

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Klavdija ŠPELIČ

**VPLIV pH, TEMPERATURE IN SVETLOBE NA
STABILNOST FOLNE KISLINE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Klavdija ŠPELIČ

**VPLIV pH, TEMPERATURE IN SVETLOBE NA STABILNOST
FOLNE KISLINE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF pH, TEMPERATURE AND LIGHT ON STABILITY
OF FOLIC ACID**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

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 mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Nataša Poklar Ulrich, za somentorico asist. dr. Mihaela Skrt in za recenzenta prof. dr. Janez Salobir.

Mentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrich

Somentorica: asist. dr. Mihaela Skrt

Recenzent: prof. dr. Janez Salobir

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora: 28. 9. 2016

Podpisana izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Klavdija Špelič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 577.164.1:613.2+612.3:641.1(043)=163.6
KG vitamini/vodotopni vitamini/folna kislina/vitamin B₉/prehrana/prehranska dopolnila/fizikalnokemijske lastnosti/pH/temperatura/svetloba/vpliv na zdravje
AV ŠPELIČ, Klavdija
SA POKLAR ULRIH, Nataša (mentorica)/SKRT, Mihaela (somentorica)/SALOBIR, Janez (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2016
IN VPLIV pH, TEMPERATURE IN SVETLOBE NA STABILNOST FOLNE KISLINE
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XIV, 79 str., 13 pregl., 47 sl., 6 pril., 124 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Folna kislina ali pteroil-L-glutaminska kislina je sintetična oblika vodotopnega vitamina B₉, ki se uporablja v obogatitvi živil ter pri proizvodnji prehranskih dopolnil. V okviru diplomske naloge smo ugotavljali vpliv pH topila, temperature ter vpliv svetlobe energijsko varčne sijalke in dnevne svetlobe na stabilnost folne kisline. Ugotavljali smo tudi antioksidativno aktivnost folne kisline. Z UV-VIS spektrofotometrijo smo spremljali spremembe v času 18 ur pri štirih različnih pH vrednostih (2, 4, 7 in 9) in pri sedmih različnih temperaturah (25, 35, 45, 55, 65, 75 in 85 °C). Ugotovili smo, da ima pH topila oziroma raztopin večji vpliv na stabilnost folne kisline od povisane temperature v območju med 25 °C in 85 °C. Folna kislina ima pri nižjih pH vrednostih (2 in 4) nizko topnost in tudi manjšo stabilnost. Pri vrednostih pH 7 in 9 je folna kislina stabilna. Preučevali smo tudi vpliv svetlobe (energijsko varčne sijalke in dnevne) na stabilnost raztopin folnih kislin s pH 2, 4, 7 in 9. Pripravljeni raztopine so bile 8 ur izpostavljene vplivu energijsko varčne sijalke in dnevne svetlobe. Opazili smo rahlo razgradnjo v raztopini folne kisline s pH 2, medtem ko se je vrednost absorbance v raztopinah s pH 4, 7 in 9 zvišala. Hladna bela svetloba energijsko varčne sijalke in dnevna svetloba imata majhen vpliv na stabilnost folne kisline. Z analizo HPLC smo določili razgradne produkte folne kisline v raztopinah z različnimi pH vrednostmi (2, 4, 7 in 9) pri temperaturi 25 °C. Ugotovili smo, da je raztopina folne kisline s pH 2 nestabilna že v času t = 0. Tudi raztopina folne kisline s pH 4 je nestabilna, saj se je površina kromatografskega vrha v času 18 ur zmanjšala za 10,9 %. Raztopine folnih kislin s pH 7 in 9 so bile v času 18 ur stabilne, ker so površine kromatografskih vrhov ostale nespremenjene. Antioksidativno aktivnost folne kisline v raztopinah s pH vrednostmi 7, 9 ter 13 smo določali z ABTS metodo. Največjo sposobnost redukcije kationskega radikala ABTS⁺ ima folna kislina s pH 13, manjšo folna kislina s pH 9 in najmanjšo folna kislina s pH 7. Folna kislina je boljši lovilec radikalov v alkalnem kot nevtralnem območju pH.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 577.164.1:613.2+612.3:641.1(043)=163.6
CX vitamins/water-soluble vitamins/folic acid/vitamin B₉/nutrition/food
supplements/physicochemical properties/pH/temperature/light/influence on health
AU ŠPELIČ, Klavdija
AA POKLAR ULRIH, Nataša (supervisor)/SKRT, Mihaela (co-advisor)/SALOBIR
Janez (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
Technology
PY 2016
TI INFLUENCE OF pH, TEMPERATURE AND LIGHT ON STABILITY OF FOLIC
ACID
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIV, 79 p., 13 tab., 47 fig., 6 ann., 124 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Folic acid or pteroyl-L-glutamic acid is a synthetic form of a water-soluble vitamin B₉, which
is used for the enrichment of food and in the production of food supplements. Within the
diploma thesis we have determined the influence of solvent pH, temperature and the
influence of energy-saver bulb and daylight on the stability of folic acid. We also discovered
the antioxidant activity of folic acid. The UV-VIS spectrophotometry was used to monitor
the changes during the 18 hours under four different pH values (2, 4, 7 and 9) and at seven
different temperatures (25, 35, 45, 55, 65, 75 and 85 °C). We discovered that a pH of the
solvent or solutions has a greater impact on the stability of folic acid from the elevated
temperature in the range between 25 °C and 85 °C. At low pH values (2 and 4) folic acid has
limited solubility and low stability. Folic acid is stable at pH values 7 and 9. We studied the
influence of light (energy-saver bulb and daylight) on the stability of folic acid solutions at
pH 2, 4, 7 and 9. The prepared solutions were for 8 hours exposed to the impact of energy-
saver bulb and daylight. We observed a slight degradation in a folic acid solution at pH 2,
while in the solutions at pH 4, 7 and 9 the value of the absorbance is higher. Cold white light
of energy-saver bulb and daylight have a little impact on the stability of folic acid. With
HPLC analysis we determine the degradation products of folic acid solutions at different pH
values (2, 4, 7, 9) and temperature 25 °C. We discovered that folic acid solutions at pH 2 is
unstable at time t = 0. The solution of folic acid at pH 4 is unstable, since the peak area
decrease was 10,9 % at the time of 18 hours. Solutions of folic acid at pH 7 and 9, at the time
of 18 hours, are stable, because the peak area was unchanged. The antioxidant activity of
folic acid solutions at pH values 7, 9 and 13 was measured with the ABTS method. Folic
acid at pH 13 has the highest ability to reduce the radical cation ABTS⁺, lower of folic acid
with pH 9 and the lowest folic acid at pH 7. Folic acid is a better radical scavenger at basic
pH than neutral pH values.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ODKRITJE FOLNE KISLINE IN FOLATOV.....	3
2.2 FOLATI IN FOLNA KISLINA	4
2.2.1 Fizikalnokemijske lastnosti	6
2.2.1.1 Vpliv dejavnikov okolja na stabilnost folne kisline	9
2.2.1.1.1 Vpliv pH in temperature na stabilnost folne kisline	9
2.2.1.1.2 Vpliv svetlobe na stabilnost folne kisline.....	10
2.3 SINTEZA FOLNE KISLINE IN FOLATOV	13
2.3.1 Kemijska sinteza folne kisline	13
2.3.2 Sinteza folatov v rastlinah in mikroorganizmih	13
2.4 PRESNOVA FOLATOV	15
2.4.1 Biokemijska vloga.....	16
2.5 PRIPOROČENI DNEVNI VNOS.....	17
2.6 POMANJKANJE FOLATOV.....	19
2.7 PREHRANSKI VIR FOLATOV	20
2.7.1 Prehranski vir naravnih folatov.....	20
2.7.1.1 Obogatitev primarnih virov hrane s folati s pomočjo genske tehnologije.....	22
2.7.2 Prehranski vir sintetične folne kisline	23
2.8 TOKSIČNOST FOLNE KISLINE.....	24
2.9 FOLNA KISLINA KOT ANTOOKSIDANT	25
2.10 METODE DOLOČANJA FOLATOV.....	26

3	MATERIAL IN METODE.....	28
3.1	MATERIAL, OPREMA IN PRIPRAVA OSNOVNIH RAZTOPIN	28
3.1.1	Material	28
3.1.2	Laboratorijska oprema.....	29
3.1.3	Priprava osnovnih raztopin.....	30
3.1.3.1	Priprava 0,1 M raztopine NaOH.....	30
3.1.3.2	Priprava 10 mM raztopine folne kisline v 0,1 M NaOH	30
3.1.3.3	Priprava 500 µM raztopine folne kisline v 0,1 M NaOH	30
3.1.3.4	Priprava pufrskih raztopin	31
3.1.3.4.1	Priprava 2 % HCOOH s pH 2.....	31
3.1.3.4.2	Priprava CH ₃ COONa/CH ₃ COOH pufra s pH 4	31
3.1.3.4.3	Priprava TRIS-HCl pufrov s pH 7 in 9.....	31
3.1.3.5	Priprava ABTS ⁺ raztopine	31
3.1.3.6	Priprava mobilnih faz za HPLC-analizo.....	32
3.1.3.7	Priprava raztopin folnih kislin za HPLC-analizo	32
3.1.3.8	Priprava raztopin standardov za HPLC-analizo	32
3.2	METODE DELA.....	33
3.2.1	Določanje vpliva pH vrednosti in temperature na stabilnost folne kisline	33
3.2.2	Določanje vpliva svetlobe na stabilnost folne kisline	33
3.2.3	Določanje antioksidativne aktivnosti folne kisline z ABTS metodo	34
3.2.3.1	Priprava vzorcev za določanje antioksidativne aktivnosti folne kisline.....	34
3.2.4	Določanje folne kisline in njenih razgradnih produktov z metodo HPLC	35
3.2.4.1	Priprava raztopin vzorcev in standardov	35
3.2.4.2	Kromatografski pogoji in pogoji detekcije	35
4	REZULTATI	37
4.1	DOLOČANJE VPLIVA pH VREDNOSTI IN TEMPERATURE NA STABILNOST FOLNE KISLINE	37
4.2	DOLOČANJE VPLIVA DNEVNE SVETLOBE IN SVETLOBE ENERGIJSKO VARČNE SIJALKE NA STABILNOST FOLNE KISLINE	46
4.3	DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI FOLNE KISLINE Z ABTS METODO	50
4.4	DOLOČANJE FOLNE KISLINE IN NJENIH RAZGRADNIH PRODUKTOV S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)	52

5	RAZPRAVA IN SKLEPI	63
5.1	RAZPRAVA	63
5.2	SKLEPI	69
6	POVZETEK.....	70
7	VIRI	71

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Topnost folne kisline v pufrih z različnimi pH vrednostmi pri T = 37 °C (Younis in sod., 2009)	8
Preglednica 2: Referenčne vrednosti za vnos prehranskih folatov oz. priporočeni dnevni vnesi (PDV-RDA) za folate za zdrave posameznike (Referenčne vrednosti..., 2004; DGE, 2013).....	18
Preglednica 3: Vsebnost folatov v živilih (Combs, 2008: 357).....	21
Preglednica 4: Biološka vrednost folatov v živilih (Combs, 2008: 358).....	21
Preglednica 5: Uporabljene kemikalije.....	28
Preglednica 6: Gradient tekočinske kromatografije pri določanju razgradnih produktov folne kisline.	36
Preglednica 7: Spremembe absorbanc raztopin folnih kislin z različnimi pH vrednostmi v odvisnosti od izpostavljenosti svetlobi.	47
Preglednica 8: Spremljanje zmanjšanja absorbance radikala ABTS ⁺ pri raztopinah folnih kislin z različnimi vrednostmi pH oziroma v različnih topilih.	51
Preglednica 9: Vrednosti retencijskih časov in površin pri analiziranih 25 µM raztopinah s pH 2 v času t = 0 ter signalu pri 280 nm.	53
Preglednica 10: Vrednosti retencijskih časov in površin pri analiziranih 25 µM raztopinah s pH 4 v času t = 0 ter signalu pri 280 nm.	55
Preglednica 11: Vrednosti retencijskih časov in površin pri analiziranih 25 µM raztopinah s pH 7 v času t = 0 ter signalu pri 280 nm.	57
Preglednica 12: Vrednosti retencijskih časov in površin pri analiziranih 25 µM raztopinah s pH 9 v času t = 0 ter signalu pri 280 nm.	59
Preglednica 13: Površine kromatografskih vrhov za 25 µM raztopine folnih kislin v različnih pH v odvisnosti od časa ter signalu pri 280 nm.....	61

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura folne kisline in naravnih prehranskih folatov (Blom in sod., 2006).....	5
Slika 2: Kemijska struktura folne kisline in označevanje (Bonechi in sod., 2004).....	6
Slika 3: Redukcija folne kisline v 7,8-dihidrofolat (7,8-DHF) in aktivno obliko diastereoizomerni 6S-tetrahidrofolat (6S-THF) z encimom dihidrofolat reduktaza (DHFR); (Glu) glutamat (Bailey in Ayling, 2009).	6
Slika 4: Tavtomerni obliki folne kisline; laktam (leva) in laktim (desna). Označena so mesta treh amidnih vezi (1, 2, 3), na katerih lahko pride do hidrolize v kislih in alkalnih pogojih (Temple in sod., 1981).....	7
Slika 5: Strukturne formule folnih kislin v nevtralni, anionski, kationski in bi-kationski obliki (Tyagi in Penzkofer, 2010).....	7
Slika 6: Absorpcijski spekter raztopine folne kisline v fosfatnem pufru s soljo (PBS) s pH 7,4 (prirejeno po Steindal in sod., 2007).	8
Slika 7: Struktura pterin-6-karboksilne kisline (levo) in p-aminobenzoil-L-glutaminske kisline (desno), glavnih razgradnih produktov fotorazgradnje folne kisline v vodnih raztopinah (Akhtar in sod., 1999).	11
Slika 8: Strukturne formule folne kisline (FA), 6-formilpterina (FPT), p-aminobenzoil-L-glutaminske kisline (pABGA) in 6-karboksilpterina (CPT) ter shema fotorazgradnje folne kisline (Juzeniene in sod., 2013).	12
Slika 9: Biosinteza folatov v rastlinski celici, s strukturno formulo folata (levo spodaj) (Blancquaert in sod., 2014).....	14
Slika 10: Presnovne poti pri katerih sodelujejo folati (Thaler, 2014).	17
Slika 11: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm, 25 μM raztopin folnih kislin z različnimi pH (2, 4, 7, 9) ter 15 μM raztopin folnih kislin s pH 2 in 4 pri temperaturi 25 °C.....	38
Slika 12: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm, 25 μM raztopin folnih kislin z različnimi pH (2, 4, 7, 9) ter 15 μM raztopin folnih kislin s pH 2 in 4 pri temperaturi 35 °C.....	39
Slika 13: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm, 25 μM raztopin folnih kislin z različnimi pH (2, 4, 7, 9) ter 15 μM raztopin folnih kislin s pH 2 in 4 pri temperaturi 45 °C.....	40
Slika 14: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm, 25 μM raztopin folnih kislin z različnimi pH (2, 4, 7, 9) ter 15 μM raztopin folnih kislin s pH 2 in 4 pri temperaturi 55 °C.....	40

Slika 15: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm, 25 μM raztopin folnih kislin z različnimi pH (2, 4, 7, 9) pri temperaturi 65 °C.....	41
Slika 16: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm, 25 μM raztopin folnih kislin z različnimi pH (2, 4, 7, 9) pri temperaturi 75 °C.....	42
Slika 17: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm, 25 μM raztopin folnih kislin z različnimi pH (2, 4, 7, 9) pri temperaturi 85 °C.....	42
Slika 18: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm, 25 μM raztopin folnih kislin pri različnih temperaturah (25 °C, 35 °C, 45 °C, 55 °C, 65 °C, 75 °C in 85 °C) s pH 2.....	43
Slika 19: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm, 15 μM raztopin folnih kislin s pH 2 pri različnih temperaturah (25 °C, 35 °C, 45 °C in 55 °C).....	43
Slika 20: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm, 25 μM raztopin folnih kislin s pH 4 pri različnih temperaturah (25 °C, 35 °C, 45 °C, 55 °C, 65 °C, 75 °C in 85 °C).....	44
Slika 21: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm, 15 μM raztopin folnih kislin s pH 4 pri različnih temperaturah (25 °C, 35 °C, 45 °C in 55 °C).....	44
Slika 22: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm, 25 μM raztopin folnih kislin s pH 7 pri različnih temperaturah (25 °C, 35 °C, 45 °C, 55 °C, 65 °C, 75 °C in 85 °C).....	45
Slika 23: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm, 25 μM raztopin folnih kislin s pH 9 pri različnih temperaturah (25 °C, 35 °C, 45 °C, 55 °C, 65 °C, 75 °C in 85 °C).....	45
Slika 24: Stabilnost 15 μM raztopin folnih kislin z različnimi pH (2, 4, 7 in 9), izpostavljenih svetlobi energijsko varčne sijalke in dnevni svetlobi, v odvisnosti od časa pri temperaturi 25 °C pri valovni dolžini 285 nm.....	46
Slika 25: Stabilnost 15 μM raztopin folnih kislin v različnih pH (2, 4, 7 in 9), zaščitenih pred svetlobo energijsko varčne sijalke in dnevno svetlobo, v odvisnosti od časa pri temperaturi 25 °C pri valovni dolžini 285 nm.....	47
Slika 26: Absorpcijski spekter 15 μM raztopin folnih kislin s pH 2, izpostavljenih svetlobi energijsko varčne sijalke in dnevni svetlobi oziroma zaščitenih pred viri svetlobe, pri temperaturi 25 °C v času t = 0 in po 8 urah.....	48
Slika 27: Absorpcijski spekter 15 μM raztopin folnih kislin s pH 4, izpostavljenih svetlobi energijsko varčne sijalke in dnevni svetlobi oziroma zaščitenih pred viri svetlobe, pri temperaturi 25 °C v času t = 0 in po 8 urah.....	48

Slika 28: Absorpcijski spekter 15 µM raztopin folnih kislin s pH 7, izpostavljenih svetlobi energijsko varčne sijalke in dnevni svetlobi oziroma zaščitenih pred viri svetlobe, pri temperaturi 25 °C v času t = 0 in po 8 urah.....	49
Slika 29: Absorpcijski spekter 15 µM raztopin folnih kislin s pH 9, izpostavljenih svetlobi energijsko varčne sijalke in dnevni svetlobi oziroma zaščitenih pred viri svetlobe, pri temperaturi 25 °C v času t = 0 in po 8 urah.....	49
Slika 30: Spremljanje zmanjšanja absorbance radikala ABTS ⁺ (%) v raztopinah folnih kislin z različnimi pH vrednostmi.	51
Slika 31: HPLC kromatogram vzorca 25 µM raztopine folne kisline s pH 2 (2 % raztopina HCOOH s pH 2), kjer prevladuje kationska oblika folne kisline, v času t = 0 (1 = nečistoča; 2 = pABGA; 3 = FA; 4 = neidentificirani razgradni produkt).	53
Slika 32: HPLC kromatogram 25 µM raztopine standarda N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminske kisline s pH 2 (2 % raztopina HCOOH s pH 2) v času t = 0.	54
Slika 33: HPLC kromatogram 25 µM raztopine standarda pterin-6-karboksilne kisline s pH 2 (2 % raztopina HCOOH s pH 2) v času t = 0.	54
Slika 34: HPLC kromatogram 25 µM raztopine standarda pterojske kisline s pH 2 (2 % raztopina HCOOH s pH 2) v času t = 0.....	54
Slika 35: HPLC kromatogram vzorca 25 µM raztopine folne kisline s pH 4 (25 mM CH ₃ COONa/CH ₃ COOH s pH 4), kjer prevladuje kationska oblika folne kisline, v času t = 0.	55
Slika 36: HPLC kromatogram 25 µM raztopine standarda N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminske kisline s pH 4 (25 mM CH ₃ COONa/CH ₃ COOH s pH 4) v času t = 0.....	56
Slika 37: HPLC kromatogram 25 µM raztopine standarda pterin-6-karboksilne kisline s pH 4 (25 mM CH ₃ COONa/CH ₃ COOH s pH 4) v času t = 0.....	56
Slika 38: HPLC kromatogram 25 µM raztopine standarda pterojske kisline s pH 4 (25 mM CH ₃ COONa/CH ₃ COOH s pH 4) v času t = 0.....	56
Slika 39: HPLC kromatogram vzorca 25 µM raztopine folne kisline s pH 7 (25 mM TRIS-HCl pufer s pH 7), kjer je folna kislina v nevtralni obliki, v času t = 0.	57
Slika 40: HPLC kromatogram 25 µM raztopine standarda N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminske kisline s pH 7 (25 mM TRIS-HCl pufer s pH 7) v času t = 0.	58
Slika 41: HPLC kromatogram 25 µM raztopine standarda pterin-6-karboksilne kisline s pH 7 (25 mM TRIS-HCl pufer s pH 7) v času t = 0.	58
Slika 42: HPLC kromatogram 25 µM raztopine standarda pterojske kisline s pH 7 (25 mM TRIS-HCl pufer s pH 7) v času t = 0.	58
Slika 43: HPLC kromatogram vzorca 25 µM raztopine folne kisline s pH 9 (25 mM TRIS-HCl pufer s pH 9), kjer prevladuje anionska oblika folne kisline, v času t = 0.....	59

Slika 44: HPLC kromatogram 25 µM raztopine standarda N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminske kisline s pH 9 (25 mM TRIS-HCl pufer s pH 9) v času t = 0.....	60
Slika 45: HPLC kromatogram 25 µM raztopine standarda pterin-6-karboksilne kisline s pH 9 (25 mM TRIS-HCl pufer s pH 9) v času t = 0.....	60
Slika 46: HPLC kromatogram 25 µM raztopine standarda pterojske kisline s pH 9 (25 mM TRIS-HCl pufer s pH 9) v času t = 0.....	60
Slika 47: Površine kromatografskih vrhov za 25 µM raztopine folnih kislin v različnih pH v odvisnosti od časa ter signalu pri 280 nm.....	62

KAZALO PRILOG

Priloga A: Absorpcijski spektri 25 µM raztopin folnih kislin s pH 2 v temperaturnem območju od 25 °C do 85 °C

Priloga B: Absorpcijski spektri 15 µM raztopin folnih kislin s pH 2 v temperaturnem območju od 25 °C do 55 °C

Priloga C: Absorpcijski spektri 25 µM raztopin folnih kislin s pH 4 v temperaturnem območju od 25 °C do 85 °C

Priloga D: Absorpcijski spektri 15 µM raztopin folnih kislin s pH 4 v temperaturnem območju od 25 °C do 55 °C

Priloga E: Absorpcijski spektri 25 µM raztopin folnih kislin s pH 7 v temperaturnem območju od 25 °C do 85 °C

Priloga F: Absorpcijski spektri 25 µM raztopin folnih kislin s pH 9 v temperaturnem območju od 25 °C do 85 °C

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AA	antioksidativna aktivnost
ABTS	2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina
AI	zadostni dnevni vnos (angl. Adequate Intake)
DACH	Referenčne vrednosti za vnos hrani nemškega, avstrijskega in švicarskega društva za prehrano (nem. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr)
DAD	detektor z nizom diod
DFE	prehranski folatni ekvivalent (angl. Dietary Folate Equivalent)
DHF	dihidrofolat
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. Deoxyribonucleic acid)
EFSA	Evropska agencija za varno hrano (angl. European Food Safety Authority)
EU	Evropska Unija
FA	folna kislina (angl. Folic acid)
FPT	6-formilpterin
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. High Performance Liquid chromatography)
K_a	konstanta disociacije kislina (angl. acid dissociation constant)
NTD	okvare nevralne cevi (angl. Neural Tube Defect)
PA	pterojska kislina (angl. Pteroxic Acid)
PABA	para-aminobenzojska kislina (angl. p-aminobenzoic acid)
pABGA	p-aminobenzoil-L-glutaminska kislina ali N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminska kislina (angl. p-aminobenzoyl-L-glutamic acid)
PCA	pterin-6-karboksilna kislina (angl. Pterine-6-carboxylic acid)
PDV	priporočeni dnevni vnos
RCF	relativna centrifugalna sila (angl. Relative Centrifugal Force)
RDA	priporočen dnevni vnos (angl. Recommended Daily Allowance)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. Ribonucleic Acid)
SCF	Znanstveni odbor za hrano (angl. Scientific Committee on Food)
THF	tetrahidrofolat
UV	ultravijolična svetloba
UL	dopustna zgornja meja vnosa (angl. Tolerable Upper Intake Level)
VIS	vidna svetloba

1 UVOD

Vitamini so heterogena skupina organskih spojin, ki so esencialnega pomena za zagotavljanje optimalnih procesov presnove in vzdrževanje normalnih celičnih funkcij v telesu. So aktivne sestavine prehrane, potrebni v majhnih količinah ter sodelujejo v številnih pomembnih biokemijskih in energetskih poteh (Lešková in sod., 2006). V prehrani ljudi poznamo trinajst vitaminov, ki so glede na njihovo topnost razvrščeni v dve skupini. Številni vodotopni vitamini skupine B služijo kot koencimi encimom, katerih funkcija je razgradnja hranil za proizvodnjo energije potrebne organizmu (Ball, 2006). Eden izmed njih je tudi folna kislina, oblika vodotopnega folata oziroma vitamina B₉. Je stabilna, sintetična in oksidirana oblika, ki se uporablja v prehranskih dopolnilih ter obogatitvi živil v humani in animalni prehrani. Sodeluje v pomembnih funkcijah celične presnove kot so podvojevanje DNA, popravljanje in metilacija ter sinteza nukleotidov, vitaminov in nekaterih aminokislin (Combs, 2008). Pomanjkanje folatov ima lahko resne posledice, kot so megaloblastna anemija, rak debelega črevesa, bolezni srca in ožilja ter okvare nevralne cevi (NTD). Folna kislina je trenutno, predvsem zaradi svoje uveljavljene vloge pri preprečevanju napak nevralne cevi pri razvoju zarodka, eden izmed bolj preučevanih vitaminov. Opravljene so bile številne študije z namenom ugotovitve vpliva različnih zunanjih dejavnikov kot so pH, temperatura, svetloba, elementi kovin, razgradni encimi, kisik, voda in čas na stabilnost različnih oblik folatov in folne kisline.

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je določiti:

- vpliv pH topila v območju med 2 in 9 na stabilnost folne kisline,
- vpliv temperature v območju med 25 °C in 85 °C na stabilnost folne kisline,
- vpliv svetlobe (hladna bela svetloba energijsko varčne sijalke in dnevna svetloba) na stabilnost folne kisline,
- antioksidativno aktivnost folne kisline.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo, da imajo različne vrednosti pH topila vpliv na stabilnost folne kisline, predvsem zaradi nizke topnosti folne kisline v kislem oziroma pri pH nižjem od 5 (pH 2 in pH 4).

Predpostavili smo, da je folna kislina občutljiva na povišanje temperature v območju med 25 °C in 85 °C.

Predpostavili smo, da so raztopine folne kisline v pH območju med 2 in 9 občutljive na izpostavljenost svetlobi energijsko varčne sijalke in dnevni svetlobi, ter se razgradijo v neaktivne produkte.

Predpostavili smo, da ima folna kislina nizko antioksidativno aktivnosti, saj je molekula popolnoma oksidirana.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ODKRITJE FOLNE KISLINE IN FOLATOV

Prvo opažanje, ki je privedlo do identifikacije folatov kot pomembnih hranil, je izvedla Lucy Wills leta 1931. Preko študij na nosečnicah v Bombaju (Mumbaj, Indija) je ugotovila, da lahko kvasni ekstrakt, "marmite", učinkovito zdravi makrocitno anemijo, ki je bila pogosto opažena med nosečnostjo na tem območju (Wills, 1931). Dr. Lucy Wills in njena skupina so ugotovili, da do te vrste anemij pride tudi pri opicah, ki so krmljene z enako prehrano kot ženske v Bombaju, ter da peroralna aplikacija kvasa ali jeter lahko ozdravi perniciozno in makrocitno anemijo pri obeh, opicah in človeku. Znano je bilo, da je kvasni ekstrakt bogat vir vitaminov B (Wills, 1931). Antianemijska aktivnost učinkovine je tako postala znana kot faktor Wills (Roe, 1978).

Raziskovalci iz Evrope in Amerike so zaradi prehranskega pomanjkanja nadaljevali s študijami anemij na istem faktorju. Ta je bil sicer poznan pod različnimi imeni, a z istim zdravilnim učinkom pri ljudeh, opicah, piščancih, podganah, morskih prašičkih in tudi njegovim vplivom na pospeševanje rasti pri nekaterih mikroorganizmih. Zato je v starejši literaturi mogoče najti imena, kot so vitamin M, faktor U, vitamin B_c, vitamin B₉, eluat faktor, *L-casei* faktor itd. (Hazra in Tripathi, 2001).

Leta 1941 je znanstvenik Mitchell s sodelavci iz štirih ton špinačnih listov izoliral kislo snov, ki je bila potrebna za rast mlečno kislinske bakterije *Lactobacillus casei* (*L. casei*) in jo poimenoval folna kislina. Ime je izpeljanka iz *folium*, latinske besede za list (Mitchell in sod., 1941, 1944). V istem letu je Robert Stokstad v raziskovalnem centru začel z delom na ekstraktu iz jeter. Dve leti kasneje mu je iz tega ekstrakta uspelo izolirati kristale rastnega faktorja za *L. casei*, spojino z antianemijskim učinkom (Stokstad, 1943).

Sčasoma se je izkazalo, da so različni faktorji, potrebni za rast mikroorganizmov, iste snovi, ko je leta 1945 Angier-jeva skupina sintetizirala spojino, identično *L. casei* faktorju iz jeter. Določili so tudi njegovo kemijsko strukturo oziroma strukturo folne kisline ter jo poimenovali pteroilglutaminska kislina (Angier in sod., 1946). Prva sinteza folne kisline je bila izvedena v Lederle Laboratories s kondenzacijo 2,4,5-triamino-6-hidroksipirimidina, 2,3-dibromopropionaldehyda in p-aminobenzoil-L-glutaminske kisline. Skupni izkoristek reakcije in čistost sintetizirane folne kisline sta bila zelo nizka (Waller in sod., 1948). Sintetična folna kislina je bila nato uporabljena za zdravljenje anemije. Tudi Lucy Wills je z njo uspešno zdravila svoje paciente (Roe, 1978).

Ugotovili so, da je pteroilglutaminska kislina dejansko snov, ki je bila v jetrih imenovana kot faktor U, vitamin M, vitamin B_c in *L. casei* faktor. Prav tako so ugotovili, da je *L. casei* faktor iz kvasa derivat diglutamil pteroildiglutaminske kisline, ter da je vitamin B_c iz jeter derivat heksaglutamil pteroilheksaglutaminske kisline. Za ostale faktorje so naknadno

ugotovili, da so metaboliti pteroilglutaminske kisline, vključeni v metabolizmu spojin z enim ogljikovim atomom (Stokstad, 1943; Angier in sod., 1946, 1948; Waller in sod., 1948; Combs, 2008).

V obdobju 50-ih in 60-ih let prejšnjega stoletja so znanstveniki odkrili biokemijske mehanizme delovanja folatov in pomanjkanje folatov prvič povezali z napako nevralne cevi. V poznih 1990-ih so ameriški znanstveniki spoznali, da ljudje kljub prisotnosti folatov v živilih in dopolnilih, ne pokrijejo dnevnih potreb po folatih, zato so v ZDA uvedli program obogatitve živil s folno kislino (Lanska, 2010). Folati in folna kislina so tako postali eni izmed bolj preučevanih vitaminov v humani prehrani v zadnjih dveh desetletjih, saj je pomanjkanje folatov povezano s številnimi boleznimi, vključno z megaloblastno anemijo, prirojenimi anomalijami pri dojenčkih, kardiovaskularno boleznijo, Alzheimerjevo boleznijo in rakom (Shrestha in sod., 2012).

2.2 FOLATI IN FOLNA KISLINA

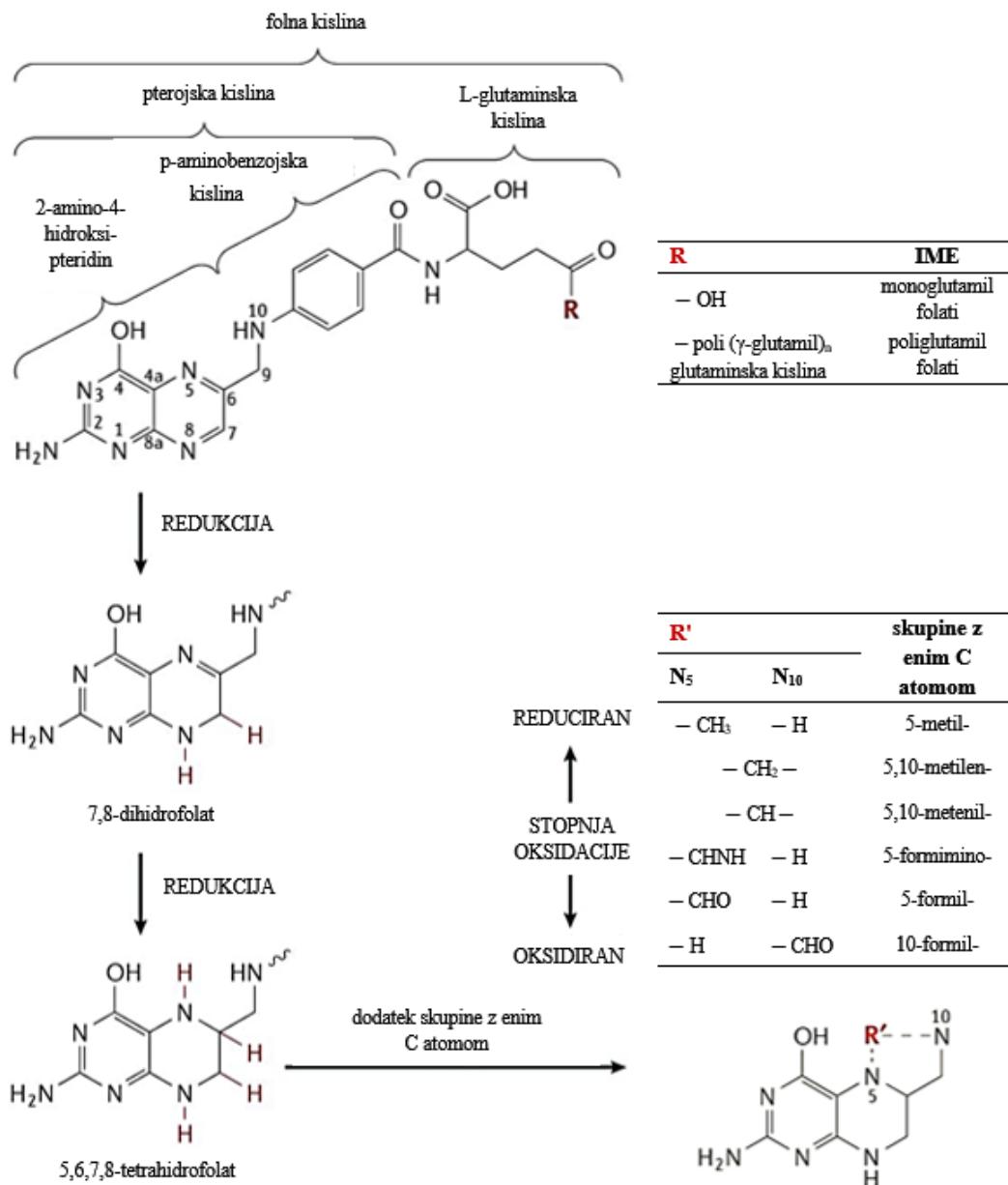
Izraza "folna kislina" in "derivati folatov" sta pogosto zamenljiva. Folna kislina se nanaša na sintetično, popolnoma oksidirano spojino, medtem ko so ostali derivati folatov znani kot folati (Bender, 2003). Izraz derivati folatov se uporablja za opisovanje več kot 150 sorodnih spojin (Ball, 1998).

V skladu s priporočili Skupne komisije IUPAC-IUB o biokemijski nomenklaturi se izraz folat uporablja za skupino heterocikličnih spojin, ki vsebujejo skelet pterojske kisline, konjugirane z enim ali več L-glutamatov (Cornish-Bowden, 1987). Folna kislina ima vezan le en ostanek glutaminske kisline in je imenovana pteroilglutaminska kislina (Eitenmiller in sod., 2008).

Folat je splošni izraz za vodotopni vitamin B₉, ki se nahaja v naravnih sestavinah. Sestavljeni so iz treh strukturnih delov, ki posamezno nimajo nobene vitaminske aktivnosti (Vora in sod., 2002). Osnovna struktura folatov sestoji iz pteridinskega obroča, ki je preko metilenskega mostu (-CH₂-) vezan na para-aminobenzojsko kislino (PABA), ki je povezana z γ-peptidno vezjo z enim ali več ostanki L-glutaminske kisline (Delchier in sod., 2016).

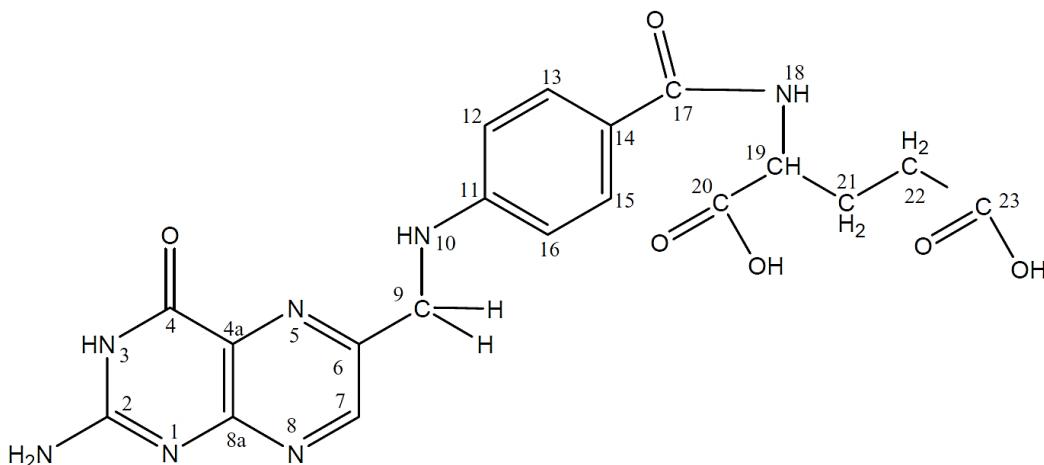
Folati se razlikujejo v stopnji reducirnosti pteridinskega obroča (oksidacijskem stanju molekule), vezanih substituentih na pteridinskem obroču ter številu molekul glutaminske kisline oziroma dolžini glutamatne verige (slika 1) (Delchier in sod., 2016). Pteridinski obroč folatov se v naravi nahaja v reducirani obliki, in sicer kot 7,8-dihidrofolat (DHF) ali 5,6,7,8-tetrahidrofolat (THF), medtem ko je v molekuli folne kisline v popolnoma oksidirani obliki. Monoglutamatna oblika vitamina ima vezano le eno molekulo glutaminske kisline. Z vezavo dodatnih ostankov glutamata, med seboj povezanih z γ-peptidno vezjo, nastane glutamatna

veriga (Bailey, 2007). Pri večini naravno prisotnih folatov število glutamatnih enot v stranski verigi variira med 1 in 11 (Herbert, 1999).



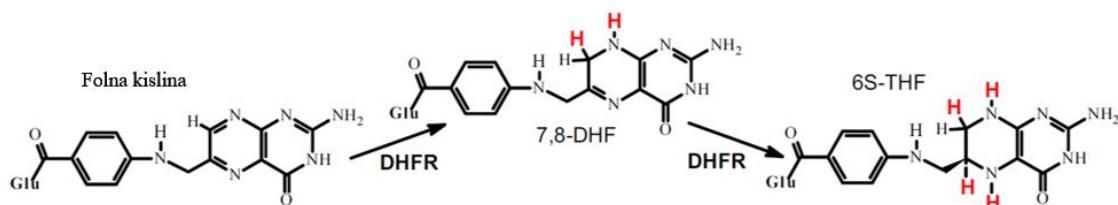
Slika 1: Struktura folne kisline in naravnih prehranskih folatov (Blom in sod., 2006).

Folna kislina je sestavljena iz treh enot (slika 2): L-glutaminske kisline, ki je preko α -amino skupine povezana s karboksilno skupino para-aminobenzojske kisline (PABA), ki je vezana na 2-amino-4-hidroksipteridin (Gliszczynska-Świgło, 2007).



Slika 2: Kemijska struktura folne kisline in označevanje (Bonechi in sod., 2004).

Folna kislina se preko encimskih transformacij *in vivo* pretvori v 7,8-dihidrofolat, v katerem je ena dvojna vez pteridinskega obroča reducirana (slika 3). DHF se nato reducira v 5,6,7,8-tetrahidrofolat (THF), ki se s pomočjo encima dihidrofolat reduktaze pretvori v 5-metiltetrahidrofolat (5-MTHF) (Smith in sod., 2008). Reducirane oblike folne kisline so kofaktorji pri prenosu in uporabi skupin z enim atomom ogljika; sodelujejo v procesu biosinteze purina, pirimidina in DNA. Poleg tega imajo ključno vlogo pri regeneraciji metionina (Stanger, 2002).



Slika 3: Redukcija folne kisline v 7,8-dihidrofolat (7,8-DHF) in aktivno obliko diastereoizomerni 6S-tetrahidrofolat (6S-THF) z encimom dihidrofolat reduktaza (DHFR); (Glu) glutamat (Bailey in Ayling, 2009).

2.2.1 Fizikalnokemijske lastnosti

Folna kislina je sintetična spojina v L-izomerni obliki, ki postane biološko aktivna po redukciji z encimom dihidrofolat reduktaza (Hazra in Tripathi, 2001).

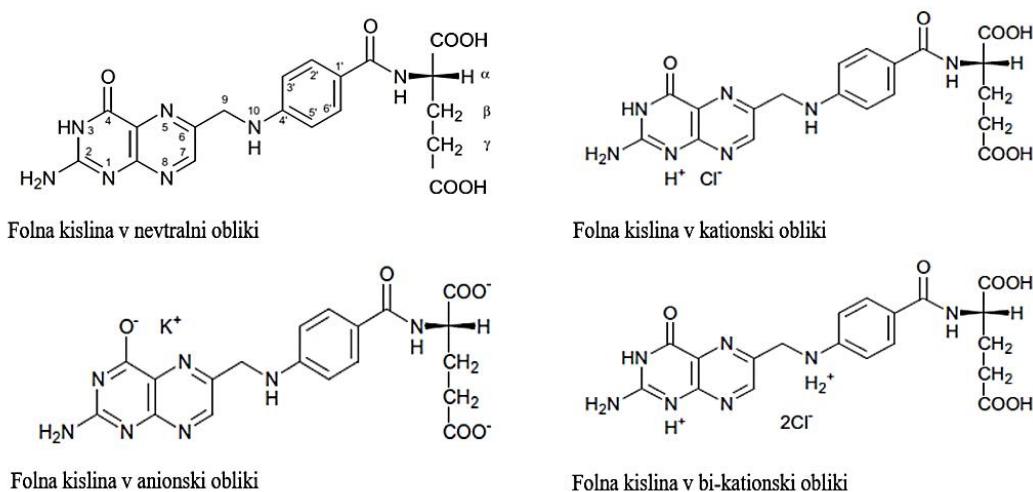
Kemijsko ime folne kisline po IUPAC-u je N-[4-[(2-amino-1,4-dihidro-4-okso-6-pteridinil-metil)amino]benzoi]-L-glutaminska kislina, z molekulsko formulo C₁₉H₁₉N₇O₆ in molsko maso 441,40 g/mol. Kemijsko čista je v obliki rumeno do oranžno rjavih kristalnih-lističev, ki na zraku potemnijo, ker je spojina higroskopična. Je brez vonja in okusa. Se ne tali, potemni in zogleni pri okoli 250 °C (Bates, 2003).

Folna kislina obstaja v laktam in laktim tautomerni obliki (slika 4). Laktim oblika ima pomembno vlogo v reakcijah z oksidacijskimi radikali oziroma pri antioksidativni aktivnosti folne kisline (Joshi in sod., 2001). Folna kislina in folati imajo večjo težnjo za laktam obliko pteridinskega obroča. Fizikalne in biološke lastnosti so odvisne od tautomerne oblike (Panijpan, 1979). Molekula folne kisline ima tri amidne vezi, ki jih lahko hidroliziramo v kislih ali alkalnih pogojih. Vezi 2 in 3 v aromatskem obroču sta stabilnejši od vezi 1 (slika 4).



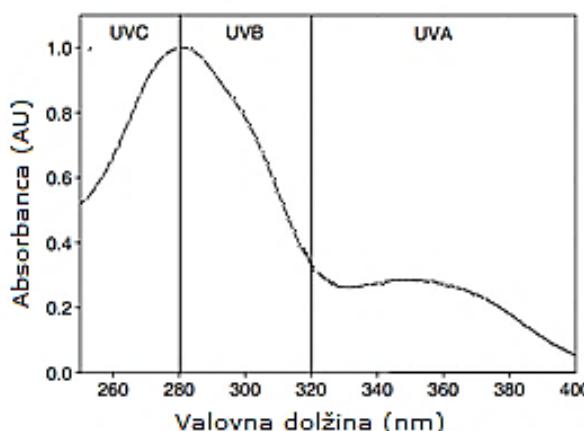
Slika 4: Tautomerni obliki folne kisline; laktam (leva) in laktim (desna). Označena so mesta treh amidnih vezi (1, 2, 3), na katerih lahko pride do hidrolize v kislih in alkalnih pogojih (Temple in sod., 1981).

Folna kislina se nahaja v različnih ionskih stanjih, ki so odvisna od pH vodnih raztopin. Strukturne formule folne kisline v nevtralni, anionski, kationski in bi-kationski obliki so prikazane na sliki 5 (Tyagi in Penzkofer, 2010). Disociacijske konstante folne kisline so pK_{a1} ($N(1)$) = 2,35; pK_{a2} ($N(10)$) = 0,20; pK_{a3} ($N(5)$) < - 1,5 ter pK_{a4} ($N(3)$) = 8,3. pK_a vrednosti α -karboksilne skupine in γ -karboksilne skupine molekule glutaminske kisline še niso bile določene (Poe, 1977). Najverjetneje so podobne vrednostim pK_a glutaminske kisline v vodnih raztopinah ($pK_{a5} = 2,1$ in $pK_{a6} = 4,07$) (Sigma-Aldrich, 2016b).



Slika 5: Strukturne formule folnih kislin v nevtralni, anionski, kationski in bi-kationski obliki (Tyagi in Penzkofer, 2010).

Raztopina folne kisline v 0,1 M NaOH ima absorpcijske maksimume pri valovnih dolžinah 256 nm, 283 nm in 365 nm (Bates, 2003).



Slika 6: Absorpcijski spekter raztopine folne kisline v fosfatnem pufru s soljo (PBS) s pH 7,4 (prirejeno po Steindal in sod., 2007).

Čeprav je folna kislina uvrščena med vodotopne vitamine, je v vodi zelo slabo topna (0,01 mg/mL pri 0 °C; 1,6 mg/L pri 25 °C) (Sigma-Aldrich, 2016a). V hladni vodi je njen topnost 1 - 10 mg/L, v vreli vodi se poveča za 1 % (The Merck Index, 2006). Vodne raztopine folne kisline so občutljive na segrevanje in hitro razpadajo pod vplivom svetlobe (Sigma-Aldrich, 2016a). Raztopine je potrebno hraniti na hladnjem, zaščitene pred svetlobo (Chango, 2013). Topnost pri pH 10 je več kot 100-krat večja od topnosti pri pH 1 (preglednica 1) (Younis in sod., 2009). Folna kislina je topna in stabilna v razredčenih alkalnih raztopinah. Topnost v 1 M raztopini NaOH znaša 50 mg/mL (Sigma-Aldrich, 2016a). Folna kislina je topna tudi v vroči razredčeni HCl in H₂SO₄ (The Merck Index, 2006), vendar povečanje koncentracije kisline in naraščanje temperature pospešuje razgradnjo (Bates, 2006). V kislem mediju se prav tako raztopi, vendar je nestabilna (Poe, 1977; Akhtar in sod., 1999; Wu in sod., 2010).

