

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IGOR POKORNY

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

IGOR POKORNY

**DOLOČANJE ASKORBINSKE IN
DEHIDROASKORBINSKE KISLINE V TRDNIH
FARMACEVTSKIH OBLIKAH Z METODO
TEKOČINSKE KROMATOGRFIJE VISOKE
LOČLJIVOSTI**

**DETERMINATION OF ASCORBIC AND
DEHYDROASCORBIC ACID IN SOLID
PHARMACEUTICAL FORMS BY HIGH-
RESOLUTION LIQUID CHROMATOGRAPHY
METHOD**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljal v tovarni zdravil Krka, d.d., Novo mesto, na Oddelku za stabilnost v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Roberta Roškarja.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Robertu Roškarju, Andreju Gartnerju, univ. dipl. ing. kem. in vsem zaposlenim na Oddelku za stabilnost za vso strokovno pomoč in nasvete.

Zahvaljujem se tudi Krki d.d., Novo mesto, ki mi je omogočila opravljanje praktičnega dela diplomske naloge na Oddelku za stabilnost v Ljubljani.

Zahvala gre tudi vsem domačim, ki so me podpirali skozi celoten študij.

Za vso spodbudo, razumevanje in pomoč se zahvaljujem svojemu dekletu Špeli.

Diplomsko delo posvečam pokojnemu očetu, ki je veliko pripomogel k moji odločitvi za študij, mi vedno stal ob strani in je moj največji vzornik.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja doc. dr. Roberta Roškarja.

Igor Pokorny

Predsednik komisije: prof. dr. Stanislav Gobec

Član komisije: doc. dr. Rok Dreu

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	I
POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VI
1. UVOD.....	1
1.1. NOMENKLATURA IN STRUKTURA ASKORBINSKE KISLINE (AA)	1
1.2. FUNKCIJE	2
1.3. KOŽA IN ASKORBINSKA KISLINA	4
1.4. PREHRANSKI POMEN VITAMINA C	5
1.5. STABILNOST ASKORBINSKE IN DEHIDROASKORBINSKE KISLINE.....	8
1.6. METODE DOLOČEVANJA ASKORBINSKE KISLINE IN DEHIDROASKORBINSKE KISLINE.....	11
1.6.1. Metode določevanja askorbinske kisline.....	11
1.6.2. Določevanje AA in DHA s HPLC metodo	12
1.7. HPLC	14
2. NAMEN DELA	19
3. MATERIALI IN METODE	20
3.1. MATERIALI	20
3.2. RAZVOJ HPLC METODE ZA DOLOČEVANJE ASKORBINSKE IN DEHIDROASKORBINSKE KISLINE.....	21
3.2.1. Kromatografski pogoji	21
3.2.2. Priprava raztopin	21
3.2.3. Postopek derivatizacije in redukcije dehidroaskorbinske kisline.....	23
3.3. VREDNOTENJE ANALIZNE METODE.....	24

3.3.1.	KONČNA HPLC METODA	24
3.3.1.1.	Kromatografija	24
3.3.1.2.	Postopek redukcije dehidroaskorbinske kisline	24
3.3.2.	VREDNOTENJE VALIDACIJSKIH PARAMETROV HPLC METODE.....	24
3.3.2.1.	Selektivnost	24
3.3.2.2.	Natančnost.....	24
3.3.2.3.	Linearnost.....	26
3.3.2.4.	Točnost.....	27
3.3.2.5.	Meja zaznavnosti in meja določitve	27
3.3.2.6.	Robustnost.....	28
3.4.	STABILNOSTNA ŠTUDIJA.....	28
3.5.	OBDELAVA PODATKOV	29
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	30
4.1.	RAZVOJ ANALIZNE METODE.....	30
4.1.1.	DOLOČEVANJE ASKORBINSKE KISLINE	30
4.1.2.	DOLOČEVANJE DEHIDROASKORBINSKE KISLINE	31
4.1.2.1.	Določevanje dehidroaskorbinske kisline z derivatizacijo	32
4.1.2.2.	Določevanje dehidroaskorbinske kisline z redukcijo.....	34
4.2.	VALIDACIJA METODE.....	38
4.2.1.	VALIDACIJA METODE ZA DOLOČEVANJE VSEBNOSTI ASKORBINSKE KISLINE.....	38
4.2.1.1.	Selektivnost.....	38
4.2.1.2.	Natančnost.....	39
4.2.1.3.	Linearnost	40
4.2.1.4.	Točnost.....	41
4.2.1.5.	Robustnost.....	42
4.2.2.	VALIDACIJA METODE ZA DOLOČEVANJE DEHIDROASKORBINSKE KISLINE.....	42

4.2.2.1. Selektivnost.....	42
4.2.2.2. Natančnost.....	42
4.2.2.3. Linearnost	42
4.2.2.4. Točnost.....	43
4.2.2.5. Meja zaznavnosti in meja določitve.....	44
4.3. STABILNOSTNA ŠTUDIJA.....	44
5. ZAKLJUČEK	48
6. LITERATURA	50

POVZETEK

Askorbinska kislina (AA) je eden od najučinkovitejših in najmanj toksičnih antioksidantov. Ima obrambno vlogo proti različnim z oksidativnim stresom povezanih boleznih, kot so rak, kardiovaskularne bolezni, Alzheimerjeva bolezen, diabetes.

Namen naloge je bil preučevati stabilnost AA v trdni obliki, saj je bilo do sedaj narejenih veliko raziskav o stabilnosti AA v tekočinah, a zelo malo na področju stabilnosti AA v trdnem stanju. Pred preučevanjem stabilnosti smo razvili HPLC metodo, s katero smo želeli ovrednotiti tako AA kot tudi njegov oksidacijski produkt dehidroaskorbinsko kislino (DHA), prvotno z derivatizacijo z reagentom 4,5-dimetil-1,2-fenildiaminom. Ker se je derivatizacija izkazala kot nespecifična in z majhnim izkoristkom, smo razvili ustrezno HPLC metodo za določevanje vsebnosti AA in DHA v trdni farmacevtski obliki s pomočjo redukcije. AA smo določevali direktno na valovni dolžini 245 nm, DHA pa posredno z redukcijo do nastanka AA. Iz razlike koncentracij med celokupno AA po redukciji in AA pred redukcijo smo določili koncentracijo DHA. Redukcija med DHA in tris-(2-karboksietil)fosfin hidrokloridom v metafosforni kislini s pH 5,5 traja 15 minut na sobni temperaturi in temnem prostoru z izkoristkom redukcije 73,74 %. Z validacijo smo v nadaljevanju dokazali, da sta metodi za določevanje vsebnosti AA in DHA ustrezni za namen stabilnostne študije, saj so bili vsi validacijski parametri (selektivnost, natančnost, linearnost, točnost) znotraj predpisanih mej. Pri vrednotenju stabilnosti AA v obliki praška v časovnih točkah (1., 2., 4., 6. teden) pri različni koncentraciji kisika (pod 0,5, 2, 5, 10 in 21 %) in povišanih temperaturah (40, 60 in 80 °C) smo določili vsebnost AA med 99 in 102 %. Vsebnost AA je rahlo odstopala po šestih tednih na temperaturi 80 °C in sicer od približno 99,5 % pri najnižji koncentraciji kisika do okoli 98,9 % pri najvišji koncentraciji kisika. Zaradi relativno dobre stabilnosti AA pri izbranih pogojih je bila vsebnost DHA le med enim in dvema odstotkoma v vseh analiziranih vzorcih. Vzorci, ki so bili vsaj štiri tedne izpostavljeni temperaturi 80 °C pri vseh testiranih koncentracijah kisika, so iz prvotne bele barve postali rjavo obarvani. To je najverjetneje posledica enega izmed razpadnih produktov – furfurala, ki ga z našo HPLC metodo nismo mogli ovrednotiti. V zmesi AA s škrobom smo opazili, da se pojavi obarvanost že v krajšem časovnem obdobju in temperaturi 40 °C, tako da lahko sklepamo, da ima vlaga velik vpliv na stabilnost AA, kar so pokazali tudi rezultati analiz vsebnosti AA ob prisotnosti škroba. Medtem ko pa povišana temperatura in različna koncentracija kisika nimata posebnega vpliva na stabilnost AA v relativno kratkem času shranjevanja na izbranih pogojih.

