.2.4 Priprava modelnih raztopin z AK, vključeno v liposome

#### Liposomi DPPC ali DPPC/hol z vključeno AK, raztopljeni v C3

Suspenzijo liposomov smo po končani dializi redčili 25-krat v 15 mL centrifugirke. Najprej smo odpipetirali, upoštevajoč izoosmolarne pogoje, ustrezne volumne pufov, MilliQ vode in v določene raztopine še CuSO<sub>4</sub>. Na koncu smo dodali suspenzijo liposomov.

Preglednica 4: Priprava modelnih raztopin za spremljanje stabilnosti AK vključene v DPPC ali DPPC/hol liposome. AK je bila vključena v liposome v citratnem pufru pH 3 (C3) in dializirana v formiatnem pufru pH 3 (For3). V oklepajih je podan skupni volumen posamezne modelne raztopine.

Modelne raztopine	Pufer (µL)	1 mM CuSO <sub>4</sub> (µL)	Voda MilliQ (µL)	Liposomi (µL)
1 M C3 (12 mL)	1044	/	10476	480
1 M C3 / Cu <sup>2+</sup> (7 mL)	609	112	5999	280
0,5 M C5 (10 mL)	860	/	8740	400
0,5 M C5 / Cu <sup>2+</sup> (7 mL)	602	112	6006	280
0,5 M A5 (8mL)	1200	/	6480	320
0,5 M A5 / Cu <sup>2+</sup> (7 mL)	1050	112	5558	280

#### Liposomi DPPC ali DPPC/hol z vključeno AK, raztopljeni v C4

Suspenzijo liposomov DPPC smo redčili 20-krat, suspenzijo liposomov DPPC/hol pa 12,5-krat, oboje v 15 mL centrifugirke. Postopek pipetiranja je enak kot pri liposomih z AK v C3. Volumne smo preračunali, tako da smo zagotovili ustrezne koncentracije in izoosmolarne zunanje pogoje.

Preglednica 5: Priprava modelnih raztopin za spremljanje stabilnosti AK vključene v DPPC liposome. AK je bila vključena v liposome v citratnem pufru pH 4 (C4) in dializirana v formiatnem pufru pH 4 (For4). V oklepajih je podan skupni volumen posamezne modelne raztopine.

Modelne raztopine	Pufer (µL)	1 mM CuSO <sub>4</sub> (µL)	Voda MilliQ (µL)	Liposomi (µL)
0,5 M C4 (10 mL)	1083	/	8417	500
0,5 M C4 / Cu <sup>2+</sup> (5 mL)	542	80	4128	250
0,5 M C5 (8 mL)	654	/	6946	400
0,5 M C5 / Cu <sup>2+</sup> (5 mL)	409	80	4261	250
1 M For3 (10 mL)	1026	/	8474	500
1 M For3 / Cu <sup>2+</sup> (5 mL)	513	80	4157	250
1 M For4 (10 mL)	713	/	8787	500
1 M For4 / Cu <sup>2+</sup> (5 mL)	356	80	4314	250
0,5 M A5 (8 mL)	1140	/	6460	400
0,5 M A5 / Cu <sup>2+</sup> (5 mL)	713	80	3957	250

Preglednica 6: Priprava modelnih raztopin za spremljanje stabilnosti AK vključene v DPPC/hol liposome. AK je bila vključena v liposome v citratnem pufru pH 4 (C4) in dializirana v formiatnem pufru pH 4 (For4). V oklepajih je podan skupni volumen posamezne modelne raztopine.

Modelne raztopine	Pufer ( $\mu\text{L}$ )	1 mM CuSO <sub>4</sub> ( $\mu\text{L}$ )	Voda MilliQ ( $\mu\text{L}$ )	Liposomi ( $\mu\text{L}$ )
0,5 M C4 (6 mL)	630	/	4890	480
0,5 M C4 / Cu <sup>2+</sup> (3 mL)	315	48	2397	240
0,5 M C5 (5 mL)	396	/	4204	400
0,5 M C5 / Cu <sup>2+</sup> (3 mL)	237	48	2475	240
1 M For3 (5 mL)	497	/	4103	400
1 M For3 / Cu <sup>2+</sup> (3 mL)	298	48	2414	240
1 M For4 (4,5 mL)	311	/	3829	360
1 M For4 / Cu <sup>2+</sup> (2 mL)	138	32	1670	160
0,5 M A5 (4 mL)	552	/	3128	320
0,5 M A5 / Cu <sup>2+</sup> (2 mL)	276	32	1532	160

#### Liposomi DPPC/A. pernix z vključeno AK, raztopljeno v C4

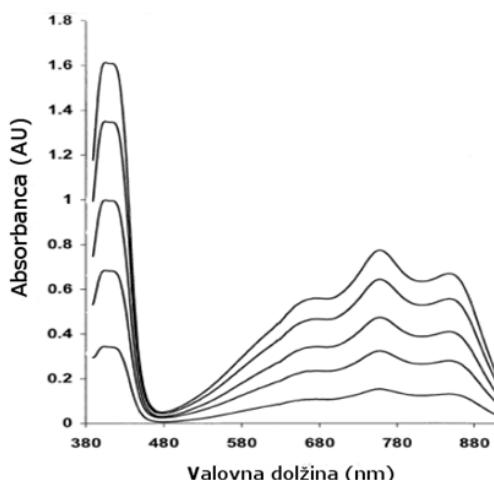
Suspenzijo liposomov smo po končani dializi redčili 30-krat v 15 mL centrifugirke. Najprej smo odpipetirali, upoštevajoč izoosmolarne pogoje, ustrezne volumne pufrov, MilliQ vode in v določene raztopine še CuSO<sub>4</sub>. Na koncu smo dodali suspenzijo liposomov.

Preglednica 7: Priprava modelnih raztopin za spremljanje stabilnosti AK vključene v DPPC/A. pernix liposome. AK je bila vključena v liposome v citratnem pufru pH 4 (C4) in dializirana v formiatnem pufru pH 4 (For4). V oklepajih je podan skupni volumen posamezne modelne raztopine.

Modelne raztopine	Pufer ( $\mu\text{L}$ )	1 mM CuSO <sub>4</sub> ( $\mu\text{L}$ )	Voda MilliQ ( $\mu\text{L}$ )	Liposomi ( $\mu\text{L}$ )
0,5 M C4 (9 mL)	992	/	7708	300
0,5 M A5 (7,5 mL)	1088	/	6162	250
0,5 M A5 Cu <sup>2+</sup> (6 mL)	870	96	4834	200

#### **3.2.3 Spektrofotometrično določanje AK po reakciji z ABTS<sup>•</sup>**

Določanje AK temelji na merjenju absorbance radikala ABTS<sup>•</sup> pri valovni dolžini 730 nm. Zelenoobarvana oksidirana oblika ABTS<sup>•</sup> se ob prisotnosti AK reducira in pri tem razbarva. Bolj kot se razbarva, nižjo absorbanco izmerimo in večja je posledično koncentracija antioksidanta (AK) v vzorcu. ABTS<sup>•</sup> ni specifičen reagent in reagira tudi z ostalimi prisotnimi reducenti, ne samo z AK. Reakcija med AK in ABTS<sup>•</sup> poteče v zelo kratkem času (manj kot 1 min).



Slika 10: Absorpcijski spekter radikalnega kationa  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (Re in sod., 1999).

### 3.2.3.1 Priprava reagenta $\text{ABTS}^{\bullet}$

V 15 mL plastični centrifugirki smo zatehtali 25 mg ABTS ( $M_w = 515 \text{ g/mol}$ ). Dodali smo 10 mL MilliQ vode in premešali na vrtinčniku, da se prah raztopi. Raztopini smo s spatulo dodali  $\text{MnO}_2$  v prebitku in ponovno močno stresali in mešali na vrtinčniku. Z  $\text{MnO}_2$  smo oksidirali ABTS, da je nastal radikalni kation  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , ki reagira z reducenti. Sledi centrifugiranje 3 minute pri 3000 obratih/min. Supernatant smo nato s pomočjo brizge filtrirali skozi 0,20  $\mu\text{m}$  filter in odstranili preostanek  $\text{MnO}_2$ . Tako pripravljen  $\text{ABTS}^{\bullet}$  smo hranili v hladilniku. Pred uporabo smo ga redčili z MilliQ vodo v razmerju 3:7.

### 3.2.3.2 Priprava vzorcev za določanje vsebnosti AK z $\text{ABTS}^{\bullet}$

Vzorce za merjenje absorbance s skupnim volumenom 1 mL smo najprej pripravili v 1,5 mL mikrocentrifugirkah. V mikrocentrifugirkah smo zmešali ustrezne volumne modelnih raztopin, raztopine  $\text{ABTS}^{\bullet}$ , MilliQ vode in pufrov, ko smo določali prosto AK (brez liposomov) ali zunajliposomalno AK (Preglednica 8, Preglednica 10, Preglednica 11). Ko smo določali skupno AK, smo dodali še detergent triton x-100 (Preglednica 9). Pri določanju antioksidantov, ki reagirajo z  $\text{ABTS}^{\bullet}$  in niso AK, smo dodali askorbat-oksidazo. Po dodatku raztopin smo počakali 1 minuto, prelili raztopino v 1,5 mL PS kivete in pomerili absorbanco pri 730 nm.

Pri določanju termične stabilnosti liposomov z vključeno AK pipetiramo iz enakih modelnih vzorcev, kot pri določanju vsebnosti AK in postopamo enako kot pri določevanju zunajliposomalne AK. Razlika je ta, da smo pipetirali direktno v 700  $\mu\text{L}$  kvarčno kiveto ter da so volumni pipetiranih raztopin manjši, razmerja pa se ohranijo (Preglednica 13). Nato spremljamo sproščanje AK iz liposomov pri segrevanju 1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  v termostatiranem spektrofotometru.

### Določanje AK v modelnih raztopinah brez liposomov

Preglednica 8: Priprava vzorcev za določanje AK brez liposomov v modelnih raztopinah.

	1 M C3 ( $\mu\text{L}$ )	Voda MilliQ ( $\mu\text{L}$ )	ABTS $^{\cdot}$ ( $\mu\text{L}$ )	Modelni vzorec ( $\mu\text{L}$ )
ABTS $^{\cdot}$	87	613	300	/
ABTS $^{\cdot}$ + vzorec	87	313	300	300

### Določanje skupne AK

Pri pripravi vzorca za merjenje absorbance smo dodali na začetku še detergent triton x-100, ki razgradi membrano liposomov, tako da tudi v liposome vključena AK reagira z ABTS $^{\cdot}$ . Na ta način merimo skupno AK, v notranjosti liposomov in v zunanjem okolju.

Preglednica 9: Priprava vzorcev za določanje skupne AK v modelnih raztopinah. Liposome DPPC/hol, ki imajo vključeno AK raztopljeno v C4, smo poleg uporabe detergenta triton lizirali s pomočjo segrevanja v vodni kopeli 5 minut pri 50 °C.

	Triton x-100 ( $\mu\text{L}$ )	1 M C3 ( $\mu\text{L}$ )	Voda MilliQ ( $\mu\text{L}$ )	ABTS $^{\cdot}$ ( $\mu\text{L}$ )	Modelni vzorec ( $\mu\text{L}$ )
ABTS $^{\cdot}$	20	87	593	300	/
ABTS $^{\cdot}$ + vzorec	20	87	293	300	300

### Določanje AK zunaj liposomov

Liposome smo ohranili intaktne in določali samo AK, ki je v zunanjem okolju in je posledica puščanja liposomov. Pri tej analizi smo ohranili izoosmolarne pogoje in nismo dodajali detergenta triton x-100.

Preglednica 10: Priprava vzorcev za spektrofotometrično določanje AK zunaj liposomov pripravljenih v citratnem pufru pH 3 (C3).

	1 M C3 ( $\mu\text{L}$ )	Voda MilliQ ( $\mu\text{L}$ )	ABTS $^{\cdot}$ ( $\mu\text{L}$ )	Modelni vzorec ( $\mu\text{L}$ )
ABTS $^{\cdot}$	87	613	300	/
ABTS $^{\cdot}$ + vzorec	87	313	300	300

Preglednica 11: Priprava vzorcev za spektrofotometrično določanje AK zunaj liposomov pripravljenih v citratnem pufru pH 4 (C4).

	0,5 M C4 ( $\mu\text{L}$ )	Voda MilliQ ( $\mu\text{L}$ )	ABTS $^{\cdot}$ ( $\mu\text{L}$ )	Modelni vzorec ( $\mu\text{L}$ )
ABTS $^{\cdot}$	80	620	300	/
ABTS $^{\cdot}$ + vzorec	80	320	300	300

### Določanje ostalih prisotnih reducentov

Za določanje ostalih reducentov, ki prav tako reagirajo z ABTS $^{\cdot}$  radikalom, smo uporabili askorbat-oksidazo z začetno koncentracijo 1,3 U/mL. Pripravili smo raztopino v citratnem pufru pH 5, tako da smo odpipetirali 50  $\mu\text{L}$  encima v 0,5 M citratni pufer in MilliQ vodo do skupnega volumna 5 mL. Raztopino encima smo dodali po tem, ko smo z detergentom triton x-100 lizirali liposome. Po tem smo čakali 1 uro z odprtimi mikrocentrifugirkami, da encim katalizira oksidacijo AK. Nato smo dodali ABTS $^{\cdot}$  radikal, prelili vzorce v 1,5 mL PS kivete in pomerili absorbanco pri 730 nm. Pripravili smo tudi vzorec brez AK za določitev maksimalne absorbance raztopine ABTS $^{\cdot}$ .

Preglednica 12: Priprava vzorcev za določanje reducentov, ki niso AK z encimom askorbat-oksidaza (AO).

	10 mM triton x-100 (µL)	Modelni vzorec (µL)	AO (µL)	C5 (µL)	ABTS <sup>•</sup> (µL)	Voda MilliQ (µL)
ABTS <sup>•</sup>	20	/	/	380	300	300
ABTS <sup>•</sup> + vzorec	20	300	380	/	300	/

**Določanje termične stabilnosti liposomov z vključeno AK**

Pripravljen vzorec v kvarčni kiveti smo segrevali od 25 °C do 60 °C s hitrostjo 1 °C/min. Razpad membrane liposomov se kaže v puščanju AK v okolico, kjer reagira z ABTS<sup>•</sup>. S spremeljanjem padanja absorbance smo določili stabilnost liposomov pri segrevanju.

Preglednica 13: Priprava vzorcev za termično določanje stabilnosti liposomov z vključeno AK.

Zunanje okolje Notranje okolje	Pufer 1 M C3 (µL)	Pufer 0,5 M C4 (µL)	Voda MilliQ (µL)	ABTS <sup>•</sup> (µL)	Modelni vzorec (µL)
AK v C3	61	/	174	255	210
AK v C4	/	56	224	210	210

**Določanje sisanja svetlobe liposomov**

Namesto ABTS<sup>•</sup> radikala smo odpipetirali vodo MilliQ, ostale raztopine odpipetiramo enako kot pri določanju skupne AK. Meritve smo izvajali v modelnih raztopinah z liposomi DPPC/hol. Absorbanco, ki smo jo odčitali, smo odštevali od absorbance, ki smo jo izmerili pri določanju skupne AK z ABTS<sup>•</sup> radikalom. Tako smo izničili vpliv, ki ga imajo na absorbanco micle, ki se tvorijo po razgradnji liposomov z detergentom triton x-100.

**3.2.4 AK v realnih raztopinah****3.2.4.1 Priprava liposomov**

Pripravili smo liposome z osmolarnostjo notranjega okolja 124 mOsm in liposome s 5-krat povečano osmolarnostjo na 620 mOsm. Postopek priprave 124 mOsm liposomov je takšen kot je opisano v poglavju 3.2.1. Rehidracijo tankega fosfolipidnega filma smo naredili z raztopino 50 mM AK in 50 mM C3.

Priprava 620 mOsm liposomov se razlikuje samo po dvigu osmolarnosti. Pri tehtanju in razapljalju AK v C3 smo povečali zatehto in volumen za 5-krat. Zatehtali smo 440 mg AK in jo raztoplili v 2500 µL 1 M C3 in 7500 µL vode MilliQ. Osmolarnost dializnega formiatnega pufra pH 3 smo povečali z raztopljeno fruktozo. V 2 L bučki smo s pufrom raztoplili 180 g fruktoze in tako povečali osmolarnost za 500 mOsm.

### 3.2.4.2 Priprava realnih raztopin za spremljanja stabilnosti AK z in brez liposomov

Za realne raztopine, ki smo jih pripravili v 50 mL centrifugirkah, smo uporabili neredčen jabolčni sok, ki smo mu glede na kemijsko sestavo ocenili osmolarnost na 620 mOsm, 5-krat redčen jabolčni sok in fermentiran mlečni napitek (Actimel). V neredčen in 5-krat redčen jabolčni sok smo 25-krat redčili suspenzijo 124 mOsm DPPC liposomov in 100-krat redčili suspenzijo 620 mOsm DPPC liposomov. Raztopine smo hranili v termostatirani pečici pri 25 °C. V Actimel smo 20-krat redčili pripravljeno suspenzijo 124 mOsm DPPC liposomov in raztopino hranili v hladilniku pri 4 °C. V hladilniku smo inkubirali tudi neredčen jabolčni sok z 80-krat redčenimi 620 mOsm DPPC liposomi. Vzporedno smo pripravili tudi kontrolne realne raztopine za spremljanje stabilnosti AK brez liposomov, in sicer pri enakih pogojih kot realne raztopine z liposomi. Skupni volumen vseh realnih raztopin je bil 10 mL.

### 3.2.4.3 Priprava vzorcev in HPLC analiza

V plastično 2 mL mikrocentrifugirko smo odpipetirali 100 µL 20 % metafosforne kisline (MFK), 500 µL vzorca, 400 µL vode MilliQ in 500 µL nepolarnega topila etil acetata, s katerim smo porušili strukturo liposomov in sprostili vključeno AK. Nato smo stresali na vrtinčniku in centrifugirali. Zgornjo nepolarno fazo, ki jo sestavlja etil acetat in ostanki liposomov, smo odstranili s kapalko. Vodno fazo z AK pa smo s pomočjo inzulinske brizge filtrirali skozi 0,2 µm filter v stekleno vialo, ki smo jo dali na avtomatski podajalnik in vzorec ločili na HPLC koloni. Mobilna faza je bila 5 mM raztopina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v MilliQ vodi s pretokom 1 mL/min. AK smo določali z UV-Vis detektorjem pri 250 nm. Pred analizo vzorcev smo na HPLC kolono injecirali tudi standardne raztopine AK z znano koncentracijo 40 mg/L, ki smo jih pripravili tako, da smo 20 mg AK raztopili v 10 mL 2 % MFK. Raztopino AK (s koncentracijo 2 g/L) smo nato 50-krat redčili v 1100 µL 50 mM tris 2-karboksi etil fosfina (TCEP), 1100 µL 20 % MFK in 8580 µL MilliQ vode.

## 4 REZULTATI

### 4.1 STABILNOST PROSTE AK V PUFRIH BREZ IN OB DODATKU Cu<sup>2+</sup>

Stabilnost AK smo preverjali v citratnem, acetatnem in formiatnem pufru, v območju pH vrednosti od 3 do 5. Prisotnost redoks aktivnih ionov, ki so lahko prisotni v živilih, smo ponazorili z dodatkom Cu<sup>2+</sup> ionov. Za primerjavo smo vzporedno testirali tudi oksidacijo AK v odsotnosti bakrovih ionov.