Preglednica 1: Topnost folne kisline v pufrih z različnimi pH vrednostmi pri T = 37 °C (Younis in sod., 2009).

pH	Topnost folne kisline (mg/mL)	RSD*
1	0.029	4.02
3	0.840	1.66
4	1.050	5.33
7	5.330	0.77
10	19.47	2.84

* RSD = relativna standardna deviacija (natančnost metode)

Slabo topna je v metanolu, bistveno manj v etanolu in butanolu. Netopna je v acetonu, kloroformu, dietil etru in benzenu (The Merck Index, 2006).

Topnost dinatrijeve soli folne kisline v vodi, ki je komercialno dostopna oblika, znaša 1,5 g/100 mL pri 0 °C (34,0 nmol/L) (Herbert, 1999).

2.2.1.1 Vpliv dejavnikov okolja na stabilnost folne kisline

Folati in folna kislina so kompleksne molekule, ki so kljub nedavnemu analitičnemu napredku in zastopanosti v hrani, še vedno slabo poznani, s številnimi nejasnostmi glede njihovih mehanizmov razgradnje in kinetike. Različni faktorji imajo pomemben vpliv na razgradnjo v pufrih in modelnih sistemih, zlasti prisotnost kisika, svetlobe, pH, temperature in reducentov. Oksidacija folatov povzroči cepitev C₉-N₁₀ vezi, pri čemer se pteridinski obroč odcepi od para-aminobenzoilglutamata, kar ima za posledico izgubo vitaminske aktivnosti (Delchier in sod., 2016). Obstajajo precejšnje razlike v stabilnosti različnih oblik folatov. Folna kislina ima večjo stabilnost kot reducirani folati ali 5-formil-THF in stabilnost pada v smeri 5-metil-THF > 10-formil-THF > THF (Forssén in sod., 2000).

Številne študije so poleg visoke stabilnosti čiste sintetične folne kisline v skladu z običajnimi skladiščnimi pogoji pokazale tudi sprejemljivo stabilnost dodane folne kisline v pomarančnem soku, obogatenem kruhu, vitaminsko-mineralnih dopolnilih, obogateni moki in žitih, ter testeninah med skladiščenjem in peko, kot tudi v visoki vlažnosti okolja (Albalá-Hurtado in sod., 2000; Gujska in Majewska, 2005; Jedlička in Klimeš, 2005; Ball, 2006; Lešková in sod., 2006; Öhrvik in Witthöft, 2008; Cheung in sod., 2009). Po obdelavi so poročali o sprejemljivi do 20 % povprečni izgubi dodane folne kisline.

2.2.1.1.1 Vpliv pH in temperature na stabilnost folne kisline

Večina opravljenih študij kinetike razgradnje folne kisline je bila izvedena v temperaturnem območju med RT (room temperature) in 100 °C (Paine-Wilson in Chen, 1979; Nguyen in sod., 2003) ter celo do T = 800 °C (Vora in sod., 2002). Ugotovili so, da kinetika razgradnje sledi reakcijam prvega reda. Kristalinična folna kislina ima precejšno stabilnost med termično obdelavo pri temperaturah do 100 °C (O'Briain in sod., 1975; Paine-Wilson in Chen, 1979; Arcot in Shrestha, 2005). Identifikacija razgradnih produktov z uporabo različnih analiznih metod, kot so infrardeča spektroskopija (IR), masna spektroskopija (MS) in rentgenska difrakcija (XRD) so pokazale, da se od strukture folne kisline prva loči komponenta glutaminske kisline pri približno 180 °C. Pri še višji temperaturi, 195 °C, se sočasno odcepita pterin in p-aminobenzojska kislina (PABA). Kristalinična folna kislina postane amorfna masa pri 349 °C (Vora in sod., 2002).

Folna kislina je občutljiva za cepitev vezi v kislih medijih in pri visokih temperaturah. Hitrost in stopnja razgradnje sta odvisni od pH medija, vrste pufra in sestave živila (Arcot in Shrestha, 2005). Folati in folna kislina so stabilni v alkalnem ali nevtralnem okolju, manj stabilni v kislem, še posebej pri pH nižjem od 5 (Paine-Wilson in Chen, 1979; Ball, 1998).

V nevtralnih in alkalnih pogojih ima folna kislina višjo topnost in stabilnost v raztopinah alkalijskih hidroksidov ter karbonatov, kot tudi v številnih organskih topilih (The Merck

Index, 2006). Ugotovili so, da je folna kislina v vodnih raztopinah s pH v območju med 5 in 12 pri 100 °C stabilna 10 ur, če je zaščitena pred svetlobo (Arcot in Shrestha, 2005).

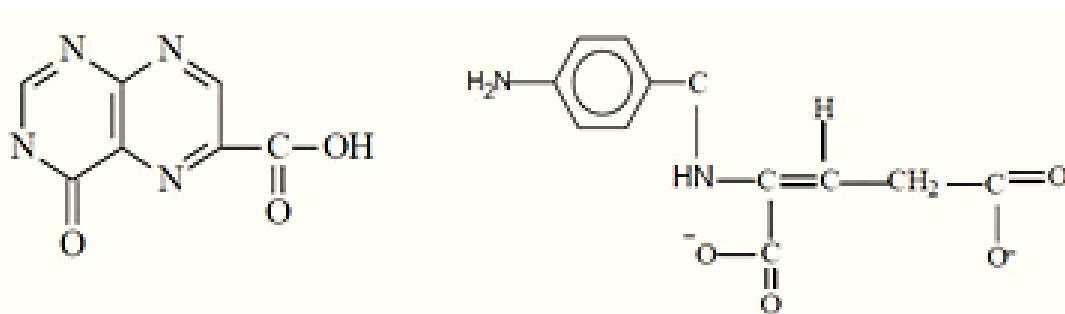
Stabilnost folne kisline je odvisna od pH topila (Delchier in sod., 2014). Produkti hidrolize folne kisline v kislem mediju so, ob prisotnosti raztopljenega kisika, p-aminobenzoilglutaminska kislina (pABGA), pterin-6-karboksilna kislina (PCA) in 6-metylpterin (Saxby in sod., 1983; Ball, 1998; Papastoyiannidis in sod., 2006). Prav tako je stabilna pri segrevanju na 85 °C pri pH 5 in 7, v anaerobnih pogojih in kombinaciji s parcialnim tlakom kisika 40 kPa (Delchier in sod., 2014).

2.2.1.1.2 Vpliv svetlobe na stabilnost folne kisline

Folna kislina se v vodnih raztopinah ob prisotnosti sončne, ultravijolične in vidne svetlobe razgradi v dva glavna produkta p-aminobenzoil-L-glutaminsko kislino (pABGA) in pterin-6-karboksilno kislino (PCA), ter p-aminobenzojsko kislino (PABA) v sledovih (Akhtar in sod., 1999). Fotorazgradnja folne kisline je bila večinoma preučevana ob izpostavljenosti UV svetlobi. Tako kot pri študijah toplotne obdelave ima pH vpliv tudi na razgradnjo folne kisline po izpostavitvi UV svetlobi. Stopnja fotorazgradnje folne kisline v kislem mediju je večja kot v alkalnem, vendar je relativno stabilna v temnih in suhih pogojih (Akhtar in sod., 2003). UVA in UVB svetloba v strukturi folne kisline povzročita cepitev vezi C₉-N₁₀, kar vodi do sprememb v spektralnih lastnostih raztopin (Off in sod., 2005). Pri tem nastaneta p-aminobenzoil-L-glutaminska kislina (pABGA) in pterin-6-karboksilna kislina (PCA), ki ločeni od prvotne spojine nimata nobene vitaminske aktivnosti (Ball, 1998; Akhtar in sod., 2003). Zato je bistvenega pomena, da sta priprava in shranjevanje vseh vzorcev folatov pod zmanjšano intenzivnostjo osvetlitve.

Pri identifikaciji fotoproductov se lahko uporablja HPLC (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti) ter ostale kromatografske in spektroskopske metode. Folna kislina se razgradi v različne razgradne produkte, ki so odvisni od mesta cepitve v molekuli folne kisline in vključujejo predvsem pterin-6-karboksilno kislino (PCA), p-aminobenzoil-L-glutaminsko kislino (pABGA), p-aminobenzojsko kislino (PABA), pterojsko kislino (PA) in glutaminsko kislino (Glu).

Glede produktov, ki nastanejo pri fotorazgradnji, so poročila precej skladna. Akhtar in sod. (2003) so identificirali pterin-6-karboksilno kislino in p-aminobenzoil-L-glutaminsko kislino (slika 7). Predpostavili so mehanizem reakcije pri razgradnji v kislih in alkalnih pogojih. Folna kislina po obsevanju z UV svetlogo oksidira, kar pomeni dehidrogenacijo na vezi C₉-N₁₀ in nastanek enamina, ki je bolj nagnjeni k hidrolizi v kislem kot v alkalnem mediju.

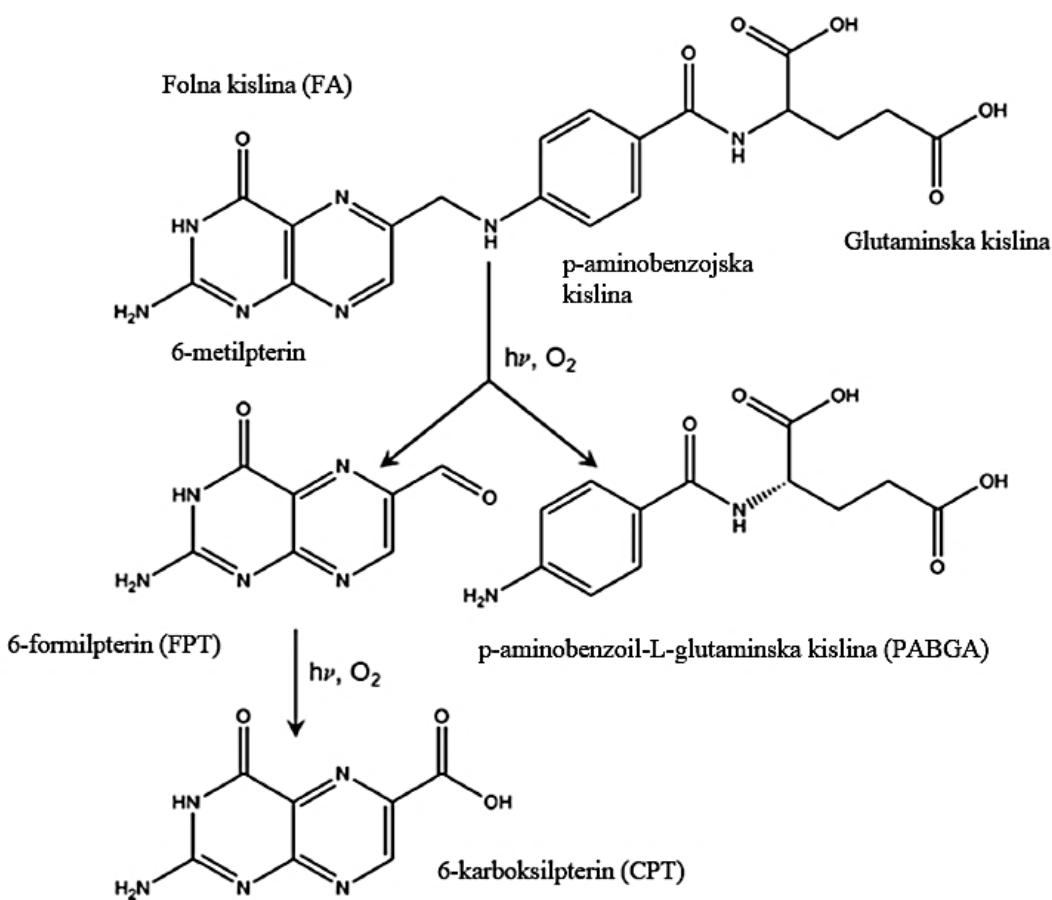


Slika 7: Struktura pterin-6-karboksilne kisline (levo) in p-aminobenzoil-L-glutaminske kisline (desno), glavnih razgradnih produktov fotorazgradnje folne kisline v vodnih raztopinah (Akhtar in sod., 1999).

Številni avtorji so določili enake končne razgradne produkte kot Akhtar in sod. (2003), vendar so poleg pABGA ugotovili dodatni vmesni 6-formilpterin (FPT) (slika 8). Nadaljevanje UV sevanja povzroči fotooksidacijo skupine 6-formil v 6-formilpterinu in s tem nastanek PCA. Oba fotoproducta, FPT in PCA, lahko delujeta kot senziterja v procesu fotorazgradnje folne kisline (Thomas in sod., 2000; Off in sod., 2005; Vorobey in sod., 2006).

Znano je, da so produkti fotorazgradnje folne kisline vzrok poškodb v DNA molekuli, kadar je izpostavljena UV sevanju. Fototoksični produkt folne kisline je pterin-6-karboksilna kislina (PCA) (Hirakawa in sod., 2003). Fotorazgradnja je odvisna od koncentracije, saj nastali pterinski fotoproducti še dodatno pospešijo razgradnjo folne kisline ob izpostavljenosti UV svetlobi (Off in sod., 2005).

Oksidacija folne kisline se pojavi v prisotnosti svetlobe (fotooksidacija). Večina poskusov o katerih so poročali v literaturi vključuje obsevanje folne kisline z UVA svetlobo, najpogosteje pri 350 nm. Folna kislina je fotostabilna v kislih in alkalnih raztopinah v odsotnosti kisika. Produkta oksidativne cepitve folne kisline v kisli raztopini sta pABGA in pterin (6-formilpterin, ki se z nadaljnjo oksidacijo preoblikuje v 6-karboksipterin) (Thomas in sod., 2000; Dántola in sod., 2010). Fotooksidacija je avtokatalitična reakcija kjer 6-formilpterin deluje kot katalizator za nadaljnjo oksidacijo folne kisline (Thomas in sod., 2002a; Dántola in sod., 2010). Ostali preučevani fotosenziterji vključujejo tudi B-vitamin riboflavin in ostale nekonjugirane pterine (npr. 6-metilpterin) (Akhtar in sod., 1997; Dántola in sod., 2010).



Slika 8: Strukturne formule folne kisline (FA), 6-formilpterina (FPT), p-aminobenzoyl-L-glutaminske kisline (pABGA) in 6-karboksilpterina (CPT) ter shema fotorazgradnje folne kisline (Juženiene in sod., 2013).

Povezava med izpostavljenostjo svetlobe in prisotnostjo kisika je bila dokazana v številnih raziskovalnih skupinah. Scheindlin in sod. (1952) so poročali o zmanjšani stopnji razgradnje, če je bil kisik nadomeščen z dušikom. Thomas in sod. (2000) so ugotovili stabilnost folne kisline, obsevane s svetlobo pri valovni dolžini 350 nm v odsotnosti kisika. Stabilnost folne kisline na UVA svetlobo v anaerobnih pogojih potrjujejo tudi Dántola in sod. (2010). V nekaterih študijah so ugotovili, da pride do razgradnje folne kisline zaradi svetlobe ob prisotnosti raztopljenega kisika. Odstranitev kisika z žveplovim dioksidom je zmanjšala stopnjo oksidacije folne kisline v prisotnosti svetlobe (Thomas in sod., 2002b). Večina avtorjev je poročala o reakcijski kinetiki prvega reda, nekateri so ugotovili tudi reakcije drugega reda (Delchier in sod., 2016).

2.3 SINTEZA FOLNE KISLINE IN FOLATOV

2.3.1 Kemijska sinteza folne kisline

Sinteza pteroilglutaminske kisline poteka v več stopnjah. Najprej s kondenzacijo gvanidina z etil cianoacetatom dobimo pirimidinski obroč. Sledi reakcija med p-aminobenzoilglutaminsko kislino, 2,4,5-triamino-6-hidroksipirimidinom in α,β -dibromopropionaldehidom, ali reakcija med 2,4,5-triamino-6-hidroksipirimidinom z piridinom, α,β -dibromopropionaldehidom, kalijevim jodidom in p-aminobenzoilglutaminsko kislino. Pteroilglutaminska kislina ima le en asimetrični center, ki je v molekuli glutaminske kisline (L oblika), vendar se po redukciji pojavi drugi asimetrični center na ogljiku 6 in tako se pri kemijski sintezi proizvajata D in L oblika. Naravni produkt je v L-konfiguraciji (Bates, 2003). Folna kislina ima samo en kiralni center v svojem glutamatnem ostanku in jo je zato lažje sintetizirati kot diastereoizomerni 6S-THF (Bailey in Ayling, 2009).

Kemijska sinteza v industrijskem merilu obsega kondenzacijo treh komponent, p-amino-L-glutaminske kisline z 2,3-dibromopropionaldehidom in 2,4,5-triamino-6-hidroksipirimidin/HCl v alkalnem mediju. Skupni izkoristek folne kisline ne presega 40 – 50 %, čistost kisline je 80 % (Galaction in sod., 2005).

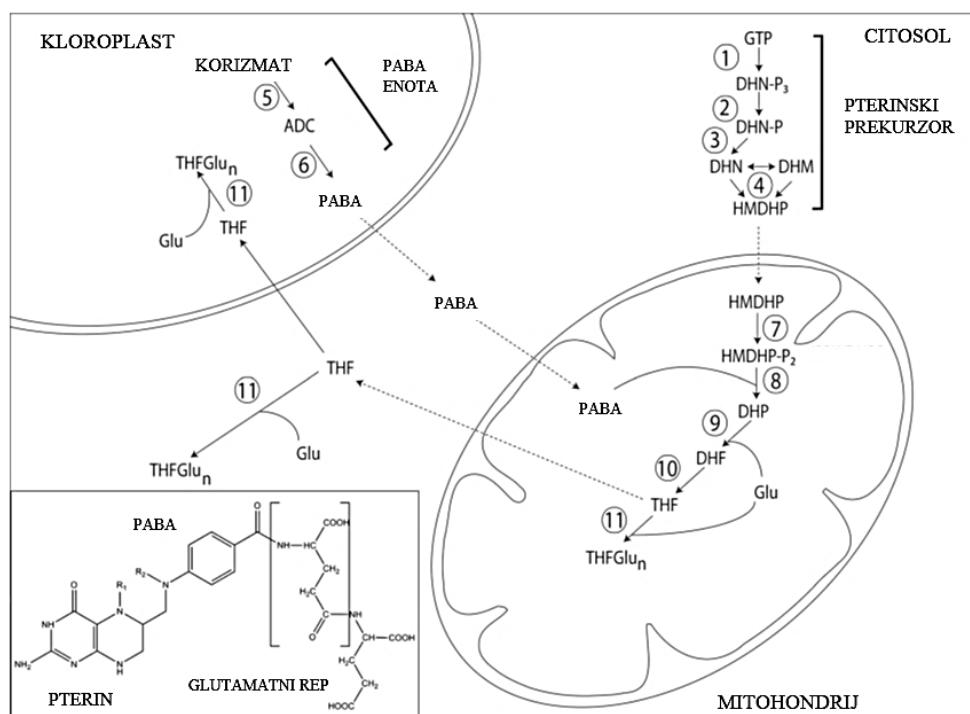
Kondenzacijske reakcije lahko katalizirajo tudi encimi. Folno kislino lahko dobimo iz prekurzorjev, kot so glutaminska kislina, p-aminobenzojska kislina ali 2-amino-4-hidroksipirimidin-6-karboksialdehid z uporabo encimov, ki so pridobljeni iz *Escherichia coli*, *Lactobacillus arabinosus* ali *Mycobacterium avium*, z ali brez potrebe dodatne faze kemijske sinteze. Zaradi ekonomskih omejitev, se te metode uporabljajo le v laboratorijskem obsegu (Galaction in sod., 2005).

2.3.2 Sinteza folatov v rastlinah in mikroorganizmih

THF in njegove derivate lahko sintetizirajo le rastline in mikroorganizmi (Blancquaert, 2014). Folati se sintetizirajo v rastlinah in mikroorganizmih, ki uporabljajo enake osnovne poti, nato pa so podvrženi interkonverziji do različnih oblik (Delchier in sod., 2016).

Sestavljeni so iz treh enot, pterina, p-aminobenzoata (PABA) ter enega ali več ostankov glutamatata (glutamatni rep). Vsaka od teh enot se sintetizira v različnih celičnih strukturah (slika 9), in sicer v citosolu, plastidih (kloroplastih), mitohondrijih, ter vakuoli. Prvi korak v sintezi THF je sinteza pterina. Ti pterinski prekurzorji (hidroksimetildihidropterini) so sintetizirani iz GTP (gvanozin 5'-trifosfat) v citosolu, s pomočjo encimov, ki so tu prisotni. Molekula PABA nastane iz korizmata v plastidih (PABA enota) s pomočjo aminodeoksikorizmat (ADC) sintaze. Nato se obe molekuli, pterinski prekurzor in PABA,

preneseta v mitohondrije in sodeluje pri kondenzaciji folatov z encimom dihidropteroat sintaza. Temu sledita glutamilacija in redukcija. Nastane 5,6,7,8-tetrahydropteroil- γ -glutamat (THF). Zadnji korak v biosintezi THF-poliglutamata je vezava poliglutamilnega repa (Basset in sod., 2005).



Legenda: (ADC) aminodeoksikorizmat; (DHF) dihidrofolat; (DHM) dihidromonapterin; (DHN) dihidroneopterin; (DHP) dihidropteroat; (Glu) glutamat; (HMDHP) hidrosimetildihidropteroin; (THF) tetrahydrofolat. Encimi: (1) GTP ciklohidrolaza I; (2) dihidroneopterin trifosfat pirofosfataza; (3) nespecifična fosfataza; (4) dihidroneopterin aldolaza; (5) aminodeoksikorizmat sintaza; (6) aminodeoksikorizmat liaza; (7) hidrosimetildihidropteroin pirofosfokinaza; (8) dihidropteroat sintaza; (9) dihidrofolat sintetaza; (10) dihidrofolat reduktaza; (11) folilpoliglutamat sintetaza.

Slika 9: Biosinteza folatov v rastlinski celici, s strukturno formulo folata (levo spodaj) (Blancquaert in sod., 2014).

2.4 PRESNOVA FOLATOV

Večina folatov v živilih je v obliki reduciranih poliglutamatov. Ti se morajo pred absorpcijo razgraditi v monoglutamatne oblike, da lahko prehajajo preko črevesne sluznice. Reakcijo hidrolize v jejunumu katalizira encim folipoli-glutamat karboksipeptidaza, ki se nahaja na luminalni ščetkasti membrani enterocitov (imenovana tudi folatna konjugaza ali pteroilpoliglutamatna konjugaza). Folipoli- γ -glutamat karboksipeptidaza deluje kot eksopeptidaza, ki cepi terminalne glutamate z optimalno aktivnostjo pri pH 6,5 do 7,0. Naslednja faza v dvostopenjskem procesu absorpcije prehranskih folatov je prenos monoglutamil folatov preko črevesne sluznice, ki je največji pri pH 5-6 (Bailey, 2007).

V nasprotju s prehranskimi folati je folna kislina iz dopolnil ali obogatenih živil že v monoglutamatni obliki in pred absorpcijo ne zahteva pretvorbe (Wright in sod., 2007). Folatni monoglutamati in sintetična folna kislina lahko vstopijo v enterocite s pasivno difuzijo kot tudi z aktivnim transportom, ki je najverjetneje posredovan s protoni sklopljenim folatnim prenašalcem (PCFT) (Laanpere in sod., 2010).

Po absorpciji se mora folna kislina spremeniti v biološko aktivne folate. Proses, ki se pojavlja v sluznici črevesnih celic, vključuje dvostopenjsko pretvorbo folne kisline v dihidrofolat in tetrahidrofolat z encimom dihidrofolat reduktaza ter naknadno redukcijo do 5-metiltetrahidrofolata (Wright in sod., 2007). Z vezavo skupin z enim ogljikovim atomom in nadaljnimi koraki redukcije nastanejo 5-metiltetrahidrofolatni (5-MTHF) monoglutamati, ki se prenesejo v krvni obtok in so glavna oblika folatov v obtoku. Posebni folatni prenašalni proteini ali folatni receptorji nato prenesejo 5-MTHF iz krvi v celice (Stover, 2004). V procesu imenovanem poliglutamacija se doda več ostankov glutamata, ki se med seboj povežejo preko γ -karboksilne peptidne vezi (R' na sliki 1). Vključitev dolgih poliglutamatnih verig spremeni lastnosti molekul tako, da ne morejo prehajati skozi membrano in se zato kopičijo v celicah. Encimi, ki sodelujejo v presnovi folatov imajo večjo afiniteto za folatne poliglutamate (Blom in sod., 2006).

Folati znotraj celice delujejo kot akceptorji in donorji skupin z enim ogljikovim atomom. Te se kovalentno vežejo na folate (R' na sliki 1) in so lahko v oksidirani ali reducirani oblik, vključno z formilnimi in metilnimi derivati (Blom in sod., 2006).

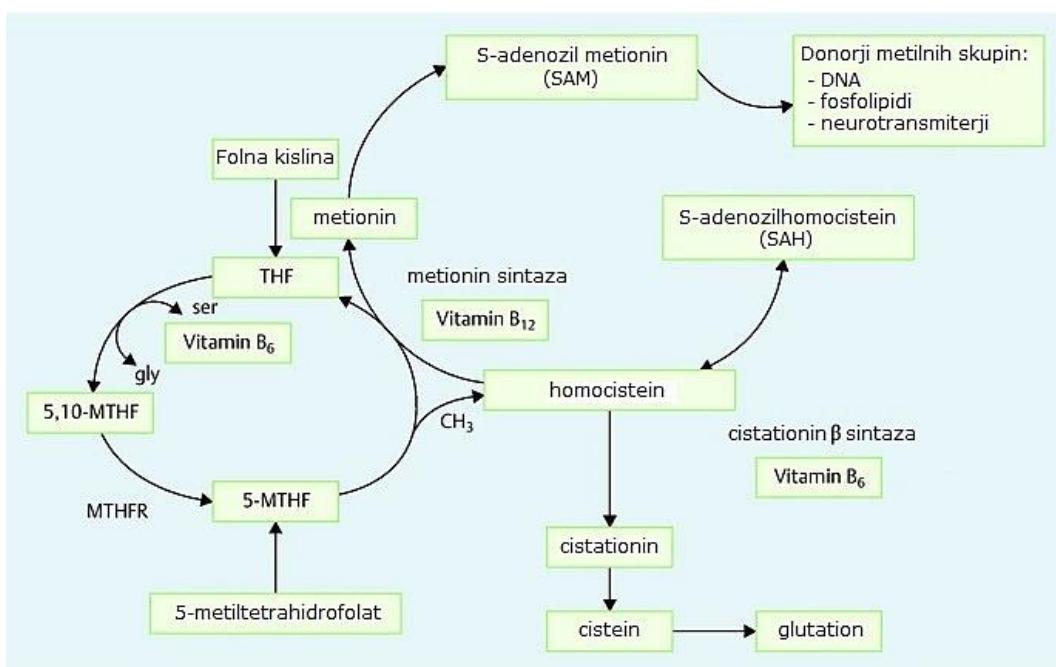
Folati se nato prenesejo preko mezenteričnih žil do jetrne portalne vene in potujejo v jetra, kjer se shranjujejo ali izločijo (Wright in sod., 2007). Folati nato iz jeter potujejo v tkiva, najpogosteje kot poliglutamatni derivati.

2.4.1 Biokemijska vloga

Povečanje zanimanja za folate, mikrohranila, ki jih uvrščamo med vitamine B skupine, je povezano z njihovo vlogo pri številnih biokemijskih reakcijah, ki so ključnega pomena za zdravje ljudi (Hannisdal in sod., 2009). Kot prenašalci in donorji eno-ogljičnih skupin so vključeni v številnih ključnih presnovnih funkcijah, vključno z biosintezo nukleinskih kislin (DNA in RNA), aminokislin (serin, glicin in histidin) in pantotenske kisline. Pri rastlinah sodelujejo tudi v nastajanju lignina in fotorespiraciji (Hanson in Roje, 2001). Presnova folatov ima ključni pomen v celičnem delovanju, še posebej v obdobju hitre rasti (Blom in sod., 2006).

Folna kislina ni biokemijsko aktivna, vendar postane po redukciji z encimom dihidrofolat reduktaza v tetrahidrofolat (THF) in po substituciji s skupinami z enim ogljikovim atomom na mestih N-5 in/ali N-10. THF sprejme skupine z enim ogljikovim atomom iz različnih razgradnih reakcij v presnovi aminokislin. Tako oblikovani derivati THF so koencimi, ki služijo kot donorji funkcionalnih skupin z enim ogljikovim atomom v različnih kemijskih reakcijah (Ball, 2004).

Folati služijo kot prenašalci metilnih (-CH₃), formilnih (-CHO) in ostalih skupin z enim ogljikovim atomom, ki se uporablajo v sintezi purinov in pirimidinov ter v reakcijah metiliranja (Hannisdal in sod., 2009). Oblika 10-formil-THF prispeva en ogljikov atom za tvorbo purinskih nukleotidov (adenina in gvanina), ki so potrebni tako za sintezo RNA kot tudi DNA (Ball, 2004). Oblika 5,10-metilentetrahidrofolat ima osrednjo vlogo v metabolizmu snovi z enim ogljikom, saj lahko prispeva svoj ogljikov atom za sintezo metionina, purinskih in pirimidinskih nukleotidov. Prav tako sodeluje pri pretvorbi deoksiurdin monofosfata (dUMP) v deoksitimidin monofosfat (dTTP) (Ball, 2004). Folati so prekurzorji 5-metiltetrahidrofolata, ki deluje kot donor metilne skupine za remetilacijo homocisteina v metionin, ki je potreben za normalen potek metilacijskih reakcij. Metionin deluje kot substrat za sintezo S-adenozil metionina (SAM), ki je pomemben donor metilne skupine v številnih epigenetskih procesih in procesih celične presnove kot so DNA, fosfolipidi in nevrotransmiterji (slika 10) (Thaler, 2014).



Legenda: THF – tetrahidrofolat; ser – serin; gly – glicin; 5,10-MTHF – 5,10-metilentetrahidrofolat; MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza; 5-MTHF – 5-metiltetrahidrofolat; DNA – deoksiribonukleinska kislina.

Slika 10: Presnovne poti pri katerih sodelujejo folati (Thaler, 2014).

2.5 PRIPOROČENI DNEVNI VNOS

Referenčne vrednosti oziroma priporočeni vnosi so količine hrani, za katere domnevamo, da pri skoraj vseh posameznikih v populacijskih skupinah omogočajo njihovo polno storilnost in ščitijo pred prehransko pogojenimi zdravstvenimi okvarami. Zadosten vnos (AI) se uporablja z namenom vnosa folatov pri dojenčkih. AI odraža opažen povprečni vnos folatov pri dojenčkih, ki uživajo izključno človeško mleko (DRI, 1998).

Naravni folati v hrani imajo nižjo biološko vrednost kot sintetična folna kislina. Z namenom bi se upoštevale te razlike, so uvedli enote DFE (Dietary folate equivalent) ali prehranski folatni ekvivalent (DFE). Opredeljeni so kot $1 \mu\text{g DFE} = 1 \mu\text{g prehranskega folata} = 0,6 \mu\text{g folne kisline}$ v obogateni hrani, ali kot dodatek, zaužit skupaj s hrano $= 0,5 \mu\text{g dodatka folne kisline}$, zaužitega na prazen želodec (EFSA, 2014).

Priporočeni dnevni vnos folatov (PDV) je odvisen od starosti in načina življenja. V Sloveniji (Referenčne vrednosti..., 2004) znaša PDV za odrasle $400 \mu\text{g}$ prehranskih ekvivalentov folata (DFE) na dan za moške in ženske, $600 \mu\text{g}$ DFE/dan za ženske med nosečnostjo in $600 \mu\text{g}$ DFE/dan za doječe matere. Povprečni vnos s hrano v državah brez obvezne obogativitve, kot je večina držav EU, je precej nižji od teh dnevnih priporočil (Kopp in Rychlik, 2015).

V preglednici 2 so navedeni priporočeni dnevni odmerki oziroma referenčne vrednosti za folate, izdani s strani združenja DACH in veljajo za zdrave osebe na našem geografskem območju. Na območju Slovenije še vedno uporabljamo priporočila DACH iz leta 2000 (Referenčne vrednosti..., 2004), medtem ko so jih na območju nemško govorečih držav spremenili leta 2013 (DGE, 2013). Za ponovno ocenitev so se odločili, saj se je izkazalo, da zmanjšanje koncentracije homocisteina v krvi ni več glavni cilj. Nove vrednosti se nanašajo na koncentracijo folatov v serumu (Krawinkel in sod., 2014).

Med priporočili številnih držav in pristojnih organizacij, ki izdajajo priporočila glede vnosa folatov, obstajajo precejšnje razlike. Priporočila so ocenjena tako, da zadostujejo za izpolnitve osnovnih zahtev po hranih pri skoraj vseh posameznikih v skupini. Priporočila niso določena tako, da se doseže optimalne učinke na zdravje. Za ta cilj se lahko zahteva višje ravni. Trenutno je opredeljena referenčna vrednost za folate, določena s strani Znanstvenega odbora za hrano (Scientific Committee on Food) (SCF, 2000), 200 µg dnevno. Le Italija, Španija in Grčija se strinjajo s to stopnjo. Ostale države uporabljajo priporočeno raven 300 ali celo 400 µg na dan pri odraslih (Dhonukshe-Rutten in sod., 2009).

Preglednica 2: Referenčne vrednosti za vnos prehranskih folatov oz. priporočeni dnevni vnosi (PDV-RDA) za folate za zdrave posameznike (Referenčne vrednosti..., 2004; DGE, 2013).

Starost	Folat ^A (µg ekvivalent ¹ /dan)	Prehranski folat ^B (µg ekvivalent ¹ /dan)
Dojenčki		
0 do manj kot 4 mesece ²	60	60
4 do manj kot 12 mesecev	80	80
Otroci in mladostniki		
1 do manj kot 4 leta	120	200
4 do manj kot 7 let	140	300
7 do manj kot 10 let	180	300
10 do manj kot 13 let	240	400
13 do manj kot 15 let	300	400
15 do manj kot 19 let ³	300	400
Odrasli		
19 do manj kot 25 let ³	300	400
25 do manj kot 51 let ³	300	400
51 do manj kot 65 let	300	400
65 let in starejši	300	400
Nosečnice³	550	600
Doječe matere	450	600

Legenda: A = izdana leta 2013; B = izdana leta 2000

¹ Izračunano po vsoti folatno učinkovitih spojin v običajni prehrani = ekvivalenti folata (po novi definiciji).

² Vrednosti predstavljajo zadosten vnos. Gre za ocenjene vrednosti.

³ Ženske, ki želijo zanosisi ali bi lahko zanosile, naj bi dodatno uživale 400 µg sintetične folne kisline dnevno v obliki dopolnil za preprečevanje napak nevralne cevi. Do tega povečanega vnosa folne kisline naj bi prišlo najkasneje 4 tedne pred začetkom nosečnosti in naj bi se izvajalo tudi v celotnem prvem trimesečju nosečnosti.

2.6 POMANJKANJE FOLATOV

Pomanjkanje folatov ima v Evropi visoko prevalenco, saj se tu ne izvaja sistematične obogativitve živil s folno kislino, ki je od leta 1998 obvezna v ZDA (Dhonukshe-Rutten in sod., 2009). Pogostost pomanjkanja folatov, glede na potrebe ljudi po vitaminih, je posledica izbora hrane, ki ni bogata z folati, izgub folatov pri predelavi hrane (oksidacija in izpiranje) in nepopolne biorazpoložljivosti folatov v humani prehrani (Sauberlich in sod., 1987).

Dejavniki, ki prispevajo k pomanjkanju folatov so tudi okvara absorpcije zaradi črevesnih bolezni, uživanja drog ali dedne malabsorpcije folatov; okvarjena presnova folatov (prisotnost inhibitorjev dihidrofolat reduktaze, alkohola ali sulfasalazina); prirojenih genetskih motenj (pomanjkanje metilentetrahidrofolatne reduktaze ali glutamatne formiminotransferaze, polimorfizem metilentetrahidrofolatne reduktaze); ter povečanih potreb med hemodializo, prezgodnjim porodom, nosečnostjo in dojenjem (Combs, 2008).

Pomanjkanje folne kisline ovira sintezo DNA in celično delitev; skupna klinična manifestacija hudemu pomanjkanju folne kisline je megaloblastična anemija (rdeče krvne celice so večje od običajnih, vendar jih je manj). Hematološki znaki so podobni anemiji, ki je posledica pomanjkanja vitamina B₁₂ (Hathcock, 2014). Pomanjkanje lahko privede do različnih motenj pri človeku, kot so prirojene okvare nevralne cevi (NTD), hiperhomocisteinemije, ki poveča tveganje za bolezni srca in ožilja ter raka (Bender, 2003).

Pomembnost folatov in zadostnega vnosa je v njegovi vlogi prekurzorja 5-metiltetrahidrofolata, ki deluje kot donor metilne skupine za ponovno metilacijo homocisteina do metionina. Pomanjkanje folatov tako povzroči posredno povišane plazemske koncentracije homocisteina. Pomanjkanje se odraža tudi v nižjih koncentracijah S-adenozil metionina, pomembnega donorja metilne skupine, ki je potreben v epigenetskih procesih (metilaciji genov) in osnovnih procesih celične presnove (sinteza DNA in beljakovin) (Thaler, 2014).

Proces metilacije ima pomembno vlogo pri biokemijskih osnovah nevropsihijatrije. Povišana raven homocisteina je najpomembnejši pokazatelj pomanjkanja folatov in vitamina B₁₂, ter hkrati najbolj zanesljiv biokemijski znak funkcionalne insuficience. Nevrološke in nevropsihiatrične bolezni, kot so psihoza, Alzheimerjeva bolezen in avtizem so prav tako povezane z motnjami v metabolizmu enega ogljikovega atoma (Coşar in sod., 2014).

2.7 PREHRANSKI VIR FOLATOV

Za razliko od rastlin in mikroorganizmov, živali in ljudje ne morejo sintetizirati folatov *de novo*, zato jih morajo v celoti vnesti s prehranskimi viri. Sesalci so sicer sposobni sinteze pteridinskega obroča, vendar ga ne morejo povezati z ostalimi komponentami. Odvisni so od vnosa z živili in sinteze biološko aktivnih folatov (Stanger, 2002). Pri ljudeh je rastlinska hrana najpomembnejši vir folatov (Scott in sod., 2000).

2.7.1 Prehranski vir naravnih folatov

Folati se pojavljajo v najrazličnejših živilih rastlinskega kot tudi živalskega izvora (preglednica 3). Folati so v živilih večinoma v reducirani obliki kot derivati poliglutamil tetrahidrofolne kisline (THF), zelo malo jih je v obliki monoglutamatov. Prevladujoče oblike so 5-metil-THF in 10-formil-THF. V mleku je 5-metil-THF prevladujoča oblika in je ena najstabilnejših oblik naravnih folatov (Forssén in sod., 2000).

Glavni viri folatov v živilih so jetra (skladiščni organ folatov), gobe in zelena listnata zelenjava (Combs, 2008). Po drugi strani so meso, ribe in perutnina slab ali zmeren vir folatov (Ball, 2006). Živila z najvišjo vsebnostjo folata na enoto suhe teže so kvas, jetra in ostali notranji organi (drobovina), sveža zelena zelenjava in nekatero sveže sadje (Herbert, 1999). Najdemo jih tudi v artičokah, beluših, stročjem fižolu, brstičnem ohrovту, zelju, cvetači, koruzi, kumarah, jajčevcih, solati, čebuli, grahu, papriki, bučah, repi, zelenjavnih solatah. Vsebnost folatov v mleku je precej nizka, vendar glede na delež v prehrani zaužitega, mleko predstavlja pomemben vir prehranskih folatov (Holasová in sod., 2005). Čeprav ima velika večina zelenjave nižjo vsebnost folatov kot temno zelena, so nekatere izmed njih tako pogosto na jedilniku, da je njihov prispevek k skupnemu vnosu folatov relativno visok (DRI, 1998). Fižol in zelena zelenjava so dobri viri folatov, vendar relativno malo ljudi poje zadostno količino teh živil (LeBlanc in sod., 2007).

Večina folatov v živilih se zlahka oksidira. Občutljivi so na oksidacijo v aerobnih pogojih shranjevanja in predelave. Zlasti v prisotnosti segrevanja, svetlobe in/ali kovinskih ionov se derivati THF zlahka oksidirajo v ustrezne derivate dihidrofolne kisline (DHF) (so delno oksidirani) in folne kisline (popolnoma oksidirana), ki se lahko nadalje razgradi do fiziološko neaktivnih spojin (Combs, 2008). Precejšnje izgube vsebnosti folatov v živilih so lahko posledica izpiranja v vodo med vrenjem (izgube do 84 %). Zaradi teh izgub lahko zelena listnata zelenjava izgubi na svoji vsebnosti folatov, kljub sorazmerno visoki naravni vsebnosti vitamina (Combs, 2008). Vsi folati se izgubijo tudi iz rafiniranih živil, kot so sladkorji, močno žganje in trdi bonboni (Herbert, 1999).

Preglednica 3: Vsebnost folatov v živilih (Combs, 2008: 357).

ŽIVILO	FOLATI (µg/100 g)	ŽIVILO	FOLATI (µg/100 g)
Mlečni izdelki		Ostalo	
mleko	5 - 12	jajca	70
sir	20	pivski kvas	1500
Meso		Zelenjava	
govedina	5 - 18	šparglji	70 - 175
jetra		fižol	70
goveja	140 - 1070	brokoli	180
piščančja	1810	brstični ohrov	90 - 175
tuna	15	zelje	15 - 45
Žita		cvetača	55 - 120
ječmen	15	grah	90
koruza	35	soja	360
riž		špinača	50 - 190
brušeni	15	paradižnik	5 - 30
nebrušeni	25	Sadje	
pšenica, cela	30 - 55	jabolka	5
pšenica, otrobi	80	banane	30
		pomarance	25

Folati rastlinskega izvora imajo slabšo biološko vrednost kot folati iz živil živalskega izvora (preglednica 4) (Combs, 2008).

Preglednica 4: Biološka vrednost folatov v živilih (Combs, 2008: 358).

ŽIVILO	BIOLOŠKA VREDNOST (razpon navedenih vrednosti, %)
Banane	0 – 148
Zelje	0 – 127
Jajca	35 – 137
Lima fižol	0 – 181
Jetra (kozja)	9 – 135
Pomarančni sok	29 – 40
Špinača	26 – 99
Paradižnik	24 – 71
Pšenični kalčki	0 – 64
Pivski kvas	10 – 100
Sojina moka	0 – 83

Nekateri mikroorganizmi imajo sposobnost povečanja vsebnosti folatov v fermentiranih mlečnih izdelkih, ter tudi v številnih drugih nemlečnih izdelkih kot npr. v vinu, pivu, rži, kruhu, pekovskem kvasu in fermentirani zelenjadi (Jägerstad in sod., 2005).

Zaradi nizkega uživanja s folati bogatih živil in čezmerne izgube folatov med predelavo je obogatitev živil s folno kislino ali s pomočjo genske tehnologije najučinkovitejši način za dvig vnosa le-teh v širši javnosti.

2.7.1.1 Obogatitev primarnih virov hrane s folati s pomočjo genske tehnologije

Biofortifikacija živil s folati z metabolnim inženiringom je alternativa ali vsaj komplementarna rešitev že obstoječim postopkom, in sicer industrijski obogatitvi, distribuciji dopolnil v obliki tablet in prehranski raznovrstnosti (Storozhenko in sod., 2007).

Obogatitev živil s sintetično folno kislino lahko učinkovito zmanjša pogostost pomanjkanja folatov, vendar lahko pri prekomernem vnosu pride do škodljivih učinkov za zdravje (Crider in sod., 2011). Poleg tega je v revnih državah težje izvajati postopke obogatitve živil kot dopolnjevanje prehrane s folno kislino v obliki tablet. Rastlinski inženiring s povečanjem vsebnosti folatov (biofortifikacija) je lahko racionalna alternativa pri reševanju globalnega pomanjkanja folatov. Prav tako je stroškovno učinkovit pristop, saj tudi pri obogatitvi ali dopolnitvi nastanejo enaki ponavljanjoči se stroški (Bouis, 2002).

Obstajajo tri možne strategije povišanja vsebnosti folatov v rastlinah: (1) povečanje sinteze s prekomerno ekspresijo enega ali več encimov (ali prenašalcev), ki vplivajo na splošni potek poti; (2) povečanje transporta folatov v celične ali druge metabolično inertne prostore, kjer se lahko skladiščijo; (3) zmanjšanje kemijske in encimske razgradnje, bodisi z regulacijo katabolnih encimov ali s preusmerjanjem sinteze folatov za nastanek 5-formil-THF, ki je najstabilnejši naravni folat. Te strategije se med seboj ne izključujejo, zato je verjetno, da so kombinacije sinergistične (Basset in sod., 2005).

V zadnjem desetletju so poročali o poskusih bioinženiringa pri paradižniku, rižu, solati, krompirju in beli koruzi (Blancquaert in sod., 2014). V rižu so tako s prekomerno ekspresijo dveh *Arabidopsis thaliana* genov za pterinsko enoto in enoto para-aminobenzoat kar za 100-krat povečali vsebnost folatov (Storozhenko in sod., 2007).

Dodatna težava pri biofortifikaciji živil s folati je njihova stabilnost, saj je pridobivanje visokih vrednosti tega vitamina brez pomena, če se ob skladiščenju in predelavi hrane znižajo na bazalno vrednost. Folati so nestabilne spojine, občutljive na oksidativno in foto-oksidativno razgradnjo (Scott in sod., 2000) ter razgradnjo zaradi vpliva pH. Večina folatov je stabilnih pri pH v območju od 4 do 8 in T = 37 °C, z izjemo THF in DHF (De Brouwer in sod., 2007). Obdelava živil kot je kuhanje, zniža raven folatov v bioobogatenem rižu za polovico (Storozhenko in sod., 2007).

2.7.2 Prehranski vir sintetične folne kisline

Folna kislina je bila analizirana v nekaterih vrstah zelenjave, kot so špinača, čičerika, paradižnik, stročji fižol in zelje. Kljub temu se folna kislina običajno ne pojavlja v naravi oziroma v živilih. Prisotnost folne kisline v rastlinah in ostalih živilih je lahko posledica razgradnje folatov med analiznimi postopki ali v živilih pred analizo (Delchier in sod., 2016).

Folna kislina je sintetični monoglutamat in se dodaja živilom, kot so formule za dojenčke, žitarice in vitaminska dopolnila (Off in sod., 2005). Prav tako je dodana sestavina v številnih prehrabbenih izdelkih, vključno z nadomestnimi obroki, v vse večjem številu žit za zajtrk (ready-to-eat), prehranskih tablicah in prigrizkih (Bailey, 2007). V ta namen se uporablja, ker je cenejša in stabilnejša od fizioloških oblik folatov. Ko jo zaužijemo oralno, se hitro reducira v aktivno obliko oziroma derivat tetrahidrofolat (Off in sod., 2005).

Pomanjkanje folne kisline je bilo opredeljeno kot vzrok za škodljive bolezni, ki bi jih lahko preprečili z obogatitvijo živil. Številne raziskave so pokazale, da ima večina odraslih neustrezeno vrednost serumskih folatov. Pomanjkanje folatov je pogosto zlasti med starejšo populacijo (Buttriss, 2005). Zaradi resnosti okvar živčne cevi pri novorojenčkih so mnoge države začele izvajati programe obvezne obogatitve žitnih izdelkov s folno kislino ter z namenom povečanja vnosa folatov v prehrani (Crider in sod., 2011). V Združenih držav Amerike so z obvezno obogatitvijo žit in žitnih izdelkov s folno kislino pričeli že leta 1996. V januarju leta 1998 so bili vsi žitni mlevski izdelki (kruh, testenine, riž, moka, žitarice za zajtrk) obogateni z $140 \mu\text{g}$ folne kisline na 100 g izdelka (Ball, 2006). Obvezno obogatitev živil so uvedli tudi v Kanadi, Čilu, Kostariki in Južni Afriki (Crider in sod., 2011). Izvaja se v več kot 50 državah, vendar ni uvedena v nobeni evropski državi (EFSA, 2009). Obstojecih programi obogatitve živil s folno kislino so bistveno zmanjšali pojav števila nosečnosti, prizadetih z okvaro nevralne cevi, in s tem povezano obolenost in umrljivost (Crider in sod., 2011).

