

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA DEL FABRO

**VREDNOTENJE OKSIDATIVNE STABILNOSTI  
ASKORBINSKE KISLINE V VODNIH RAZTOPINAH,  
PREHRANSKIH DOPOLNILIH IN ZDRAVILIH Z METODO  
TEKOČINSKE KROMATOGRFIJE VISOKE  
LOČLJIVOSTI**

**EVALUATION OF OXIDATIVE STABILITY OF ASCORBIC  
ACID IN AQUEOUS SOLUTIONS, DIETARY  
SUPPLEMENTS AND DRUGS BY HIGH PERFORMANCE  
LIQUID CHROMATOGRAPHY**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Roberta Roškarja, mag. farm..

## **Zahvala**

Zahvaljujem se svojemu mentorju doc. dr. Roberta Roškarja, mag. farm. za strokovno pomoč, napotke in spodbudo pri izdelavi ter pisanju diplomske naloge. Hvala tudi vsem sodelavcem na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko za nasvete in pomoč. Hvala tudi mojemu fantu Tomažu in družini za podporo pri študiju.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom doc. dr. Roberta Roškarja, mag. farm..

Tanja Del Fabro

Predsednik diplomske komisije:

prof. dr. Stanislav Gobec, mag. farm.

Članica diplomske komisije:

doc. dr. Alenka Zvonar, mag. farm.

Ljubljana, junij 2013

# VSEBINA

POVZETEK .....	III
SEZNAM OKRAJŠAV .....	IV
1 UVOD .....	1
1.1 Delovanje askorbinske kisline.....	1
1.1.1 Mehanizem delovanja .....	1
1.1.2 Askorbinska kislina v povezavi z nekaterimi bolezenskimi stanji.....	2
1.2 Farmakokinetika askorbinske kisline .....	5
1.2.1 Absorpcija, metabolizem in izločanje .....	5
1.2.2 Priporočeni dnevni odmerki .....	5
1.2.3 Pomanjkanje askorbinske kisline .....	6
1.2.4 Neželeni učinki askorbinske kisline.....	6
1.3 Viri askorbinske kisline.....	7
1.4 Stabilnost askorbinske kisline .....	10
1.5 Analitika askorbinske kisline .....	13
1.5.1 Klasične metode .....	14
1.5.2 Sodobne metode .....	15
2 NAMEN DELA .....	20
3 MATERIALI IN METODE .....	21
3.1 MATERIALI.....	21
3.1.1 Reagenti, raztopine in substance .....	21
3.1.2 Pripravki z askorbinsko kislino .....	21
3.1.3 Naprave in pribor .....	22
3.2 ANALIZNA METODA .....	23
3.2.1 Razvoj in optimizacija analizne metode.....	23
3.2.2 Končni kromatografski pogoji HPLC za vrednotenje askorbinske kisline .....	23
3.3 PRIPRAVA VZORCEV .....	24
3.3.1 Razvoj in optimizacija analizne metode.....	24
3.3.2 Vrednotenje HPLC metode .....	24
3.3.3. Stabilnost standarda askorbinske kisline.....	26
3.3.4 Stabilnost askorbinske kisline v pripravkih.....	29
3.4 VREDNOTENJE HPLC METODE.....	30
3.4.1 Selektivnost.....	30
3.4.2 Linearnost in območje linearnosti .....	30
3.4.3 Ponovljivost.....	30
3.4.4 Točnost.....	31
3.4.5 Meja zaznavnosti.....	31
3.4.6 Meja določitve.....	31

3.4.7 Stabilnost vzorcev .....	32
3.5 ODELAVA PODATKOV .....	32
4 REZULTATI .....	33
4.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA ANALIZNE METODE .....	33
4.2 VREDNOTENJE HPLC METODE .....	33
4.2.1 Selektivnost .....	33
4.2.2 Linearnost in območje linearnosti .....	35
4.2.3 Točnost in ponovljivost .....	38
4.2.5 Meja zaznavnosti in meja določitve .....	39
4.2.6 Stabilnost vzorcev .....	39
4.3 STABILNOST STANDARDA ASKORBINSKE KISLINE .....	40
4.3.1 Stabilnost askorbinske kisline pri različnih koncentracijah .....	40
4.3.2 Stabilnost askorbinske kisline v prisotnosti vodikovega peroksida .....	42
4.3.3 Stabilnost askorbinske kisline v različnih medijih .....	44
4.3.4 Stabilnost askorbinske kisline v prisotnosti EDTA .....	44
4.3.5 Stabilnost askorbinske kisline pri različnih temperaturah .....	45
4.3.6 Stabilnost askorbinske kisline pri različnih pH-jih .....	46
4.3.7 Stabilnost askorbinske kisline v prisotnosti kisika, dušika in svetlobe .....	47
4.4 STABILNOST ASKORBINSKE KISLINE V PRIPRAVKIH .....	48
5 RAZPRAVA .....	51
5.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA HPLC METODE .....	51
5.2 VREDNOTENJE HPLC METODE .....	52
5.3 STABILNOST STANDARDA ASKORBINSKE KISLINE .....	55
5.3.1 Stabilnost askorbinske kisline pri različnih koncentracijah .....	55
5.3.2 Stabilnost askorbinske kisline v prisotnosti vodikovega peroksida .....	55
5.3.3 Stabilnost askorbinske kisline v različnih medijih .....	56
5.3.4 Stabilnost askorbinske kisline v prisotnosti EDTA .....	56
5.3.5 Stabilnost askorbinske kisline pri različnih temperaturah .....	57
5.3.6 Stabilnost askorbinske kisline pri različnih pH-jih .....	57
5.3.7 Stabilnost askorbinske kisline v prisotnosti kisika, dušika in svetlobe .....	58
5.4 STABILNOST ASKORBINSKE KISLINE V PRIPRAVKIH .....	58
6 SKLEP .....	62
7 LITERATURA .....	64

## POVZETEK

Askorbinska kislina je pomemben vodotopni antioksidant, ki ima v človeškem telesu številne vloge: poveča absorpcijo železa iz prebavnega trakta, lovi proste radikale, kot kofaktor encimov pa sodeluje pri sintezi kolagena, karnitina in nekaterih kateholaminov. Človeško telo zaradi pomanjkanja encima v biosintezni poti ne more samo sintetizirati askorbinske kisline, zato jo moramo zaužiti s hrano, občasno tudi s prehranskimi dopolnili.

Namen našega dela je bil proučiti oksidativno stabilnost askorbinske kisline v enostavnih sistemih (raztopine askorbinske kisline) kot tudi v prehranskih dopolnilih in nekaterih zdravilih, ki so dosegljiva v lekarnah. Na trgu je askorbinska kislina zaradi boljše obstojnosti predvsem v trdnih farmacevtskih oblikah, vendar se pred zaužitjem nekatere pripravijo tudi z raztapljanjem v vodi, kar bi lahko vplivalo na stabilnost askorbinske kisline.

Za proučevanje stabilnosti askorbinske kisline v vodnih raztopinah smo razvili in optimizirali metodo HPLC. Analizno metodo smo nato ovrednotili po ICH smernicah in dokazali, da je primerna za kvantitativno določanje askorbinske kisline v stabilnostnih študijah.

Proučevali smo vpliv različnih dejavnikov na stabilnost standarda askorbinske kisline. Ugotovili smo, da je askorbinska kislina bolj stabilna pri višjih koncentracijah. Vodikov peroksid oksidira askorbinsko kislino, vendar ima pri višji koncentraciji askorbinske kisline manjši vpliv. Askorbinska kislina je najbolj stabilna v absolutnem etanolu, najmanj pa v vodovodni vodi. EDTA bistveno izboljša stabilnost askorbinske kisline, različne koncentracije EDTA (0,1-3 mM) pa se v sposobnosti stabilizacije skoraj ne razlikujejo. Stabilnost askorbinske kisline z višanjem temperature pada. Na njeno obstojnost vpliva tudi pH: najbolj stabilna je pri pH 2, najmanj pa pri pH 8. Prisotnost kisika bistveno bolj destabilizira askorbinsko kislino kot izpostavljenost svetlobi.

V nadaljevanju smo pri nekaterih pripravkih (šumeče tablete, prašek, zrnca) spremljali obstojnost askorbinske kisline po ustrezni pripravi za jemanje. Stabilnost askorbinske kisline v pripravkih po raztapljanju v vodi se je izkazala kot neproblematična. Ugotovili smo, da koncentracija askorbinske kisline ne vpliva na stabilnost v pripravkih, kar je najverjetneje posledica same sestave pripravkov. Prav tako smo opazili, da je askorbinska kislina bolj stabilna v vodni raztopini pripravka kot pa standarda s podobno koncentracijo.

## SEZNAM OKRAJŠAV

AK: askorbinska kislina

ACN: acetonitril

EDTA: etilendiamintetraocetna kislina

EtOH: etanol

HPLC: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

ICH: Mednarodna konferenca o harmonizaciji (International Conference on Harmonisation)

MF: mobilna faza

RSD: relativni standardni odklon

SD: standardni odklon

T: temperatura

$t_r$ : retencijski čas

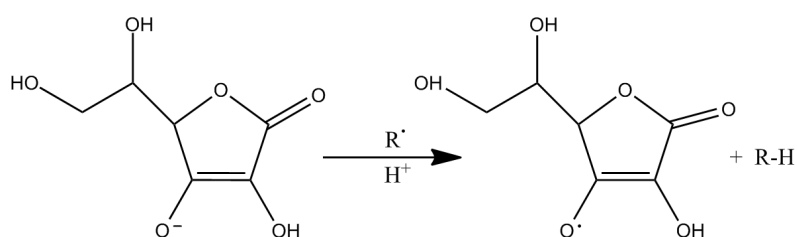
# 1 UVOD

## 1.1 Delovanje askorbinske kisline

### 1.1.1 Mehanizem delovanja

Askorbinska kislina (AK) v telesu deluje kot kofaktor encimov tako, da reducira kovinske ione, predvsem bakrove in železove (1,2). AK kot kofaktor sodeluje pri sintezi kolagena, ki gradi hrustanec, dentin, krvne žile, vezi in kosti (3,4). Potreben je pri biosintezi karnitina, adrenalina, kortikosteroidov, aldosterona in žolčnih kislin. Sodeluje pri presnovi tirozina, folata in pri delovanju levkocitov (1,2,5). Pomembno vlogo ima tudi pri izboljšanju absorpcije železa iz prebavnega trakta zaradi redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  v  $\text{Fe}^{2+}$ , poleg tega pa AK in železo tvorita nizko molekularni kompleks, ki se prav tako lažje absorbira (3).

Najpomembnejša vloga v telesu je vezana na njeno antioksidativno delovanje. AK v telesu ščiti molekule (proteine, lipide, ogljikove hidrate) pred poškodbami zaradi prostih radikalov, ki nastajajo med presnovo ali pri izpostavljenosti toksinom (4). V nevtralnem in bazičnem pH je AK v obliki aniona (askorbat), saj je njena  $\text{pK}_a$  4,17. Askorbat lahko odda elektron različnim radikalom ali pa reducira reaktivne zvrsti kisika (ROS) in dušika (RNS). V reakciji radikala in askorbata nastane stabilnejši askorbil radikal (Slika 1), le-ta se v nadaljevanju pretvori nazaj v askorbat ali pa v manjše neaktivne molekule, ki se izločijo z urinom (6).



Slika 1: Nastanek askorbil radikala (povzeto po 6)

AK lahko deluje tudi kot pro-oksidant zaradi njene sposobnosti redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  v  $\text{Fe}^{2+}$ .  $\text{Fe}^{2+}$  v Fentonovi reakciji (Enačbi 1 in 2) omogoča nastajanje hidroksilnega radikala ( $\text{HO}^\bullet$ ), ki sproža oksidativne procese (5,6).





AK se kot antioksidant uporablja v farmacevtski, kemični, kozmetični in živilski industriji (7,8). Različnim proizvodom se dodaja kot konzervans, za izboljšanje okusa in barve (7).

### **1.1.2 Askorbinska kislina v povezavi z nekaterimi bolezenskimi stanji**

#### *- prehlad*

Med ljudmi velja prepričanje, da uživanje visokih odmerkov AK preprečuje prehlad in gripo, vendar številne klinične študije tega zaenkrat ne potrjujejo (2). B. Douglas s sodelavci (9) je pregledal rezultate približno 30 placebo kontroliranih študij, ki so proučevale učinkovitost AK v odmerkih od 200 mg do 2 g na dan. Ugotovili so, da redno uživanje AK ni imelo učinka na pojavnost prehlada. Opazili so le rahel vpliv na skrajšanje trajanja prehlada in na zmanjšanje jakosti simptomov. Jemanje AK je prepolovilo incidenco prehlada le pri skupini športnikov, ki so bili izpostavljeni ekstremnemu fizičnemu stresu (maraton, smučanje). Ugotovili so tudi, da jemanje AK po pojavu prvih simptomov prehlada ni imelo nikakršnega vpliva na trajanje prehlada ali na jakost simptomov.

#### *- bolezni srca in ožilja*

Raziskave kažejo, da lahko povečan vnos AK zniža tveganje za nastanek bolezni, ki so povezane z oksidativnim stresom, vključno s koronarno srčno boleznijo (10). Pri koronarni srčni bolezni je motena oskrba srčne mišice s krvjo, razlog pa je v večini primerov ateroskleroza koronarnih srčnih žil (11). Raziskavo o vplivu AK na srčno žilno bolezen so izvedli na desetih zdravih prostovoljcih, ki so 28 dni zapored prejeli prehransko dopolnilo z AK (1g/dan). V njihovi plazmi so pred začetkom in po koncu jemanja AK izmerili koncentracijo holesterola, trigliceridov, sečne kisline in AK. Rezultati so pokazali značilno povišanje koncentracije AK ter znižanje koncentracije sečne kisline in lipidov v plazmi. S tem so dokazali, da povečan vnos AK pripomore k zniževanju tveganja za srčno-žilno bolezen (10). V obsežni študiji, v kateri so proučevali povezavo med uživanjem vitaminov z antioksidativnim delovanjem in koronarno srčno boleznijo, so prav tako dokazali, da je vnos več kot 700 mg AK na dan znižal tveganje za pojav srčno žilne bolezni (12).



V randomizirani, dvojno slepi kontrolirani študiji so proučevali vpliv AK na visok krvni tlak. Sodelovalo je 54 bolnikov, ki so jih naključno razdelili v tri skupine. Vsaka skupina je prejela AK v različnih odmerkih: 500, 1000 in 2000 mg na dan. Ugotovili so, da se je v prvem mesecu jemanja AK krvni tlak pri bolnikih znižal (sistolični za  $4,5 \pm 1,8$  mm Hg, diastolični pa za  $2,8 \pm 1,2$  mm Hg), naslednjih 7 mesecev pa je ostal na enakem nivoju. Med skupinami ni bilo razlik v znižanju krvnega tlaka, kar pomeni, da odmerki višji od 500 mg niso učinkovitejši pri zniževanju krvnega tlaka. Raziskovalci predvidevajo, da je učinek AK na znižanje krvnega tlaka le kratkoročen (13).

V raziskavi na celični liniji HEK293 in aorti kunca so raziskovali vpliv AK na receptor za angiotenzin II (receptor AT1). Angiotenzin II po vezavi na receptor AT preko kaskade reakcij poviša krvni tlak. Raziskovalci so predpostavili, da lahko AK spremeni farmakološke lastnosti AT1 za angiotenzin II. Rezultati so pokazali, da je AK zmanjšala vezavno afiniteto receptorja AT1, pri čemer se maksimalna vezavna kapaciteta ni spremenila. AK je tudi zmanjšala z angiotenzinom II povzročeno krčenje aorte (14).

- *diabetes*

Številne študije so pokazale zmanjšano koncentracijo AK in vitamina E v krvi sladkornih bolnikov. V študiji, kjer je sodelovalo 170 prostovoljcev, so proučevali vpliv AK ter vitamina E na raven glukoze v krvi in na koncentracijo plazemskih lipidov pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2. Prostovoljci so bili razdeljeni v štiri skupine: placebo skupina, skupina, ki je prejela AK, skupina, ki je prejela vitamin E ter skupina, ki je prejela AK in vitamin E. Bolnikom so na začetku in na koncu testiranja določili naslednje vrednosti: glukoza na tešče, trigliceridi, LDL, HDL, celotni holesterol ter glikozilirani hemoglobin (HbA1c). Ugotovili so, da so se vrednosti glukoze na tešče, HbA1c, LDL, trigliceridov in celotnega holesterola statistično značilno znižale pri skupinah, ki so prejemale omenjena vitamina. Pri teh skupinah se je značilno zvišal HDL. Študija je pokazala, da so bolniki s sladkorno boleznijo tipa 2 po treh mesecih uživanja AK, vitamina E ali AK in vitamina E skupaj imeli izboljšano delovanje inzulina, značilno znižan krvni tlak ter izboljšani lipidni profil (15).

V študiji, ki je potekala na 427 bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2, so ugotavljali povezavo med plazemsko koncentracijo AK, koncentracijo glukoze na tešče, HbA1c ter poškodbami DNA v limfocitih. Ugotovili so, da so bile poškodbe DNA neposredno

povezane s koncentracijo glukoze na tešče in s HbA1c ter obratno sorazmerne s plazemsko koncentracijo AK. Pri bolnikih z neurejenim krvnim sladkorjem in s plazemsko koncentracijo AK pod povprečjem so bile poškodbe DNA značilno višje kot pri bolnikih s približno enako stopnjo hiperglikemije in koncentracijo AK nad povprečjem (16).

- *rak*

AK so v visokih odmerkih prejeli rakavi bolniki že v sedemdesetih letih prejšnjega tisočletja. Raziskave, kjer so bolniki prejeli AK intravensko (i.v.) in peroralno, so pokazale pozitivne učinke, medtem ko samo peroralno jemanje AK ni imelo nobenega vpliva. Ugotovili so, da lahko i.v. aplikacija AK doseže t. i. farmakološko koncentracijo AK v plazmi (od 1 do 5 mM), peroralna aplikacija visokih odmerkov AK (3g večkrat na dan) pa v plazmi doseže le 220  $\mu$ M. Citotoksičnost visokih koncentracij AK najverjetneje temelji na pH odvisni avtooksidaciji AK, pri čemer nastaja vodikov peroksid, ki prizadene predvsem rakave celice. AK tako deluje kot predzdravilo, ki dostavi velike količine vodikovega peroksida v tumorske celice. Za klinično uporabo AK so potrebne še nadaljnje študije, ki bi potrdile varnost in učinkovitost AK (5).

- *nevrodegenerativne bolezni (Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen)*

Ugotovili so, da je oksidativni stres v možganih povezan z nevrodegenerativnimi boleznimi kot sta Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen (17). Zandi in sodelavci (18) so ugotavljali povezavo med jemanjem prehranskih dopolnil z antioksidativnimi vitamini ter zmanjšanim tveganjem za Alzheimerjevo bolezen (AB). Ugotovili so, da je bila uporaba prehranskih dopolnil z vitaminom E in AK povezana z zmanjšano pojavnostjo AB, jemanje same AK pa ni pripomogla k zmanjšanju pojavnosti te bolezni. Študija kaže, da lahko vitamin E in AK zmanjšata razširjenost in pojavnost AB, če se sočasno jemljeta v visokih odmerkih (od 500 do 1000 mg AK ter 600 mg vitamina E).

AK naj bi povečala biološko uporabnost levodope, ki je najučinkovitejše zdravilo za Parkinsonovo bolezen. V raziskavi na 67ih starejših bolnikih s Parkinsonovo boleznijo so namreč ugotovili, da je dodatek 200 mg AK k tableti, ki je vsebovala levodopo in karbidopo, povečala AUC in  $c_{\max}$  ter zmanjšala  $t_{\max}$  levodope (19).

## 1.2 Farmakokinetika askorbinske kisline

### 1.2.1 Absorpcija, metabolizem in izločanje

AK v tankem črevesju ionizira, nastane askorbat (7), ki se absorbira z aktivnim transportom (1). Biološka uporabnost AK je pri mešani prehrani približno 80%, če pa zaužijemo manj kot 100 mg AK na tešče, je njena biološka uporabnost 100% (2). Iz enterocitov se askorbat z difuzijo absorbira v krvni obtok. Celice imajo dva tipa transporterjev za AK: od natrija odvisna transporterja za askorbinsko kislino (SVCT) 1 in 2 za askorbat ter glukozne transporterje GLUT 1, 3 in 4 za dehidroaskorbinsko kislino, ki se v celicah reducira v askorbat (1). AK v telesu najdemo v jetrih, možganih, nadledvični žlezi, nevtrofilcih, limfocitih, monocitih, eritrocitih ter v očesnem zrklu, kjer je koncentracija AK približno tridesetkrat večja kot v plazmi. Celokupna količina AK v telesu je približno 3 grame. AK se v jetrih presnovi v dioksoglukonsko in oksalno kislino, zelo malo pa tudi v 2-sulfataskorbinsko kislino. Te spojine se iz telesa izločijo z urinom. Pri zaužitju odmerkov, ki so večji od dnevni potreb organizma, se AK nespremenjena izloči z urinom in blatom. V dnevni odmerkih od 1 do 3 g se AK izloča predvsem z urinom, v večjih odmerkih pa z blatom (20). AK se iz telesa izloči skozi ledvica tudi kot oksalat, ki nastane iz dehidroaskorbinske kisline. Oksalat lahko v ledvicah kristalizira kot kalcijev oksalat, vendar se je izkazalo, da 200 mg zaužite AK dnevno ne predstavlja dejavnik tveganja za nastanek ledvičnih kamnov (2), saj so potrebne veliko večje količine zaužite AK več mesecev oz. let zapored. Razgradni produkti dehidroaskorbinske kisline v telesu vstopajo v pentoza fosfatni cikel (5) in tako sodelujejo pri katabolizmu energijsko bogate hrane.

### 1.2.2 Priporočeni dnevni odmerki

RDA (Recommended dietary Allowance) je povprečna dnevna količina esencialnih hranil, ki zadošča za prehranske potrebe skoraj vseh zdravih odraslih. Povprečen vnos blizu določene RDA vrednosti pomeni, da je tveganje za pomanjkanje določenega hranila zelo majhno (21). RDA za AK znaša 80 mg na dan (22).

Priporočeni dnevni odmerki AK so odvisni od starosti. Za otroke od enega do treh let starosti je priporočen dnevni odmerek 15 mg/dan, za otroke od štirih do osmih let 25 mg/dan, za otroke med devetim in trinajstim letom 45 mg/dan ter 75 mg/dan za mladostnike stare od štirinajst do osemnajst let. Za odrasle ženske je priporočen dnevni

odmerek 75 mg/dan, za odrasle moške pa 90 mg/dan. Nosečnice naj bi zaužile dodatnih 10 mg/dan, doječe matere pa 50 mg/dan. Za kadilce je priporočeno uživanje dodatnih 35 mg askorbinske kisline dnevno (1,2,23).