Preglednica 14: Razpolovni časi (ocenjeni iz grafičnih podatkov v Prilogah A-P) proste AK v različnih pufrih, z in brez dodanih bakrovih ionov.

PUFER	brez dodatka Cu <sup>2+</sup> (dan)	dodani 16 µM Cu <sup>2+</sup> (dan)
87 mM citratni pufer pH 3	11	0,60
57 mM citratni pufer pH 4	13	0,082
43 mM citratni pufer pH 5	12	0,078
108 mM formiatni pufer pH 3	12	0,10
75 mM formiatni pufer pH 4	1,4	0,0093
108 mM acetatni pufer pH 4	0,88	0,014
75 mM acetatni pufer pH 5	0,19	0,0050

V citratnem pufru brez dodatka Cu<sup>2+</sup> opazimo največjo stabilnost proste AK. Razpolovni čas je pri vseh treh pH vrednostih več kot 10 dni. Podobno stabilnost opazimo tudi pri formiatnem pufru, vendar le pri pH 3, pri pH 4 se stabilnost 10-krat zmanjša. V acetatnem pufru pH 4 brez Cu<sup>2+</sup> je razpolovni čas krajši od 1 dneva, pri pH 5 pa se polovica prisotne AK oksidira v dobrih 4 urah.

V pufernih raztopinah z dodanimi Cu<sup>2+</sup> je stabilnost proste AK manjša, kot pa v raztopinah brez Cu<sup>2+</sup>. Citratni pufer s svojimi kelatorskimi lastnostmi omogoča najdaljši razpolovni čas pri pH 3, in sicer več kot polovico dneva. Stabilnost pa je več kot 20-krat manjša glede na vzorec brez Cu<sup>2+</sup>. V formiatnem pufru pri enakem pH se AK oksidira 6-krat hitreje kot v citratnem pufru. Z višanjem pH se tudi v citratnem pufru stabilnost AK zmanjša skoraj 10-krat. Pri pH 5 se polovica AK oksidira v slabih dveh urah, v enakih pogojih brez Cu<sup>2+</sup> pa v 12-ih dnevih. Bakrovi ioni še bolj pospešijo oksidacijo pri pH 4 in 5 v formiatnem in acetatnem pufru, ki ne kompleksirata bakrovih ionov. Tu je razpolovni čas AK krajši od 20 minut, v acetatu pH 5 celo krajši od 10 minut in v primerjavi z enakimi pogoji brez Cu<sup>2+</sup> kaže na skoraj 40-krat manjšo stabilnost.

## 4.2 STABILIZACIJA AK Z VKLJUČITVIJO V LIPOSOME

Liposomi omogočijo ohranjanje notranjega okolja, ki je ugodno za stabilnost AK in s svojo fosfolipidno dvoslojno membrano preprečujejo vpliv zunanjega okolja. Vključena AK je odvisna od stabilnosti liposomov. Puščanje ali razpad membrane pomeni da AK ni zaščitena (Kirby in sod., 1991). Zagotovili smo enake pogoje kot pri spremljanju stabilnosti proste AK, saj stabilizacijo določamo kot stabilnost v liposome vključene AK glede na prosto. Koncentracije pufrov preračunamo tako, da je osmolarnost raztopine v liposomih enaka osmolarnosti v raztopini zunaj liposomov. Zaradi enake osmolarnosti ne prihaja do tlačnih razlik, ki bi lahko vplivale na stabilnost liposomov in na prehajanje AK. Vzporedno v raztopino zunaj liposomov dodamo bakrove ione, ki še dodatno pospešijo oksidacijo AK.

### 4.2.1 AK, raztopljeni v citratnem pufru pH 3

AK je stabilnejša v kislem pH območju in v citratnem pufru, ki ima kelatorske lastnosti in kompleksira prisotne redoks aktivne kovinske ione (Imer in sod., 2003). Preveriti smo hoteli, kakšna je stabilnost AK, vključene v liposome, pripravljene v citratnem pufru pH 3, ki jo izpostavimo različnim pufrom pri izoosmolarnih pogojih.

Preglednica 15: Primerjava razpolovnih časov (ocenjenih iz grafičnih podatkov v Prilogah A-P) proste in v liposome vključene AK v C3 (notranje okolje liposomov), pri inkubaciji v C3, C5 in A5, brez in z dodatkom bakrovih ionov (zunanje okolje).

	AK raztopljeni v CITRATNEM PUFRU pH 3					
	PROSTA		vključena v DPPC liposome		vključena v DPPC/hol liposome	
	brez Cu <sup>2+</sup> (dan)	z Cu <sup>2+</sup> (dan)	brez Cu <sup>2+</sup> (dan)	z Cu <sup>2+</sup> (dan)	brez Cu <sup>2+</sup> (dan)	z Cu <sup>2+</sup> (dan)
C3-C3	11	0,60	21	13	25	4,5
C3-C5	12	0,078	28	9,5	12	1,5
C3-A5	0,19	0,0050	17	2,9	4,5	0,85

#### 4.2.1.1 Vključena v liposome DPPC

Največja absolutna stabilnost se kaže pri vzorcu, kjer zunanje okolje predstavlja citratni pufer pH 5 brez dodatka Cu<sup>2+</sup>, in sicer je razpolovni čas skoraj 30 dni. Stabilizacija v liposome vključene AK glede na prosto, je približno 2-kratna pri inkubaciji v citratnem pufru pH 3 in pH 5. V acetatnem pufru pH 5 je liposomalna AK več kot 90-krat bolj obstojna od proste.

V vzorcih z dodatkom Cu<sup>2+</sup> je stabilizacija najbolj očitna. V acetatnem pufru pH 5 je AK skoraj 600-krat bolj stabilna kot prosta. Močno povečana obstojnost se kaže tudi pri inkubaciji liposomalne AK v citranem pufru pH 5, kjer se razpolovni čas podaljša iz slabih

2 ur na skoraj 10 dni. V citratnem pufru pH 3 z dodanimi Cu<sup>2+</sup> ioni je stabilizacija najmanjša, vendar več kot 20-kratna. Dodani Cu<sup>2+</sup> ioni zmanjšajo razpolovni čas liposomalne AK, še najbolj v acetatnem pufru pH 5 za več kot 6-krat, glede na enake pogoje brez Cu<sup>2+</sup>.

#### 4.2.1.2 Vključena v liposome, pripravljene iz DPPC in holesterola

Z vključitvijo holesterola v DPPC fosfolipide želimo zagotoviti večjo stabilnost membrane liposomov in s tem preprečiti puščanje, zlasti v fazi temperaturnega prehoda, ko pride do spremembe strukture membrane iz gel stanja v tekoče-kristalinično stanje (Lin in Thomas, 2004; Sułkowski in sod., 2005; Ouimet in sod., 2003).

V pogojih brez dodanih Cu<sup>2+</sup> ionov smo najbolj stabilizirali AK v acetatnem pufru pH 5, in sicer več kot 20-krat. Pri inkubaciji v citratnem pufru je stabilizacija pri pH 3 2-kratna, pri pH 5 pa AK z vključitvijo v liposome nismo stabilizirali.

Ob dodatku bakrovih ionov je stabilizacija večja, zlasti v acetatnem pufru pH 5, kjer se razpolovni čas AK podaljša za skoraj 200-krat. V citratnem pufru pH 5 skoraj 20-krat pri pH 3 pa manj kot 10-krat. Absolutno pa je liposomalna AK ob dodatku bakrovih ionov veliko manj stabilna kot liposomalna AK brez dodatka bakrovih ionov. V primerjavi z DPPC liposomi so DPPC/hol liposomi hranjeni pri 25 °C slabše stabilizirali AK, zlasti ob dodatku bakrovih ionov.

#### 4.2.2 AK, raztopljeni v citratnem pufru pH 4

AK, vključena v fosfolipidne liposome, kaže različno stabilnost v odvisnosti od pufra in pH vrednosti notranjega okolja. Preveriti smo nameravali, kakšna je stabilnost AK, vključene v liposome, pripravljene v citratnem pufru pH 4, ko te liposome dodamo v pufre pri različnih pH vrednostih.

Preglednica 16: Primerjava razpolovnih časov (ocenjenih iz grafičnih podatkov v Prilogah A-P) proste in v liposome vključene AK v C4 (notranje okolje liposomov), pri inkubaciji v C4, For3, For4, C5 in A5, brez in z dodatkom bakrovih ionov (zunanje okolje).

AK raztopljeni v CITRATNEM PUFRU pH 4						
	PROSTA		vključena v DPPC liposome		vključena v DPPC/hol liposome	
	brez Cu <sup>2+</sup> (dan)	z Cu <sup>2+</sup> (dan)	brez Cu <sup>2+</sup> (dan)	z Cu <sup>2+</sup> (dan)	brez Cu <sup>2+</sup> (dan)	z Cu <sup>2+</sup> (dan)
C4-C4	13	0,082	18	15	22	5,5
C4-For3	12	0,10	17	7,1	18	5,1
C4-For4	1,4	0,0093	16	2,5	13	1,0
C4-C5	12	0,078	18	5,6	23	2,5
C4-A5	0,19	0,0050	15	1,8	8,4	0,54

#### 4.2.2.1 Vključena v liposome DPPC

AK, vključena v DPPC liposome, je stabilizirana pri vseh pogojih glede na prosto AK. V acetatnem pufru pH 5 dosežemo 80-kratno stabilizacijo AK, v formiatnem pufru pH 4 pa podaljšamo obstojnost z 1 dneva na 16 dni. V citratnem pufru pH 4 in pH 5 je razpolovni čas manj kot 2-krat daljši, saj je že prosta AK pri teh pogojih dobro stabilna. Uporaba pH 4 za notranje okolje v DPPC liposomih omogoča podobno stabilizacijo AK kot pri notranjem okolju pH 3 (Preglednica 15 in Preglednica 16).

Ko v zunanje okolje dodamo bakrove ione, se izkaže, da dosežemo z uporabo pH 3 znotraj DPPC liposomov večjo stabilnost kot pa pri pH 4, predvsem, kadar je v zunanjem okolju pH 5 (Preglednica 15 in Preglednica 16). V acetatnem pufru pH 5 je AK skoraj 400-krat bolj obstojna od proste. Dobro smo stabilizirali tudi AK v formiatnem pufru pH 4, in sicer je razpolovni čas skoraj 300-krat daljši. Tudi pri ostalih vzorcih z dodanimi  $\text{Cu}^{2+}$  ioni je stabilizacija velika. V citratu pH 4 je skoraj 200-kratna pri pH 5 pa smo podaljšali razpolovni čas s slabih 2 ur na 6 dni.

#### 4.2.2.2 Vključena v liposome, pripravljene iz DPPC in holesterola

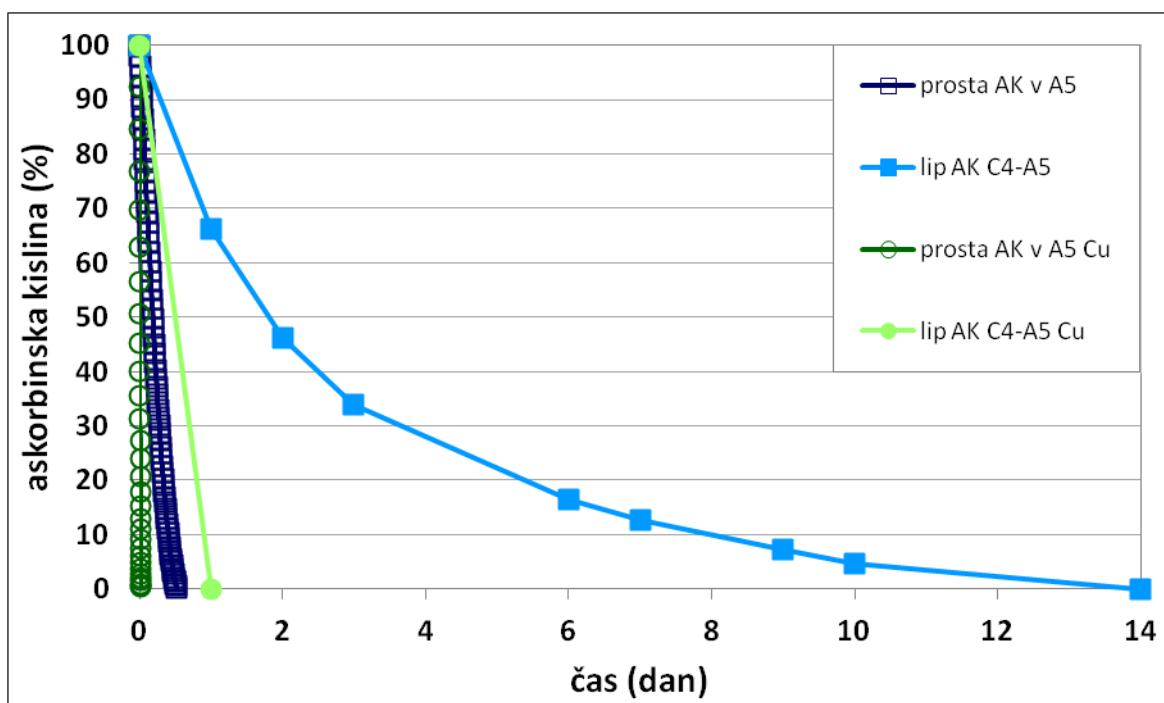
Tudi z vključitvijo AK v DPPC/hol liposome dosežemo dobro stabilizacijo. Brez dodanih bakrovih ionov je stabilizacija podobna kot pri DPPC liposomih. Ponovno je največja obstojnost AK glede na prosto v acetatnem pufru pH 5, in sicer več kot 40-kratna. Inkubacija v citratnem pufru pri pH 4 in pH 5 je 2-kratna. V formiatnem pufru pH 4 pa smo podaljšali razpolovni čas z dobrih 30 ur na 13 dni.

DPPC/hol liposomi, inkubirani ob dodatku bakrovih ionov, ne omogočajo tako dobre stabilizacije AK kot DPPC liposomi. Največje podaljšanje razpolovnega časa glede na prosto AK smo opazili pri inkubaciji v acetatnem pufru pH 5, vendar je v primerjavi z AK vključeno v čiste DPPC liposome stabilizacija pri enakih pogojih več kot 3-krat slabša. Prosta AK, inkubirana v citratnem pufru pri pH 4 in pH 5, kaže zelo podobno stabilnost. Z vključitvijo v liposome pa je pri pH 4 stabilizacija več kot 60-kratna, pri pH 5 pa 30-kratna. V formiatnem pufru je stabilizacija boljša pri pH 4, in sicer več kot 100-kratna, pri pH 3 pa smo razpolovni čas podaljšali z dobrih 2 ur na 5 dni. Liposomi DPPC/hol bolje stabilizirajo AK v notranjem okolju pH 4 kot pH 3 (Preglednica 15 in Preglednica 16).

#### 4.2.2.3 Vključena v liposome, pripravljene iz DPPC in lipidov arheje *A. pernix*

Od liposomov, pripravljenih iz DPPC in arhejnih lipidov v masnem razmerju 9 proti 1, pričakujemo predvsem dobro termično stabilnost. Z mešanico želimo izkoristiti dobre lastnosti obeh vrst lipidov, in sicer stabilnost pri nizkem pH in pri segrevanju.

Stabilnost AK vključene v DPPC/A. *pernix* liposome je slabša kot pri DPPC in DPPC/hol liposomih. Pri inkubaciji v acetatnem pufru pH 5 sicer dosežemo 10-kratno stabilizacijo, ob dodatku bakrovih ionov pa skoraj 100-kratno v primerjavi s prosto AK. Vendar pa so razpolovni časi AK mnogo krajsi, in sicer slaba 2 dneva, ob dodatku bakrovih ionov pa 12 ur, kar je več kot 7-krat manj v primerjavi z liposomi DPPC (Slika 11). Pri inkubaciji v citratnem pufru pH 4, je prosta AK dobro stabilna z razpolovnim časom 12 dni, vključena v DPPC/A. *pernix* liposome pa je celo manj stabilna glede na prosto in ima razpolovni čas samo nekoliko daljši od 2 dni (Priloga Q).



Slika 11: Primerjava stabilnosti proste in v DPPC/A. *pernix* liposome vključene AK raztopljene v citratnem pufru pH 4. Liposomalna (lip AK C4-A5) in prosta AK sta bili inkubirani v acetatnem pufru pH 5 (A5) brez in z dodanimi  $\text{Cu}^{2+}$  ioni pri 25 °C.

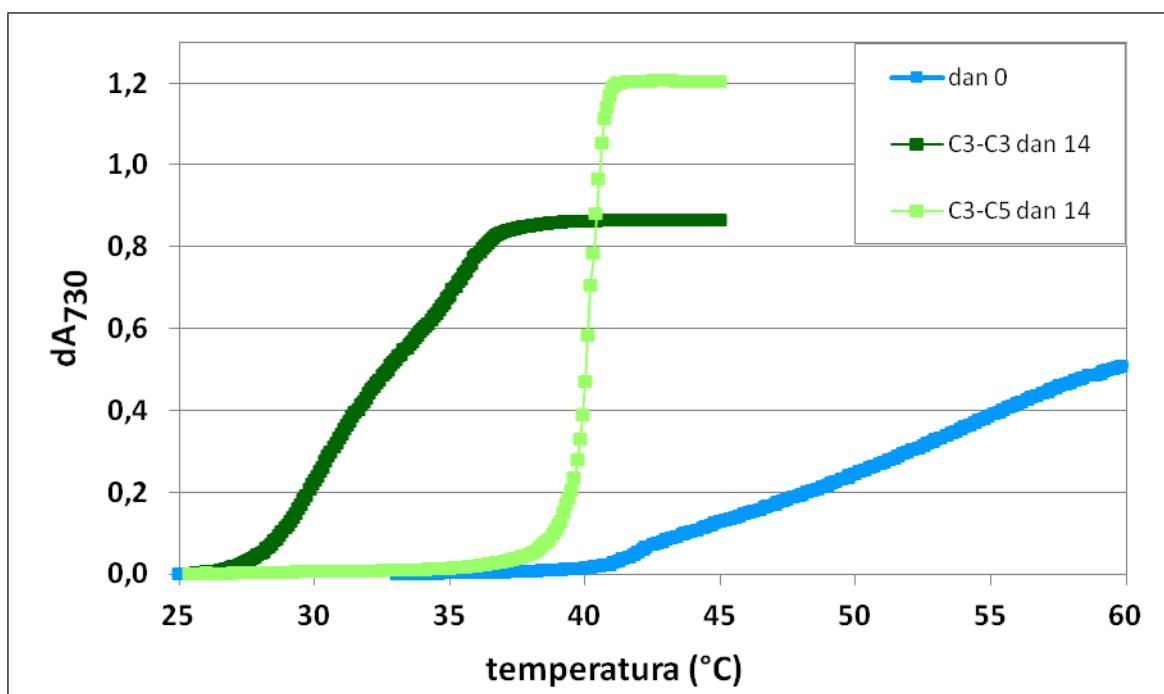
#### 4.2.3 Stabilnost liposomov pri segrevanju

Preveriti smo nameravali, kako različen pH znotraj in zunaj liposomov ter vključitev holesterola v membrano vpliva na stabilnost DPPC in DPPC/hol liposomov pri povišani temperaturi. Ker DPPC/A. *pernix* liposomi niso dobro stabilizirali AK pri sobni temperaturi, kljub pričakovano dobri termični stabilnosti teh liposomov nismo analizirali.