V Sloveniji se folna kislina kot vitamin lahko dodaja živilom (kot snov za obogatitev živil) oziroma se jo uporablja pri proizvodnji prehranskih dopolnil in v živilih za posebne prehranske namene. V prilogah I in II, Uredbe (ES) št. 1925/2006 o dodajanju vitaminov mineralov in drugih snovi živilom, so navedeni vitamini in minerali ter njihove kemijske oblike, ki se v skladu s pravili te uredbe, lahko dodajo k živilom. Med dovoljenimi je folna kislina v obliki pteroilmonglutaminske kisline. Z Uredbo komisije (ES) št. 1170/2009 z dne 30. novembra 2009 o spremembi Direktive 2002/46/ES Evropskega parlamenta in Sveta in Uredbe (ES) št. 1925/2006 Evropskega parlamenta in Sveta glede seznamov vitaminov in mineralov ter njihovih oblik, ki se lahko dodajo živilom, vključno s prehranskimi dopolnili, se živilom lahko dodaja folna kislina v obliki pteroilmonglutaminske kisline in kot kalcijev-L-metilfolat (5MTHF-Ca).

Glavna težava v vsakem programu bogatjenja živil je zagotoviti, da ljudje z nizkim vnosom zaužijejo dovolj obogatene hrane, medtem ko ljudje z visokim vnosom ne prejmejo potencialno škodljive količine. Čeprav ima folna kislina nizko tveganje za toksičnost, saj je v vodi topen vitamin in se vsaka odvečna količina odstrani iz telesa z uriniranjem (Hazra in Tripathi, 2001), lahko konstantno uživanje visokih količin prikrije znake pomanjkanja vitamina B₁₂, kar lahko privede do trajnih nevroloških poškodb (Ball, 1998).

Glavni pomisleki glede možnih škodljivih posledic zaradi previsoke ravni dodatnega vnosa folne kisline, so prikritje simptomov megaloblastne anemije zaradi pomanjkanja vitamina B₁₂, rak, epigenetske spremembe ter prisotnost nepresnovljene folne kisline v krvnem obtoku. Nenehno spremljanje obogatitvenih programov je zato ključnega pomena pri obravnavanju nastalih pomislekov glede morebitnih škodljivih posledic (Crider in sod., 2011).

2.8 TOKSIČNOST FOLNE KISLINE

Dopustna zgornja meja vnosa (UL) se uporablja za pregled nad možnostjo prekomerne porabe hranil. Če je posameznikov običajni vnos hranil nižji od UL, je malo verjetno, da bo prišlo do povečanega tveganja za pojav neželenih učinkov zaradi čezmernega vnosa. Tveganje za škodljive učinke se poveča, če ostajajo vnosti nad UL v daljšem časovnem obdobju. Zgornja meja vnosa folatov velja samo za folno kislino in ne za v hrani naravno prisotne folate (DRI, 1998). Ker je folat vodotopen vitamin, ima relativno nizek toksični potencial, saj se zaužiti presežek hitro izloči z urinom (Smith in sod., 2008). Naravni folati v hrani veljajo za varne, saj visoki odmerki do sedaj niso bili povezani z morebitnimi škodljivimi posledicami (Butterworth in Tamura, 1989).

Prevelika količina folne kisline lahko začasno zakrije megaloblastno anemijo, zaradi pomanjkanja kobalamina (B₁₂) in s tem prepreči pravilno diagnozo ter ustrezno zdravljenje bolezni. Nevrološke motnje, ki jih povzroči pomanjkanje vitamina B₁₂, tako napredujejo v nepopravljive subakutne kombinirane degeneracije hrbtenjače (EFSA, 2014). To je privelo do opredelitev zgornje ravni vnosa folne kisline na 1000 µg/dan za odrasle, ter med 200 in 800 µg folne kisline na dan za otroke stare od 1 do 17 let (SCF, 2000). Institut za medicino (IOM) je prav tako opredelil zgornjo raven vnosa na 1000 µg folne kisline na dan za odrasle (DRI, 1998).

Kronična prekomerna izpostavljenost folni kislini je povezana s številnimi tveganji, ki vključujejo: možnosti za maskiranje vitamina B₁₂, poslabšanje kognitivnih funkcij pri starejših, visoka stopnja nepresnovljene folne kisline in okvarjeno delovanje naravnih celic ubijalk ter dvojna modulatorna vloga pri napredovanju raka, ki temelji na živalskih študijah (Smith in sod., 2008). Sposobnost telesa za pretvorbo folne kisline v 5-MTHF je omejena. Nepresnovljena folna kislina je bila odkrita v sistemskem obtoku po dopolnitvi s folno

kislino (iz dopolnil in obogatenih živil) pri peroralnih odmerkih nad 260 µg (Kelly in sod., 1997). Presnovne in biološke posledice prisotnosti so zaenkrat še nejasne (Troen in sod., 2006; Morris in sod., 2010).

Čeprav je visok skupni vnos folatov v obratni povezavi s tveganjem za nekatere vrste raka kot je kolorektalni (rak debelega črevesa) (Bailey, 2003), lahko folati dejansko povečajo razvoj že prisotnih tumorjev (Smith in sod., 2008). Zato je pomembno, da se vzpostavijo prehranska priporočila, ki ne le preprečujejo pomanjkanje, ampak tudi zmanjšujejo škodljive učinke prekomernega vnosa (Cahill in El-Sohemy, 2012).

2.9 FOLNA KISLINA KOT ANTIOKSIDANT

Raziskave so pokazale pozitivne učinke folatov pri lovljenju prostih radikalov, saj je znano, da prosti radikali povzročajo oksidativni stres, ki vodi do mnogih bolezni (Stanger in Wonisch, 2012). Antioksidativna aktivnost folne kisline *in vivo* je postala pomembna zaradi uporabe folne kisline v obogativi živil in prehranskih dopolnil (Gliszczynska-Świgło, 2007). Folati imajo antioksidativne lastnosti, ki ščitijo genom z zaviranjem napada prostih radikalov na DNA. Pomembno vlogo imajo pri popravilu DNA in mehanizmu podvojevanja (Duthie in sod., 2002).

Glede aktivnosti folne kisline v lovljenju prostih radikalov ni enotnega mnenja. Študija Joshi-ja in sod. (2001) je pokazala, da ima hidroksilna skupina 4-OH na pteridinskem obroču folne kisline pomembno vlogo. V drugi študiji (Nakamura in sod., 2002) so ugotovili, da je stranska veriga N-(p-aminobenzoil)-L-glutaminska kislina bolj pomembna, saj so produkti nitriranja folne kisline opredeljeni kot 10-nitrofolati in 12-nitrofolati.

Folna kislina lahko deluje kot antioksidant, saj je učinkovita pri lovljenju prostih radikalov kot so $\text{CCl}_3\text{O}_2^\bullet$, N_3^\bullet , $\text{SO}_4^{\bullet-}$, Br_2^\bullet , $\cdot\text{OH}$ in O^\bullet pri pH 6,8 do 12,8 (Joshi in sod., 2001). Poleg tega ima sposobnost redukcije Fe^{3+} (feri oblika) v Fe^{2+} (fero oblika) določene s FRAP testom (Ferric Reducing Antioxidant Power - antioksidativna moč redukcije železa). Folna kislina je kot lovilec prostih radikalov relativno počasna, zato lahko reakcijo opišemo z navidezno (pseudo) kinetiko prvega reda (Gliszczynska-Świgło, 2006).

Folna kislina je boljši lovilec prostih radikalov v kislem in alkalnem pH v primerjavi z nevtralnim pH. Vpliv pH topila na antioksidativno aktivnost folne kisline je lahko biološkega pomena, saj je znano, da se pH različnih človeških telesnih tekočin med seboj zelo razlikujejo. Folna kislina ima manjšo učinkovitost lovljenja prostih radikalov v nevtralnem območju pH (Gliszczynska-Świgło in Muzolf, 2007). V alkalnem pH folna kislina prav tako lovi proste radikale, saj hidroksilni radikali povzročijo cepitev folne kisline in nastanek molekule p-ABGA (Patro in sod., 2005).

Sintetična folna kislina ima v primerjavi z ostalimi folati slabši zaščitni učinek pred prostimi radikali in peroksidacijo lipidov, zato se ne uvršča med pomembne antioksidante (Joshi in sod., 2001; Gliszczynska-Świgło, 2007; Gliszczynska-Świgło in Muzolf, 2007). Kljub temu je folna kislina vitamin z odlično klinično vrednostjo. Njena sposobnost znižanja ravni homocisteina v plazmi, ki je znan dejavnik tveganja za srčno-žilne bolezni, velja za potencialno zaščito pred boleznimi srca in ožilja (Smith in sod., 2008). Številne epidemiološke študije so pokazale, da lahko dopolnila s folno kislino bistveno zmanjšajo tveganje za hematološke bolezni, nevrološke in nevropsihiatricne motnje, okvare nevralne cevi (NTD) ter različne oblike raka. Predvideva se, da so zaščitni učinki folne kisline v patogenezi teh degenerativnih bolezni lahko povezani z njeno antioksidativno aktivnostjo (Joshi in sod., 2001).

2.10 METODE DOLOČANJA FOLATOV

Analize folatov so v primerjavi z analizami ostalih mikrohranil zahtevnejše zaradi občutljivosti folatov na vplive iz okolja in različnih oblik v katerih se nahajajo. Zahtevajo dobro poznavanje kemije folatov, ustreznih ekstrakcijskih in detekcijskih tehnik. Tehnike ekstrakcije se med seboj lahko razlikujejo glede na vrsto, naravo, stanje, izvor živil, kot tudi metodo detekcije. Vključujejo lahko le enostaven postopek segrevanja v puferski raztopini, npr. pri obogatenih žitih, do zapletenih z tri-encimsko obdelavo pri stročnicah. Poleg tega je potrebna skrbna izbira vrste pufra, dodatka antioksidantov, pogojev segrevanja, tipov konjugata, pogojev inkubacije in postopkov čiščenja, saj lahko vsak korak vpliva na končni izkoristek vitamina (Arcot in Shrestha, 2005).

Analizne metode za določanje folne kisline in folatov lahko razdelimo na biološke, mikrobiološke, biospecifične postopke, kromatografske in kemijske metode. Za določanje folatov se uporablajo mikrobiološke analize, ki temeljijo na turbidimetrični rasti bakterij *Lactobacillus rhamnosus* (Arcot in Shrestha, 2005). Čeprav je mikrobiološka analiza najpogosteje uporabljena metoda analize folatov, je zamudna in potrebuje veliko previdnosti in spretnosti. Prav tako ne omogoča razlikovanja med posameznimi folati. Nedavno odkrite metode z uporabo LC/MS/MS tehnik omogočajo natančno kvantifikacijo in boljšo specifičnost za različne oblike folatov (Araújo in sod., 2012). Encimskoimunske tehnike so hitre, enostavnejše in veliko cenejše, vendar manj primerne za določanje folatov v živilih (Arcot in Shrestha, 2005).

V sodobnem času je HPLC, v povezavi z različnimi tehnikami za odkrivanje, vodilni analitski postopek za določitev količine vitaminov, kot tudi za večino drugih analitov, zahvaljujoč možnosti hitre ločitve in kvantifikacije (Jedlička in Klimeš, 2005). HPLC analiza prav tako omogoča razlikovanje med oblikami folatov, kar je pomembno, saj imajo posamezni derivati folatov drugačno stabilnost in biološko vrednost (O'Broin in sod., 1975).

Priprava in predhodna stabilizacija vzorca sta najpomembnejša ukrepa za zagotovitev, da je poznejša HPLC analiza učinkovita. Pripravo vzorca je treba skrbno optimizirati, še posebej pri vitaminih zaradi degradacije na svetlobi, oksidacije reagentov, pH, segrevanja in drugih faktorjev. Zlasti pri vitaminih, ki delujejo kot antioksidanti, kar jih naredi nestabilne, je potrebno uporabiti primerne metode za pridobitev natančnih rezultatov (Jedlička in Klimeš, 2005).

HPLC z reverzno fazo je zaradi svoje preprostosti, občutljivosti in združljivosti s številnimi metodami detekcije najpogosteje uporabljen. Ločevanje spojin poteka na osnovi razlik v hidrofobnosti, medtem ko kromatografija z ionsko izmenjavo temelji na zadrževanju molekul na osnovi njihovih ionskih lastnosti (Pfeiffer in sod., 2010). Nepolarno stacionarano fazo ponavadi predstavlja oktadecil (C18), redkeje oktil (C8) ali fenil (Gujška in Majewska, 2005; Prasertmanakit in sod., 2009; Pfeiffer in sod., 2010). Organsko mobilno fazo sestavljata topili acetonitril ali metanol (Johansson in sod., 2005). Polarno mobilno fazo predstavljajo pufri oziroma različna topila. Najboljšo separacijo dosežemo z uporabo gradientne elucije. Pri analizi folatov se uporablja različni načini detekcije. Najpogostejši načini so UV/detektor z nizom diod (DAD), ki se uporablja predvsem pri analizi folne kisline, ter fluorescenza (FL) in elektrokemijski način detekcije (ES) (Pfeiffer in sod., 2010). Folna kislina in ostali derivati folatov ne fluorescirajo, zato je UV detekcija pogosteje uporabljen kot fluorometrična. Vzorce, ki vsebujejo folno kislino je mogoče analizirati fluorometrično, vendar je potrebna predhodna derivatizacija, s katero razgradimo folno kislino do pterina, ki fluorescira (Arcot in Shrestha, 2005; Pfeiffer in sod., 2010). Pri detekciji se uporablja valovne dolžine v UV območju, pri katerih ima folna kislina absorpcijske maksimume, torej v območju 280 nm in 350 nm (Off in sod., 2005; Gujska in Majewska, 2005; Cheung in sod., 2008; Prasertmanakit in sod., 2009).

Pomembno je, da se optimizacijo ekstrakcije in detekcijo folatov za vsako skupino hrane opravi, preden je izvedena dejanska analiza. Nobena metoda za analizo folatov ni popolna. Izbira določenega načina je veliki meri odvisna od namena analize, npr. sestave živil, prehranske intervencije, regulatornega namena ter tudi razpoložljivih sredstev, časa in stroškov (Arcot in Shrestha, 2005).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL, OPREMA IN PRIPRAVA OSNOVNIH RAZTOPIN

3.1.1 Material

- kromatografska kolona Zorbax Eclipse Plus C18; 4,6 x 150 mm, 3,5 µm (Agilent Technologies, ZDA)
- kromatografska predkolona Eclipse XDB-C18; 4,6 x 12,5 mm; 5 µm (Agilent Technologies, ZDA)

Preglednica 5: Uporabljene kemikalije.

KEMIKALIJA	PODANA ČISTOST (%)	PROIZVAJALEC
C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆ – folna kislina	≥ 97	SIGMA-ALDRICH, Nemčija
NaOH – natrijev hidroksid		MERCK, Darmstadt, Nemčija
HCOOH – mravljična kislina	98 - 100	KEMIKA, Hrvaška
HCOOH – mravljična kislina	≥ 98 HPLC	SIGMA-ALDRICH, Nemčija
CH ₃ COONa – natrijev acetat		MERCK, Darmstadt, Nemčija
CH ₃ COOH – ocetna kislina	100	MERCK, Darmstadt, Nemčija
2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol – TRIS	≥ 99,8	SIGMA-ALDRICH, Nemčija
HCl – klorovodikova kislina		MERCK, Darmstadt, Nemčija
milliQ voda		MILLIPORE, ZDA
Cr-H ₂ SO ₄ – krom-žvelpena kislina		KEMIKA, Hrvaška
2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) diamonijeve soli – ABTS	≤ 98	SIGMA-ALDRICH, ZDA
MnO ₂ – manganov (IV) dioksid	≥ 90	SIGMA-ALDRICH, Nemčija
C ₇ H ₅ N ₅ O ₃ – pterin-6-karboksilna kislina	≥ 98	SIGMA-ALDRICH, Nemčija
C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₅ – N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminska kislina	≥ 98	SIGMA-ALDRICH, Nemčija
C ₁₄ H ₁₂ N ₆ O ₃ – pterojska kislina	≥ 93	SIGMA-ALDRICH, Nemčija
C ₂ H ₃ N – acetonitril	HPLC	SIGMA-ALDRICH, Nemčija
CH ₃ OH – metanol	HPLC	SIGMA-ALDRICH, Nemčija

3.1.2 Laboratorijska oprema

- analitska tehnica AT 201 (Mettler Toledo, Švica)
- tehnica PB 3002 – S (Mettler Toledo, Švica)
- pH meter HI 221 (Hanna instruments, Italija)
- centrifuga Eppendorf 5415 C (Eppendorf, Nemčija)
- centrifuga Centric 322B (Tehtnica Železniki, Slovenija)
- energijsko varčna sijalka: 20 W E27 6400 K CE 220-240V 50/60 HZ
- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- UV-VIS spektrofotometer z diodno matriko HP 8453 (Hewlett – Packard, ZDA)
- UV-VIS spektrofotometer Cary 100 Bio (Cary, Varian, Avstralija)
- ultrazvočna kopel Sonorex TK 52 (Bandelin Sonorex, Nemčija)
- HPLC sistem – tekočinski kromatograf z detektorjem z diodno matriko Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, ZDA)
- magnetno mešalo Rotamix S-10 (Tehtnica Železniki, Slovenija)
- vrtinčnik IKA MS3 basic (IKA, Nemčija)
- 1,4 mL kvarčne kivete, dolžina optične poti 10 mm, s pripadajočimi pokrovčki (Starna Scientific Ltd., Velika Britanija)
- semi-mikro kivete 1,5 mL – plastične, dolžina optične poti 10 mm (Plastibrand, Nemčija)
- hladilnik
- laboratorijska steklovina (čaše, bučke, merilni valji, erlenmajerice, epruvete, viale)
- plastični inventar (tehtalne ladjice, kapalke, plastične centrifugirke, filter 0,2 µm in 0,45 µm z brizgo, epice, tipsi, stojala)
- spatule in žličke
- izolirni trak in parafilm
- magnetna mešala
- aluminijasta folija
- zaščitne rokavice
- štoparica

3.1.3 Priprava osnovnih raztopin

3.1.3.1 Priprava 0,1 M raztopine NaOH

Za pripravo 0,1 M raztopine smo na tehtnici zatehtali 800 mg NaOH ($M_{NaOH} = 40,0 \text{ g/mol}$) in ga kvantitativno prenesli v merilno bučko, ki smo jo nato z milliQ vodo dopolnili do oznake 200 mL ter dobro premešali. Raztopino smo hranili v hladilniku pri + 8 °C.

3.1.3.2 Priprava 10 mM raztopine folne kisline v 0,1 M NaOH

Folna kislina je stabilnejša v alkalnih kot v kislih pogojih, zato smo osnovne založne raztopine folne kisline pripravili v 0,1 M alkalni raztopini NaOH.

Za pripravo 10 mM raztopine folne kisline (FA) smo na tehtnici zatehtali 22,07 mg folne kisline ($M_{FA} = 441,4 \text{ g/mol}$) v prahu, jo kvantitativno prenesli v plastično centrifugirko in raztopili v 5 mL 0,1 M raztopine NaOH.

Ker naj bi bila folna kislina občutljiva na svetlobo, je tehtanje potekalo v temi. Plastične centrifugirke oziroma merilne bučke so bile ovite z aluminijasto folijo. Tako pripravljeno raztopino smo hranili v hladilniku pri + 8 °C največ 1 teden.

Za potrebe HPLC metode smo vsakič pripravili svežo raztopino folne kisline v 0,1 M NaOH, da bi se izognili kemičnim in fotokemičnim vplivom.

10 mM raztopina folne kisline v 0,1 M NaOH nam je služila za pripravo 25 µM raztopin FA v pH 7 in 9.

3.1.3.3 Priprava 500 µM raztopine folne kisline v 0,1 M NaOH

Za pripravo 500 µM raztopine folne kisline smo na tehtnici zatehtali 5,02 mg folne kisline v prahu ($M_{FA} = 441,4 \text{ g/mol}$), jo kvantitativno prenesli v merilno bučko, dopolnili do oznake 25 mL z 0,1 M raztopino NaOH ter bučko ovili z aluminijasto folijo. Tako pripravljeno raztopino smo hranili v hladilniku pri + 8 °C največ 1 teden.

500 µM raztopina folne kisline v 0,1 M NaOH nam je služila za pripravo 15 in 25 µM raztopin FA v pH 2 in 4.

3.1.3.4 Priprava pufrskih raztopin

3.1.3.4.1 Priprava 2 % HCOOH s pH 2

Za pripravo 250 mL 2 % vodne raztopine mravljične kisline smo v merilno čašo nalili približno eno polovico želenega volumna milliQ vode in dodali 5 mL 98 – 100 % HCOOH. Nato smo dodali še preostanek milliQ vode do 250 mL in izmerili pH ($2,00 \pm 0,09$). Tako pripravljeno vodno raztopino mravljične kisline smo hranili v hladilniku pri + 8 °C. Pred uporabo smo jo prefiltrirali skozi membranski filter z 0,45 µm porami.

3.1.3.4.2 Priprava CH₃COONa/CH₃COOH pufra s pH 4

Za pripravo 25 mM CH₃COONa/CH₃COOH pufra smo na tehnici zatehtali 513 mg CH₃COONa v prahu ($M_{CH_3COONa} = 82,03 \text{ g/mol}$), ga kvantitativno prenesli v merilno čašo in dodali približno 200 mL milliQ vode ter dobro premešali. Z dodajanjem koncentrirane CH₃COOH smo pufru uravnali pH na $4,00 \pm 0,05$. pH vrednost smo izmerili s pH – metrom, katerega elektrodo smo predhodno kalibrirali s standardnimi pufri (pufer s pH = 4,0 in pH = 7,0). Nato smo ga prelili v merilno bučko in volumen dopolnili do oznake 250 mL z milliQ vodo. Tako pripravljen acetatni pufer smo hranili v hladilniku pri + 8 °C. Pred uporabo smo ga prefiltrirali skozi membranski filter z 0,45 µm porami.

3.1.3.4.3 Priprava TRIS-HCl pufrov s pH 7 in 9

Za pripravo 25 mM TRIS-HCl pufra smo na tehnici zatehtali 757,13 mg TRIS-a v prahu ($M_{TRIS} = 121,14 \text{ g/mol}$), ga kvantitativno prenesli v merilno čašo in dodali približno 200 mL milliQ vode, ter dobro premešali. Tako pripravljenemu pufru smo nato uravnali pH na $7,00 \pm 0,08$ in $9,00 \pm 0,07$ z dodajanjem 1 M HCl. pH vrednost smo merili s pH – metrom, katerega elektrodo smo predhodno kalibrirali s standardnimi pufri (pufer s pH = 4,0 in pH = 7,0). Nato smo pufru prelili v merilni bučki in volumna dopolnili do oznake 250 mL z milliQ vodo. Kalibracija elektrode in uravnavanje pH pufrov je potekalo pri sobni temperaturi. Pufra smo hranili v hladilniku pri + 8 °C. Pred uporabo smo ju prefiltrirali skozi membranski filter z 0,45 µm porami.

3.1.3.5 Priprava ABTS⁺raztopine

Za izvedbo eksperimenta je bila potrebna predhodna priprava ABTS⁺ raztopine. Na tehnici smo zatehtali 25,1 mg ABTS ($M_{ABTS} = 548,68 \text{ g/mol}$) oziroma 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsko kislino) diamonijeve soli in jo kvantitativno prenesli v plastično centrifugirko. Nato smo dodali 10 mL milliQ vode ($\gamma_{ABTS} = 2,51 \text{ mg/mL}$ milliQ vode) in temeljito premešali. Raztopini smo dodali še 50 mg MnO₂ v prahu in ponovno

temeljito premešali. Raztopino, ovito v alufolijo, smo inkubirali na stresalniku pri sobni temperaturi vsaj 16 ur. Naslednji dan smo raztopino centrifugirali 15 minut s hitrostjo 4000 RCF ter s pomočjo brizge in igle filtrirali supernatant skozi membranski filter z $0,2\text{ }\mu\text{m}$ porami. Do uporabe smo raztopino ABTS⁺ hranili v hladilniku pri $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.3.6 Priprava mobilnih faz za HPLC-analizo

Za potrebe HPLC-analize smo najprej pripravili raztopino organske mobilne faze B, ki sta jo sestavljeni topili acetonitril (ACN) in metanol (MeOH) v razmerju 85 : 15 (v/v).

Vodne faze oziroma mobilne faze A so predstavljale uporabljene 25 mM raztopine pufrov s pH vrednostmi 4 (25 mM CH₃COONa/CH₃COOH), pH 7 (25 mM Tris-HCl pufer), pH 9 (25 mM Tris-HCl pufer) in 2 % raztopina HCOOH s pH 2. Natančnejša priprava delovnih raztopin oziroma pufrov je že bila predhodno opisana.

Vsa topila ali raztopine, ki smo jih uporabljali za analizo HPLC so bile z uporabo vakuumsko črpalko predhodno filtrirane skozi najlonski membranski filter ($0,45\text{ }\mu\text{m}$) ter v ultrazvočni kopeli (Sonorex TK 52, Bandelin Sonorex, Nemčija) razplinjene za 15 minut. Tako smo zagotovili, da so topila za analizo zelo čista.

3.1.3.7 Priprava raztopin folnih kislin za HPLC-analizo

Z metodo HPLC smo analizirali 25 μM raztopine folnih kislin v štirih različnih pH medijih. Iz 10 mM založne raztopine folne kisline v 0,1 M NaOH smo z ustreznim pufom pripravili 25 μM raztopino folne kisline. Vse raztopine smo filtrirali skozi membranski filter z $0,45\text{ }\mu\text{m}$ porami in prenesli v steklene viale za HPLC. Zaradi možne občutljivosti folne kisline na svetlobo, smo postopke izvedli v temi oziroma ne na neposredni sončni svetlobi. Poleg tega smo delovne raztopine ovili z aluminijasto folijo ali uporabili temne steklene viale.

3.1.3.8 Priprava raztopin standardov za HPLC-analizo

Raztopine treh standardov v štirih ustreznih pH medijih smo pripravili tako, da smo jih najprej raztoplili v 0,1 M raztopini NaOH. Z raztopljanjem v 2 % raztopini HCOOH s pH 2, oziroma pufrih s pH 4, 7 in 9 smo pripravili 25 μM raztopine N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminske kisline (Sigma-Aldrich, Nemčija), 25 μM raztopine pterin-6-karboksilne kisline (Sigma-Aldrich, Nemčija) in 25 μM raztopine pterojske kisline (Sigma-Aldrich, Nemčija). Raztopine smo nato filtrirali skozi membranski filter z $0,45\text{ }\mu\text{m}$ porami in jih prenesli v temne steklene viale za HPLC.

3.2 METODE DELA

3.2.1 Določanje vpliva pH vrednosti in temperature na stabilnost folne kisline

S pomočjo UV – VIS spektroskopije smo spremljali stabilnost 25 µM raztopin folnih kislin v štirih različnih pH (pH 2, 4, 7 in 9) v času 18 ur in pri sedmih različnih temperaturah (25, 35, 45, 55, 65, 75 in 85 °C). Pod enakimi pogoji smo spremljali tudi stabilnost 15 µM raztopin folnih kislin v pH 2 in 4 v temperaturnem območju od 25 °C do 55 °C.

Absorpcijski spektri so bili posneti z UV-VIS spektrofotometrom Cary 100 Bio s programom Kinetics. Za merjenje smo uporabili 1,4 mL kvarčne kivete (Starna Scientific Ltd., Velika Britanija) s širino 10 mm.

Tako pripravljenim raztopinam smo izmerili pH vrednost s pH – metrom, katerega elektrodo smo predhodno kalibrirali s standardnimi pufri (pufer s pH = 4,0 in pH = 7,0).

3.2.2 Določanje vpliva svetlobe na stabilnost folne kisline

Za ugotavljanje vpliva svetlobe na stabilnost folne kisline v različnih pH medijih (2, 4, 7 in 9) smo raztopine izpostavili energijsko varčni sijalki in z UV-VIS spektrofotometrom Cary 100 Bio merili absorpcijske spektre.

15 µM raztopine folnih kislin v ustreznih topilih (2 % HCOOH s pH 2; 25 mM CH₃COONa/CH₃COOH s pH 4; 25 mM TRIS-HCl pufer s pH 7 in pH 9) smo obsevali z energijsko varčno sijalko, ki oddaja hladno belo svetlobo (karakteristike: 20 W E27 6400K CE 220-240V 50/60 HZ) z oddaljenosti 20 cm. Vpliva dnevne svetlobe nismo omejili.

Spremljali smo vpliv svetlobe, energijsko varčne sijalke in dnevne, oziroma teme (odsotnost svetlobe) pri 15 µM raztopinah folnih kislin v štirih različnih pH medijih (2, 4, 7 in 9). Pripravljene raztopine smo razdelili v dve stekleni, prozorni epruveti. Vse epruvete smo zatesnili s pokrovčki. Neovite steklene epruvete smo izpostavili svetlobi energijsko varčne sijalke pri sobni temperaturi. Absorpcijske spekture smo izmerili na začetku ter po 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360, 420 in 480 minutah po izpostavitvi hladno beli svetlobi energijsko varčne sijalke in dnevni svetlobi. Raztopine folnih kislin v ovitih, zaprtih epruvetah smo uporabili kot kontrolne raztopine.

Raztopino folne kisline s koncentracijo 15 µM smo v raztopini s pH 2 pripravili tako, da smo pri pripravi uporabili ultrazvočno kopel.

3.2.3 Določanje antioksidativne aktivnosti folne kisline z ABTS metodo

Metoda temelji na spektrofotometričnem sledenju spremembe barve stabilnega radikala 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonske kisline) oziroma kationskega radikala ABTS^{•+}, ki absorbira svetlobo v vidnem delu absorpcijskega spektra pri valovni dolžini $\lambda = 734$ nm. Uporabili smo predhodno pripravljeno oksidirano raztopino ABTS^{•+}, ki je modro-zelene barve in se v prisotnosti antioksidantov, ki so donorji vodikovega atoma, relativno hitro razbarva (Gliszczynska-Świgło, 2007).

3.2.3.1 Priprava vzorcev za določanje antioksidativne aktivnosti folne kisline

Pripravili smo različne koncentracije raztopin folnih kislin v 0,1 M NaOH s pH 13 in štirih topilih z različnimi pH vrednostmi (pH 2, 4, 7 in 9).

Za določanje antioksidativne aktivnosti (AA) raztopine folne kisline v 0,1 M NaOH s pH 13 smo pripravili različne začetne izhodne koncentracije od 0,1 – 1,0 mM. K 50 μL raztopine ABTS^{•+} smo dodali 30 μL raztopine folne kisline v 0,1 M NaOH s pH 13 (v koncentracijskem območju od 0,1 mM do 1,0 mM) ter 920 μL milliQ vode in premešali. Koncentracija folne kisline v reakcijski mešanici je bila med 3,0 μM – 30,0 μM . Po 30 minutah inkubacije v temi na sobni temperaturi smo merili absorbanco pri valovni dolžini 734 nm (A_{734}). Izmerili smo tudi absorbanco kontrolnega vzorca (A_{K734}), kjer smo k 50 μL raztopine ABTS^{•+} dodali 30 μL 0,1 M raztopine NaOH ter 920 μL milliQ vode. Splei vzorec je vseboval 30 μL 0,1 M raztopine NaOH in 970 μL milliQ vode. Vsako meritev smo določili v treh paralelkah.

Za določanje AA raztopin folnih kislin s pH 9 in 7 (25 mM TRIS-HCl pufer s pH 9 in 7) smo pripravili različne začetne koncentracije od 0,1 mM do 2,0 mM v pH 9 oziroma od 0,1 mM do 3,0 mM v pH 7. K 50 μL raztopine ABTS^{•+} smo dodali 30 μL raztopine folne kisline v ustrezнем pH mediju ter dodali 920 μL milliQ vode in premešali. Koncentracija folne kisline v reakcijski mešanici je bila med 3,0 μM – 60,0 μM v pH 9 oziroma med 3,0 μM – 90,0 μM v pH 7. Po 30 minutah inkubacije v temi ter sobni temperaturi smo merili absorbanco pri valovni dolžini 734 nm (A_{734}). Izmerili smo tudi absorbanco kontrolnega vzorca (A_{K734}), kjer smo k 50 μL raztopine ABTS^{•+} dodali 30 μL raztopine 0,1 M NaOH v pH 9 oziroma pH 7 (predpriprava začetnih koncentracij od 0,1 do 2,0 mM v pH 9 oziroma od 0,1 do 3,0 mM v pH 7) ter 920 μL milliQ vode. Splei vzorec smo pripravili tako, da smo k 30 μL raztopine z ustreznim pH dodali 970 μL milliQ vode. Vsako meritev smo določili v treh paralelkah.

Za določanje AA raztopin folnih kislin s pH 4 in 2 (25 mM pufer CH₃COONa/CH₃COOH s pH 4 oziroma 2 % raztopina HCOOH s pH 2) smo pripravili različne začetne koncentracije od 0,05 do 0,3 mM. Zaradi nižje topnosti raztopin folnih kislin v kislem mediju smo začetne

raztopine dali v ultrazvočno kopel in nato centrifugirali. Raztopine so bile še vedno motne in s tem neprimerne za nadaljnjo analizo. Kljub temu smo žeeli preveriti antioksidativno aktivnost delovnih 25 µM raztopin folnih kislin v pH 4 in pH 2. Za določanje AA smo k 50 µL raztopine ABTS⁺ dodali 30 µL 25 µM raztopine folne kisline v topilu z ustreznim pH, dodali 920 µL milliQ vode in premešali. Koncentracija folne kisline v reakcijski mešanici je bila 0,75 µM. Po 30 minutah inkubacije v temi, na sobni temperaturi smo merili absorbanco pri valovni dolžini 734 nm (A₇₃₄). Izmerili smo tudi absorbanco kontrolnega vzorca (A_{k734}), kjer smo k 50 µL raztopine ABTS⁺ dodali 30 µL raztopine 0,1 M NaOH v pH 4 ozziroma pH 2 (predpriprava 25 µM raztopine 0,1 M NaOH v pH 4 ozziroma 2), ter 920 µL milliQ vode. Vsako meritev smo določili v treh paralelkah. Ker je bila dejanska koncentracija FA v kiveti prenizka oz. pod mejo občutljivosti, se je ta metoda za določanje AA folne kisline s pH 2 in 4 izkazala za neustrezno.

3.2.4 Določanje folne kisline in njenih razgradnih produktov z metodo HPLC

S HPLC metodo smo analizirali in identificirali posamezne razgradne produkte folne kisline. Njihovo prisotnost v različnih pH medijih smo analizirali s pomočjo HPLC sistema Agilent 1260 Infinity z detektorjem z diodno matriko. Kromatograme smo obdelali z računalniškim programom Agilent ChemStation Software.

3.2.4.1 Priprava raztopin vzorcev in standardov

25 µM raztopine folnih kislin in standardov (N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminska kislina; pterin-6-karboksilna kislina; pterojska kislina (Sigma-Aldrich, Nemčija)) v štirih različnih pH (2, 4, 7 in 9) so bile vedno pripravljene neposredno pred analizo. V izogib napakam je bila tudi 10 mM založna raztopina folne kisline v 0,1 M NaOH vedno pripravljena neposredno pred analizo. Vse raztopine smo predhodno filtrirali skozi 0,45 µm membranski filter in prenesli v temne steklene viale za HPLC.

3.2.4.2 Kromatografski pogoji in pogoji detekcije

HPLC: Agilent Technologies 1260 Infinity

Vakuumski razplinjevalnik:	G1322A, Degasser 1260
Binarna črpalka:	G1312B, Binary Pump 1260
Avtomatski vzorčevalnik:	G1367E, HiP ALS 1260
Termostat kolone:	G1316A
DAD:	G4212B, UV-VIS DAD detektor 1260

Pogoji

Način kromatografije:	RP (reverzna faza)
Kromatografska predkolona:	Eclipse XDB-C18; 4,6 x 12,5 mm; 5 µm (Agilent Technologies, ZDA)
Kromatografska kolona:	Zorbax Eclipse Plus C18; 4,6 x 150 mm; 3,5 µm (Agilent Technologies)
Mobilna faza A:	2 % HCOOH (milliQ voda : mravljična kislina, 98 : 2 (v/v)); ali 25 mM CH ₃ COONa/CH ₃ COOH pufer s pH 4; ali 25 mM TRIS-HCl pufer s pH 7; ali 25 mM TRIS-HCl pufer s pH 9
Mobilna faza B:	acetonitril : metanol, 85 : 15 (v/v)
Volumen injiciranja:	10 µL
Temperatura vzorcev:	25 °C
Temperatura kolone:	25 °C

V preglednici 6 je opisana gradientna metoda, ki smo jo uporabili za analizo s tekočinsko kromatografijo.

Preglednica 6: Gradient tekočinske kromatografije pri določanju razgradnih produktov folne kislino.

Čas (min)	Mobilna faza A (%)	Mobilna faza B (%)	Pretok (mL/min)
0,00	98	2	0,500
1,00	98	2	0,500
5,00	94	6	0,500
15,00	80	20	0,500
20,00	60	40	0,500
22,00	60	40	0,500
23,00	98	2	0,500
27,00	98	2	0,500

Čas trajanja analize vzorcev je znašal 27 minut. Spektri so bili posneti v območju valovnih dolžin med 200 nm in 400 nm z $\Delta\lambda = 2$ nm, medtem ko je bila za detekcijo folne kislino in razgradnih produktov izbrana valovna dolžina $\lambda = 280$ nm. Folno kislino (Sigma-Aldrich, Nemčija) in njene razgradne produkte smo kvantitativno primerjali z raztopinami treh standardov (N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminska kislina (pABGA; $M_w = 266,25$); pterin-6-karboksilna kislina (PCA; $M_w = 207,15$); pterojska kislina (PA; $M_w = 312,29$)) proizvajalca Sigma-Aldrich (Nemčija). Kvantitativna določitev je temeljila na osnovi primerjave površin kromatografskih vrhov in retencijskih časov pri 25 µM raztopinah folnih kislín v različnih pH medijih oziroma njenih razgradnih produktov s površino vrhov in retencijskimi časi znanih standardov.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE VPLIVA pH VREDNOSTI IN TEMPERATURE NA STABILNOST FOLNE KISLINE

Z uporabo UV-VIS spektrofotometrije (Cary 100 Bio) smo določali stabilnost 25 µM in 15 µM raztopin folnih kislin s štirimi različnimi pH vrednostmi (2, 4, 7 in 9), v območju temperatur med 25 °C in 85 °C. Posneti absorpcijski spektri, spremeljni v območju valovnih dolžin med 200 nm in 600 nm so v prilogah (Priloga A, B, C, D, E in F). Spektri predstavljajo povprečje dveh paralelnih meritev. Z merjenjem smo pričeli po 10 minutah inkubacije na željeni temperaturi.

Izhodne 25 µM raztopine folne kisline so bile pripravljene v 2 % raztopini HCOOH s pH 2; 25 mM CH₃COONa/CH₃COOH pufru s pH 4 ter 25 mM TRIS-HCl pufru s pH 7 in 9. Stabilnost 25 µM raztopin folnih kislin smo spremeljali v temperaturnem območju med 25 °C in 85 °C. Zaradi predvidene slabše topnosti folne kisline pri nizkih pH vrednostih smo dodatno določali stabilnost 15 µM raztopin folnih kislin s pH 2 in 4. Pri izhodnih 15 µM raztopinah folnih kislin, ki so bile pripravljene v 2 % raztopini HCOOH s pH 2 in 25 mM CH₃COONa/CH₃COOH pufru s pH 4, smo ugotavljali stabilnost le v temperaturnem območju od 25 °C do 55 °C.

S spektrov (Priloge A - F) je razvidno, da imajo raztopine folnih kislin v različnih pH medijih značilne oblike spektrov, ki se med seboj razlikujejo. Folna kislina absorbira svetlobo v UV območju z vrhovi v UVA in UVB spektru. Pri valovnih dolžinah, daljših od 340 nm, je absorbiran le manjši delež sevanja. Izkazalo se je, da nobena od raztopin folnih kislin ni spremenila spektra, če se je spremenila le temperatura, torej ima pH večji vpliv na stabilnost folne kisline kot maksimalna T = 85 °C.

Absorpcijski maksimumi 25 µM raztopin FA s pH 2, v temperaturnem območju od 25 °C do 85 °C, so v območju od 287 nm do 283 nm. Zaradi povišanja temperature se pomaknejo v smeri krajevih valovnih dolžin. Enako velja za 15 µM raztopine FA s pH 2 (povišanje T od 25 °C do 55 °C), le da so ti maksimumi v območju od 288 nm do 285 nm.

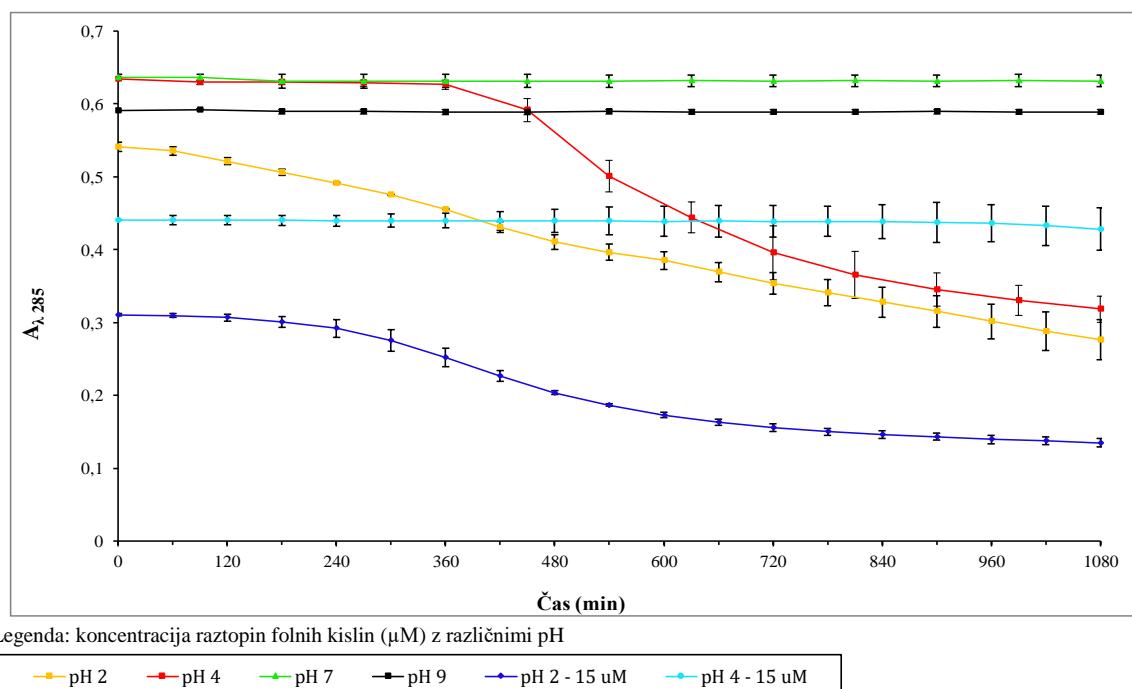
25 µM in 15 µM raztopine FA s pH 4 imajo tri absorpcijske maksimume. 25 µM raztopinam FA se s povišanjem temperature od 25 °C do 85 °C prvi maksimum pomakne v smeri krajevih valovnih dolžin (221 nm – 217 nm), drugi je v območju od 280 nm in 282 nm ter tretji v območju od 340 nm do 346 nm. Pri 15 µM raztopinah FA s pH 4 je prvi maksimum pri 219 nm pri temperaturah 25 °C, 45 °C in 55 °C. Pri 35 °C se pomakne k valovni dolžini 232 nm, kar je najverjetnejše napaka pri eksperimentu. Drugi je v območju 283 nm in se z višanjem temperature na 55 °C pomakne v smeri krajevih valovnih dolžin k 280 nm. Tretji se prav tako pomakne v smeri krajevih valovnih dolžin od 348 nm do 346 nm.

Pri pH 7 ima 25 μM raztopina FA ob povišanju temperature ($25^\circ\text{C} – 85^\circ\text{C}$) prvi maksimum absorpcije v območju od 200 nm do 202 nm in drugega pri 280 nm, razen pri 55°C , kjer znaša 278 nm. Tretji maksimum je v območju 345 nm do 348 nm.

UV-VIS absorpcijski spekter raztopin FA s pH 9 prikazuje štiri maksimume. Prvi je pri 210 nm in se ob povišanju temperature ($25^\circ\text{C} – 85^\circ\text{C}$) pomakne v smeri daljših valovnih dolžin k 216 nm. Drugi je pri 257 nm in ob povišanju temperature postane prevoj in pri 85°C izgine. Tretji absorpcijski vrh ostane nespremenjen pri 282 nm, medtem ko se četrti pri povišanju temperature pomakne v smeri krajših valovnih dolžin, od 365 nm do 357 nm.

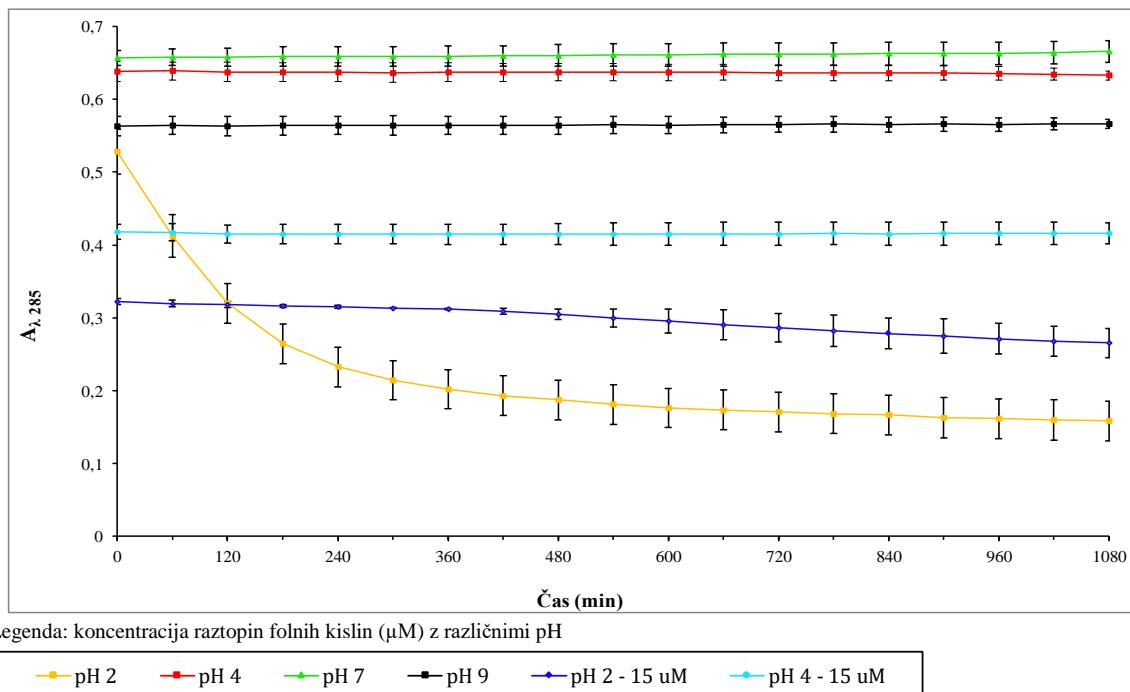
Oblika absorpcijskega spektra folne kisline je neodvisna od koncentracije folne kisline in sledi Beer-Lambert-ovem zakonu za nizke koncentracije (Off in sod., 2005), kar je razvidno iz absorpcijskih spektrov analiziranih 15 μM in 25 μM raztopin folnih kislin s pH 2 in 4 v temperaturnem območju od 25°C do 55°C , saj so ti ohranili isto obliko.

Slike (11 – 17) prikazujejo vpliv povišanja temperature na stabilnost raztopin folnih kislin z različnimi pH vrednostmi. Pri 25°C (slika 11) so v času 18 ur stabilne le 25 μM raztopini FA s pH 7 in pH 9 ter 15 μM raztopina FA s pH 4, saj se absorbance spremeljane pri $\lambda = 285\text{ nm}$ ($A_{\lambda=285}$) s časom ne spreminja. 25 μM raztopina FA s pH 4 je stabilna le v času 6 ur, nato se njena $A_{\lambda=285}$ močno zniža. Enako velja za 15 μM raztopino FA s pH 2, le da je ta stabilna le 2 uri. 25 μM raztopina FA s pH 2 je nestabilna.