### **1.2.3 Pomanjkanje askorbinske kisline**

AK je vodotopni vitamin, zato v telesu zanj ne obstajajo depoji kot za lipidotopne vitamine. Zaradi tega lahko veliko hitreje pride do pomanjkanja AK kot do pomanjkanja katerega od lipidotopnih vitaminov (24). Skorbut je bolezen, ki nastane zaradi pomanjkanja AK zaradi zmanjšane vnosa svežega sadja in zelenjave s prehrano. V preteklosti se je pogosto pojavljala pri mornarjih in vojaki. Danes je ta bolezen redka, vendar se še pojavlja pri alkoholikih zaradi neustrezne prehrane, starejših ljudi in pri bolnikih z malabsorpcijskim sindromom. Bolezenski znaki skorbuta se pokažejo po osmih do dvanajstih tednih neustrezne prehrane, ko telesne zaloge AK padejo na približno 350 mg. Najprej se pri bolniku pojavijo slabo počutje, utrujenost in zaspanost. Simptomi in znaki daljšega pomanjkanja AK so anemija, bolečine v mišicah in kosteh, modrice, petehije, gingivitis, slabo celjenje ran, spremembe razpoloženja in depresije. Pri ekstremnem pomanjkanju AK so simptomi celo življenjsko ogrožajoči: pojavijo se lahko generaliziran edem, huda zlatenica, hemoliza, akutna spontana krvavitev, nevropatija, povišana telesna temperatura, krči in smrt. Našteti simptomi in znaki skorbuta nastanejo zaradi pomanjkanja AK v biosintezi karnitina in holesterola (utrujenost, zaspanost) in zaradi pomanjkanja kolagena v vezivnem tkivu v kosteh, dlesnih, koži in žilah (bolečine v kosteh, vnetje dlesni, modrice, krvavitve). Diagnosticiranje skorbuta je lahko zelo težavno, saj je bolezen redka, njeni simptomi pa so zelo nespecifični. Zdravljenje je enostavno, saj zadošča 200 mg AK na dan nekaj dni. AK lahko bolniki jemljejo peroralno ali pa parenteralno. Bolnike je hkrati potrebno poučiti o zdravi prehrani in jih spodbujati, da vsakodnevno zaužijejo čim več sadja in zelenjave (25).

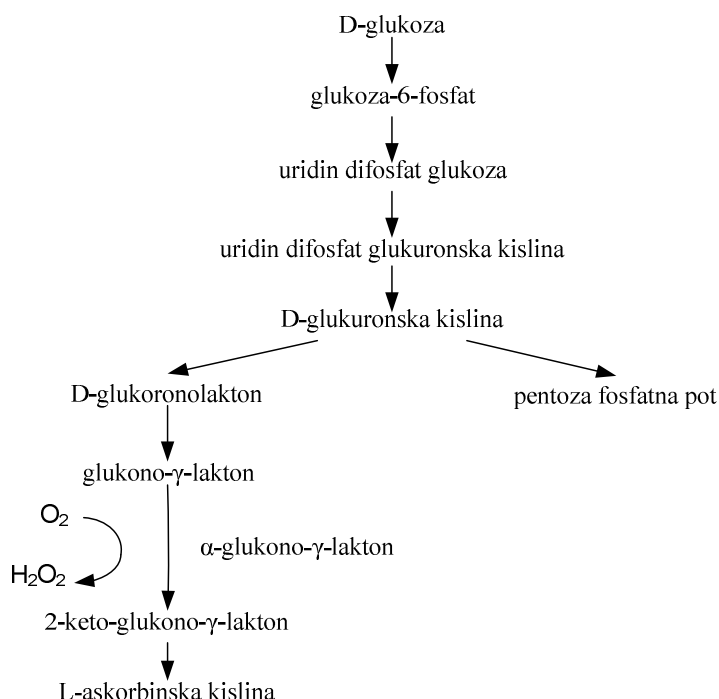
### **1.2.4 Neželeni učinki askorbinske kisline**

Peroralno zaužitje večjih količin AK (od 2 do 4 g na dan) pri zdravih posameznikih navadno nima neželenih učinkov, lahko pa se pojavijo draženje gastrointestinalnega trakta, napenjanje in driska. Drugi neželeni učinki so: tvorba ledvičnih kamnov, zmanjšanje koncentracije vitamina B12, povečana absorpcija železa, paradoksalno pa lahko pride tudi do pojava skorbuta (1). Previdnost pri uživanju večjih količin AK torej velja za bolnike z ledvičnimi kamni, z odpovedjo ledvic, s hiperoksalurijo, pri bolnikih s pomanjkanjem

encima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze ter pri bolnikih z motnjami v presnovi železa (hemokromatoza, talasemija, sideroblastna anemija) (1,2,20,26).

### 1.3 Viri askorbinske kisline

Rastline in večina živali lahko sami sintetizirajo AK iz D-glukoze. Ljudje, ostali primati, morski prašički in nekateri netopirji pa jo zaradi pomanjkanja encima  $\alpha$ -glukono- $\gamma$ -lakton oksidaze, ki katalizira zadnjo stopnjo v biosintezni poti (Slika 2), ne morejo sintetizirati sami (1,2,5,26,27). Zaradi tega je pomembno, da AK zaužijemo s hrano.



**Slika 2: Biosinteza AK (povzeto po 28)**

Glavna vira AK sta sveže sadje in zelenjava. Podatki kažejo na velike razlike v vsebnosti AK med posameznimi vrstami ter tudi znotraj vrste. Veliko AK je v citrusih, kiviju, črnem ribezu, šipku, zeleno listnati zelenjavi, brokoliju, zelju in papriki (1,2). Vsebnost AK je v teh virih odvisna od lokacije pridelave, vrste in dela rastline, stopnje zrelosti, metode obiranja (28), transporta, načina shranjevanja in priprave hrane (2), pa tudi od izbrane analize metode in detekcije AK. V Preglednici I so navedeni primeri z AK bogate hrane in vsebnost. Kot je razvidno iz Preglednice I z uživanjem sadja in zelenjave ni težko doseči priporočenega dnevnega odmerka (RDA) AK, ki znaša 80 mg (22). Tisti, ki ne uživajo svežega sadja in zelenjave, lahko dnevne potrebe po AK nadomestijo s prehranskimi

dopolnili. Prehranska dopolnila sicer niso nadomestila za uravnoteženo in raznovrstno prehrano, primarno je pomembno uživanje polnovredne prehrane.

**Preglednica I: Viri askorbinske kisline (povzeto po 2,23,29)**

vir askorbinske kisline	količina AK [mg/100 g]
šipek	2000
črni ribez	200
kivi	93
pomaranča	50
limona	55
brokoli	104
zelje	46

V lekarnah lahko najdemo številne pripravke z AK v različnih farmacevtskih oblikah: prašek, pastile, tablete, šumeče tablete, tablete s podaljšanim sproščanjem, pršilo, žvečljive tablete, sirup, peroralna raztopina. V teh farmacevtskih oblikah se nahaja sama askorbinska kislina ali pa v kombinaciji z drugimi vitamini (vitamin E, vitamini B kompleksa), minerali (železo, baker), učinkovinami (paracetamol, acetilsalicilna kislina...). Vsebnost AK v teh farmacevtskih oblikah se giblje od 25 mg do 1000 mg.

Na našem trgu je AK prisotna tudi v pripravkih, ki so registrirani kot zdravilo brez recepta: Lekadol plus C, Daleron C, Daleron C za otroke, Aspirin plus C, Coldrex, Ca-C Calvive, Plivamed in CalciumvitaC. V teh zdravilih so prisotne tudi druge učinkovine, AK kot samostojna učinkovina pa je prisotna le v zdravilu Plivit C (30).

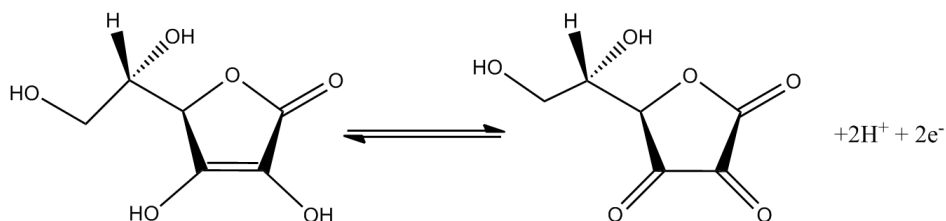
V Preglednici II so navedena nekatera prehranska dopolnila in zdravila, ki vsebujejo AK.

**Preglednica II: Askorbinska kislina v nekaterih prehranskih dopolnilih in zdravilih**

farmacevtska oblika	primeri	vsebnost AK [mg] v enem odmerku	ostale glavne sestavine	oblika AK
šumeče tablete	Vitamin C, Krüger	180	/	shranjevanje: v trdni obliki, pred zaužitjem: raztapljanje v vodi
	FidiMag 300 plus C, Fidimed	300	magnezij	
	Vitamin C, Sensilab	180	/	
	Ca-C Calvive, Novartis	1000	kalcij	
	Plivamed, Pliva	60	paracetamol, psevdofedrin	
	CalciumvitaC, Krka	500	kalcij	
tablete	Plivit C, Pliva	500	/	shranjevanje: v trdi obliki
	Coldrex, GSK	30	paracetamol, kofein, fenilefrin, terpin	
prašek	Vitamin C Pulver, Amos Vital	75	/	shranjevanje: v trdni obliki, pred zaužitjem: raztapljanje v vodi
	Imunogran, Fidimed	300	aminokislina, vitamini, minerali	
zrnca	Imunostar, Sensilab	300	aminokislina, vitamini, minerali, koencim Q10	shranjevanje: v trdni obliki, pred zaužitjem: raztapljanje v vodi
	Lekadol plus C, Lek	300	paracetamol	
	Daleron C, Krka	20	paracetamol	
sirup	Sambucol Extra Defence, Sambucol	150 mg v 10 mL	čink, baker, selen, vitamin B6, betakaroten	shranjevanje: v tekoči obliki
	Marsovci, Walmark	25 mg v 5 mL	vitamini: A, D <sub>3</sub> , B-kompleksa, betaglukan, bioflavonoidi	
	Immunofit, Valens	75 mg v 5 mL	betaglukan, koencim Q10	
peroralna raztopina	Floradix Floravital, Fidimed	10 mg v 10 mL	železo, vitamini B1, B2, B6, B12	shranjevanje: v tekoči obliki, po odprtju shranjevati v hladilniku
	Floradix Kindervital, Fidimed	12 mg v 5 mL	vitamini A, B1, B2, B6, B12, D, E, kalcij	

## 1.4 Stabilnost askorbinske kisline

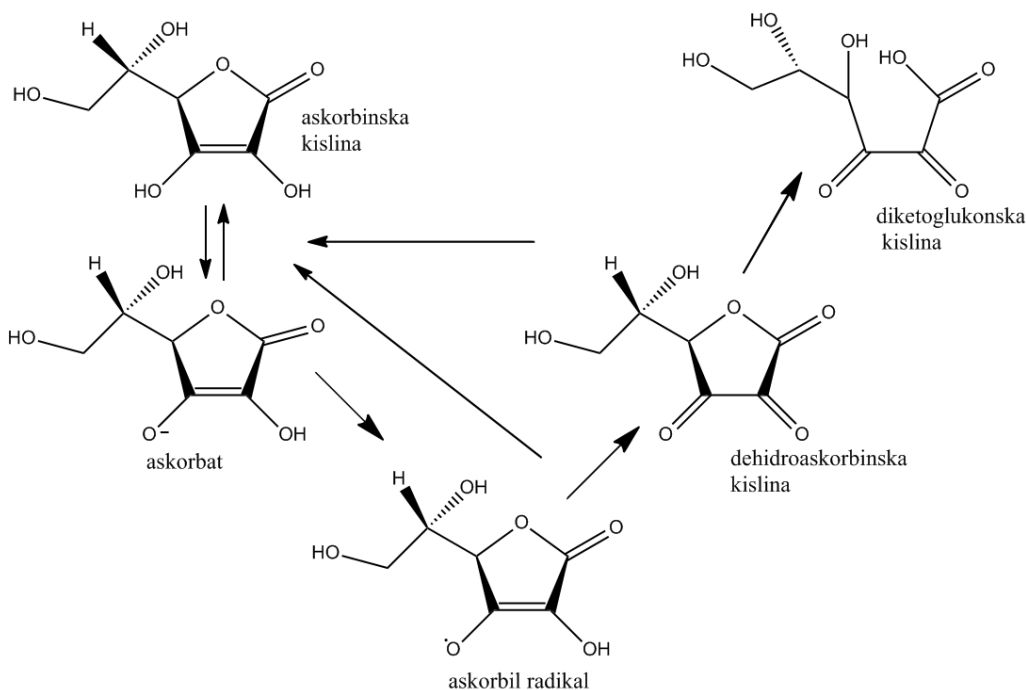
Askorbinska kislina je v obliki belega kristaliničnega praška, ki se razbarva, če ga izpostavimo svetlobi ali vlagi. Zelo dobro se topi v vodi (33 g v 100 ml vode), topna pa je tudi v alkoholu (2 g v 100 ml alkohola) (6). Kemijsko je AK (5R)-5-[(1S)-2-dihidroksietil]-3,4-dihidroksifuran-2-(5H)-on (31). Izraz vitamin C se nanaša na AK in njeno oksidirano obliko, dehidroaskorbinsko kislino (Slika 3) (1).



Slika 3: Oksidacija L-askorbinske kisline v dehidroaskorbinsko kislino (povzeto po 27,33)

AK je zelo stabilna v trdnem stanju, v raztopinah pa je njena stabilnost dosti slabša. Pri 25°C in relativni vlažnosti od 55 do 65% je AK v trdni farmacevtski obliki obstojna 5 let. Koncentracija AK v vodni raztopini z visoko koncentracijo 10 mg/mL pri sobni temperaturi že v pol leta pade na 51%, po enem letu pa vsa AK oksidira (32). Iz Preglednice II je razvidno, da je AK na trgu večinoma v trdni obliki, vendar se šumeče tablete, praški in zrnca pred zaužitjem pripravijo z raztapljanjem v vodi. Tukaj lahko pride do zmanjšanja stabilnosti AK, zato številni proizvajalci priporočajo zaužitje takoj po pripravi. Zaradi dveh hidroksilnih skupin v strukturi se AK hitro oksidira do dehidroaskorbinske kisline (Slika 4). Ta reakcija je reverzibilna, medtem ko je reakcija nastanka biološko neaktivne diketoglukonske kisline ireverzibilna. Iz diketoglukonske kisline v aerobnih pogojih po več reakcijskih stopnjah oksidacije nastanejo 3 molekule oksalne kisline, v anaerobnih pogojih pa nastaneta furfural in ogljikov dioksid (32-34).





**Slika 4: Razgradnja askorbinske kisline (povzeto po 34)**

Na stabilnost AK v raztopinah vplivajo predvsem temperatura, kisik, svetloba, pH, kovinski ioni in koncentracija AK (33,34). Stabilnost AK v raztopinah se lahko izboljša z izbiro primerne topila, poleg tega pa je treba znižati tudi vpliv drugih, prej naštetih destabilizatorjev (32).

- *temperatura*

Povišanje temperature povzroči povečanje hitrosti kemijskih in fizikalnih reakcij, zato za večino kemijskih procesov predvidevamo večjo stabilnost pri nizkih temperaturah. Pri oksidacijah znižanje hitrosti pri nizkih temperaturah ni tako značilno kot pri ostalih reakcijah. Pri višjih temperaturah je namreč topnost kisika v raztopini manjša, ravno kisik pa določa obseg oksidacije (35). Temperatura je eden ključnih dejavnikov, ki vpliva na stabilnost AK v raztopinah. Nováková s sodelavci (33) je proučevala stabilnost AK v raztopini s koncentracijo 10 mg/L pri temperaturah 4, 10 in 20°C. Ugotovili so, da je AK najbolj stabilna pri 4°C, najmanj pa pri 20°C. H. Iwase (36) je preverjal stabilnost AK pri temperaturah od 25 do 80°C. Ugotovil je, da je bilo v raztopini AK z začetno koncentracijo 10 mg/L po eni uri pri 25°C prisotnih še 97% začetne koncentracije, medtem ko je vsebnost AK pri 80°C v eni uri padla na 12% začetne vsebnosti.

- *kisik*

Oksidacije učinkovin najhitreje potekajo v raztopinah in so odvisne od raztopljenega kisika. AK se v prisotnosti kisika oksidira do dehidroaskorbinske kisline. Za odstranjevanje kisika iz raztopin se največkrat uporablja prepihanje z inertnimi plini, kot so dušik, argon ali helij (35). Nováková in sodelavci (33) so prepihovali raztopine AK s helijem 5, 10 in 20 minut. Dobili so zanimive rezultate, in sicer se je izkazalo, da je 5 minutno prepihanje z inertnim plinom celo zmanjšalo stabilnost AK, daljše prepihanje pa je pripomoglo k stabilizaciji AK. Kljub temu je bila AK še vedno najbolj stabilna v raztopini, ki je niso prepihovali s helijem.

- *svetloba*

Svetloba zaradi ionizirajočega sevanja povzroča nastanek prostih radikalov in različnih razpadnih produktov (35). Študija vpliva svetlobe na stabilnost AK v raztopinah je pokazala, da na stabilnost AK vplivata tako vidna kot UV svetloba. Po eni uri izpostavljenosti UV svetlobi (265 nm) je bilo v raztopini prisotne nekaj manj kot 80% začetne koncentracije AK, v raztopini, ki je bila izpostavljena vidni svetlobi pa 84%. Najbolj stabilna je bila raztopina AK shranjena v rjavi bučki, saj je bilo po eni uri v tej raztopini prisotnih še 95% začetne koncentracije AK. Raziskovalci zato priporočajo shranjevanje vzorcev v rjavih bučkah in vialah ali pa zaščito steklovine z alu folijo, da se prepreči izpostavljenost svetlobi (34,36).

- *pH*

pH vpliva na oksidacijo z neposrednim vplivom na redoks potencial oksidirajočih snovi. Višji kot je pH raztopine, nižji je redoks potencial in s tem večja občutljivost na oksidacijo. Kisle učinkovine (na primer AK) se zato hitreje oksidirajo v nevtralnih in bazičnih pogojih (35). V bazičnem mediju iz AK nastaja askorbat (Slika 4), medtem ko je v kislem ta reakcija manj verjetna, zato je AK najbolj stabilna v kislem pH (33,34). H. Iwase je proučeval stabilnost AK pri 25 in 40°C ter pri pH-jih od 3 do 8,5. Ugotovil je, da je AK najbolj stabilna pri temperaturi 25°C in pH 3, najmanj pa pri 40°C in pH 7,4 oziroma 8,5. Pri 25°C in pH 3 je po eni uri v raztopini AK z začetno koncentracijo 10 mg/L prisotne še 99,5% AK, pri pH 8,5 pa le 7,4%. Pri 40°C in pH 3 je po eni uri prisotne še 94% začetne koncentracije AK, pri pH 8,5 pa je vsa AK oksidirala (36).

- *kovinski ioni*

Kovinski ioni prehodnih elementov ( $M^{n+}$ ) so katalizatorji v reakcijah oksidacije, saj omogočajo odcep elektrona iz molekule in s tem nastanek radikala. V farmacevtskih sistemih sta pomembna predvsem baker in železo, ki ju najdemo v pomožnih snoveh, pufrih, učinkovinah naravnega izvora in v vodi (35). Tudi AK je občutljiva na prisotnost kovinskih ionov, kar so dokazali v številnih študijah (32-34). Za zmanjšanje vpliva kovinskih ionov se uporabljajo kelatorji, ki v raztopini kelirajo kovinske ione in tako preprečijo njihovo katalitsko aktivnost. Za stabilizacijo AK se najpogosteje uporabljajo EDTA, 2-merkaptopropionska kislina (MPA), triklorocetna kislina, citronska kislina ter o- in m-fosforjeva kislina (33,34). V literaturi najdemo tudi zanimiv podatek, da dodatek EDTA ni vedno učinkovit pri stabilizaciji AK, saj naj bi kompleks EDTA – Fe v nekaterih primerih močnejše oksidiral AK kot pa prosto železo (36).

- *koncentracija AK*

Stabilnost AK v raztopinah je odvisna tudi od njene koncentracije. V razredčeni raztopini AK je sorazmerno večja količina destabilizirajočih dejavnikov glede na količino AK, kar pomeni večjo hitrost reakcij (35). Vpliv koncentracije AK na njeno stabilnost so proučevali L. Nováková in sodelavci. Ugotovili so, da višja koncentracija v raztopini poveča stabilnost AK. Stabilnost AK se je bistveno zmanjšala pri raztopinah s koncentracijami nižjimi od 0,1 mg/L, raztopine s koncentracijami AK nad 10 mg/L pa so se izkazale kot bolj stabilne. Po treh dneh je bilo v raztopini s koncentracijo AK 10 mg/L prisotnih še 60% začetne vsebnosti, medtem ko je v raztopini s koncentracijo 0,1 mg/L vsa AK oksidirala že po eni uri (33).

## **1.5 Analitika askorbinske kisline**

Za določanje AK v bioloških sistemih in v stabilnostnih študijah se uporabljajo titracijske reakcije, encimske, spektrofotometrične, fluorometrične, elektrokemične in kromatografske metode. Metode za določanje AK lahko razdelimo na klasične in na sodobne metode (37).

## 1.5.1 Klasične metode

### Redoks reakcije

#### *Jodometrična titracija*

Evropska farmakopeja za določanje vsebnosti AK predpisuje jodometrično titracijo. Vzorec je potrebno raztopiti v mešanici razredčene žveplove kisline in vode brez ogljikovega dioksida. Kot indikator se doda raztopino škroba, nato pa sledi titracija z jodom do pojava obstojne vijolično-modre barve (31). Jod se v reakciji reducira do jodidnega iona, AK pa se oksidira do dehidroaskorbinske kisline (Enačba 3). Farmakopeja še navaja, da je 1 mL 0,05 M joda ekvivalentno 8,81 mg AK (31).



Določanje AK na takšen način je preprosto, vendar ni selektivno in je pri velikem številu vzorcev tudi zamudno.

#### *Titracija z 2,6-dikloroindofenolom*

Pri tej metodi se raztopino AK titrira z modrim barvilom 2,6-dikloroindofenolom, pri čemer se barvilo razbarva, iz AK pa nastane dehidroaskorbinska kislina. Ko se porabi vsa prisotna AK, se prebitek barvila obarva roza. Končna točka titracije se določi vizualno ali pa spektrofotometrično pri 518 nm (37). Reakcijo titracije motijo železovi in bakrovi ioni, ki jih AK reducira, močno obarvani izvlečki iz rastlin, ki prekrijejo končno točko titracije, ter prisotni reducenti, ki dajejo lažno višje rezultate (7,37). Metoda je preprosta, hitra in ne zahteva zahtevne opreme (37). Njene pomanjkljivosti so: slaba specifičnost zaradi interference z drugimi snovmi, slabša natančnost, pri obarvanih vzorcih pa je težka določitev končne točke titracije.

#### *Redukcija kovinskih ionov*

AK reducira  $\text{Fe}^{3+}$  v  $\text{Fe}^{2+}$ .  $\text{Fe}^{2+}$  tvori kompleks s ferozinom, 2,29-tripiridil-5-triazin ali 2,2'-dipiridinom. Nastali kompleks se kvantificira kolorimetrično (7,37).