##### 4.2.3.1 Termična stabilnost liposomov DPPC

Iz grafa (Slika 12) je razvidno, da sveži DPPC liposomi, z vključeno AK v citratnem pufru pH 3, začnejo puščati pri temperaturi okoli 41 °C in AK postopno prehaja v zunanje okolje. Pri 60 °C je določen delež AK še vedno vključen v liposome. Liposomi po 14 dneh

kažejo manjšo stabilnost kot sveži. AK se začne sproščati v zunanje okolje pri nižji temperaturi, kinetika puščanja pa je hitrejša kot pri svežih liposomih.



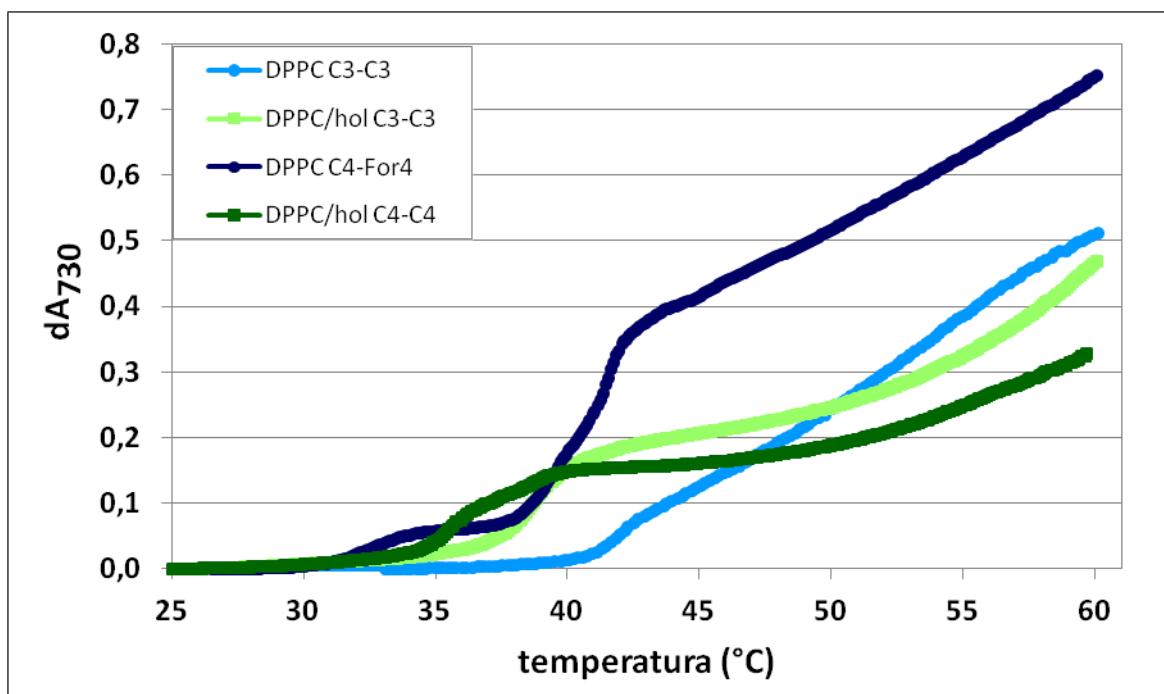
Slika 12: Vpliv pH na termično stabilnost svežih (dan 0) in staranih (dan 14) DPPC liposomov pri segrevanju od 25 °C do 60 °C s hitrostjo 1 °C/min. Znotraj liposomov je AK v citratnem pufru pH 3 (C3), zunaj pa citratni pufer pH 3 (C3) in pH 5 (C5). Prepuščeno AK določamo spektrofotometrično z merjenjem absorbance ABTS<sup>•</sup> radikala.

Liposomi, stari 14 dni, inkubirani pri pH 3, začno puščati že pod 30 °C (Slika 12). V zunanjem okolju pH 3 je fosfolipidna membrana bolj podvržena kislinski hidrolizi, kar je najverjetnejše razlog za slabšo termično stabilnost (Ickenstein in sod., 2006). Pokazali smo da, starejši kot so liposomi in nižji kot je pH v zunanjem okolju, pri nižji temperaturi spustijo AK v okolico. V zunanjem okolju pH 5 so DPPC liposomi bolj stabilni kot pri pH 3 in pri starosti 14 dni ob segrevanju začnejo spuščati vključeno AK malo pred 40 °C. Kinetika puščanja je hitra in pri 41 °C v liposomih ni več AK (Slika 12).

Podobno termično stabilnost opazimo tudi pri liposomih pripravljenih v citratnem pufru pH 4. Zunanje okolje pH 5 omogoča boljšo termično stabilnost, saj so liposomi tudi po več kot 30 dneh podobno termično stabilni kot sveži in začno puščati AK malo pred 40 °C (Priloga V). Po 14 ali več dneh inkubacije notranje okolje pH 4 omogoča nekoliko boljšo termično stabilnost DPPC liposomov kot notranje okolje pH 3. Vendar je ta razlika opazna le pri pH 3 v zunanjem okolju, pri pH 5 je stabilnost zelo podobna (Slika 12 in Priloga U). Kot kaže pa so sveži (dan 0) DPPC liposomi, termično bolj stabilni z notranjim okoljem pH 3 kot pa pH 4 (Slika 13).

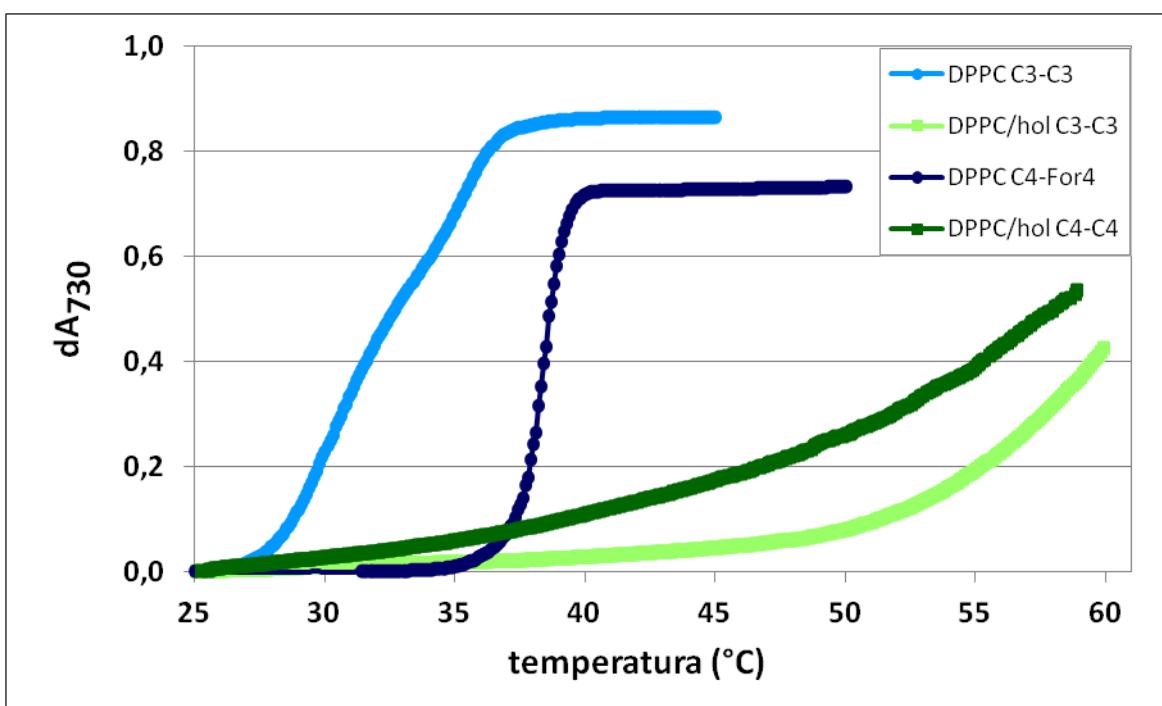
#### 4.2.3.2 Termična stabilnost liposomov, pripravljenih iz DPPC in holesterola

Sveži DPPC/hol liposomi začnejo spuščati vključeno AK pri podobni temperaturi kot DPPC liposomi, in sicer okoli 41 °C, ki je fazni prehod DPPC liposomov (Gopalakrishnan, 2006). Bistvene razlike med obema vrstama svežih liposomov ni, opazili pa smo, da DPPC/hol liposomi nekoliko bolje zadržujejo AK pri segrevanju do 60 °C (Slika 13). Velike razlike v termični stabilnosti med DPPC in DPPC/hol liposomi smo pokazali pri staranih liposomih, ki smo jih daljši čas inkubirali v modelnih raztopinah pri 25 °C (Slika 14).



Slika 13: Termična stabilnost svežih (dan 0) DPPC in DPPC/hol liposomov pri segrevanju od 25 °C do 60 °C s hitrostjo 1 °C/min. Znotraj liposomov je citratni pufer pH 3 (C3) ali pH 4 (C4), zunanjé okolje pa je C3, C4 ali formiatni pufer pH 4 (For 4). Prepuščeno AK določamo spektrofotometrično z merjenjem absorbance ABTS<sup>•</sup> radikalja.

Pri 14 dni starih liposomih, hranjenih v izoosmolarnih pufrih pri 25 °C, so DPPC/hol veliko bolj stabilni pri višjih temperaturah kot DPPC liposomi. Kinetika prehajanja vključene AK v okolico je pri DPPC/hol liposomih počasnejša in nimajo očitnega faznega prehoda. DPPC/hol liposomi so za razliko od čistih DPPC mnogo manj občutljivi na staranje. Inkubirani 14 dni izkazujejo podobno stabilnost, kot takoj po pripravi (Slika 13 in Slika 14). Ravno tako so DPPC/hol liposomi manj občutljivi na nižji pH zunanjega okolja in kažejo dobro termično stabilnost ne glede na to ali je v zunanjem okolju pH 3 ali 5 (Priloga W). Tako sveži kot 14 dni stari DPPC/hol liposomi kažejo podobno stabilnost, ne glede na to ali so pripravljeni (notranje okolje) v citratnem pufru pH 3 ali pH 4 (Slika 14).



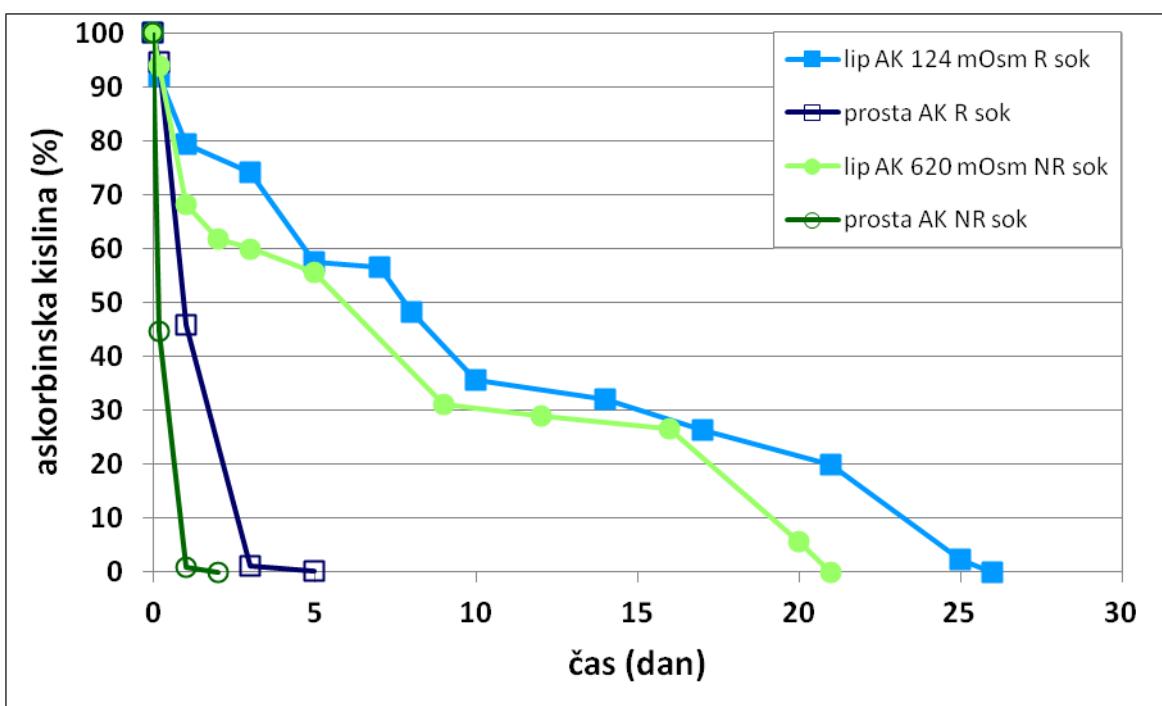
Slika 14: Termična stabilnost 14 dni starih DPPC in DPPC/hol liposomov pri segrevanju od 25 °C do 60 °C s hitrostjo 1 °C/min. Znotraj liposomov je citratni pufer pH 3 (C3) ali pH 4 (C4), zunanje okolje pa je C3, C4 ali formiatni pufer pH 4 (For 4). Prepuščeno AK določamo spektrofotometrično z merjenjem absorbance ABTS<sup>+</sup> radikala.

#### 4.2.4 Stabilizacija AK z vključitvijo v DPPC liposome v vzorcih živil

Pri spremeljanju stabilnosti AK, v modelnih raztopinah inkubiranih pri 25 °C, so se liposomi DPPC, pripravljeni v pH 3, izkazali kot bolj primerni od DPPC/hol liposomov, zlasti ob prisotnosti bakrovih ionov v zunanjem okolju. Živila vsebujejo redoks aktivne kovinske ione, med katerimi bakrovi ioni najbolj vplivajo na razgradnjo AK (Gregory, 1985). Zato smo predvsem upoštevali, kateri liposomi omogočajo dobro stabilizacijo AK v modelnih raztopinah ob prisotnosti bakrovih ionov in neugodnih pufrov v zunanjem okolju. DPPC liposomi inkubirani pri 25 °C kažejo boljšo stabilizacijo AK v primerjavi z DPPC/hol liposomi, in sicer pri uporabi citratnega pufra pH 3 in pH 4 kot notranje okolje (Priloga R, Priloga S). Opazili smo tudi, da se pri DPPC liposomih notranje okolje pH 3, nekoliko bolje obnese od pH 4, pri inkubaciji v citratnem ali acetatnem pufru pH 3 in pH 5 (Preglednica 15, Preglednica 16, Priloga T). Zato smo za poskus stabilizacije AK v realnih vzorcih, izbrali DPPC liposome, pripravljene v citratnem pufru pH 3.

##### 4.2.4.1 Inkubacija v jabolčnem soku

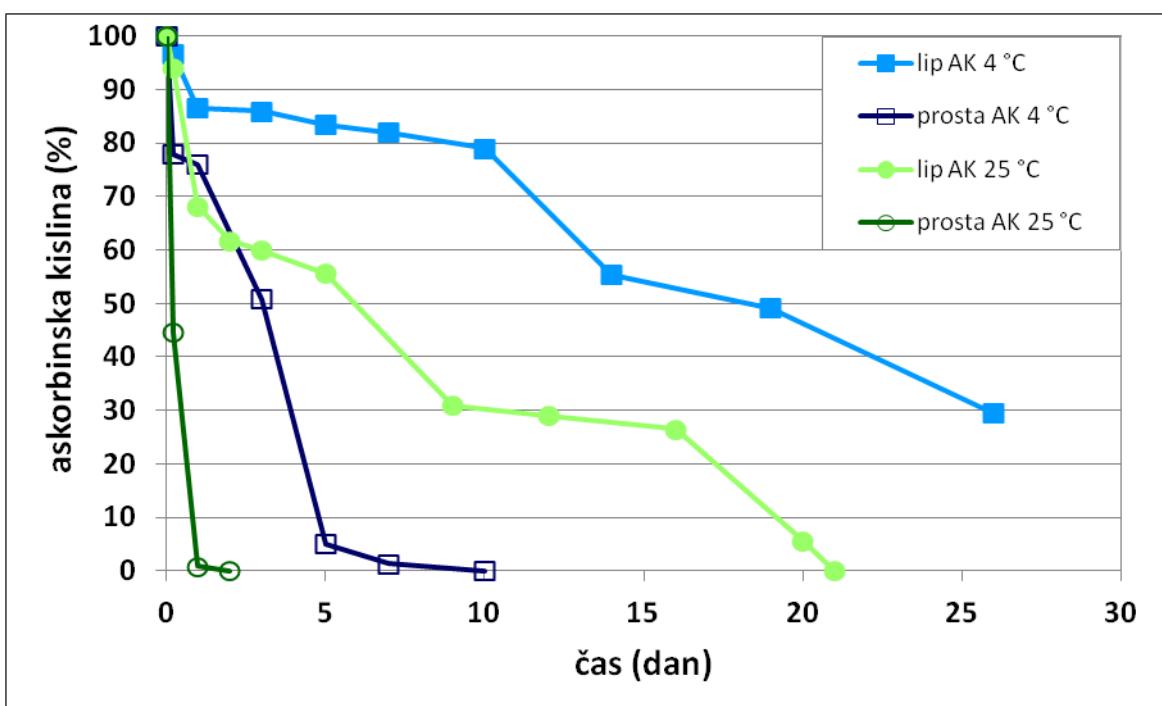
AK smo uspešno stabilizirali z vključitvijo v liposome v modelnih raztopinah. Nameravali smo preveriti, ali je v liposome vključena AK stabilizirana v jabolčnem soku. Pri tem smo testirali tudi vplive različne osmolarnosti raztopine v liposomih in raztopine izven liposomov.



Slika 15: Stabilizacija AK – primerjava proste in v liposome DPPC vključene AK (lip AK) v jabolčnem soku v izoosmolarnih pogojih pri 25 °C. Osmolarnost notranjega in zunanjega okolja je v redčenem jabolčnem soku (R sok), kjer inkubiramo liposome 124 mOsm. Pri stabilizaciji AK v neredčenem jabolčnem soku (NR sok, 620 mOsm) smo pripravili liposome z večjo osmolarnostjo. AK brez liposomalov (prosta AK) se nahaja v neredčenem jabolčnem soku (NR sok) in 5-krat redčenem jabolčnem soku (R sok).

Prosta AK je v neredčenem in redčenem jabolčnem soku, inkubiranem pri 25 °C, slabo stabilna. V neredčenem soku je razpolovni čas manj kot 5 ur in skoraj 5-krat krajsi kot v redčenem soku. Z vključitvijo v DPPC liposome, smo njeno stabilnost podaljšali in določili podoben razpolovni čas z vključitvijo v 620 mOsm liposome v neredčenem jabolčnem soku (izoosmolarni pogoji) in vključitvijo v 124 mOsm liposome v redčenem jabolčnem soku (izoosmolarni pogoji). Vendar je njena stabilizacija glede na prosto AK v neredčenem jabolčnem soku kar 30-kratna, medtem ko je v redčenem jabolčnem soku stabilizacija 8-kratna. Pri obeh vzorcih z liposomalimi v izoosmolarnem okolju smo določili pri dnevu 15 še več kot 20 % AK (Slika 15, Preglednica 17).