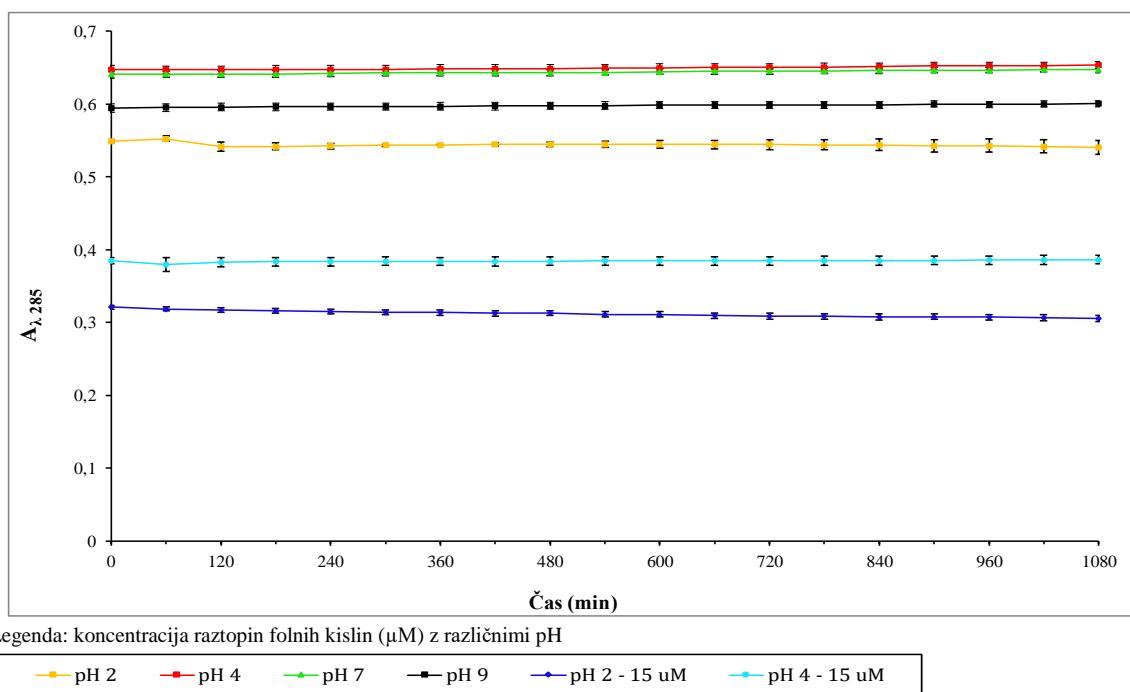
Slika 11: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremeljana pri valovni dolžini $\lambda = 285\text{ nm}$, 25 μM raztopin folnih kislin z različnimi pH (2, 4, 7, 9) ter 15 μM raztopin folnih kislin s pH 2 in 4 pri temperaturi 25°C .

Pri povišanju temperature na 35 °C (slika 12) je opazno, da ima višja temperatura vpliv na topnost folne kisline. Absorbance ($A_{\lambda=285}$) 25 µM raztopin FA s pH 4, 7 in 9 ter 15 µM raztopine FA s pH 4 se s časom niso spremajale. 25 µM raztopina FA s pH 2 je še vedno precej nestabilna, saj se $A_{\lambda=285}$ s časom še vedno znižuje. Pri 15 µM raztopini FA s pH 2 je zaznati le rahlo znižanje $A_{\lambda=285}$ s časom, vendar je to v okviru napake, torej je stabilna.



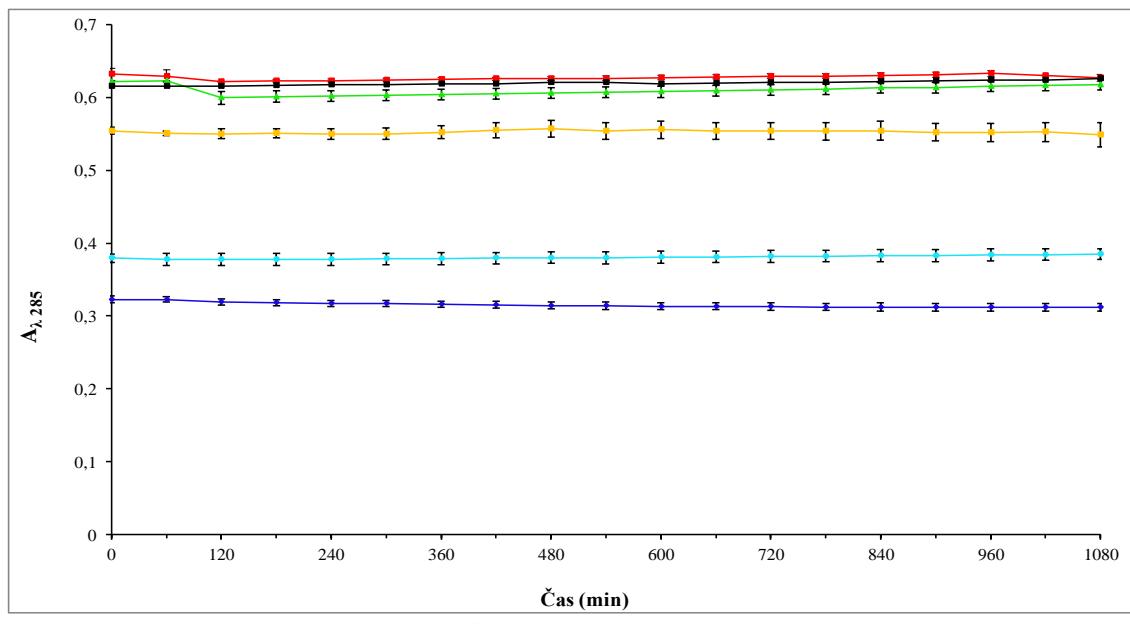
Slika 12: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm, 25 µM raztopin folnih kislin z različnimi pH (2, 4, 7, 9) ter 15 µM raztopin folnih kislin s pH 2 in 4 pri temperaturi 35 °C.

Pri temperaturi 45 °C (slika 13) so stabilne vse 25 µM raztopine FA s pH 4, 7 in 9, saj se $A_{\lambda=285}$ s časom ne spremajajo. Tudi pri 15 µM raztopinah FA s pH 2 in 4 je $A_{\lambda=285}$ nespremenjena. Pri 25 µM raztopini FA s pH 2 se $A_{\lambda=285}$ po eni uri zniža in nato ostane nespremenjena.



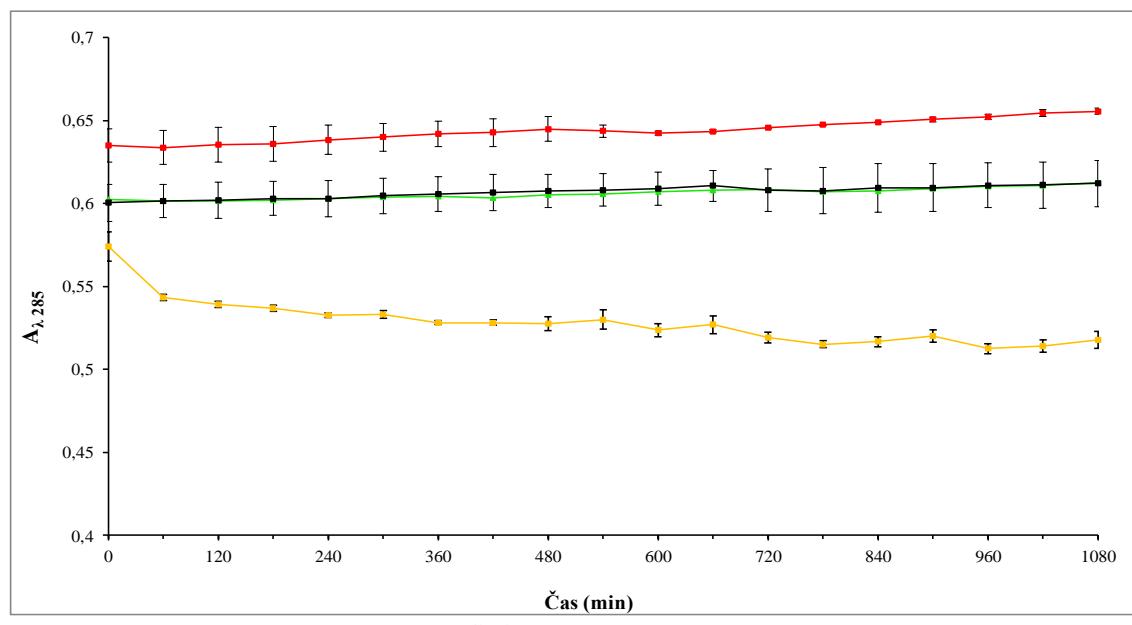
Slika 13: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm, 25 μM raztopin folnih kislin z različnimi pH (2, 4, 7, 9) ter 15 μM raztopin folnih kislin s pH 2 in 4 pri temperaturi 45 °C.

Pri temperaturi 55 °C (slika 14) ni opaznega znižanja $A_{\lambda=285}$ pri 25 μM raztopinah FA s pH 2, 4 in 9. Prav tako ne pri 15 μM raztopinah FA s pH 2 in 4. Pri 25 μM raztopini FA s pH 7 se $A_{\lambda=285}$ po 1 uri zniža, nato je absorbanca nespremenjena.



Slika 14: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm, 25 μM raztopin folnih kislin z različnimi pH (2, 4, 7, 9) ter 15 μM raztopin folnih kislin s pH 2 in 4 pri temperaturi 55 °C.

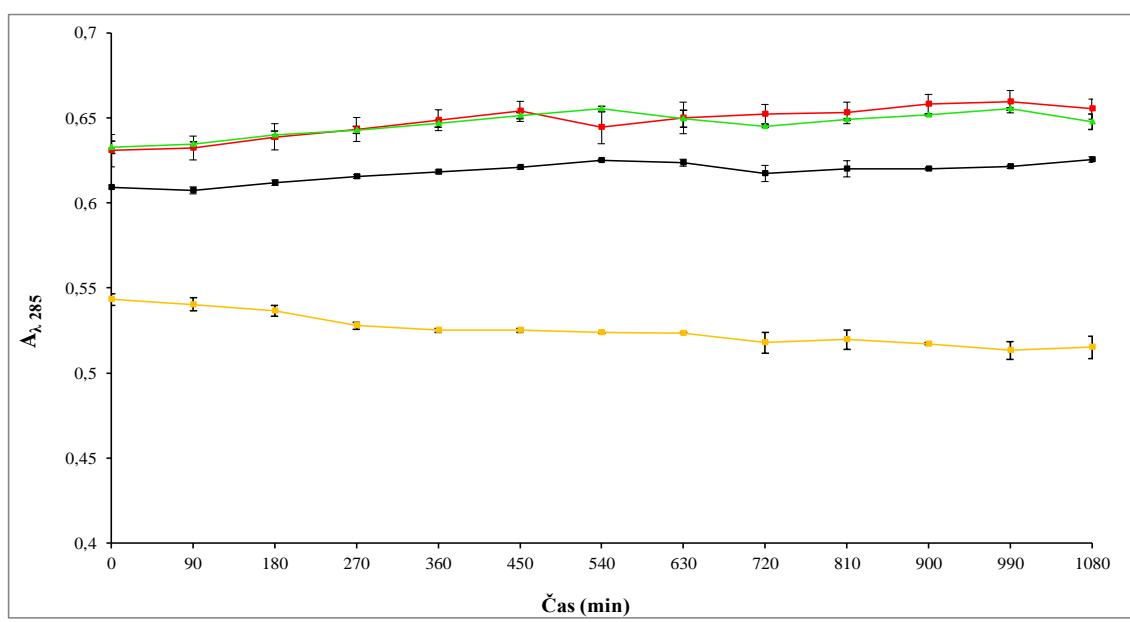
S povišanjem temperature na 65 °C (slika 15) opazimo, da so 25 µM raztopine FA s pH 4, 7 in 9 še vedno stabilne v času 18 ur. Pri 25 µM raztopini FA s pH 2 se $A_{\lambda=285}$ s časom zopet rahlo znižuje, kar je opazno tudi pri višjih temperaturah 75 °C (slika 16) in 85 °C (slika 17). 25 µM raztopinam FA s pH 4, 7 in 9 se pri teh temperaturah $A_{\lambda=285}$ v času 18 ur ne spreminja, saj je rahlo zvišanje $A_{\lambda=285}$ s časom v okviru eksperimentalne napake.



Legenda: koncentracija raztopin folnih kislin (µM) z različnimi pH



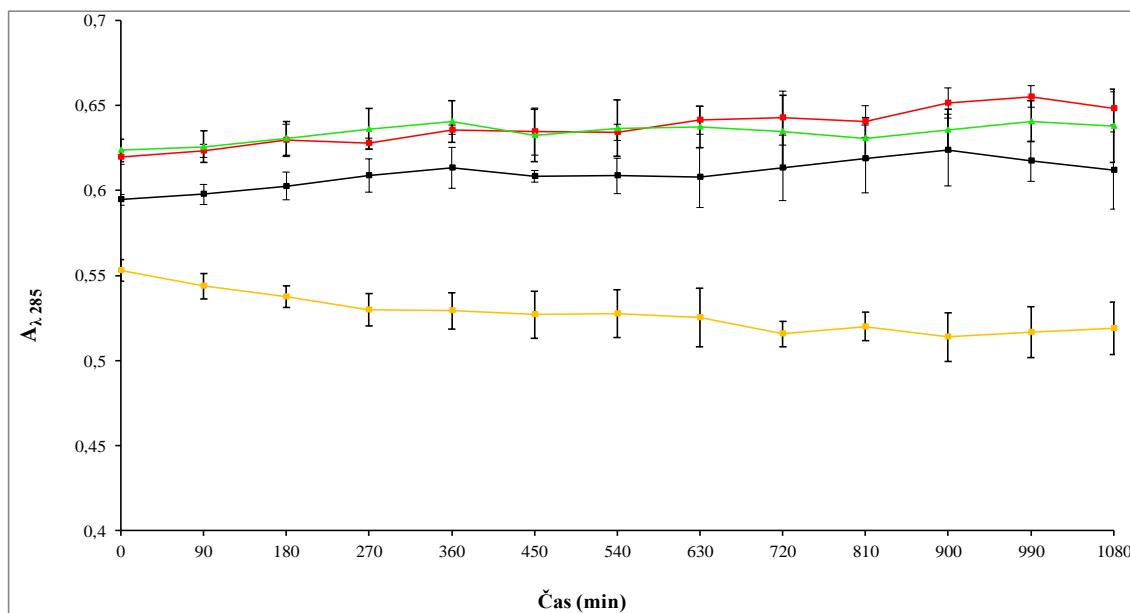
Slika 15: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm, 25 µM raztopin folnih kislin z različnimi pH (2, 4, 7, 9) pri temperaturi 65 °C.



Legenda: koncentracija raztopin folnih kislin (μM) z različnimi pH

■ pH 2 ■ pH 4 ■ pH 7 ■ pH 9

Slika 16: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285 \text{ nm}$, $25 \mu\text{M}$ raztopin folnih kislin z različnimi pH (2, 4, 7, 9) pri temperaturi 75°C .

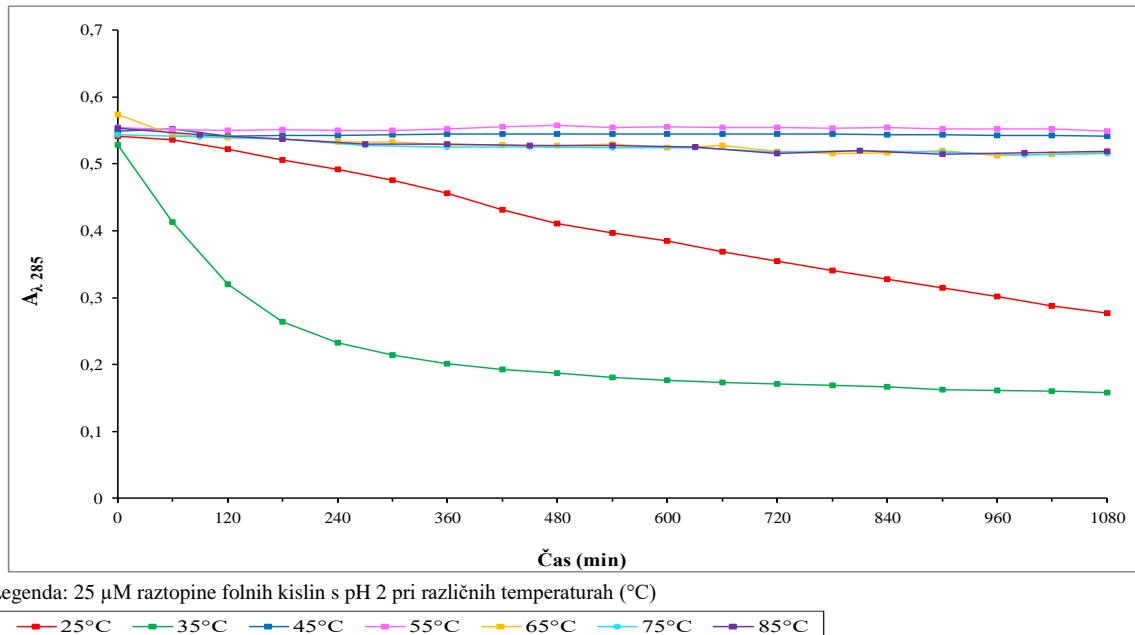


Legenda: koncentracija raztopin folnih kislin (μM) z različnimi pH

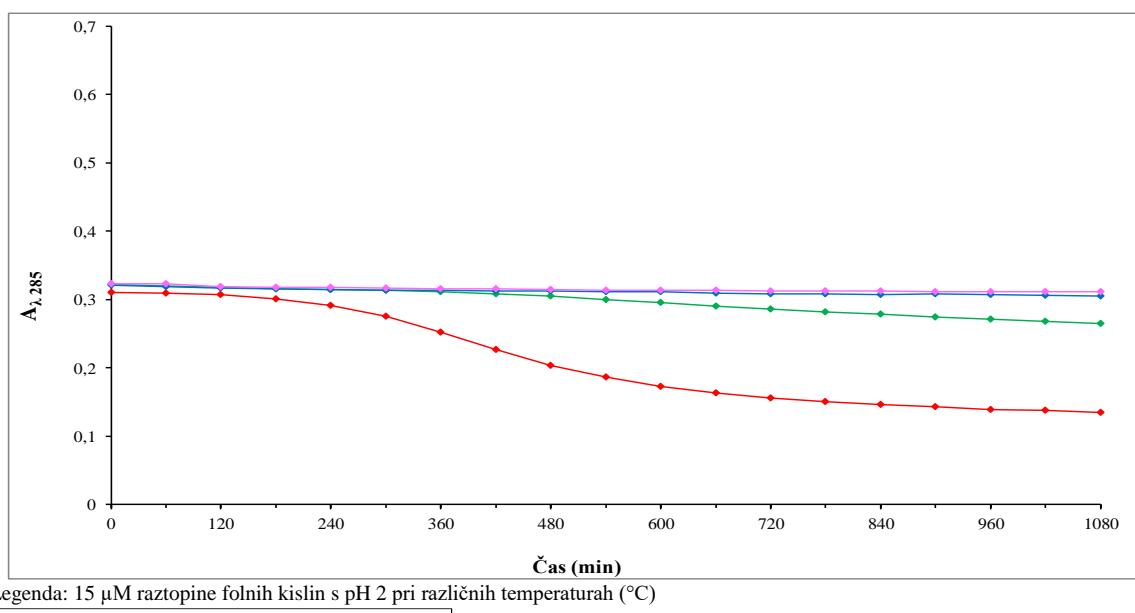
■ pH 2 ■ pH 4 ■ pH 7 ■ pH 9

Slika 17: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285 \text{ nm}$, $25 \mu\text{M}$ raztopin folnih kislin z različnimi pH (2, 4, 7, 9) pri temperaturi 85°C .

Razvidno je, da ima $25 \mu\text{M}$ raztopina folne kisline s pH 2 (slika 18) najvišjo stabilnost pri 45°C in 55°C . Pri višjih temperaturah (65°C – 85°C) pride do rahlega znižanja absorbanc. Pri temperaturah 25°C in 35°C FA ni stabilna, saj se absorbanca s časom močno zniža. Tudi $15 \mu\text{M}$ raztopina folne kisline s pH 2 (slika 19) je stabilna pri temperaturah 35°C (v okviru napake), 45°C in 55°C . Pri temperaturi 25°C se absorbanca s časom znižuje.

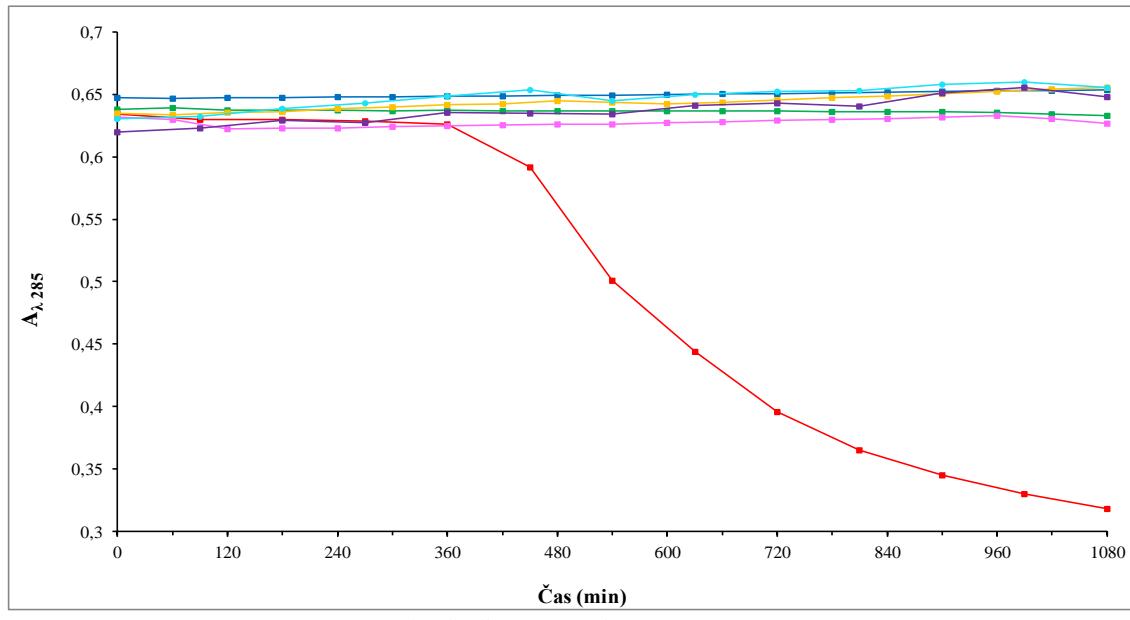


Slika 18: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285 \text{ nm}$, $25 \mu\text{M}$ raztopin folnih kislin pri različnih temperaturah (25°C , 35°C , 45°C , 55°C , 65°C , 75°C in 85°C) s pH 2.



Slika 19: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285 \text{ nm}$, $15 \mu\text{M}$ raztopin folnih kislin s pH 2 pri različnih temperaturah (25°C , 35°C , 45°C in 55°C).

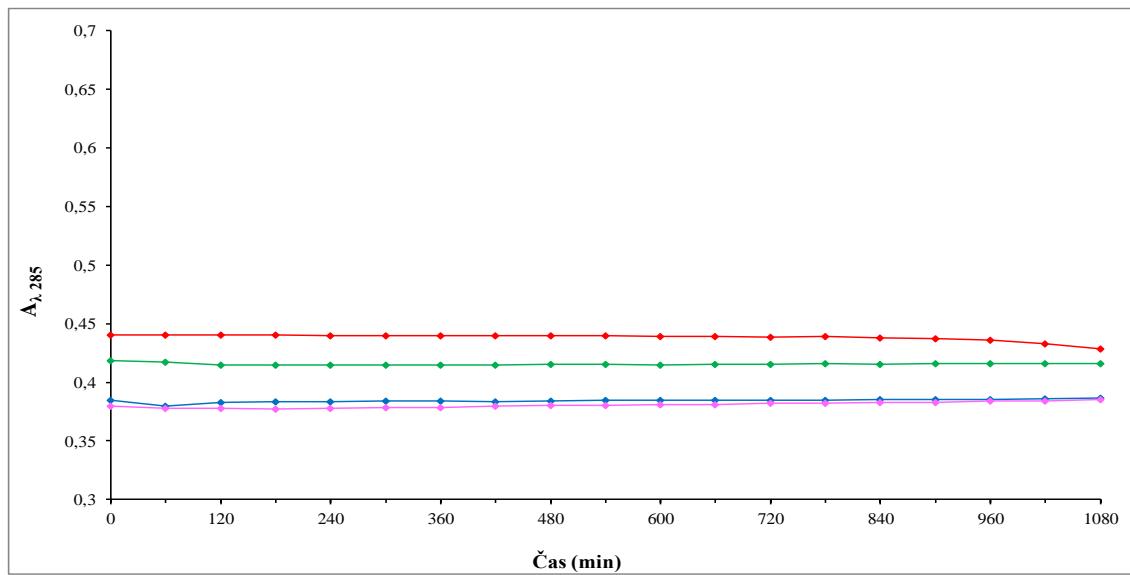
Pri 25 µM raztopini folne kisline s pH 4 (slika 20) je padec absorbance s časom opazen le pri temperaturi 25 °C po šestih urah, medtem ko sprememba absorbance v območju med 35 °C in 85 °C ni tako opazna. 15 µM raztopina folne kisline s pH 4 (slika 21) je stabilna v temperaturnem območju od 25 °C do 55 °C, saj se absorbanca s časom ne spreminja. Le pri temperaturi 25 °C je v času 16 ur do 18 ur opazno znižanje absorbance, ki je v okviru napake.



Legenda: 25 µM raztopine folnih kislin s pH 4 pri različnih temperaturah (°C)

—●— 25°C —■— 35°C —■— 45°C —●— 55°C —●— 65°C —●— 75°C —■— 85°C

Slika 20: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm, 25 µM raztopin folnih kislin s pH 4 pri različnih temperaturah (25 °C, 35 °C, 45 °C, 55 °C, 65 °C, 75 °C in 85 °C).

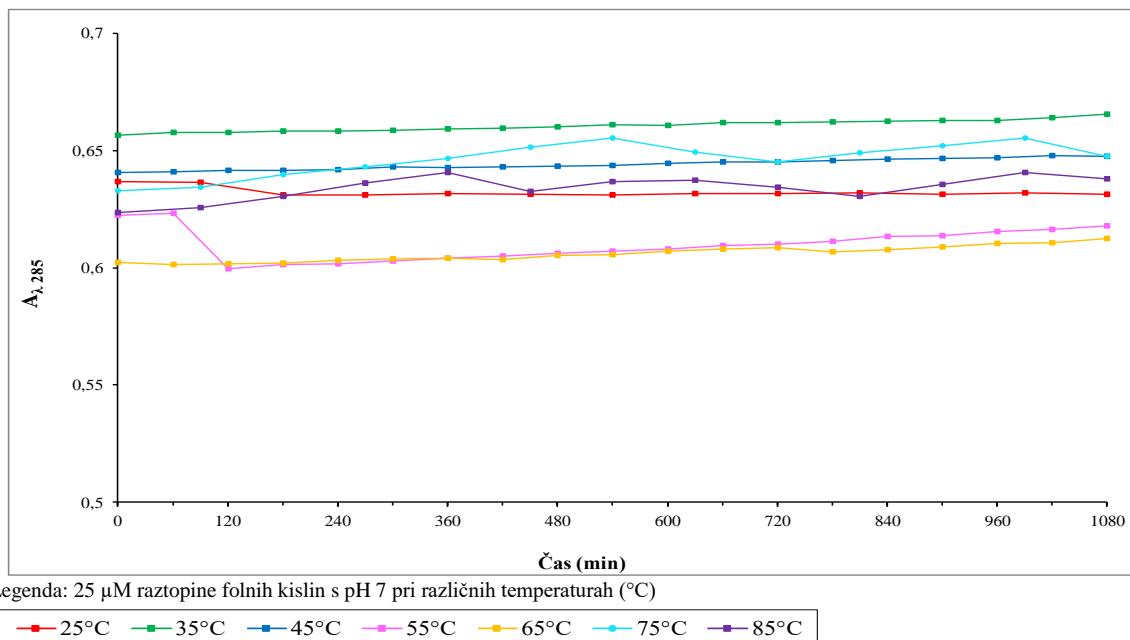


Legenda: 15 µM raztopine folnih kislin s pH 4 pri različnih temperaturah (°C)

—●— 25°C —■— 35°C —■— 45°C —●— 55°C

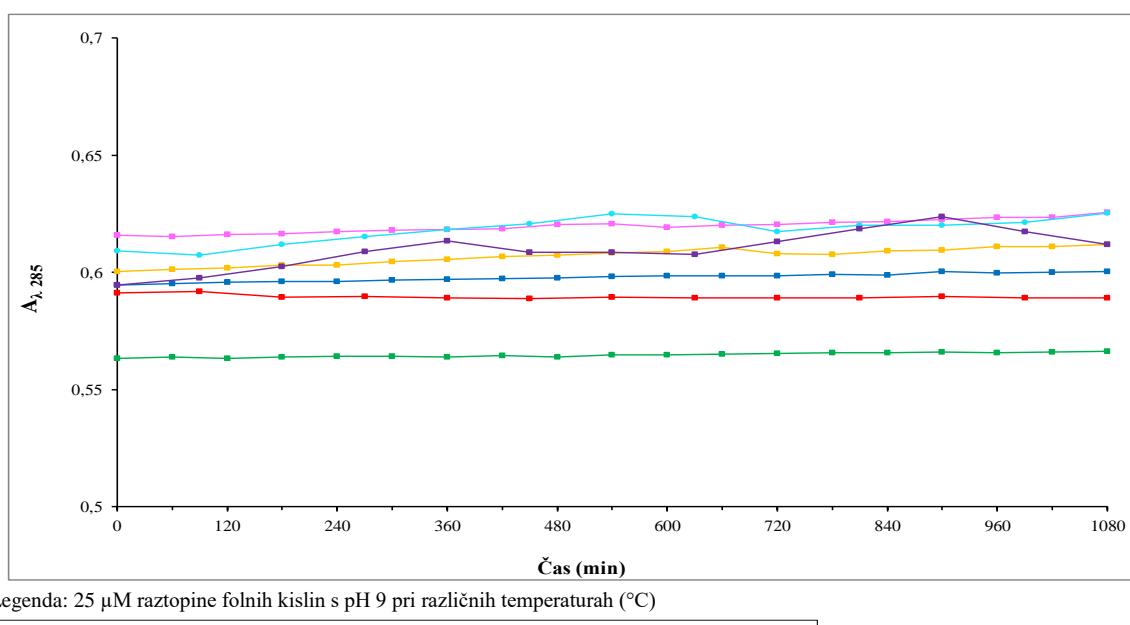
Slika 21: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm, 15 µM raztopin folnih kislin s pH 4 pri različnih temperaturah (25 °C, 35 °C, 45 °C in 55 °C).

25 μM raztopina folne kisline s pH 7 (slika 22) je stabilna pri povišanju temperature v območju 25 °C in 85 °C. Le pri temperaturi 55 °C se po 1 uri absorbanca zniža in je konstantna v času 10 ur, nato rahlo narašča.



Slika 22: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285 \text{ nm}$, 25 μM raztopin folnih kislin s pH 7 pri različnih temperaturah (25 °C, 35 °C, 45 °C, 55 °C, 65 °C, 75 °C in 85 °C).

25 μM raztopina folne kisline s pH 9 (slika 23) je stabilna v temperaturnem območju od 25 °C do 65 °C. Pri višjih temperaturah, 75 °C in 85 °C, je opazno rahlo zvišanje absorbance.

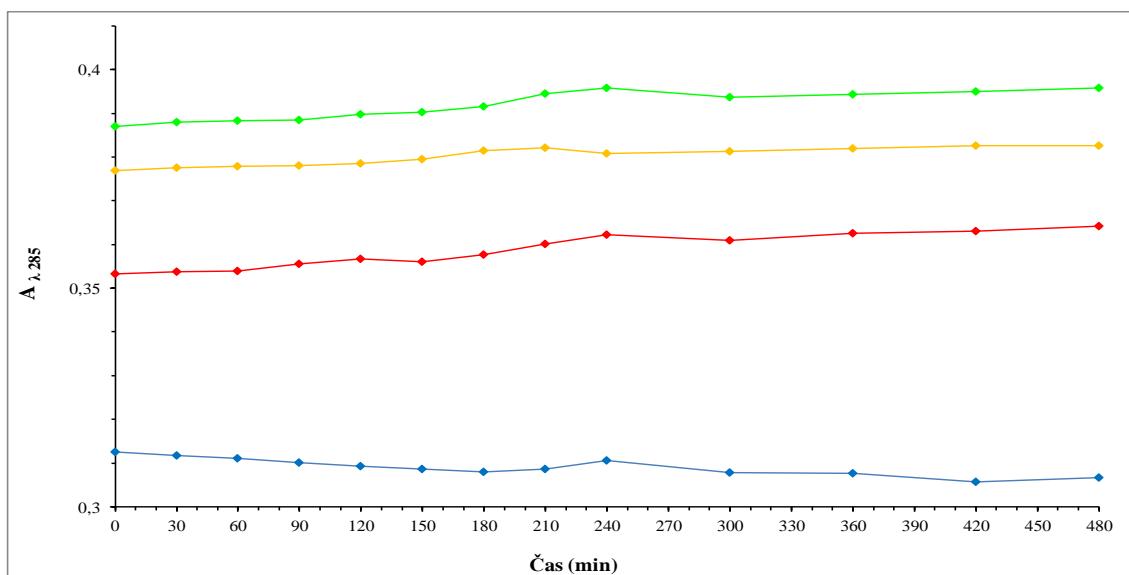


Slika 23: Absorbanca v odvisnosti od časa, spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 285 \text{ nm}$, 25 μM raztopin folnih kislin s pH 9 pri različnih temperaturah (25 °C, 35 °C, 45 °C, 55 °C, 65 °C, 75 °C in 85 °C).

4.2 DOLOČANJE VPLIVA DNEVNE SVETLOBE IN SVETLOBE ENERGIJSKO VARČNE SIJALKE NA STABILNOST FOLNE KISLINE

Z raziskovalno nalogo smo želeli pokazati, da imata osvetljevanje z energijsko varčno sijalko, ki oddaja hladno belo svetljivo in izpostavljenost dnevni svetlobi vpliv na stabilnost raztopin folnih kislin z različnimi pH vrednostmi v primerjavi s tistimi, ki so bile z aluminijasto folijo zaščitene pred viri svetlobe. Poskus smo izvedli pri sobni temperaturi 25 °C. Raztopinam folnih kislin z različnimi pH (2, 4, 7 in 9), ki so bile izpostavljene svetlobi energijsko varčne sijalke (karakteristike: 20 W E27 6400K CE 220-240V 50/60 HZ) in dnevni svetlobi, ter tistim, ki so bile zaščitene pred viri svetlobe, smo s pomočjo UV-VIS spektrofotometrije izmerili absorpcijske spekture v različnih časih izpostavljenosti (od 0 do 480 minut).

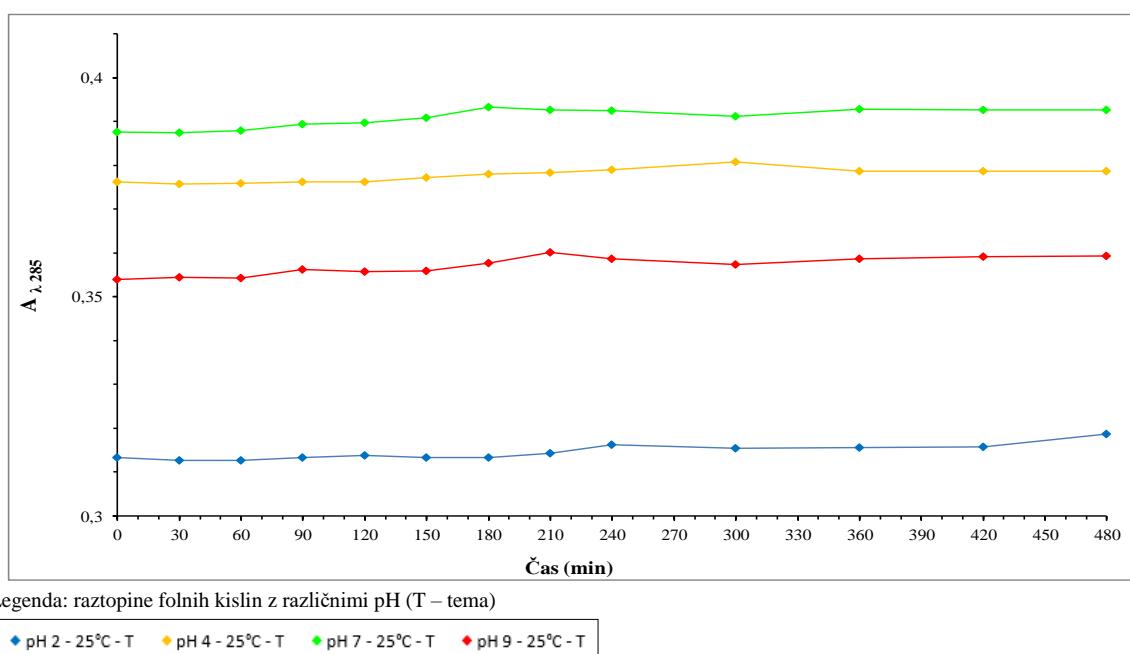
Eksperimentalni rezultati so predstavljeni kot spreminjanje absorbance, spremeljane pri valovni dolžini $\lambda = 285$ nm ($A_{\lambda=285}$), v odvisnosti od časa pri 15 μM raztopinah folnih kislin z različnimi pH (2, 4, 7 in 9), ki so bile izpostavljene svetlobi energijsko varčne sijalke, ki oddaja hladno belo svetljivo in dnevni svetlobi (slika 24), ter raztopin, ki so bile zaščitene pred svetljivo energijsko varčne sijalke in dnevno svetljivo (slika 25).



Legenda: raztopine folnih kislin z različnimi pH (S – svetloba)

• pH 2 - 25°C - S ♦ pH 4 - 25°C - S ● pH 7 - 25°C - S ◆ pH 9 - 25°C - S

Slika 24: Stabilnost 15 μM raztopin folnih kislin z različnimi pH (2, 4, 7 in 9), izpostavljenih svetlobi energijsko varčne sijalke in dnevni svetlobi, v odvisnosti od časa pri temperaturi 25 °C pri valovni dolžini 285 nm.



Legenda: raztopine folnih kislin z različnimi pH (T – tema)

◆ pH 2 - 25°C - T ♦ pH 4 - 25°C - T ♦ pH 7 - 25°C - T ♦ pH 9 - 25°C - T

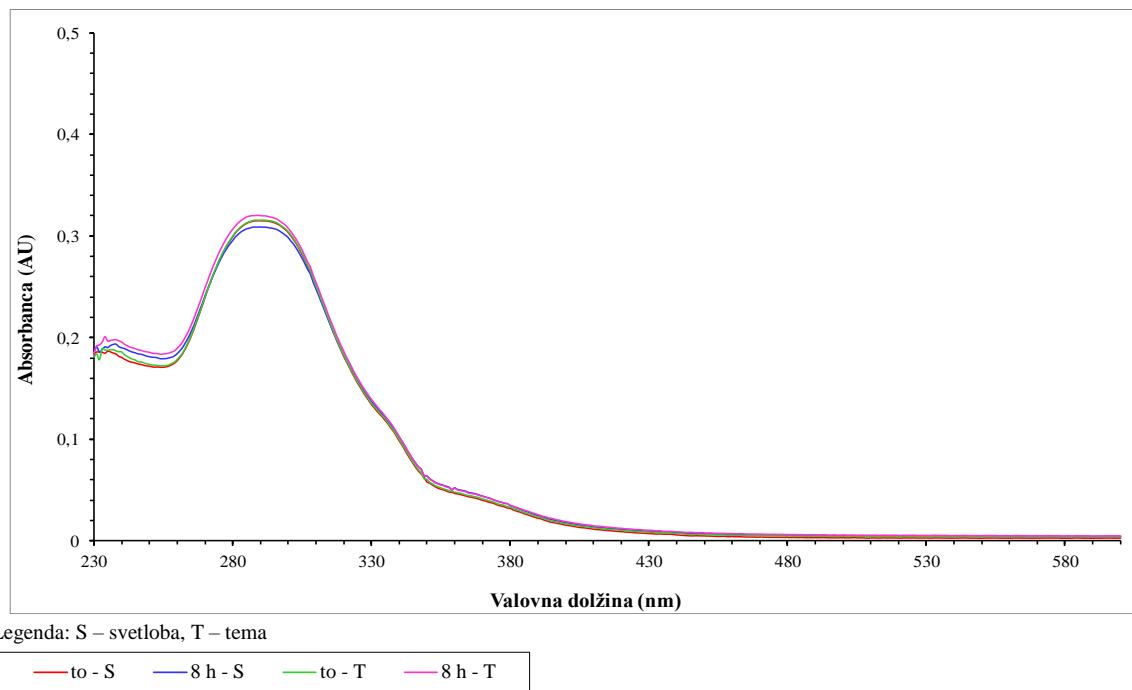
Slika 25: Stabilnost 15 μM raztopin folnih kislin v različnih pH (2, 4, 7 in 9), zaščitenih pred svetlobo energijsko varčne sijalke in dnevno svetlobo, v odvisnosti od časa pri temperaturi 25 °C pri valovni dolžini 285 nm.

Spremembe v absorbanci ($A_{\lambda=285}$) raztopin folnih kislin, spremeljanih pri valovni dolžini 285 nm, so v času osmih ur zelo majhne. V preglednici 7 so prikazane razlike med vrednostjo $A_{\lambda=285}$ v času $t = 0$ in vrednostjo $A_{\lambda=285}$ v času $t = 8$ ur za raztopine folnih kislin s pH vrednostmi 2, 4, 7 in 9 v odvisnosti od izpostavljenosti svetlobi. Slike 26, 27, 28 in 29 prikazujejo absorpcijske spektre raztopin folnih kislin z različnimi pH v času $t = 0$ in po 8 urah izpostavljenosti svetlobi (S) oz. zaščitenosti pred svetlobo (T). Rahlo zvišanje $A_{\lambda=285}$ (maksimalno 3 %) je opazno v času 8 ur pri svetlobi izpostavljenih raztopinah folnih kislin s pH 4, 7 in 9, ter pred vplivom svetlobe zaščitenih raztopinah s pH 2, 4, 7 in 9. Pri raztopini folne kisline s pH 2, ki je bila izpostavljena svetlobi, se $A_{\lambda=285}$ rahlo zniža (1,9 % znižanje absorbance).

Preglednica 7: Spremembe absorbanc raztopin folnih kislin z različnimi pH vrednostmi v odvisnosti od izpostavljenosti svetlobi.

$\Delta A_{\lambda=285}$ IZPOSTAVLJENE SVETLOBI (AU)		$\Delta A_{\lambda=285}$ ZAŠČITENE PRED SVETLOBO (AU)	
pH 2	- 0,005717	pH 2	+ 0,005474
pH 4	+ 0,005702	pH 4	+ 0,002406
pH 7	+ 0,008752	pH 7	+ 0,005186
pH 9	+ 0,011038	pH 9	+ 0,005349

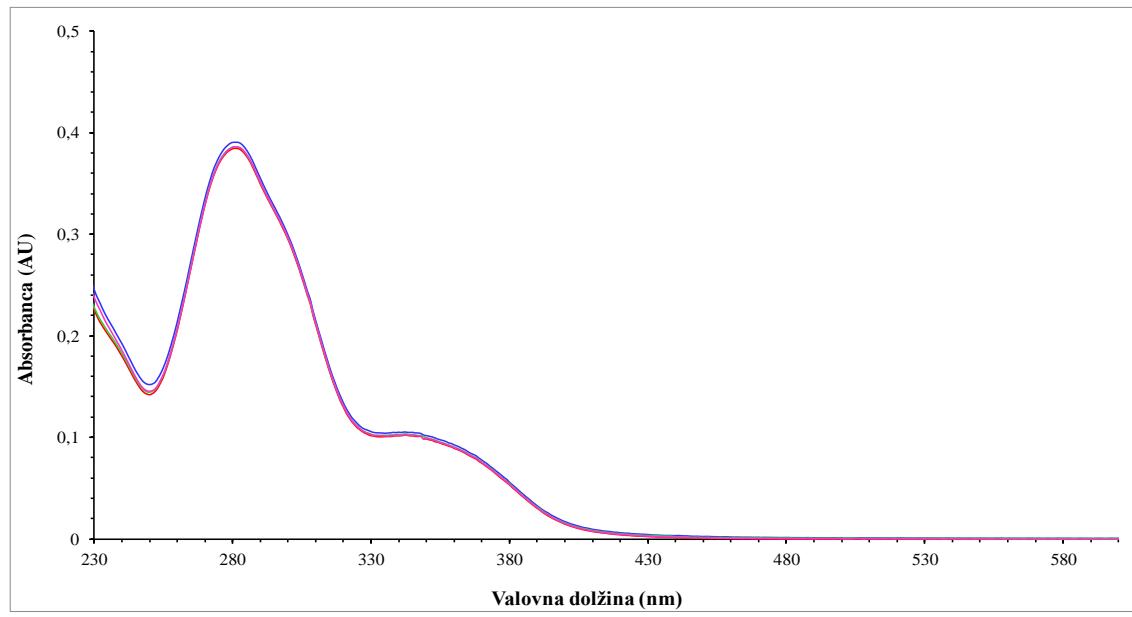
Opomba: $\Delta A_{\lambda=285} = A_{\lambda=285}$ (v času $t = 8$ ur) - $A_{\lambda=285}$ (v času $t = 0$ ur).



Legenda: S – svetloba, T – tema

— to - S — 8 h - S — to - T — 8 h - T

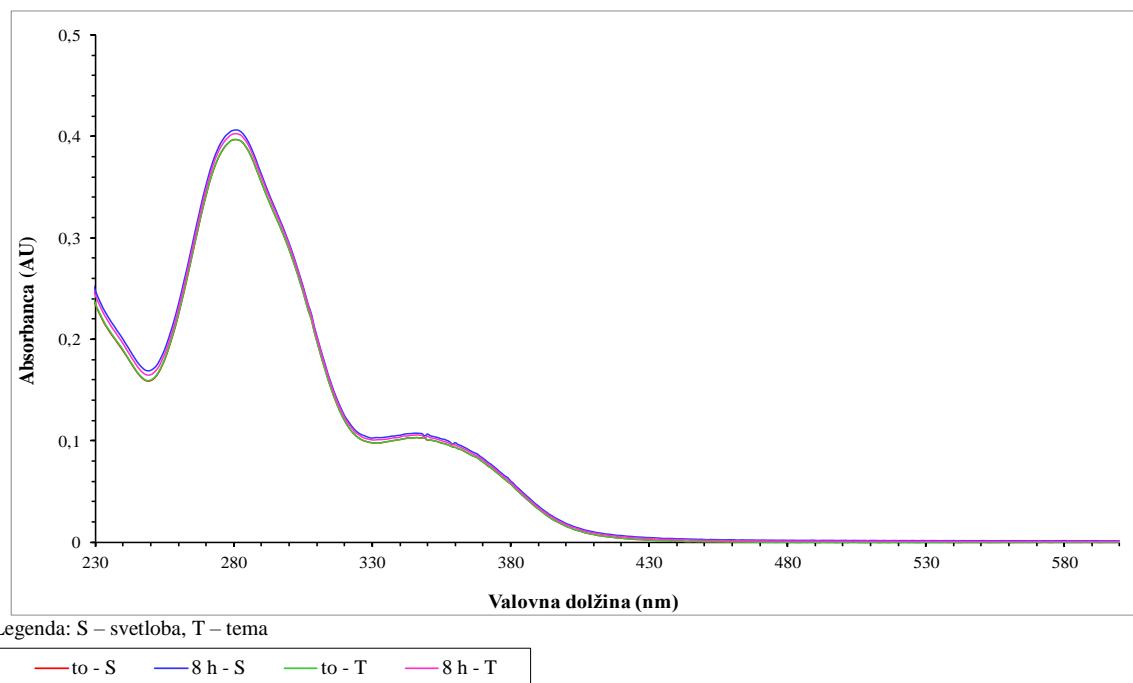
Slika 26: Absorpcijski spekter 15 μM raztopin folnih kislin s pH 2, izpostavljenih svetlobi energijsko varčne sijalke in dnevni svetlobi oziroma zaščitenih pred viri svetlobe, pri temperaturi 25 °C v času t = 0 in po 8 urah.