## **Derivatizacijske metode**

### *Derivatizacija z o-fenilendiaminom (OPD)*

AK se najprej oksidira do dehidroskorbinske kisline, nato sledi derivatizacija z o-fenilendiaminom. Pri tem nastane kinoksalin, ki intenzivno fluorescira pri 430 nm, če ga ekscitiramo z UV svetlobo pri 350 nm. Detekcijo motijo ostale fluorescirajoče snovi, ki so prisotne v večini bioloških vzorcih (37).

### *Derivatizacija z 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH)*

AK se oksidira do dehidroaskorbinske kisline, nato sledi derivatizacija z DNPH. V reakciji nastane rdeče obarvan osazon, ki se spektrofotometrično detektira pri 520 nm. Reakcija je nespecifična, saj z DNPH reagirajo ogljikovi hidrati in diketoni (7,37).

## **Encimske metode**

Pri encimskih metodah se AK z encimoma askorbat oksidazo ali askorbat peroksidazo pretvori v dehidroaskorbinsko kislino. Načini detekcije so različni: z direktno spektrofotometrijo se detektira upad vsebnosti AK, nastalo dehidroaskorbinsko kislino se po derivatizaciji z OPD detektira spektrofotometrično, z elektrokemično detekcijo pa se lahko spremlja poraba kisika. Encimske metode določanja AK so natančnejše od derivatizacijskih metod (37).

## **1.5.2 Sodobne metode**

### **Spektroskopske metode**

Spektroskopske metode za določanje AK izkoriščajo njene redoks lastnosti. AK reducira kovinske ione (bakrove ali železove), reducirani kovinski ioni pa se nato kompleksirajo z različnimi barvili. Pri kompleksaciji pride do obarvanosti, kar se zazna vizualno ali spektrofotometrično. Barvila, ki se uporabljajo za določanje AK, so ferozin, resorcinol, 2,2'-dipiridil, 1,10-fenantrolin in druga (37). Prednosti spektroskopskih metod so: široka uporabnost in dostopnost, enostavnost, hitrost analize in dobra občutljivost. Slabost spektroskopskih metod je slaba selektivnost, zato ni primerna za stabilnostne študije, kjer nastajajo razpadni produkti s podobnimi lastnostmi kot izhodna snov. Spektroskopske metode lahko motijo tudi druge komponente, predvsem v kompleksnejših vzorcih.

### **Kapilarna elektroforeza (CE)**

Ločba analitov pri CE temelji na razmerju med nabojem in velikostjo analitov. Analiti se zaradi različne hitrosti potovanja v električnem polju v kapilari ločijo med seboj (38). Ta metoda se uporablja za določanje AK v sadju, zelenjavi in farmacevtskih izdelkih. Največ se uporabljata CZE (kapilarna conska elektroforeza) in MECC (micelarna elektrokemična kapilarna kromatografija). Za detekcijo se ponavadi uporablja UV-VIS detektor, valovna dolžina detekcije je ponavadi 254 nm. Prednosti teh tehnik so univerzalnost, kratek čas analize, majhna poraba vzorcev, možna je avtomatizacija ter visoka učinkovitost glede na tradicionalne metode. Slabost CE je majhna občutljivost v primerjavi s tekočinsko kromatografijo (37).

### **Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)**

Zlati standard za določanje AK je HPLC, saj je metoda hitra, selektivna in visoko občutljiva (39). Določanje AK s tekočinsko kromatografijo je lahko osnovano na različnih separacijskih tehnikah: reverzno-fazna, ionsko izmenjevalna, ionsko parna in HILIC kromatografija (Hydrophilic interaction liquid chromatography) (34). Med naštetimi se v največji meri uporablja reverzno-fazna kromatografija.

#### *- reverzno-fazna kromatografija*

Reverzno-fazna HPLC (RP) združuje nepolaro stacionarno fazo in zmerno polaro mobilno fazo. Nepolarne molekule se zato dlje časa zadržujejo na koloni, polarne molekule pa se zlahka eluirajo (40). Za analizo AK se znotraj RP kromatografije največ uporablja C18 stacionarna faza. Pri reverzno-fazni kromatografiji se AK eluira zelo blizu mrtvega volumna, za boljšo resolucijo pa je potrebno povečati delež vodne faze v mobilni fazi in znižati pH na vrednost do minimalno 2. Pri daljši uporabi lahko 100% vodna mobilna faza povzroči t.i. hidrofobni kolaps stacionarne faze, prav tako pa na stacionarno fazo negativno vpliva zelo nizek pH. Z reverzno-fazno kromatografijo so določali AK v očesni tekočini, plazmi, levkocitih, kozmetičnih izdelkih, multivitaminskih, hrani ter tudi v stabilnostnih študijah (vpliv vlage na AK) (34).

#### *- ionsko parna kromatografija*

Mobilna faza je zelo kompleksna, saj je sestavljena iz petih ali celo več komponent, ki vključujejo reagente za ionsko parno kromatografijo in anorganske pufre. Retencija je

odvisna od tipa in koncentracije reagenta za ionsko parno kromatografijo ter kolone. Anorganski pufri lahko precipitirajo in tako zamašijo elemente HPLC sistema, reagenti pa skrajšajo življenjsko dobo kolone. Ionsko parna kromatografija zato ni priljubljena tehnika za analizo AK v sodobnih laboratorijih. To tehniko so uporabljali za določanje AK v multivitaminskih tabletah, kozmetičnih produktih, krvi, plazmi ter farmacevtskih izdelkih (34).

- *ionsko izmenjevalna kromatografija*

Retencija pri ionsko izmenjevalni kromatografiji temelji na privlačnosti med raztopljenimi ioni v vzorcu in med nabitimi molekulami vezanimi na stacionarno fazo (40). AK je šibka organska kislina, ki se dobro zadržuje na SAX (močan anionski izmenjevalec) stacionarni fazi. Za analizo AK se uporablja tudi modificirana metoda, kjer so kot reverzna-faza vezane amino skupine, ki služijo kot šibek anionski izmenjevalec. Za mobilno fazo se v tem primeru uporablja anorganski pufer ali kislina z nizkim pH. Ionsko izmenjevalno kromatografijo so uporabljali za določanje AK v pijačah (34).

- *HILIC kromatografija*

HILIC je podskupina normalno-fazne kromatografije in je zelo primerna za analizo majhnih polarnih molekul, ki se slabo zadržujejo na reverzno-faznih stacionarnih fazah. Mobilna faza je sestavljena iz acetonitrila ter 5-40% vode, ki je prisotna tudi na površini hidrofilne stacionarne faze (hidroksi etil, diol ali amino skupine). Ločba temelji na vodikovih vezeh in elektrostatskih interakcijah z nabito stacionarno fazo (34,40). HILIC je novejša tehnika, ki je zlasti popularna zaradi možnosti detekcije z masnim spektrometrom. Pri tej tehniki se namreč uporablja mobilna faza z visokim deležem organskega modifikatorja, kar olajša ionizacijo analita v MS s čimer se posledično poveča tudi občutljivost metode. HILIC so uporabljali za določanje AK v hrani, pijači in tabletah (34).

### **Detekcija askorbinske kisline**

Za detekcijo AK pri HPLC metodah in tudi pri CE se predvsem uporabljajo UV, elektrokemični in fluorescenčni detektorji, nekoliko manj pa detekcija z masnim spektrometrom, ki je po drugi strani najbolj občutljiva in selektivna med načini detekcije (37).

*- UV detekcija*

Pri analizi AK se najpogosteje uporablja UV detekcija. AK ima absorpcijske maksimume v območju od 244 do 265 nm, odvisno od sestave in pH vrednosti mobilne faze (34). Pri pH 2 je absorpcijski maksimum AK pri 245 nm, pri pH 6,4 pa pri 265 nm. UV detekcija je najbolj uporabna za kvantifikacijo AK v multivitaminskih pripravkih in sadnih sokovih, kjer je koncentracija AK visoka. Za višje koncentracije AK je ta način detekcije omejen zaradi neselektivnosti, kar pride do izraza zlasti pri kompleksnejših bioloških vzorcih (37). HPLC sistem z UV detekcijo je najbolj primeren kot analitska podpora v stabilnostnih študijah, ker je HPLC po eni strani selektiven (loči med analitom in njegovimi razpadnimi produkti), po drugi strani pa je UV detekcija dovolj občutljiva in univerzalana za analizo AK. Za potrebe diplomske naloge smo tudi mi uporabili HPLC-UV metodo.

*- Elektrokemična detekcija (ECD)*

Druga najpogostejša metoda za detekcijo AK je elektrokemična detekcija. AK je elektroaktivna, zato jo zlahka detektiramo s kulometričnimi ali amperometričnimi detektorji. AK se oksidira že pri nizkih potencialih, zaradi česar je manjša verjetnost interferenc z drugimi analiti, ki se prav tako oksidirajo in se eluirajo skupaj z AK. HPLC metoda skupaj z elektrokemičnim detektorjem zagotavlja visoko občutljivost, specifičnost in selektivnost (34). Elektrokemična detekcija se uporablja za določanje AK v bioloških vzorcih in hrani.

*- Fluorescenčna detekcija (FD)*

Kemijska struktura AK nima fluorescenčnih lastnosti, zato je pred fluorescenčno detekcijo potrebna oksidacija AK do dehidroaskorbinske kisline, nato pa še ustreza derivatizacija, ki je lahko pred- ali post-kolonska. Detekcija s FD je zato zahtevna in časovno potratna in se malo uporablja (34). Za kvantifikacijo AK se najpogosteje uporablja derivatizacija z o-fenilendiaminom, ki zagotavlja dobro selektivnost in občutljivost (37).

*- Detekcija z masnim spektrometrom (MS)*

Detekcija z masnim spektrometrom se za kvantifikacijo AK manj uporablja zaradi visoke cene, dostopnosti in zahtevnejšega rokovanja z instrumentom. Detekcija z MS je primerna za reverzno-fazno kromatografijo in HILIC, medtem ko je mobilna faza pri ostalih kromatografskih tehnikah nezdržljiva z MS. Detekcija z MS je od vseh prej naštetih



detekcij najbolj selektivna in občutljiva, zato se uporablja za analizo AK v vzorcih z nizko vsebnostjo AK in v kompleksnih vzorcih (kri, plazma, sadje, zelenjava) (34). A. G. Franich in sodelavci (41) so za detekcijo AK v sadju in zelenjavi uporabili elektrosprej ionizacijo (ESI) v negativnem načinu in AK določili kot  $[M-H]^- = 175$ . Tekočinska kromatografija z detekcijo z masnim spektrometrom omogoča hitro identifikacijo, potrditev in kvantifikacijo analita z enim samim injiciranjem.

## 2 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge bo vrednotenje oksidativne stabilnosti askorbinske kisline v vodnih raztopinah standarda in nato še v izbranih pripravkih. Zaradi antioksidativnih lastnosti askorbinske kisline je namreč zelo problematična njena stabilnost, zlasti v vodnih raztopinah. Najprej bomo razvili primerno stabilnostno indikativno HPLC metodo za določanje AK in jo ustrezno ovrednotili.

Nato bomo proučili stabilnost standarda askorbinske kisline v vodnih raztopinah. Ugotavljali bomo vpliv najpogostejših dejavnikov, ki vplivajo na reakcije oksidacij spojin. Ovrednotili bomo vpliv naslednjih dejavnikov na stabilnost askorbinske kisline: koncentracija askorbinske kisline (v območju od 10 do 2500 mg/L), vodikov peroksid (3, 0,3 in 0,03% vodikov peroksid), različni mediji (absolutni etanol, 50% etanol, destilirana, MiliQ ter vodovodna voda), EDTA (od 0,1 do 3 mM EDTA), temperatura (4, 25, 40 in 60°C), pH (v območju od 2 do 8), kisik, dušik in svetloba.

V nadaljevanju bomo proučevali stabilnost askorbinske kisline v nekaterih prehranskih dopolnilih in v zdravilu brez recepta z askorbinsko kislino, ki se pred zaužitjem pripravijo z raztapljanjem v vodi. Znano je namreč, da je askorbinska kislina v trdnem stabilna, v raztopinah pa je njena stabilnost zelo problematična. Zanimala nas bo obstojnost askorbinske kisline v realnih situacijah, kot na primer: če šumečo tableto raztopimo v vodi in jo dlje časa pustimo, preden jo zaužijemo; ali če pripravek z askorbinsko kislino pripravimo z vročim čajem. V ta namen bomo izbrali več različnih šumečih tablet in vsaj dva pripravka, ki se lahko pripravita kot topel napitek. Na osnovi stabilnosti askorbinske kisline v izbranih pripravkih po raztapljanju v vodi bomo ovrednotili potencialno destabilizacijo askorbinske kisline pred samim jemanjem prehranskega dopolnila ali zdravila. Med seboj bomo primerjali tudi rezultate stabilnosti askorbinske kisline v pripravkih in vodnih standardih z enako oziroma podobno deklarirano koncentracijo. Hkrati bomo z našo analizo metodo določili tudi dejansko koncentracijo askorbinske kisline v izbranih pripravkih.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Reagenti, raztopine in substance

- L-askorbinska kislina,  $C_6H_8O_6$ ,  $M_r = 176,1$  g/mol, min. 99,0% (Sigma-Aldrich)
- MiliQ voda, Fakulteta za Farmacijo
- EDTA,  $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_6 \cdot 2H_2O$ ,  $M_r = 372,24$  g/mol, min. 99% (Merck)
- absolutni etanol,  $C_2H_5OH$ ,  $M_r = 46,07$  g/mol, min. 99,8% (Panreac Quimica S.A.U.)
- acetonitril,  $C_2H_3N$ , Chromasolv<sup>®</sup>, gradient grade, for HPLC,  $M_r = 41,05$  g/mol (Sigma-Aldrich)
- ortofosforjeva kislina 85 %,  $H_3PO_4$ ,  $M_r = 98,00$  g/mol; 1l = 1,71 kg (Merck)
- metanol,  $CH_3OH$ ,  $M_r = 32,04$  g/mol (Sigma-Aldrich)
- kisik,  $O_2$ , Messer Slovenija d.o.o.
- dušik,  $N_2$ , Messer Slovenija d.o.o.
- kalijev dihidrogen fosfat,  $KH_2PO_4$ ,  $M_r = 136,08$  g/mol;  $\geq 99,5\%$  (Merck)
- pufrne raztopine: pH 3, pH 4, pH 7 (Merck)
- vodikov peroksid 30 %,  $H_2O_2$ ,  $M_r = 34,02$  (Fluka)
- kalijev klorid,  $KCl$ ,  $M_r = 74,55$  g/mol, min. 99,5 % (Carlo Erba)
- dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat,  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ,  $M_r = 177,99$  g/mol, min. 99,5% (Merck)
- paracetamol,  $C_8H_9NO_2$ ,  $M_r = 151,17$  g/mol;  $\geq 99,0$  % (Sigma-Aldrich)

#### 3.1.2 Pripravki z askorbinsko kislino

1. PRIPRAVEK A: Vitamin C 180 mg, šumenke z vitaminom C s sladili, prehransko dopolnilo z okusom limone brez dodanega sladkorja, 80 g (20 šumenk po 4 g), Krüger,
2. PRIPRAVEK B: Vitamin C 180 mg, šumeče tablete z okusom limone, s sladili, 80 g (20 šumečih tablet po 4g), Sensilab,
3. PRIPRAVEK C: FidiMag 300 plus C, 300 mg magnezija in 120 mg vitamina C, 65 g (10 šumečih tablet po 6,5 g), Fidimed,

4. PRIPRAVEK Č: Biofar naravni vitamin C, 120 mg vitamina C, okus pomaranča/grenivka, s sladili, 90 g (20 šumečih tablet po 4,5 g), Biofar,
5. PRIPRAVEK D: Multibionta Plus Calcium + Magnesium, 75 mg vitamina C, 90 g (20 šumečih tablet po 4,5 g), Merck
6. PRIPRAVEK E: Vitamin C Pulver, 100 g, Amos Vital
7. PRIPRAVEK F: Daleron C, 500 mg paracetamola in 20 mg askorbinske kisline, zrnca za peroralno uporabo, (10 vrečk po 5 g), Krka

Pripravki od A do E so prehranska dopolnila, pripravek F pa je registriran kot zdravilo, ki se v lekarnah izdaja brez recepta.

### 3.1.3 Naprave in pribor

- Digitalni tehtnici XP105 DeltaRange in Exacta 300EB (Mettler Toledo)
- Avtomatske pipete 20-200  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L, 500-5000  $\mu$ L (Eppendorf)
- Stekljeni inventar: čaše, merilne bučke, merilni valji, zamaški, tehtiči, viala, inserti
- Ostalo: spatule, plastične kapalke, epice, Parafilm M<sup>®</sup>, alu folija, škarje, digestorij
- Sistem za pripravo MiliQ vode 30L, Millipore Billerica
- Klimatska komora Vötsch VC 4034 (Vötsch Industrietechnik GmbH)
- Hladilnik LTH
- Vodni kopeli WB 1223 in WB – 30E (Kambič)
- Ultrazvočni kadički Sonis 4 (Iskra) in Bandelin Sonorex (Brandelin electronic)
- pH metra MA 5750 (Iskra) in MP 220 (Mettler Toledo)
- Magnetno mešalo HI 190M (Hanna Instruments)
- kolona Luna C18 (2), 100 x 4,6, 5  $\mu$ m (Phenomenex)
- HPLC sistem 1100/1200 series (Agilent Technologies): razplinjjevalec, kvarterna črpalka, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, UV–VIS detektor, programska oprema ChemStation
- kolona Luna NH<sub>2</sub> 150 x 3,0 mm, 3  $\mu$ m (Phenomenex)
- predkolona Luna NH<sub>2</sub> 4 x 3,0 mm (Phenomenex)
- sistem za filtriranje (Sartorius)
- celulozno-acetatni filter z velikostjo por 0,45  $\mu$ m (Sartorius)

## 3.2 ANALIZNA METODA

### 3.2.1 Razvoj in optimizacija analizne metode

Pri razvoju analizne metode smo kot mobilno fazo uporabili 25 mM fosfatni pufer s pH=3 (vodna faza) in acetonitril (ACN, organska faza) v različnih razmerjih. V Preglednici III so prikazane analizne metode in kromatografski pogoji, ki smo jih uporabili pri razvoju končne metode.

**Preglednica III: Kromatografski pogoji metod, uporabljeni pri razvoju analizne metode**

metoda	kolona	MF (A : B)	T	$\Phi$
1	Luna C18	80 : 20	40	1
2	Luna C18	90 : 10	40	1
3	Luna C18	95 : 5	40	1
4	Luna C18	100 : 0	40	1
5	Luna NH <sub>2</sub>	80 : 20	50	0,8
6	Luna NH <sub>2</sub>	90 : 10	50	0,8
7	Luna NH <sub>2</sub>	95 : 5	50	0,8

MF (A : B) – sestava mobilne faze, fosfatni pufer : ACN (v %), T – temperatura kolone [°C],  $\Phi$  – pretok mobilne faze [mL/min]

### 3.2.2 Končni kromatografski pogoji HPLC za vrednotenje askorbinske kisline

- Kolona: Luna NH<sub>2</sub> 150 x 3,0 mm, 3  $\mu$ m
- Temperatura kolone: 50°C
- Mobilna faza: fosfatni pufer : ACN = 95:5
- Pretok mobilne faze: 0,8 mL/min
- Volumen injiciranja: 1  $\mu$ l
- Valovna dolžina detekcije: 254 nm
- Čas analize: 3 min
- Retencijski čas askorbinske kisline: 1,9 min
- Temperatura avtomatskega vzorčevalnika: 15°C

### 3.3 PRIPRAVA VZORCEV

#### 3.3.1 Razvoj in optimizacija analizne metode

##### 3.3.1.1 Priprava vodne mobilne faze

Pufer smo pripravili tako, da smo natehtali 3,4027 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , ga kvantitativno prenesli v 1 L merilno bučko, ga raztopili v MiliQ vodi, dopolnili do oznake ter dobro premešali. Koncentracija tako pripravljene raztopine je bila 25 mmol/L. pH meter smo s standardno pufrno raztopino pH 3 umerili na vrednost 3. Nato smo z uporabo 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  po kapljicah uravnali pH mobilne faze na vrednost 3. Pufer smo filtrirali s pomočjo vakuumskega filtrirnega sistema preko celulozno-acetatnega filtra z velikostjo por 0,45  $\mu\text{m}$ . Nato smo pufer še razplinili na ultrazvočni kadički.

##### 3.3.1.2 Priprava standardne raztopine askorbinske kisline

Natehtali smo 5 mg AK in dodali 1 mL destilirane vode. Tako pripravljeno raztopino smo 10 krat redčili z destilirano vodo, da smo dobili končno raztopino s koncentracijo 500 mg/L.

##### 3.3.1.3 Priprava standarda cisteina

Natehtali smo 1 mg cisteina in ga raztopili v 1 mL destilirane vode, tako da smo dobili raztopino s koncentracijo 1000 mg/L.

#### 3.3.2 Vrednotenje HPLC metode

##### 3.3.2.1 Priprava standardnih raztopin za vrednotenje selektivnosti

Pripravili smo standardno raztopino AK s koncentracijo 500 mg/L tako, da smo natančno natehtali 2,5 mg AK, jo raztopili v 5 mL bučki z destilirano vodo in dopolnili do oznake.

Standardno raztopino pripravka smo pripravili tako, da smo eno šumečo tableto Multibionta Plus Calcium + Magnesium raztopili v 150 mL vodovodne vode, dobro premešali ter počakali, da so izhlapeli mehurčki. Tako pripravljena raztopina je imela deklarirano koncentracijo AK 500 mg/L.

Standardno raztopino EDTA (1 mmol/L) smo pripravili tako, da smo natehtali 18,612 mg EDTA, jo kvantitativno prenesli v 50 mL bučko, raztopili v destilirani vodi in dopolnili do oznake.

#### 3.3.2.2 Priprava standardnih raztopin askorbinske kisline za vrednotenje linearnosti

Za izdelavo umeritvene premice smo pripravili osem raztopin različnih koncentracij AK. Osnovno raztopino s koncentracijo 2500 mg/L smo pripravili tako, da smo natehtali 125 mg AK, jo kvantitativno prenesli v 50 mL bučko, raztopili v 1 mM EDTA in nato dopolnili do oznake. Iz osnovne raztopine smo z redčenjem z 1 mM EDTA pripravili še raztopine s koncentracijami 1000, 500, 250, 100, 50, 25 in 10 mg/L. Tako pripravljene standardne raztopine AK smo analizirali z metodo HPLC.

Na enak način smo pripravili tudi standardne raztopine AK s koncentracijami 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 in 2500 mg/L v destilirani vodi. Tako pripravljene raztopine smo analizirali z metodo HPLC in izdelali umeritveno premico.

#### 3.3.2.3 Priprava standardnih raztopin askorbinske kisline za vrednotenje ponovljivosti in točnosti

Za vrednotenje dnevne in meddnevne ponovljivosti in točnosti smo pripravili tri vzorce AK s koncentracijami 20, 200 in 2000 mg/L. Osnovno raztopino s koncentracijo 2000 mg/L smo pripravili tako, da smo natehtali 10 mg standarda AK, ga kvantitativno prenesli v 5 mL bučko, raztopili v 1 mM EDTA in z istim topilom dopolnili do oznake. Koncentraciji 200 in 20 mg/L smo pripravili z redčenjem osnovne raztopine z 1 mM EDTA. Za vsako koncentracijo smo pripravili pet paralelk v istem dnevu.