ABSTRACT

Ascorbic acid is one of the most effective and least toxic antioxidants. It has a defensive role against various with oxidative stress related diseases such as cancer, cardiovascular disease, Alzheimer disease and diabetes. The aim of study was to examine the stability of AA in solid form, as it has been so far made a lot of research on the stability of AA in liquids, but very little on stability of AA in the solid state. We tried to develop the HPLC method to determine the ascorbic acid (AA) as well as its oxidation product dehydroascorbic acid (DHA), firstly by using derivatization reagent 4,5-dimethyl-1,2-fenildiaminom (DMPD). The method was inappropriate because it was non-specific and it also had a small efficiency of derivatization. Consequently, we decided to develop a new method for the determination of AA and DHA. We have developed HPLC method for the determination the stability of AA and DHA in solid dosage form (powder) using the reduction. Ascorbic acid was determined directly at the wavelength of 245 nm and DHA indirectly by reduction to the formation of AA. DHA concentration was determined by the difference between the overall concentrations of AA after reduction and the concentration of AA before reduction. Reduction of DHA and reducing agent tris-(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) in metaphosphoric acid with a pH of 5,5 lasts around fifteen minutes at room temperature and dark place with 73,74 % of reduction efficiency. We have proven with validation that the both methods for determining the content of ascorbic acid (AA) and dehydroascorbic acid (DHA) are appropriate for the research stability studies. We were determining the stability of AA in a solid form at time points (1, 2, 4, 6 weeks) at different concentrations of oxygen (below 0,5, 2, 5, 10, 21 %) and different temperatures (40, 60, 80 °C). The content of AA was between 99 in 102 % and slightly deviated after six weeks of storage at the temperatures of 80 °C from 99,5 % at concentration of oxygen below 0,5 % to 98,9 % at 21 % of oxygen concentration. The content of DHA was only between one and two percent in all analyzed samples due to relatively good stability of AA in selected conditions. Samples, that were exposed at least four weeks at temperature of 80 °C at all tested oxygen concentrations, became brown colored from the previous white colour. This is most likely due to one of the degradation products - furfural, which could not be determined by our HPLC method. We also evaluated the stability of AA in a mixture with starch. We noticed that the coloration appears already in a shorter period of time and milder conditions (40 °C), so it can be concluded that the moisture has a large influence on the stability of AA. While increased temperature and different oxygen concentrations have no particular influence on the stability of AA in a relatively short time of storage at selected conditions.

SEZNAM OKRAJŠAV

AA - askorbinska kislina

CTAB - N-cetil-N,N,N-trimetilamonijev bromid

DHA - dehidroaskorbinska kislina

DMPD - 4,5-dimetil-1,2-fenildiamin

DTT - ditiotreitol

EDTA - etilendiamintetraocetna kislina

FID - plamensko ionizacijski detektor

HPLC - tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High Performance Liquid Chromatography)

LDL - lipoproteini z nizko gostoto (ang. Low Density Lipoprotein)

LOD - meja detekcije (ang. Limit of detection)

LOQ - meja določljivosti (ang. Limit of quantitation)