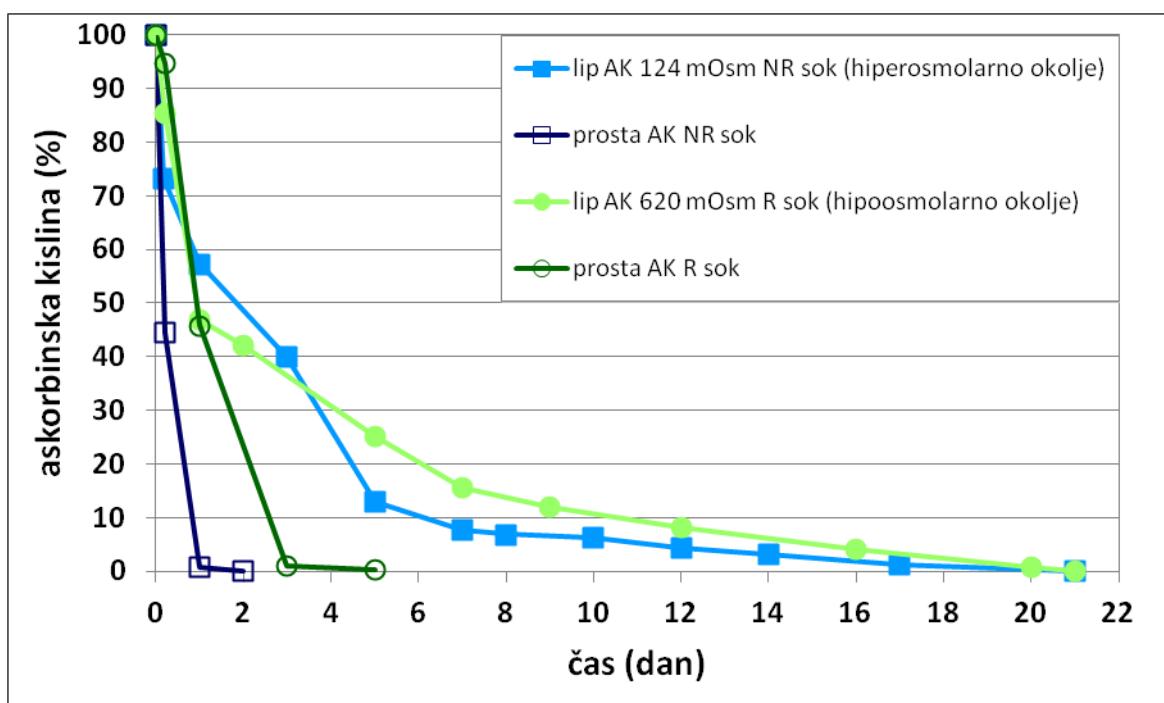
Nerazredčen jabolčni sok smo hranili tudi v hladilniku pri 4 °C ter s tem preverili stabilnost proste in v liposome vključene AK pri pogojih, v katerih se jabolčni sok pogosto shranjuje v gospodinjstvu. V liposome vključena AK je pri 4 °C bolj stabilna kot pri 25 °C. Razpolovni čas je okoli 18 dni in je 3-krat daljši glede na inkubacijo pri 25 °C. Tudi prosta AK ima pri 4 °C 15-krat daljši razpolovni čas kot pri 25 °C. Zato je tudi stabilizacija 5-krat slabša kot med inkubacijo pri 25 °C. Tako smo z vključitvijo AK v liposome, pri inkubaciji v hladilniku, 6-krat podaljšali njen razpolovni čas, glede na prosto AK (Slika 16, Preglednica 17).



Slika 16: Stabilizacija AK – primerjava stabilnosti proste in v DPPC liposome vključene AK (lip AK), hranjene v jabolčnem soku pri 4 °C in 25 °C. Notranjost liposomov je 620 mOsm in je enaka kot osmolarnost jabolčnega soka.

Kot je prikazano na Sliki 15 in Sliki 16 liposomi dobro stabilizirajo AK v izoosmolarnih pogojih. Ker pa v praksi lahko prihaja do tega, da osmolarnost raztopine znotraj liposomov ni izenačena z osmolarnostjo zunaj liposomov, smo preverili kako hiperosmolarni pogoji – hipertonično okolje (zunaj liposomov je večja osmolarnost) in hipoosmolarni pogoji – hipotonično okolje (zunaj liposomov je nižja osmolarnost) vplivajo na stabilnost AK.

V hiperosmolarnem zunanjem okolju opazimo 3-krat slabšo stabilizacijo kot v izoosmolarnih pogojih (Slika 15, Slika 17). Liposomi DPPC z vključeno AK v citratnem pufru pH 3 imajo v notranjem okolju osmolarnost 124 mOsm. Hranimo jih v jabolčnem soku, ki ima 5-krat višjo osmolarnost in tako zagotovimo hiperosmolarne pogoje. V tem primeru pride do prehajanja vode iz liposomov v okolico, fosfolipidna membrana pa se skrči. Kljub slabši stabilnosti v hiperosmolarnem okolju pa liposomi DPPC stabilizirajo AK v primerjavi s stabilnostjo AK brez liposomov. Ugotavljam, da razpolovni čas AK podaljšamo z manj kot 5 ur na 2 dneva. Liposomi ne izpustijo vse AK v zunanje okolje naenkrat, temveč postopoma. Del AK ostane vključen, saj je ob dnevu 6 v notranjosti liposomov še vedno  $\approx 20\%$  AK, medtem ko pri prosti AK po dnevu 3 ne določimo več AK (Slika 17).



Slika 17: Stabilizacija AK – primerjava stabilnosti AK vključene v DPPC liposome in proste AK v jabolčnem soku (NR) in 5-krat redčenem jabolčnem soku (R) pri 25 °C. Hiperosmolarno zunanje okolje je jabolčni sok z inkubiranimi 124 mOsm liposomi. Hipoosmolarno zunanje okolje je 5-krat redčen jabolčni sok z inkubiranimi 620 mOsm liposomi. AK brez liposomov (prosta AK) je inkubirana v jabolčni sok (NR) in redčen jabolčni sok (R).

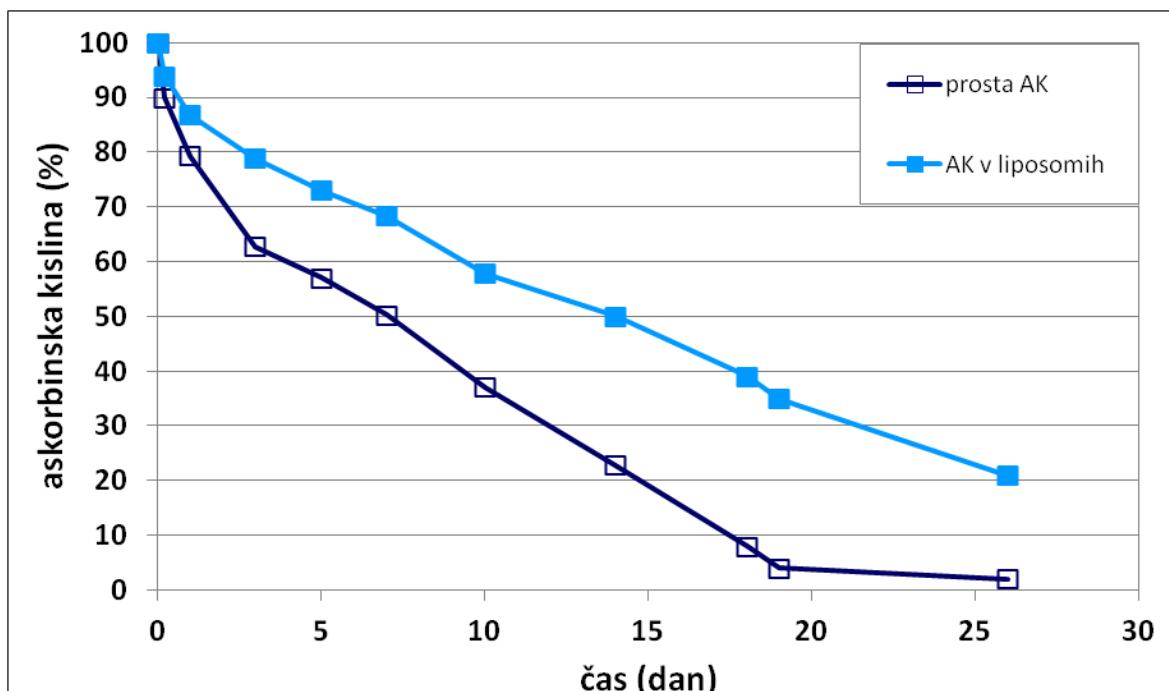
Hipoosmolarno okolico pa zagotovimo s 5-kratnim redčenjem jabolčnega soka, v katerem inkubiramo DPPC liposome s 620 mOsm notranjim okoljem. Takšni pogoji kažejo slabo stabilizacijo. Razpolovna časa liposomalne in proste AK sta enaka (Slika 17). Voda prehaja iz zunanje okolice, skozi fosfolipidno membrano, v notranjost liposomov. Liposomi pa kljub temu sproščajo AK počasi v zunanje okolje, in sicer s podobno kinetiko kot v hiperosmolarnih pogojih (Slika 17).

Preglednica 17: Ocena razpolovnih časov (dan) proste in v liposome vključene AK (DPPC) v jabolčnem soku (izoosmolarno okolje pri 4 °C in 25 °C in hiperosmolarno okolje pri 25 °C), 5-krat redčenem jabolčnem soku (izoosmolarno in hipoosmolarno okolje pri 25 °C) in v Actimelu (izoosmolarno okolje pri 4 °C).

	4 °C		25 °C			
	Izoosmolarni pogoji				Hiperosmolarni pogoji	Hipoosmolarni pogoji
	PROSTA	DPPC	PROSTA	DPPC	DPPC	DPPC
Jabolčni sok	3,0	18	0,2	5,9	1,8	/
5x redčen jabolčni sok	/	/	0,9	7,6	/	0,9
Mlečni napitek	7,0	14,0	/	/	/	/

#### 4.2.4.2 Inkubacija v fermentiranem mlečnem napitku (Actimel)

AK, raztopljeno v citratnem pufru pH 3 in vključeno v liposome DPPC, smo shranili tudi v fermentiran mlečni napitek (Actimel). Osmolarnost notranjega okolja liposomov je 124 mOsm. S tem zagotovimo izoosmolarne pogoje in boljšo stabilnost liposomov. Vzorce hranimo v hladilniku pri temperaturi 4 °C in po ekstrakciji kromatografsko določamo prisotno AK.



Slika 18: Stabilizacija AK – primerjava stabilnosti proste AK in v liposome DPPC vključene AK inkubirane v mlečnem napitku pri 4 °C. V notranjosti liposomov je osmolarnost 124 mOsm z vključeno AK raztopljeno v citratnem pufru pH 3.

Prosta AK je v mlečnem napitku dobro stabilna v primerjavi z inkubacijo v jabolčnem soku. Pri 4 °C je njen razpolovni čas 7 dni, v jabolčnem soku pa 3 dni. Z vključitvijo AK v liposome njeno stabilnost podaljšamo za 2-krat. Razpolovni čas inkapsulirane AK, hranjene v mlečnem napitku, je podoben razpolovnemu času v jabolčnem soku. Relativni učinek stabilizacije pa je, zaradi večje stabilnosti proste AK v mlečnem napitku, manj izrazit kot pri jabolčnem soku.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Askorbinska kislina je nestabilna molekula, ki se hitro oksidira do dehidroaskorbinske kisline ob prisotnosti kisikovih spojin. Skupaj predstavljata vitamin C, ki je biološko aktivien in esencialen. Tudi DHA je nestabilna molekula in se hidrolizira do DKG in ostalih razgradnih produktov, ki so brez prehranske vrednosti. Stabilnost AK podaljšamo z vključitvijo v fosfolipidne liposome in jo tako zaščitimo pred zunanjim okoljem (Kirby in sod., 1991). V naših modelnih vzorcih se je potrdila občutljivost proste AK na pH vrednost, prisotnost redoks aktivnih kovinskih ionov ter pufrov z in brez kelatorskih lastnosti. V okviru eksperimentalnega dela smo poizkušali ponazoriti pogoje, ki jih lahko najdemo tudi v živilih ter v takšnih razmerah zaščititi AK pred zunanjim okoljem z vključitvijo v fosfolipidne liposome.

Namen spremeljanja stabilnosti AK v modelnih raztopinah je ugotoviti, ali z vključitvijo v liposome podaljšamo njeno stabilnost. Preizkusili smo različne kombinacije zunanjih in notranjih pogojev in analizirali stabilizacijo AK z vključitvijo v liposome. AK smo določali spektrofotometrično z merjenjem absorbance oksidiranega reagenta ABTS<sup>•</sup>, ki se ob prisotnosti AK reducira in razbarva. AK hitro reagira z ABTS<sup>•</sup> radikalom v molarnem razmerju 1:2. Vendar ABTS<sup>•</sup> reagira tudi z ostalimi reducenti, zato je bolj primeren za določanje antioksidativne aktivnosti v modelnih raztopinah, kjer imamo znano definirano okolje. Absorbira v vidnem območju pri valovni dolžini 730 nm, kjer prisotne spojine ne motijo analize, je dobro topen v vodi in dovolj polaren, da ne reagira s fosfolipidi. Tudi pri segrevanju se absorbanca ABTS<sup>•</sup> radikala ne spreminja (Wechtersbach, 2011). Po nekaj dneh nastanejo nekateri razgradni produkti iz AK, ki imajo lahko reducirne lastnosti in motijo našo analizo. Mednje sodita 2,3-endiolna in 3,4-endiolna oblika diketogulono- $\delta$ -laktona, ki lahko nastaneta z izomerizacijo iz DKG (Nakata in sod., 1992). Zato smo uporabili encim AO, s katerim smo pretvorili AK v spojine, ki ne reagirajo z ABTS<sup>•</sup> in spektrofotometrično določali reducente, ki niso AK ter jih nato računsko odšteli od skupnih reducentov. AO je glikoprotein, ki ima bakrove ione na aktivnih mestih in katalizira oksidacijo AK do DHA ob prisotnosti kisika, ki se reducira v vodo (Wawire in sod., 2011). Zaradi velikega števila vzorcev smo AO uporabili le pri staranih vzorcih, kjer je bila vsebnost AK majhna in s tem vpliv ostalih reducentov na reakcijo z ABTS<sup>•</sup> večji. Pri vzorcih, kjer je razpadlo le malo AK, smo prispevek teh reducentov zanemarili. Določali smo tudi absorbanco, ki jo prispevajo micerle liziranih liposomov in jo upoštevali pri določanju AK. Pri DPPC liposomih je bil vpliv na absorbanco zelo majhen, pri DPPC/hol liposomih pa znatnejši. Liposomi, večji od 300 nm, sipajo svetlobo do te mere, da je suspenzija na pogled motna in bela (Taylor in sod., 2005). Naši liposomi so bili po ekstruziji veliki 800 nm ali manj.

Rezultati nedvomno kažejo, da smo v modelnih in realnih raztopinah z liposomi podaljšali razpolovno dobo AK glede na prosto (Slika 11, Slika 15, Slika 18, Priloge A-P). Liposomi DPPC/hol tudi po 14 dneh izkazujejo dobro termično stabilnost pri temperaturah nad faznim prehodom (Slika 14, Priloga W), zato jih je v nadaljnjih poskusih smiselno vključiti v živila, ki so topotno obdelana.

Na podlagi podatkov pridobljenih pri analizi modelnih raztopin, smo se odločili, da za stabilizacijo AK v realnih vzorcih jabolčnega soka in fermentiranega mlečnega napitka pripravimo liposome DPPC v citratnem pufru pH 3. Liposomi, pripravljeni v pH 3, so dobro stabilni in nekoliko bolje ščitijo AK (Priloga T), verjetno pa so bolj podvrženi kislinski hidrolizi estrske vezi, kot pripravljeni v citratnem pufru pH 4 (Ickenstein in sod., 2006).

### **5.1.1 Stabilnost proste AK**

#### **5.1.1.1 Hranjena v modelnih pufernih raztopinah**

Modelne raztopine smo termostatirali pri 25 °C, da smo zagotovili enake temperaturne pogoje. Dobro obstojnost smo določili v citratnih pufrih, pri vseh treh pH vrednosti 3, 4 in 5. Razpolovni čas proste AK v citratnem pufru je med 10 in 12 dni. Opazili smo, da se stabilnost močno zmanjša ob dodatku bakrovih ionov, saj kot ugotavljajo nekateri avtorji, kovinski ioni, kot so npr.  $Cu^{2+}$ , pospešijo oksidacijo AK (Imer in sod., 2003). Razpolovna doba AK v citratnem pufru pH 4 in pH 5 se skrajša na 2 uri. Bolj stabilna ostane pri pH 3, kjer je okolje dovolj kislo, da določimo razpolovni čas skoraj 15 ur. Citratni pufer ima sposobnost kompleksiranja kovinskih ionov in s tem podaljša stabilnost AK v primerjavi z ostalimi pufrji, ki nimajo lastnosti tvorbe kelatov (Imer in sod., 2003). Kislo okolje so pogoji, kjer je AK dobro stabilna, ko se nahaja pretežno v protonirani obliki ( $AH_2$ ) in kot askorbatni monoanion ( $AH^-$ ) (Gregory, 2008). Vpliv nizkega pH na stabilnost AK je bolj očiten v formiatnem pufru, ki nima kelatorskih lastnosti. Pri pH 3 je AK več kot 9-krat bolj obstojna kot pri pH 4. Ob dodatku bakrovih ionov se razpolovna doba skrajša za več kot 100-krat pri pH 3 in skoraj za 150-krat v pH 4. Podobno stabilnost opazimo tudi v acetatnem pufru pH 4, ki ravno tako ne kompleksira kovinskih ionov. Pri pH 5 opazimo zelo hitro oksidacijo AK, razpolovni čas je dobre 4 ure, ob prisotnosti bakrovih ionov pa celo manj kot 10 minut. S tem potrdimo veliko občutljivost AK in hitro izgubo biološke aktivnosti, ob prisotnosti bakrovih ionov in odsotnosti kompleksantov.

#### **5.1.1.2 Hranjena v realnih raztopinah**

Za razliko od definiranega modelnega sistema pa je realni sistem veliko bolj kompleksen in vsebuje številne spojine, ki vplivajo na stabilnost AK. Jabolčni sok vsebuje redoks aktivne kovinske ione in delno oksidirane fenole, kjer je AK zelo nestabilna, zlasti pri 25

°C (Wechtersbach in sod., 2012). Po slabih 5 urah smo določili samo še polovico začetne vsebnosti AK. V redčenem soku pa je razpolovna doba več kot 20 ur, kar smo pričakovali, saj je koncentracija kovinskih ionov manjša. S hranjenjem jabolčnega soka v hladilniku (4 °C) podaljšamo razpolovni čas proste AK za 15-krat v primerjavi s hranjenjem pri 25 °C (Preglednica 17). Še vedno pa je ta le 3 dni in lahko sklepamo, da v kupljenem jabolčnem soku, vsebnost AK kmalu po odprtju embalaže ni več tolikšna kot navaja proizvajalec.