#### 3.3.2.4 Priprava standardnih raztopin askorbinske kisline za vrednotenje stabilnosti

Pripravili smo standardne raztopine AK s koncentracijami 20, 200 in 2000 mg/L v 1 mM EDTA. Raztopine smo nato analizirali ob času 0 in 24 ur.

### 3.3.3. Stabilnost standarda askorbinske kisline

#### 3.3.3.1 Stabilnost askorbinske kisline pri različnih koncentracijah

Za spremljanje stabilnosti AK pri različnih koncentracijah smo pripravili osnovno raztopino AK s koncentracijo 2500 mg/L v destilirani vodi. Osnovno raztopino smo nato redčili z istim topilom, da smo dobili naslednje koncentracije: 10, 50, 100, 200, 500 in 1000 mg/L. Za vsako koncentracijo smo pripravili po tri paralelke, ki smo jih analizirali v časovnih točkah 0, 1, 2, 4, 24, 48 in 120 ur. Vzorce smo shranjevali na 25°C.

#### 3.3.3.2 Stabilnost askorbinske kisline v prisotnosti vodikovega peroksida

30 % vodikov peroksid smo z destilirano vodo redčili tako, da smo dobili 3% in 0,3% vodikov peroksid. Pripravili smo tri raztopine AK v destilirani vodi s koncentracijami 11, 110 in 1100 mg/L, nato pa smo iz vsake raztopine odpipetirali po 1000 µL v štiri viale. Za vsako koncentracijo AK smo tako imeli pripravljene štiri viale s 1000 µL raztopine. V prvo vialo vsake koncentracije smo dodali 100 µL destilirane vode, v drugo 100 µL 30% vodikovega peroksida, v tretjo 100 µL 3% in v četrto vialo 100 µL 0,3% vodikovega peroksida. Tako pripravljene vzorce smo analizirali v časovnih točkah 10, 20, 30, 60, 90 in 120 minut. Vzorce smo shranjevali na 25°C.

#### 3.3.3.3 Stabilnost askorbinske kisline v različnih medijih

Pripravili smo pet raztopin AK s koncentracijo 500 mg/L v različnih medijih: vodovodni, destilirani in MiliQ vodi, 50% etanolu v destilirani vodi ter absolutnem etanolu. Vzorce smo shranjevali na 25°C in jih analizirali v časovnih točkah 0, 1, 2, 4, 24 in 48 ur. Za vsak medij smo analizirali tri paralelke.

#### 3.3.3.4 Stabilnost askorbinske kisline v prisotnosti EDTA

Pripravili smo 3,3 mmol/L raztopino EDTA, tako da smo natehtali 30,71 mg EDTA v 25 mL bučko in z destilirano vodo dopolnili do oznake. To osnovno raztopino smo z istim topilom redčili, da smo dobili raztopine s koncentracijami 1,1 mmol/L, 0,55 mmol/L, 0,22 mmol/L in 0,11 mmol/L. Pripravili smo raztopino AK v destilirani vodi s koncentracijo 5 mg/mL. Za pripravo vzorca s 500 mg/L AK in 0,1 mmol/L EDTA smo zmešali 1/10 raztopine AK s koncentracijo 5 mg/mL in 9/10 raztopine EDTA s koncentracijo 0,11



mmol/L. Na enak način smo pripravili še vzorce AK z 0,2, 0,5, 1 in 3 mmol/L EDTA. Tako pripravljene vzorce smo analizirali v časovnih točkah 0, 1, 2, 24 in 48 ur. Vzorce smo shranjevali na 25°C.

#### 3.3.3.5 Stabilnost askorbinske kisline pri različnih temperaturah

Pripravili smo raztopino AK v destilirani vodi s koncentracijo 500 mg/L in jo enakomerno razdelili v štiri manjše bučke. Bučke smo postavili v hladilnik (4°C), v komoro na 25°C, v vodno kopel s 40°C ter v vodno kopel s 60°C. Vzorce smo analizirali v časovnih točkah 0, 1, 2, 4, 24 in 48 ur. Za vsako časovno točko smo iz posamezne bučke vzeli po tri vzorce.

#### 3.3.3.6 Stabilnost askorbinske kisline pri različnih pH-jih

Pripravili smo osnovno raztopino AK v destilirani vodi s koncentracijo 2500 mg/L. Osnovno raztopino AK smo nato petkrat redčili (500 mg/L AK) s pufrnimi raztopinami s pH-ji: 2, 3, 4, 5, 6, 7 in 8. Tako pripravljene vzorce smo analizirali v časovnih točkah 0, 1, 2, 4, 24 in 48 ur.

Pufrne raztopine smo pripravili tako, da smo v različnih razmerjih zmešali 0,05 M raztopini  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , ki smo ju pripravili v 500 mL bučkah z raztapljanjem soli v destilirani vodi. Vse pufre smo uravnali na enako ionsko moč s KCl ( $\mu = 0,15 \text{ mol/l}$ ). 50 mL (s pH-ji 2, 3, 4) oz. 100 mL (s pH-ji 5, 6, 7, 8) pufrne raztopine smo pripravili tako, da smo z merilnim valjem odmerili predpisan volumen raztopine soli, kot je prikazano v Preglednici IV, in ga prelili v bučko. Dodali smo predpisano natehto KCl za uravnavanje ionske moči ter dobro premešali. S pH metrom smo pomerili pH vrednosti raztopin in jih uravnali z uporabo 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , ki smo jo redčili z destilirano vodo in dodajali po kapljicah. pH meter smo predhodno umerili s standardnimi raztopinami pufrov na vrednosti 3, 4 in 7.

**Preglednica IV: Pregled sestave pufrnih raztopin**

pH	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O [mL]	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [mL]	KCl [g]
2	/	50	0,361
3	/	50	0,362
4	/	50	0,3615
5	0,95	99,5	0,7159
6	12,1	87,9	0,6332
7	61,2	38,8	0,2674
8	96,9	3,1	/

**3.3.3.7 Stabilnost askorbinske kisline v prisotnosti kisika, dušika in svetlobe**

Za proučevanje stabilnosti AK v prisotnosti kisika smo pripravili osnovno raztopino AK v destilirani vodi s koncentracijo 2500 mg/L. Osnovno raztopino smo z istim topilom 5 krat redčili, da smo dobili vzorec s koncentracijo 500 mg/L. Pripravili smo tri paralelke. Vsak vzorec smo najprej prepihali s kisikom in ga analizirali. Nato smo ga ponovno prepihali s kisikom. Vzorce smo nato analizirali še v časovnih točkah 1, 2, 4, 24 in 48 ur. Po vsakem vzorčenju smo vzorce ponovno prepihali s kisikom. Iz osnovne raztopine smo pripravili še tri paralelke s koncentracijo 500 mg/L, ki so nam služili kot kontrola, in jih nismo prepihovali s kisikom. Vse vzorce smo shranjevali v bučkah, jih zaščitili z alu folijo in ovili s Parafilmom M<sup>®</sup>.

Za proučevanje stabilnosti AK v prisotnosti dušika smo pripravili vzorce po istem postopku kot za proučevanje stabilnosti AK v prisotnosti kisika. Razlika je bila le ta, da smo vzorce in kontrolne vzorce shranjevali v plastičnih epicah, saj prepihanje raztopine v bučki ni bilo izvedljivo. Epice smo prav tako ovili s Parafilmom M<sup>®</sup> in zaščitili z alu folijo.

Za proučevanje stabilnosti AK izpostavljene svetlobi smo pripravili tri vzorce AK v destilirani vodi s koncentracijo 500 mg/L v 5 mL bučkah. Bučke smo ovili s Parafilmom M<sup>®</sup> in jih pustili na okenski polici, da so bili izpostavljeni svetlobi. Vzorce smo analizirali v časovnih točkah 0, 1, 2, 4, 24 ter 48 ur.

### 3.3.4 Stabilnost askorbinske kisline v pripravkih

Za proučevanje stabilnosti AK v pripravkih smo pripravili sedem različnih pripravkov. Vsakega smo pripravili po navodilu na ovojnicini, pri čemer smo kot 'velik kozarec vode' upoštevali 200 mL vodovodne vode. Vodo smo odmerili z merilnim valjem v čašo, v njej raztopili pripravek, dobro premešali ter počakali, da so izhlapeli morebitni mehurčki. Pripravki A, B, C, Č in D so šumeče tablete. Pri teh pripravkih smo vzeli eno šumečo tableto in jo raztopili v ustreznem volumnu vode. Pripravek E je v obliki praška, zato smo ga po navodilu na ovojnicini odmerili s priloženo odmerno žličko in prelili z ustreznim volumnom vode. Pripravek F je v obliki zrnč, vendar je vsak odmerek posebej pakiran v vrečko. Za pripravo pripravka F smo eno vrečko zrnč raztopili v ustreznem volumnu vode. V Preglednici V so navedeni pripravki, volumen vode, potreben za pripravo posamezne raztopine pripravka, ter deklarirana koncentracija AK. Del vsakega pripravljenega pripravka smo nato prenesli v vialo in analizirali z metodo HPLC v časovnih točkah 0, 1, 2, 4, 24 in 48 ur.

Pripravka E in F smo pripravili tudi v vreli vodi, saj je navodilo na ovojnicini dovoljevalo pripravo hladnega ali toplega napitka. Vodovodno vodo smo zavreli, odmerili ustrezen volumen z merilnim valjem ter prelili pripravek. Nato smo vzorčili ob času 10, 20 in 30 minut ter analizirali z metodo HPLC.

**Preglednica V: Potreben volumen vode za pripravo raztopin pripravkov in deklarirana koncentracija askorbinske kisline**

pripravek	volumen vode [mL]	deklarirana koncentracija AK [mg/L]
A	200	900
B	200	900
C	200	600
Č	200	600
D	150	500
E	200	600
F	150	133

Za določanje vsebnosti AK v pripravkih smo pripravili pripravke le v hladni vodovodni vodi. Iz vsakega pripravka smo nato odvzeli po tri vzorce in jih analizirali z metodo HPLC. Vsak vzorec smo dvakrat injicirali. Pripravili smo tudi standardne raztopine AK s koncentracijami 200, 400, 600, 800 in 1000 mg/L ter jih analizirali. Iz dobljenih podatkov

smo izdelali umeritveno premico in izračunali pripadajočo enačbo. Vsebnost AK v pripravkih smo določili na osnovi izračunane enačbe umeritvene premice.

### **3.4 VREDNOTENJE HPLC METODE**

HPLC metodo smo validirali v skladu z ICH smernicami (42). Validirali smo naslednje parametre: selektivnost, linearnost, območje linearnosti, ponovljivost, točnost, meja zaznavnosti, meja določitve in stabilnost vzorcev.

#### **3.4.1 Selektivnost**

Za vrednotenje selektivnosti smo najprej analizirali raztopine medijev, v katerih so bili pripravljene vzorci: destilirana voda in 1 mM EDTA. Nato smo analizirali standard AK in pripravek Multibionta Plus Calcium + Magnesium. Pripravek smo analizirali tudi po devetih dneh. Vzorce smo pripravili po postopku 3.3.2.1 Priprava standardnih raztopin za vrednotenje selektivnosti.

#### **3.4.2 Linearnost in območje linearnosti**

Vsak dan, tri dni zapored, smo analizirali raztopine AK, ki smo jih za vsak dan posebej pripravili po postopku 3.3.2.2 Priprava standardnih raztopin askorbinske kisline za vrednotenje linearnosti. Vsako koncentracijo smo injicirali dvakrat in določili povprečje dveh odzivov. Nato smo z metodo najmanjših kvadratov na podlagi povprečja površin kromatografskih vrhov iz osmih točk v območju od 10 do 2500 mg/L za vsak dan izdelali umeritveno premico za celotno koncentracijsko območje. Za nizko koncentracijsko območje smo upoštevali koncentracije od 10 do 100 mg/L ter prav tako izdelali umeritveno premico. Določili smo pripadajoče enačbe vseh umeritvenih premic in determinacijske koeficiente ( $R^2$ ). Kot spodnjo mejo sprejemljivosti smo določili  $R^2 > 0,9990$ .

#### **3.4.3 Ponovljivost**

Za vrednotenje dnevne ponovljivosti smo pripravili standardne raztopine AK po postopku 3.3.2.3. Za vsako od koncentracij (20, 200 in 2000 mg/L) smo tako imeli pripravljenih pet paralelk. Vsako paralelko smo dvakrat injicirali, razen prvo paralelko od vsake koncentracije, kjer smo vzorec injicirali šestkrat (ponovljivost injiciranja). Za posamezno

koncentracijo standardne raztopine AK smo primerjali stopnjo ujemanja odzivov petih paralelek v enem dnevu in tako ugotavljali dnevno ponovljivost. Ponovljivost injiciranja smo vrednotili pri vseh treh koncentracijah, in sicer pri paralelki, ki smo jo šestkrat injicirali. Rezultat smo podali kot RSD v %. Meja sprejemljivosti RSD je 5%.

Za določitev meddnevne ponovljivosti smo zgornji postopek ponovili še drugi in tretji dan ter primerjali stopnjo ujemanja med tremi zaporednimi dnevi.

#### 3.4.4 Točnost

Za vrednotenje točnosti smo uporabili iste kontrolne vzorce kot pri vrednotenju ponovljivosti. Iz enačbe umeritvene premice za nizko koncentracijsko območje smo izračunali koncentracijo standardne raztopine AK s koncentracijo 20 mg/L, tako da smo v enačbo vstavili izmerjen odziv. Za koncentraciji 200 in 2000 mg/L smo uporabili enačbo umeritvene premice za celotno koncentracijsko območje. Točnost smo nato izračunali s pomočjo enačbe 4, kjer je  $C_t$  dejanska,  $C_i$  pa izračunana koncentracija (42). Kot mejo sprejemljivosti smo določili interval [95-105].

$$\text{točnost (\%)} = C_i / C_t \times 100 \quad (\text{Enačba 4})$$

#### 3.4.5 Meja zaznavnosti

Mejo zaznavnosti smo izračunali iz Enačbe 5, kjer je  $\sigma$  standardni odklon vrednosti odsekov na ordinati in  $S$  povprečna vrednost naklonov umeritvenih premic (42).

$$\text{LOD} = (3,3 \times \sigma) / S \quad (\text{Enačba 5})$$

#### 3.4.6 Meja določitve

Mejo zaznavnosti smo izračunali iz Enačbe 6 (42).

$$\text{LOQ} = (10 \times \sigma) / S \quad (\text{Enačba 6})$$

### **3.4.7 Stabilnost vzorcev**

Stabilnost v avtomatskem vzorčevalniku smo vrednotili v dveh zaporednih dneh validacije. Vzorce AK s koncentracijami 20, 200 in 2000 mg/L smo analizirali v času 0, nato pa še po 24 urah. Vsak vzorec smo injicirali dvakrat. Rezultate smo podali kot razmerje odzivov po 24 urah glede na odziv v času 0. Določili smo, da upad ali porast ne sme biti večji od 5% glede na začetno vrednost odziva AK pri posamezni koncentraciji.

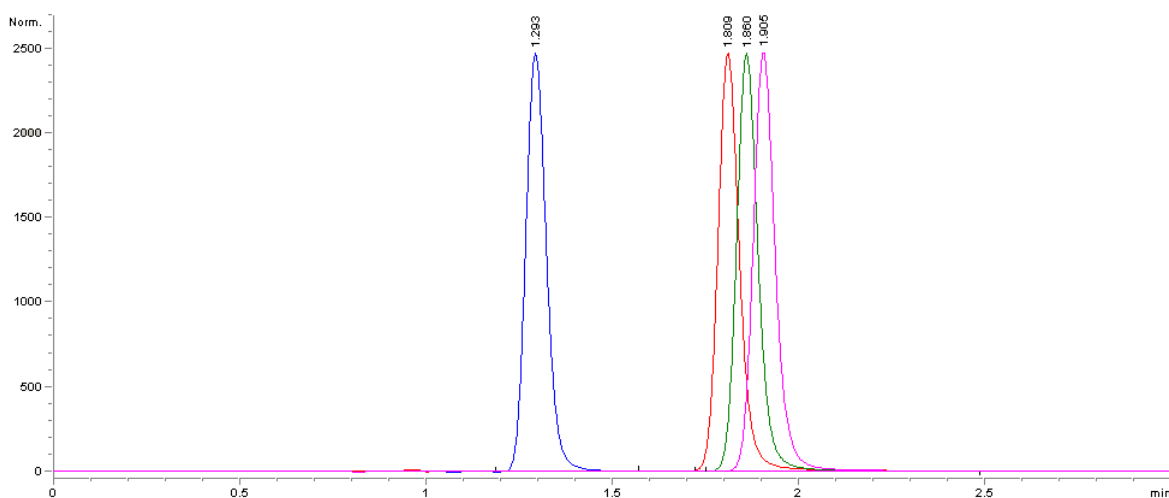
### **3.5 ODELAVA PODATKOV**

Rezultate, ki smo jih dobili z metodo HPLC, smo obdelali s pomočjo programske opreme Excel. S pomočjo Excela smo določili enačbe umeritvenih premic, izračunali povprečja meritev, standardne odklone, determinacijske koeficiente ( $R^2$ ), hitrostne konstante ter izrisali grafe. Excel je del programskega paketa Microsoft Office 2007.

## 4 REZULTATI

### 4.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA ANALIZNE METODE

Slika 5 prikazuje kromatograme AK, ki so bili posneti z metodami 3, 5, 6 in 7.

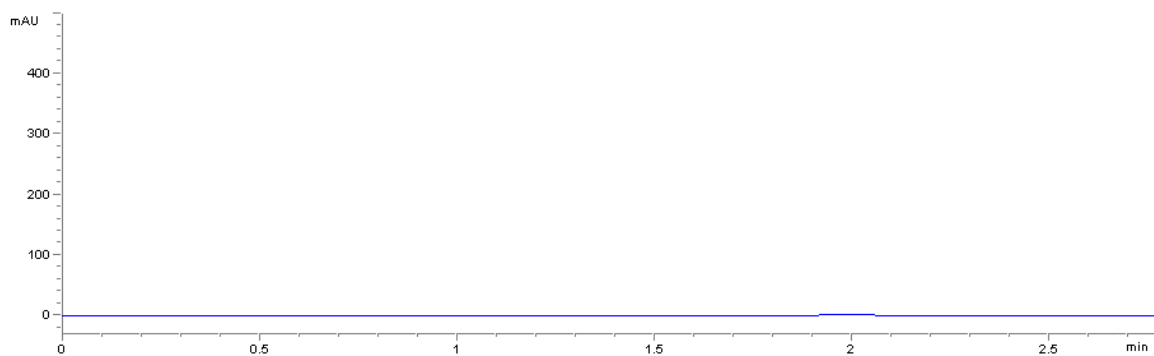


Slika 5: Kromatogrami posneti z metodo 3 (modra), 5 (rdeča), 6 (zelena) in 7 (roza)

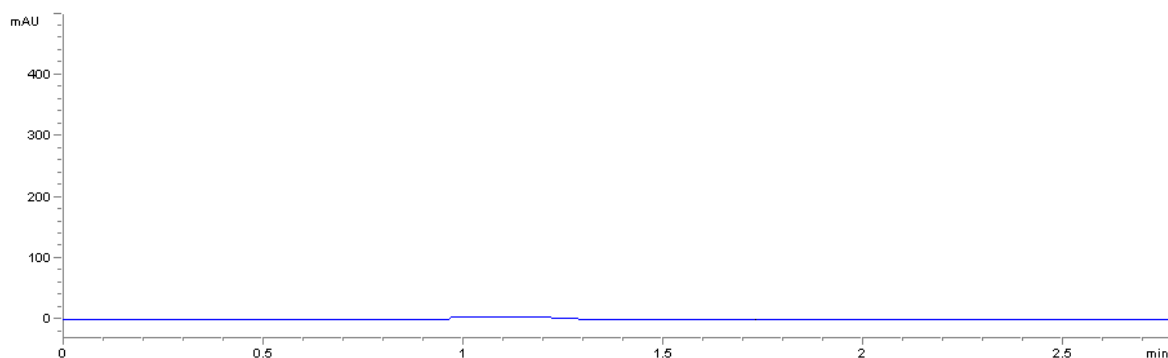
### 4.2 VREDNOTENJE HPLC METODE

#### 4.2.1 Selektivnost

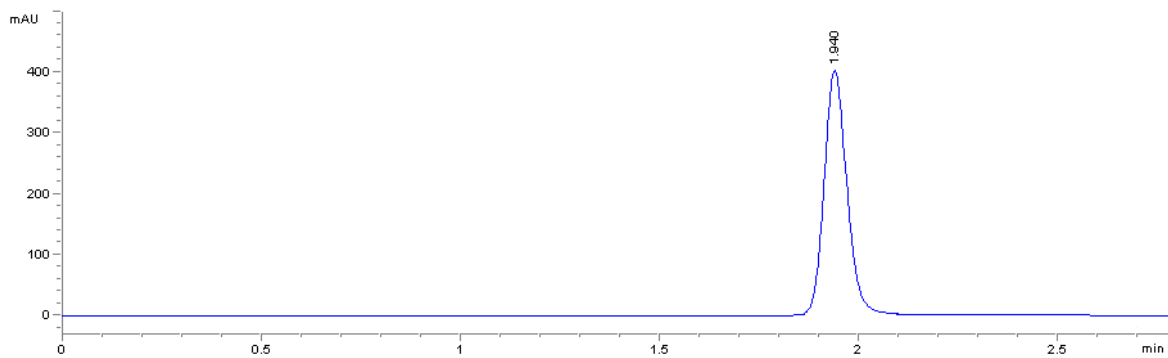
Selektivnost smo opredelili v skladu z metodo 3.4.1. Slike od 6 do 10 prikazujejo kromatograme destilirane vode, 1 mM EDTA, standarda AK (500 mg/L) ter pripravka D v časovnih točkah 0 in 9 dni. Iz dobljenih kromatogramov smo razbrali selektivnost metode, saj na Sliki 9 pri 1,9 minute vidimo kromatografski vrh AK, medtem ko je pri topilih odsoten (Sliki 6 in 7). Na Sliki 10 pri retencijskem času AK ni vrha, kar je pričakovano, saj je v roku devetih dni že vsa AK v pripravku oksidirala. S tem smo potrdili selektivnost metode za spremljanje pripravkov z AK, ker ni prisotnih interferenc pri retencijskem času AK.