MS - masni spektrometer

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

pK_a - negativni desetiški logaritem konstante kisline

R² - determinacijski koeficient

RI - refrakcijski indeks

RSD - relativni standardni odmik

s - standardni odmik

TCEP - tris-(2-karboksietil) fosfin hidroklorid

UZ - ultrazvok

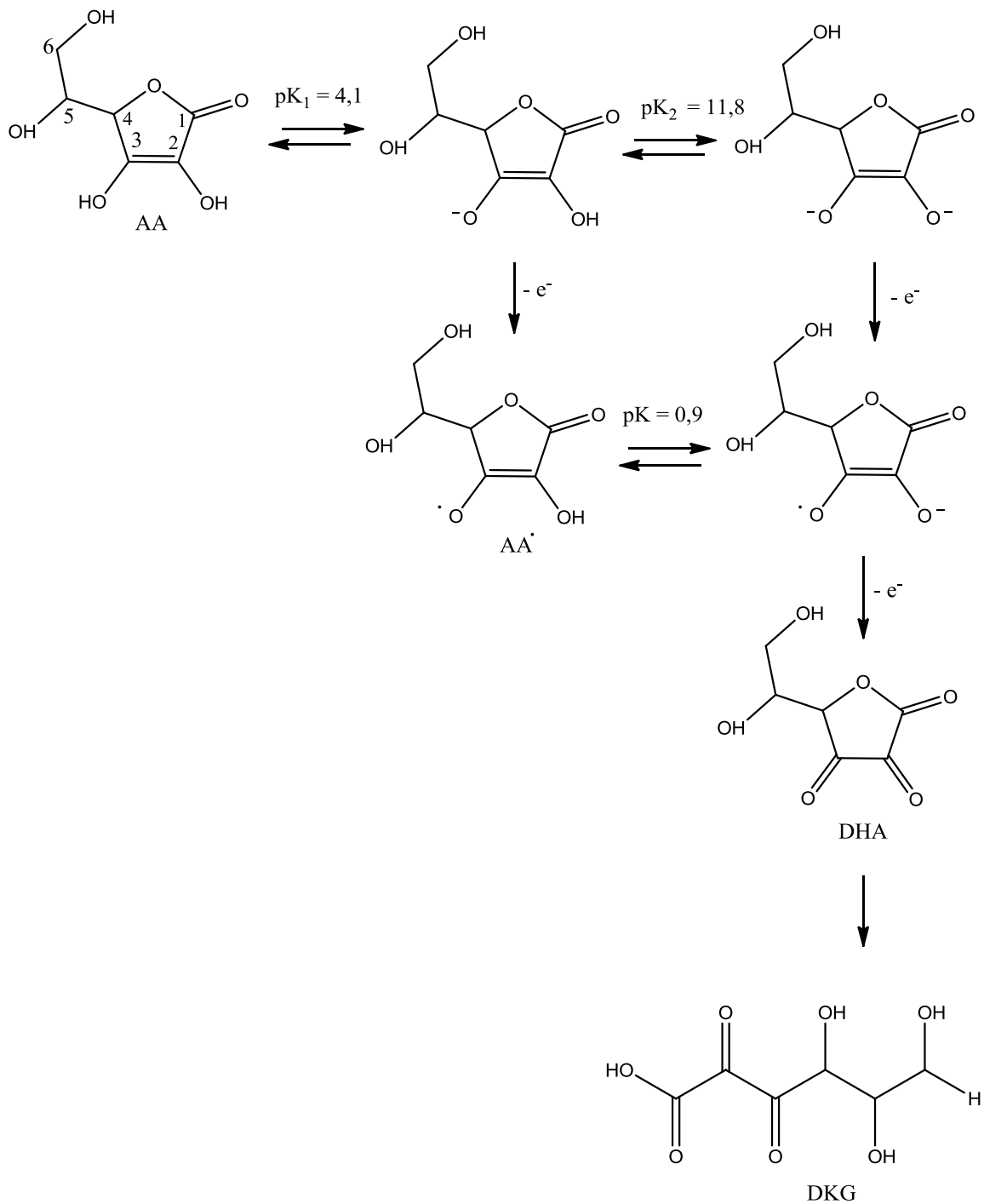
1. UVOD

1.1. NOMENKLATURA IN STRUKTURA ASKORBINSKE KISLINE (AA)

Vitamin C imenujemo v kemijskem izrazoslovju askorbinska kislina in spada v redoks sistem, saj lahko reverzibilno preide v dehidroaskorbinsko kislino. C-vitamin lahko najdemo še pod drugimi različnimi imeni, kot so L-askorbinska kislina, heksuronska kislina, skorbutamin, antiskorbutni vitamin. Njeno kemijsko ime je 1,4-lakton 2,3-dihidroglukonska kislina. Vitamin C je eden izmed najbolj raziskanih vitaminov. L-oblika askorbinske kisline je ena izmed najenostavnejših strukturnih oblik med vitamini (1). Je dibazična kislina in je sorodna sladkorjem s šestimi atomi ogljika in je aldon-1,4-lakton heksonske kisline. Molekula vsebuje dva kiralna centra na četrtem in petem ogljikovem atomu in teoretično štiri stereoizomere in sicer L-askorbinsko kislino, L-izoaskorbinsko kislino, D-askorbinsko kislino in D-izoaskorbinsko kislino (2). AA vsebuje endiolno skupino na C₂ in C₃ atomih. Stereoizomer L-AA ima antiskorbutno delovanje, medtem ko je D-AA skoraj brez antiskorbutnega delovanja (1). AA se reverzibilno pretvori v dehidroaskorbinsko kislino (DHA) in obratno. DHA se lahko irreverzibilno z odprtjem laktonskega obroča pretvori v 2,3-diketogulonsko kislino in s tem izgubi aktivnost vitamina C in antioksidativne lastnosti (slika 1) (2).

Delokalizacija π - elektronov v C₂ - C₃ endiolnem konjugiranem sistemu stabilizira molekulo in vpliva na povečano kislost C₃ hidroksilne skupine ($pK_a = 4,1$), zato je pri fiziološkem pH v obliki monoaniona (L-askorbat). Disociacija C₂ hidroksilne skupine poteka pri pH 11,8 (1).

Poznamo številne naravne in sintetizirane derivate AA. Med naravne spadajo askorbil-2-sulfat, 2-O- β -glukuronid askorbinske kisline in 2-O- α -glukozid. Med sintezne pa spadata askorbil-2-fosfat in askorbil-6-palmitat, ki imata antioksidativne lastnosti in ju dodajajo nekaterim živilom, vendar se slabo absorbirata v telo (1).



Slika 1: Reakcijska pot razpada AA preko semidehidroaskorbinskega radikala (AA•) in dehidroaskorbinske kisline (DHA) do diketoglulonske kisline (DKG), (povzeto po 2)

1.2. FUNKCIJE

Vitamin C ima številne biokemijske funkcije, antioksidativne lastnosti in igra pomembno vlogo v obrambi imunskega sistema. AA je kofaktor številnih encimov, ki se vključujejo v biosintezo kolagena, karnitina in nevrottransmitterjev, ker ohranja železove ali bakrove ione, ki so vezani na encime, v reducirani obliki in s tem encimsko aktivnost (2,3). Ima pomembno

vlogo pri reakciji hidroksilacije, saj omogoča uvedbo hidroksilnih skupin nekaterim molekulam. Za biosintezo prokolagena, ki je sestavljen iz aminokislin prolina in glicina, sta potrebna dva encima, ki potrebujeta maksimalno aktivnost AA. To sta prokolagen-prolin dioksidogenaza (prolil hidroksilaza) in prokolagen-lizin 5-dioksidogenaza (lizil hidroksilaza). Posttranslacijska hidroksilacija prolina in lizina je potrebna za stabilno tvorbo kolagena. Pomanjkanje AA lahko privede do manjše sinteze kolagena in posledično skorbuta (3).

AA tudi vpliva na biosintezo karnitina. Za biosintezo karnitina sta potrebna dva dioksidogenazna encima (ϵ -N-trimetilizin hidroksilaza in γ -butirobetain hidroksilaza), ki za uspešno delovanje potrebuje AA za ohranitev reducirane oblike železa (Fe^{2+}), ki je vezan na encim. Karnitin sodeluje pri transportu dolgoveržnih nasičenih maščobnih kislin do mitohondrijev, kjer poteče β -oksidacija. Pomanjkanje AA posledično povzroča utrujenost in zaspanost (3,4).

V nadledvični žlezi se nahajajo velike količine vitamina C (5), ki je kofaktor pri biosintezi kateholamina, natančneje pri pretvorbi dopamina v noradrenalin s pomočjo encima dopamin- β -monooksigenaze (dopamin β -oksidaza) (3). Dopamin β -oksidaza je tetramer. Vsak monomer vsebuje dva bakrova iona (Cu^+), ki ostaneta v reducirani obliki s pomočjo AA in s tem ohranja aktivnost encima (2).

AA igra tudi pomembno vlogo antioksidanta in preprečuje nastanek številnih bolezni, kot so rak, krvožilne bolezni, diabetes, saj odstranjuje škodljive proste radikale. Prosti radikali lahko nastajajo v številnih procesih znotraj celic, kot na primer pri avtooksidacijah, fagocitozah, presnovah različnih snovi (cigaretni dim, zdravila, nečistote,...). Med proste radikale spadajo hidroksi, peroksi in superoksidni radikali. Številne radikale v telesu presnavlja encim superoksid dismutaza, ki katalizira redukcijo superoksidnih radikalov do tvorbe vodikovega peroksida in vode. Katalaze in glutation peroksidaze pa pretvorijo škodljiv vodikov peroksid v vodo in kisik. Askorbat (AA anion), ki je sekundarni antioksidant, dopolnjuje vlogo odstranjevanja škodljivih prostih radikalov v telesu, saj donira elektron prostemu radikalju do nastanka neškodljivega produkta, askorbat pa se pretvori v semidehidroaskorbat (AA radikal). Dva semidehidroaskorbata pa tvorita DHA in askorbat (AA anion). AA tudi obnavlja vitamin E, ki je pomemben fiziološki antioksidant, saj med drugim tudi ščiti lipide pred peroksidacijo (3). V študiji so dokazali, da lahko AA prepreči oksidacijo LDL zaradi prekomernega kajenja in s tem zmanjša verjetnost nastanka ateroskleroze. Po enomesečnem jemanju visokega odmerka AA (1 g/dan) so ugotovili, da se zmanjša količina reaktivnih spojin tiobarbiturne kisline, ki nastaja kot produkt oksidacije LDL (6).

Z jemanjem vitamina C se zmanjša pojav poškodbe mišic. Eden od vzrokov za pojav poškodbe je vdor makrofagov na obolelo mesto. Makrofagi sproščajo proste radikale, ki povzročajo nadaljnje poškodbe tkiva. Vitamin C in ostali antioksidanti odstranjujejo proste radikale in preprečijo širjenje poškodb (7).

Prav tako vpliva na povečano absorpcijo železa, tako da reducira Fe^{3+} v Fe^{2+} in s tem poskrbi, da so jetra, vranica in kostni mozeg, ki skladiščijo železo, dobro preskrbljeni s tem elementom (3).

AA ima pomembno vlogo pri zmanjšanju histaminske aktivnosti in krepitvi obrambne sposobnosti našega imunskega sistema, saj povečuje kemotakso nevtrofilcev in tvorbo limfocitov T (2,3). Histamin sodeluje pri obrambi imunskega sistema, poveča prehodnost kapilar in s tem olajša dostop imunskih faktorjev do mesta poškodbe oziroma infekcije. Presežek histamina pa povzroča vnetje in vročino, zato je v tem primeru pomemben vitamin C, ki zmanjšuje koncentracijo histamina v telesu. Nevtrofilci odstranjujejo patogene organizme s fagocitozo in znotrajcelično encimsko razgradnjo. Kemični signali, ki nastajajo na mestu okužbe, povečajo aktivnost nevtrofilcev. Toda histamin zniža aktivnost nevtrofilcev s povečanjem znotrajcelične koncentracije cikličnega adenzina 3',5'-monofosfata (cAMP). AA zniža vpliv histamina in poveča delovanje nevtrofilcev.