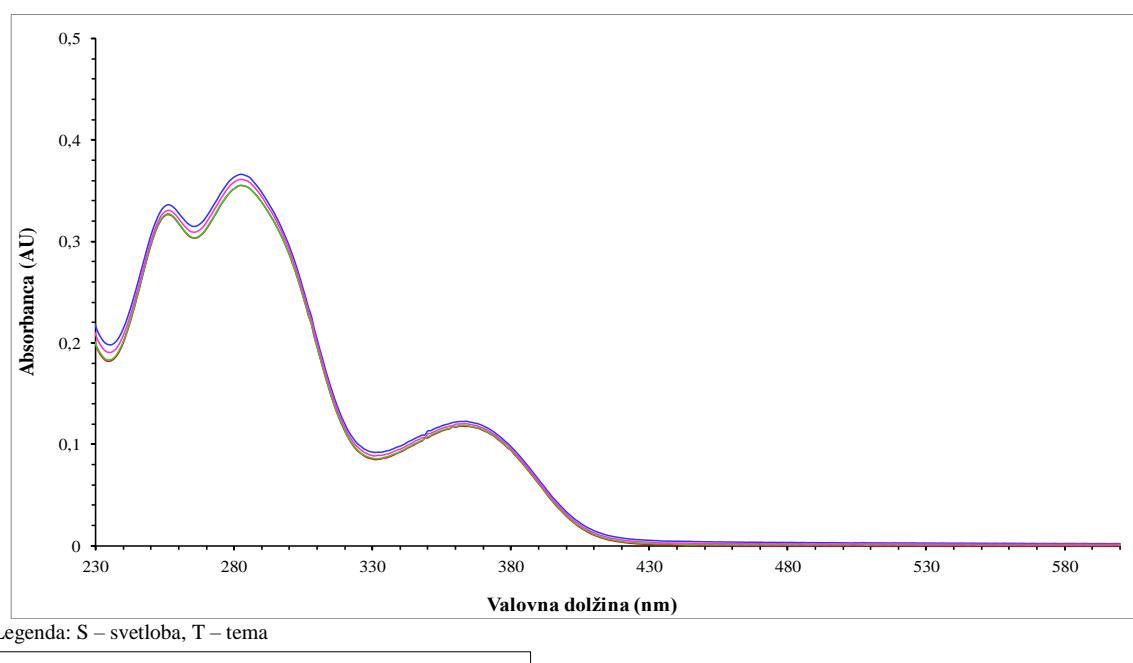
Legenda: S – svetloba, T – tema

— to - S — 8 h - S — to - T — 8 h - T

Slika 27: Absorpcijski spekter 15 μM raztopin folnih kislin s pH 4, izpostavljenih svetlobi energijsko varčne sijalke in dnevni svetlobi oziroma zaščitenih pred viri svetlobe, pri temperaturi 25 °C v času t = 0 in po 8 urah.



Slika 28: Absorpcijski spekter 15 μM raztopin folnih kislin s pH 7, izpostavljenih svetlobi energijsko varčne sijalke in dnevni svetlobi oziroma zaščitenih pred viri svetlobe, pri temperaturi 25 °C v času t = 0 in po 8 urah.



Slika 29: Absorpcijski spekter 15 μM raztopin folnih kislin s pH 9, izpostavljenih svetlobi energijsko varčne sijalke in dnevni svetlobi oziroma zaščitenih pred viri svetlobe, pri temperaturi 25 °C v času t = 0 in po 8 urah.

Absorpcijski spektri raztopin folnih kislin kažejo, da folna kislina ne absorbira sevanja uporabljene hladne bele svetlobe energijsko varčne sijalke in dnevne svetlobe, saj se spektri svetlobi izpostavljenih raztopin ne razlikujejo od spektrov raztopin, ki so bile zaščitene pred viri svetlobe. Posledica izpostavljenosti folne kisline dnevni svetlobi je razgradnja vezi folne kisline med C₉ in N₁₀, kar je razvidno v spremembah spektralnih lastnosti obsevanih raztopin (Akhtar in sod., 1999, 2003).

4.3 DOLOČANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI FOLNE KISLINE Z ABTS METODO

Za merjenje antioksidativne aktivnosti folne kisline v raztopinah z različnimi pH vrednostmi (pet različnih topil: 0,1 M NaOH s pH 13; 25 mM TRIS-HCl pufer s pH 9 in 7; 25 mM CH₃COONa/CH₃COOH pufer pH 4 in 2 % raztopina HCOOH s pH 2) smo uporabili indirektno metodo ABTS. Metoda temelji na sposobnosti antioksidantov za reakcijo z radikalnim kationom ABTS^{•+}. Z merjenjem zmanjšanja absorbance pri valovni dolžini $\lambda = 734$ nm po 30 minutah smo preučevali vpliv raztopin folnih kislin z različnimi pH vrednostmi na redukcijo radikalnega kationa ABTS^{•+} oziroma njihovo sposobnost lovljenja prostega radikala ABTS^{•+} (Gliszczynska-Świgło, 2006).

Z metodo ABTS smo določili antioksidativno aktivnost raztopin folnih kislin s pH 7, 9 in 13 v koncentracijskem območju od 3 µM do 30 µM (pri FA s pH 13) oziroma od 3 µM do 60 µM (pri FA s pH 9) ter od 3 µM do 90 µM (pri FA s pH 7). Zaradi omejene nizke topnosti folne kisline v kislem, nismo uspeli pripraviti ustreznih izhodnih raztopin za analizo pri raztopinah FA s pH 2 in 4. 25 µM koncentracija raztopin FA s pH 2 in 4, je najvišja koncentracija, pri kateri je folna kislina topna. Pri ABTS testu iz te izhodne 25 µM raztopine FA s pH 2 in 4, so bile koncentracije v kivetih 0,75 µM, kar je pod mejo občutljivosti te metode.

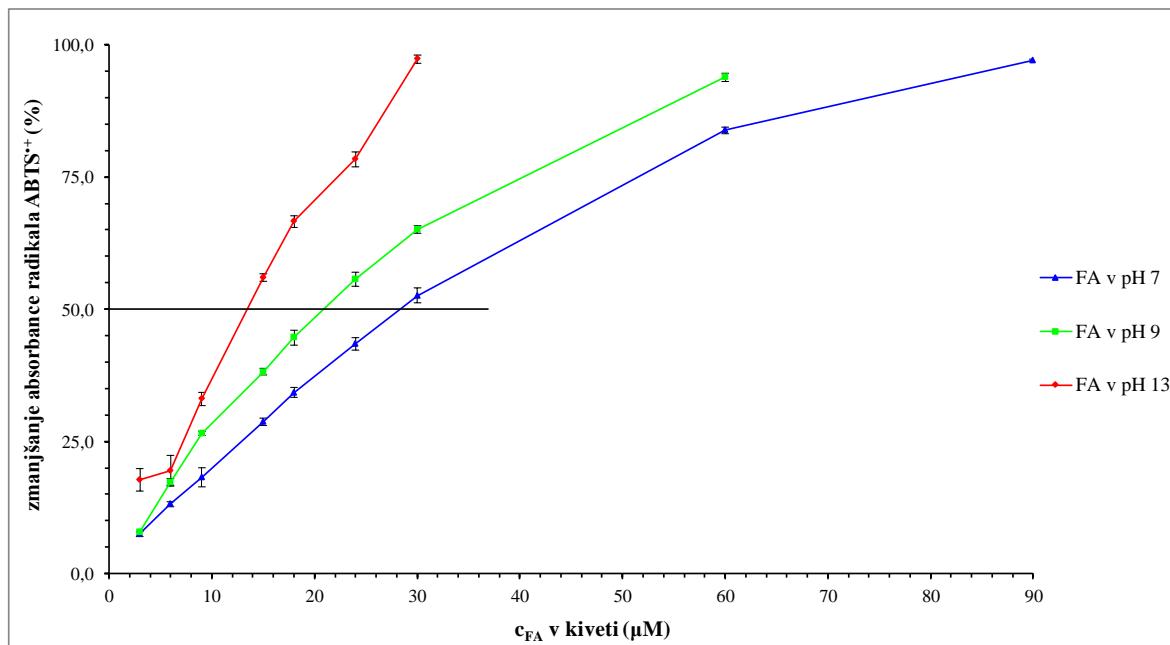
Zmanjšanje absorbance radikala ABTS^{•+} (%) smo izračunali z enačbo 1. Rezultati so prikazani v preglednici 8, kjer je A_{k734} absorbanca kontrole [AU], izmerjena pri $\lambda = 734$ nm; A_{v734} absorbanca vzorca [AU], izmerjena pri $\lambda = 734$ nm, $\Delta A_{(k734 - v734)}$ sprememba absorbance kontrole – vzorca [AU].

$$\text{zmanjšanje absorbance radikala ABTS}^{•+} = \left(\frac{\Delta A_{(k734 - v734)}}{A_{k734}} \right) \times 100 \% \quad \dots (1)$$

Preglednica 8: Spremljanje zmanjšanja absorbance radikala ABTS⁺ pri raztopinah folnih kislin z različnimi vrednostmi pH oziroma v različnih topilih.

c_{FA} začetna (mM)	c_{FA} v kiveti (μ M)	zmanjšanje absorbance radikala ABTS ⁺ (%)		
		FA s pH 13	FA s pH 9	FA s pH 7
3,0	90,0	/	/	97,1 ± 0,2
2,0	60,0	/	93,8 ± 0,4	83,8 ± 0,6
1,0	30,0	97,3 ± 0,8	65,1 ± 0,8	52,6 ± 1,4
0,8	24,0	78,3 ± 1,4	55,6 ± 0,7	43,5 ± 1,2
0,6	18,0	66,6 ± 1,1	44,7 ± 1,3	34,3 ± 0,9
0,5	15,0	56,0 ± 0,7	38,2 ± 1,4	28,7 ± 0,7
0,3	9,0	33,0 ± 1,3	26,5 ± 0,6	18,2 ± 1,8
0,2	6,0	19,4 ± 2,9	17,3 ± 0,4	13,2 ± 0,5
0,1	3,0	17,7 ± 2,1	7,9 ± 0,6	7,5 ± 0,5

Slika 30 prikazuje zmanjšanje absorbance radikala ABTS⁺ (%) oziroma zmanjšanje začetne vrednosti radikala ABTS⁺ za raztopine folnih kislin v različnih topilih. Razvidno je, da ima pH topila v katerem je raztopljena folna kislina vpliv na antioksidativno aktivnost folne kisline. V alkalnem topilu je za 50 % zmanjšanje začetne vrednosti radikala ABTS⁺ potrebna 13 μ M koncentracija folne kisline, raztopljene v 0,1 M NaOH s pH 13, ter 21 μ M koncentracija folne kisline, raztopljene v 25 mM TRIS-HCl pufru s pH 9. Pri nevtralnih vrednostih pH je za 50 % zmanjšanje začetne vrednosti radikala ABTS⁺ potrebna 28 μ M koncentracija folne kisline, raztopljene v 25 mM TRIS-HCl pufru s pH 7. Raztopine folne kisline v 0,1 M NaOH s pH 13 imajo najvišjo antioksidativno aktivnost.



Slika 30: Spremljanje zmanjšanja absorbance radikala ABTS⁺ (%) v raztopinah folnih kislin z različnimi pH vrednostmi.

4.4 DOLOČANJE FOLNE KISLINE IN NJENIH RAZGRADNIH PRODUKTOV S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI (HPLC)

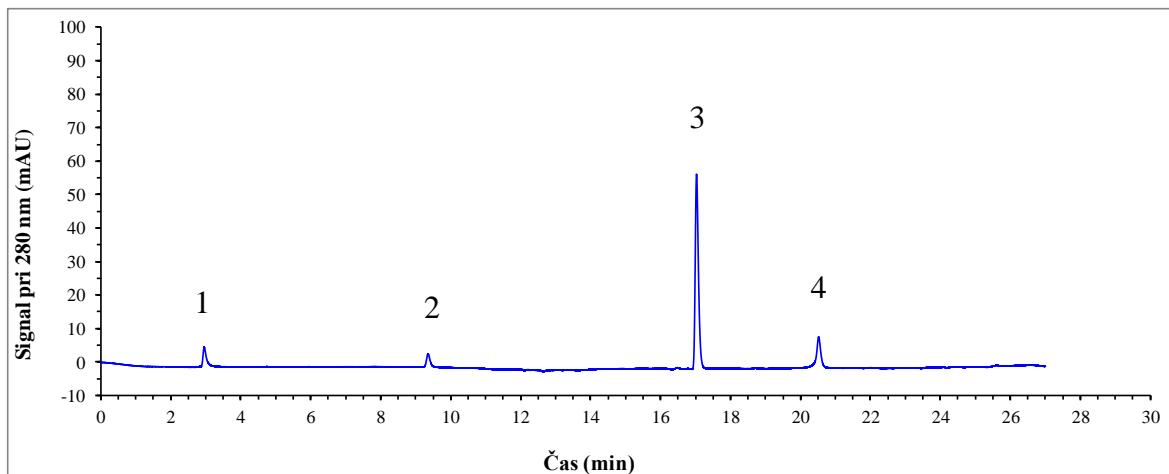
S pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) smo poskušali določiti morebitne razgradne produkte raztopin folnih kislin v topilih s pH vrednostmi v območju med 2 in 9. S kvalitativno identifikacijo lahko potrdimo ali ovržemo prisotnost razgradnih produktov folne kisline s primerjavo retencijskih časov (t_r) in površin analiziranih raztopin folnih kislin z različnimi pH vrednostmi in standardnih raztopin v ustreznih pripadajočih topilih.

Analizirali smo $25 \mu\text{M}$ raztopine folnih kislin in standardov (N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminska kislina oz. pABGA; pterin-6-karboksilna kislina oz. PCA; pterojska kislina oz. PA (Sigma-Aldrich, Nemčija)) v različnih topilih s pH vrednostmi 2, 4, 7 in 9. Prisotnost razgradnih produktov smo spremljali z merjenjem signala (mAU) pri valovni dolžini $\lambda = 280 \text{ nm}$. Kromatogrami prikazujejo primerno ločbo posameznih vrhov. Določili smo retencijske čase in površine vseh štirih raztopin folnih kislin s pH 2, 4, 7 in 9 in pripadajočih posameznih standardnih raztopin PCA, PA in pABGA, ki smo jih predhodno analizirali pri enakih pogojih kromatografskega postopka. Rezultati so zbrani v preglednicah od 9 do 12.

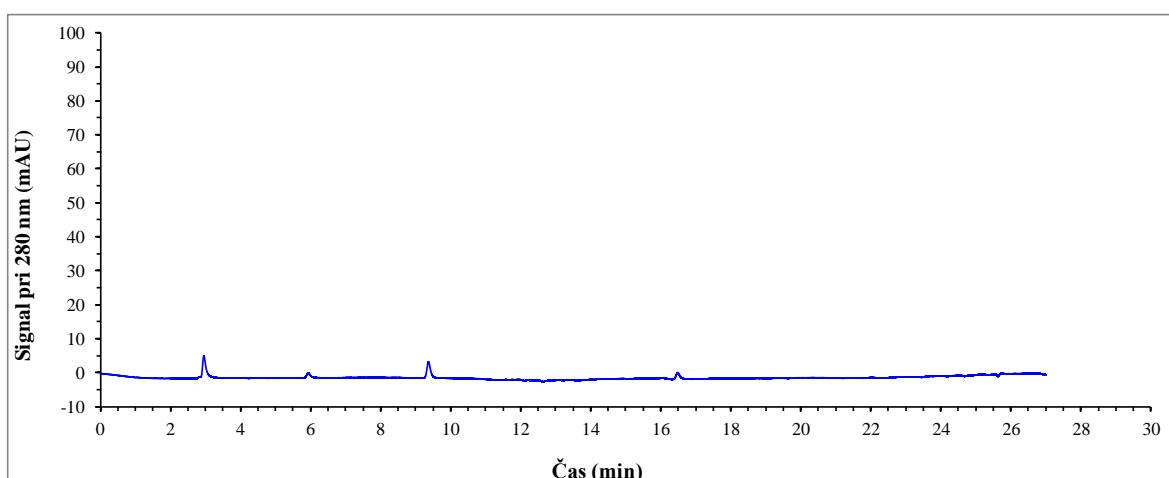
Na kromatogramu $25 \mu\text{M}$ raztopine folne kisline s pH 2 (slika 31) v času $t = 0$ opazimo štiri vrhove pri 2,955 minutu; 9,355 minutu; 17,03 minutu in 20,522 minutu, ki kažejo na nestabilnost folne kisline v kislem topilu. Najvišji vrh (št. 3) najverjetneje pripada folni kislini, medtem ko so ostali trije (št. 1, 2 in 4) neznane spojine oziroma razgradni produkti folne kisline. S pomočjo retencijskih časov in UV spektrov analiziranih standardov bi lahko prvi vrh (št. 1) na kromatogramu folne kisline ($t_r = 2,955 \text{ min}$) predstavljal nečistočo, ki se nahaja v vseh pripravljenih standardih in smo jo pri teh pogojih detektirali. Lahko gre tudi za prisotnost neznanega razgradnega produkta, ki nastane pri pH 2 pri vseh analiziranih spojinah. Drugi vrh (št. 2) predstavlja N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminsko kislino. Četrти vrh (št. 4) na kromatogramu folne kisline je neznan razgradni produkt, saj nobena od analiziranih standardnih raztopin ne eluira ob istem času.

Preglednica 9: Vrednosti retencijskih časov in površin pri analiziranih 25 µM raztopinah s pH 2 v času t = 0 ter signalu pri 280 nm.

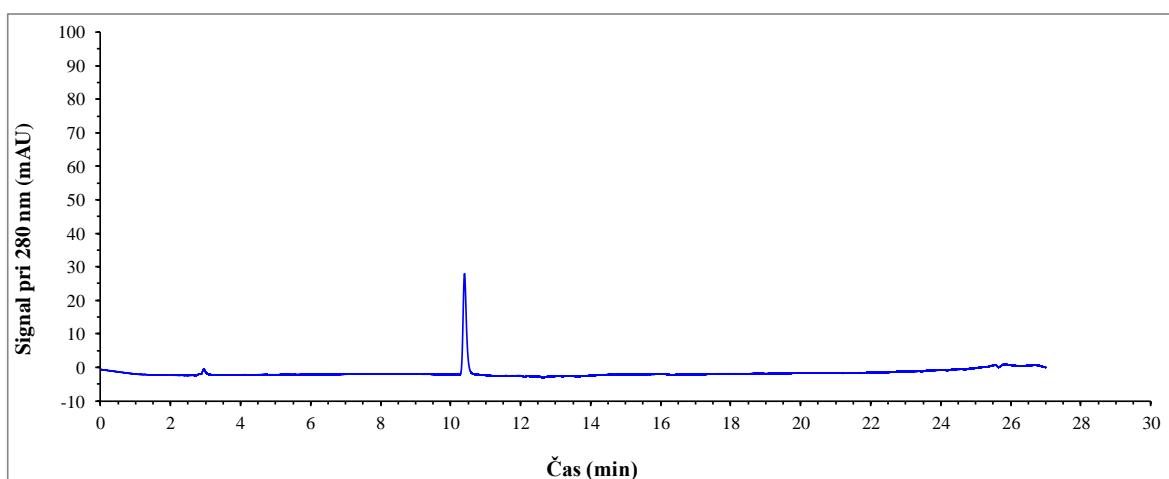
VZOREC	RETENCIJSKI ČAS (min)	POVRŠINA (mAU*s)
25 µM raztopina FA s pH 2	1	2,955
	2	9,355
	3	17,03
	4	20,522
25 µM raztopina standarda N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminske kisline	1	2,954
	2	5,932
	3	9,368
	4	16,484
25 µM raztopina standarda pterin-6-karboksilne kisline	1	2,951
	2	10,397
25 µM raztopina standarda pterojske kisline	1	2,951
	2	10,386
	3	18,7
	4	22,569



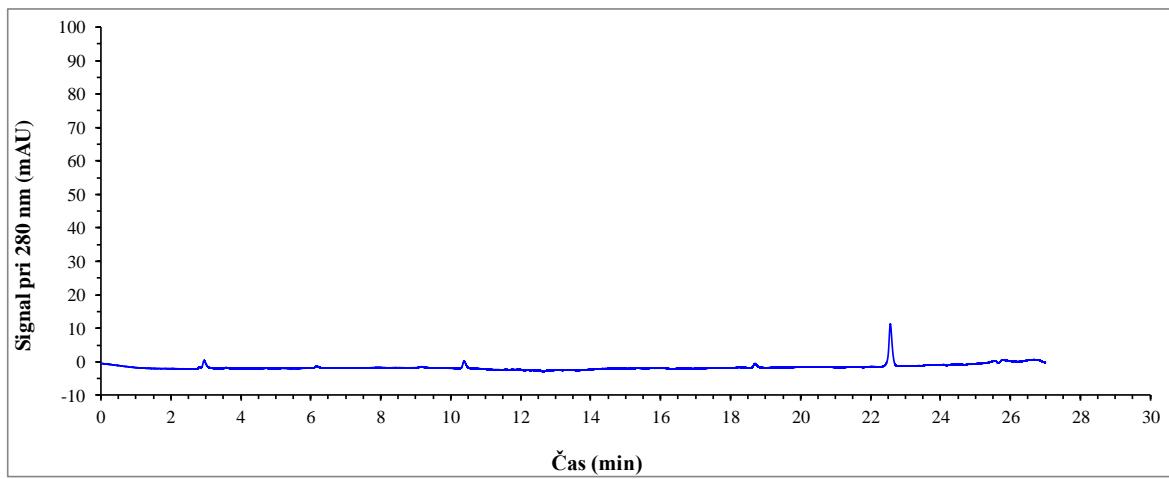
Slika 31: HPLC kromatogram vzorca 25 µM raztopine folne kisline s pH 2 (2 % raztopina HCOOH s pH 2), kjer prevladuje kationska oblika folne kisline, v času t = 0 (1 = nečistoča; 2 = pABGA; 3 = FA; 4 = neidentificirani razgradni produkt).



Slika 32: HPLC kromatogram 25 μM raztopine standarda N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminske kisline s pH 2 (2 % raztopina HCOOH s pH 2) v času $t = 0$.



Slika 33: HPLC kromatogram 25 μM raztopine standarda pterin-6-karboksilne kisline s pH 2 (2 % raztopina HCOOH s pH 2) v času $t = 0$.

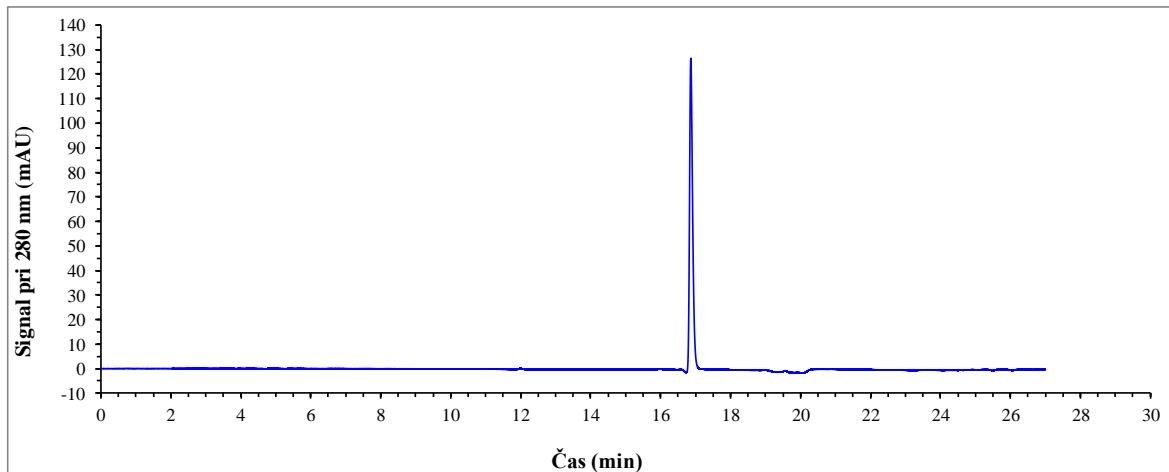


Slika 34: HPLC kromatogram 25 μM raztopine standarda pterojske kisline s pH 2 (2 % raztopina HCOOH s pH 2) v času $t = 0$.

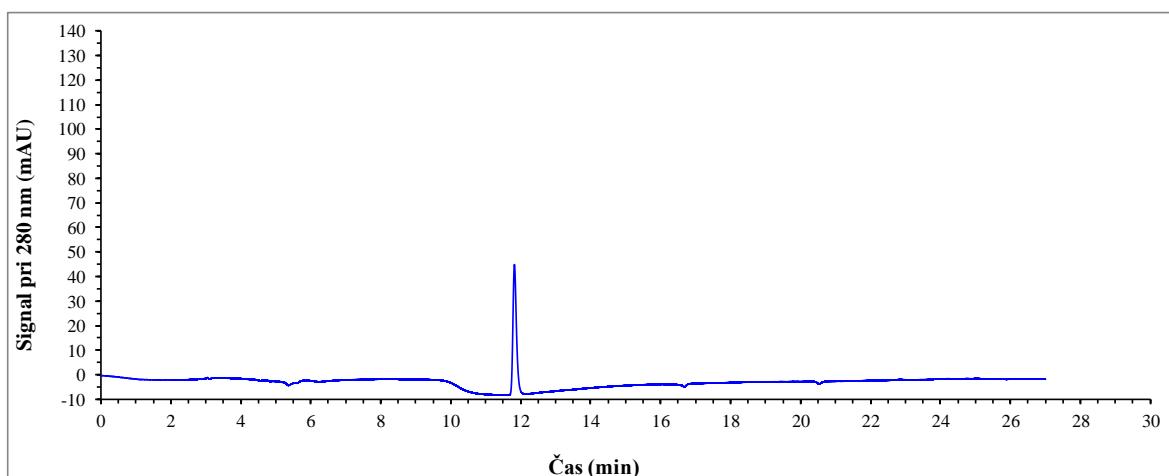
Na kromatogramu $25 \mu\text{M}$ raztopine folne kisline s pH 4 (slika 35) v času $t = 0$ je razviden le en vrh pri 16,864 minut, ki predstavlja folno kislino, saj nobena od treh analiziranih standardnih raztopin ne eluira v tem času, kar je razvidno iz preglednice 10 oziroma kromatogramov s slik 36, 37 in 38. Folna kislina s pH 4 in standarda N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminska kislina s pH 4 ter pterin-6-karboksilna kislina s pH 4 so v času $t = 0$, pri teh pogojih stabilni, medtem ko je tretji standard pterojska kislina nestabilna v topilu s pH 4.

Preglednica 10: Vrednosti retencijskih časov in površin pri analiziranih $25 \mu\text{M}$ raztopinah s pH 4 v času $t = 0$ ter signalu pri 280 nm.

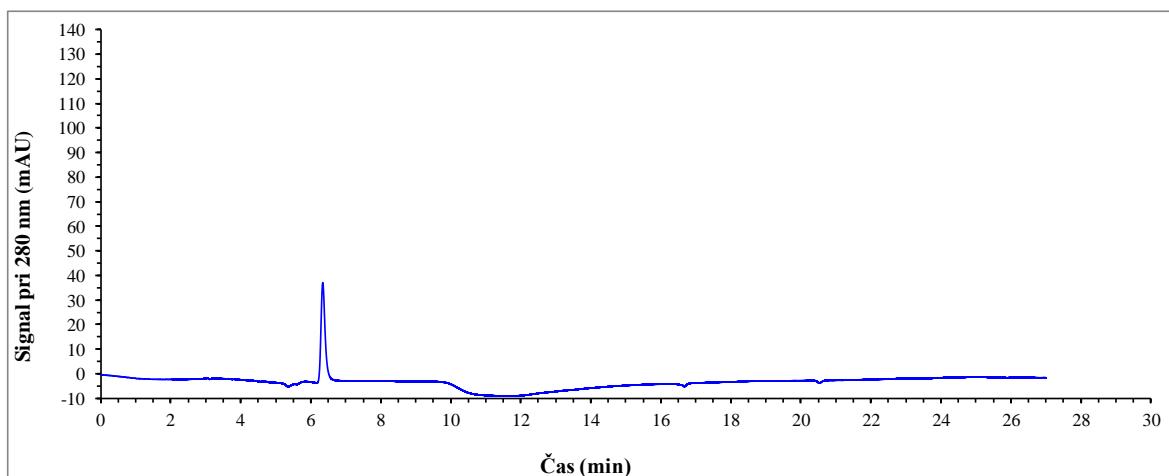
VZOREC	RETENCIJSKI ČAS (min)	POVRŠINA (mAU*s)
25 μM raztopina FA s pH 4	1	783,9
25 μM raztopina standarda N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminske kisline	1	379,1
25 μM raztopina standarda pterin-6-karboksilne kisline	1	346
	1	6,343
25 μM raztopina standarda pterojske kisline	2	9,553
	3	16,044
	4	20,424
		10,7



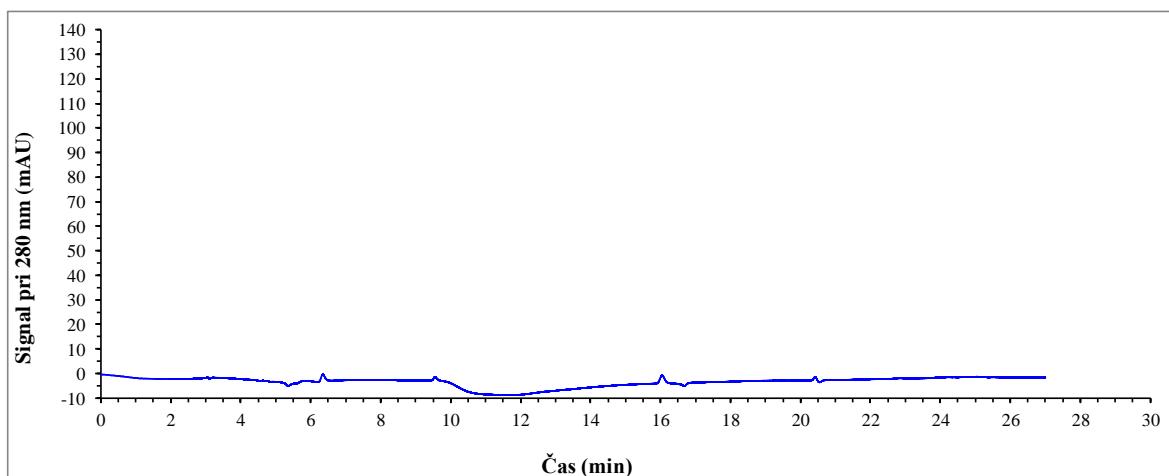
Slika 35: HPLC kromatogram vzorca $25 \mu\text{M}$ raztopine folne kisline s pH 4 ($25 \text{ mM CH}_3\text{COONa/CH}_3\text{COOH}$ s pH 4), kjer prevladuje kationska oblika folne kisline, v času $t = 0$.



Slika 36: HPLC kromatogram 25 μM raztopine standarda N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminske kisline s pH 4 (25 mM CH₃COONa/CH₃COOH s pH 4) v času t = 0.



Slika 37: HPLC kromatogram 25 μM raztopine standarda pterin-6-karboksilne kisline s pH 4 (25 mM CH₃COONa/CH₃COOH s pH 4) v času t = 0.

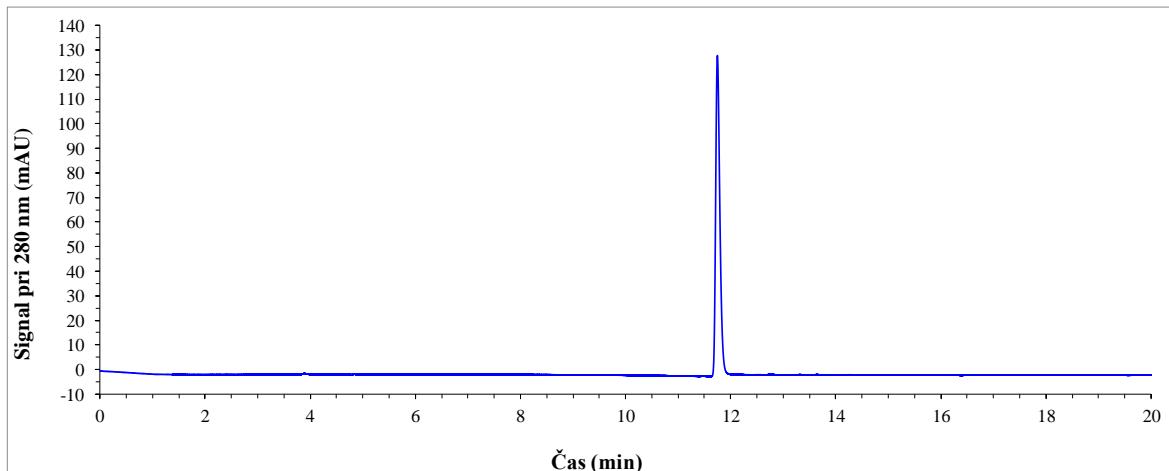


Slika 38: HPLC kromatogram 25 μM raztopine standarda pterojske kisline s pH 4 (25 mM CH₃COONa/CH₃COOH s pH 4) v času t = 0.

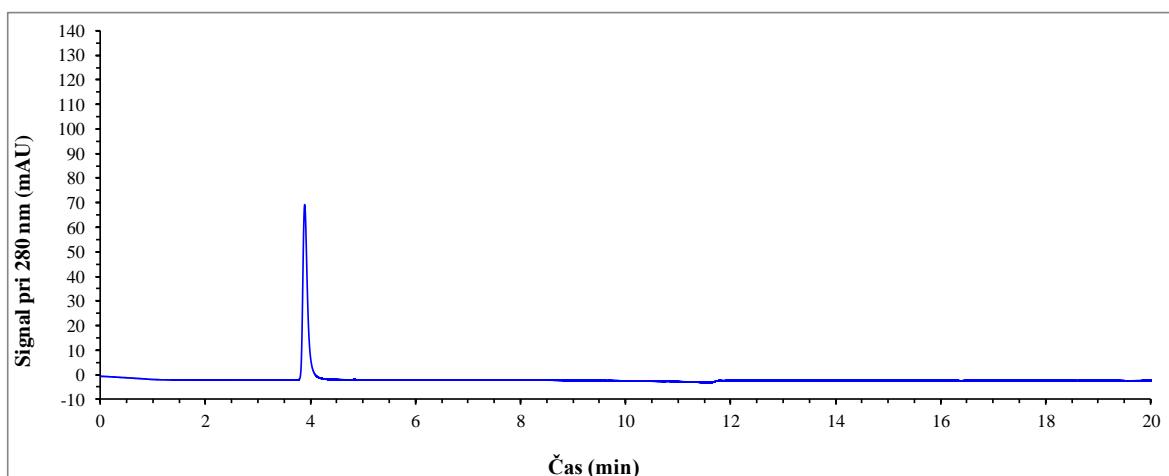
Kromatogram 25 µM raztopine folne kisline s pH 7 (slika 39) v času t = 0 prikazuje en vrh pri 11,748 minutih, ki glede na t_r ne ustreza nobeni analizirani standardni raztopini. Raztopina FA s pH 7 je pri teh pogojih analize stabilna.

Preglednica 11: Vrednosti retencijskih časov in površin pri analiziranih 25 µM raztopinah s pH 7 v času t = 0 ter signalu pri 280 nm.

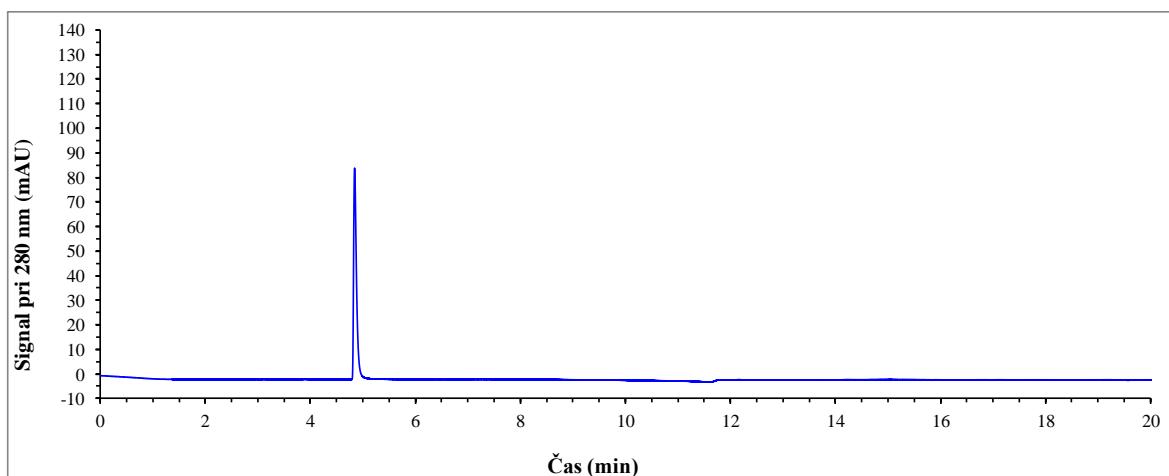
VZOREC	RETENCIJSKI ČAS (min)	POVRŠINA (mAU*s)
25 µM raztopina FA s pH 7	1 11,748	729,4
25 µM raztopina standarda N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminske kisline	1 3,89	450,8
25 µM raztopina standarda pterin-6-karboksilne kisline	1 4,844	329,4
	1 4,073	27,1
25 µM raztopina standarda pterojske kisline	2 4,839	34,4
	3 9,775	13,4
	4 12,823	658,5



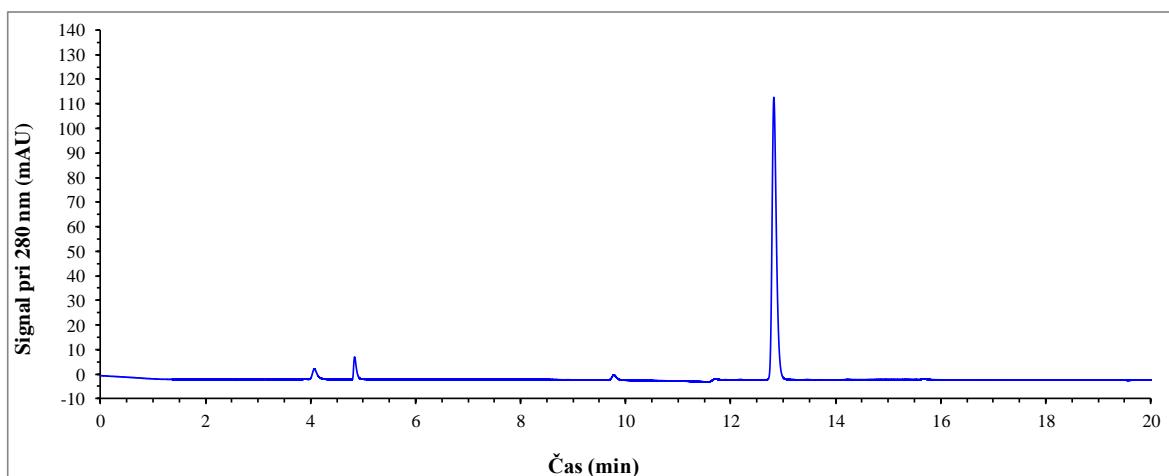
Slika 39: HPLC kromatogram vzorca 25 µM raztopine folne kisline s pH 7 (25 mM TRIS-HCl pufer s pH 7), kjer je folna kislina v nevtralni obliki, v času t = 0.



Slika 40: HPLC kromatogram 25 μM raztopine standarda N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminske kisline s pH 7 (25 mM TRIS-HCl pufer s pH 7) v času $t = 0$.



Slika 41: HPLC kromatogram 25 μM raztopine standarda pterin-6-karboksilne kisline s pH 7 (25 mM TRIS-HCl pufer s pH 7) v času $t = 0$.

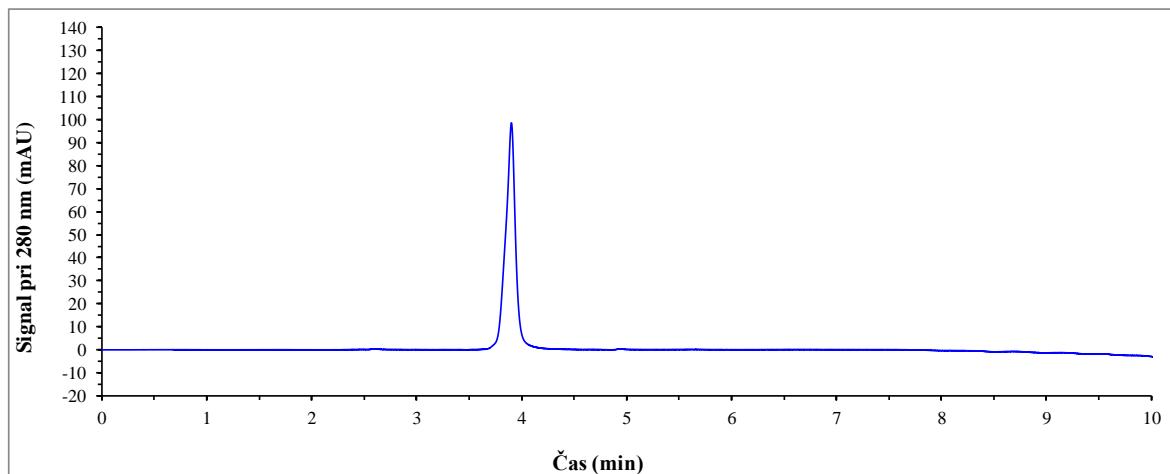


Slika 42: HPLC kromatogram 25 μM raztopine standarda pterojske kisline s pH 7 (25 mM TRIS-HCl pufer s pH 7) v času $t = 0$.

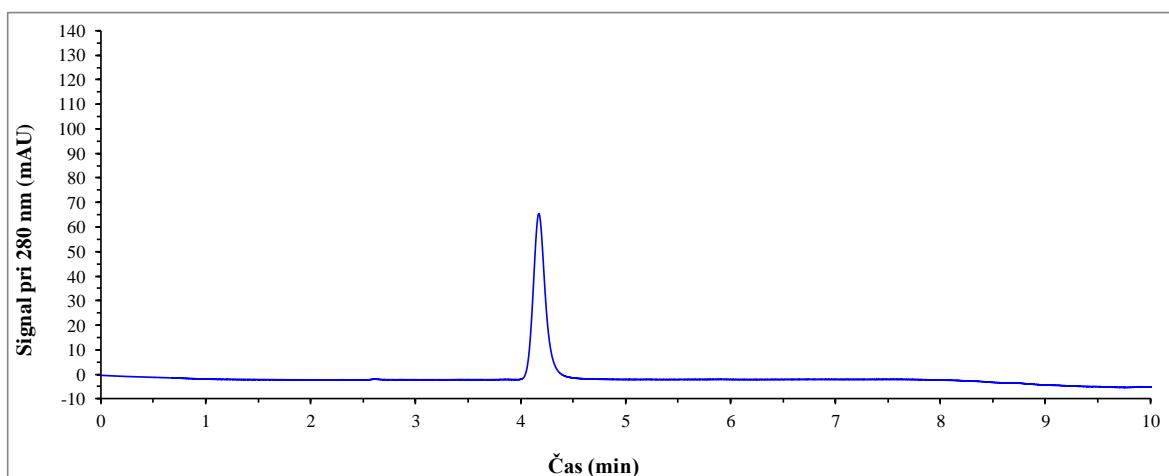
Na kromatogramu 25 µM raztopine folne kisline s pH 9 (slika 43) je v času $t = 0$ viden vrh pri 3,903 minut, ki ne predstavlja nobenega od analiziranih standardnih razgradnih produktov folne kisline, saj pri nobenem ni prišlo do eluiranja iz kolone v istem času. V teh pogojih analize je raztopina FA s pH 9 stabilna.

Preglednica 12: Vrednosti retencijskih časov in površin pri analiziranih 25 µM raztopinah s pH 9 v času $t = 0$ ter signalu pri 280 nm.

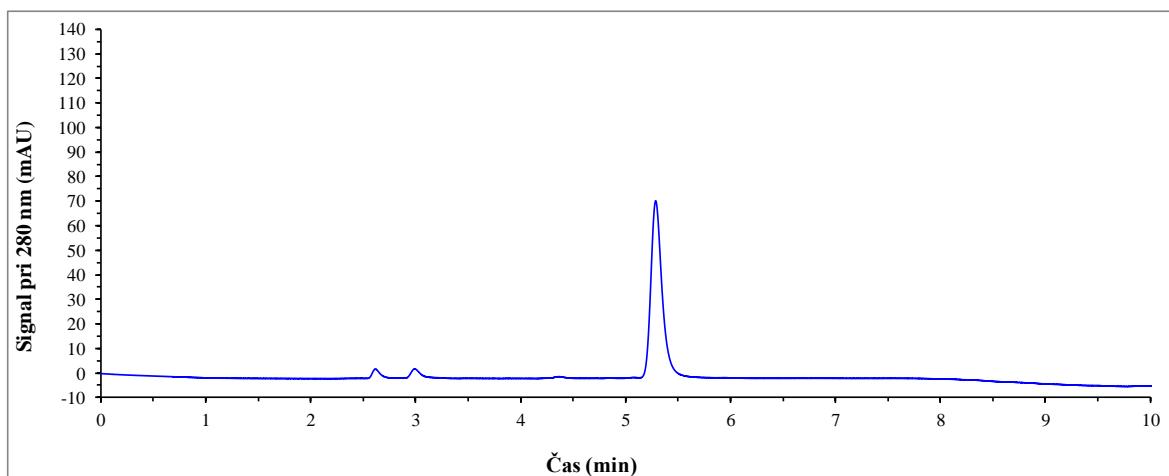
VZOREC	RETENCIJSKI ČAS (min)	POVRŠINA (mAU*s)
25 µM raztopina FA s pH 9	1	659,3
25 µM raztopina standarda N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminske kisline	1	560,5
25 µM raztopina standarda pterin-6-karboksilne kisline	1	19,6
	2	26,5
	3	540,8
25 µM raztopina standarda pterojske kisline	1	406,1



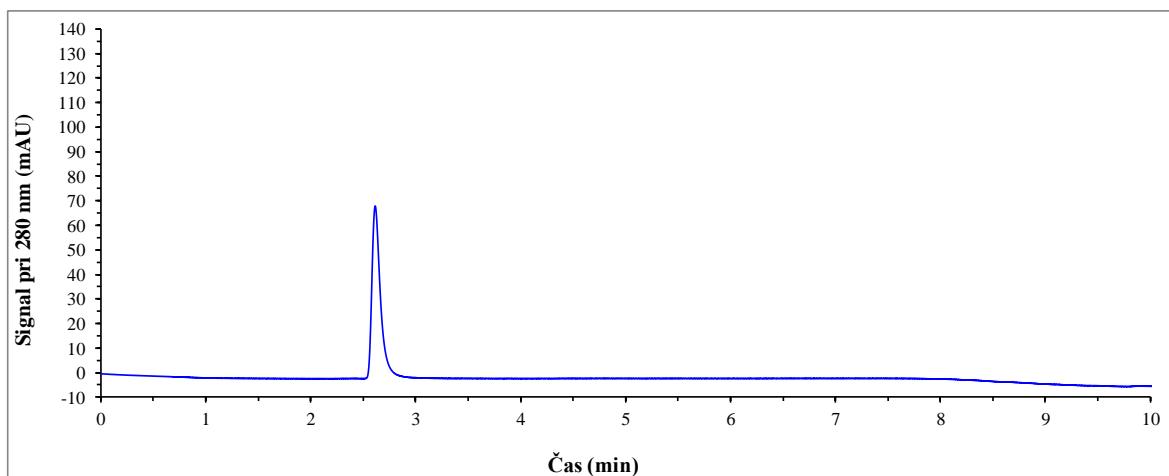
Slika 43: HPLC kromatogram vzorca 25 µM raztopine folne kisline s pH 9 (25 mM TRIS-HCl pufer s pH 9), kjer prevladuje anionska oblika folne kisline, v času $t = 0$.



Slika 44: HPLC kromatogram 25 μM raztopine standarda N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminske kisline s pH 9 (25 mM TRIS-HCl pufer s pH 9) v času $t = 0$.



Slika 45: HPLC kromatogram 25 μM raztopine standarda pterin-6-karboksilne kisline s pH 9 (25 mM TRIS-HCl pufer s pH 9) v času $t = 0$.