**Slika 6: Kromatogram destilirane vode**

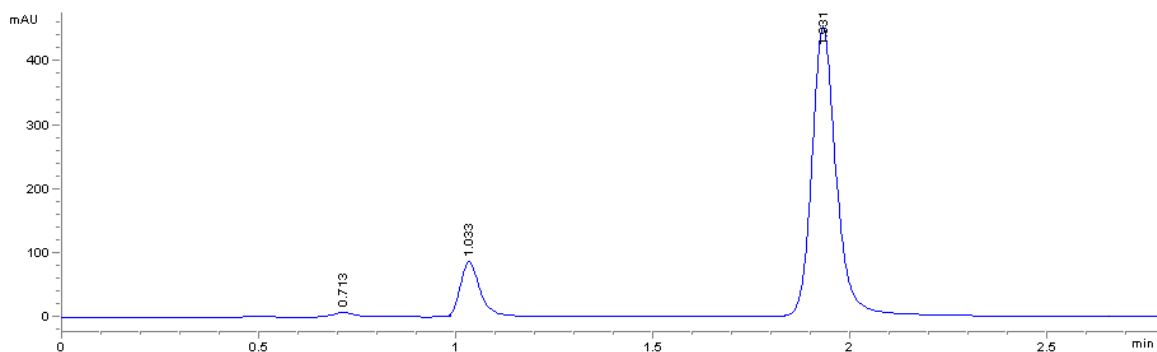


**Slika 7: Kromatogram 1 mM EDTA**

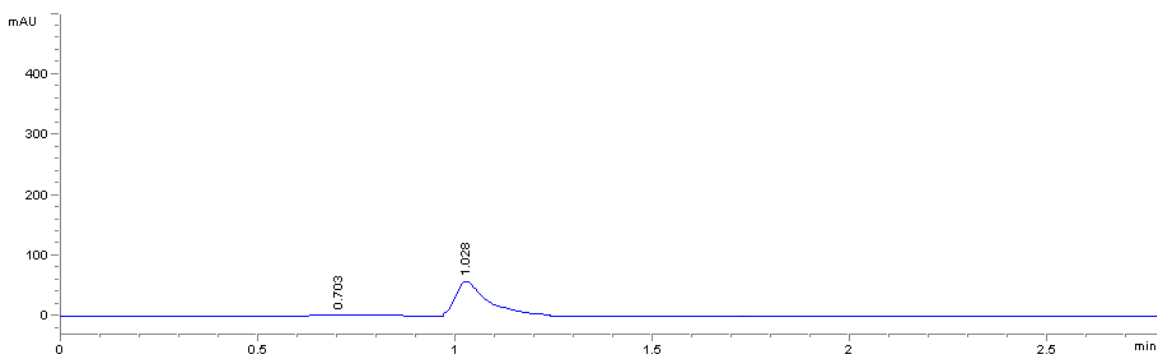


**Slika 8: Kromatogram standarda askorbinske kisline (500 mg/L), retencijski čas je 1,9 minut**





Slika 9: Kromatogram pripravka D v časovni točki 0 dni



Slika 10: Kromatogram pripravka D v časovni točki 9 dni

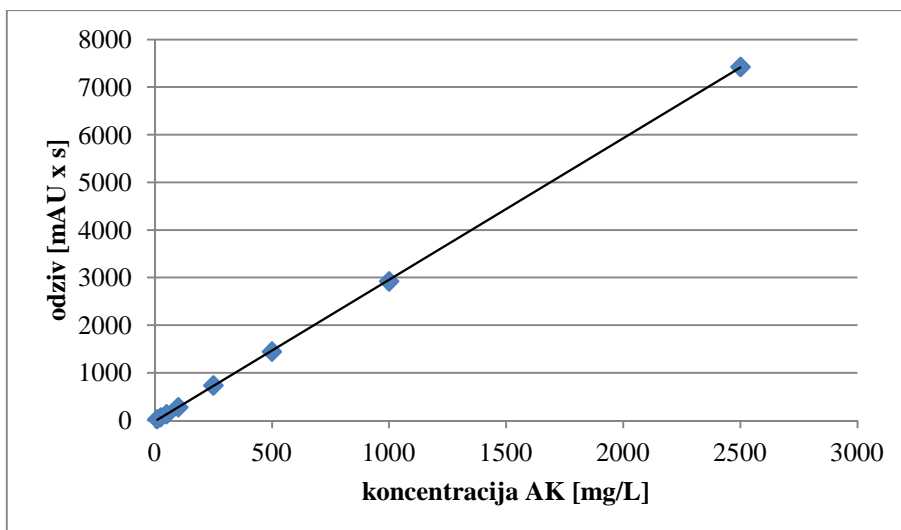
#### 4.2.2 Linearnost in območje linearnosti

Iz pridobljenih odzivov standardnih raztopin AK smo s pomočjo linearne regresije določili umeritveno premico in determinacijski koeficient (Preglednica VI). Glede na vrednost determinacijskega koeficienta lahko potrdimo, da je izbrana metoda linearna v območju med 10 mg/L in 2500 mg/L.

**Preglednica VI: Enačbe umeritvenih premic za askorbinsko kislino s pripadajočimi determinacijskimi koeficienti ( $R^2$ )**

dan	enačba premice	$R^2$
1	$y = 3.0562x - 4.2145$	1
2	$y = 2.9718x - 18.788$	1
3	$y = 3.0688x - 8.8077$	1
skupno	$y = 3.0323x - 10.6034$	1

Slika 11 prikazuje umeritveno premico za AK v 1 mM EDTA, ki je bila narejena drugi dan validacije. Enačba te umeritvene premice in pripadajoči  $R^2$  sta navedena v Preglednici VI.

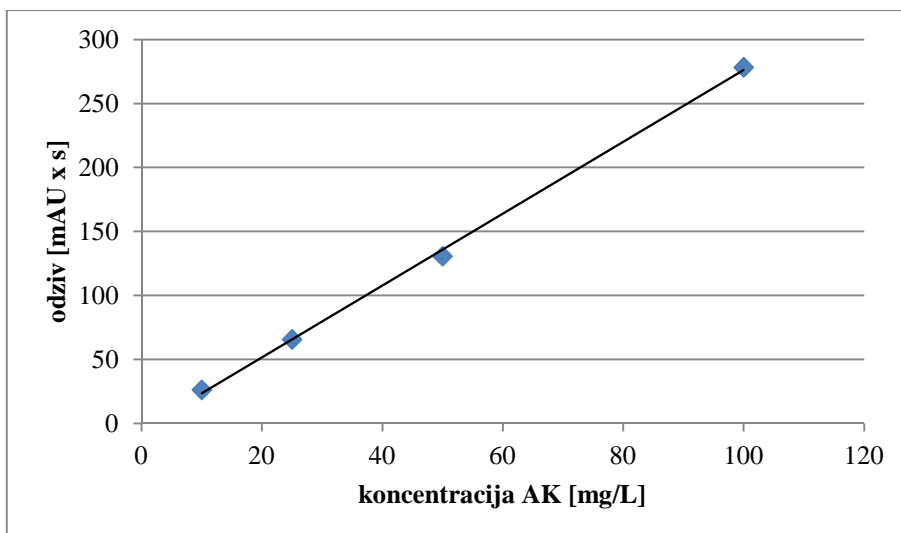


**Slika 11: Umeritvena premica za askorbinsko kislino v 1 mM EDTA v drugem dnevu validacije**

Z linearno regresijo smo za vsak dan validacije izdelali umeritveno premico tudi za nizko koncentracijsko območje. Upoštevali smo odzive vzorcev AK s koncentracijami od 10 do 100 mg/L. V Preglednici VII so navedene enačbe teh premic, na Sliki 12 pa je prikazana umeritvena premica za nizko koncentracijsko območje za drugi dan validacije.

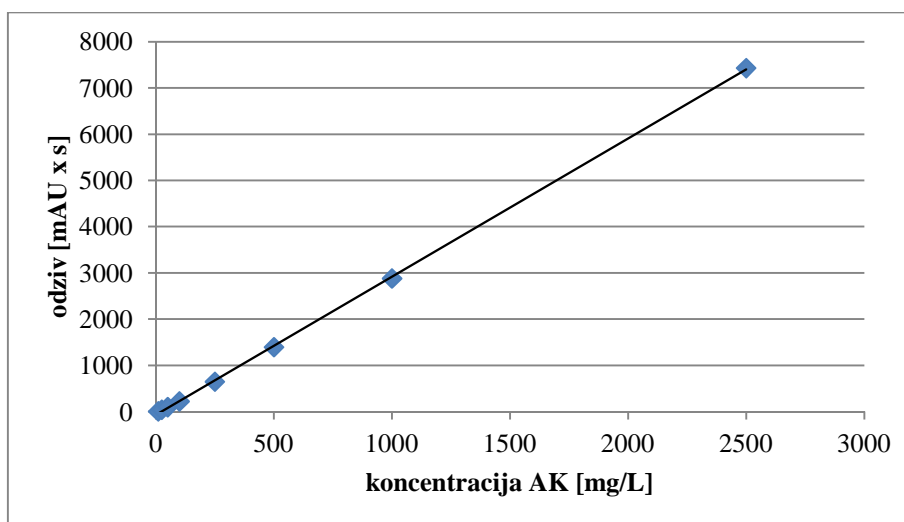
**Preglednica VII: Enačbe umeritvenih premic za askorbinsko kislino v 1 mM EDTA za nizko koncentracijsko območje s pripadajočimi determinacijskimi koeficienti ( $R^2$ )**

dan	enačba premice	$R^2$
1	$y = 3.1659x - 2.8093$	0.9991
2	$y = 2.8057x - 4.515$	0.9990
3	$y = 2.9911x - 2.7151$	0.9993
skupno	$y = 2.9876x - 3.3465$	0.9991



**Slika 12: Umeritvena premica za askorbinsko kislino v 1 mM EDTA za nizko koncentracijsko območje v drugem dnevu validacije**

Slika 13 prikazuje umeritveno premico za raztopino AK v destilirani vodi za koncentracijsko območje 10-2500 mg/L. V Preglednici VIII pa je prikazana točnost analizne metode za raztopine AK pripravljene brez 1 mM EDTA. Dobra točnost potrjuje linearnost metode.



**Slika 13: Umeritvena premica za raztopino askorbinske kisline brez EDTA**

**Preglednica VIII: Točnost HPLC metode za raztopino askorbinske kisline v destilirani vodi**

dejanska koncentracija [mg/L]	izračunana koncentracija [mg/L]	točnost [%]
10	10.22	102.16
25	24.92	99.70
50	48.39	96.77
100	99.25	99.25
250	238.13	95.25
500	487.35	97.47
1000	983.83	98.38
2500	2510.62	100.42
povprečna vrednost		98.68±2.19

### 4.2.3 Točnost in ponovljivost

#### 4.2.3.1 Dnevna točnost in ponovljivost

Pri vseh treh koncentracijah kontrolnih vzorcev je bil RSD odziva nižji od 5%, zato smo lahko potrdili ponovljivost metode (Preglednica IX). Naša metoda je zagotavlja tudi točne rezultate, saj je bila povprečna vrednost točnosti v dovoljenih mejah [95% - 105%]. Tudi ponovljivost injiciranja je bila dobra, saj je bil RSD pri vseh treh koncentracijah nižji od 5% (Preglednica IX).

**Preglednica IX: Ponovljivost in točnost HPLC metode znotraj enega dneva**

dejanska koncentracija [mg/L]	povprečje odziva	odstopanje odziva izraženo z RSD [%]	izračunana koncentracija [mg/L]	točnost [%]	ponovljivost injiciranja izražena z RSD [%]
20	53.5	1.79	20.69	103.47	2.42
200	594.4	0.89	205.87	102.94	0.41
2000	6137.0	0.29	2071.64	103.58	0.40
povprečna vrednost		0.99±0.75		103.33±0.34	1.08±1.16

#### 4.2.3.2 Meddnevna točnost in ponovljivost

Pri določanju meddnevne ponovljivosti je bil pri kontrolnih vzorcih RSD največ 2,33% (Preglednica X), zato smo lahko potrdili meddnevno ponovljivost. Naša metoda zagotavlja tudi meddnevno točnost (Preglednica X), saj je povprečna vrednost znotraj dovoljenega intervala [95% - 105%].

**Preglednica X: Meddnevna ponovljivost in točnost HPLC metode**

dejanska koncentracija [mg/L]	povprečje odziva	odstopanje odziva izraženo z RSD [%]	izračunana koncentracija [mg/L]	točnost [%]
20	52.28	2.33	20.24	101.20
200	589.45	0.73	204.67	102.34
2000	6043.34	1.38	2039.88	102.00
povprečna vrednost		1.48±0.80		101.85±0.59

#### 4.2.5 Meja zaznavnosti in meja določitve

Iz podatkov, ki so prikazani v Preglednici VII, smo izračunali povprečno vrednost naklonov umeritvenih premic ( $S = 2,9876$ ) ter standardni odklon vrednosti odsekov na ordinati ( $\sigma = 1,0131$ ).

$$LOQ = (10 \times \sigma)/S = (10 \times 1,0131)/2,9876 = 3,39 \text{ mg/L}$$

$$LOD = (3,3 \times \sigma)/S = (3,3 \times 1,0131)/2,9876 = 1,12 \text{ mg/L}$$

Pri izbranih pogojih HPLC metode je meja zaznavnosti AK 1,12 mg/L, meja določitve pa 3,39 mg/L.

#### 4.2.6 Stabilnost vzorcev

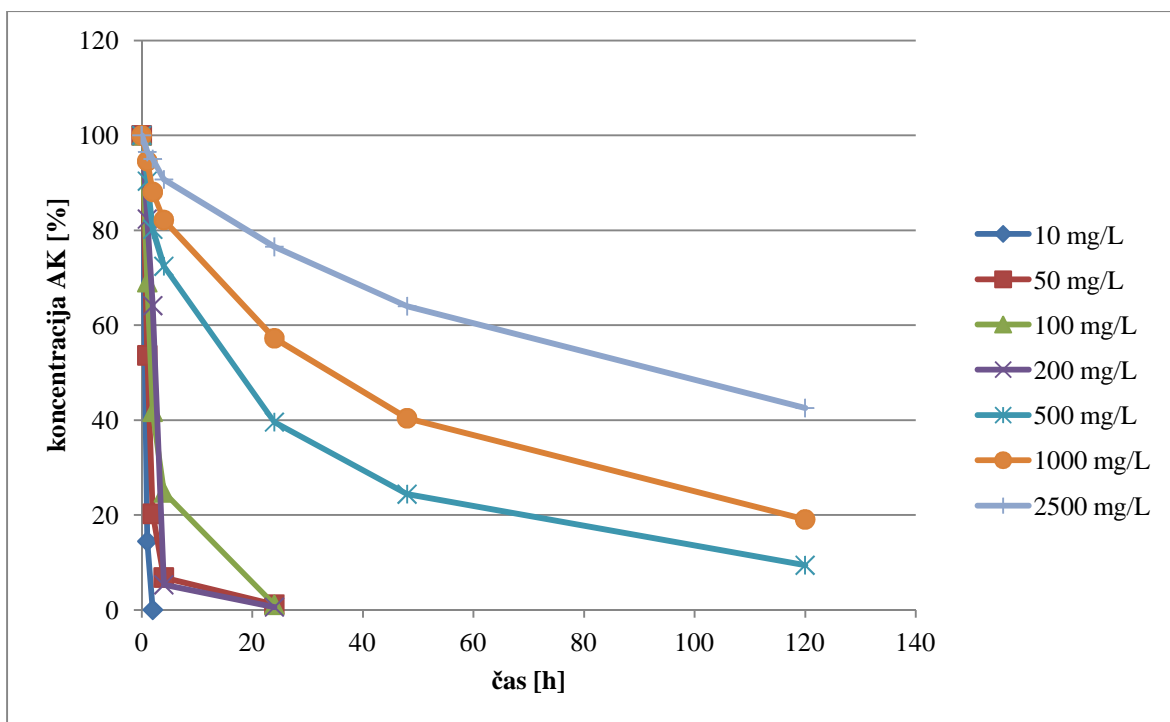
V Preglednici XI je prikazana stabilnost kontrolnih vzorcev s koncentracijami 20, 200 in 2000 mg/L v času 0 in 24 ur. Stabilnost vzorcev je ustrezna, saj upad oziroma porast koncentracije AK glede na začetno vrednost ni nikjer večji od 5%.

**Preglednica XI: Prikaz stabilnosti kontrolnih vzorcev**

koncentracija [mg/L]	čas [h]	
	0	24
20	100.00	98.87
200	100.00	103.11
2000	100.00	100.80
povprečna vrednost [%]		100.93±2.12

**4.3 STABILNOST STANDARDA ASKORBINSKE KISLINE****4.3.1 Stabilnost askorbinske kisline pri različnih koncentracijah**

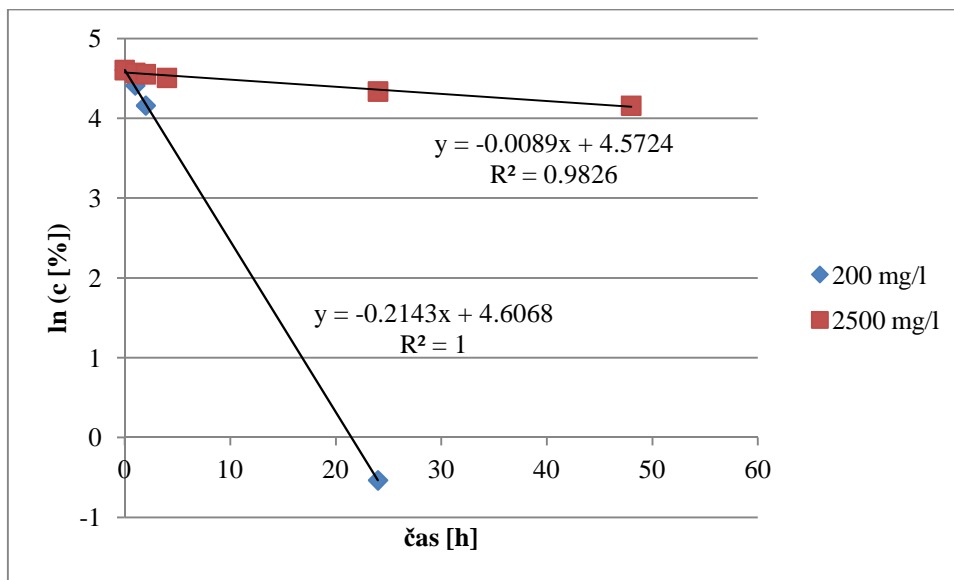
Na Sliki 14 je predstavljena stabilnost raztopine AK pri koncentracijah 10, 50, 100, 200, 500, 1000 in 2500 mg/L. Raztopine AK so bile pripravljene v destilirani vodi in shranjene na 25°C.



Slika 14: Upad vsebnosti askorbinske kisline pri različnih koncentracijah glede na čas

## DOLOČITEV REDA REAKCIJE

Slika 15 prikazuje izračun konstante reakcijske hitrosti 1. reda v primeru koncentracij 200 mg/L in 2500 mg/L.



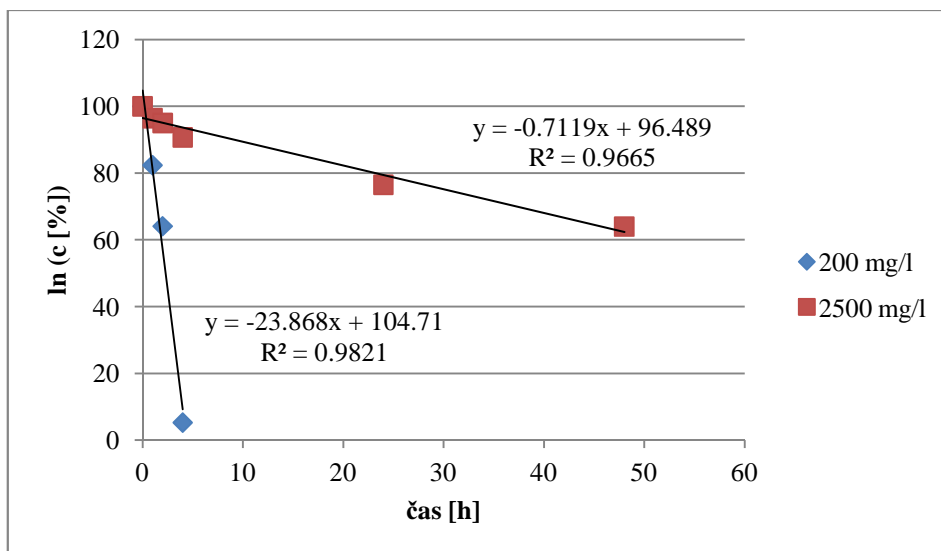
Slika 15: Premici za 1. red za koncentraciji 200 in 2500 mg/L

V Preglednici XII so navedene konstante reakcijske hitrosti za vse koncentracije AK določene v skladu s kinetiko 1. reda.

Preglednica XII: Enačbe premic za 1. red s pripadajočimi determinacijskimi koeficienti ( $R^2$ ) in konstantami reakcijske hitrosti

koncentracija	enačba premice za 1. red	$R^2$	konstanta reakcijske hitrosti [ $h^{-1}$ ]
10	$y = -1.9349x + 4.6052$	1	1.9349
50	$y = -0.6835x + 4.5741$	0.9867	0.6835
100	$y = -0.1572x + 4.1864$	0.989	0.1572
200	$y = -0.2143x + 4.6068$	1	0.2143
500	$y = -0.0282x + 4.4797$	0.9691	0.0282
1000	$y = -0.0181x + 4.5365$	0.9789	0.0181
2500	$y = -0.0089x + 4.5724$	0.9826	0.0089

Slika 16 prikazuje izračun konstante reakcijske hitrosti 0. reda v primeru koncentracij 200 mg/L in 2500 mg/L.



Slika 16: Premici za 0. red za koncentraciji 200 in 2500 mg/L

V Preglednici XIII so navedene konstante reakcijske hitrosti določene v skladu s kinetiko 0. reda.

**Preglednica XIII: Enačbe premic za 0. red s pripadajočimi determinacijskimi koeficienti ( $R^2$ ) in konstantami reakcijske hitrosti**

koncentracija	enačba premice za 0. red	$R^2$	konstanta reakcijske hitrosti [ $h^{-1}$ ]
10	$y = -50x + 88.148$	0.8557	50.000
50	$y = -22.27x + 84.143$	0.8391	22.270
100	$y = -18.355x + 91.018$	0.9069	18.355
200	$y = -23.868x + 104.71$	0.9821	23.868
500	$y = -2.1783x + 90.009$	0.8980	2.1783
1000	$y = -1.1699x + 92.474$	0.9371	1.1699
2500	$y = -0.7119x + 96.489$	0.9665	0.7119

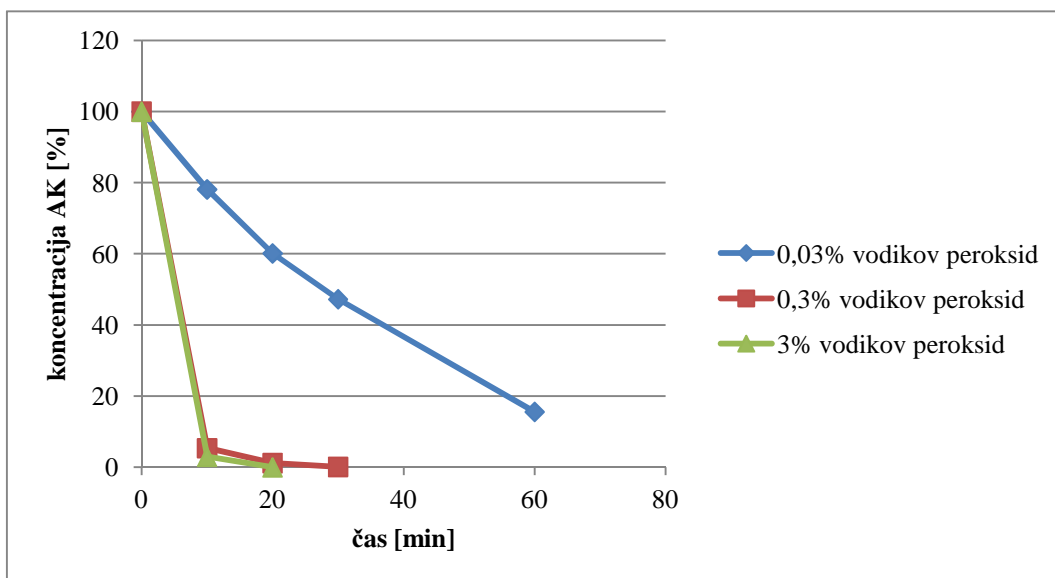
Na osnovi determinacijskih koeficientov ( $R^2$ ) za 1. in 0. red smo se odločili, da bomo za opis hitrosti reakcije AK uporabili konstanto reakcijske hitrosti 1. reda.