Limfociti T uničujejo viruse tako, da prepoznajo okuženo celico, sprostijo limfokine (interferon) in povzročijo apoptozo (celična smrt) okužene celice.

Vsakodnevno jemanje vitamina C (50 mg) zmanjša pojavnost prehlada, vendar nima vpliva na trajanje in jakost prehlada (8).

1.3. KOŽA IN ASKORBINSKA KISLINA

Veliko kozmetičnih izdelkov za dermalno uporabo vsebuje vitamin C, vendar je zelo malo takšnih, ki zares učinkujejo. Prvič zato, ker je vsebnost C-vitamina v izdelkih zelo nizka, drugič zaradi slabe stabilnosti vitamina C ob stiku z zrakom in svetlobo ter tretjič zaradi slabe absorpcije v kožo. Vitamin C ima veliko pozitivnih učinkov za kožo. Uporabljajo ga kot antioksidant, ki zmanjša od UV žarkov povzročene poškodbe, kot so eritem, sončne opekline, kronično UV fotostaranje in kožni rak (9). Vitamin C poveča sintezo kolagena v mlajših in starejših fibroblastih in hkrati posvetli kožo, saj zmanjša njeno pigmentacijo in poveča razgradnjo melanina (10). Vitamin C z vitaminom E deluje sinergistično pri UV zaščiti, ker obnavlja oksidiran vitamin E (9).

Vitamin C zaradi slabe stabilnosti derivatizirajo v askorbil-6-palmitat in magnezijev askorbil fosfat, ki sta najbolj pogosto uporabljena derivata v kozmetičnih izdelkih. Da bi dosegli visok učinek delovanja vitamina C, morajo kozmetični izdelki vsebovati visoko koncentracijo (vsaj 10 %) L-askorbinske kisline, ki mora biti stabilna in se nahajati v pH sistemu, nižjem od pKa, ki je 4,2 (optimalno pri pH 3,5) (9).

Askorbil palmitat je bolj lipofilen in hitreje prehaja skozi kožo od askorbil fosfata, zato potrebuje askorbil fosfat ustrezen dostavni sistem, ki bo olajšal difuzijo skozi kožo. Primer dostavnega sistema so lipidni nanodelci, liposomi in miceli (10).

Palmitinski ester vitamina C je amfifilna molekula. Ima nevtralen pH in ne draži kože. Aktivnost lipofilnih estrov AA je odvisna od položaja, kjer poteka estrenje. Če nastane ester na drugem ali tretjem C atomu v AA, potem je AA neaktivna, ker tak ester AA ne more oddajati elektrona (11).

AA upočasnjuje staranje. *In vitro* so dokazali, da se ob dodatku AA štirikrat bolj poveča razmnoževanje novonastalih celic, še bolj pa se poveča razmnoževanje starejših celic (9).

Dokazan je tudi protivnetni učinek AA, ker zmanjša aktivacijo transkripcijskega faktorja NF- κ B, ki je udeležen pri sintezi številnih vnetnih dejavnikov, kot so TNF- α (dejavnik tumorske nekroze alfa) in interlevkinov (IL-1, IL-6 in IL8). Vitamin C inhibira tudi encim tirozinazo, kar zmanjša sintezo melanina. Vsi omenjeni pozitivni dejavniki pripomorejo k upočasnitvi fotostaranja kože. S povečano sintezo kolagena in inhibicijo metaloproteinaze I (MMP I) se zmanjša nastanek gub, medtem ko se z zaviranjem encima tirozinaze in protivnetnim delovanjem zmanjša pigmentacija (9).

1.4. PREHRANSKI POMEN VITAMINA C

Večina živali lahko sintetizira vitamin C iz glukoze. Ljudje in morski prašički nimajo encima, ki je pomemben za sintezo vitamina C (gulonolakton oksidaza), zato morajo vitamin pridobiti iz hranil. Dolgotrajno pomanjkanje AA privede do okvar v posttranslacijski modifikaciji kolagena, posledično do skorbuta in v skrajnem primeru celo do smrti (12).

Po navedbah organizacije National Health and Nutrition Examination Survey je priporočen dnevni vnos vitamina C za odrasle moške 105,2 mg na dan, za odrasle ženske pa 83,6 mg dan (13). Mühleib F., avtor knjige Vitamini za zdravje in dobro počutje, priporoča dnevni odmerek AA 75 mg za mladostnike in odrasle, medtem ko za doječe matere in nosečnice med 100 in 125 mg na dan (3). Za kadilce je priporočen odmerek 140 mg na dan. Vitamin C se skladišči v omejenih količinah in sicer maksimalno do treh gramov. Presežek se izloči skozi

ledvice. Za vzdrževanje maksimalne zaloge, bi morali vsak dan vnesti 200 mg C vitamina, vendar ni dokazano, da so polne zaloge potrebne za optimalno delovanje (11).

Nekateri znanstveniki celo zagovarjajo vnos več kot 1 grama vitamina C na dan, kar so določili na podlagi prehranskih navad nekaterih opic (14).

Pretirano uživanje vitamina C lahko povzroči nastanek ledvičnih kamnov iz soli oksalne in sečne kisline. Dnevne količine nad 10 gramov lahko povzročijo neželene učinke, kot so driska, povečano izločanje urina in kožni izpuščaji (15).

Znanstveniki so ugotovili, da ima enaka količina zaužitega C vitamina večji učinek pri otrocih kot odraslih ljudeh. Razlog za to je lahko manjša telesna masa otrok oziroma večji odmerki glede na telesno maso ali pa od starosti odvisne fiziološke spremembe med otroki in odraslimi osebami (16).

Najboljši naravni viri vitamina C so brokoli, paradižnik, brstični ohrovt, agrumi, jagodičje, kivi, zelena in listnata zelenjava, cvetača, krompir in paprika (Preglednica I). Večji učinek vitamina C se lahko doseže, če ga jemljemo skupaj z bioflavonoidi, kalcijem in magnezijem (15). AA se pri pomanjkanju lahko jemlje tudi v obliki prehranskih dopolnil. AA zaradi terapevtske vrednosti ali pa kot stabilizator za preprečevanje oksidacij dodajajo določenim zdravilom (Preglednica II). Vitamin C je zaradi antioksidativnih lastnosti zelo uporaben tudi v živilski industriji, predvsem kot stabilizator (17). Njegova oznaka je E300 (18). AA ohranja barvo in aromo proizvodov ter izboljša njihovo obstojnost (19). Kot antioksidacijsko sredstvo dodajajo AA pri proizvodnji piva, sadnih sokov, konzerviranega sadja in zelenjave, pri prekajevanju mesnih izdelkov itd. Estri AA, predvsem askorbil palmitat se uporabljajo za antioksidativno zaščito olj in maščob (19).