Fermentiran mlečni napitek (Actimel) je bolj ugodno okolje za stabilnost proste AK od jabolčnega soka. Zaradi zaviranja mikrobioloških procesov smo ga hranili pri 4 °C, kjer je razpolovni čas AK 7 dni (Preglednica 17, Slika 18).

### 5.1.2 Stabilnost AK, vključene v liposome, hranjene v modelnih raztopinah

AK smo z vključitvijo v fosfolipidne liposome stabilizirali in močno podaljšali njen razpolovni čas v večini modelnih raztopin. Liposomi DPPC, pripravljeni v citratnem pufru, kažejo večjo stabilnost pri pH 3 kot pri pH 4, medtem ko liposomi DPPC/hol bolje ščitijo AK v citratnem pufru pH 4. Razlike niso velike in so opazne predvsem v vzorcih z dodanimi bakrovimi ioni (Preglednica 15 in Preglednica 16). Sklepamo, da ima nizek pH večji doprinos k stabilnosti AK kot ima negativni vpliv na kislinsko hidrolizo estrskih vezi fosfolipidov in s tem na destabilizacijo liposomov. Najboljšo stabilizacijo v primerjavi s prosto AK določimo pri vzorcih, hranjenih v acetatnem pufru pH 5. AK pa je po pričakovanju glede na dobro stabilnost brez liposomov, vključena v liposome najbolj stabilna, če jo hranimo v citratnem pufru. Opazili smo, da je stabilnost boljša v citratnem pufru pH 5, kar kaže na občutljivost liposomov na nizek pH in pa verjetno tudi boljše kelatorske lastnosti citrata pri višjem pH.

#### 5.1.2.1 AK, vključena v liposome DPPC

Za pripravo liposomov smo uporabili DPPC fosfolipide, ki smo jih inkubirali v različnih pufrih. Zunanji pogoji so enaki kot pri spremeljanju stabilnosti proste AK, vzorce pa hranimo pri 25 °C. AK, raztopljena v citratnem pufru pH 3 in vključena v liposome, je dobro stabilna v citratnem pufru pH 5 z razpolovno dobo skoraj 30 dni in nekoliko manj pri pH 3. Podaljšanje obstojnosti AK pa je le 2-kratno, saj je AK že brez liposomov dobro stabilna pri teh pogojih. Veliko podaljšanje razpolovne dobe opazimo pri vzorcu hranjenem v acetatnem pufru pH 5, kjer je stabilizacija več kot 90-kratna (Preglednica 15).

Z dodatkom bakrovih ionov ponazorimo prisotnost redoks aktivnih kovinskih ionov v živilih. Ustvarimo pogoje, kjer je AK neobstojna in se hitro razgradi, kot npr. v živilskem matriksu. Zato smo se osredotočili predvsem na primerjavo stabilnosti proste in v liposome vključene AK v vzorcih, katerim smo v zunanje okolje dodali bakrove ione. Dodatek bakrovih ionov močno zmanjša razpolovno dobo AK, predvsem pri pH 5 in v acetatnem

pufru, ki nima kelatorskih lastnosti. Vendar pa je podaljšanje obstojnosti v liposome vključene AK najbolj opazno. Razpolovna doba AK je v vzorcu C3-A5 Cu<sup>2+</sup> 3 dni, kar je skoraj 600-krat dlje, kot smo jo določili brez liposomov (Preglednica 15).

Pri notranjem okolju citratni pufer pH 4 za vzorec C4-A5 Cu<sup>2+</sup> (Preglednica 16) pa smo določili skoraj 400-kratno stabilizacijo. Notranje okolje C4 malo slabše stabilizira AK v primerjavi s C3, kar je opazno pri pH 3 v zunanjem okolu in pri inkubaciji v acetatnem pufru pH 5 (Priloga T). Po drugi strani pa smo opazili, da z enakim pH znotraj in zunaj liposomalne membrane pri pH 4 (vzorec C4-C4 Cu<sup>2+</sup>, Preglednica 16) dosežemo razpolovno dobo kar 15 dni, kar pomeni skoraj 200-kratno stabilizacijo glede na prosto AK. Iz teh podatkov sklepamo, da pH nad 3, kot notranje liposomalno okolje še vedno omogoča dobro stabilnost AK, hkrati pa je kislinska hidroliza estrskih vezi v DPPC, ki povzroči puščanje liposomalne membrane, počasnejša.

Sveži liposomi DPPC so termično stabilni do okoli 41 °C. Pri tej temperaturi pride do faznega prehoda iz gel stanja v tekoče-kristalinično stanje (Taylor in Morris, 1995). Tudi v našem poskusu smo to potrdili in pri temperaturi nad 40 °C spremljali puščanje AK iz liposomov, kar smo zaznali z reagentom ABTS<sup>•</sup>, ki ga je reducirala iz liposomov prepuščena AK. Pokazali smo tudi, da na termično stabilnost liposomov močno vpliva staranje liposomov in pH zunanjega okolja. Temperatura, pri kateri liposomi sproščajo AK, se spusti na manj kot 30 °C pri 14 dni starih liposomih DPPC, z notranjim okoljem pH 3 in zunanjim okoljem pH 3. Pri inkubaciji v zunanjem okolju pH 5 opazimo boljšo stabilnost. Staranje ima na njih manjši vpliv in tudi 14 dni stari liposomi so termično stabilni do okoli 35 °C (Slika 12). Spremljanje termične stabilnosti liposomov DPPC, z notranjim okoljem pH 4 je pokazalo, da so manj občutljivi na staranje in nizek pH okolice kot pripravljeni v pH 3. Po 20 dneh se prepuščanje začne med 30 °C in 35 °C ob hrambi v pufru s pH 3. Pri višjem pH v zunanjem okolju (4 ali 5) ni bistvenih razlik v stabilnosti liposomov s C3 ali s C4 v notranjem okolju. Membrana postane prepustna med 35 °C in 40 °C (Slika 12 in Priloga U).

### 5.1.2.2 AK, vključena v liposome DPPC/hol

Holesterol je membranski lipid s togo in negibljivo strukturo, ki zmanjša fluidnost membrane (Boyer, 2005). Pripravili smo liposome iz mešanice 85 % masnega deleža DPPC in 15 % masnega deleža holesterola. S tem želimo izboljšati stabilnost liposomov pri višjih temperaturah in podaljšati čas izpusta AK v okolico. Več avtorjev omenja vključitev različnih deležev holesterola v fosfolipidno membrano za povečanje stabilnosti liposomov. Holesterol vpliva na mobilnost fosfolipidnega dvosloja z omejitvijo gibanja ogljikovodikovih verig nad temperaturo faznega prehoda (Taylor in Morris, 1995). Vendar so se DPPC/hol liposomi izkazali za slabše od čistih DPPC liposomov med shranjevanjem v modelnih raztopinah pri 25 °C (Preglednica 15, Preglednica 16, Priloga R, Priloga S).

Liposomi DPPC/hol z notranjim okoljem pH 3, hranjeni v citratnem pufru pH 3, stabilizirajo AK podobno dobro kot liposomi DPPC. Razpolovna doba AK je skoraj 25 dni in je več kot 2-krat daljša od razpolovne dobe proste AK. Hranjeni pri pH 5 pa so slabše stabilizirali AK od liposomov DPPC. V acetatnem pufru pH 5 smo vseeno določili skoraj 25-kratno podaljšanje razpolovne dobe. Liposomi DPPC/hol so neglede na večjo rigidnost membrane, slabše stabilizirali AK pri 25 °C, kot DPPC liposomi. To se dobro vidi v vzorcih z dodanimi bakrovimi ioni, kjer liposomi DPPC/hol veliko manj časa ohranjajo AK, v primerjavi z liposomi DPPC. V zunanjem okolju citratni pufer pH 5 je razpolovna doba AK 1 dan in je več kot 6-krat krajsa od stabilnosti AK v liposomih DPPC. V vzorcu C3-A5 Cu<sup>2+</sup>, z vključitvijo v liposome DPPC/hol, podaljšamo obstojnost AK z dobrih 7 minut na 1 dan, vendar je razpolovna doba AK v liposomih DPPC še 3-krat daljša (Preglednica 15).

Če vključimo v liposome DPPC/hol AK raztopljeno v C4, opazimo dobro stabilizacijo v zunanjem okolju C4 in C5. Pri inkubaciji v formiatnem in acetatnem pufru pa liposomi DPPC bolje stabilizirajo AK. Ob dodatku bakrovih ionov pa je AK v DPPC/hol liposomih manj stabilna kot vključena v liposome DPPC. Podaljšanje razpolovne dobe AK je veliko večje kot v vzorcih brez dodatka bakrovih ionov, vendar opažamo tudi do 3-krat slabšo stabilizacijo v primerjavi z liposomi DPPC (Preglednica 16).

Priprava liposomov DPPC/hol za stabilizacijo AK je bolj smiselna, če raztopine segrevamo. Prisotnost holesterola v fosfolipidni membrani povzroči, da liposomi nimajo očitnega faznega prehoda pri 41 °C. Postopno in enakomerno spuščajo svojo vsebino in pri segrevanju do 60 °C še vedno vsebujejo določen delež AK (Slika 14). Velike razlike v termični stabilnosti, ki jih dosežemo s holesterolom, se pokažejo po nekaj dnevih. Liposomi, stari 14 dni, so enako stabilni, kot ob dnevu 5 (Priloga W). Problem s staranjem in okolico pH 3, ki smo ga opazili pri spremeljanju termični stabilnosti liposomov DPPC, se pri liposomih DPPC/hol ne kaže. Določimo enako stabilnost kot pri vzorcih z zunanjim okoljem pH 5 (Priloga W). Ali izberemo C3 ali C4 kot notranje okolje tudi bistveno ne vpliva na termično stabilnost. Po rezultatih sodeč, so liposomi z vsebovanim citratnim pufrom pH 3, nekoliko bolj stabilni pri segrevanju (Slika 14.). Čeprav so nadaljnji poskusi pokazali, da je notranje okolje pH 4 ugodnejše, saj je kinetika puščanja nad temperaturo faznega prehoda počasnejša (Wechtersbach, 2011).

#### 5.1.2.3 AK, vključena v liposome DPPC/*A. pernix*

Arheosomi, ki jih tvorimo iz arhejnih lipidov so termostabilni in primerni za zaščito antioksidantov med toplotno obdelavo živil (Mozafari in sod., 2006). Uporabili smo izolirane membranske lipide arheje *A. pernix*, da bi pripravili liposome, ki so termično stabilni in podaljšali obstojnost vključene AK. Arhejne lipide smo vključili v membrano DPPC liposomov in v njih vključili AK v citratnem pufru pH 4.

Pri inkubaciji v citratnem pufru pH 4 nismo podaljšali stabilnosti AK. Celo nasprotno, AK brez liposomov je bolj stabilna kot pa vključena v liposome. Ker smo AK dobro stabilizirali že v DPPC liposomih, nismo optimizirali postopka priprave liposomov iz arhejnih lipidov. Morda je bil vzorec onesnažen s kovinskimi ioni ali pa je prišlo do nepredvidenih reakcij med AK in arhejnimi lipidmi. Liposomi DPPC/A. *pernix* so bili nestabilni in so puščali pri pH 4. Zato smo jih inkubirali tudi v acetatnem pufru pH 5. Na ta način smo AK stabilizirali, vendar mnogo slabše kot z uporabo liposomov DPPC ali DPPC/hol. Liposomi niso stabilni in opazno puščajo. To lahko opazimo, če primerjamo vzorce z in brez dodatka bakrovih ionov. Ob dodatku bakrovih ionov se prisotna AK oksidira v 1 dnevnu razpolovnemu času 12 ur. Brez bakrovih ionov pa AK zaznamo še po 14 dneh z razpolovnim časom skoraj 2 dneva. Arheja A. *pernix* uspešno raste pri nevtralnem in rahlo bazičnem pH, pri pH 5 pa se ne razmnožuje. Verjetno pri pH nižjem od 6 postane celična membrana prepustna za ione (Ota in sod., 2012).

### 5.1.3 Stabilnost AK, vključene v liposome, hranjene v živilih

Uporaba liposomov za stabilizacijo AK v jabolčnem soku in fermentiranem mlečnem napitku je smiselna, saj smo podaljšali njeno razpolovno dobo v vseh vzorcih. Izbrali smo liposome DPPC, pripravljene v citratnem pufru pH 3, ki so se pri poskusih v modelnih raztopinah izkazali, da dobro stabilizirajo AK, predvsem ob dodatku bakrovih ionov in nizkem pH v zunanjem okolju. Prehodne kovine, kot sta baker in železo, so naravno prisotne v sokovih in pospešijo razgradnjo AK (Van den Broeck in sod., 1998). Citronska kislina je med najbolj pogostimi naravnimi prisotnimi kislinami v sadju. Ima pomembno vlogo pri stabilizaciji AK, predvsem ob prisotnosti bakrovih ionov in preprečuje njeno oksidacijo v sadnih sokovih (Imer in sod., 2003).

V jabolčnem soku smo preverili tudi vpliv osmotskega stresa na membrano liposomov. Inkubacija v hipoosmolarnem okolju povzroči prehajanje vode v notranjost liposomov, kjer je večji osmotski tlak, da bi se vzpostavilo osmotsko ravnotežje. Vezikli narastejo in v lipidni membrani nastanejo pore, skozi katere vsebina liposomov prehaja v okolico (Hull in sod., 2004). Takšno puščanje preprečimo z zagotavljanjem izoosmolarnih pogojev. V ta namen smo pripravili liposome s 5-krat večjo osmolarnostjo (620 mOsm), od liposomov, ki smo jih inkubirali v modelnih raztopinah. Razpolovno dobo AK v jabolčnem soku, hranjenem pri 25 °C, tako podaljšamo s slabih 5 ur na 6 dni (Slika 15, Preglednica 17). Izoosmolarne pogoje pa smo zagotovili tudi za liposome z nizko osmolarnostjo notranjega okolja (124 mOsm). V ta namen smo jabolčni sok 5-krat redčili z MilliQ vodo. V tem poskusu smo dosegli celo boljšo stabilnost AK, in sicer je njen razpolovni čas skoraj 8 dni pri 25 °C. To je predvsem zaradi redčenega jabolčnega soka in s tem manjše vsebnosti redoks aktivnih kovinskih ionov in ostalih pospeševalcev razgradnje AK. Stabilizacija AK pa je 8-kratna glede na prosto AK (Slika 15, Preglednica 17). Potrdili smo tudi, da nizka temperatura podaljša stabilnost AK. Izoosmolarni vzorec jabolčnega soka z AK, vključeno

v liposome smo hranili v hladilniku na 4 °C. Po pričakovanju, je stabilnost AK več kot 3-krat daljša, glede na hrambo pri 25 °C in ima razpolovno dobo skoraj 20 dni. Stabilizacija v liposome vključene AK, glede na prosto pa je le 6-kratna, saj je potrebno vedeti, da je tudi prosta AK v jabolčnem soku pri 4 °C dobro stabilna, z razpolovno dobo 3 dni (Slika 16, Preglednica 17).

Liposomi, ki smo jih shranili v hipoosmolarnem zunanjem okolju pri 25 °C, vključene AK ne stabilizirajo. S tem potrdimo navedbe o pomembnosti enakih osmotskih tlakov na obeh straneh liposomalne membrane. Liposome s 5-krat nižjo osmolarnostjo (124 mOsm) smo inkubirali v jabolčnem soku in tako preverjali stabilnost tudi v hiperosmolarnem okolju. Pri teh pogojih, voda prehaja iz notranjosti veziklov v zunanje okolje, z njo pa verjetno tudi vodotopna AK, lipidna membrana pa se skrči. Stabilizacija AK, ki smo jo dosegli v hiperosmolarnem okolju pri 25 °C, je 10-kratna. Vendar je vseeno razpolovna doba AK 3-krat krajsa, v primerjavi z izoosmolarnimi pogoji (Preglednica 17). Je pa puščanje liposomov, v hipoosmolarnem in hiperosmolarnem okolju, podobno hitro in tudi po 6 dnevih, določimo še vedno med 10 % in 20 % AK, medtem ko proste AK v tem času nismo več zaznali (Slika 17). Enak osmotski tlak znotraj in zunaj liposomov je nedvomno pomemben in omogoča daljšo stabilnost fosfolipidnega sloja in s tem tudi vključene AK. Ne želimo pa skupaj z liposomi vnašati v sok še dodatnega sladkorja, saj ima jabolčni sok že dovolj visoko osmolarnost. Zato je smiseln razmišljati o uporabi liposomov kot stabilizatorjev AK in ostalih antioksidantov tudi v hiperosmolarnem okolju.

Kot drugi realni vzorec smo izbrali mlečni napitek (Actimel), kjer prisotnost liposomov naj ne bi vplivala na senzorične lastnosti živila. Mikroinkapsulacijska metoda je uporabna za dodajanje AK v mlečne izdelke, saj zamaskira njeno kislost, prepreči spremembo barve in omogoča njeno počasno spuščanje v okolico (Lee in sod., 2003). Že pri prosti AK smo opazili dobro stabilnost v mlečnem napitku pri 4 °C. Za boljšo stabilizacijo AK z liposomi smo zagotovili izoosmolarne pogoje in uporabili liposome DPPC s 124 mOsm notranjim okoljem. Z vključitvijo AK v liposome podaljšamo njeno razpolovno dobo s 7 na 14 dni. Liposomi so manj stabilni v mlečnem napitku, v primerjavi z jabolčnim sokom in zato tudi slabše ščitijo AK. Fermentirani mlečni izdelki vsebujejo mlečne maščobe in imajo pH okoli 4 (Rogelj, 2003) Verjetno se, v mlečnem napitku prisotni lipidi, vključujejo v fosfolipidno membrano liposomov in tako pospešijo prepuščanje njihove vsebine. Poskus pa kaže na počasno in enakomerno puščanje, tako da po 25 dneh določimo več kot 20 % prisotne AK. V enakem času pa v vzorcu brez liposomov AK ne določimo več (Slika 18).

Potrebno je vedeti, da kromatografsko določamo vso AK v vzorcu in ne samo tiste, ki je vključena v liposome. Ekstrakcija lipidov z etil acetatom ni popolna in nekaj AK ostane v nepolarni fazi. Vendar pa je stabilizacija dobro razvidna, če primerjamo prosto AK in v liposome vključeno AK. Z vključitvijo v liposome smo občutno izboljšali stabilnost AK v jabolčnem soku in mlečnem napitku.

Pri vseh poskusih smo določali AK, ne pa tudi DHA. Vsebnost biološko aktivnega vitamina C, je zato nekoliko višja, saj združuje reducirano in oksidirano obliko, ki se v organizmu medsebojno pretvarjata. Predvsem pri shranjevanju živil se po določenem času vsebnost DHA povečuje, medtem ko v živih celicah najdemo predvsem AK (Lee in Kader, 2000).

Liposome DPPC/hol zaradi dobre termične stabilnosti lahko uporabimo za stabilizacijo AK v pasteriziranem (segrevanje pri 72 °C) jabolčnem soku. Začeli smo s preliminarnim poskusom in nadaljnje preučevanje je pokazalo, da tudi pri temperaturi pasterizacije, večji delež AK ostane vključen v liposome (Wechtersbach, 2011).