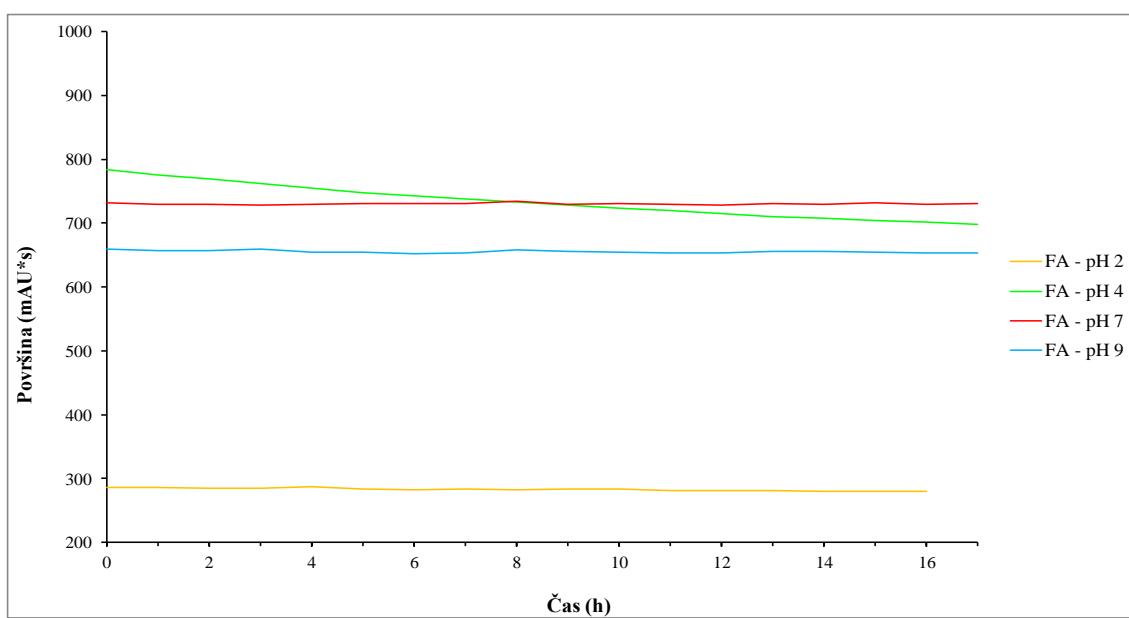
Slika 46: HPLC kromatogram 25 μM raztopine standarda pterojske kisline s pH 9 (25 mM TRIS-HCl pufer s pH 9) v času $t = 0$.

Stabilnost 25 μM raztopin folnih kislin s pH vrednostmi 2, 4, 7 in 9 smo določali s spremeljanjem sprememb v površini kromatografskih vrhov v odvisnosti od časa (18 ur), ki so zbrane v preglednici 13.

Preglednica 13: Površine kromatografskih vrhov za 25 μM raztopine folnih kislin v različnih pH v odvisnosti od časa ter signalu pri 280 nm.

ČAS (h)	POVRŠINA (mAU*s)			
	FA - pH 2	FA - pH 4	FA - pH 7	FA - pH 9
0	285,6	783,9	732,5	659,3
1	285,2	775,9	730,1	657,6
2	284,3	769,7	729,6	657,5
3	284,6	762,2	728,9	660,0
4	286,7	755,5	729,3	654,1
5	283,1	747,9	730,8	654,3
6	282,6	742,5	730,9	652,7
7	283,9	737,8	731,1	653,7
8	281,9	733,0	734,5	658,2
9	283,3	728,3	729,4	655,7
10	283,9	724,0	730,6	654,9
11	281,0	719,7	729,2	653,3
12	281,0	714,5	727,8	653,1
13	280,5	710,6	730,9	655,3
14	279,9	708,0	729,4	655,4
15	279,5	704,6	731,8	654,0
16	279,2	701,6	729,2	653,1
17	/	698,1	730,9	652,8

S slike 47 je razvidno spreminjanje površine vrhov raztopin folnih kislin v topilih z različnimi pH vrednostmi in temperaturi 25 °C. Površine pri 25 μM raztopinah folnih kislin s pH 2, 7 ter 9 so se s časom le rahlo zmanjšale, zmanjšanje za 2,1 %, 1,0 % in 0,2 %. Pri 25 μM raztopini folne kisline s pH 4 je ta padec bolj opazen in znaša 10,9 %. Najmanjšo spremembo in s tem največjo stabilnost smo ugotovili pri 25 μM raztopinah folnih kislin s pH 7 in 9, saj v času 18 ur ni prišlo do sprememb v površini kromatografskih vrhov. 25 μM raztopina folne kisline s pH 2 je bila nestabilna že v času t = 0.



Slika 47: Površine kromatografskih vrhov za 25 μM raztopine folnih kislin v različnih pH v odvisnosti od časa ter signalu pri 280 nm.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Hitrost razgradnje folne kisline je odvisna od številnih faktorjev kot so pH, temperatura, svetloba in kisik. V literaturi se pogosto zasledi, da je folna kislina relativno nestabilna v vodnih raztopinah, prisotnosti kisika in predvsem pri nizkih pH vrednostih. Na obseg in stopnjo razgradnje raztopin folnih kislin vplivata pH in tudi vrsta pufra, zato je pomembno upoštevati ta dejavnika. Alkalni pufer (v našem primeru 25 mM TRIS-HCl s pH 7 in 9) pomaga pri stabilizaciji folne kisline v vodni raztopini, kar je razvidno iz rezultatov. Folna kislina je bila nestabilna v kislih topilih oziroma pufrih (2 % HCOOH s pH 2 in 25 mM CH₃COONa/CH₃COOH s pH 4) še zlasti pri nižjih temperaturah 25 °C in 35 °C ter v območju temperatur od 65 °C do 85 °C.

Z UV-VIS spektrofotometrijo smo ugotovili, da nobena od raztopin folnih kislin ni spremenila oblike spektra, če se je spremenila le temperatura, torej ima pH večji vpliv na stabilnost folne kisline kot maksimalna T = 85 °C. Prav tako smo ugotovili, da je oblika absorpcijskega spektra folne kisline neodvisna od koncentracije folne kisline in sledi Beer-Lambert-ovem zakonu za nizke koncentracije (Off in sod., 2005), kar je razvidno iz absorpcijskih spektrov analiziranih 15 µM in 25 µM raztopin folnih kislin s pH 2 in 4 v temperturnem območju od 25 °C do 55 °C, saj so ti ohranili isto obliko.

Absorpcijski maksimumi folne kisline so odvisni od pH topila, oziroma različnih ionskih oblik v katerih se folna kislina nahaja. V kislem mediju (pH 2 in 4) prevladujejo protonirane kationske oblike ($pK_1 = 2,35$), ki so močno občutljive na razgradnjo. Pri višanju pH vrednosti proti nevtralnemu območju (pH 7) je molekula folne kisline deprotonirana, prevladujejo nevtralne oblike, in kot taka je FA veliko bolj stabilna. Pri vrednosti pH 9 je molekula folne kisline v anionski in nevtralni obliki. Ko pH vrednost narašča proti alkalnemu območju, se folna kislina nahaja v pretežno anionski obliki ($pK_2 = 8,3$) (Akhtar in sod., 1999).

Razliko v začetnih absorbancah (v času t = 0) raztopin FA v topilih s pH vrednostmi med 2 in 9, ki imajo isto začetno 25 µM koncentracijo, tako lahko pojasnimo s pojavom in različno stabilnostjo ionskih oblik FA, ki prevladujejo v določenih topilih. V rahlo kislih topilih, kjer prevladujejo monokationske in nevtralne oblike FA, je stabilnost folne kisline zmanjšana. Do povečanja koncentracije anionskih oblik FA pride pri pH vrednosti nad 4 in stabilnost raztopin se poveča. Razlike v začetnih absorbancah (v času t = 0) se s povišanjem temperature od 25 °C do 65 °C zmanjšujejo, z izjemo pri 35 °C, kjer je opažena največja razlika v začetnih vrednostih absorbanc pri 25 µM raztopinah FA s pH med 2 in 9, ki znaša 19,5 %. Najmanjša razlika je opažena pri temperaturi 65 °C z vrednostjo 9,6 %. 25 µM raztopine FA s pH 4 in 7, kjer prevladujejo kationske in nevtralne oblike FA, imajo v času t = 0 v celotnem temperturnem območju (od 25 °C do 85 °C) razmeroma podobne začetne

vrednosti absorbanc z največjim 5,0 % odstopanjem pri 65 °C. Pri 25 µM raztopinah FA s pH 9, kjer prevladujejo nevtralne in anionske oblike FA, se začetne vrednosti absorbanc 25 µM raztopin FA s pH 7 razlikujejo z največjim odstopanjem 14,2 %, ki smo ga določili pri temperaturi 35 °C. Največje odstopanje v začetnih vrednostih absorbanc je pri 25 µM raztopinah FA s pH 2, kjer prevladujejo monokationske oblike FA, ki so nestabilne. Razlike v začetnih absorbancah (v času t = 0) 15 µM raztopin FA s pH 2 in pH 4 so v primerjavi z razlikami v začetnih absorbancah 25 µM raztopin FA v topilih s pH vrednostmi med 2 in 9 večje. S povišanjem temperature od 25 °C do 55 °C se ta razlika pri 15 µM raztopinah FA postopoma zmanjšuje. Predvsem pri najnižjih temperaturah, 25 °C in 35 °C, znaša 29,4 % oziroma 23,0 %. Pri temperaturi 45 °C je razlika 16,6 % ter pri 55 °C je razlika 15,0 %.

Folna kislina ima pH topnostni profil odvisen od značilne nizke topnosti v kislem pH, ki je posledica različnih ionskih oblik, ki prevladujejo v določenem pH. Topnost folne kisline v raztopinah s kislom pH je relativno nizka in znatno višja v raztopinah z alkalnim pH. Topnost folne kisline pri pH 7 je 183-krat večja od topnosti folne kisline pri pH 1 in se povečuje s zvišanjem pH pri 37 °C (Younis in sod., 2009). Optimalna topnost folne kisline je pri pH 7,6 (Akhtar in sod., 2003). Pri tej pH vrednosti je tudi najbolj stabilna, kar lahko razberemo tudi iz naših rezultatov, saj se vrednost absorbance ($A_{\lambda=285}$) raztopin folnih kislin s pH 7 v času 18 ur ter temperaturnem območju od 25 °C do 85 °C skoraj ne spremeni. Podobno lahko povzamemo tudi za analizirane raztopine FA s pH 9, ker je topnost folne kisline višja v alkalnem. Razgradnja folne kisline v topilih s pH 2 in 4 je največja, kar potrjuje znižanje $A_{\lambda=285}$ s časom pri 25 µM raztopinah folnih kislin s pH 2 pri 25 °C in 35 °C ter raztopini FA s pH 4 pri 25 °C.

O'Broin in sod. (1975) so ugotavljali vpliv pH in ionov pufra na termično stabilnost folne kisline in številnih derivatov folatov. Ugotovili so, da je folna kislina občutljiva na razgradnjo pri pH vrednostih nižjih od 4. Tudi Paine-Wilson in Chen (1979) sta ugotovila, da je kinetika termične razgradnje folatov v modelnih sistemih odvisna od pH vrednosti in vrste pufrskih ionov. Razgradnja folne kisline in ostalih folatov pri temperaturi 100 °C sledi kinetiki prvega reda v širokem območju pH od 1 do 12. Folna kislina je stabilna med 10 urnim segrevanjem pri 100 °C pri pH vrednostih od 4 do 12. Njena stabilnost se je zmanjšala pri pH vrednostih nižjih od 4. Pri pH vrednosti 7 niso opazili razgradnje. Ti rezultati so prav tako v skladu z našimi eksperimentalnimi, saj smo na podlagi nespremenjenih absorpcijskih spektrov ugotovili, da je folna kislina stabilna, predvsem v alkalnih topilih s pH 7 in 9. Saxby in sod. (1983) so prav tako ugotovili, da je folna kislina stabilna pri segrevanju v alkalnih in nevtralnih raztopinah ter nestabilna v raztopinah s kislom pH. Na stopnjo termične razgradnje vpliva pH nižji od 4. V območju pH vrednosti nižjih od 4, ob prisotnosti kisika, poteče aerobna hidroliza in folna kislina se razgradi v p-aminobenzoilglutaminsko kislino in 6-metilpterin.

Nguyen in sod. (2003) so preiskovali stabilnost folne kisline v 0,2 M fosfatnem pufru s pH 7 pri temperaturah od 65 °C do 160 °C v kombinaciji z visokim tlakom (do 800 MPa). Izpostavitev povišanemu tlaku v temperaturnem območju od 25 °C do 60 °C ni imela vpliva na razgradnjo folne kisline oziroma je bil vpliv zelo majhen. Kinetiko razgradnje folne kisline pri temperaturah višjih od 120 °C so opisali s kinetičnim modelom prvega reda, medtem ko rezultatov pri temperaturah do 90 °C niso določili. Folno kislino s pH 7 so označili kot stabilno na povišano temperaturo in tlak, torej bi se lahko v določeni količini ohranila tudi po postopku sterilizacije.

Identifikacija možnih razgradnih produktov PCA (pterin-6-karboksilna kislina), PA (pterojska kislina) in pABGA (N-4-aminobenzoil)-L-glutaminska kislina) v raztopinah folnih kislin s pH vrednostmi v območju med 2 in 9, je bila potrjena s primerjanjem njihovih retencijskih časov t_r in površin kromatografskih vrhov. Raztopina folne kisline s pH 2 se je pri temperaturi 25 °C že v času $t = 0$ izkazala za nestabilno. Razgradni produkt, ki smo ga lahko potrdili z analizo je N-(4-aminobenzoil)-L-glutaminska kislina. Preostalih razgradnih produktov nismo uspeli identificirati s preostalima uporabljenima standardoma PCA in PA. Prvi vrh je lahko posledica nečistoče, ki se nahaja v vseh pripravljenih standardih in smo jih pri teh pogojih detektirali. Lahko gre tudi za prisotnost neznanih razgradnih produktov, ki nastanejo pri pH 2 pri vseh analiziranih spojinah. Akhtar in sod. (1999) so s HPLC analizo določili dva glavna razgradna produkta folne kisline v vodnih raztopinah, p-aminobenzoil-L-glutaminsko kislino in pterin-6-karboksilno kislino, skupaj s sledovi p-aminobenzojske kisline. Če upoštevamo prisotnost raztopljenega kisika v raztopini FA, potem lahko poteče aerobna hidroliza in folna kislina se razgradi v p-aminobenzoil-L-glutaminsko kislino in 6-metilpterin (Saxby in sod., 1983).

Raztopine folnih kislin s pH vrednostmi 4, 7 in 9 so bile v času $t = 0$ pri temperaturi 25 °C stabilne. Pri spremjanju stabilnosti v času 18 ur smo ugotovili, da je raztopina folne kisline s pH 4 nestabilna, saj se je površina kromatografskega vrha s časom zmanjšala za približno 10,9 %. 25 µM raztopine folnih kislin s pH 7 in 9 so se izkazale za najstabilnejše. Ti rezultati so prav tako v skladu z objavljenimi v literaturi, kjer je bilo ugotovljeno, da je razgradnja folne kisline v kislem območju pH višja kot v nevtralnem in alkalnem območju pH (Yakubu in Muazu, 2010). Površine 25 µM raztopin folnih kislin s pH 2, 7 in 9 so ostale v času 18 ur skoraj nespremenjene, vendar smo pri raztopini folne kisline s pH 2 v času $t = 0$ ugotovili, da je nestabilna.

pH vrednosti topila, v katerih je raztopljena folna kislina, vplivajo tako na stabilnost folne kisline kot tudi retencijske čase. Pri prehajanju folne kisline skozi kromatografsko kolono C18 smo opazili, da se z višanjem pH vrednosti topila (od 2 do 9) retencijski čas zmanjšuje. Takšen trend prehajanja smo opazili tudi pri dveh standardih, pterojski kislini in pterin-6-karboksilni kislini. Pri standardu N-4-aminobenzoil-L-glutaminski kislini takšnega trenda prehajanja ne moremo potrditi.

S primerjavo rezultatov UV-VIS spektrofotometrije in rezultatov HPLC analize o stopnji razgradnje pri 25 µM raztopinah folnih kislin s pH 2, 4, 7 in 9 v času 18 ur in temperaturi 25 °C lahko povzamemo, da smo z obema metodama potrdili nestabilnost folne kisline v topilih s pH 2 in 4 ter stabilnost v topilih s pH 7 in 9. V raztopini FA s pH 2 smo z UV-VIS spektrofotometrijo določili 48,9 % in v raztopini FA s pH 4 49,8 % razgradnjo. Pri raztopini FA s pH 7 je prišlo do 0,8 % oziroma pri raztopini FA s pH 9 do 0,4 % razgradnje. Preko zmanjšanja površine vrhov, določenih s HPLC analizo, smo ugotovili pri raztopini FA s pH 2 v 18 urah 2,1 % zmanjšanje, vendar moramo upoštevati, da je prišlo do razgradnje FA s pH 2 že v času t = 0. Pri raztopini FA s pH 4 je zmanjšanje površine vrha s časom 10,9 %. Pri raztopinah FA s pH 7 in 9 je zmanjšanje površine v 18 urah zanemarljivo, 0,2 % in 1,0 %.

V pogojih, ki smo jih uporabili med eksperimentom za ugotavljanje vpliva svetlobe na stabilnost folne kisline, se je izkazalo, da je pri raztopinah folnih kislin s pH vrednostmi med 2 in 9 prišlo le do rahle razgradnje v času 8 ur osvetljevanja z uporabljeno energijsko varčno sijalko, ki oddaja hladno belo svetobo in dnevni svetlobi. Absorbanca v raztopini FA s pH 2 se po 8 urah rahlo zniža (2 %), kar nakazuje na hitrejšo razgradnjo v kislem mediju. V raztopinah FA s pH 4, 7 in 9 se je absorbanca po 8 urah rahlo zvišala. Spremembe v absorbanci $A_{\lambda=285}$ pri raztopinah FA s pH 4, 7 in 9 so maksimalno 3 %. Vrednosti so v okviru eksperimentalne napake. Verjetno bi se vpliv svetlobe na stabilnost folne kisline pokazal šele po daljši izpostavljenosti virom svetlobe. Saxby in sodelavci so prav tako raziskali stopnjo degradacije folne kisline v prisotnosti svetlobe in v temi, v acetatnem pufru s pH 5 in v pivu s pH 5. Raztopine so izpostavili svetlobi bele fluorescenčne sijalke. Stopnja razgradnje folne kisline, hranjene v temi in sobni temperaturi, je bila po 23 dneh zanemarljiva, medtem ko se je v prisotnosti svetlobe in kisika v celoti razgradila v tri produkte; pterin-6-karboksilno kislino, p-aminobenzoilglutaminsko kislino ter 6-metilpterin ali pterin-6-karboksaldehid (Saxby in sod., 1983).

Folna kislina se najverjetneje ne razgradi zaradi vidne svetlobe. Absorpcijski spektri dokazujejo, da folna kislina ne absorbira hladno bele svetlobe uporabljene energijsko varčne sijalke, saj se spektri raztopin folnih kislin, ki so bile izpostavljene svetlobi ne razlikujejo od tistih, ki so bile zaščitene pred svetobo. Izpostavljenost svetlobi povzroči v strukturi folne kisline cepitev vezi C₉ in N₁₀, kar vodi do sprememb v spektralnih lastnostih raztopin. Z uporabo UVA svetlobe so ugotovili spremembe v absorpcijskem spektru FA že po 20 minutah (Off in sod., 2005).

Yakubu in Muazu (2010) sta raziskovala vpliv ultravijolične (UV) svetlobe na pojav in obseg razgradnje folne kisline v kislem in alkalnem topilu. Folna kislina, v obliki prahu, je bila v času 5 ur izpostavljena UV svetilki. Nato sta pripravila raztopine folnih kislin v razredčeni kislini (0,1 M HCl) in bazi (0,1 M NaOH). Sledila je priprava raztopin FA s pH 4,2; 5,4; 6,4; 7,4 in 8,2 v fosfatnem pufru, ki so bile zaščitene pred svetobo. Rezultati so pokazali, da je najhitrejši začetek in največji obseg razgradnje folne kisline v kislem (pH 4,2), saj se je v času 5 ur v celoti razgradila, v primerjavi z izpostavitvijo UV svetlobi in nazadnje v

alkalnem. Vse spremenljivke vplivajo na razgradnjo folne kisline, zato je potrebna previdnost pri shranjevanju produktov s folno kislino. Čim nižji je pH, višji je obseg razgradnje folne kisline. V območju nevtralnega pH je razgradnja folne kisline najmanjša. V območju povečane alkalnosti sta pojav in obseg razgradnje folne kisline povečana (Yakubu in Muazu, 2010).

Z metodo ABTS smo določili antioksidativno aktivnost raztopin folnih kislin s pH 7, 9 in 13. Zaradi omejene nizke topnosti folne kisline v kislem, nismo uspeli pripraviti ustreznih izhodnih koncentracij raztopin FA s pH 2 in 4, s katerimi bi lahko dosegli 50 % zmanjšanje absorbance oziroma zmanjšanje začetne vrednosti radikala. Najvišjo antioksidativno aktivnost oziroma sposobnost redukcije radikalkega kationa ABTS⁺ ima raztopina FA s pH 13. Za 50 % zmanjšanje začetne vrednosti radikala ABTS⁺ je bila potrebna 13 µM koncentracija folne kisline ter 21 µM koncentracija folne kisline s pH 9. Pri nevtralnih vrednostih pH je bila za 50 % zmanjšanje začetne vrednosti radikala ABTS⁺ potrebna 28 µM koncentracija folne kisline s pH 7. Rezultati so potrdili ugotovitve Gliszczynska-Świgło in Muzolf (2007), ki sta ugotovili, da je folna kislina boljši lovilec radikalov v alkalnem kot v nevtralnem območju pH. Z metodo TEAC (troloxo-ekvivalentna antioksidativna kapaciteta) sta ugotavljeni vpliv pH topila (v območju med 2 in 10) na aktivnost folne kisline (2 - 20 µM raztopine) v lovljenju prostih radikalov in ugotovili, da je le-ta močno odvisna od pH. Raztopine sta pripravili tako, da sta ABTS⁺ radikal pripravili v pufru z ustrezeno pH vrednostjo, nato sta dodali FA, ki je bila raztopljena v DMSO, zato niso imeli težav s topnostjo FA v kislem. Sposobnost FA v lovljenju prostega radikala ABTS⁺ narašča kot TEAC vrednost med pH vrednostjo 2 in 3,5; nato TEAC vrednost za FA pada do pH vrednosti 6,5; nad vrednostjo pH 6,5 pa ponovno narašča. Sposobnost lovljenja prostih radikalov ABTS⁺ za FA je veliko manjša od DHF, THF in askorbinske kisline (Gliszczynska-Świgło in Muzolf, 2007).

Gliszczynska-Świgło (2006) je prav tako preučevala antioksidativno aktivnost folne in ugotovila, da ima sposobnost redukcije radikalkega kationa ABTS⁺, čeprav reagira z njim relativno počasi v primerjavi z vitaminom C. Reakcija sledi kinetiki psevdo-prvega reda. Sposobnost folne kisline, raztopljene v PBS pufru s pH 7,4, za lovljenje prostih radikalov je bila le okoli 5-krat nižja od vrednosti pri vitaminu C. Koncentracija folne kisline, potrebna za redukcijo 50 % radikalkega kationa ABTS⁺ po 30 minutah, je znašala $IC_{50} = 73,0 \pm 1,9 \mu\text{M}$, medtem ko je IC_{50} za vitamin C $14,5 \pm 0,7 \mu\text{M}$. Rezultate bi lahko primerjali z antioksidativno aktivnostjo raztopine folne kisline v 25 mM TRIS-HCl pufru s pH 7, kjer je bila za redukcijo 50 % radikalkega kationa ABTS⁺ potrebna 28 µM koncentracija, kar pomeni, da je naša določena sposobnost redukcije radikala ABTS⁺ okrog 2,5-krat nižja. Nastale razlike so posledica uporabe različnih topil, pH raztopin in koncentracije vzorca. Poleg tega obstaja tudi razlika v pripravi obeh raztopin ABTS⁺. Vpliv pH na antioksidativno aktivnost folne kisline je biološkega pomena, saj se pH v različnih človeških telesnih tekočinah in tkivih precej razlikuje.

Stabilnost folatov in folne kisline je odvisna od pogojev, vendar se lahko poveča s prisotnostjo antioksidantov (Madziva in sod., 2005). Reducenti, vključno z askorbinsko kislino, cisteinom in tioli imajo številne zaščitne učinke na folate kot lovilci kisika (Arcot in sod., 2002; Gregory, 2008). K založni raztopini folne kisline v 0,1 M NaOH bi bilo smiselno dodali askorbinsko kislino (0,1 % L-askorbinsko kislino) (Cheung in sod., 2008).

Na stabilnost folne kisline vpliva pH kot tudi svetloba (UV in vidna). Obseg razgradnje folne kisline je največji v kislem in nato alkalnem mediju. Zaradi vpliva UV svetlobe je priporočljivo, da se dopolnila s folno kislino shranjujejo v embalaži, ki ne prepušča UV svetlobe. Pomemben vpliv imajo tudi snovi, ki znižujejo pH v farmacevtskih pripravkih, kot na primer citronska kislina in vitamin C. Poznavanje vpliva različnih zunanjih dejavnikov (pH, temperatura in svetloba) na stabilnost folne kisline je pomembno z vidika živilske in farmacevtske industrije. Predvsem pri dodajanju folne kisline v sadne sokove z nizkim pH (približno 3,5), kjer zaradi možne razgradnje vitamina ne vemo natančne količine dodatka. Poleg tega je potrebno upoštevati deklariranje vrednosti, ki dovoljuje $\pm 30\%$ toleranco (Frommherz in sod., 2014).

5.2 SKLEPI

Na podlagi eksperimentalnih rezultatov lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- Folna kislina je v raztopinah s pH vrednostmi med 7 in 9 stabilna 18 ur pri 85 °C.
- Folna kislina je v raztopini s pH 2 stabilna pri temperaturah 45 °C in 55 °C v času 18 ur. Pri temperaturah 25 °C, 35 °C, 65 °C, 75 °C in 85 °C smo opazili razgradnjo.
- Folna kislina je v raztopini s pH 4 stabilna v temperaturnem območju od 35 °C do 85 °C. Razgradnja je bila opažena pri temperaturi 25 °C.
- Folna kislina je v topilih z nižjim pH (2 in 4) bolj občutljiva na povišano temperaturo, kot v topilih z višjim pH (7 in 9).
- Z UV-VIS spektrofotometrijo smo ugotovili, da svetloba energijsko varčne sijalke in dnevna svetloba nimata večjega vpliva na stabilnost raztopin folnih kislin s pH v območju med 2 in 9.
- Folna kislina ima sposobnost redukcije radikalnskega kationa ABTS^{•+} in je boljši lovilec radikalov v 0,1 M raztopini NaOH s pH 13 kot v TRIS-HCl pufru s pH 9 in s pH 7.

6 POVZETEK

Folna kislina ali pteroilglutaminska kislina je sintetična oblika vodotopnega vitamina B₉, ki se zaradi boljše stabilnosti od naravnih folatov uporablja v obogatitvi živil ter v prehranskih dopolnilih. V zadnjem času je pridobila na pozornosti zaradi svoje domnevne vloge v patogenezi prirojenih okvar nevralne cevi, boleznih srca in ožilja, raku in nevropsihiatricnih motnjah, saj so folati pomembni kofaktorji v številnih presnovnih poteh, za normalno rast in razvoj organizma (celic) ter ima pomembno vlogo pri presnovi aminokislin, biosintezi DNA in RNA. Pomanjkanje folatov pri ljudeh sodi med pogostejša pomanjkanja vitaminov tudi v razvitih državah. Možnost vpliva folne kisline na zdravje oziroma preprečevanje raka je v povezavi z njeno aktivnostjo lovljenja prostih radikalov in antioksidativno aktivnostjo.

Namen diplomskega dela je bil preučiti stabilnost folne kisline v topilih z različnimi pH vrednostmi (2, 4, 7 in 9) ter pri povišanju temperature v območju od 25 °C do 85 °C z uporabo UV-VIS spektrofotometrije. Poleg tega smo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z UV detekcijo izvedli analize folne kisline in možnih razgradnih produktov v topilih z različnimi pH vrednostmi (2, 4, 7 in 9) pri 25 °C. Vpliv svetlobe na stabilnost raztopin folnih kislin v topilih s pH vrednostmi med 2 in 9 smo določali z UV-VIS spektrofotometrijo. Z ABTS metodo smo določili antioksidativno aktivnost folne kisline v topilih s pH 7, 9 in 13.

Rezultati so pokazali, da vrednost pH topila močno vpliva na stabilnost folne kisline. Folna kislina ima najvišjo stabilnost med vsemi analiziranimi temperaturami v TRIS-HCl pufru s pH 7 in pH 9, saj je stabilna v času 18 ur med segrevanjem na 85 °C. Stabilnost folne kisline se zmanjšuje pri znižanju pH proti kislemu (pH 2 in pH 4). Rezultati so primerljivi z literaturo, saj je stabilnost pri pH vrednosti 4 manjša in najmanjša pri pH vrednosti 2. HPLC analiza raztopin FA je potrdila nestabilnost folne kisline v topilih z vrednostmi pH 2 in 4 in temperaturi 25 °C.

Na podlagi spektrofotometričnih rezultatov lahko povzamemo, da imata svetloba energijsko varčne sijalke in dnevna svetloba majhen vpliv na stabilnost raztopin folnih kislin z različnimi pH vrednostmi, če jih primerjamo s tistimi, ki so bile zaščitene pred viri svetlobe oziroma pred fotoinduciranimi spremembami.

Najvišjo antioksidativno aktivnost oziroma sposobnost redukcije radikalskega kationa ABTS⁺ ima raztopina FA v 0,1 M NaOH s pH 13, nato raztopina FA v 25 mM TRIS-HCl pufru s pH 9 in nazadnje raztopina FA raztopljena v 25 mM TRIS-HCl pufru s pH 7. Rezultati so potrdili, da je folna kislina boljši lovilec radikalov v alkalnem kot v nevtralnem območju pH.

7 VIRI

- Akhtar M.J., Khan M.A., Ahmad I. 1997. High performance liquid chromatographic determination of folic acid and its photodegradation products in the presence of riboflavin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 16, 1: 95-99
- Akhtar M.J., Khan M.A., Ahmad I. 1999. Photodegradation of folic acid in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25: 269-275
- Akhtar M.J., Khan M.A., Ahmad I. 2003. Identification of photoproducts of folic acid and its degradation pathways in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31: 579-588
- Albalá-Hurtado S., Veciana-Nogués M.T., Vidal-Carou M.C., Mariné-Font A. 2000. Stability of vitamins A, E, and B complex in infant milks claimed to have equal final composition in liquid and powdered form. *Journal of Food Science*, 65, 6: 1052-1055
- Angier R.B., Boothe J.H., Hutchings B.L., Mowat J.H., Semb J., Stokstad E.L.R., Subbarow Y., Waller C.W., Cosulich D.B., Fahrenbach M.J., Hultquist M.E., Kuh E., Northey E.H., Seeger D.R., Sickels J.P., Smith J.M.Jr. 1946. The structure and synthesis of the liver *L. casei* factor. *Science*, 103, 2683: 667-669
- Angier R.B., Stokstad E.L.R., Mowat J.H., Hutchings B.L., Boothe J.H., Waller C.W., Semb J., Subbarow Y., Cosulich D.B., Fahrenbach M.J., Hultquist M.E., Kuh E., Northey E.H., Seeger D.R., Sickels J.P., Smith J.M.Jr. 1948. Synthesis of pteroylglutamic acid III. *Journal of the American Chemical Society*, 70, 1: 25-26
- Araújo M.M., Marchioni E., Zhao M., Kuntz F., Di Pascoli T., Villavicencio A.L.C.H. Bergaentzlé M. 2012. LC/MS/MS identification of some folic acid degradation products after E-beam irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 81, 8: 1166-1169
- Arcot J., Shrestha A.K., Gusanov U. 2002. Enzyme protein binding assay for determining folic acid in fortified cereal foods and stability of folic acid under different extraction conditions. *Food Control*, 13: 245-252
- Arcot J., Shrestha A. 2005. Folate: methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 253-266
- Bailey L.B. 2003. Folate, methyl-related nutrients, alcohol, and the MTHFR 677C → T polymorphism affect cancer risk: intake recommendations. *The Journal of Nutrition*, 133, 11: 3748-3753
- Bailey L.B. 2007. Folic acid. V: *Handbook of vitamins*. 4th ed. Zempleni J., Rucker R.B., McCormick D.B., Suttie J.W. (eds.). Boca Raton, CRC Press, Taylor & Francis Group: 385-412
- Bailey S.W., Ayling J.E. 2009. The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 36: 15424-15429
- Ball G.F.M. 1998. Folate. V: *Bioavailability and analysis of vitamins in foods*. 1st ed. London, Chapman and Hall: 439-496

- Ball G.F.M. 2004. Vitamins: their role in the human body. 1st ed. Oxford, Blackwell Publishing Ltd: 432 str.
- Ball G.F.M. 2006. Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability. Boca Raton, CRC Press, Taylor & Francis Group: 785 str.
- Basset G.J.C., Quinlivan E.P., Gregory J.F.III, Hanson A.D. 2005. Folate synthesis and metabolism in plants and prospects for biofortification. *Crop Science*, 45, 2: 449-453
- Bates C.J. 2003. Folic acid: properties and determination. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 4. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). London, Academic Press: 2559-2564
- Bates C.J. 2006. Vitamins: fat and water soluble: analysis. V: Encyclopedia of analytical chemistry. Meyers R.A. (ed.). Chichester, John Wiley & Sons Ltd: 1-35
- Bender D.A. 2003. The vitamins. V: Nutritional biochemistry of vitamins. 2nd ed. Cambridge, Cambridge University Press: 1-29
- Blancquaert D., De Steur H., Gellynck X., Van Der Straeten D. 2014. Present and future of folate biofortification of crop plants. *Journal of Experimental Botany*, 65, 4: 895-906
- Blom H.J., Shaw G.M., den Heijer M., Finnell R.H. 2006. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 9: 724-731
- Bonechi C., Donati A., Lampariello R., Martini S., Picchi M.P., Ricchi M., Rossi C. 2004. Solution structure of folic acid: molecular mechanics and NMR investigation. *Spectrochimica Acta Part A*, 60, 7: 1411-1419
- Bouis H.E. 2002. Plant breeding: a new tool for fighting micronutrient malnutrition. *The Journal of Nutrition*, 132, 3: 491-494
- Butterworth C.E., Tamura T. 1989. Folic acid safety and toxicity - a brief review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 50, 2: 353-358
- Buttriss J. 2005. Strategies designed to increase awareness about folates and health, and to increase folate intake: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 16: 246-252
- Cahill L.E., El-Sohemy A. 2012. Genetic variation and nutrient metabolism. V: Present knowledge in nutrition. 10th ed. Erdman J.W.Jr., MacDonald I.A., Zeisel S.H. (eds.). Oxford, Wiley-Blackwell: 27-37
- Chango A. 2013. The Chemistry of Folate. V: B vitamins and folate: chemistry, analysis, function and effects. Preedy V.R. (ed.). Cambridge, The Royal Society of Chemistry: 158-163
- Cheung R.H.F., Morrison P.D., Small D.M., Marriott P.J. 2008. Investigation of folic acid stability in fortified instant noodles by use of capillary electrophoresis and reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1213, 1: 93-99
- Cheung R.H.F., Hughes J.G., Marriott P.J., Small D.M. 2009. Investigation of folic acid stability in fortified instant Asian noodles by use of capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, 112: 507-514

- Combs G.F.Jr. 2008. Discovery of the vitamins. V: The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. 3rd ed. Combs G.F.Jr. (ed.). London, Elsevier Academic Press: 7-33
- Combs G.F.Jr. 2008. Folates. V: The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. 3rd ed. Combs G.F.Jr. (ed.). London, Elsevier Academic Press: 355-380
- Cornish-Bowden A. 1987. IUPAC-IUB joint commission on biochemical nomenclature - Nomenclature and symbols for folic acid and related compounds, recommendations 1986. Pure & Applied Chemistry, 59, 6: 833-836
- Coşar A., İpçioğlu O.M., Özcan Ö., Gültepe M. 2014. Folate and homocysteine metabolisms and their roles in the biochemical basis of neuropsychiatry. Turkish Journal of Medical Sciences, 44, 1: 1-9
- Crider K.S., Bailey L.B., Berry R.J. 2011. Folic acid food fortification - its history, effect, concerns, and future directions. Nutrients, 3: 370-384
- Dántola M.L., Denofrio M.P., Zurbano B., Gimenez C.S., Ogilby P.R., Lorente C., Thomas A.H. 2010. Mechanism of photooxidation of folic acid sensitized by unconjugated pterins. Photochemical & Photobiological Sciences, 9: 1604-1612
- De Brouwer V., Zhang G.F., Storozhenko S., Straeten D.V., Lambert W.E. 2007. pH stability of individual folates during critical sample preparation steps in prevision of the analysis of plant folates. Phytochemical Analysis, 18, 6: 496-508
- Delchier N., Ringling C., Cuvelier M.E., Courtois F., Rychlik M., Renard C.M.G.C. 2014. Thermal degradation of folates under varying oxygen conditions. Food Chemistry, 165: 85-91
- Delchier N., Herbig A.L., Rychlik M., Renard C.M.G.C. 2016. Folates in fruits and vegetables: contents, processing, and stability. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 15, 3: 506-528
- DGE. 2013. DACH-Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr – Folat. Bonn, Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.: 1 str.
<https://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/folat/> (julij 2016)
- Dhonukshe-Rutten R.A.M., de Vries J.H.M., de Bree A., van der Put N., van Staveren W.A., de Groot L.C.P.G.M. 2009. Dietary intake and status of folate and vitamin B12 and their association with homocysteine and cardiovascular disease in European populations. European Journal of Clinical Nutrition, 63: 18-30
- DRI. 1998. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. Washington, The National Academies Press: 564 str.
- Duthie S.J., Narayanan S., Brand G.M., Pirie L. Grant G. 2002. Impact of folate deficiency on DNA stability. The Journal of Nutrition, 132, 8: 2444-2449
- EFSA. 2009. ESCO report prepared by the EFSA scientific cooperation working group on analysis of risks and benefits of fortification of food with folic acid. EFSA Journal, 6, 8: efs33e, doi: 10.2903/sp.efsa.2009.EN-3: 115 str.

- EFSA. 2014. Scientific opinion on dietary reference values for folate. EFSA Journal, 12, 11: 3893, doi:10.2903/j.efsa.2014.3893: 59 str.
- Eitenmiller R.R., Ye L., Landen W.O.Jr. 2008. Folate and folic acid. V: Vitamin analysis for the health and food sciences. 2nd ed. Eitenmiller R.R., Ye L., Landen W.O.Jr. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 443-505
- Forssén K.M., Jägerstad M.I., Wigertz K., Witthöft C.M. 2000. Folates and dairy product: a critical update. Journal of the American College of Nutrition, 19, 2: 100-110
- Frommherz L., Martiniak Y., Heuer T., Roth A., Kulling S.E., Hoffmann I. 2014. Degradation of folic acid in fortified vitamin juices during long term storage. Food Chemistry, 159: 122-127
- Galaction A.I., Blaga A.C., Cascaval D. 2005. The influence of pH and solvent polarity on the mechanism and efficiency of folic acid extraction with amberlite LA-2. Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly, 11, 2: 63-68
- Gliszczynska-Świgło A. 2006. Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) and the FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assays. Food Chemistry, 96: 131-136
- Gliszczynska-Świgło A. 2007. Folates as antioxidants. Food Chemistry, 101: 1480-1483
- Gliszczynska-Świgło A., Muzolf M. 2007. pH-dependent radical scavenging activity of folates. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 20: 8237-8242
- Gregory J.F.III. 2008. Vitamins. V: Fennema's food chemistry. 4th ed. Damodaran S., Parkin K.L., Fennema O.R. (eds.). Boca Raton, CRC Press - Taylor & Francis Group: 439-521
- Gujska E., Majewska K. 2005. Effect of baking process on added folic acid and endogenous folates stability in wheat and rye breads. Plant Foods for Human Nutrition, 60: 37-42
- Hannisdal R., Ueland P.M., Eussen S.J.P.M., Svardal A., Hustad S. 2009. Analytical recovery of folate degradation products formed in human serum and plasma at room temperature. The Journal of Nutrition, 139: 1415-1418
- Hanson A.D., Roje S. 2001. One-carbon metabolism in higher plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 52: 119-137
- Hathcock J.N. 2014. Folic acid. V: Vitamin and mineral safety. 3rd ed. MacKay D., Wong A., Nguyen H. (eds.). Washington, Council for Responsible Nutrition: 86-93
- Hazra A., Tripathi S.K. 2001. Folic acid revisited. Indian Journal of Pharmacology, 33, 5: 322 - 422
- Herbert V. 1999. Folic acid. V: Modern nutrition in health and disease. 9th ed. Shils M.E., Olson J.A., Shike M., Ross A.C. (eds.). Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins: 433-446
- Hirakawa K., Suzuki H., Oikawa S., Kawanishi S. 2003. Sequence-specific DNA damage induced by ultraviolet A-irradiated folic acid via its photolysis product. Archives of Biochemistry and Biophysics, 410, 2: 261-268
- Holasová M., Fiedlerová V., Roubal P., Pechačová M. 2005. Possibility of increasing natural folate content in fermented milk product by fermentation and fruit component addition. Czech Journal of Food Sciences, 23, 5: 196-201

- Jägerstad M., Piironen V., Walker C., Ros G., Carnovale E., Holasová M., Nau H. 2005. Increasing natural food folates through bioprocessing and biotechnology. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 298-306
- Johansson M., Jastrebova J., Grahn A., Jägerstad M. 2005. Separation of dietary folates by gradient reversed-phase HPLC: comparison of alternative and conventional silica-based stationary phases. *Chromatographia*, 62, 1: 33-40
- Jedlička A., Klimeš J. 2005. Determination of water- and fat-soluble vitamins in different matrices using high-performance liquid chromatography. *Chemical Papers*, 59, 3: 202-222
- Joshi R., Adhikari S., Patro B.S., Chattopadhyay S., Mukherjee T. 2001. Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 30, 12: 1390-1399
- Juzeniene A., Tam T.T.T., Iani V., Moan J. 2013. The action spectrum for folic acid photodegradation in aqueous solutions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 126, 11: 11-16
- Kelly P., McPartlin J., Goggins M., Weir D.G., Scott J.M. 1997. Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65, 6: 1790-1795
- Kopp M., Rychlik M. 2015. Quantitation of 5-methyltetrahydrofolic acid in dried blood spots and dried plasma spots by stable isotope dilution assays. *PLoS ONE*, 10, 11: e0143639, doi:10.1371/journal.pone.0143639: 18 str.
- Krawinkel M.B., Strohm D., Weissenborn A., Watzl B., Eichholzer M., Bärlocher K., Elmadfa I., Leschik-Bonnet E., Heseker H. 2014. Revised D-A-CH intake recommendations for folate: how much is needed? *European Journal of Clinical Nutrition*, 68: 719-723
- Laanpere M., Altmäe S., Stavreus-Evers A., Nilsson T.K., Yngve A., Salumets A. 2010. Folate-mediated one-carbon metabolism and its effect on female fertility and pregnancy outcome. *Nutrition Reviews*, 68, 2: 99-113
- Lanska D.J. 2010. Historical aspects of the major neurological vitamin deficiency disorders: the water-soluble B vitamins. V: *Handbook of clinical neurology*. Aminoff M.J., Boller F., Swaab D.F. (eds.). Amsterdam, Elsevier B.V.: 445-476
- LeBlanc J.G., Savoy de Giori G., Smid E.J., Hugenholtz J., Sesma F. 2007. Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade microorganisms. V: *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*. Vol. 1. 1st ed. Méndez-Vilas A. (ed.). Badajoz, Formatec Research Center: 329-339
- 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, 4: 252-276
- Madziva H., Kailasapathy K., Phillips M. 2005. Alginate-pectin microcapsules as a potential for folic acid delivery if foods. *Journal of Microencapsulation*, 22, 4: 343-351

- Mitchell H.K., Snell E.E., Williams R.J. 1941. The concentration of "folic acid". *Journal of the American Chemical Society*, 63, 8: 2284-2284
- Mitchell H.K., Snell E.E., Williams R.J. 1944. Folic acid. I. Concentration from spinach. *Journal of the American Chemical Society*, 66, 2: 267-268
- Morris M.S., Jacques P.F., Rosenberg I.H., Selhub J. 2010. Circulating unmetabolized folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive test performance in American seniors. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91, 6: 1733-1744
- Nakamura M., Nagayoshi R., Ijiri K., Nakashima-Matsushita N., Takeuchi T., Matsuyama T. 2002. Nitration and chlorination of folic acid by peroxy nitrite and hypochlorous acid, and the selective binding of 10-nitrofolate to folate receptor β . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297, 5: 1238-1244
- Nguyen M.T., Indrawati, Hendrickx M. 2003. Model studies on the stability of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid degradation during thermal treatment in combination with high hydrostatic pressure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 11: 3352-3357
- O'Briain J.D., Temperley I.J., Brown J.P., Scott J.M. 1975. Nutritional stability of various naturally occurring monoglutamate derivatives of folic acid. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 28: 438-444
- Off M.K., Steindal A.E., Porojnicu A.C., Juzeniene A., Vorobey A., Johnsson A., Moan J. 2005. Ultraviolet photodegradation of folic acid. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 80: 47-55
- Öhrvik V., Witthöft C. 2008. Orange juice is a good folate source in respect to folate content and stability during storage and simulated digestion. *European Journal of Nutrition*, 47, 2: 92-98
- Paine-Wilson B., Chen T.S. 1979. Thermal destruction of folacin: effect of pH and buffer ions. *Journal of Food Science*, 44, 3: 717-722
- Panijpan B. 1979. The pteridine ring of folic acid – lactam or lactim form. *Biochemical Education*, 7, 2: 38-39
- Papastoyiannidis G., Polychroniadou A., Michaelidou A.M., Alichanidis E. 2006. Fermented milks fortified with B-group vitamins: vitamin stability and effect on resulting products. *Food Science and Technology International*, 12, 6: 521-529
- Patro B.S., Adhikari S., Mukherjee T., Chattopadhyay S. 2005. Possible role of hydroxyl radicals in the oxidative degradation of folic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15, 1: 67-71
- Pfeiffer C.M., Fazili Z., Zhang M. 2010. Folate analytical methodology. V: Folate in health and disease. 2nd ed. Bailey L.B. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 517-574
- Poe M. 1977. Acidic dissociation constants of folic acid, dihydrofolic acid, and methotrexate. *The Journal of Biological Chemistry*, 252, 11: 3724-3728

- Prasertmanakit S., Praphairaksit N., Chiangthong W., Muangsin N. 2009. Ethyl cellulose microcapsules for protecting and controlled release of folic acid. An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists, 10, 4: 1104-1112
- Referenčne vrednosti za vnos hrani. 2004. 1. izd. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije: 215 str.
- Roe D.A. 1978. Lucy Wills (1888–1964): A biographical sketch. The Journal of Nutrition, 108, 9: 1379-1383
- Sauberlich H.E., Kretsch M.J., Skala J.H., Johnson H.L., Taylor P.C. 1987. Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. The American Journal of Clinical Nutrition, 46, 6: 1016-28
- Saxby M.J., Smith P.R., Blake C.J., Coveney L.V. 1983. The degradation of folic acid in a model system and in beer. Food Chemistry, 12, 2: 115-126
- SCF. 2000. Opinion of the Scientific Committee on Food on the tolerable upper intake level of folate. Brussels, European Commission, Health & Consumer Protection Directorate – General, Scientific Committee on Food: 13 str. www.europa.eu/food/fs/sc/scf/out80e_en.pdf (oktober 2014)
- Scheindlin S., Lee A., Griffith I. 1952. The action of riboflavin on folic acid. Journal of the American Pharmaceutical Association, 41, 8: 420-427
- Scott J., Rébeillé F., Fletcher J. 2000. Review: folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 7: 795-824
- Shrestha A.K., Arcot J., Dhital S., Crennan S. 2012. Effect of biscuit baking conditions on the stability of microencapsulated 5-methyltetrahydrofolic acid and their physical properties. Food and Nutrition Sciences, 3: 1445-1452
- Sigma-Aldrich. 2016a. Folic acid: product information. Saint Louis, Sigma-Aldrich: 1 str. http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/f7876pis.pdf (julij 2016)
- Sigma-Aldrich. 2016b. L-glutamic acid: product information. Saint Louis, Sigma-Aldrich: 2 str. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/g1251pis.pdf (julij 2016)
- Smith A.D., Kim Y.I., Refsum H. 2008. Is folic acid good for everyone? The American Journal of Clinical Nutrition, 87: 517-533
- Stanger O. 2002. Physiology of folic acid in health and disease. Current Drug Metabolism, 3, 2: 211-223
- Stanger O., Wonisch W. 2012. Enzymatic and non-enzymatic antioxidative effects of folic acid and its reduced derivates. Subcellular Biochemistry, 56: 131-161
- Steindal A.H., Porojnicu A.C., Moan J. 2007. Is the seasonal variation in cancer prognosis caused by sun-induced folate degradation? Medical Hypotheses, 69: 182-185
- Stokstad E.L.R. 1943. Some properties of a growth factor for *Lactobacillus casei*. The Journal of Biological Chemistry, 149: 573-574

- Stokstad E.L.R., Hutchings B.L., Mowat J.H., Boothe J.H., Waller C.W., Angier R.B., Semb J., Subbarow Y. 1948. The degradation of the fermentation *Lactobacillus casei* factor. Journal of the American Chemical Society, 70, 1: 5-9
- Storozhenko S., De Brouwer V., Volckaert M., Navarrete O., Blancquaert D., Zhang G.-F., Lambert W., Van Der Straeten D. 2007. Folate fortification of rice by metabolic engineering. Nature Biotechnology, 25, 11: 1277-1279
- Stover P.J. 2004. Physiology of folate and vitamin B₁₂ in health and disease. Nutrition Reviews, 62, 6: 3-12
- Temple C.Jr., Rose J.D., Montgomery J.A. 1981. Chemical conversion of folic acid to pteroxic acid. The Journal of Organic Chemistry, 46, 18: 3666-3667
- Thaler C.J. 2014. Folate metabolism and human reproduction. Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 74, 9: 845-851
- The Merck Index. 2006. Folic acid. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 14th ed. O'Neil M.J. (ed.). Whitehouse Station, Merck and Company: 4223-4223
- Thomas A.H., Suárez G., Cabrerizo F.M., Martino R., Capparelli A.L. 2000. Study of the photolysis of folic acid and 6-formylpterin in acid aqueous solutions. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 135: 147-154
- Thomas A.H., Lorente C., Capparelli A.L., Pokhrel M.R., Braun A.M., Oliveros E. 2002a. Fluorescence of pterin, 6-formylpterin, 6-carboxypterin and folic acid in aqueous solution: pH effects. Photochemical and Photobiological Sciences, 1, 6: 421-426
- Thomas A.H., Suárez G., Cabrerizo F.M., García Einschlag F.S., Martino R., Baiocchi C., Parmauro E., Capparelli A.L. 2002b. Photochemical behavior of folic acid in alkaline aqueous solutions and evolution of its photoproducts. Helvetica Chimica Acta, 85, 8: 2300-2315
- Troen A.M., Mitchell B., Sorensen B., Wener M.H., Johnston A., Wood B., Selhub J., McTiernan A., Yasui Y., Oral E., Potter J.D., Ulrich C.M. 2006. Unmetabolized folic acid in plasma is associated with reduced natural killer cell cytotoxicity among postmenopausal women. The Journal of Nutrition, 136, 1: 189-194
- Tyagi A., Penzkofer A. 2010. Fluorescence spectroscopic behaviour of folic acid. Chemical Physics, 367: 83-92
- Uredba Komisije (ES) št. 1925/2006 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 20. decembra 2006 o dodajanju vitaminov, mineralov in nekaterih drugih snovi živilom. 2006. Uradni list Evropske Unije, L404: 26-38
- Uredba Komisije (ES) št. 1170/2009 z dne 30. novembra 2009 o spremembi Direktive 2002/46/ES Evropskega parlamenta in Sveta in Uredbe (ES) št. 1925/2006 Evropskega parlamenta in Sveta glede seznamov vitaminov in mineralov ter njihovih oblik, ki se lahko dodajo živilom, vključno s prehranskimi dopolnili. 2009. Uradni list Evropske Unije, L314: 36-42
- Vora A., Riga A., Dollimore D., Alexander K.S. 2002. Thermal stability of folic acid. Thermochimica Acta, 392-393: 209-220

- Vorobey P., Steindal A.E., Off M.K., Vorobey V., Moan J. 2006. Influence of human serum albumin on photodegradation of folic acid in solution. Photochemistry and Photobiology, 82, 3: 817-822
- Waller C.W., Hutchings B.L., Mowat J.H., Stokstad E.L.R., Boothe J.H., Angier R.B., Semb J., Subbarow Y., Cosulich D.B., Fahrenbach M.J., Hultquist M.E., Kuh E., Northey E.H., Seeger D.R., Sickels J.P., Smith J.M. 1948. Synthesis of pteroylglutamic acid (liver *L. casei* factor) and pteroic acid. Journal of American Chemical Society, 70, 1: 19-22
- Wills L. 1931. Treatment of "pernicious anaemia of pregnancy" and "tropical anaemia". British Medical Journal, 1, 3676: 1059-1064
- Wright A.J.A., Dainty J.R., Finglas P.M. 2007. Folic acid metabolism in human subjects revisited: potential implications for proposed mandatory folic acid fortification in the UK. British Journal of Nutrition, 98: 667-675
- Wu Z., Li X., Hou C., Qian Y. 2010. Solubility of folic acid in water at pH values between 0 and 7 at temperatures (298.15, 303.15 and 313.15) K. Journal of Chemical & Engineering Data, 55: 3958-3961
- Yakubu S., Muazu J. 2010. Effects of variables on degradation of folic acid. Der Pharmacia Sinica, 1, 3: 55-58
- Younis I.R., Stamatakis M.K., Callery P.S., Meyer-Stout P.J. 2009. Influence of pH on dissolution of the folic acid supplements. International Journal of Pharmaceutics, 367: 97-102

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Nataši Poklar Ulrich za pomoč in nasvete pri pisanju diplomskega dela. Hvala tudi za vse spodbudne besede in razumevanje.