Preglednica I: Prikaz vsebnosti in priporočene dnevne količine vitamina C v različnih živilih (Priporočena dnevna količina vitamina C za odrasle je 75 mg) (povzeto po 3)

Količina (g)	živilo	vsebnost (v mg)	delež priporočene dnevne količine (%)
100	krompir, surov	22	29
100	beluši, surovi	28	37
100	zelje, surovo	47	63
100	brstični ohrovt, surov	102	136
100	brokoli, surovi	110	147
100	paprika, surova	140	187
100	grenivka	41	55
100	jagode	62	83
100	kivi	150	200
100	črni ribez	285	380

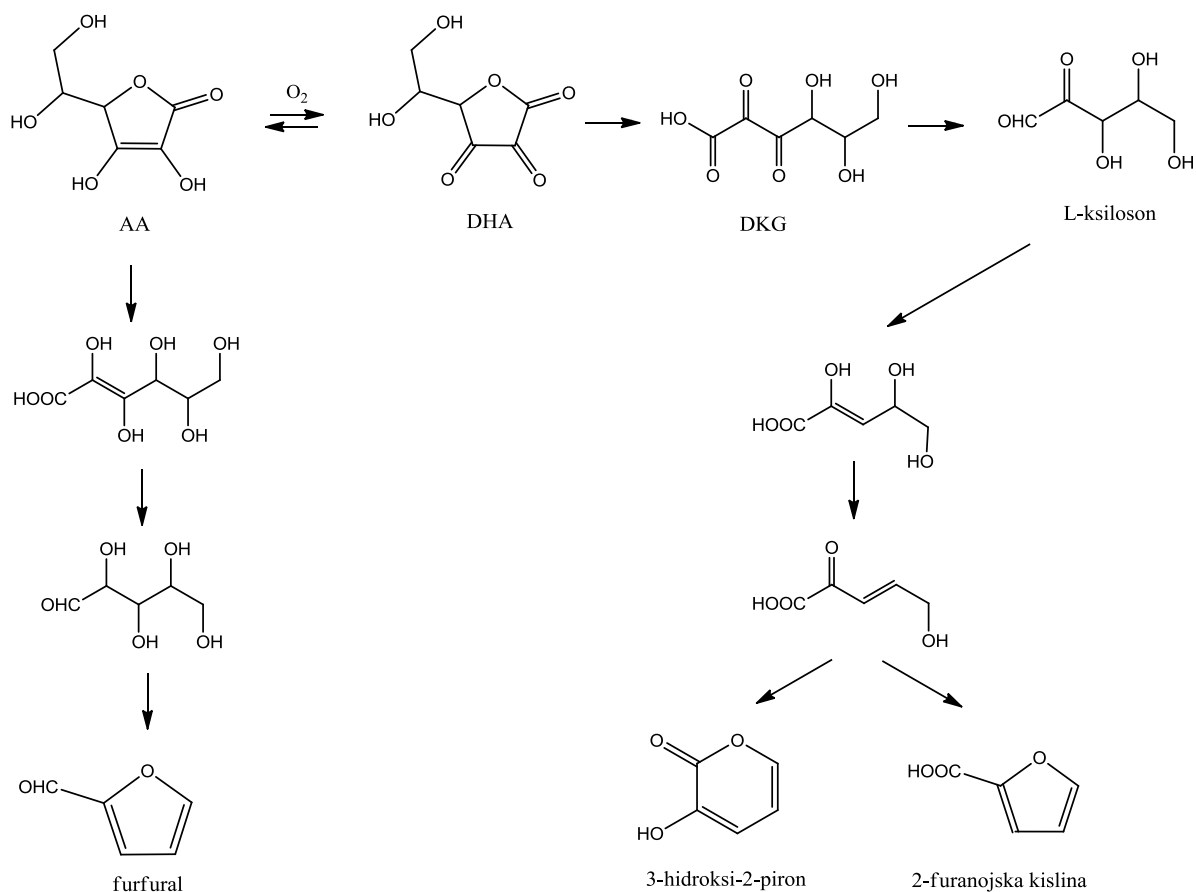
Preglednica II: Prikaz nekaterih prehranskih dopolnil in zdravil z vsebnostjo AA (povzeto po 20)

Prehransko dopolnilo, zdravilo	Delovanje
Sensilab Železo + Vitamin C (Sensilab)	prehransko dopolnilo (antioksidant)
ImmunoGran (Fidimed)	prehransko dopolnilo (antioksidant)
Daleron C junior (Krka, d.d., Novo mesto)	krepitev imunskega sistema
Lekadol plus C (Lek)	krepitev imunskega odziva in nadomestitev porabljenih AA med boleznijo
Pikovit (Krka, d.d., Novo mesto)	prehransko dopolnilo
Strepsils vitamin C z okusom pomaranče (Reckitt Benck)	krepitev imunskega sistema
Simvastatin Teva	stabilizator
Vasilip (Krka, d.d., Novo mesto)	stabilizator
Aspirin plus C (Bayer Pharma d.o.o.)	krepitev obrambnega sistema, antioksidant, zaviranje vnetja

1.5. STABILNOST ASKORBINSKE IN DEHIDROASKORBINSKE KISLINE

Razgradnja askorbinske kisline je zelo kompleksna in obsega številne redoks reakcije in intermolekularne premestitve (21). Na sliki 2 sta prikazani dve razpadni poti askorbinske kisline v kisli vodni raztopini. V aerobnih pogojih poteka oksidacija askorbinske kisline do dehidroaskorbinske kisline. Nato poteka hidroliza in cepitev obroča dehidroaskorbinske kisline do tvorbe 2,3-diketo-L-gulonske kisline. 2,3-diketo-L-gulonska kislina dekarboksilira do nastanka L-ksilosona. Na L-ksilosonu poteče intermolekularna redoks reakcija in dehidracija do nastanka dveh končnih produktov 2-furanojske kisline in 3-hidroksi-2-pirona.

V anaerobnih pogojih ne pride do tvorbe dehidroaskorbinske kisline. Namesto DHA nastane furfural po cepitvi obroča askorbinske kisline, adiciji vode, dekarboksilaciji in intermolekularni premestitvi (22).



Slika 2: Razpadna pot askorbinske kisline v vodni raztopini pri aerobnih in anaerobnih pogojih (povzeto po 22)

Pomembna dejavnika pri stabilnosti askorbinske kisline sta temperatura in pH raztopine. Rezultati raziskav so pokazali, da je bila koncentracija nastalega razgradnega produkta furfurala 2,88 mg/L, 3-hidroksi-2-pirona pa 3,68 mg/L pri dvournem segrevanju AA v kisli

raztopini (pH 4) na temperaturi 100 °C. Pri segrevanju AA na temperaturi 60 °C pa je bila koncentracija nastalega produkta furfurala 0,01 mg/L, 3-hidroksi-2-pirona pa 0,4 mg/L. Pri nizki pH vrednosti raztopine se iz AA tvorijo furfurali, 2-furanojska kislina in 3-hidroksi-2-piron, pri ekstremno nizki pH vrednosti raztopine (okoli pH 1) pa prevladuje tvorba furfuralov. V alkalni raztopini (pH 10) nastane iz AA zelo malo furfuralov, 3-hidroksi-2-pironov in nič 2-furanojske kisline (22).

Na stabilnost AA v vodnih raztopinah vplivajo poleg pH raztopine in temperature tudi prisoten kisik, kovinski ioni, encimi (npr. askorbat oksidaza), svetloba in koncentracija AA. V fosfatnem pufru pri pH vrednosti 4,5 je stabilnost AA po 60 min 98,2 %, pri pH 6,0 je 95,6 %, pri pH 6,8 pa 84,5 %. AA je prvih 60 min stabilna (95,6 %) pri temperaturi 25 °C v fosfatnem pufru s pH 6, pri temperaturi 40 je stabilnost okoli 75 %, pri 60 °C pa 20 %. Stabilnost AA je boljša v kislem kot v bazičnem okolju, še bolj pa jo lahko optimaliziramo z uporabo metafosforne kisline, aminokislin, sladkorjev, kelatorjev (EDTA) v raztopini in če jo shranjujemo pri nizkih temperaturah v temnem okolju (23, 24).

Preglednica III prikazuje vpliv sestave in pH pufra ter prisotnost Cu^{2+} ionov na kemijsko stabilnost AA. Reakcija oksidacije poteka po kinetiki prvega reda. Pri preučevanju citratnega, ftalatnega in acetatnega pufra z različnimi pH vrednostmi v prisotnosti Cu^{2+} ionov so ugotovili, da je hitrost oksidacije najmanjša v citratnem pufru, ker tvori citrat močne komplekse z bakrovimi ioni. Citronska kislina se posledično pogosto uporablja kot konzervans v sadnih sokovih. V ftalatnem pufru med pH 3,1 in 3,3 je stabilnost AA najmanjša, ker v tem pH območju ftalna kislina izgublja proton in lahko tvori nenasičen kompleks z bakrovimi ioni. Bakrovi ioni (Cu^{2+}) lahko reagirajo z AA in jo oksidirajo. Podobno se dogaja pri acetatnem pufru v pH območju med 4.2 - 6.2 (25).