## 5.2 SKLEPI

- AK je občutljiva molekula, ki se v vodnih raztopinah hitro oksidira in hidrolizira. Prisotnost bakrovih ionov in oksidantov, višje pH vrednosti ter segrevanje pospešijo razgradnjo AK.
- Z vključitvijo AK v DPPC in DPPC/hol liposome podaljšamo njeno razpolovno dobo glede na prosto AK. Stabilizacijo dosežemo pri vseh zunanjih pogojih, v citratnem, acetatnem in formiatnem pufru, v območju pH od 3 do 5. Zlasti v modelnih raztopinah z dodanimi bakrovimi ioni. Od pufrov je najugodnejši za stabilnost AK citratni pufer, ki ima kelatorske lastnosti. Večjo stabilizacijo, glede na prosto AK, dosežemo v modelnih raztopinah z bolj neugodnimi pogoji za obstojnost AK.
- Liposomi DPPC/hol, hranjeni v modelnih raztopinah pri 25 °C, so manj stabilni od čistih DPPC liposomov. Uporaba holesterola pa omogoča boljšo termično stabilnost liposomov pri segrevanju nad temperaturo faznega prehoda. Le-ta je manj očiten, prepuščanje veziklov pa je enakomerno in počasno, tako da pri 60 °C liposomi še vedno ščitijo določen delež AK.
- Liposomi, pripravljeni iz mešanice DPPC fosfolipidov in arhejnih lipidov, izoliranih iz *A. pernix* v masnem razmerju 9:1 ne omogočajo dobre stabilizacije AK v modelnem sistemu pri 25 °C in prepuščajo snovi iz zunanjega okolja.
- V jabolčnem soku z liposomi DPPC podaljšamo obstojnost AK, predvsem v izoosmolarinem okolju pri 25 °C. Enakost osmotskih tlakov v notranjem in zunanjem okolju pomembno poveča stabilnost liposomov. Hranjenje pri nizki temperaturi (4 °C) pa poveča stabilnost AK.
- AK smo stabilizirali z vključitvijo v liposome DPPC tudi v fermentiranem mlečnem napitku (Actimel) kljub temu, da je v tem okolju pri 4 °C že prosta AK dobro stabilna.

## 6 POVZETEK

AK s svojimi antioksidativnimi lastnostmi sodeluje pri številnih življenjsko pomembnih metabolnih procesih. Ima vlogo kofaktorja, ki omogoča delovanje določenim encimom in preko njih sintezo ključnih spojin, kot so kolagen, kamitin in hormoni nadledvične žleze. Druga vidnejša funkcija je lovљenje prostih radikalov in s tem preprečevanje oksidativnih poškodb biomolekul ter posledično zmanjšanje možnosti za nastanek degenerativnih kroničnih bolezni.

AK je zelo občutljiva spojina in se hitro razgradi ob višji temperaturi, svetlobi in bazičnem pH. Prisotnost kisikovih spojin, redoks aktivnih kovinskih ionov in oksidativnih encimov pospeši njen razgradnjo in izgubo biološke aktivnosti. AK se reverzibilno oksidira v DHA, ta pa se naprej hidrolizira preko DKG v številne prehransko nepomembne produkte. Njeno stabilnost lahko podaljšamo z eliminacijo dejavnikov, ki pospešijo razgradnjo ali z vključevanjem v nanodelce iz bioloških polimerov. Nanodelce, pripravljene iz lipidov, imenujemo liposomi, kot osnovni material pa lahko uporabimo tudi proteine ali ogljikove hidrate. Pripravili smo tri vrste liposomov, in sicer iz fosfolipidov DPPC, iz mešanice DPPC in 15 % holesterola ter iz mešanice DPPC in 10 % lipidov arheje *A. pernix*. V liposome smo vključili AK po metodi dehidracije/rehidracije tankega lipidnega filma. Vključili smo jo raztopljeno v citratnem pufru pH 3 ali pH 4, kjer je dobro stabilna.

Stabilnost AK, vključene v liposome, smo spremljali v modelnih raztopinah. Pripravili smo jih iz citratnega, acetatnega in formiatnega pufra v koncentracijah, ki zagotavljajo izoosmolarne pogoje. Pufri so imeli pH vrednosti od 3-5, citratni puffer pa je tudi kelator kovinskih ionov. Pripravili smo jih v parih, tako da smo v polovico dodali bakrove ione. Vzoredno smo spremljali stabilnost proste AK, ki ni bila vključena v liposome v enakih modelnih raztopinah. Vse modelne raztopine smo inkubirali pri 25 °C in v daljšem časovnem obdobju spektrofotometrično spremljali vsebnost AK. Merili smo absorbanco pri 730 nm radikala ABTS<sup>•</sup>, ki reagira z AK in se pri tem razbarva. Grafično smo določili in primerjali razpolovne čase AK vključene v liposome in proste AK. Z vključitvijo AK v liposome, smo podaljšali njeno obstojnost v skoraj vseh modelnih raztopinah, zlasti pa je stabilizacija visoka pri vzorcih z dodanimi bakrovimi ioni, kjer smo opazili tudi več 100-kratno podaljšanje razpolovne dobe. Med tremi različicami liposomov smo največjo stabilizacijo AK, v modelnih raztopinah pri 25 °C, določili pri liposomih DPPC. Liposomi DPPC/hol so dobro stabilni pri segrevanju do 60 °C, saj nimajo očitnega faznega prehoda pri 41,3 °C kot DPPC liposomi. Pri spremljanju termične stabilnosti liposomov z vključeno AK, se dobro vidi tudi vpliv staranja in pH zunanjega okolja. DPPC liposomi so verjetno zaradi kislinske hidrolize estrskih vezi fosfolipidov manj topotno obstojni, hranjeni pri pH 3 kot pH 5. Hranjeni v okolju s pH 3 so po 14 dneh začeli spuščati svojo vsebino tudi pri temperaturi, nižji od 30 °C, medtem ko so DPPC/hol liposomi dobro termično stabilni in neobčutljivi na staranje in nizek pH zunanjega okolja.

Liposome iz mešanice DPPC in arhejnih lipidov smo pripravili z namenom doseči dobro stabilnost v kislem območju in dobro termično stabilnost. Vendar so liposomi, kljub samo 10 % odstotnemu masnemu deležu arhejnih lipidov, v kislem pH nestabilni in spuščajo snovi iz zunanjega okolja v svojo notranjost. Vključena AK se je popolnoma oksidirala v nekaj dneh.

V večini modelnih raztopin, ki smo jih inkubirali pri 25 °C, so DPPC liposomi bolje ščitili AK od DPPC/hol liposomov, predvsem ob dodatku bakrovih ionov. Pri DPPC liposomih smo določili nekoliko boljšo stabilnost AK pri notranjem okolju C3 v primerjavi s C4. Na podlagi rezultatov iz modelnih raztopin smo se odločili, da za spremljanje stabilnosti AK v realnih raztopinah pripravimo liposome DPPC z notranjim okoljem C3. So pa imeli liposomi iz DPPC in holesterola z vključeno AK, raztopljeni v C4, zelo stabilno membrano, ki je nismo uspeli lizirati samo z detergentom triton in smo se morali poslužiti segrevanja v vodni kopeli. Sklepamo, da so ti liposomi primerni za stabilizacijo AK v toplotno obdelanih živilih.

Za realne raztopine smo uporabili jabolčni sok in fermentiran mlečni napitek Actimel. Pripravili smo vzorce v parih za primerjavo stabilnosti proste AK in stabilnosti AK vključene v liposome v enakih zunanjih pogojih. Vzorce z jabolčnim sokom smo hranili pri 25 °C, za primerjavo vpliva temperature pa en par tudi pri 4 °C. Vzorce z Actimelom, kjer smo inkubirali 124 mOsm liposome, smo imeli stalno v hladilniku pri 4 °C zaradi zaviranja mikrobioloških procesov. AK smo ločevali na HPLC koloni in določali z UV-Vis detektorjem. Določali smo celotno AK, prisotno v vzorcu. Rezultati so manj natančni, saj nekaj AK preide tudi v nepolarno fazo, se pa dobro vidi njena stabilizacija, ki smo jo dosegli z vključitvijo v liposome. V jabolčnem soku smo ugotovili, da so liposomi dobro stabilni samo v izoosmolarnem okolju. Za zagotovitev izoosmolarnih pogojev smo pripravili liposome s 124 mOsm notranjim okoljem v redčenem jabolčnem soku in pa liposome s 620 mOsm notranjostjo v neredčenem jabolčnem soku. Glede na stabilnost proste AK v neredčenem jabolčnem soku pri 25 °C, smo z vključitvijo v liposome in inkubacijo v izoosmolarnih pogojih, podaljšali njen razpolovno dobo za 30-krat. Najboljšo stabilnost vključene AK smo pričakovano določili v jabolčnem soku, hranjenem v hladilniku pri 4 °C z razpolovno dobo AK skoraj 20 dni. Vendar je stabilizacija manjša kot pri 25 °C, saj je tudi prosta AK v hladilniku veliko bolj obstojna kot pri sobni temperaturi. V hipoosmolarnem okolju voda vdira v liposome in membrana zaradi nabrekanja začne puščati, AK pa je slabo zaščiten. V hiperosmolarnem okolju je razpolovna doba nekoliko daljša, vendar liposomi ne omogočajo občutne stabilizacije AK. Tudi v Actimelu smo z vključitvijo v liposome podaljšali razpolovno dobo AK s 7 na 14 dni. Prosta AK je v primerjavi z jabolčnim sokom več kot 2-krat bolj obstojna v Actimelu, vključena v liposome pa je bolj stabilna v jabolčnem soku. Sklepamo, da pride do razgradnje membranske strukture zaradi interakcij med liposomalnimi fosfolipidi in lipidi, ki so naravno prisotni v fermentiranem mlečnem izdelku.

## 7 VIRI

- Arrigoni O., De Tullio M.C. 2002. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1569: 1-9
- Arya S.P., Mahajan M., Jain P. 1998. Photometric methods for the determination of vitamin C. *Analytical Sciences*, 14: 889-895
- Bastiat G., Olinger P., Karlsson G., Edwards K., Lafleur M. 2007. Development of non-phospholipid liposomes containing a high cholesterol concentration. *Langmuir*, 23: 7695-7699
- Boyer R.F. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.
- Burdurlu H.S., Koca N., Karadeniz F. 2006. Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage. *Journal of Food Engineering*, 74: 211-216
- Champagne C.P., Fustier P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 184-190
- Chauhan A.S., Ramteke R.S., Eipeson W.E. 1998. Properties of ascorbic acid and its application in food processing. A critical appraisal. *Journal of Food Science and Technology*, 35, 5: 381-392
- Choi S.W., Benzie I.F.F., Collins A.R., Hannigan B.M., Strain J.J. 2004. Vitamins C and E: acute interactive effects on biomarkers of antioxidant defence and oxidative stress. *Mutation Research*, 551: 109-117
- Da Silva Bastos D., Gomes de Lima Araújo K., Miguez da Rocha Leão M.H. 2009. Ascorbic acid retaining using a new calcium alginate-Capsul based edible film. *Journal of Microencapsulation*, 26, 2: 97-103
- Davey M.W., Van Montagu M., Inzé D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N., Benzie I.J.J., 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. Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide. *Analytical Biochemistry*, 255: 1-7

Elkassabany M., Hoseney R.C., Seib P.A. 1980. Ascorbic acid as an oxidant in wheat flour dough. I. Conversion to dehydroascorbic acid. *Cereal Chemistry*, 57, 2: 85-87

Erenturk S., Gulaboglu M.S., Gultekin S. 2005. The effects of cutting and drying medium on the vitamin C content of rosehip during drying. *Journal of Food Engineering*, 68: 513-518

Fayle S.E., Gerrard J.A., Simmons L., Meade S.J., Reid E.A., Johnston A.C. 2000. Crosslinkage of proteins by dehidroascorbic acid and its degradation products. *Food Chemistry*, 70: 193-198

Finotelli P.V., Miguez da Rocha Leão M.H. 2005. Microencapsulation of ascorbic acid in maltodextrin and capsul using spray-drying. V: ENPROMER 2005. 2<sup>nd</sup> Mercosur Congress on Chemical Engineering. 4<sup>th</sup> Mercosur Congress on Process Systems Engineering. August 14<sup>th</sup>-18<sup>th</sup> 2005, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, ENPROMER, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro: 1-11

Gallarate M., Carlotti M.E., Trotta M., Bovo S. 1999. On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. *International Journal of Pharmaceutics*, 188: 233-241

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

Gopalakrishnan G. 2006. Lipid membranes for the fabrication of functional micro- and nano-structures. Lausanne, École Polytechnique Fédérale de Lausanne: 120 str.

Gregory J.F. 1985. Chemical changes of vitamins during food processing. V: Chemical changes in food during processing. Richardson T., Finley J.W. (eds.). New York, Van Nostrand Reinhold Company: 373-402

Gregory J.F. 2008. Vitamins. V: Fennema's food chemistry. 4<sup>th</sup> ed. Damodaran S., Parkin K.L., Fennema O.R. (eds.). Boca Raton, Taylor & Francis Group: 439-522

Han J., Guenier A.S., Salmieri S., Lacroix M. 2008. Alginate and chitozan functionalization for micronutrient encapsulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 2528-2535

- Hiat A.N., Taylor L.S., Mauer L.J. 2010. Influence of simultaneous variations in temperature and relative humidity on chemical stability of two vitamin C forms and implications for shelf life models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 3532-3540
- Hrncirik K., Valusek J., Velisek J. 2001. Investigation of ascorbigen as a breakdown product of glucobrassicin autolysis in *Brassica* vegetables. *European Food Research and Technology*, 212: 576-581
- Hull M.C., Sauer D.B., Hovis J.S. 2004. Influence of lipid chemistry on the osmotic response of cell membranes: effect of non-bilayer forming lipids. *Journal of Physical Chemistry B*, 108, 40: 15890-15895
- Iammarino M., Di Taranto A. 2012. Monitoring on the presence of ascorbic acid in not prepacked fresh meat preparations by a validated HPLC method. *Journal of Food Research*, 1, 2: 22-31
- Ickenstein L.M., Sandstrom M.C., Mayer L.D., Edwards K. 2006. Effects of phospholipid hydrolysis on the aggregate structure in DPPC/DSPE-PEG<sub>2000</sub> liposome preparations after gel to liquid crystalline phase transition. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758: 171-180
- 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*, 4, 15: 521-529
- Jang K. I., Lee H. G. 2008. Stability of chitosan nanoparticles for L-ascorbic acid during heat treatment in aqueous solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 1936-1941
- Jansson P.J., Jung H.R., Lindqvist C., Nordström T. 2004. Oxidative decomposition of vitamin C in drinking water. *Free Radical Research*, 38, 8: 855-860
- Kabasakalis V., Siopidou D., Moshatou E. 2000. Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage. *Food Chemistry*, 70: 325-328
- Karlsen A., Blomhoff R., Gundersen T.E. 2005. High-throughput analysis of vitamin C in human plasma with the use of HPLC with monolithic column and UV-detection. *Journal of Chromatography B*, 824: 132-138

Keller B.C. 2001. Liposomes in nutrition. Trends in Food Science and Technology, 12: 25-31

Khan D.R., Rezler E.M., Lauer-Fields J., Fields G.B. 2008. Effects of drug hydrophobicity on liposomal stability. Chemical Biology and Drug Design, 71: 3-7

Kirby C.J., Whittle C.J., Rigby N., Coxon D.T., Law B.A. 1991. Stabilization of ascorbic acid by microencapsulation in liposomes. International Journal of Food Science and Technology, 26: 437-449

Kojo S. 2004. Vitamin C: Basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. Current Medicinal Chemistry, 11: 1041-1064

Lapinski M.M., Castro-Forero A., Greiner A.J., Ofoli R.Y., Blanchard G.J. 2007. Comparison of liposome formed by sonication and extrusion: rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. Langmuir, 23: 11677-11683

Lee J.B., Ahn J., Lee J., Kwak H-S. 2003. The microencapsulated ascorbic acid release *in vitro* and its effect on iron bioavailability. Archives of Pharmacal Research, 26, 10: 874-879

Lee J.B., Ahn J., Lee J., Kwak H-S. 2004. L-ascorbic acid microencapsulated with polyacylglycerol monostearate for milk fortification. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 68, 3: 495-500

Lee S.K., Kader A.A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. Postharvest Biology and Technology, 20: 207-220

Lee J.S., Kim J.W., Han S.H., Chang H.S., Kang H.H., Lee O.S., Oh S.G., Suh K.D. 2004. The stabilization of L-ascorbic acid in aqueous solution and water-in-oil-in-water double emulsion by controlling pH and electrolyte concentration. Journal of Cosmetic Science, 55, 1: 1-12

Lešková E., Kubíková J., Kováčiková E., Košická M., Porubská J., Holčíková K. 2006. Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. Journal of Food Composition and Analysis, 19: 252-276

Li Y., Schellhorn H.E. 2007. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. Journal of Nutrition, 137: 2171-2184

Lin H.Y., Thomas J.L. 2004. Factors affecting responsivity of unilamellar liposomes to 20 kHz ultrasound. *Langmuir*, 20: 6100-6106

Linster C.L., Van Schaftingen E. 2007. Vitami C, biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS Journal*, 274: 1-22

Mandl J., Szarka A., Banhegyi G. 2009. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, 157: 1097-111

Mozafari M.R., Flanagan J., Matia-Merino L., Awati A., Omri A., Suntres Z.E., Singh H. 2006. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 2038-2045

Mozafari M.R., Johnson C., Hatziantoniou S., Demetzos C. 2008. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, 18: 309-327

Myrvik Q.N., Volk W.A. 1954. Comperative study of the antibacterial properties of ascorbic acid and reductogenic compounds. *Journal of Bacteriology*, 68, 5: 622-626

Nadal M.R., Morera-Pons S., Castellote A.I., Lopez-Sabater M.C. 2006. Rapid high-performance liquid chromatographic method for vitamin C determination in human milk versus an enzymatic method. *Journal of Chromatography B*, 830: 41-46

Nagymate E.J., Fodor P. 2008. The stability of vitamin C in different beverages. *British Food Journal*, 110, 3: 296-309

Nakata K., Morita N., Sawada S., Takagi M. 1992. Polarografic studies on two endiol forms derived from diketo-L-gulonic acid in a neutral buffer solution. *Analytical Sciences*, 8: 51-55

Oey I., Verlinde P., Hendrickx M., Van Loey A. 2006. Temperature and pressure stability of L-ascorbic acid and/or [6s] 5-methyltetrahydrofolic acid: A kinetic study. *European Food Research and Technology*, 223: 71-77

Ouimet J., Croft S., Paré C., Katsaras J., Lafleur M. 2003. Modulation of the polymorphism of the palmitic acid / cholesterol system by the pH. *Langmuir*, 19: 1089-1097

Ota A., Gmajner D., Šentjurc M., Poklar-Ulrich N. 2012. Effect of growth medium pH of *Aeropyrum pernix* on structural properties and fluidity of archeosomes. *Archaea*, 2012: ID: 285152, doi: 10.1155/2012/285152: 9 str.