Iskrena hvala somentorici dr. Mihaeli Skrt. Zahvaljujem se za strokovno pomoč pri laboratorijskem delu ter potrpežljivost in nasvete ob nastajanju diplomskega dela.

Hvala tudi recenzentu prof. dr. Janezu Salobirju za hiter in temeljit pregled diplomskega dela.

Zahvaljujem se celotni ekipi Katedre za biokemijo in kemijo živil, Oddelka za živilstvo, za vso pomoč in nasvete.

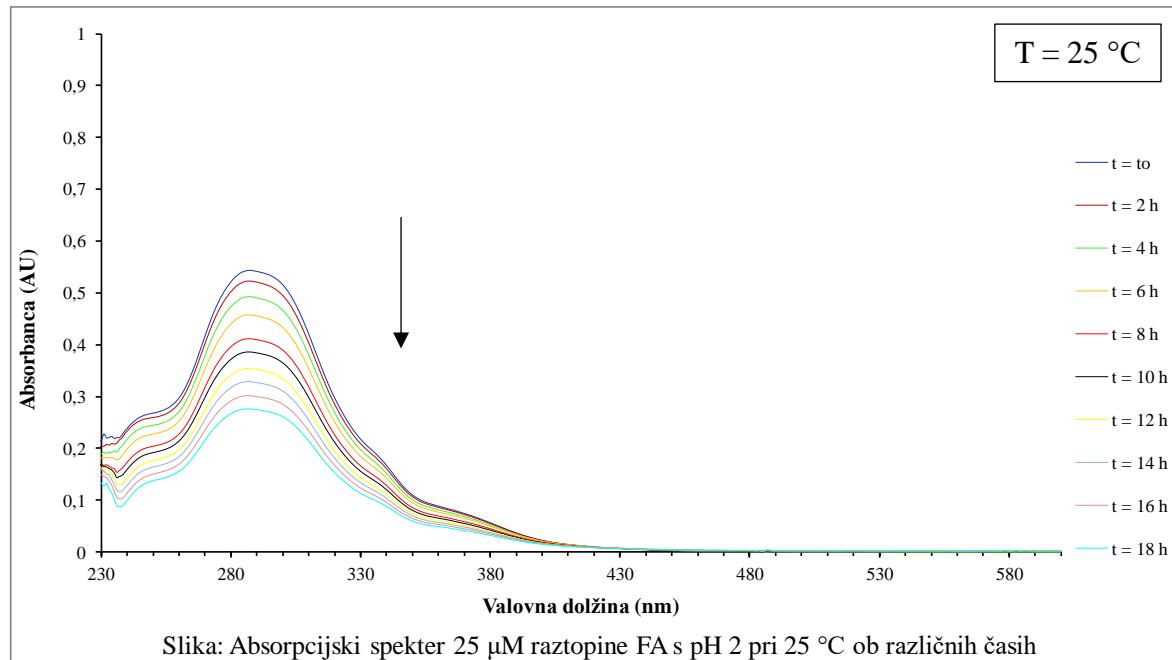
Največja zahvala je namenjena mojima staršema, ki sta mi omogočila študij in mi stojita ob strani na vseh poteh življenja.

Tanja, hvala ker mi vsa ta leta stojiš ob strani ter za vso pomoč pri oblikovanju diplomskega dela.

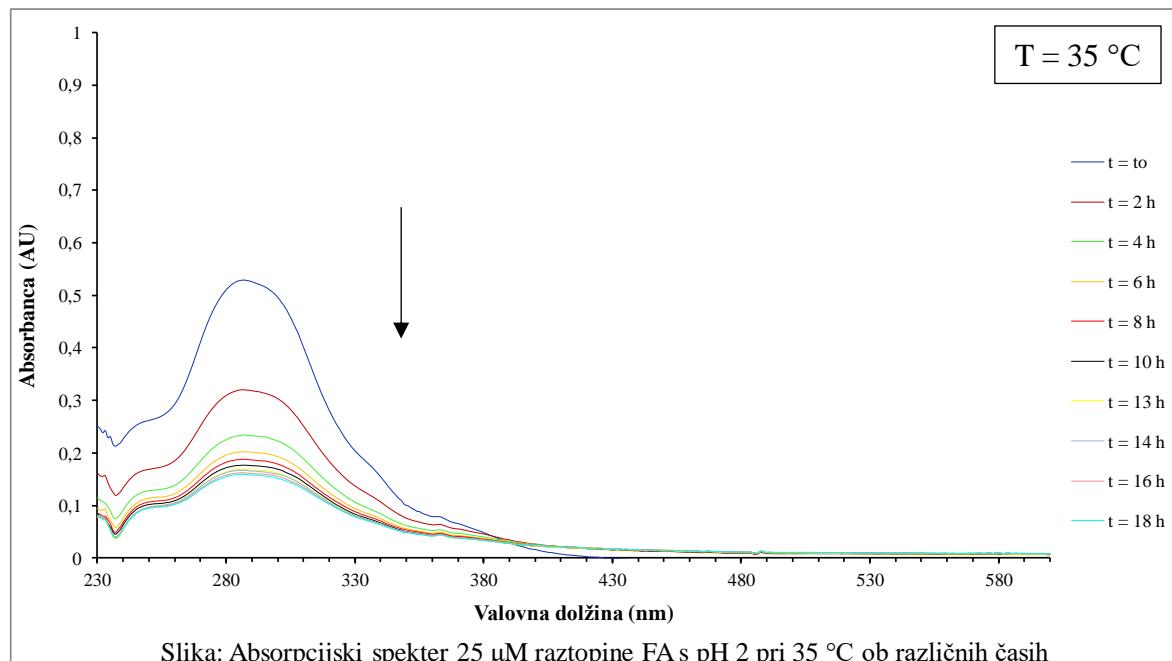
Jože, hvala ti za vso podporo in ker verjameš vame.

PRILOGE

Priloga A: Absorpcijski spektri 25 μM raztopin folnih kislin s pH 2 v temperaturnem območju od 25 °C do 85 °C



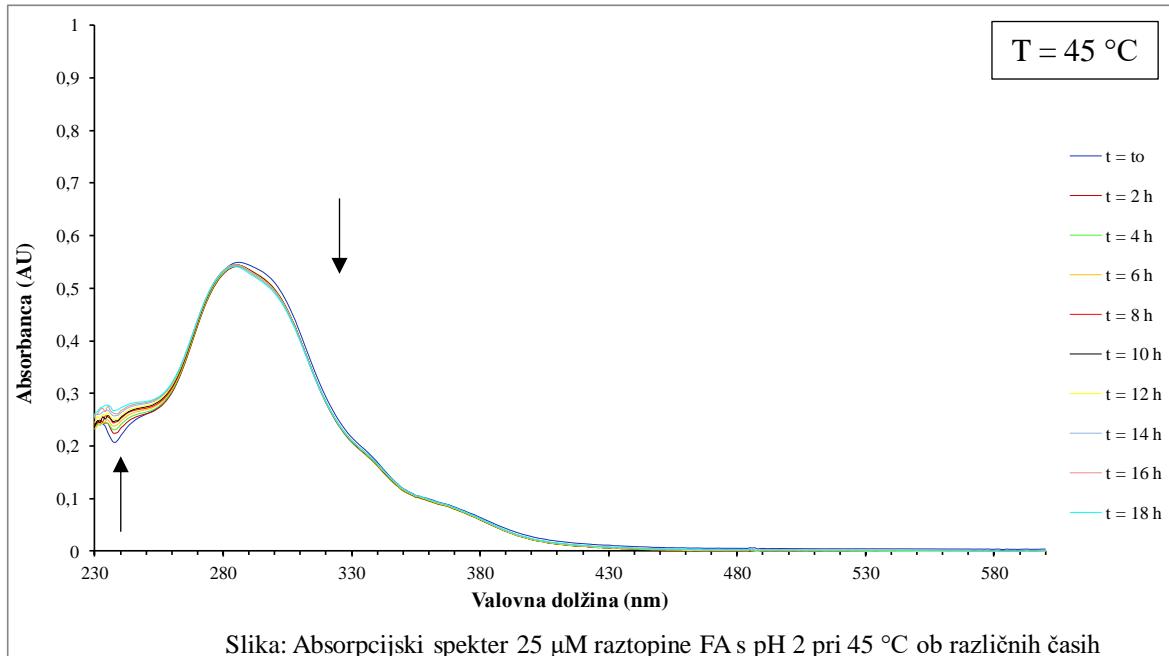
Slika: Absorpcijski spekter 25 μM raztopine FA s pH 2 pri 25 °C ob različnih časih



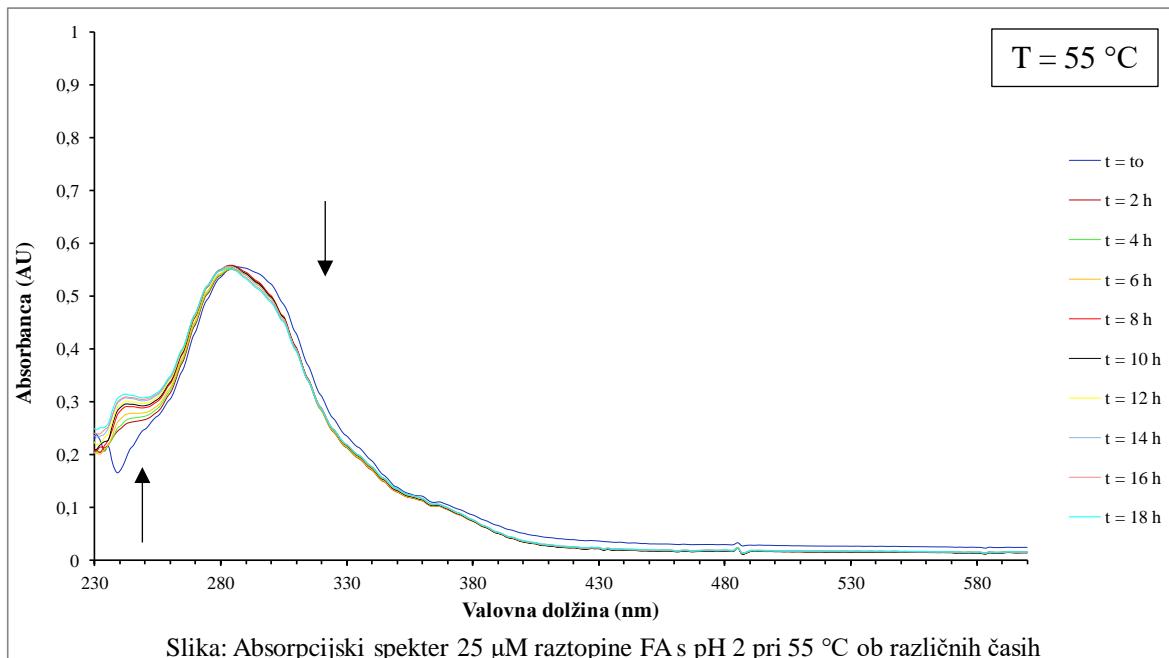
Slika: Absorpcijski spekter 25 μM raztopine FA s pH 2 pri 35 °C ob različnih časih

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge A: Absorpcijski spektri $25 \mu\text{M}$ raztopin folnih kislin s pH 2 v temperaturnem območju od 25°C do 85°C

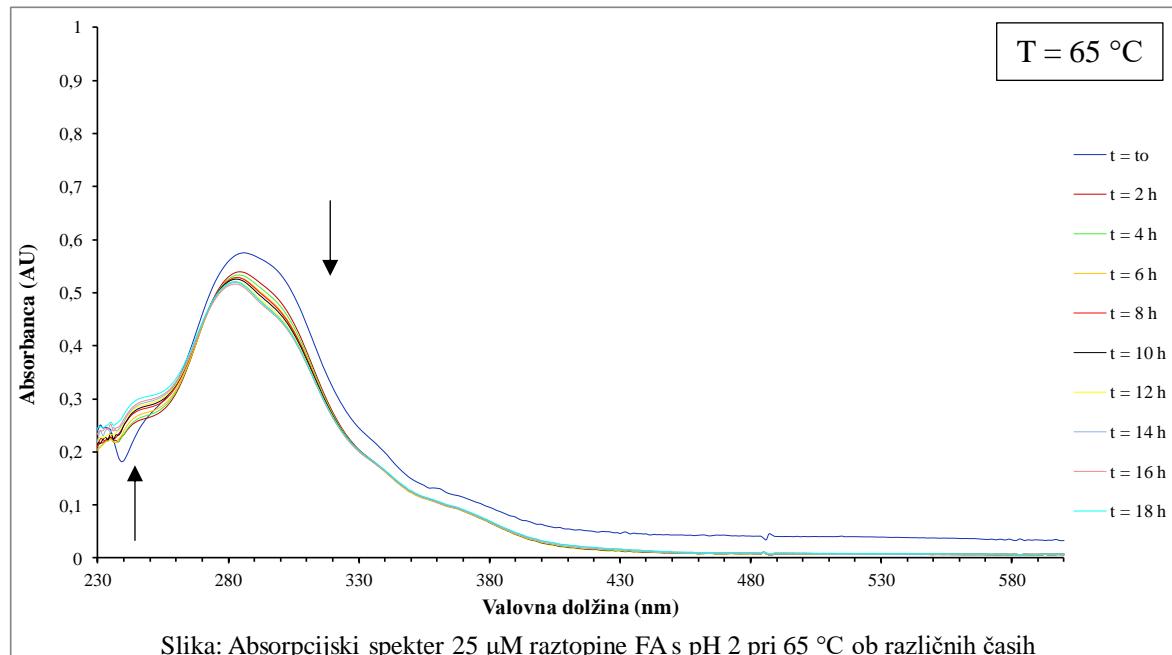


Slika: Absorpcijski spekter $25 \mu\text{M}$ raztopine FA s pH 2 pri 45°C ob različnih časih

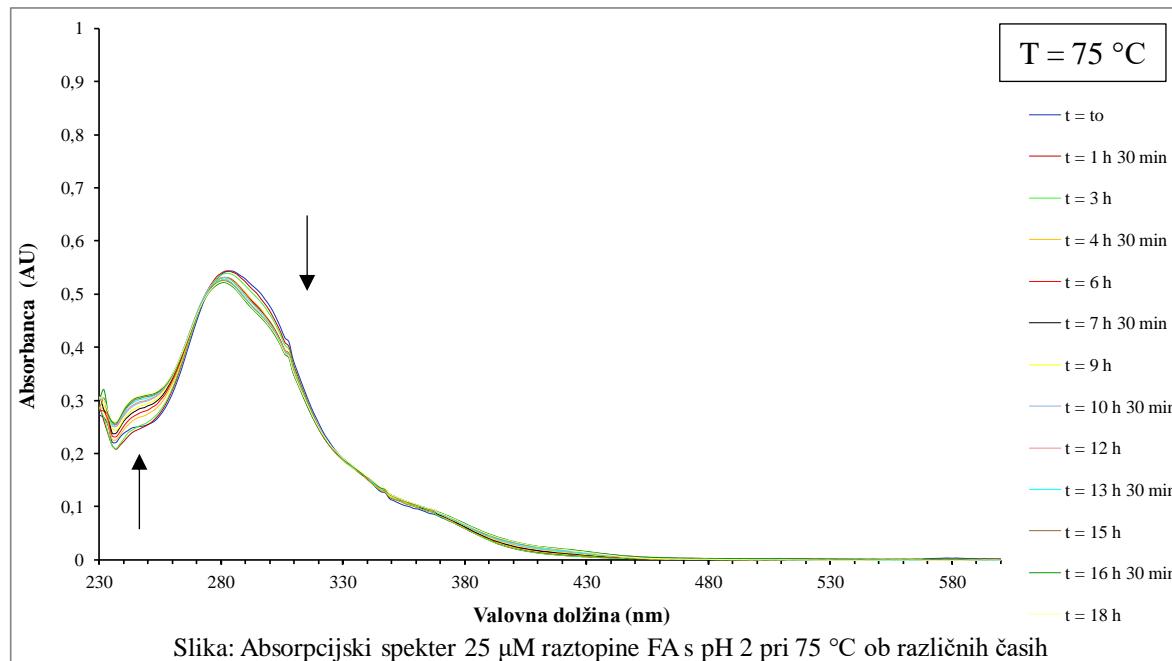


se nadaljuje

nadaljevanje Priloge A: Absorpcijski spektri $25 \mu\text{M}$ raztopin folnih kislin s pH 2 v temperaturnem območju od 25°C do 85°C



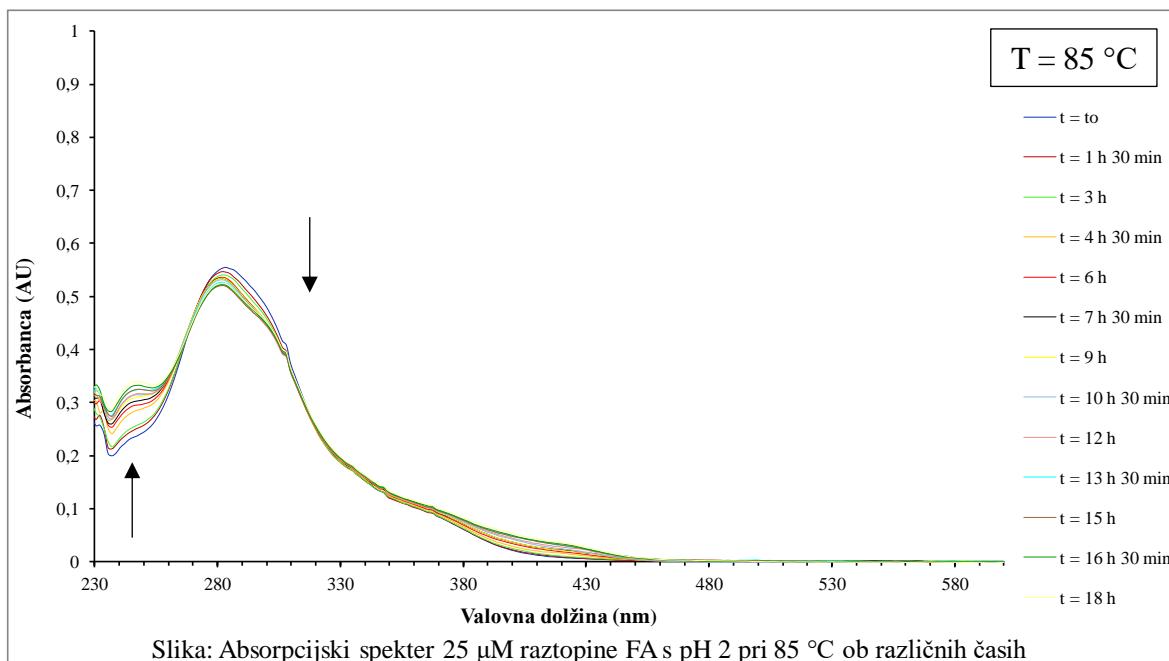
Slika: Absorpcijski spekter $25 \mu\text{M}$ raztopine FA s pH 2 pri 65°C ob različnih časih



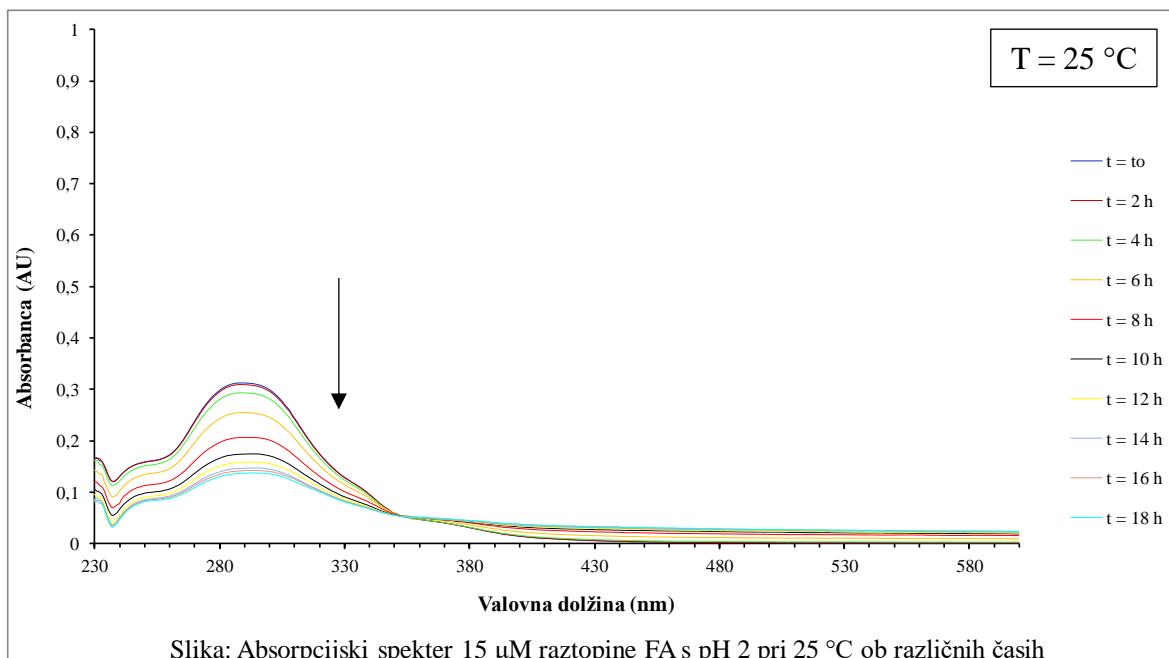
Slika: Absorpcijski spekter $25 \mu\text{M}$ raztopine FA s pH 2 pri 75°C ob različnih časih

se nadaljuje

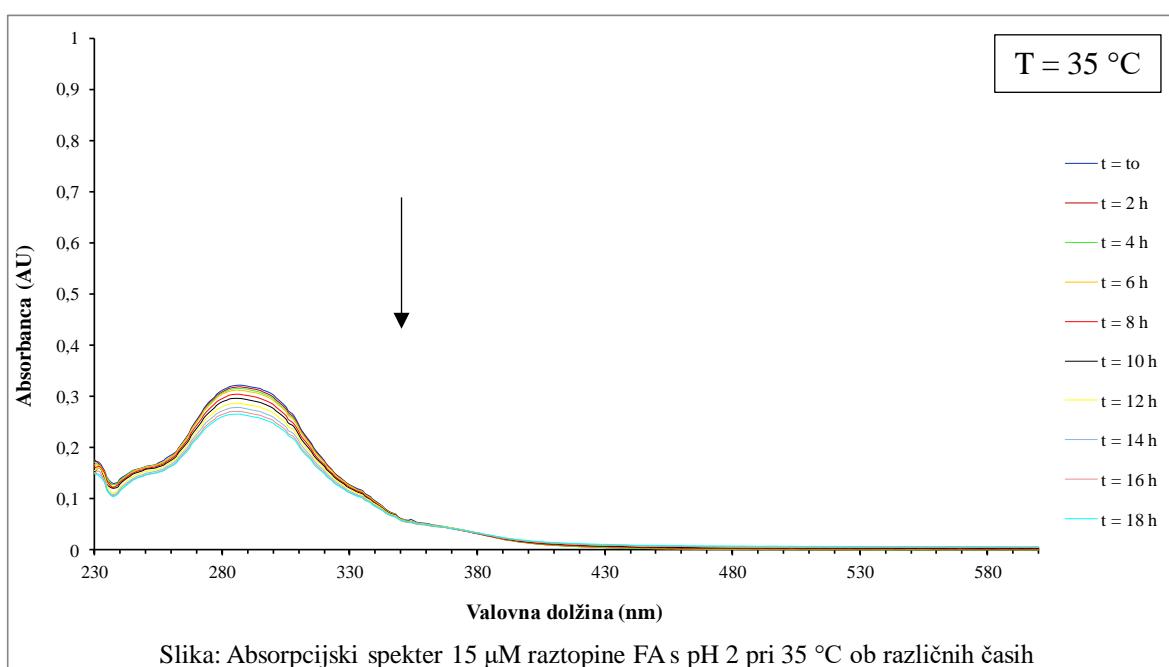
nadaljevanje Priloge A: Absorpcijski spektri $25 \mu\text{M}$ raztopin folnih kislin s pH 2 v temperaturnem območju od 25°C do 85°C



Priloga B: Absorpcijski spektri 15 μM raztopin folnih kislin s pH 2 v temperaturnem območju od 25 °C do 55 °C



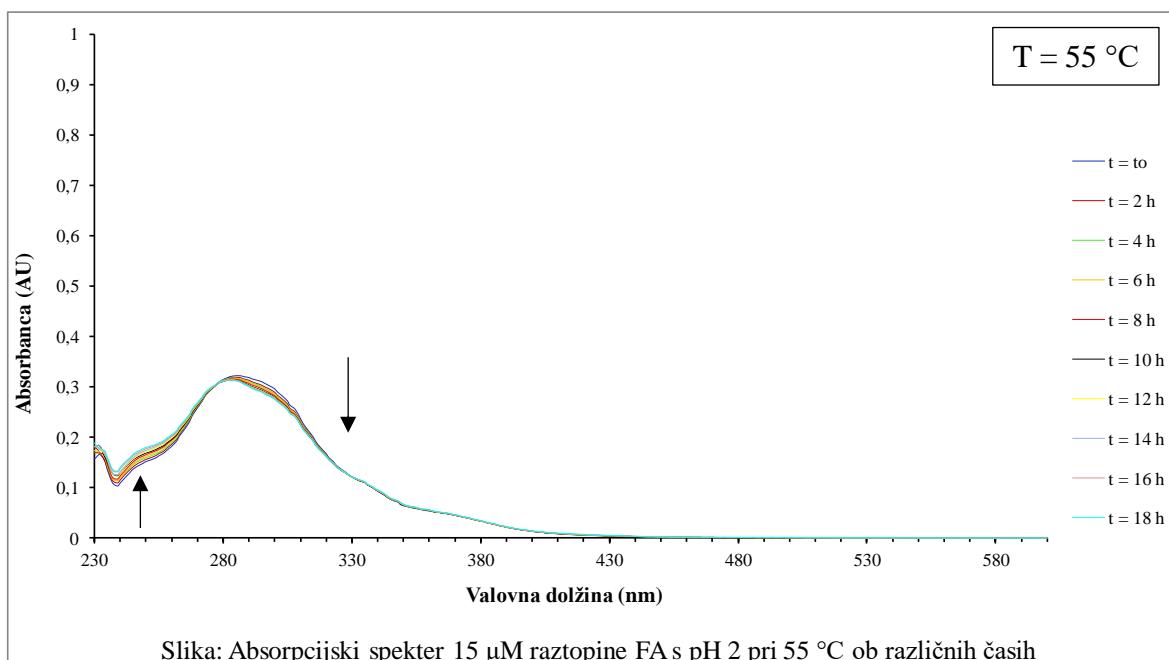
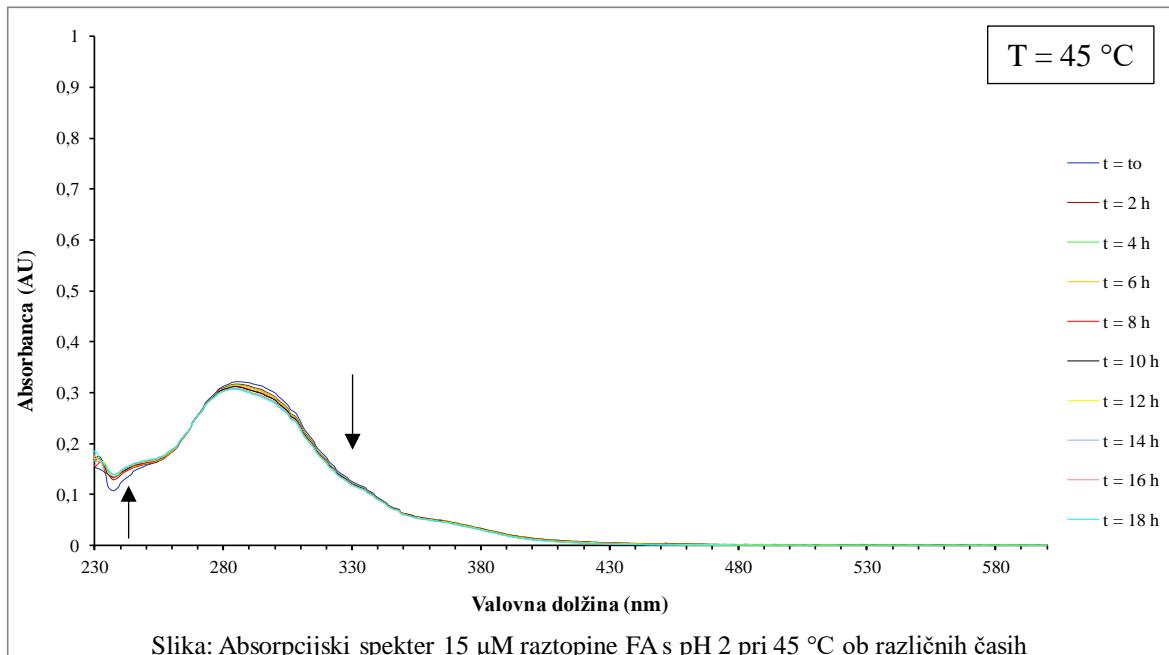
Slika: Absorpcijski spekter 15 μM raztopine FA s pH 2 pri 25 °C ob različnih časih



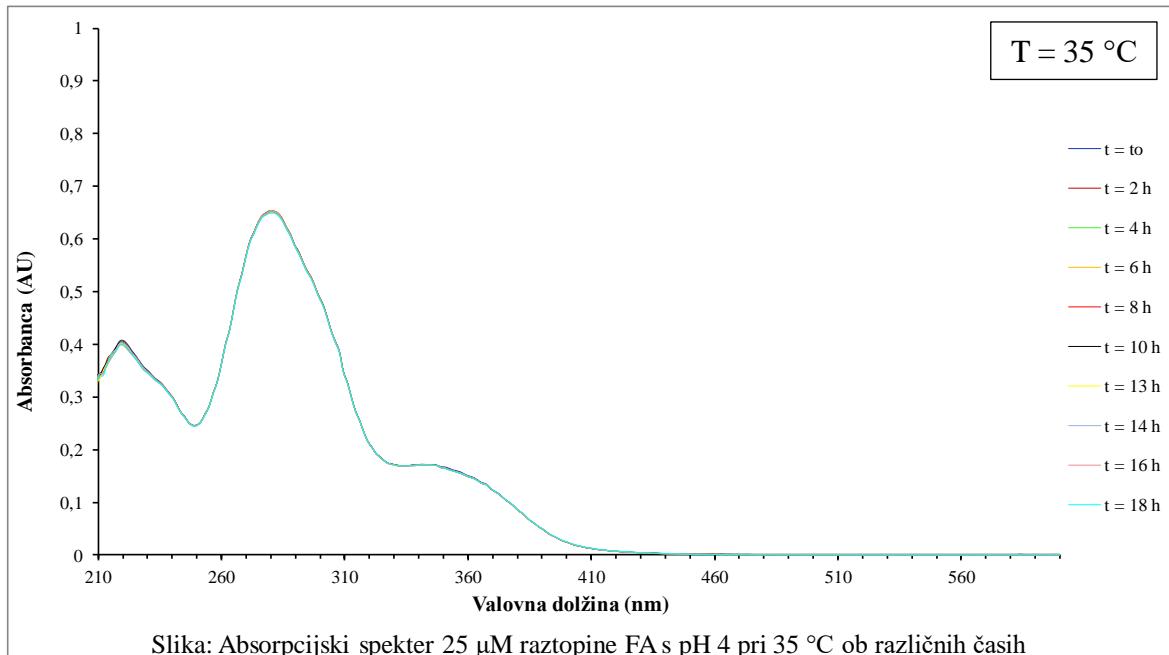
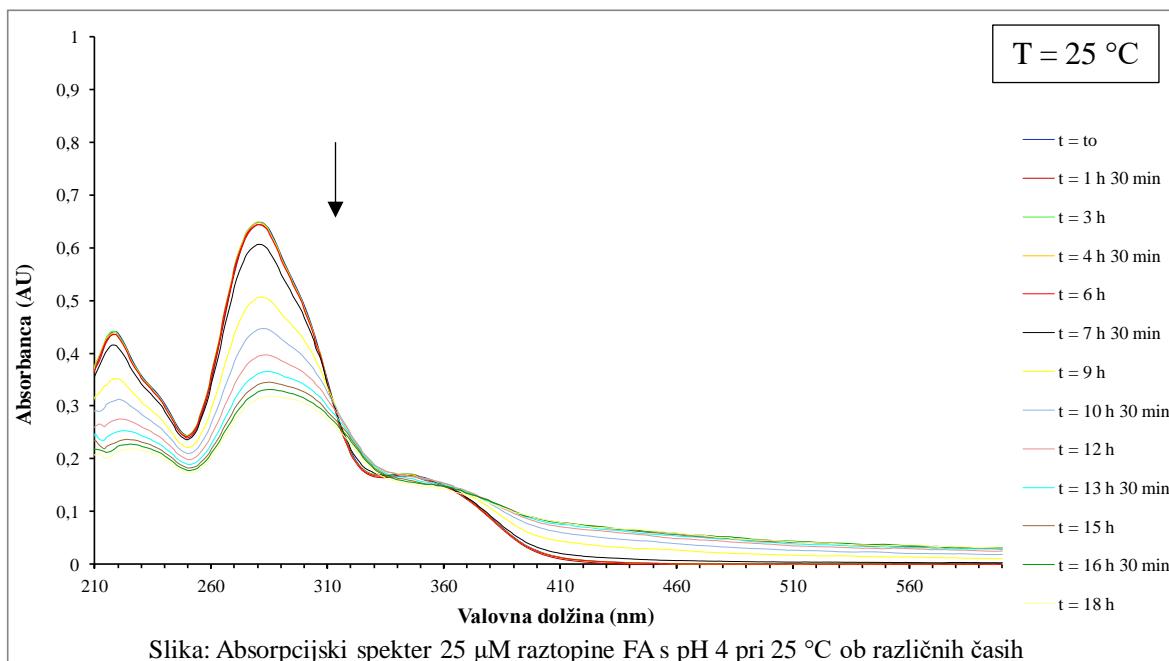
Slika: Absorpcijski spekter 15 μM raztopine FA s pH 2 pri 35 °C ob različnih časih

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge B: Absorpcijski spektri $15 \mu\text{M}$ raztopin folnih kislin s pH 2 v temperaturnem območju od 25°C do 55°C

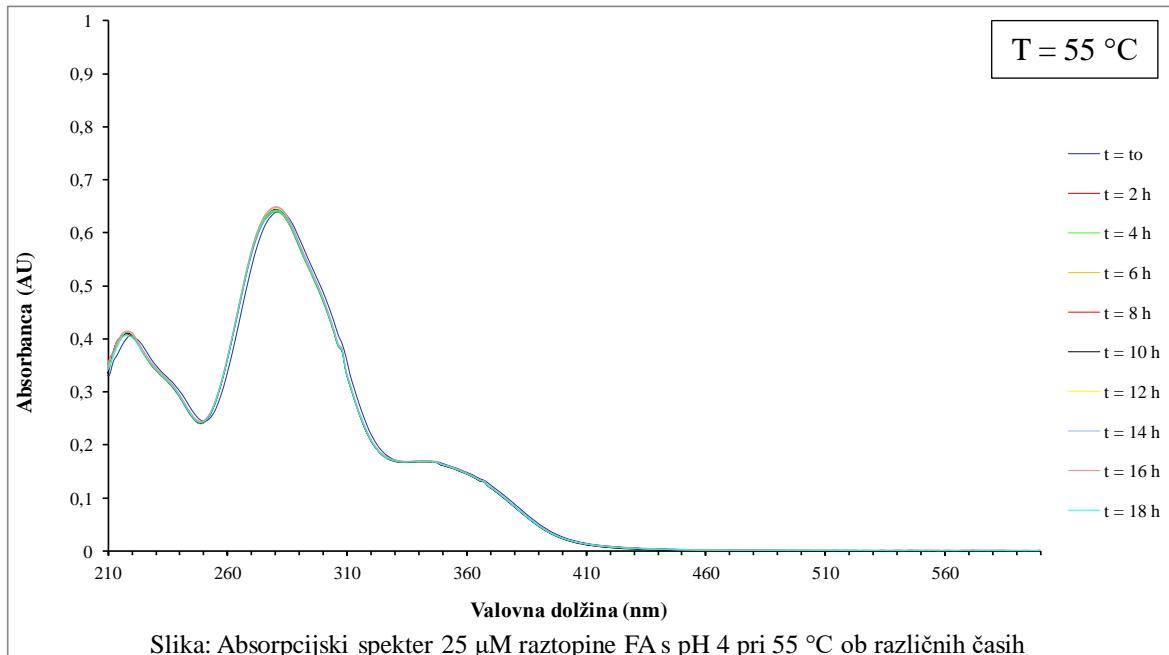
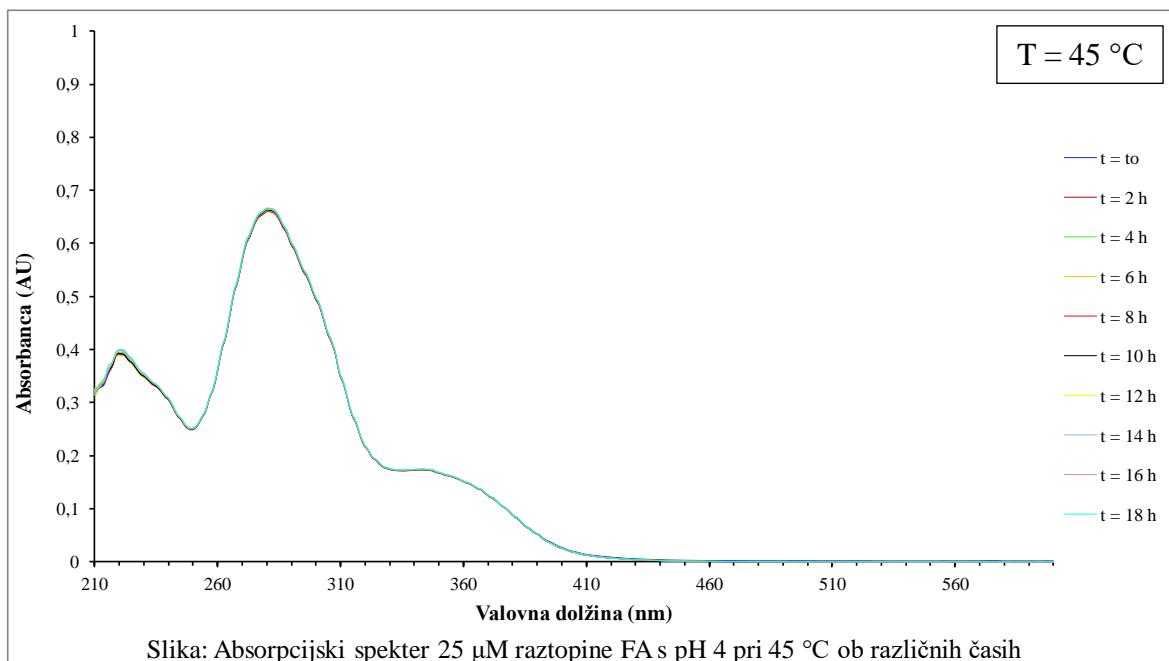


Priloga C: Absorpcijski spektri 25 µM raztopin folnih kislin s pH 4 v temperaturnem območju od 25 °C do 85 °C



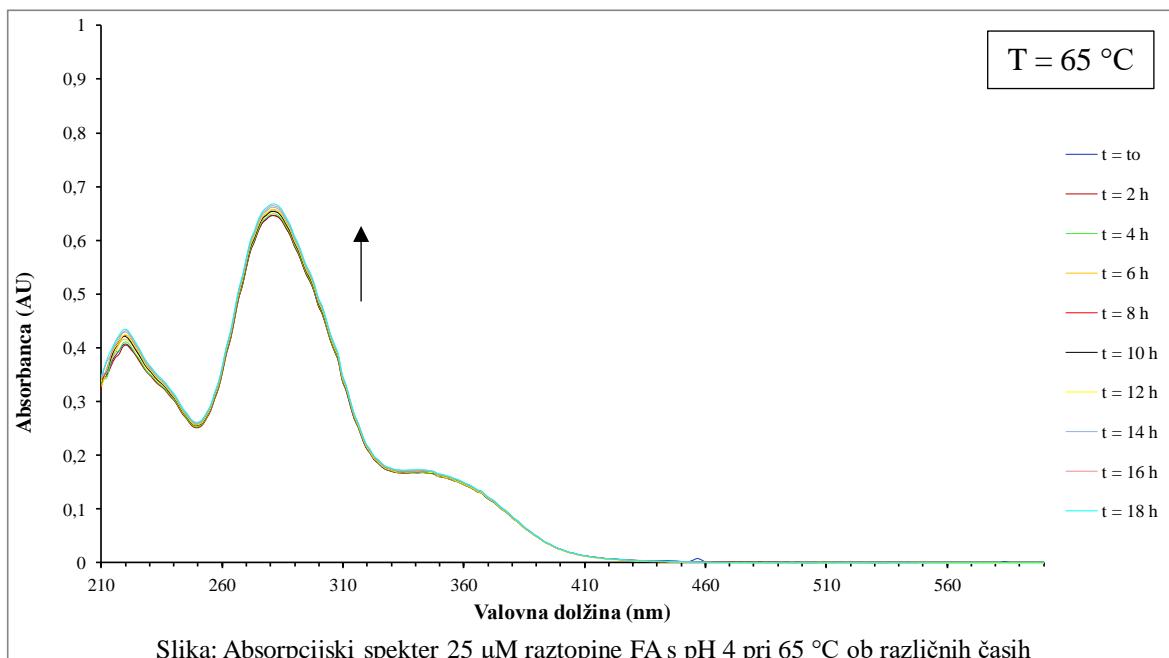
se nadaljuje

nadaljevanje Priloge C: Absorpcijski spektri $25 \mu\text{M}$ raztopin folnih kislin s pH 4 v temperaturnem območju od 25°C do 85°C