Preglednica III: Vpliv različnih pufrov s Cu^{2+} ioni na stabilnost AA (povzeto po 25)

Pufer	pH	$K \pm S_k (\text{M}^{-1} \text{min}^{-1})$	R^2
Acetat	3.22	95.04 ± 6.22	0.9915
	4.50	240.7 ± 8.83	0.9973
	5.60	628.2 ± 10.8	0.9994
Citrat	3.35	31.06 ± 2.93	0.9825
	4.50	48.56 ± 0.994	0.9992
	6.00	40.64 ± 1.19	0.9983
	6.50	33.76 ± 2.36	0.9918
Ftalat	3.10	247.4 ± 7.41	0.9977
	4.27	142.9 ± 6.51	0.9850
	6.19	233.6 ± 8.82	0.9750

S_k - standardna deviacije konstante hitrosti oksidacije (K) pod vplivom Cu^{2+} ionov

R^2 - determinacijski koeficient

K - konstanta hitrosti oksidacije

Podatkov o stabilnosti AA v trdni obliki je zelo malo, vendar je znano, da so tablete z vsebnostjo AA stabilne vsaj 5 let pri sobni temperaturi in relativni vlažnosti 55 – 65 % (26). Na stabilnost AA v trdni obliki najbolj vpliva temperatura, vlaga in sestava vsebnika za shranjevanje trdnih oblik (prašek, tablete, pelete,...). V eni od redkih študiji na tej problematiki so preučevali vpliv sestave vsebnikov za shranjevanje tablet na stabilnost AA pri temperaturi 30 ± 2 °C in relativni vlažnosti 65 ± 5 %. Uporabljali so štiri različne vsebnike, ki so bili sestavljeni iz polipropilena, aluminija s polivinilkloridom, stekla in aluminija s polietilenom. Tablete z AA so bile najbolj stabilne v vsebnikih iz aluminija in polietilena, najmanj pa v vsebnikih iz aluminija in polivinilklorida (27).

1.6. METODE DOLOČEVANJA ASKORBINSKE KISLINE IN DEHIDROASKORBINSKE KISLINE

1.6.1. Metode določevanja askorbinske kisline

Poznamo številne metode za določevanje askorbinske kisline, kot so titracija, spektrofotometrija, fluorometrija, voltometrija, elektroforeza in tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC). Slabost teh metod razen HPLC je, da slabo ločijo AA od DHA in ostalih razpadnih produktov vitamina C. Pri HPLC metodi se pojavi problem občutljivosti pri direktnem merjenju DHA z UV-VIS detektorjem zaradi pomanjkanja kromoforja v strukturi (28). Metode za določevanje AA in DHA lahko razdelimo na dve večji kategoriji in sicer na metode, ki temeljijo na redoks reakcijah in metode, pri katerih se tvorijo kromoforni in fluoroforni derivati (2).

Redoks reakcije

Ena izmed metod za določevanje askorbinske kisline, ki temelji na njeni redukcijski sposobnosti, je titracijska metoda. Pri titracijski metodi AA reducira barvilo 2,6-diklorofenol-indofenol. Barvilo 2,6- diklorofenol-indofenol je v kisli raztopini obarvano rožnato, v alkalni pa modro in ima absorpcijski maksimum pri 518 nm (2). Pri titraciji AA z 2,6-diklorofenol-indofenolom se barvilo reducira in razbarva dokler je prisoten AA. Titracija je zaključena, ko dodano barvilo ostane rožnato v kisli raztopini. Količino porabljenega barvila se preračuna na mg AA/100g vzorca (29). Problem te metode je slaba specifičnost. AA lahko namreč reducira tudi druge snovi, kot so cistein, tiosulfati, bakrove in železove ione. Vse omenjene snovi je potrebno odstraniti, sicer dobimo lažno nizke rezultate za AA (19). Prav tako motijo prisotni reducenti, ki lažno povečajo vrednosti AA (2). Druge pomanjkljivosti metode so še nejasna končna točka titracije, slabša natančnost. S to metodo ne moremo določevati DHA. Prednosti metode sta njena hitrost in občutljivost (19).

Druge titracijske metode, ki prav tako temelji na redukcijski sposobnosti AA, je redukcija Fe (III) v Fe (II). Pri tem Fe (II) ioni tvorijo kompleks z 2,2'-dipiridinom, ki ga kolorimetrično določimo (2).

Podobno, vendar spektrofotometrično določamo AA z redukcijo Fe(III) v Fe(II). Reducirana oblika železa reagira z 1,10-fenantrolinom, ki absorbira svetlobo pri valovni dolžini 515 nm (30).

Reakcije z derivatizacijo

Metoda, ki ne temelji na redukcijskih lastnostih AA, je kolorimetrična z uporabo 2,4-dinitrofenilhidrazina. Princip metode je oksidacija AA do DHA, ki reagira z 2,4-dinitrofenilhidrazinom do tvorbe obarvanega osazona (2,4,-dinitrofenilhidrazon), ki ga spektrofotometrično merimo pri 520 nm. Metoda je slabo specifična, saj 2,4,-dinitrofenilhidrazin lahko reagira tudi z diketoni (npr. diketogulonska kislina), sladkorji. (2,19).

Poznamo metodo, ki prav tako temelji na oksidaciji AA do DHA in nato derivatizaciji z o-fenildiaminom do nastanka fluorofora kinoksalina. Intenzivnost fluorescence se meri pri 430 nm. Detekcijo lahko motijo ostale prisotne fluorescirajoče snovi (2).

1.6.2. Določevanje AA in DHA s HPLC metodo

Kromatografske metode so med sodobnimi metodami najbolj zanesljive, saj omogočajo popolno ločbo AA od ostalih spojin, ki lahko motijo analizo. Razvili so postopke določanja AA s papirno kromatografijo, tankoplastno, tekočinsko in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Metoda HPLC je primerna za hitro določitev AA in DHA, poleg tega je metoda selektivna, občutljiva, zahteva malo vzorca in je primerna za rutinske analize (19).

Vitamin C lahko določamo na različne načine in sicer prvi način z redukcijo DHA do AA in merjenjem celokupne koncentracije AA, drugi z oksidacijo AA do DHA in merjenjem celokupne koncentracije DHA in tretji s sočasnim določevanjem AA in DHA, kjer AA določujemo direktno, DHA pa po predkolonski ali postkolonski derivatizaciji na primer z o-fenildiaminom oziroma s 4,5-dimetil-1,2-fenildiaminom (DMPD) (2, 31).

Redukcija DHA do AA in merjenje celokupne koncentracije AA

Pri tej metodi se določa vsebnost vitamina C kot celokupna koncentracija AA, ki je seštevek AA pred redukcijo in dodatne AA, ki nastane po redukciji njenega oksidacijskega produkta. DHA dobro absorbira UV svetlobo v raztopini pri 185 nm, vendar slabo absorbira UV svetlobo višjo od 200 nm. Merjenje pri 185 nm ni natančno, ker pri tej valovni dolžini absorbirajo še druge snovi, kot so sestavine pufrov in raztopljeni plini. DHA zato pogosto posredno določamo s predhodno redukcijo v AA in z merjenjem razlike v koncentraciji AA v vzorcu pred in po redukciji. Takega načina določevanja DHA smo se tudi mi poslužili v našem diplomskem delu.