Özkan M., Kirca A., Cemeroğlu B. 2004. Effects of hydrogen peroxide on the stability of ascorbic acid during storage in various fruit juices. *Food Chemistry*, 88: 591-597

Pierucci A.P.T.R., Andrade L.R., Baptista E.B., Volpato N.M., Miguez da Rocha-Leão M.H. 2006. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as cost protector. *Journal of Microencapsulation*, 23, 6: 654-662

Podsędek A. 2007. Natural antioksidants and antioksidant capacity of *Brassica* vegetables: A review. *LWT – Food Science and Technology*, 40: 1-11

Poklar-Ulrich N., Gmajner D., Raspor P. 2009. Structural and physicochemical properties of polar lipids from thermophilic archaea. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84: 249-260

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evanc C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231-1237

Righetto A.M., Netto F.M. 2006. Vitamin C stability in encapsulated green West Indian cherry juice and in encapsulated synthetic ascorbic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 1202-1208

Rivas C.I., Zúñiga F.A., Salas-Burgos A., Mardones L., Ormazabal V., Vera J.C. 2008. Vitamin C transporters. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 64: 357-376

Rogelj I. 2003. Mleko. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 513-539

Roig M.G., Bello J.F., Rivera Z.S., Kennedy J.F. 1999. Studies on the occurrence of non-enzymatic browning during storage of citrus juice. *Food Research International*, 32: 609-619

Rumsey S.C., Levine M. 1998. Absorption, transport and disposition of ascorbic acid in humans. *Nutritional Biochemistry*, 9: 116-130

Silva R., Ferreira H., Little C., Cavaco-Paulo A. 2010. Effect of ultrasound parameters for unilamellar liposome preparatio. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17: 628-632

Smirnoff N., Wheeler G.L. 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 4: 291-314

Sułkowski W.W., Pentak D., Nowak K., Sułkowska A. 2005. The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. *Journal of Molecular Structure*, 744-747: 737-747

Survase S.A., Bajaj I.B., Singhal R.S. 2006. Biotechnological production of vitamins. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 3: 381-396

Taylor T.M., Davidson P.M., Bruce B.D., Weiss J. 2005. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 587-605

Taylor K.M.G., Morris R.M. 1995. Thermal analysis of phase transition behaviour in liposomes. *Thermochimica Acta*, 248: 289-301

Thompson A.K., Couchoud A., Singh H. 2009. Comparison of hydrophobic and hydrophilic encapsulation using liposomes prepared from milk fat globule-derived phospholipids and soya phospholipids. *Dairy Science and Technology*, 89: 99-113

Thompson A.K., Mozafari M.R., Singh H. 2007. The properties of liposomes produced from milk fat globule membrane material using different techniques. *Le Lait*, 87: 349-360

Tudela J.A., Espin J.C., Gil M.I. 2002. Vitamin C retention in fresh-cut potatoes. *Postharvest Biology and Technology*, 26: 75-84

Uddin M.S., Hawlader M.N.A., Zhu H.J. 2001. Microencapsulation of ascorbic acid: effect of process variables on product characteristic. *Journal of Microencapsulation*, 18, 2: 199-209

Van den Broeck I., Ludikhuyze L., Weemaes C., Van Loey A., Hendrickx M. 1998. Kinetics for isobaric-isothermal degradation of L-ascorbic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 2001-2006

Van Duijn M.M., Ascorbate and its reactions with plasma membrane redox systems. Leiden, Universiteit Leiden: 157 str.

Van Poppel G., Van den Berg H. 1997. Vitamins and cancer. *Cancer Letters*, 114: 195-202

Vislisel J.M., Freya Q.S., Buettner G.R. 2007. A simple and sensitive assay for ascorbate using a plate reader. *Analytical Biochemistry*, 365: 31-39

Walsh D.E., Youngs V.L., Gilles K.A. 1970. Inhibition of durum wheat lipoxidase with L-ascorbic acid. Cereal Chemistry, 47, 2: 119-125

Wawire M., Oey I., Mathooko F., Njoroge C., Shitanda D., Hendrickx M. 2011. Thermal stability of ascorbic acid and ascorbic acid oxidase in African Cowpea leaves (*Vigna unguiculata*) of different maturities. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59: 1774-1783

Wechtersbach L. 2011. Pretvorbe askorbinske in dehidroaskorbinske kisline v vodnih raztopinah. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 62-63

Wechtersbach L., Poklar-Ulrich N., Cigić B. 2012. Liposomal stabilization of ascorbic acid in model systems and food matrices. LWT – Food Science and Technology, 45: 43-49

Wechtersbach L., Cigić B. 2007. Reduction of dehydroascorbic acid at low pH. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 70: 767-772

Wilson J.X. 2005. Regulation of vitamin C transport. Annual Review of Nutrition, 25: 105-125

Zaporozhets O.A., Krushinskaya E.A. 2002. Determination of ascorbic acid by molecular spectroscopic techniques. Journal of Analytical Chemistry, 57, 4: 286-297

Zuidam N.J., Gouw H.K.M.E., Barenholz Y., Crommelin D.J.A. 1995. Physical (in)stability of liposomes upon chemical hydrolysis: the role of lysophospholipids and fatty acids. Biochimica et Biophysica Acta, 1240: 101-110

## ZAHVALA

Za strokovne in življenjske napotke se zahvaljujem prof. dr Blažu Cigiću, ki me je vodil pri celotnem delu. Hvala za dostopnost, pomoč in potrpežljivost.

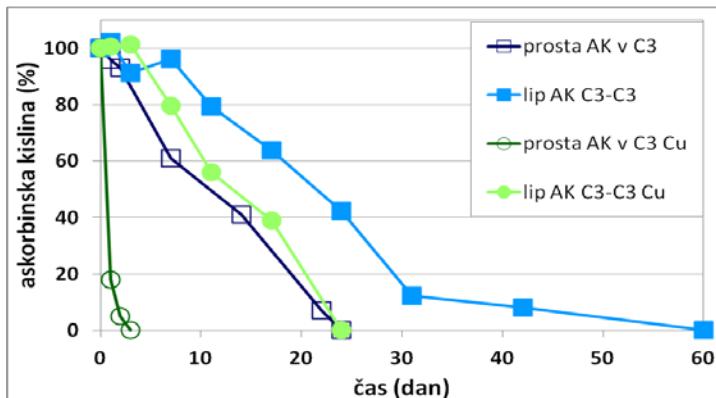
Luka Wechtersbach, hvala za praktično pomoč v laboratoriju, za številna pojasnila in razlage ter seveda za dobro družbo z veliko smeha.

Za recenzije se zahvaljujem prof. dr. Rajku Vidrihu s Katedre za tehnologije, prehrano in vino.

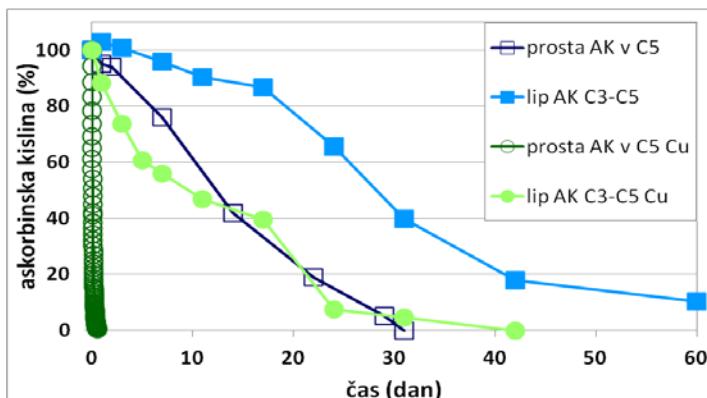
Za opravljeno lektorsko delo se zahvaljujem teti Cvetki.

Moji najbližji, hvala za zaupanje in razumevanje!

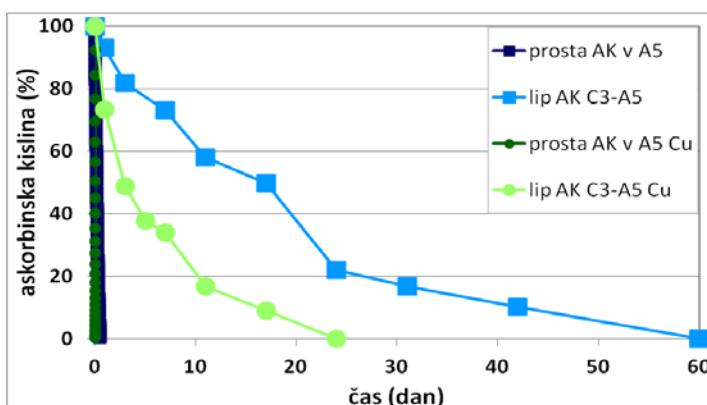
## PRILOGE



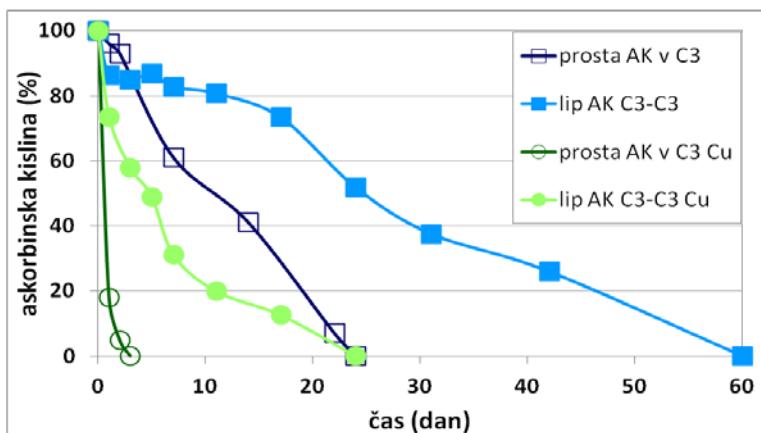
Priloga A: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v citratnem pufru pH 3 (C3) in v liposome DPPC vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 3, hranjene v citratnem pufru pH 3 (lip AK C3-C3). Brez in z dodatkom bakrovih ionov ( $Cu^{2+}$ ). Inkubacija poteka pri 25 °C. Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>•</sup> ob določenih dnevih.



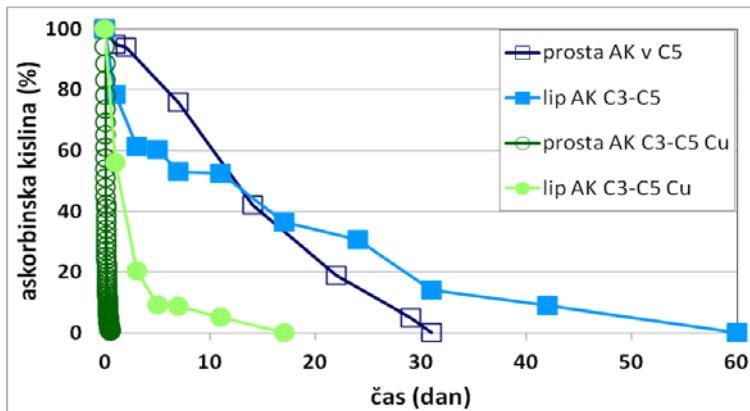
Priloga B: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v citratnem pufru pH 5 (C5) in v liposome DPPC vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 3, hranjene v citratnem pufru pH 5 (lip AK C3-C5). Brez in z dodatkom bakrovih ionov ( $Cu^{2+}$ ). Inkubacija poteka pri 25 °C. Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>•</sup> ob določenih dnevih.



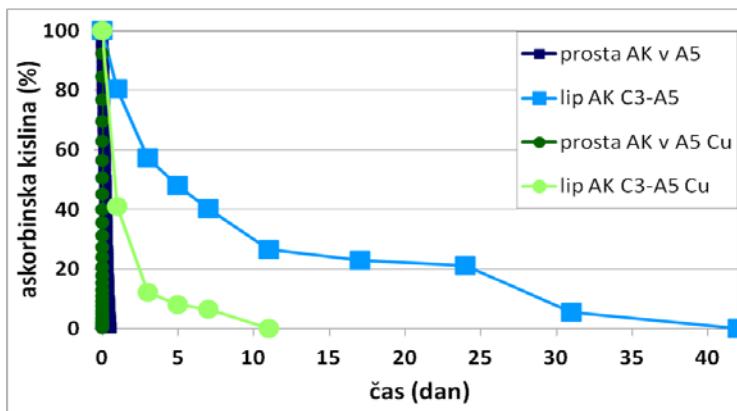
Priloga C: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v acetatnem pufru pH 5 (A5) in v liposome DPPC vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 3, hranjene v acetatnem pufru pH 5 (lip AK C3-A5). Brez in z dodatkom bakrovih ionov ( $Cu^{2+}$ ). Inkubacija poteka pri 25 °C. Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>•</sup> ob določenih dnevih.



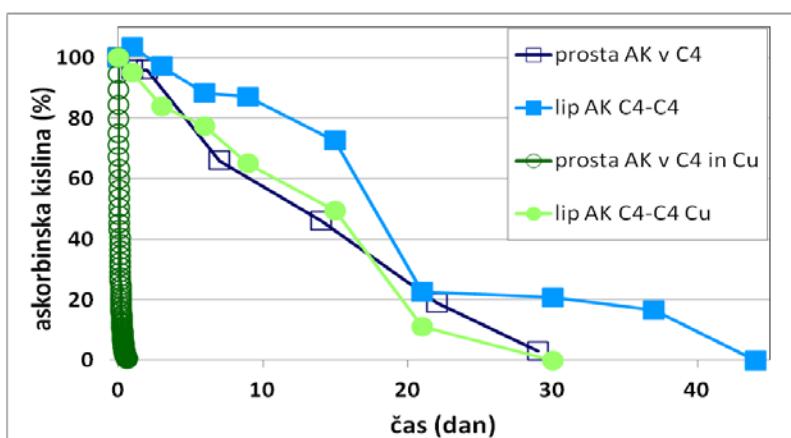
Priloga D: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v citratnem pufru pH 3 (C3) in v liposome DPPC/hol vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 3, hranjene v citratnem pufru pH 3 (lip AK C3-C3). Brez in z dodatkom bakrovih ionov ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Inkubacija poteka pri 25 °C. Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>•</sup> ob določenih dnevih.



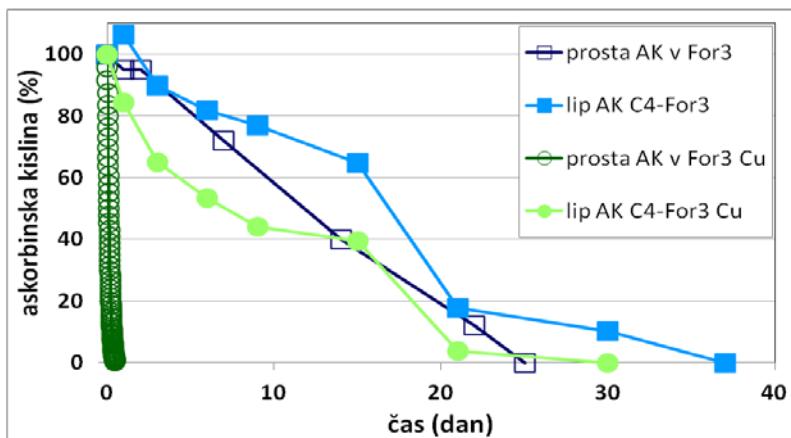
Priloga E: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v citratnem pufru pH 5 (C5) in v liposome DPPC/hol vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 3, hranjene v citratnem pufru pH 5 (lip AK C3-C5). Brez in z dodatkom bakrovih ionov ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Inkubacija poteka pri 25 °C. Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>•</sup> ob določenih dnevih.



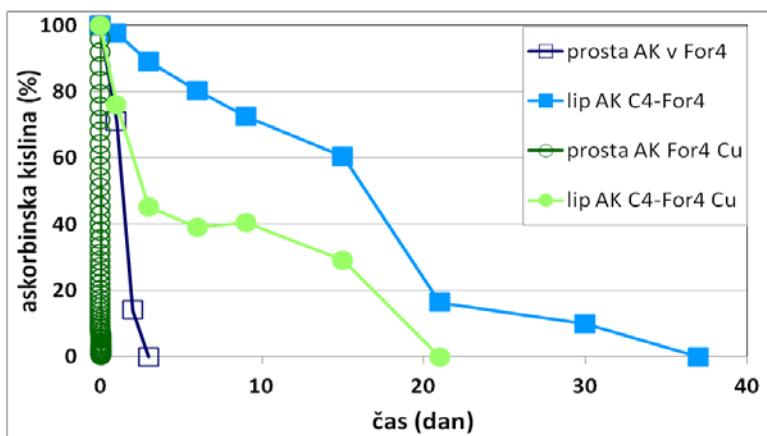
Priloga F: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v acetatnem pufru pH 5 (A5) in v liposome DPPC/hol vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 3, hranjene v acetatnem pufru pH 5 (lip AK C3-A5). Brez in z dodatkom bakrovih ionov ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Inkubacija poteka pri 25 °C. Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>•</sup> ob določenih dnevih



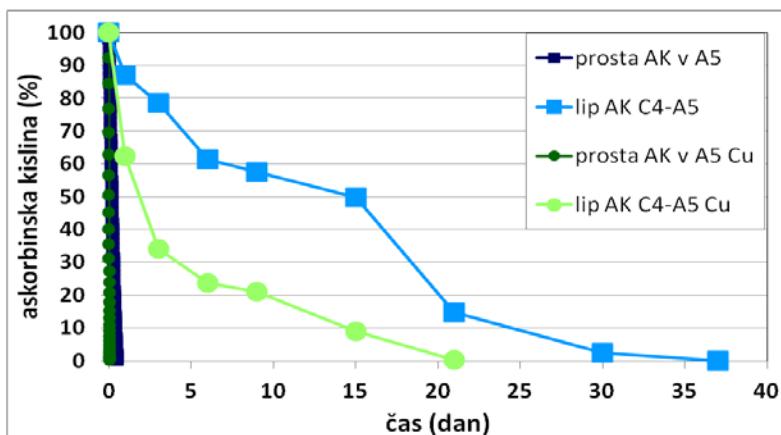
Priloga G: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v citratnem pufru pH 4 (C4) in v liposome DPPC vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v citratnem pufru pH 4 (lip AK C4-C4). Brez in z dodatkom bakrovih ionov ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Inkubacija poteka pri 25 °C. Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>•</sup> ob določenih dnevih.



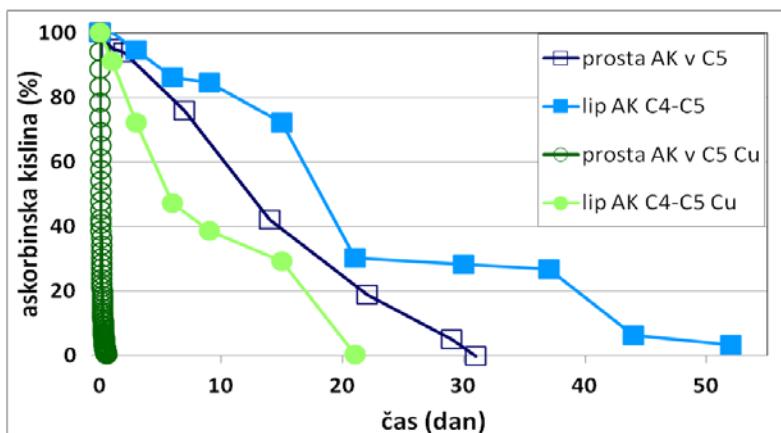
Priloga H: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v formiatnem pufru pH 3 (For3) in v liposome DPPC vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v formiatnem pufru pH 3 (lip AK C4-For3). Brez in z dodatkom bakrovih ionov ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Inkubacija poteka pri 25 °C. Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>•</sup> ob določenih dnevih.