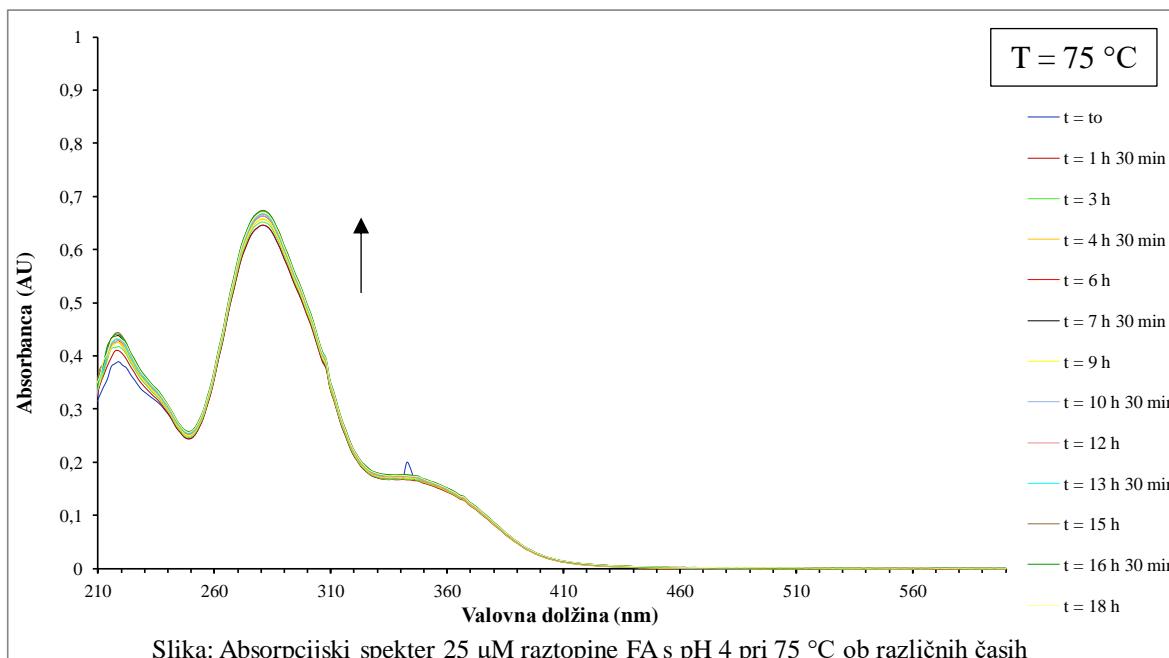


se nadaljuje

nadaljevanje Priloge C: Absorpcijski spektri 25 μM raztopin folnih kislin s pH 4 v temperaturnem območju od 25 °C do 85 °C



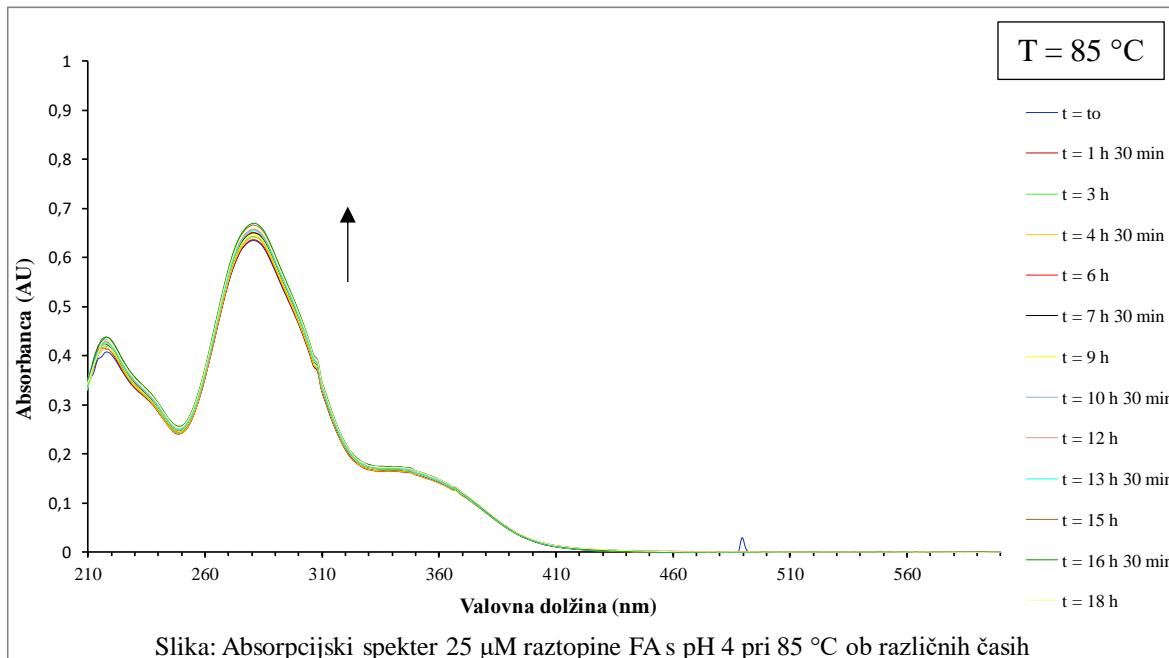
Slika: Absorpcijski spekter 25 μM raztopine FA s pH 4 pri 65 °C ob različnih časih



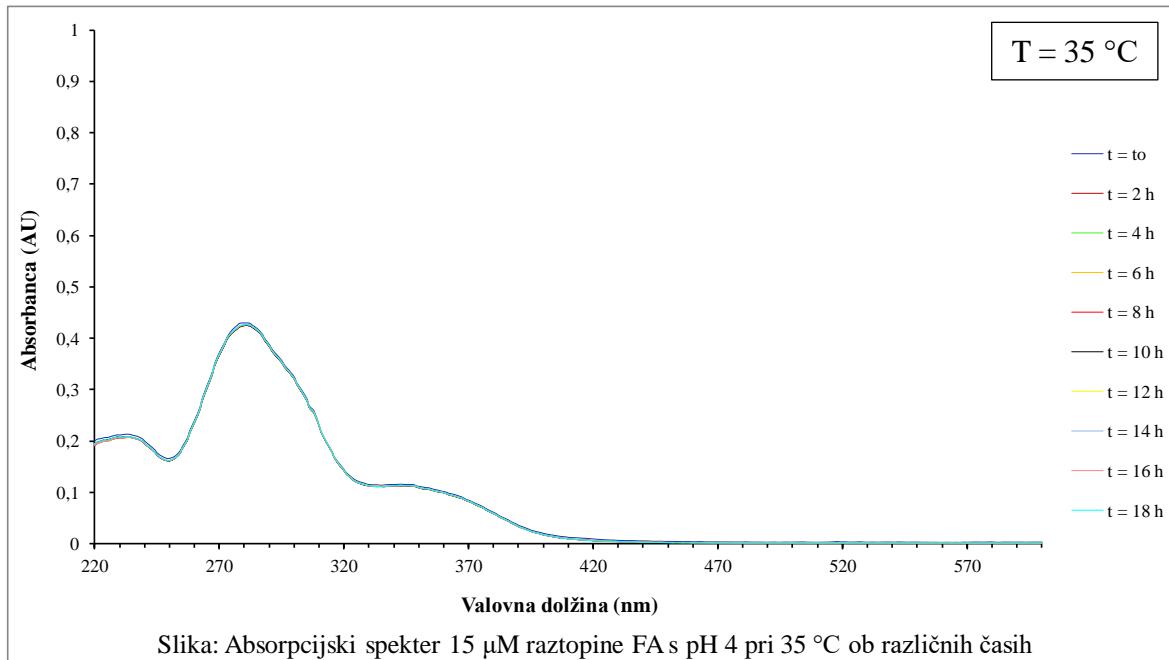
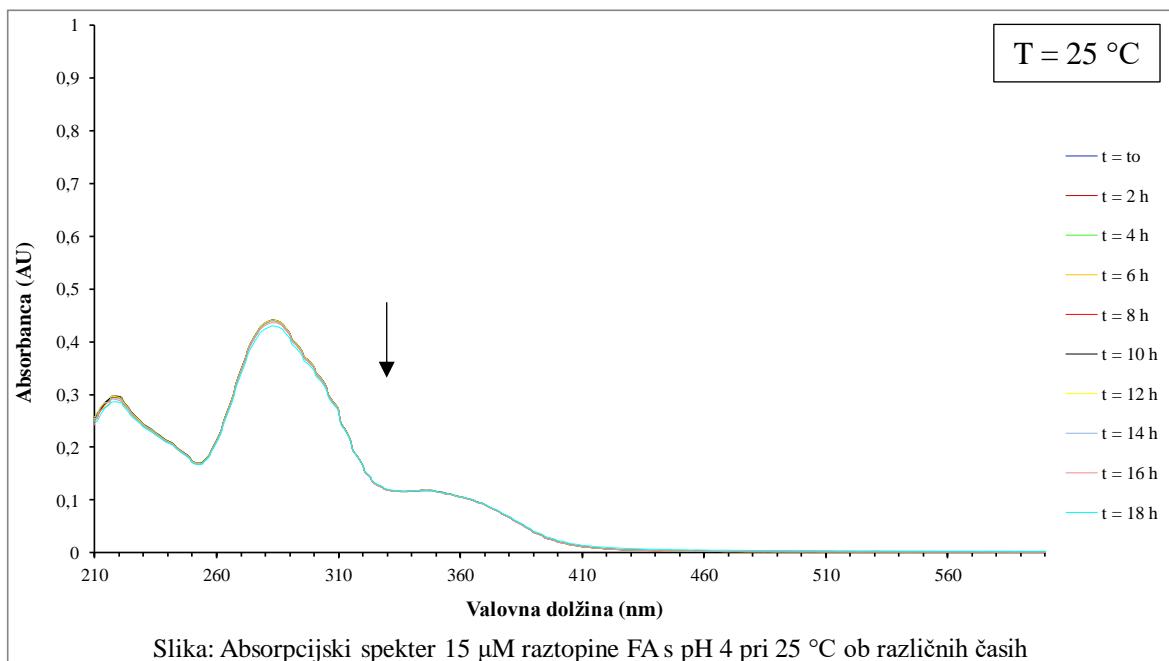
Slika: Absorpcijski spekter 25 μM raztopine FA s pH 4 pri 75 °C ob različnih časih

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge C: Absorpcijski spektri 25 μM raztopin folnih kislin s pH 4 v temperaturnem območju od 25 °C do 85 °C

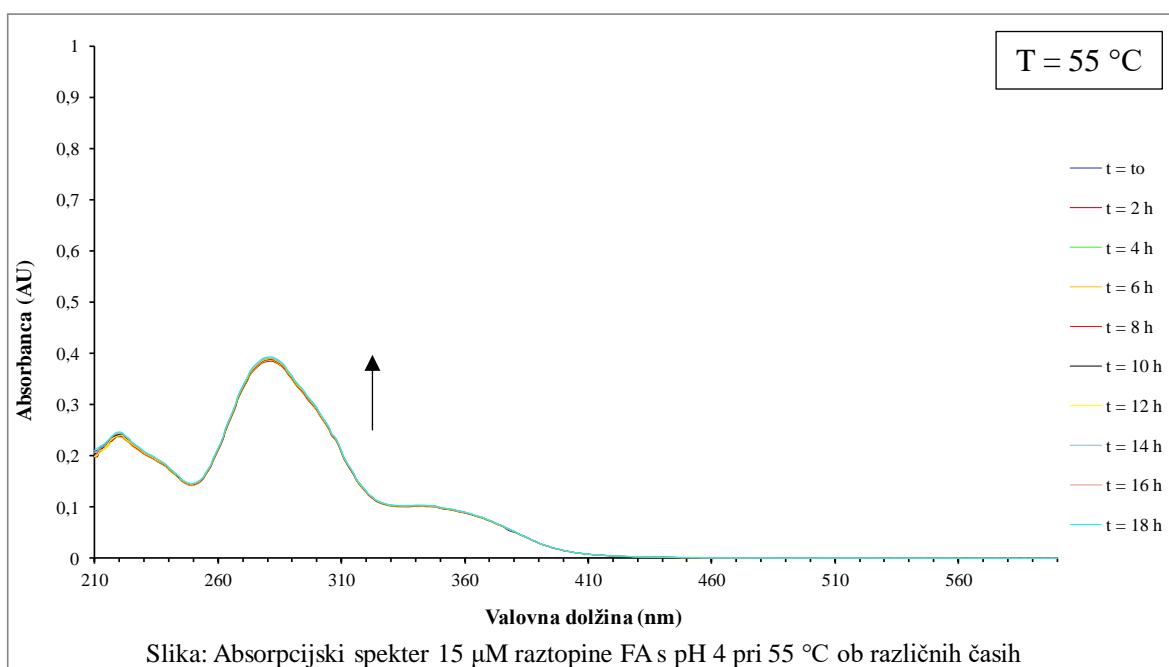
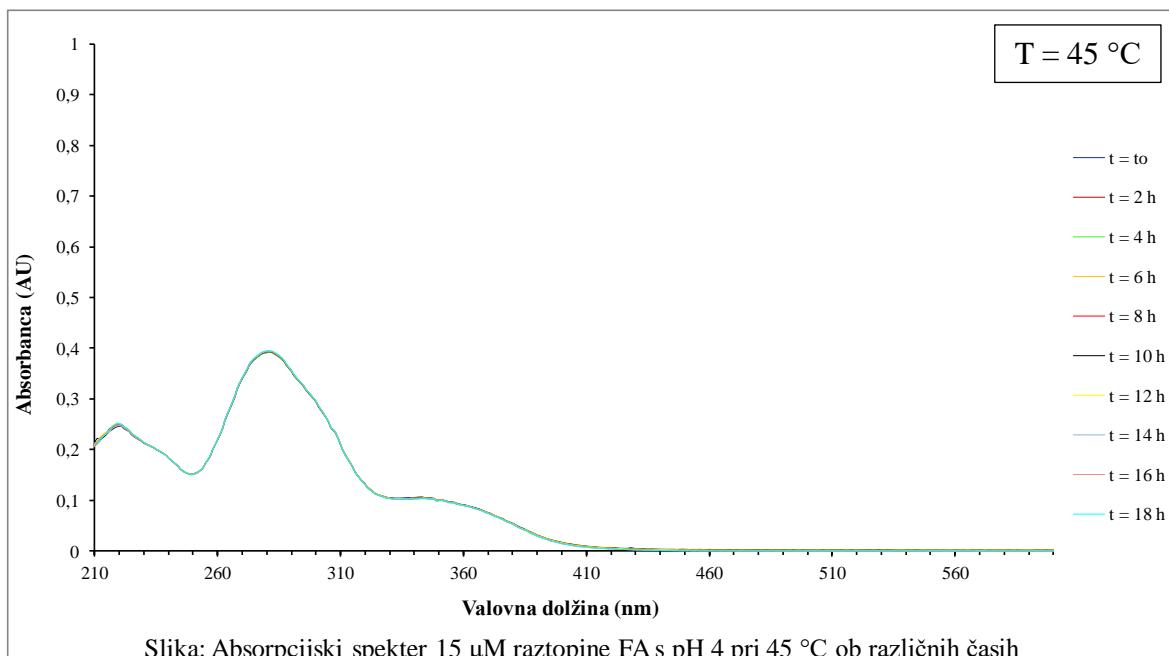


Priloga D: Absorpcijski spektri 15 μM raztopin folnih kislin s pH 4 v temperaturnem območju od 25 °C do 55 °C

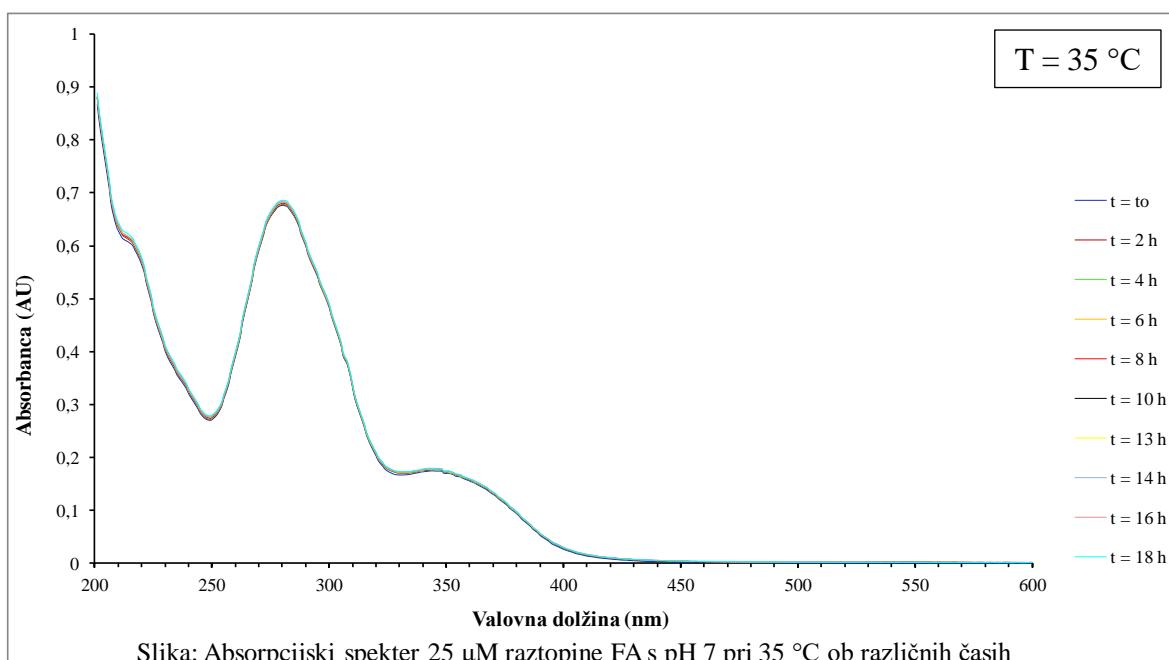
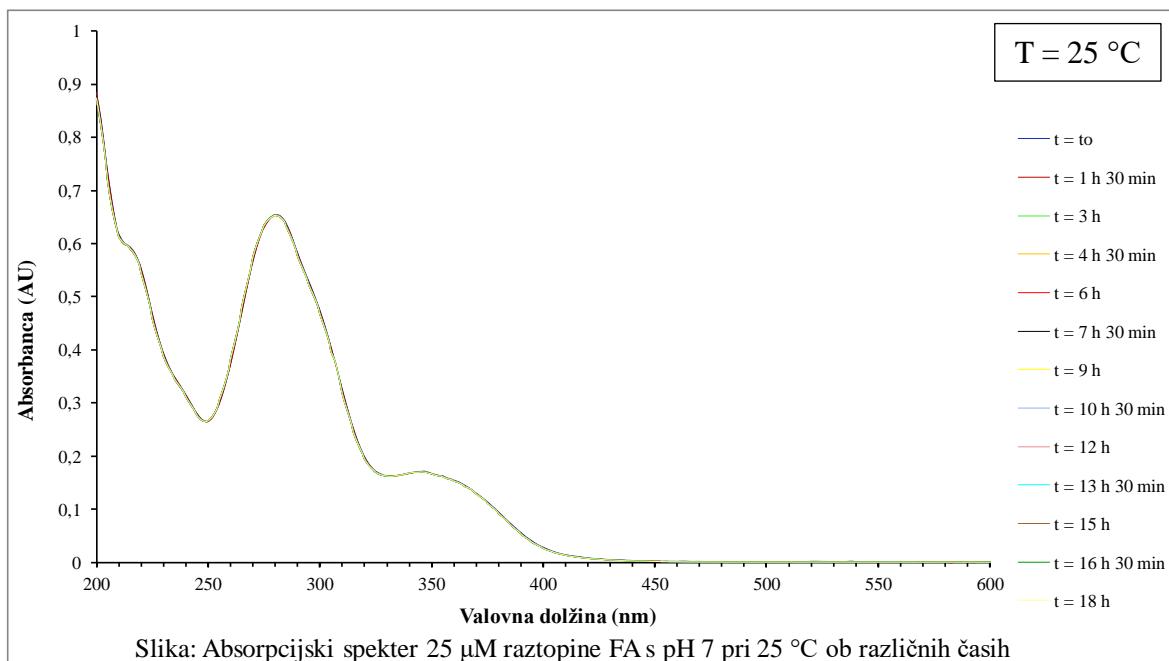


se nadaljuje

nadaljevanje Priloge D: Absorpcijski spektri $15 \mu\text{M}$ raztopin folnih kislin s pH 4 v temperaturnem območju od 25°C do 55°C

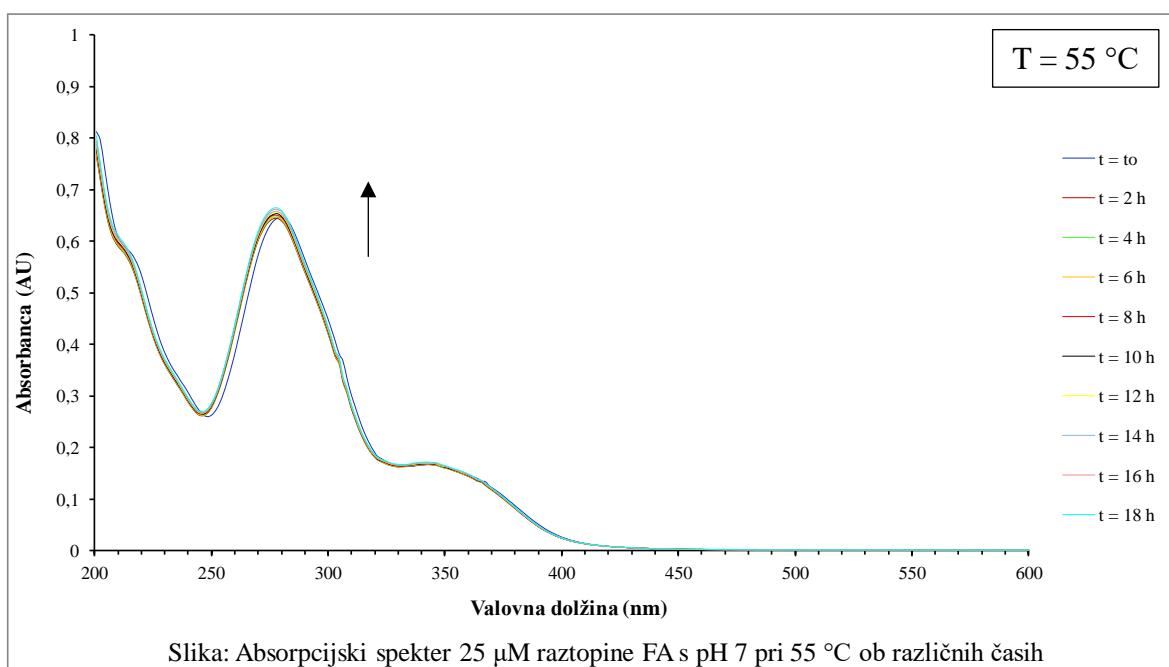
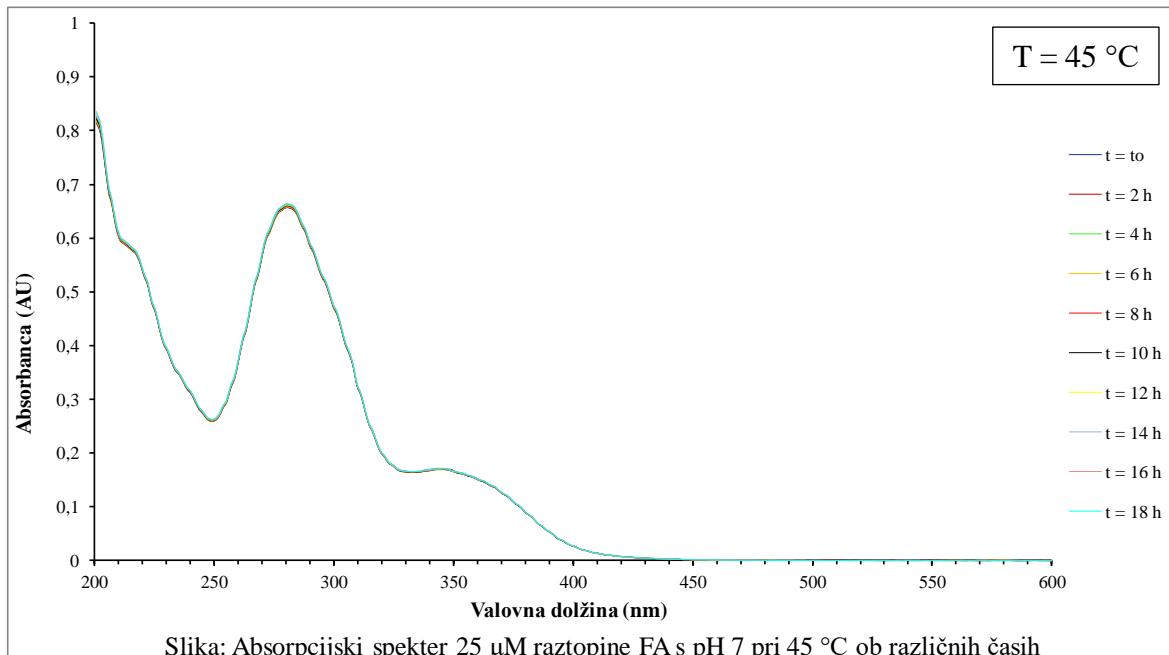


Priloga E: Absorpcijski spektri 25 µM raztopin folnih kislin s pH 7 v temperaturnem območju od 25 °C do 85 °C



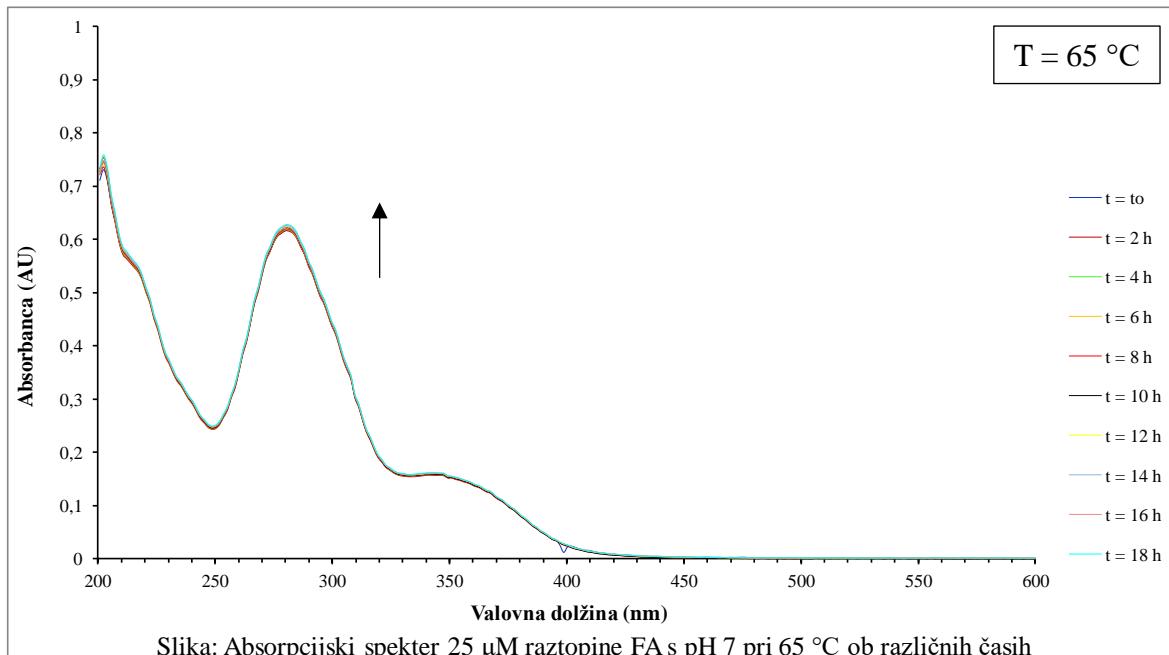
se nadaljuje

nadaljevanje Priloge E: Absorpcijski spektri 25 μM raztopin folnih kislin s pH 7 v temperaturnem območju od 25 °C do 85 °C

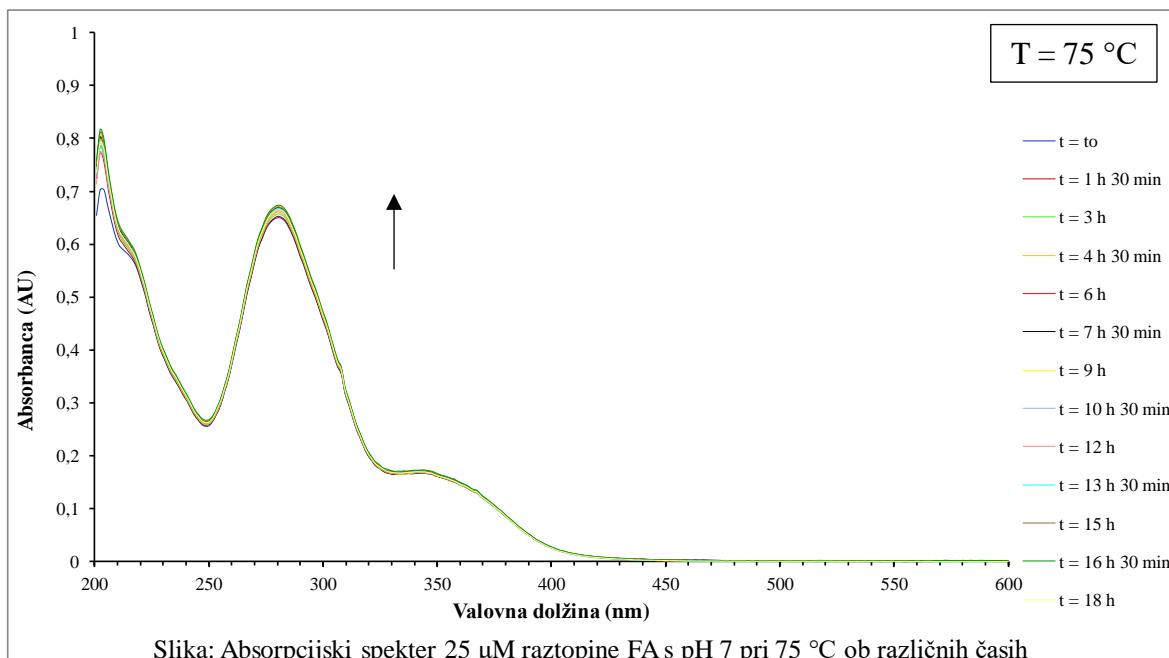


se nadaljuje

nadaljevanje Priloge E: Absorpcijski spektri 25 μM raztopin folnih kislin s pH 7 v temperaturnem območju od 25 °C do 85 °C



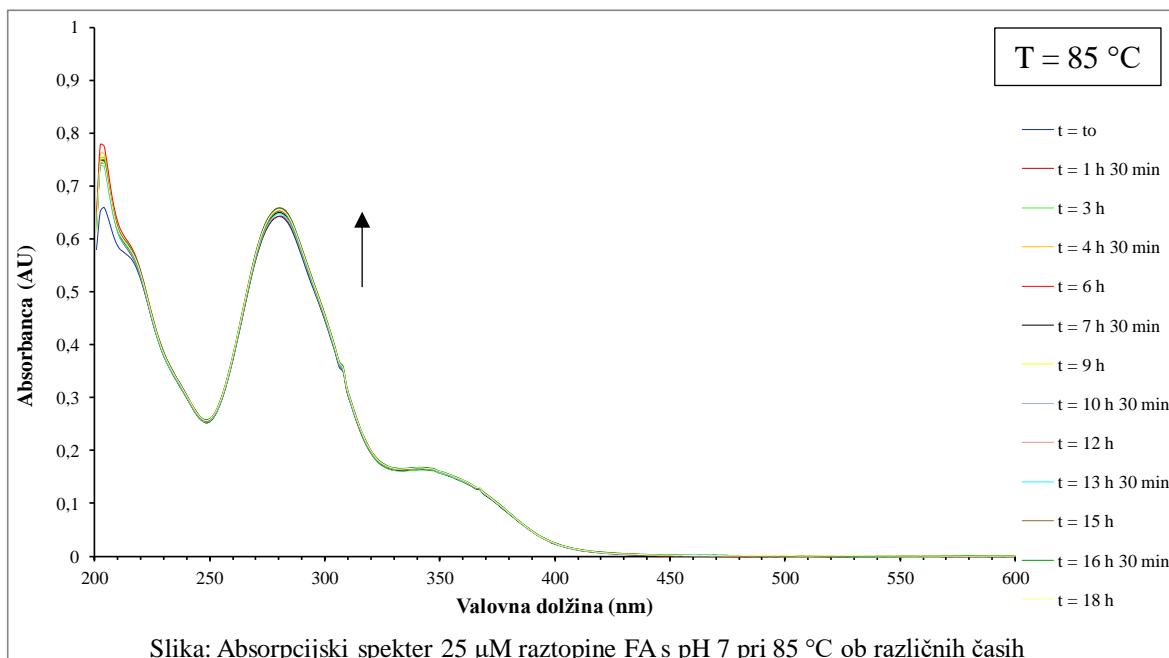
Slika: Absorpcijski spekter 25 μM raztopine FA s pH 7 pri 65 °C ob različnih časih



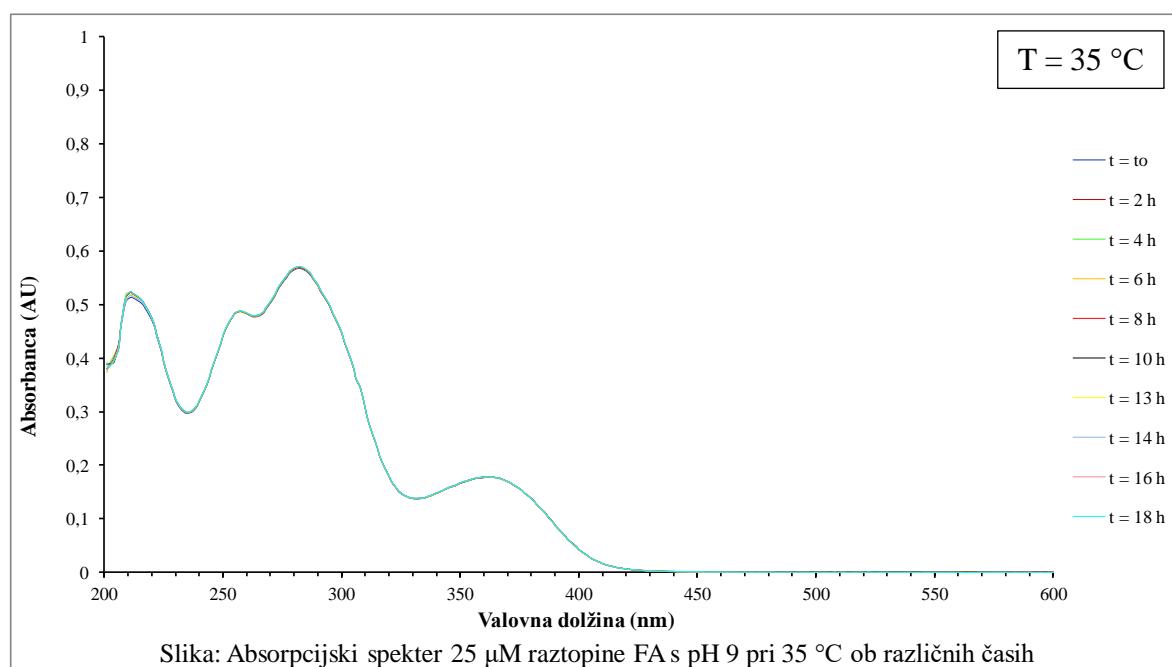
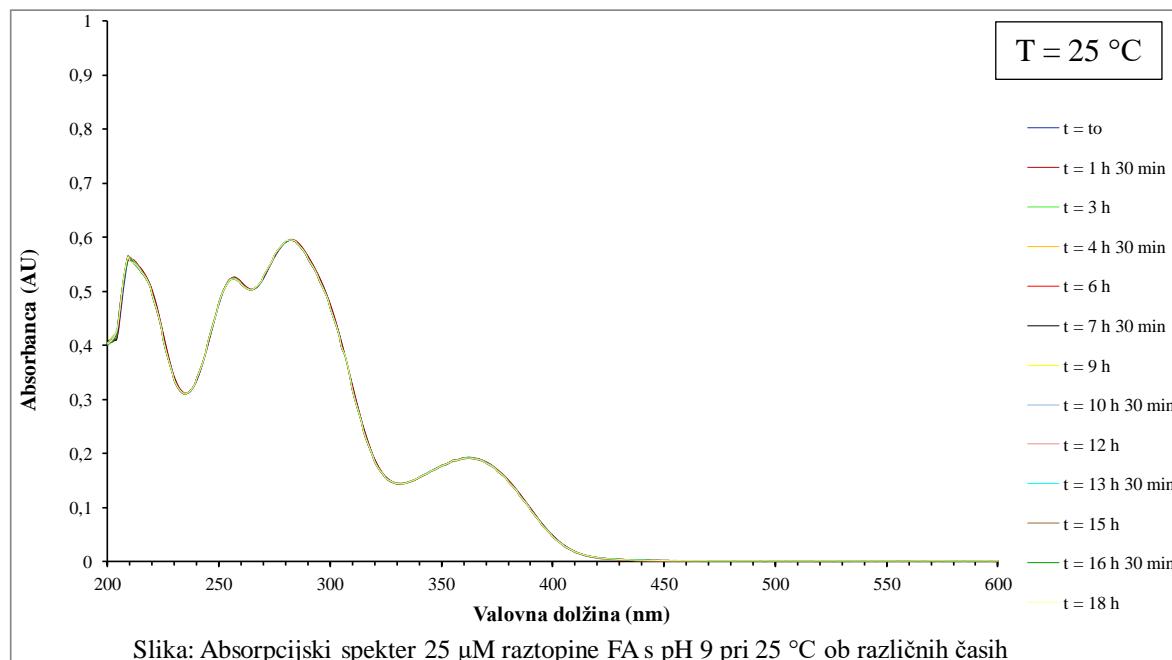
Slika: Absorpcijski spekter 25 μM raztopine FA s pH 7 pri 75 °C ob različnih časih

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge E: Absorpcijski spektri 25 μM raztopin folnih kislin s pH 7 v temperaturnem območju od 25 °C do 85 °C

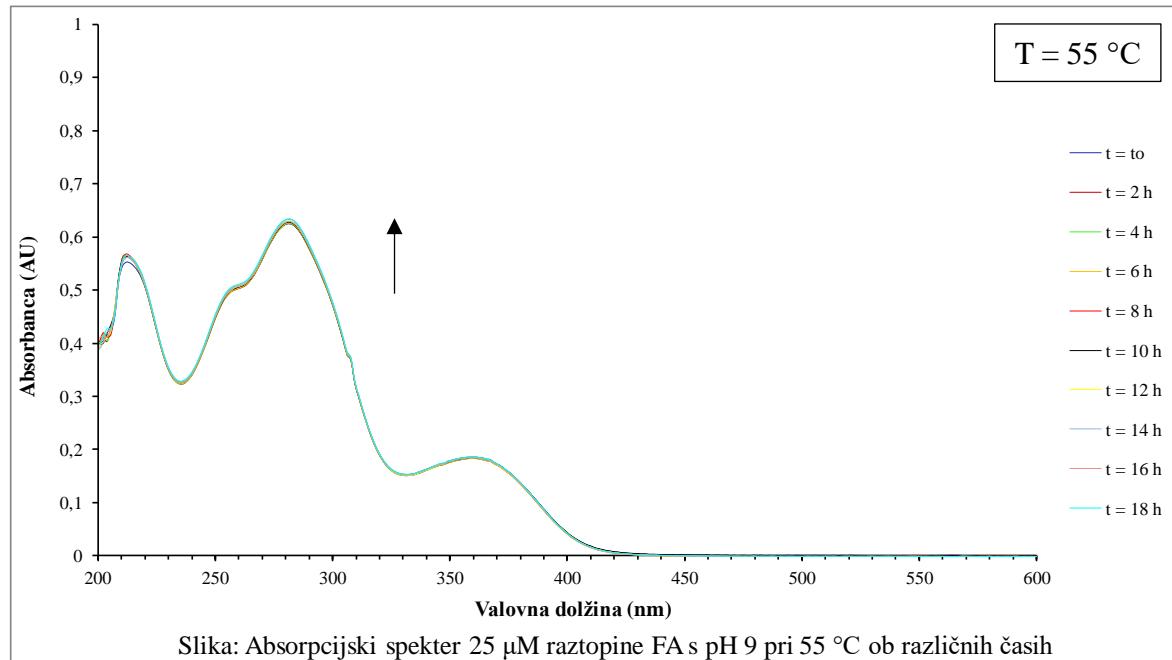
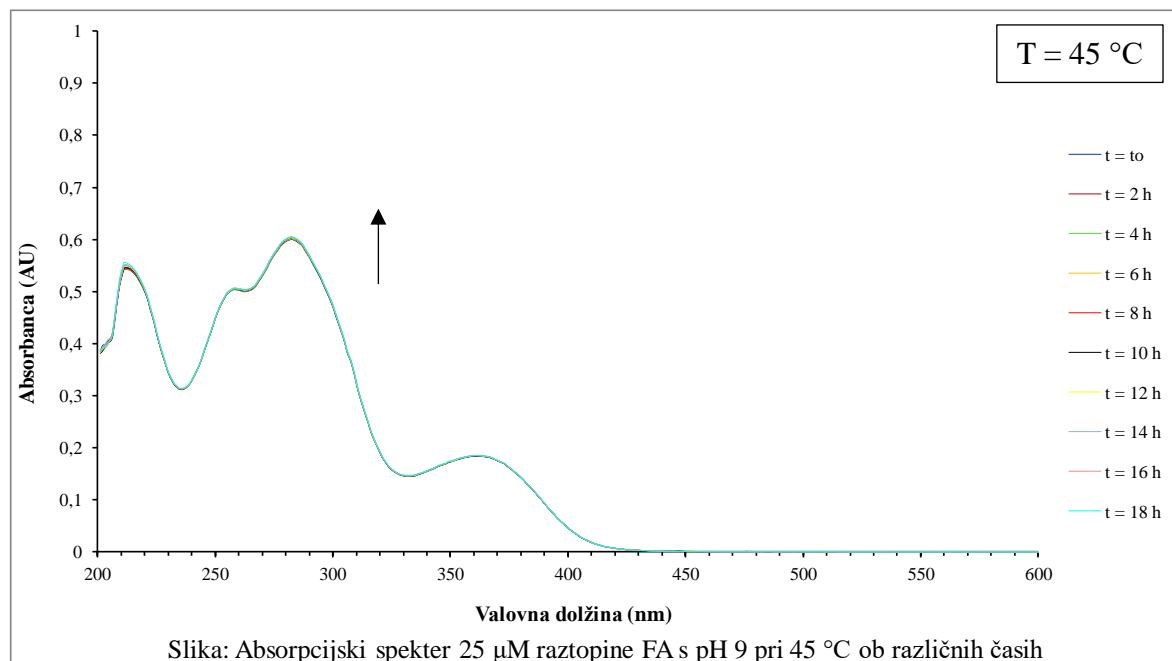


Priloga F: Absorpcijski spektri 25 μM raztopin folnih kislin s pH 9 v temperaturnem območju od 25 °C do 85 °C



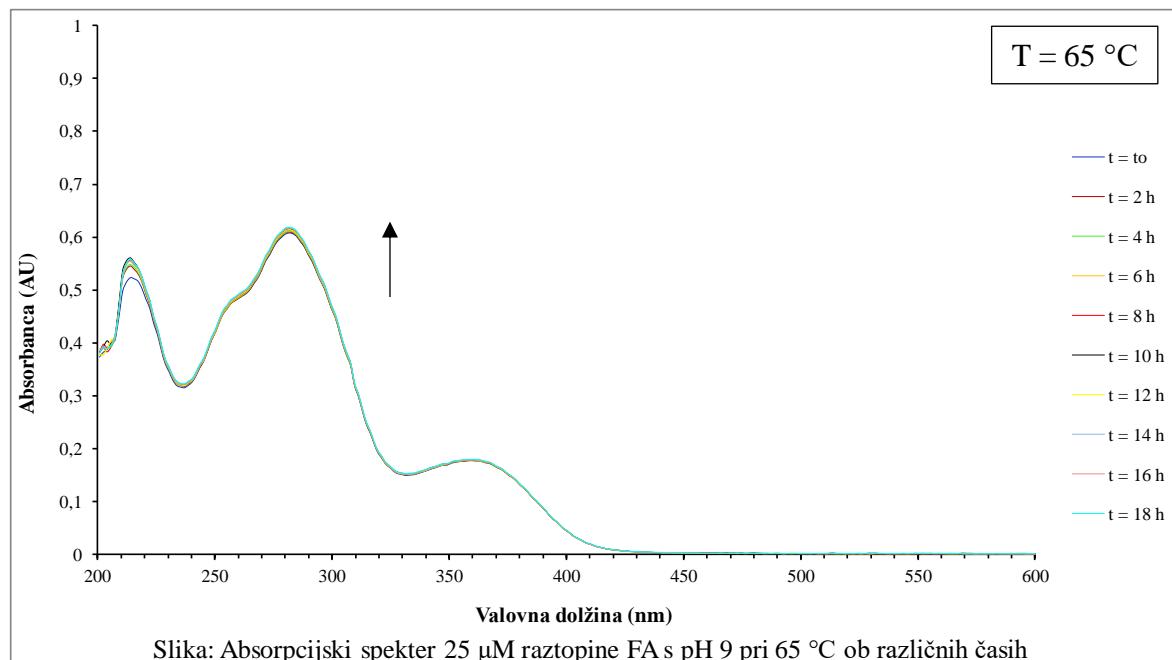
se nadaljuje

nadaljevanje Priloge F: Absorpcijski spektri 25 μM raztopin folnih kislin s pH 9 v temperaturnem območju od 25 °C do 85 °C

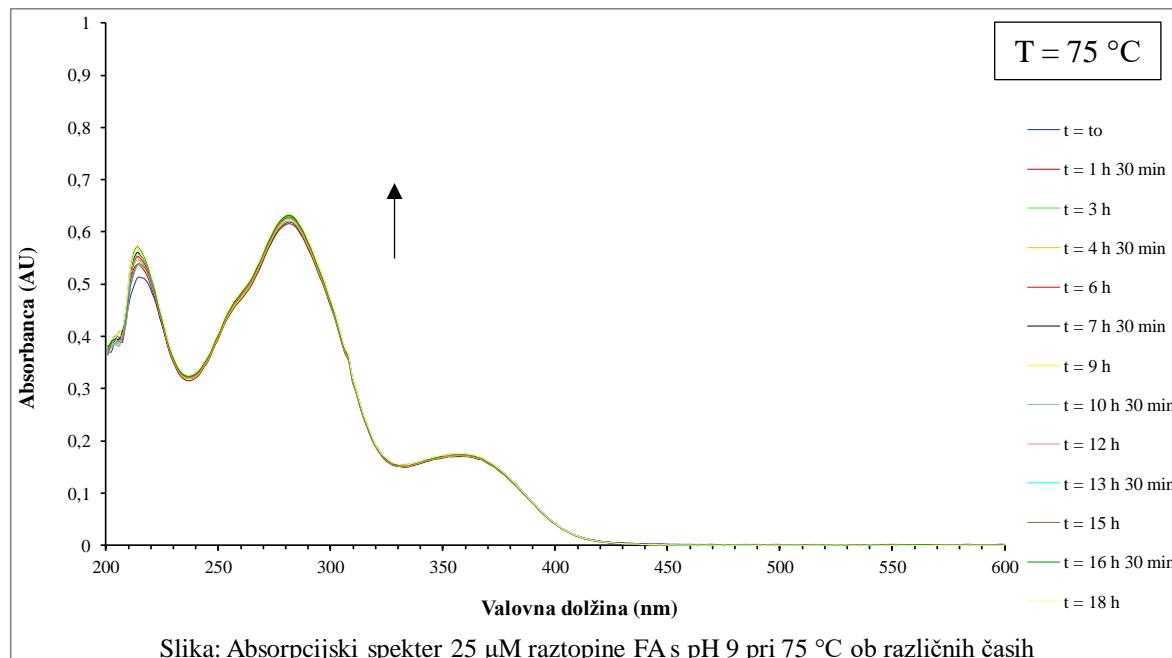


se nadaljuje

nadaljevanje Priloge F: Absorpcijski spektri 25 μM raztopin folnih kislin s pH 9 v temperaturnem območju od 25 °C do 85 °C



Slika: Absorpcijski spekter 25 μM raztopine FA s pH 9 pri 65 °C ob različnih časih



Slika: Absorpcijski spekter 25 μM raztopine FA s pH 9 pri 75 °C ob različnih časih

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge F: Absorpcijski spektri 25 μM raztopin folnih kislin s pH 9 v temperaturnem območju od 25 °C do 85 °C