DHA lahko reduciramo do AA z uporabo reductentov s tiolno skupino, kot so cistein, homocistein, 2-merkaptoetanol in ditiotreitrol (DTT). Problem tiolnih reductentov je, da so slabo stabilni z nizkim redukcijskim potencialom v kislem okolju, kjer sta AA in DHA stabilni. Stabilnost in redukcijski potencial povečamo z uporabo reductenta tris-(2-karboksietil) fosfin hidroklorida (TCEP) v kislem okolju (32). TCEP je nehlapen in vodotopen ter je pri pH vrednostih nad 7,5 bolj stabilen od DTT. TCEP je prav tako močnejši reductent in hitreje reagira od DTT pri pH vrednostih, ki so nižje od 8, zato je bolj uporaben reductent v širokem pH območju (1,5 – 8) (28). TCEP je učinkovit v metafosforni kislini pri pH 1,9. Za rutinsko določevanje DHA in celokupne AA je redukcija DHA v AA v metafosforni kislini dovolj hitra, saj poteče kar 99 % redukcije v približno 20 minutah (33).

Oksidacija AA do DHA in merjenjem celokupne koncentracije DHA

Princip te metode je oksidacija AA do DHA in sledeča derivatizacija celokupne DHA. Oksidacijo AA lahko izvedemo z dodatkom joda ali kovinskih ionov pri nizki pH vrednosti oziroma z dodatkom encima askorbat oksidaze pri nevtralnem pH. DHA je manj stabilen od AA, zato je potrebno izvesti derivatizacijo DHA takoj po oksidaciji AA. Derivat kinoksalin ima prav tako omejeno stabilnost in sicer od 8 do 12 ur v metafosforni kislini. Metoda je selektivna, občutljiva in brez interakcij z metafosforno kislino. Slabost je v slabi stabilnosti derivata kinoksalina (2).

Sočasno določevanje AA in DHA

Pri tej metodi določamo AA in DHA sočasno in sicer AA na direkten način, DHA pa določamo s postkolonsko derivatizacijo z o-fenildiaminom do nastanka fluorofora kinoksalina. Koncentracije DHA so po navadi nižje od AA in lahko že majhen razpad AA močno vpliva na dvig koncentracije DHA (2).

AA in DHA lahko določujemo sočasno tudi tako, da najprej AA direktno določimo z UV detektorjem na valovni dolžini 245 nm, DHA pa predkolonsko po derivatizaciji z DMPD na valovni dolžini 360 nm. Derivatizacija DHA z DMPD naj bi bila specifična s kratkim reakcijskim časom (31).

AA in DHA lahko določujemo tudi z uporabo masne spektrometrije sklopljene s tekočinsko kromatografijo, kjer se ioni analita ločijo glede na razmerje med maso in nabojem (m/z) (32). Metode na osnovi masne spektrometrije so bolj specifične in občutljive vendar so dražje in niso tako široko dostopne. Ker se molski masi AA in DHA razlikujeta le za 2 Da, ju z masno spektroskopijo težje kvantitativno vrednotimo na direkten način. Zato se za lažje določanje

obeh spojin uporablja derivatizacija z N-(terc-butildimetilsilil)-N-metil-trifluoroacetamidom, saj ima DHA za derivatizacijo primerni dve mesti, medtem ko jih ima AA štiri, kar vpliva na razmerje med maso in nabojem (m/z) molekulskega iona $[M^+]$ DHA in AA (32,34).

1.7. HPLC

Kromatografija je splošno ime za separacijske tehnike. Cilj kromatografske metode je ločitev posameznih komponent vzorca in jih nato kvalitativno ali kvantitativno določiti z ustreznim detektorjem. Komponente v vzorcu se ločijo med seboj na podlagi različnih fizikalnih in kemijskih interakcij z mobilno in stacionarno fazo (35). Mobilna faza v kromatografiji je lahko tekočina ali plin, medtem ko je stacionarna faza trdna snov ali tekočina. Kromatografijo razdelimo na plinsko in tekočinsko. Tekočinsko kromatografijo lahko delimo še na kolonsko (visokotlačna – HPLC in nizkotlačna – LPLC, MPLC) in tankoplastno (36).

Čim boljšo ločitev komponent želimo doseči v čim krajšem času, z optimizacijo vseh parametrov in komponent kromatografskega sistema (35).

HPLC ali tekočinska kromatografija visoke ločljivosti je postala zelo razširjena metoda v farmacevtski industriji. Velja za selektivno, točno, ponovljivo, robustno in visoko ločljivo metodo. HPLC se primarno uporablja za iskanje in detektiranje nečistot v učinkovinah ter za ugotavljanje količine in identitete učinkovin in razpadnih produktov v stabilnostnih študijah (37).

Separacijske tehnike (38)

HPLC vključuje različne separacijske tehnike z različnimi mehanizmi zadrževanja molekul vzorca v stacionarni fazi. Na voljo so kolone, ki omogočajo ločevanje molekul glede na obliko, naboj in velikost. Ločimo štiri osnovne metode separacije:

1. Porazdelitvena kromatografija

Porazdelitvena kromatografija spada med najpogosteje uporabljene kromatografske metode. Stacionarna faza je vezana na trden nosilec. Glede na polarnost stacionarne in mobilne faze ločimo dva tipa porazdelitvene kromatografije:

- Normalno – fazna kromatografija

Stacionarna faza je polarna (NH_2 , CN, silikagel), mobilna faza pa relativno nepolarna, sestavljena iz različnih topil (etileter, kloroform, n-heksan). Kolone so večinoma polnjene s

silikagelom. Ta tip porazdelitvene kromatografije je primeren za ločevanje srednje do močno polarnih analitov.

- Reverzno – fazna kromatografija

V tem primeru je mobilna faza polarna (voda, acetonitril, metanol), stacionarna pa bolj nepolarna (fenil, C₄, C₈, C₁₈) in je primerna za ločevanje manj polarnih vzorcev.

2. Ionsko – izmenjevalna kromatografija

V tej metodi se ioni reverzibilno izmenjujejo med mobilno in stacionarno fazo. Stacionarna faza je kationski (npr. kvarterni amini) ali anionski (npr. alkilsulfoni) ionski izmenjevalec. Princip ionske izmenjave temelji na ravnotežju izmenjave med ioni vzorca v raztopini in ioni enakega predznaka na površini stacionarne faze. Metoda je uporabna za ločevanje ioniziranih molekul, proteinov, DNK.

3. Gelska kromatografija

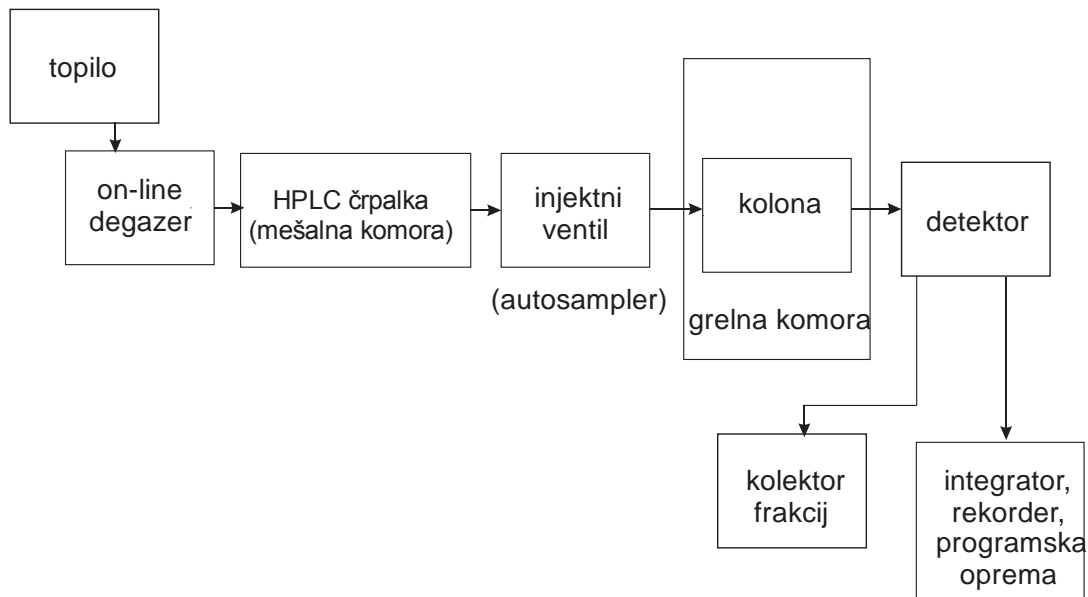
Pri gelski kromatografiji vsebujejo kolone porozne delce različnih premerov. To nam omogoča, da lahko ločimo komponente vzorca na osnovi njihove velikosti in oblike. Če so molekule večje od povprečne velikosti por, ne morejo difundirati vanje, zato se ne zadržujejo in eluirajo prve iz kolone. Manjše molekule pa se ujamejo v pore in zadržujejo v koloni. Uporabna je ločevanje molekul po velikosti in obliki, zlasti za makromolekule kot npr. proteine.