#### 4.3.2 Stabilnost askorbinske kisline v prisotnosti vodikovega peroksida

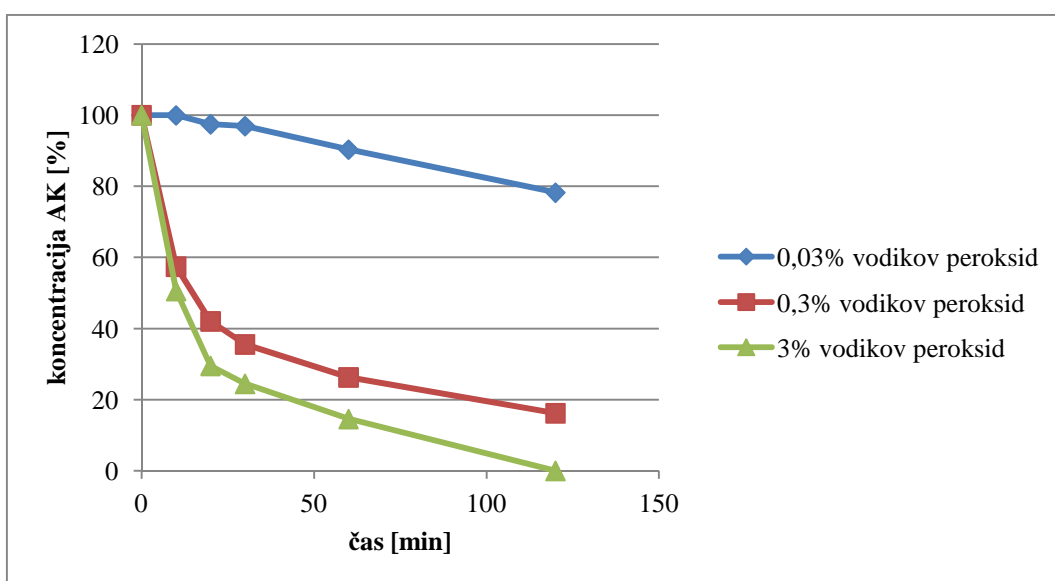
Stabilnost AK v prisotnosti vodikovega peroksida smo proučevali pri koncentracijah AK 10, 100 in 1000 mg/L. Raztopine AK smo pripravili v destilirani vodi, prav tako smo z destilirano vodo redčili vodikov peroksid. Vse pripravljene raztopine smo shranjevali pri 25°C. Pri koncentraciji AK 10 mg/L je vsa AK oksidirala že po desetih minutah pri vseh treh koncentracijah vodikovega peroksida. Na Slikah 17 in 18 pa je prikazan upad



vsebnosti AK v raztopinah s koncentracijama 100 in 1000 mg/L v prisotnosti 0,03%, 0,3% ter 3% vodikovega peroksida.



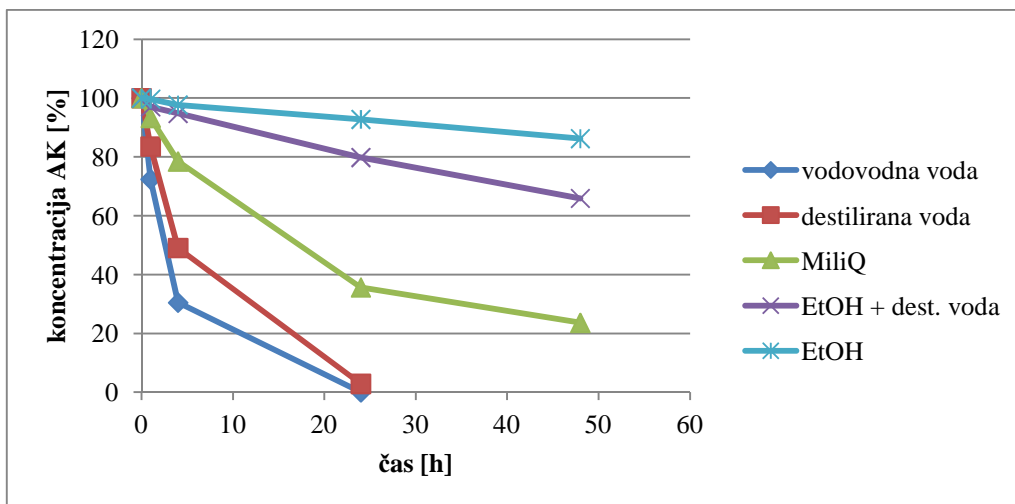
Slika 17: Upad vsebnosti askorbinske kisline v raztopini s koncentracijo 100 mg/L pri različnih koncentracijah vodikovega peroksida



Slika 18: Upad vsebnosti askorbinske kisline v raztopini s koncentracijo 1000 mg/L pri različnih koncentracijah vodikovega peroksida

### 4.3.3 Stabilnost askorbinske kisline v različnih medijih

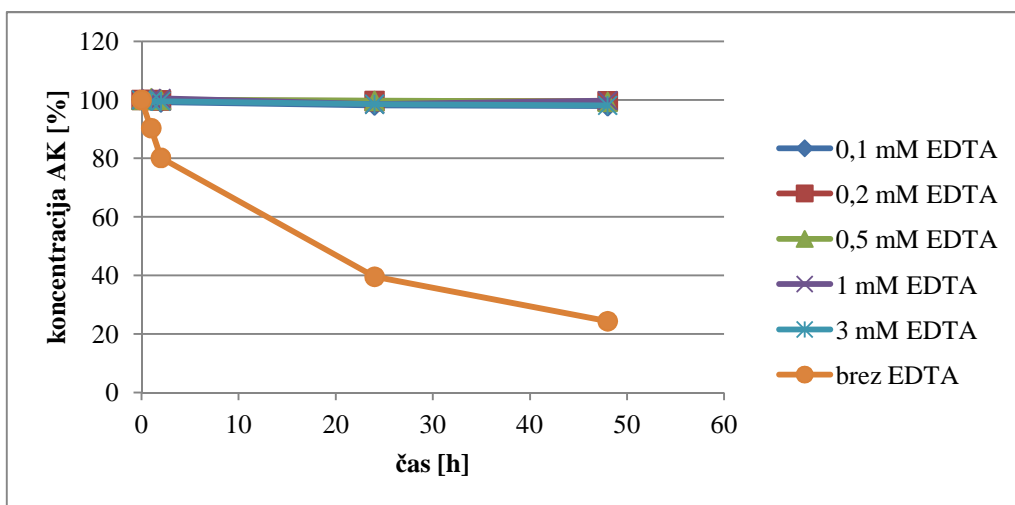
Na Sliki 19 je predstavljena stabilnost AK (500 mg/L) raztopljene v naslednjih medijih: v vodovodni vodi, destilirani vodi, MiliQ vodi, 50% etanolu ter v absolutnem etanolu. Raztopine AK smo shranjevali pri 25°C.



Slika 19: Upad vsebnosti askorbinske kisline (500 mg/L) v različnih medijih glede na čas

### 4.3.4 Stabilnost askorbinske kisline v prisotnosti EDTA

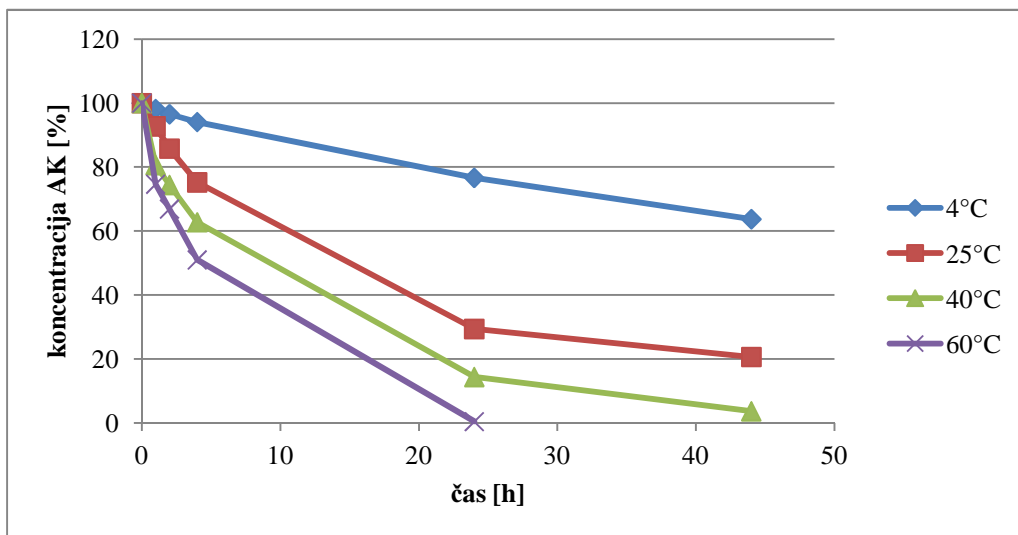
Slika 20 prikazuje stabilnost raztopine AK (500 mg/L) v prisotnosti različnih koncentracij EDTA in stabilnost raztopine brez dodatka EDTA. Raztopine AK smo shranjevali pri 25°C.



Slika 20: Stabilnost askorbinske kisline (500 mg/L) v prisotnosti EDTA in brez EDTA

### 4.3.5 Stabilnost askorbinske kisline pri različnih temperaturah

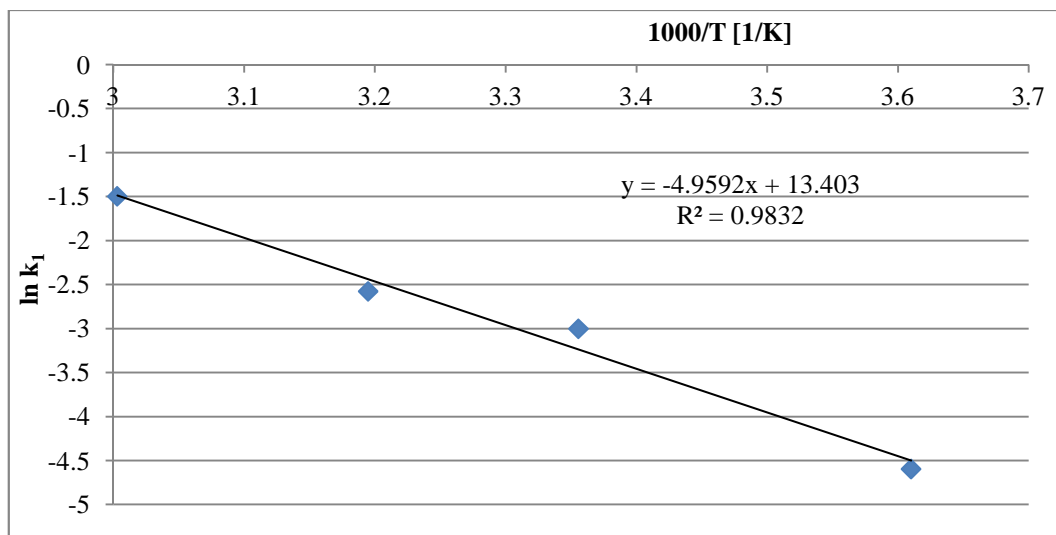
Določili smo vpliv temperature na stabilnost AK v destilirani vodi (Slika 21) in izračunali Arrheniusovo odvisnost hitrosti oksidacije od temperature (Preglednica XIV in Slika 22). Ugotovili smo, da je aktivacijska energija oksidacije AK ~ 41 kJ/mol.



Slika 21: Vpliv temperature na stabilnost askorbinske kisline (500 mg/L) v vodni raztopini

Preglednica XIV: Podatki za izdelavo Arrheniusovega grafa odvisnosti kinetike hitrosti oksidacije od recipročne absolutne temperature

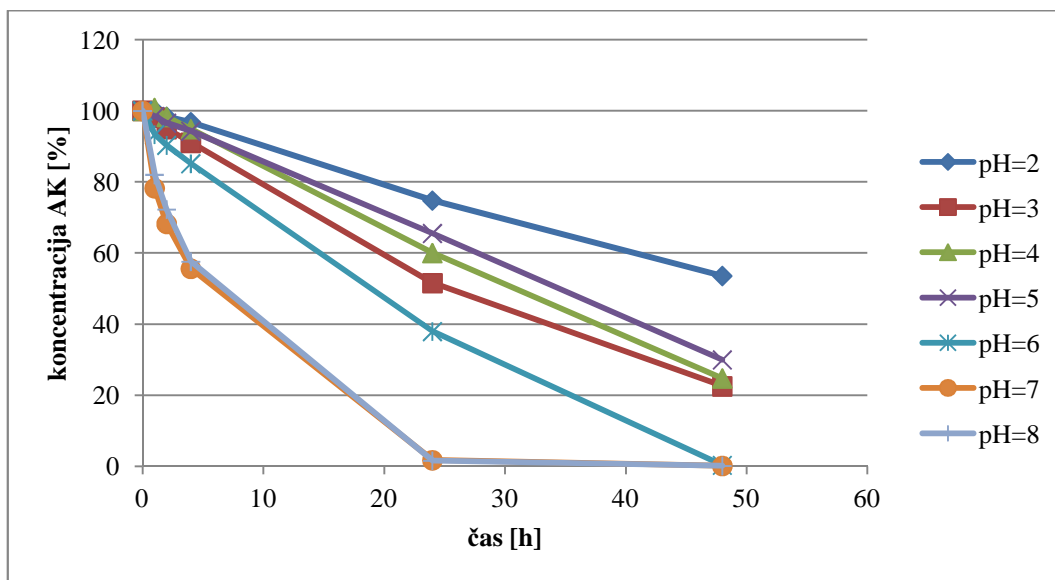
temperatura		1/T [K <sup>-1</sup> ]	enačba premice	R <sup>2</sup>	k <sub>1</sub> [h <sup>-1</sup> ]	ln k <sub>1</sub>
[°C]	[K]					
4	277	0.003610	y = -0.0101x + 4.5933	0.9976	0.0101	-4.595
25	298	0.003356	y = -0.0497x + 4.5661	0.9959	0.0497	-3.002
40	313	0.003195	y = -0.0761x + 4.4713	0.9967	0.0761	-2.576
60	333	0.003003	y = -0.2239x + 4.5970	0.9997	0.2239	-1.497



Slika 22: Arrheniusov graf vpliva temperature na hitrost oksidacije askorbinske kisline

#### 4.3.6 Stabilnost askorbinske kisline pri različnih pH-jih

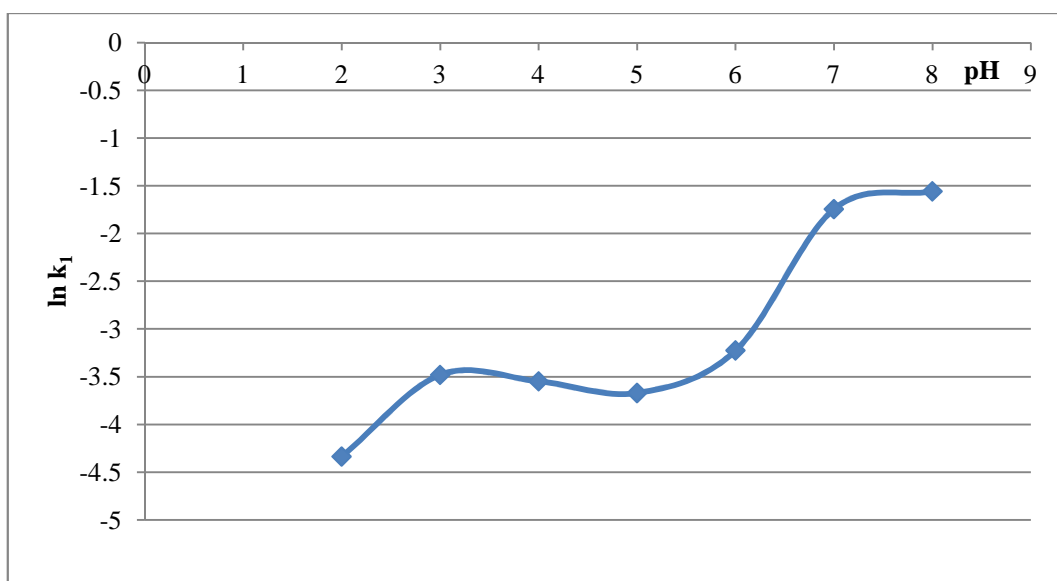
Spremljali smo upad AK v raztopinah z različnimi pH vrednostmi v časovnih točkah 0, 1, 2, 4, 24 in 48 ur (Slika 23). Iz podatkov, ki smo jih dobili z analizo vzorcev, smo določili premice s pripadajočimi enačbami in determinacijskimi koeficienti za prvi red reakcije (Preglednica XV). Na Sliki 24 je prikazan pH profil AK pri 25°C.



Slika 23: Vpliv pH na hitrost oksidacije askorbinske kisline (500 mg/L)

**Preglednica XV: Izračunane enačbe premic ter hitrostne konstante 1. reda oksidacije askorbinske kisline pri različnih pH-jih**

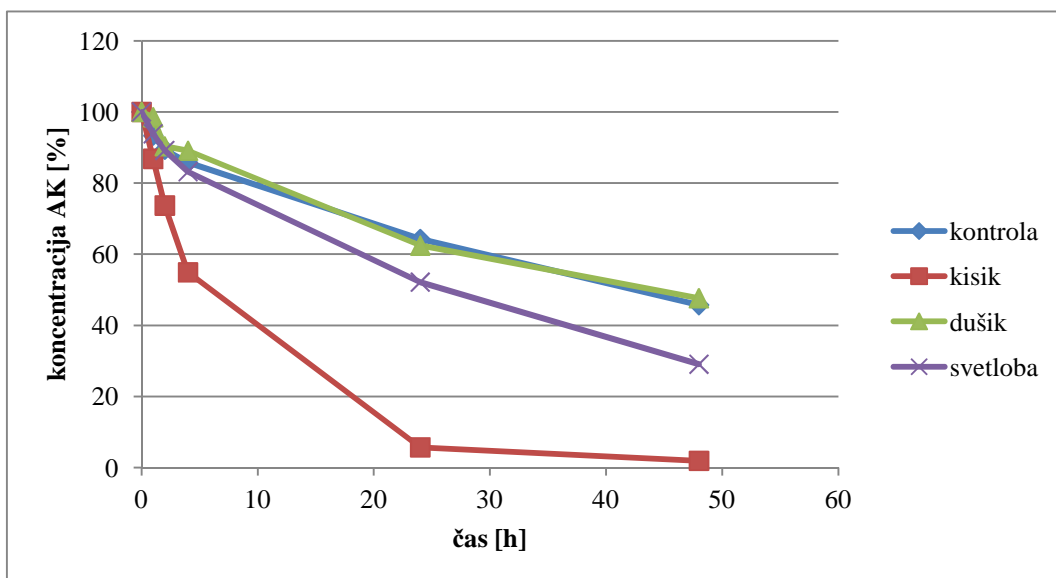
pH	enačba premice	$R^2$	$k_1$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	$\ln k_1$
2	$y = -0.0131x + 4.6173$	0.9987	0,0131	-4.33514
3	$y = -0.0308x + 4.6251$	0.9973	0.0308	-3.48024
4	$y = -0.0288x + 4.6564$	0.9847	0.0288	-3.54738
5	$y = -0.0255x + 4.6086$	0.9996	0.0255	-3.66908
6	$y = -0.0398x + 4.5916$	0.999	0.0398	-3.22389
7	$y = -0.1749x + 4.6284$	0.9976	0.1749	-1.74354
8	$y = -0.2107x + 4.6975$	0.9969	0.2107	-1.55732



**Slika 24: pH profil askorbinske kisline pri 25°C**

#### **4.3.7 Stabilnost askorbinske kisline v prisotnosti kisika, dušika in svetlobe**

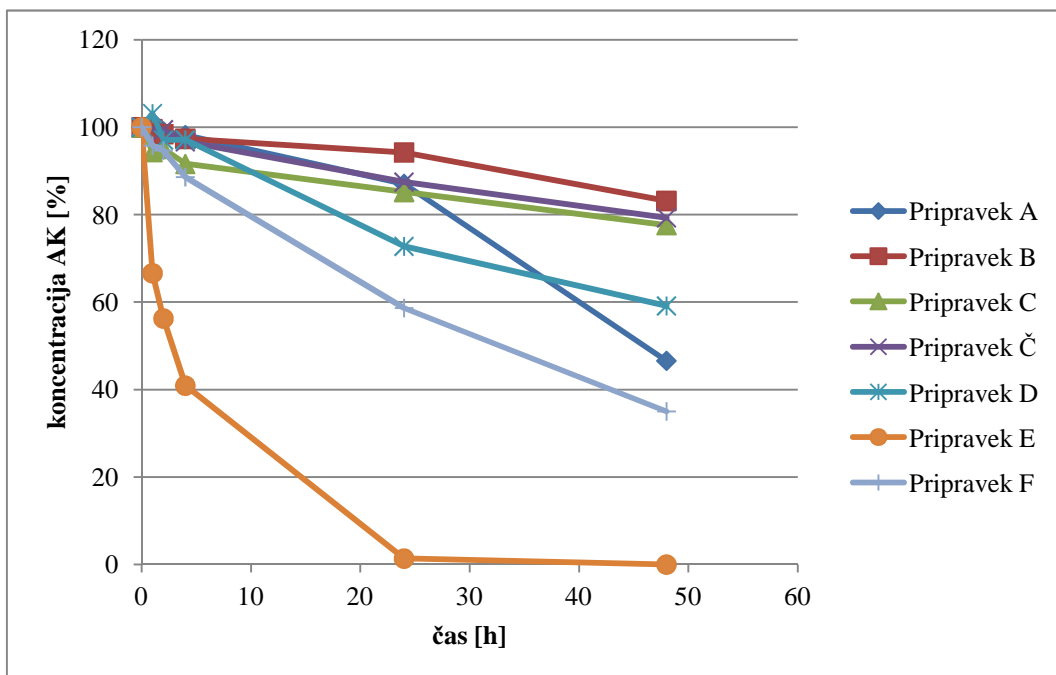
Na Sliki 25 je predstavljen upad vsebnosti AK v raztopini preprihani s kisikom, v raztopini preprihani z dušikom, v raztopini izpostavljeni svetlobi ter v kontrolnem vzorcu, ki je bil zaščiten pred svetlobo in ga nismo preprihovali. Vzorce smo shranjevali pri 25°C.