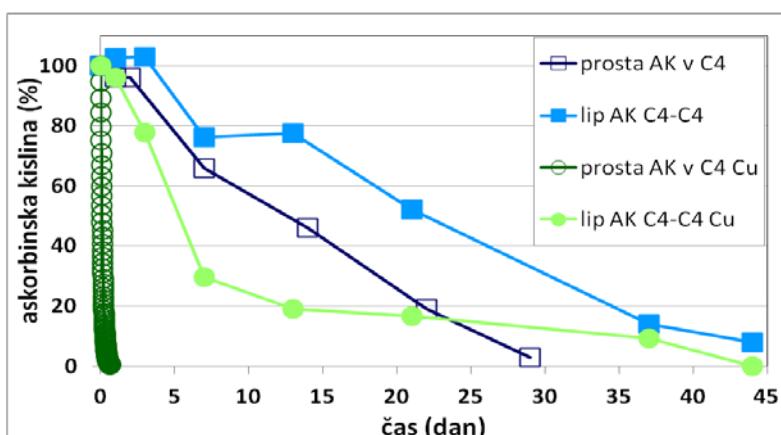
Priloga I: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v formiatnem pufru pH 4 (For4) in v liposome DPPC vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v formiatnem pufru pH 4 (lip AK C4-For4). Brez in z dodatkom bakrovih ionov ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Inkubacija poteka pri 25 °C. Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>•</sup> ob določenih dnevih.



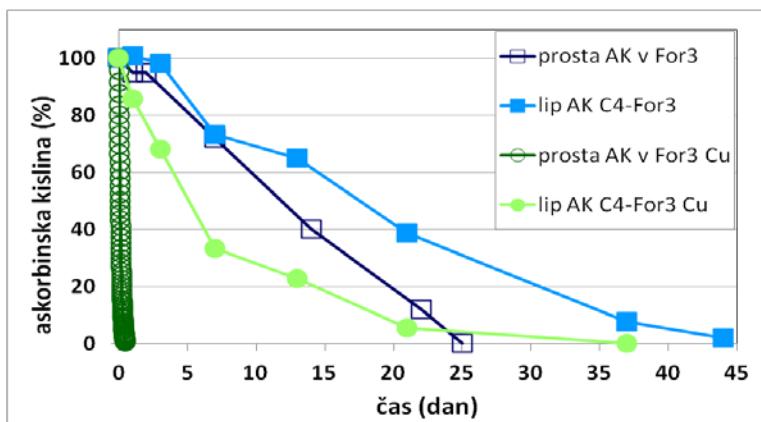
Priloga J: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v acetatnem pufru pH 5 (A5) in v liposome DPPC vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v acetatnem pufru pH 5 (lip AK C4-A5). Brez in z dodatkom bakrovih ionov ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Inkubacija poteka pri 25 °C. Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>•</sup> ob določenih dnevih.



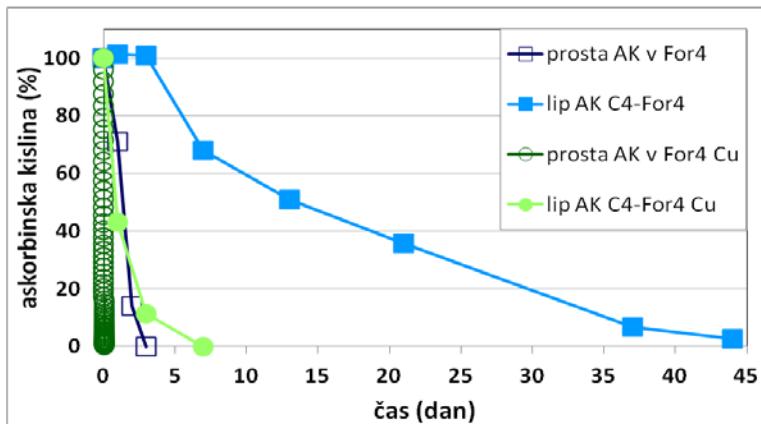
Priloga K: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v citratnem pufru pH 5 (C5) in v liposome DPPC vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v citratnem pufru pH 5 (lip AK C4-C5). Brez in z dodatkom bakrovih ionov ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Inkubacija poteka pri 25 °C. Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>•</sup> ob določenih dnevih.



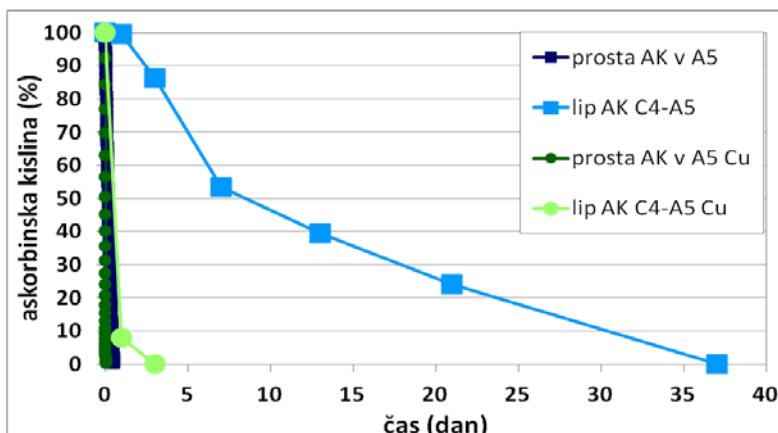
Priloga L: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v citratnem pufru pH 4 (C4) in v liposome DPPC/hol vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v citratnem pufru pH 4 (lip AK C4-C4). Brez in z dodatkom bakrovih ionov ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Inkubacija poteka pri 25 °C. Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>•</sup> ob določenih dnevih.



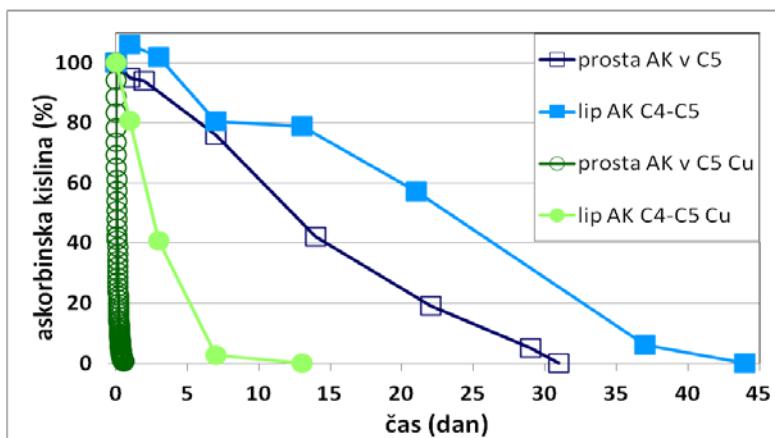
Priloga M: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v formiatnem pufru pH 3 (For 3) in v liposome DPPC/hol vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v formiatnem pufru pH 3 (lip AK C4-For3). Brez in z dodatkom bakrovih ionov ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Inkubacija poteka pri 25 °C. Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>•</sup> ob določenih dnevih.



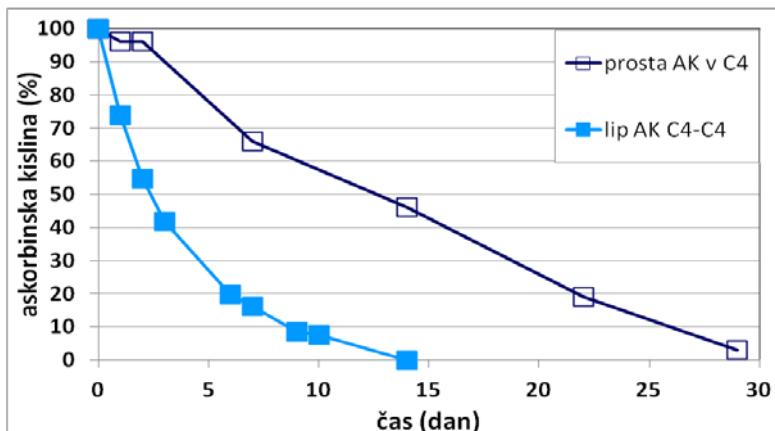
Priloga N: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v formiatnem pufru pH 4 (For 4) in v liposome DPPC/hol vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v formiatnem pufru pH 4 (lip AK C4-For4). Brez in z dodatkom bakrovih ionov ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Inkubacija poteka pri 25 °C. Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>•</sup> ob določenih dnevih.



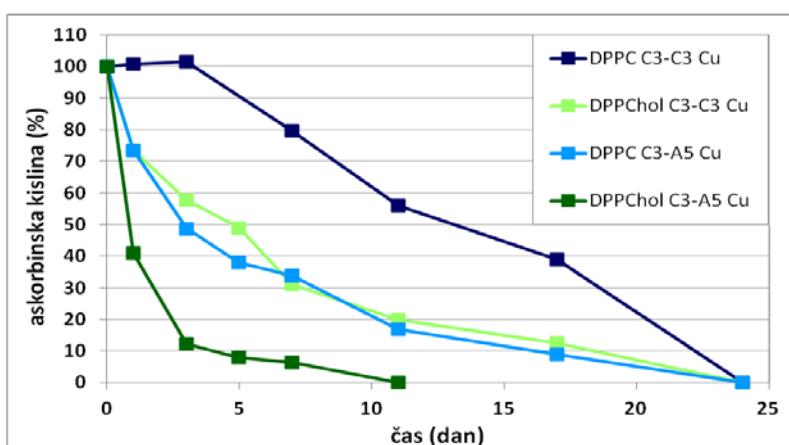
Priloga O: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v acetatnem pufru pH 5 (A5) in v liposome DPPC/hol vključene AK z notranjim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v acetatnem pufru pH 5 (lip AK C4-A5). Brez in z dodatkom bakrovih ionov ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Inkubacija poteka pri 25 °C. Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>•</sup> ob določenih dnevih.



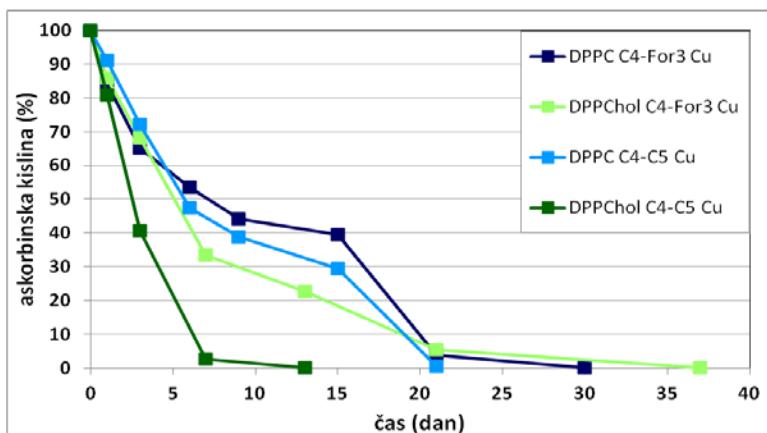
Priloga P: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v citratnem pufru pH 5 (C5) in v liposome DPPC/hol vključene AK z notravnim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v citratnem pufru pH 5 (lip AK C4-C5). Brez in z dodatkom bakrovih ionov ( $Cu^{2+}$ ). Inkubacija poteka pri 25 °C. Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>•</sup> ob določenih dnevih.



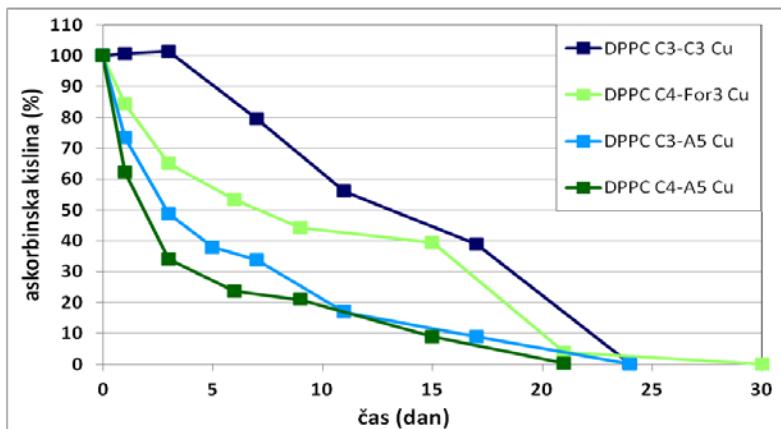
Priloga Q: Primerjava stabilnosti proste AK, hranjene v citratnem pufru pH 4 (C4) in v liposome DPPC/A. pernix vključene AK z notravnim okoljem citratni pufer pH 4, hranjene v citratnem pufru pH 4 (lip AK C4-C4). Inkubacija poteka pri 25 °C. Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>•</sup> ob določenih dnevih.



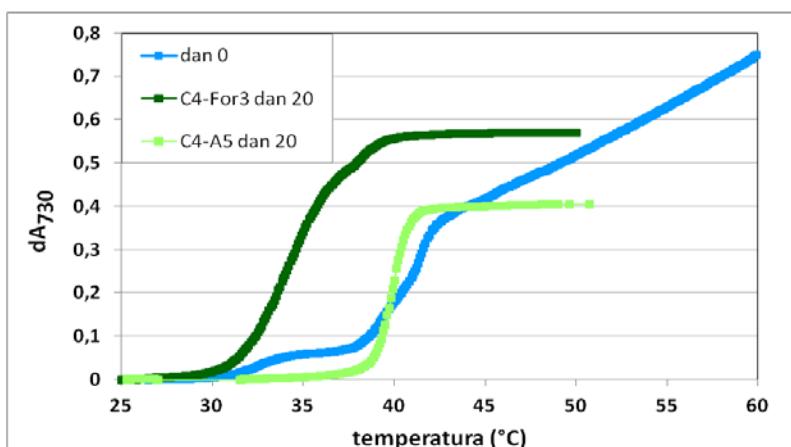
Priloga R: Primerjava stabilnosti AK, vključene v DPPC in DPPC/hol liposome v citratnem pufru pH 3. Inkubacija poteka v citratnem pufru pH 3 (C3) in acetatnem pufru pH 5 (A5) z dodanimi bakrovimi ioni ( $Cu^{2+}$ ) pri 25 °C. Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>•</sup>.



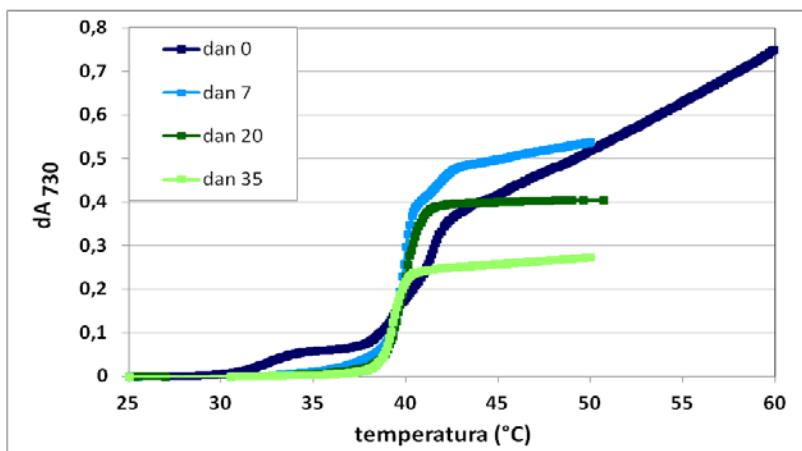
Priloga S: Primerjava stabilnosti AK, vključene v DPPC in DPPC/hol liposome v citratnem pufru pH 4. Inkubacija poteka v formiatnem pufru pH 3 (For3) in citratnem pufru pH 5 (C5) z dodanimi bakrovimi ioni ( $\text{Cu}^{2+}$ ) pri  $25^\circ\text{C}$ . Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>\*</sup>.



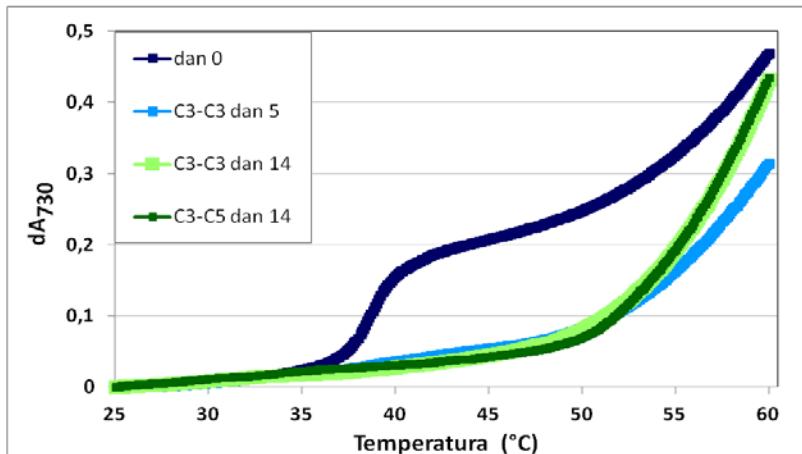
Priloga T: Primerjava stabilnosti AK, raztopljljene v citratnem pufru pH 3 ali citratnem pufru pH 4 vključene v DPPC liposome. Inkubacija poteka v citratnem ali formiatnem pufru pH 3 (C3 ali For3) in acetatnem pufru pH 5 (A5) z dodanimi bakrovimi ioni ( $\text{Cu}^{2+}$ ) pri  $25^\circ\text{C}$ . Vsebnost AK določamo z merjenjem absorbance po reakciji z ABTS<sup>\*</sup>.



Priloga U: Vpliv pH na termično stabilnost svežih (dan 0) in staranih (dan 20) DPPC liposomov pri segrevanju od  $25^\circ\text{C}$  do  $60^\circ\text{C}$  s hitrostjo  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ . Znotraj liposomov je AK v citratnem pufru pH 4 (C4), zunaj pa formiatni pufer pH 3 (For3) in acetatni pufer pH 5 (A5). Prepuščeno AK določamo spektrofotometrično z merjenjem absorbance ABTS<sup>\*</sup> radikala.



Priloga V: Termična stabilnost DPPC liposomov z vključeno AK, raztopljeno v citratnem pufru pH 4 inkubiranih v acetatnem pufru pH 5 v daljšem časovnem obdobju. Določanje termične stabilnosti je potekalo ob izbranih dneh na spektrofotometru s termostatom pri segrevanju od 25 °C do 60 °C s hitrostjo 1 °C/min.



Priloga W: Termična stabilnost svežih (dan 0) ter 5 in 14 dni starih DPPC/hol liposomov z vključeno AK v citratnem pufru pH 3, inkubiranih v citratnem pufru pH 3 (C3) in citratnem pufru pH 5 (C5). Prepuščeno AK določamo spektrofotometrično z merjenjem absorbance ABTS<sup>+</sup> radikala pri segrevanju od 25 °C do 60 °C s hitrostjo 1 °C/min.