Slika 25: Upad vsebnosti askorbinske kisline (500 mg/L) v raztopini prepihani s kisikom, v raztopini prepihani z dušikom, v raztopini izpostavljeni svetlobi ter v kontrolni raztopini

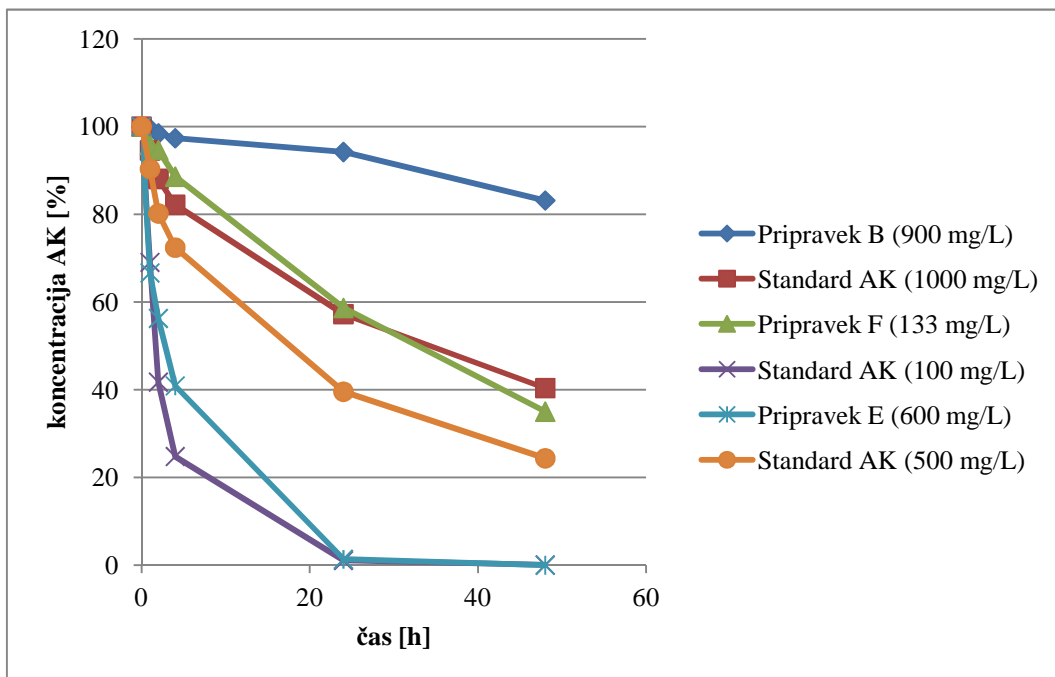
#### 4.4 STABILNOST ASKORBINSKE KISLINE V PRIPRAVKIH

Na Sliki 26 je predstavljena stabilnost AK v prehranskih dopolnilih od A do E ter v zdravilu F. Raztopine pripravkov smo shranjevali pri 25°C, pripravili pa smo jih v skladu s postopkom 3.3.4.



Slika 26: Stabilnost askorbinske kisline v vodnih raztopinah pripravkih

Na Sliki 27 je predstavljena primerjava stabilnosti AK v pripravkih B, E in F s standardi AK s koncentracijami 100, 500 in 1000 mg/L.



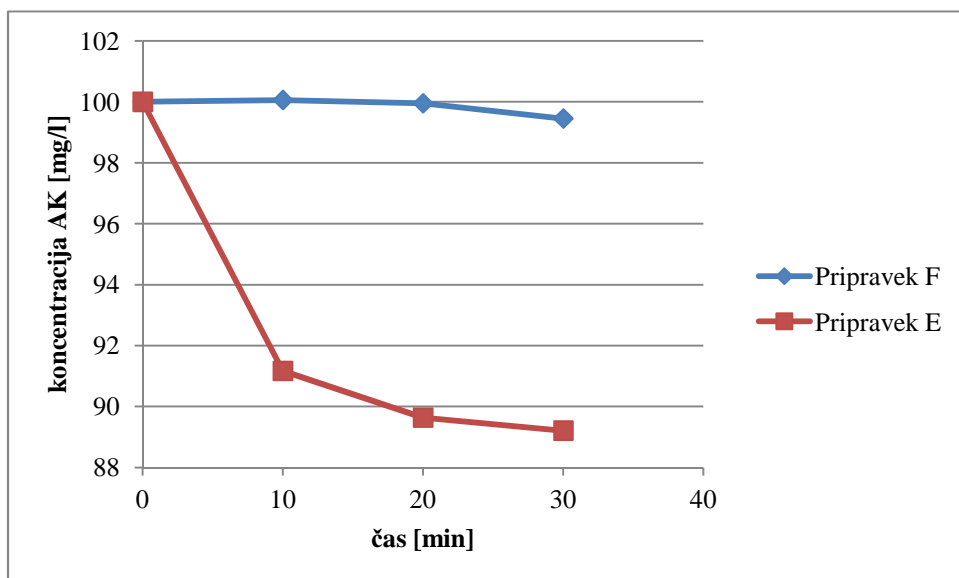
Slika 27: Stabilnost askorbinske kisline v pripravkih B, E in F ter standardov AK s koncentracijami 100, 500 in 1000 mg/L

V Preglednici XVI so navedene deklarirane in določene koncentracije AK v posameznih pripravkih. Koncentracijo AK smo izračunali iz enačbe umeritvene premice, ki smo jo izdelali kot je opisano v poglavju 3.3.4.

Preglednica XVI: Deklarirane in določene koncentracije pripravkov

pripravek	deklarirana koncentracija [mg/L]	določena koncentracija [mg/L]
A	900	926
B	900	843
C	600	696
Č	600	653
D	500	596
E	600	631
F	133	152

Na Sliki 28 je predstavljen upad vsebnosti AK v pripravkih E in F, ki sta bila pripravljena z vrelo vodo, saj je za ta dva pripravka navodilo na ovojnicini dovoljevalo pripravo toplega napitka.



Slika 28: Stabilnost askorbinske kisline v pripravkih E in F, ki sta bila pripravljena z vrelo vodo



## 5 RAZPRAVA

AK je zelo nestabilna v vodnih raztopinah, medtem ko je stabilnost AK v trdnih farmacevtskih oblikah zelo dobra (32-34). AK v raztopini hitro oksidira do dehidroaskorbinske kisline in naprej do diketoglukonske kisline, ki pa ni biološko aktivna. Oksidacijo lahko sprožijo povišana temperatura, visok pH, svetloba, kisik ter prisotnost kovinskih ionov (33,34). Na stabilnost AK vplivajo tudi koncentracija AK v raztopini, morebitni prisotni oksidanti ter medij, v katerem je AK raztopljen.

V okviru diplomske naloge smo najprej razvili HPLC metodo za določanje vsebnosti AK v stabilnostnih študijah. HPLC metodo smo nato validirali po ICH smernicah in jo uporabili za vrednotenje stabilnosti AK. Raziskovali smo vpliv zgoraj omenjenih dejavnikov na stabilnost standarda AK v vodni raztopini, preverili smo stabilnost AK v pripravkih, ki se pred uporabo raztapljajo v vodi, ter določili tudi vsebnost AK v teh pripravkih.

### 5.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA HPLC METODE

AK je majhna polarna molekula, zaradi česar se slabše zadržuje na reverzno-faznih kolonah (33). V okviru razvoja metode smo najprej uporabili reverzno-fazno kolono Luna C18(2). Volumen injiciranja (10  $\mu$ L), pretok (1 mL/min) ter valovna dolžina detekcije (254 nm) so bili enaki pri metodah 1, 2, 3 in 4. Pri vsaki od metod smo spreminjali le delež organske faze v mobilni fazi (Preglednica III), in sicer od 20 do 0%, saj smo s tem želeli povečati zadrževanje AK na koloni. Kljub temu da so se retencijski časi ( $t_r$ ) AK od metode 1 proti metodi 3 nekoliko podaljševali, je bila ločljivost med AK in topilom zelo slaba. Pri metodi 4 smo delež organske faze zmanjšali na 0%. Dobili smo zadovoljiv  $t_r$  AK in dobro ločljivost, vendar takšna sestava mobilne faze pri daljši uporabi uniči stacionarno fazo kolone.

Zato smo se odločili, da preizkusimo še kolono z bolj polarno stacionarno fazo. Takšna kolona je Luna NH<sub>2</sub>, kjer so amino skupine vezane na slikagel in služijo kot šibki anionski izmenjevalec. Zaradi polarnih amino skupin se polarni analiti dlje časa zadržujejo na koloni (43). Pri metodah 5, 6 in 7 smo zmanjševali delež organske faze od 20 do 5%, da bi povečali zadrževanje AK na koloni. Glede na prvotno metodo smo prilagodili nekatere

parametre, in sicer: temperaturo kolone smo nastavili na 50°C, pretok mobilne faze znižali na 0,8 mL/min ter zmanjšali volumen injiciranja na 1 µL. Naštete parametre smo spremenili zaradi visokega tlaka na tej koloni, ki je posledica zelo majhnih delcev stacionarne faze (3µm). Retencijski čas se je povečeval od metode 5 proti metodi 7. Pri metodi 7 je bil  $t_r$  AK 1,9 minute (Slika 5). Elucijo topila na izbranih kolonah smo vrednotili preko cisteina, ki se zaradi velike polarosti ne zadrži na koloni in ima  $t_r$  1,1 minute pri metodah 5-7. Metoda 7 je tako zagotavljala dobro ločljivost fronte topila in AK, zato smo jo v nadaljevanju uporabili za vrednotenje HPLC metode.

## 5.2 VREDNOTENJE HPLC METODE

V skladu z ICH smernicami za validacijo analizne metode smo preverjali primernost analizne metode za določanje AK v stabilnostnih študijah. Priprava vzorcev za validacijo je opisana v poglavju 3.3.2, parametri validacije pa v poglavju 3.4.

Validacija je dokumentiran postopek dokazovanja, ki z veliko stopnjo zaupanja zagotavlja ustreznost metode, da ta daje zanesljive rezultate. Validacijo moramo izvesti v celoti oz. delno ob vsaki spremembi analizne metode. Obseg validacije je odvisen od kategorije analizne metode in je podan v smernicah ICH (42). V okviru diplomske naloge smo izvajali validacijo razvite HPLC metode v treh zaporednih dneh. Opredelili smo selektivnost, linearnost, območje linearnosti, točnost in ponovljivost, mejo zaznavnosti, mejo določitev ter stabilnost vzorcev.

Z namenom ustreznega vrednotenja analizne metode smo vzorce za validacijo pripravljali v 1 mM EDTA, ki kompleksira kovinske ione. Kovinski ioni so namreč znani destabilizator AK.

Selektivnost analizne metode je njena sposobnost, da analizira točno določen analit ob prisotnosti ostalih komponent v vzorcu. Metoda je selektivna, kadar so kromatografski vrhovi na kromatogramu analiziranega vzorca jasno ločeni in se ne prekrivajo med seboj (42). Selektivnost analizne metode smo preverili s primerjavo kromatogramov destilirane vode, 1 mM EDTA, standarda AK ter pripravka D v času 0 in 9 dni (Slike 6-10). Iz kromatograma standarda AK (Slika 8) lahko vidimo, da ima naš analit  $t_r$  pri 1,9 minute. Ugotovili smo, da se pri  $t_r$  našega analita ne eluira nobena druga komponenta (Sliki 6 in 7).

Na kromatogramu pripravka D v času 0 dni je lepo viden vrh AK (Slika 9), ki pa po devetih dneh izgine (Slika 10), saj v tem času vsa AK oksidira. S tem se je naša metoda izkazala tudi kot stabilnostno indikativna za vrednotenje vsebnosti AK v pripravkih, ki so bili predmet naše stabilnostne študije.

Linearnost analizne metode je njena sposobnost, da znotraj določenega območja zagotavlja rezultate, ki so neposredno ali posredno (preko ustreznega matematičnega modela) premosorazmerni s koncentracijo analita v vzorcu. Linearnost razmerja med obema spremenljivkama preverimo s pomočjo regresijske premice, ki jo določimo z metodo najmanjših kvadratov. Rezultat regresijske analize je umeritvena premica z enačbo  $y = bx + a$  ( $y$  = odziv,  $b$  = naklon premice,  $x$  = koncentracija analita,  $a$  = odsek na ordinati). Korelacijo med odzivom in koncentracijo podajamo z determinacijskim koeficientom ( $R^2$ ), ki ima pri popolni linearni povezavi vrednost 1 (42). Linearnost analizne metode smo potrdili na osnovi  $R^2$  umeritvenih premic za raztopino AK v 1 mM EDTA. Enačbe umeritvenih premic in pripadajoče koeficiente korelacije smo določili za območje od 10 mg/L do 2500 mg/L (Preglednica VI, Slika 11). Zaradi širokega razpona koncentracij bi bila točnost pri nizkih koncentracijah slabša, zato smo umeritvene premice ter  $R^2$  določili tudi za območje od 10 mg/L do 100 mg/L (Preglednica VII, Slika 12). Ker je bil  $R^2$  povsod večji od 0,999, lahko potrdimo linearnost metode. Linearnost smo nato preverili še za raztopino AK v destilirani vodi (Slika 13). Dobili smo primerljive rezultate s predhodnimi z EDTA. Hkrati je tudi točnost metode skozi celotno koncentracijsko območje dobra (Preglednica VIII), kar pomeni, da je naša metoda primerna za spremljanje AK v stabilnostnih študijah.

Območje linearnosti analizne metode je interval med spodnjo in zgornjo koncentracijo, znotraj katerega analizna metoda zagotavlja rezultate z ustrežno natančnostjo, točnostjo in linearnostjo. Običajno se območje določi iz linearnosti in je odvisno od namena metode (42). Glede na vrednosti determinacijskih koeficientov, ki smo jih določili, lahko potrdimo linearnost metode v območju med 10 mg/L in 2500 mg/L.

Ponovljivost ali natančnost analizne metode pomeni stopnjo razpršenosti rezultatov med serijo analiz istega homogenega vzorca pod predpisanimi eksperimentalnimi pogoji. Merilo za natančnost sta standardni odmik (SD) in relativna standardna deviacija (RSD). Točnost analizne metode izraža ujemanje izmerjene vrednosti z dejansko vrednostjo (42).

Za vrednotenje dnevne ponovljivosti in točnosti (Preglednica IX) smo izbrali tri kontrolne vzorce AK s koncentracijami 20, 200 in 2000 mg/L. S temi izbranimi koncentracijami smo pokrili celotno delovno območje analizne metode. Dnevno ponovljivost metode smo določili s primerjavo stopnje ujemanja odzivov petih paralelk iste koncentracije v enem dnevu. RSD med odzivi znotraj dneva je znašal največ 1,79%, kar je še znotraj dovoljenih 5%. Določili smo tudi ponovljivost injiciranja, ki je bila povprečno 1,08%. Tudi ta rezultat je ustrezen, saj je manjši od postavljene zgornje meje petih procentov. Povprečna dnevno točnost je bila  $103,33 \pm 0,34$ , kar ustreza postavljenim kriterijem sprejemljivosti ( $100 \pm 5\%$ ).

Pri vrednotenju meddnevne ponovljivosti in točnosti (Preglednica X) smo analizirali tri kontrolne vzorce, pripravljene vsakodnevno tri zaporedne dni. Potrdimo lahko meddnevno ponovljivost, saj največji RSD znaša 2,33%, kar je manj od postavljenega kriterija sprejemljivost. Za našo analizno metodo lahko potrdimo tudi meddnevno točnost, saj je povprečna vrednost znašala  $101,85 \pm 0,59$  in v nobenem primeru ne presega postavljenega kriterija 95-105%.

Meja zaznavnosti je najnižja koncentracija analita v preiskovanem vzorcu, ki jo lahko zanesljivo zaznamo ločeno od ozadja pri predpisanih eksperimentalnih pogojih, vendar je ne moremo tudi kvantitativno ovrednotiti. Meja določitve je najmanjša koncentracija analita v preiskovanem vzorcu, ki jo pod predpisanimi eksperimentalnimi pogoji lahko kvantitativno ovrednotimo z ustrežno točnostjo in natančnostjo (42). Mejo zaznavnosti in mejo določitve analizne metode smo izračunali iz Enačbe 5 oziroma iz Enačbe 6. Ugotovili smo, da je meja zaznavnosti 1,12 mg/L, meja določitve pa 3,39 mg/L in je nižja od izbranega delovnega območja metode.

Potrdili smo tudi stabilnost vzorcev med analizo, saj se koncentracija kontrolnih vzorcev ni spremenila za več kot 5%. Najvišje odstopanje je bilo pri koncentraciji 200 mg/L za 3,11% (Preglednica XI). Ugotovili smo tudi, da je 24 ur še primeren čas za shranjevanje raztopine AK.

Ker so vsi validacijski parametri znotraj postavljenih kriterijev, je metoda primerna za spremljanje stabilnosti AK, tudi v pripravkih.

## 5.3 STABILNOST STANDARDA ASKORBINSKE KISLINE

### 5.3.1 Stabilnost askorbinske kisline pri različnih koncentracijah

V literaturi smo zasledili, da je AK v raztopini stabilnejša pri višjih koncentracijah (33,34). Da bi preverili to trditev, smo pripravili in analizirali sedem raztopin kot je opisano v poglavju 3.3.3.1 Stabilnost askorbinske kisline pri različnih koncentracijah. Iz Slike 14 je razvidno, da stabilnost AK z nižanjem koncentracije pada. Ugotovili smo, da vsebnost AK v raztopini s koncentracijo 10 mg/L že po eni uri pade na 14% začetne vsebnosti, po dveh urah pa že vsa AK oksidira. Do koncentracije 200 mg/L oksidira vsa AK že po 24ih urah, v vzorcih s koncentracijami od 500 mg/L naprej pa je AK prisotna še po petih dneh. Edini rezultat, ki ni bil v skladu s pričakovanji, je koncentracija 200 mg/L po štirih urah. Pričakovali smo namreč, da bo vsebnost AK glede na začetno vsebnost večja kot je vzorcu s koncentracijo 100 mg/L.

Za lažjo ponazoritev stabilnosti se uporablja kemijska kinetika. Na osnovi znanega reda reakcije se določi konstanta reakcijske hitrosti, ki je merilo stabilnosti spojine v obravnavanem sistemu. Za določitev reda reakcije oksidacije AK smo izračunali enačbe premic za 1. in 0. red (Sliki 15 in 16) ter pripadajoče determinacijske koeficiente (Preglednici XII in XIII). Iz izračunanih  $R^2$  je razvidno, da 1. red bolje opisuje kinetiko oksidacije AK kot 0. red, zato smo se odločili, da bomo konstanto reakcijske hitrosti določali po 1. redu. Konstanta reakcijske hitrosti omogoča kvantitativno vrednotenje stabilnosti, tako je na primer pri koncentraciji 2500 mg/L konstanta reakcijske hitrosti 275 krat nižja kot pri koncentraciji 10 mg/L (razvidno iz Preglednice XII), kar pomeni, da oksidacija AK pri višji koncentraciji poteka počasneje.

### 5.3.2 Stabilnost askorbinske kisline v prisotnosti vodikovega peroksida

Vodikov peroksid v naših poskusih ponazarja oksidante, ki so lahko prisotni v pripravkih z AK. V prisotnosti oksidantov se AK hitro oksidira do dehidroaskorbinske kisline in naprej do biološko neaktivne diketoglukonske kisline (33,34). Da bi preverili vpliv vodikovega peroksida na stabilnost AK smo pripravili in analizirali vzorce, kot je opisano v poglavju 3.3.3.2 Stabilnost askorbinske kisline v prisotnosti vodikovega peroksida. Ugotovili smo, da AK v vzorcu s koncentracijo 10 mg/L ter v prisotnosti 3, 0,3% oz. 0,03% vodikovega peroksida že po desetih minutah popolnoma oksidira. Iz Slik 17 in 18 je razvidno, da je

višja koncentracija AK odpornejša na vodikov peroksid. V raztopini AK s koncentracijo 100 mg/L je v prisotnosti najnižje koncentracije vodikovega peroksida po eni uri prisotnih še 15% začetne vsebnosti AK, v raztopini s koncentracijo AK 1000 mg/L pa kar 90%. V prisotnosti 3% vodikovega peroksida je v raztopini s koncentracijo AK 1000 mg/L po eni uri prisotnih še 14% začetne vsebnosti AK, pri koncentraciji 100 mg/L pa AK že po 20ih minutah popolnoma oksidira. Rezultati kažejo, da se s povišanjem koncentracije vodikovega peroksida poveča tudi hitrost oksidacije AK. Prav tako pa lahko ugotovimo, da nižja koncentracija AK pospeši oksidacijo pri isti koncentraciji vodikovega peroksida.

V nadaljevanju diplomskega dela smo se odločili, da za proučevanje stabilnosti AK uporabimo koncentracijo 500 mg/L, saj je AK pri nižjih koncentracijah zelo nestabilna in oksidira že v enem dnevu (Slika 14). Poleg tega je povprečna koncentracija AK v izbranih pripravkih, ki smo jih proučevali v nadaljevanju, okrog 500 mg/L.

### **5.3.3 Stabilnost askorbinske kisline v različnih medijih**

Za proučevanje stabilnosti AK v različnih medijih smo pripravili in analizirali vzorce po postopku 3.3.3.3 Stabilnost askorbinske kisline v različnih medijih. Rezultati so prikazani na Sliki 19. Ugotovili smo, da je AK najbolj stabilna v etanolu. Možen vzrok za dobro stabilnost v etanolu bi lahko bila odsotnost kovinskih ionov, ki katalizirajo oksidacijo AK (14). Dobra stabilnost AK je tudi v 50% etanolu. Od vodnih medijev je AK najbolj stabilna v MiliQ vodi, najmanj pa v vodovodni vodi, saj je najverjetneje v vodovodni vodi prisotnih največ kovinskih ionov. Po 24ih urah je vsa AK v vodovodni vodi že oksidirala, medtem ko je v destilirani vodi prisotnih še 3%, v MiliQ vodi pa kar 35% začetne koncentracije AK. V absolutnem etanolu je v tej časovni točki prisotnih še 92% AK, v 50% etanolu pa 80% začetne koncentracije AK.

### **5.3.4 Stabilnost askorbinske kisline v prisotnosti EDTA**

Zato smo v naslednjem koraku preverili stabilnost AK z EDTA, ki kompleksira kovinske ione. Literaturni viri navajajo, da se AK hitreje oksidira v prisotnosti kovinskih ionov, še posebej v prisotnosti  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{3+}$  (34,36). Dodatek EDTA v raztopino AK povzroči nastanek kelatov med EDTA in kovinskimi ioni, kar omejuje oksidacijo AK. V literaturi najdemo tudi zanimiv podatek, da dodatek EDTA ni vedno učinkovit. H. Iwase (36) navaja, da kompleks EDTA – Fe močnejše oksidira AK kot pa prosto železo. Stabilnost AK

v prisotnosti EDTA smo proučevali v skladu s postopkom 3.3.3.4. Na Sliki 20 je prikazana stabilnost AK v prisotnosti EDTA in brez EDTA. AK je zelo dobro stabilizirana že z najnižjo koncentracijo EDTA (0,1 mM), saj je po dveh dneh v raztopini prisotnih še približno 98% začetne vsebnosti AK. V raztopini brez EDTA je v tem času ostalo le še 24% začetne vsebnosti AK. Med različnimi koncentracijami EDTA ni bistvene razlike – vse testirane koncentracije EDTA (0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM, 1 in 3 mM) zelo dobro stabilizirajo AK. Na osnovi tega lahko zaključimo, da kovinski ioni zelo destabilizirajo AK in da je že najnižja koncentracija EDTA sposobna kompleksirati v mediju prisotne kovinske ione.

### 5.3.5 Stabilnost askorbinske kisline pri različnih temperaturah

Temperatura je eden ključnih dejavnikov, ki vpliva na stabilnost AK v raztopini (34,36). Da bi preverili temperaturni vpliv smo pripravili in analizirali vzorce po postopku 3.3.3.5 Stabilnost askorbinske kisline pri različnih temperaturah. Naši rezultati so bili v skladu s pričakovanji: z višanjem temperature stabilnost AK pada (Slika 21). Pri 4°C poteka oksidacija 4 krat počasneje kot pri 25°C, medtem ko je pri 40°C hitrost oksidacije približno 2 krat višja kot pri 25°C (Preglednica XIV). Arrheniusova enačba podaja odnos med temperaturo in hitrostjo kemične reakcije in je osnova pospešenih testov stabilnosti. S pomočjo ekstrapolacije Arrheniusove premice lahko kinetične eksperimente pri povišani temperaturi prenesemo na nižje temperature, kar uporabljamo pri metodi umetnega staranja. Tudi nas je zanimala Arrheniusova odvisnost hitrosti oksidacije od recipročne absolutne temperature, zato smo izračunali konstante hitrosti oksidacije za 1. red reakcije za posamezne temperature, njihove naravne logaritme (Preglednica XIV) in narisali Arrheniusov graf (Slika 22). Iz naklona premice smo določili aktivacijsko energijo oksidacije, ki za AK znaša 41 kJ/mol. Ta rezultat se ujema s podatki iz literature (32). Iz Slike 22 je razvidno, da je med temperaturo in hitrostjo oksidacije AK relativno dobra korelacija, saj je  $R^2$  blizu vrednosti 1.

### 5.3.6 Stabilnost askorbinske kisline pri različnih pH-jih

V splošnem je obseg oksidacije večji v bazičnem mediju, kar velja tudi za AK. V bazičnem namreč nastaja askorbat, iz njega pa dehidroaskorbinska in diketoglukonska kislina (34,36). Poleg tega pH vpliva na oksidacijo z neposrednim vplivom na redoks potencial oksidirajočih snovi. Pri višjem pH je nižji redoks potencial in s tem večja občutljivost na

oksidacijo (35). Za proučevanje stabilnosti AK pri različnih pH-jih smo pripravili vzorce kot je opisano v poglavju 3.3.3.6. Naši rezultati so bili v skladu z literaturnimi podatki, kar je razvidno iz Slike 23, kjer lahko vidimo, da stabilnost AK z nižanjem pH narašča. Kvantitativno smo ovrednotili stabilnost AK pri različnih pH-jih s pomočjo konstant reakcijske hitrosti, ki so podane v pH profilu (Slika 24). Stabilnost AK se povečuje v naslednjem vrstnem redu:  $\text{pH } 8 < \text{pH } 7 < \text{pH } 6 < \text{pH } 3 < \text{pH } 4 < \text{pH } 5 < \text{pH } 2$ . AK je najbolj stabilna pri pH 2, kar se ujema tudi z literaturnimi podatki (36).

### **5.3.7 Stabilnost askorbinske kisline v prisotnosti kisika, dušika in svetlobe**

Pri oksidacijah sta pomembna dejavnika destabilizacije tudi kisik in svetloba. AK je dovzetna za razgradnjo, če jo izpostavimo dnevni ali UV svetlobi. AK se prav tako hitro oksidira v prisotnosti kisika (34,36). Dušik iz raztopine in atmosfere nad njo izpodrine kisik in tako prepreči oksidacijo. Za proučevanje vpliva kisika, dušika in svetlobe na stabilnost AK smo pripravili vzorce kot je opisano v poglavju 3.3.3.7. Naši rezultati (Slika 25) so bili v skladu s pričakovanji in so pokazali, da prisotnost kisika zmanjša stabilnost AK v raztopini, prav tako se stabilnost AK v raztopini zmanjša, če je izpostavljena svetlobi. Iz Slike 25 je razvidno, da ima svetloba manjši vpliv na stabilnost AK kot kisik. Po enem dnevu je bilo v raztopini AK, ki je bila izpostavljena svetlobi, prisotnih še 52% začetne vsebnosti AK, v raztopini preprihani s kisikom pa le 5%. Raztopina AK, ki smo jo preprihovali z dušikom, je bila po pričakovanjih bolj stabilna kot raztopina preprihana s kisikom. Ugotovili smo tudi, da sta kontrolna raztopina in raztopina preprihana z dušikom podobno stabilni. Pričakovali smo, da bo raztopina preprihana z dušikom bolj stabilna. Izvedba eksperimenta s preprihovanjem z dušikom očitno ni bila optimalna, saj je najverjetneje prišlo do vdora kisika v epico z raztopino AK.

## **5.4 STABILNOST ASKORBINSKE KISLINE V PRIPRAVKIH**

Znano je, da je AK zelo dobro stabilna v trdnem, v vodnih raztopinah pa je njena stabilnost slabša (35). AK je v pripravkih na trgu večinoma v trdni obliki (tablete, šumeče tablete, praški), vendar je potrebno nekatere pripravke pred samim zaužitjem raztopiti v vodi. V naši diplomski nalogi smo želeli preveriti ali priprava raztopin za jemanje teh pripravkov vpliva na stabilnost AK. Zanimala nas je stabilnost AK v pripravkih, ki jih po navodilu na ovojnicini pripravimo pred jemanjem (na primer: šumečo tableto raztopimo v kozarcu vode),



in jih nekaj časa pustimo stati (pripravka ne popijemo takoj). Pri nekaterih pripravkih z AK je na ovojnicah navedeno, da se lahko pripravijo kot hladni ali topli napitek, zato smo simulirali tudi te pogoje in preverili ali povišana temperatura vpliva na stabilnost AK v teh pripravkih. Ker zakonodaja na področju prehranskih dopolnil (pripravki od A do E so prehranska dopolnila) ne zahteva ustreznega nadzora kakovosti in vsebnosti, nas je zanimala tudi vsebnost AK v izbranih izdelkih. Vsebnost smo določili z metodo, ki smo jo razvili in validirali v okviru diplomske naloge.

Stabilnost AK v pripravkih smo spremljali kot je opisano v poglavju 3.3.4. Na Sliki 26 so prikazani rezultati stabilnostne študije. Ugotovili smo, da je AK najstabilnejša v pripravku B z deklarirano koncentracijo AK 900 mg/L. Po dveh dneh je bilo v pripravku B prisotnih še 83% začetne vsebnosti AK. AK je dobro stabilna tudi v pripravkih Č in C s koncentracijo AK 600 mg/L. Na četrtem mestu po stabilnosti AK je pripravek D, kjer je deklarirana koncentracija AK 500 mg/L. AK v pripravku A s koncentracijo AK 900 mg/L je do časovne točke 24 ur stabilnejši od AK v pripravku D, po enem dnevu pa vsebnost AK v pripravku A hitro pade. Po 48ih urah je tako v pripravku D prisotnih še 60%, v pripravku A pa le 46% začetne vsebnosti AK. Najnižja deklarirana koncentracija AK (133 mg/L) je v pripravku F, kjer je AK presenetljivo stabilna, saj je po enem dnevu vsebnost AK še vedno dobrih 58% začetne vsebnosti. Najslabša stabilnost AK je v pripravku E, kjer je deklarirana koncentracija AK 600 mg/L. Do časovne točke 4 ure vsebnost AK hitro pada do 40% začetne vsebnosti, nato pa v naslednjih dvajsetih urah pade na 1% začetne vsebnosti. Na Sliki 26 lahko v časovnih točkah 1 in 2 uri opazimo, da pri nekaterih pripravkih pride do porasta vsebnosti AK. Najverjetneje gre tukaj za izhlapevanje topila ali pa za eksperimentalno napako.

Zgornji rezultati kažejo, da stabilnost AK v pripravkih po raztapljanju v vodi v splošnem ni problematična. Vsebnost AK v pripravkih, ki so bili pripravljene za jemanje, je bila tudi po štirih urah še vedno zelo visoka. V povprečju je bila vsebnost AK v tej časovni točki 95% glede na začetno vsebnost, če izvzamemo pripravek E, ki po stabilnosti AK edini odstopa, kar je razvidno tudi iz Slike 26. Zaključimo lahko, da je AK v izbranih pripravkih po ustreznih pripravah za jemanje zelo stabilna tudi, če pripravka ne zaužijemo takoj po pripravi.

Če primerjamo stabilnost AK in deklarirano koncentracijo AK v pripravkih, lahko ugotovimo, da pripravki z isto deklarirano koncentracijo nimajo enake stabilnosti. Takšen primer sta pripravka A in B, s koncentracijo AK 900 mg/L. Vsebnost AK je do časovne točke 4 ure primerljiva, v časovnih točkah 24 in 48 ur pa se vsebnost AK bistveno razlikuje – AK v pripravku B je stabilnejša. Pripravki C, Č in E imajo deklarirano koncentracijo AK 600 mg/L. Vsebnost AK v pripravkih C in Č je skozi celotno časovno območje zelo podobna, medtem ko je vsebnost AK v pripravku E popolnoma drugačna, čeprav bi zaradi iste koncentracije pričakovali podobno vsebnost. Najverjetneje je vzrok za te razlike sama sestava pripravkov, ki vpliva na stabilizacijo oziroma destabilizacijo AK.

Na Sliki 27 je prikazana še primerjava med pripravki B, E, F in standardi AK s podobnimi koncentracijami, kot so v pripravkih. Opazimo lahko, da je AK v pripravku B s koncentracijo AK 900 mg/L stabilnejša od standarda AK s koncentracijo 1000 mg/L. Pripravek F (133 mg/L) ima sicer nekoliko višjo koncentracijo AK kot standard AK (100 mg/L), vendar je AK veliko bolj stabilna v pripravku F. Pri pripravku E (600 mg/L) in standardu s koncentracijo 500 mg/L bi zaradi podobne koncentracije AK pričakovali podobno stabilnost, vendar je AK v pripravku E manj stabilna kot standard. Zanimivo je, da je pripravek E deklariran kot čista askorbinska kislina, brez drugih dodatkov, kar je verjetno tudi razlog, da po stabilnosti AK odstopa od drugih pripravkov (Slika 26). Ugotovili smo, da je AK v pripravkih (z izjemo pripravka E) bolj stabilna kot pa standard AK. Vzrok je sestava pripravkov, saj nekateri poleg AK vsebujejo še druge vitamine, minerale in ostale snovi, ki lahko stabilizirajo AK.

Za konec smo pripravka E in F pripravili z vrelo vodo, saj navodilo na teh dveh izdelkih dovoljuje pripravo hladnega ali toplega napitka. Temperatura vode za pripravo v navodilu ni bila definirana, zato smo se odločili, da bomo uporabili vrelo vodo. S tem smo želeli simulirati realno situacijo, ko si na primer pri prehladu in gripi pripravimo čaj in vanj umešamo vrečko pripravka F. Slika 28 prikazuje stabilnost AK v pripravkih E in F, ki sta bila pripravljena z vrelo vodo. Ugotovili smo, da je AK v teh dveh pripravkih tudi v vreli vodi relativno dobro stabilna, predvsem v pripravku F, ki ima sicer zelo nizko koncentracijo AK (133 mg/L). Po tridesetih minutah, ko sta se vroča napitka shladila do te

mere, da bi ju lahko popili, je bilo v pripravku F prisotnih še 99% začetne vsebnosti AK, v pripravku E (600 mg/L) pa 90%. Vsebnost AK v pripravkih E in F se torej tudi v vroči vodi ne zniža bistveno, medtem ko pri standardu AK s koncentracijo 500 mg/L in pri temperaturi 60°C vsebnost AK po eni uri pade na 74% začetne vsebnosti (Slika 21). Tudi ta rezultat kaže, da ima sestava pripravkov pomembno vlogo pri stabilizaciji AK.

## 6 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo razvili analizno metodo, ki je primerna za vrednotenje askorbinske kisline, tudi v pripravkih. To smo potrdili z vrednotenjem metode, kjer smo dokazali, da je metoda selektivna, linearna v območju od 10 do 2500 mg/L, daje natančne in točne rezultate. Meja zaznavnosti metode je 1,12 mg/L, meja določitve pa 3,39 mg/L in je nižja od izbranega delovnega območja metode.

Ugotovili smo, da lahko hitrost oksidacije askorbinske kisline v raztopini zelo dobro opišemo s 1. redom reakcije. Z redom reakcije kvantitativno ovrednotimo stabilnost AK. Stabilnost askorbinske kisline v raztopini se povečuje s povišanjem koncentracije. Najstabilnejša je bila raztopina s koncentracijo 2500 mg/L, najmanj pa raztopina s koncentracijo 10 mg/L. Zanimivo bi bilo proučiti, če obstaja zgornja koncentracija askorbinske kisline, nad katero se stabilnost več ne povečuje.

Rezultati kažejo, da se s povišanjem koncentracije vodikovega peroksida poveča hitrost oksidacije askorbinske kisline. Prav tako pa smo ugotovili, da nižja koncentracija askorbinske kisline pospeši oksidacijo pri isti koncentraciji vodikovega peroksida.

Stabilnost askorbinske kisline je odvisna tudi od vrste medija, v katerem je raztopljena. Najbolj je stabilna v absolutnem etanolu, nekoliko manj v 50% etanolu. V vodnih medijev je najbolj stabilna v MiliQ vodi, manj v destilirani vodi, najmanj pa v vodovodni vodi.

Ugotovili smo, da že nizke koncentracije EDTA (0,1 mmol/L) zelo dobro stabilizirajo askorbinsko kislino v raztopini. Med različnimi testiranimi koncentracijami EDTA (do 3 mmol/L) ni bistvene razlike v stabilizaciji.

Askorbinska kislina je najbolj stabilna pri 4°C, najmanj pa pri 60°C. Aktivacijska energija oksidacije askorbinske kisline je 41 kJ/mol. Stabilnost askorbinske kisline je v skladu z Arrheniusovo enačbo, kar pomeni, da velja premosorazmernost med hitrostjo oksidacije in temperaturo.

pH vrednost medija vpliva na stabilnost askorbinske kisline. Največja stabilnost askorbinske kisline je pri pH 2, najmanjša pa pri pH 8.

Kisik ima večji vpliv na destabilizacijo askorbinske kisline kot svetloba. Prepričanje raztopine z dušikom ni povečalo stabilnosti askorbinske kisline v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Stabilnost askorbinske kisline v pripravkih po raztapljanju v vodi ni problematična. Askorbinska kislina je v testiranih pripravkih, ki so pripravljene za jemanje, bolj stabilna kot v raztopinah standarda s podobnimi koncentracijami. Askorbinska kislina v pripravkih z isto deklarirano koncentracijo ne izkazuje enake stabilnosti. Stabilnost askorbinske kisline v raztopinah pripravkov ni odvisna od koncentracije askorbinske kisline, ampak najverjetneje od sestave. Vsebnost askorbinske kisline se v pripravkih E (600 mg/L) in F (133 mg/L) po pripravi z vrelo vodo po tridesetih minutah spremeni le za 10 oziroma 1% glede na začetno vsebnost, kar je bistveno manj kot v obliki raztopine standarda s koncentracijo 500 mg/L (znižanje na 74% začetne AK pri 60°C v eni uri).

## 7 LITERATURA

1. C. A. Burtis, E. R. Ashwood, D. E. Bruns: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 5<sup>th</sup> edition, Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, 2012: 925-927
2. B. Rozman, M. Gašperlin: Vitamin C in njegovi derivati v farmacevtskih in kozmetičnih izdelkih, Prehranska dopolnila I, Podiplomsko izobraževanje 2009: 77-84
3. H. P. Rang, M. M. Dale, J. M. Ritter, P. K. Moore: Rang and Dale's pharmacology, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2007: 331
4. <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/vitamins/vitaminC/>, dostopana junija 2013
5. J. Du, J. J. Cullen, G. R. Buettner: Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer, Biochimica et Biophysica Acta 2012; 1826: 443-457
6. M. Sollner Dolenc, S. Pečar: Antioksidanti, Vaje iz farmacevtske kemije III, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 1997
7. B. Caballero, L. C. Trugo, P. M. Finglas: Encyclopedia of food sciences and nutrition, 2. izdaja, volumen 1, Academic Press : Elsevier Science, Amsterdam, 2003: 316-332
8. B.B. Prasad, D. Kumar, R. Madhuri, M. P. Tiwari: Ascorbic acid imprinted polymer-modified graphite electrode: A diagnostic sensor for hypovitaminosis C at ultra trace ascorbic acid level, Sensor and Actuators B; 2001: 160: 418-427
9. H. Hemilä, E. Chalker, B. Douglas: Vitamin C for preventing and treating the common cold (Review), reprint of a Cochrane review, prepared and maintained by The Cochrane Collaboration, The Cochrane Library 2010, 3. izdaja
10. I. F. F. Benzie, J. J. Strain: Can antioxidant vitamin supplementation lower risk of coronary heart disease?, Atherosclerosis; 1998; 136: 61
11. <http://www.lek.si/si/skrb-za-zdravje/bolezni-in-simptomi/srce-ozilje/koronarna-srcna-bolezen/>, dostopano junija 2013
12. Knekt, P. Ritz, J. Pereira, M.A. O'Reilly, E.J. Augustsson, K. Fraser, G.E. Goldbourt, U. Heitmann, B.L. Hallmans, G. Liu: Antioxidant vitamins and coronary heart disease risk: a pooled analysis of 9 cohorts, American journal of clinical nutrition, 2004; 80: 1508-1520

13. I. M. Hajjar, V. George, E. A. Sasse, M. S. Kochar: A randomized, double-blind, controlled trial of vitamin C in the management of hypertension and lipids, *American Journal of Therapeutics*, 2002; 9: 289-293
14. P. C. Leclerc, C. D. Proulx, G. Arduin, S. Belanger, F. Gobeil, E. escher, R. Leduc, G. Guillemette: Ascorbic Acid Decreases the Binding Affinity of the AT<sub>1</sub> Receptor for Angiotensin II, *American Journal of Hypertension*, 2008; 21: 67-71
15. Z. Rafighi, S. Arab, R. Mohd Yusof, A. Shiva: The Effect of Vitamin C and E on Lipid Profile in People with Type 2 Diabetes Mellitus, *Global Journal of Health Science*, 2011; 3: 69-74
16. S. W. Choi, J. J. Strain, et. al.: Inter-relationship between DNA damage, ascorbic acid and glycaemic control in Type 2 diabetes mellitus, *Diabetic Medicine*, 2005; 22: 1347-1353
17. F. E. Harrison, J. M. May: Vitamin C function in the brain: vital role of ascorbate transporter SVCT2, *Free Radical Biology&Medicine*, 2009; 46: 719-730
18. P. P. Zandi, et. al.: Reduced Risk of Alzheimer Disease in Users of Antioxidant Vitamin Supplements, *Archives of Neurology*, 2004; 61: 82-88
19. H. Nagayama, M. Hamamoto, M. Ueda, C. Nito, H. Yamaguchi, Y. Katayama: The Effect of Ascorbic Acid on the Pharmacokinetics of Levodopa in Elderly Patients with Parkinson Disease, *Clinical Neuropharmacology* 2004; 27: 270-273
20. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Plivit C
21. [http://www.fidimed.si/zdravstvene teme/priporoceni\\_dnevni\\_odmerki\\_rda/](http://www.fidimed.si/zdravstvene teme/priporoceni_dnevni_odmerki_rda/), dostopano junija 2013
22. Pravilnik o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o prehranskih dopolnilih, 2010, Uradni list Republike Slovenije, št. 104/2010, Priloga II
23. M. T. Tarrago-Trani, K. M. Phillips, M. Cotty: Matrix-specific method validation for quantitative analysis of vitamin C in diverse foods, *Journal of Food Composition and Analysis* 2012; 26: 12-25
24. V. Varagić, M. Milošević: *Farmakologija, Elit – Medica*, Beograd, 2002: 459

25. R. L. Allgaier, K. Vallabh, S. Lahri: Scurvy: A difficult diagnosis with simple cure, *African Journal of Emergency Medicine* 2012; 2: 20-23
26. J. Mandl, A. Szarka, G. Banhegyi: Vitamin C: update on physiology and pharmacology, *British Journal of Pharmacology* 2009; 157: 1097-1110
27. J. Verrax, P. B. Calderon: The Controversial place of vitamin C in cancer treatment, *Biochemical Pharmacology* 2008; 76: 1644-1652
28. V. Zubin: Določanje vsebnosti L-askorbinske kisline in nitrata v zelju cv. Destiny in cv. Caco, diplomska naloga, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Univerza v Ljubljani, 2010
29. K. K. Chebrolu, G. K. Jayaprakasha, K.S. Yoo, J. L. Jifon, B. S. Patil: An improved sample preparation method for quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by HPLC, *Food Science and Tehnology*, 2012; 47: 443-449
30. <http://www.lekarnar.com>, dostopano decembra 2012
31. European Pharmacopeia 5th edition (Ph. Eur. 5), Council of Europe, Strasbourg 2004, monografija Ascorbic acid, 1025-1026
32. K. A. Connors, G. L. Amidon, V. J. Stella: *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists*, Wiley, New York, 1986: 208-220
33. L. Nováková, D. Solichová, S. Pavlovičová, P. Solich: Hydrophilic interaction liquid chromatography method for the determination of ascorbic acid, *Journal of Separation Sciences* 2008; 31: 1634-1644
34. L. Nováková, P. Solich, D. Solichová: HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids, *Trends in Analytical Chemistry* 2008; 27: 942-958
35. R. L. Allgaier, K. Vallabh, S. Lahri: Scurvy: A difficult diagnosis with simple cure, *African Journal of Emergency Medicine* 2012; 2: 20-23
36. H. Iwase: Use of an amino acid in the mobile phase for the determination of ascorbic acid in food by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Journal of Chromatography A* 2000; 881: 317-326



37. R. R. Eitenmiller, L. Ye, W. O. Landen, Jr.: Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences, 2. izdaja, Boca Raton, London, New York, 2008: 231-280
38. S. Ahuja, S. Scypinski: Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis, Academic Press, San Diego, 2001, vol. 3: 379-383
39. A. Rodriguez-Bernaldo de Quiros, M. Fernandez-Arias, J. Lopez-Hernandez: A screening method for the determination of ascorbic acid in fruit juices and soft drinks, Food Chemistry 2009; 116: 509-512
40. <http://www.columnex.com/>, dostopano maja 2013
41. A. G. Franich, et. al.: Determination of Ascorbic Acid and Carotenoids in Food Commodities by Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Detection, Journal of Agricultural and Food Chemistry 2005; 53: 7371-7376
42. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005
43. <http://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Luna/NH2>, dostopano maja 2013