4. Adsorpcijska kromatografija

Vzorec se porazdeljuje med tekočo mobilno fazo in trdno stacionarno fazo. Privlačnost do delcev stacionarne faze povzroča zadrževanje molekul vzorca. Predvsem se uporablja za ločevanje nepolarnih spojin z omejeno topnostjo v vodnem mediju.

HPLC sistem

Osnovna sestava HPLC aparature je prikazana na sliki 3:



Slika 3: Sestava HPLC aparature (povzeto po 36)

Topilo (mobilna faza)

Pred uporabo moramo mobilno fazo nujno filtrirati skozi 0,45 ali 0,20 μm filter. HPLC topila morajo biti praviloma zelo čista (vsaj HPLC grade). Topila se morajo mešati med seboj, ne smejo kemijsko reagirati s stacionarno fazo in morajo biti kompatibilna z detektorjem (36).

Razplinjevalec (degazer)

V večini primerov moramo mobilne faze razpliniti, kar lahko naredimo off-line ali on-line. Pri off-line načinu razplinjujemo topila z ultrazvokom, vakuumskimi črpalkami in prepihanjem s helijem ali argonom. Slabost off-line razplinjevanja je resorpcija zraka po določenem času in nekontrolirana izguba hlapnih topil.

Pri on-line načinu razplinjujemo topila s helijskim ali z vakumskim razplinjevalcem, delujejo kontinuirano in razplinjujejo topila pred prihodom na kolono. V tem primeru ni resorpcije zraka, izguba hlapnih topil pa je konstantna in zanemarljiva (36).

Črpalka

Črpalka nam omogoča potiskanje mobilne faze skozi kolono. Visokotlačna črpalka potiska topilo s pritiskom tudi do 400 – 600 barov. Potreben pritisk je odvisen od sestave kolone, mobilne faze in njenega pretoka. Za visokotlačno mešanje uporabljamo binarne in kvarterne črpalke, ki nam omogočajo tudi gradientno izpiranje. Pri analizi se uporabljajo izključno batne črpalke, ki povzročajo pulzne signale na detektorju zaradi vlečenja in potiskanja. Amplitudo le teh lahko zmanjšamo z uporabo dvobatnih črpalk, elektronskih filtrov na

detektorju in montažo pulznih blažilcev ("pulse damper"). Črpalke morajo zagotavljati konstanten pretok mobilne faze za doseganje ustrezne ponovljivost analiz (36).

Injekcijski ventil

Za vnos vzorca na kolono se uporabljajo posebni injekcijski ventili, na katere se lahko pritrdijo različno velike zanke (sample loop), ponavadi 20 ali 50 μL . Pri vnosu vzorca se pri atmosferskem tlaku z injekcijsko iglo napolni zanka, ki se nato poveže s črpalko, ki odplakne vzorec na kolono. Volumen nanešenega vzorca na kolono nam določa velikost zanke. Sodobni instrumenti so opremljeni z avtomatskimi vzorčevalniki z nastavljivimi volumni injiciranja (običajno 0,1-100 μL), kjer poteka preklon ventila in polnjenje zanke avtomatsko (36).

Kolona

Kolona je glavni del HPLC instrumenta. Na njej poteka popolna ali delna ločitev zmesi na posamezne komponente. Kolone so ponavadi dolge od 50 do 250 mm z notranjim premerom od 2 do 4,6 mm. Delci, s katerimi polnimo kolone, imajo običajno premer 3 – 10 μm , najpogosteje se uporabljajo delci s premerom pod 5 μm . Preventivna je vezava predkolon, ki so mnogo krajše (ponavadi 4 mm) in preprečijo dostop nečistotam do kolone (36). Izbira ustrezne kolone je odvisna od narave analiziranih analitov, ponavadi se uporabljajo reverzno-fazne stacionarne faze (37).

Detektor

Vloga detektorjev je identifikacija in določitev (kvantifikacija) posameznih komponent, ki se ločujejo na kromatografski koloni (39). Detektor zabeleži spremembe fizikalnih lastnosti mobilne faze ob eluciji komponent vzorca iz kolone in jih prevede v električni signal. Poznamo univerzalne detektorje, ki merijo lastnost (lomni količnik, dielektrična konstanta, gostota) mobilne faze, ki se zaradi prisotnosti vzorca spremeni ter specifične (UV-VIS, fluorescenčni, elektrokemijski, masni), ki se odzivajo na lastnost substance v vzorcu, kot je npr. absorbanca UV-VIS svetlobe, fluorescenca. Slabost univerzalnih detektorjev je, da so slabo občutljivi in je onemogočeno delo z nizkimi koncentracijami, slabost specifičnih pa, da so zelo občutljivi le za omejeno število kemijskih spojin. Poznamo tudi diode-array detektorje, ki so UV-VIS detektorji, le da nam omogočajo trodimenzionalno sliko (čas, intenziteta in valovna dolžina). Primerni so za določevanje nečistot in sorodnih spojin, ki se težko ločijo na koloni (36).

Sistem za vrednotenje rezultatov

Danes se večinoma uporablja za vrednotenje rezultatov programska oprema, ki jo instaliramo na osebne računalnike. Taki programi nam nudijo široke možnosti pri ovrednotenju kromatogramov in integraciji instrumentov v laboratorijih in industriji (36).

2. NAMEN DELA

Askorbinska kislina ima številne biološke funkcije pri živalih, rastlinah in ljudeh. Ena od pomembnih funkcij je vpliv na sintezo kolagena in posledično tvorbo in zaščito hrustanca, kosti, kože in zobovja. AA okrepi imunski sistem, saj zvišuje aktivnost levkocitov. Je eden od najučinkovitejših in najmanj toksičnih antioksidantov. Ima obrambno vlogo proti različnim z oksidativnim stresom povezanih boleznih, kot so rak, kardiovaskularne bolezni, Alzheimerjeva bolezen, diabetes (1).

Pri pregledu literature smo ugotovili, da je bilo veliko raziskav v zvezi z askorbinsko kislino narejenih v tekoči fazi. Stabilnost AA so raziskovali v vodnih raztopinah, mikroemulzijah za dermalno uporabo, bioloških vzorcih, zelo malo pa v trdni obliki. Da bi pridobili večji vpogled v stabilnost AA v trdnem agregatnem stanju, bomo raziskali stabilnost AA v prašku kot trdni farmacevtski obliki.

Za določevanje vsebnosti AA in njenega oksidativnega produkta DHA bomo poskusili razviti ustrežno metodo, ki bo temeljila na HPLC metodi. Vsebnost AA bomo določevali direktno z UV detektorjem pri valovni dolžini 245 nm. Ker DHA slabo absorbira UV svetlobo pri valovnih dolžinah nad 200 nm, jo bomo poskusili določevati po derivatizaciji z reagentom 4,5-dimetil-1,2-fenildiaminom (DMPD) pri valovni dolžini 360 nm. V primeru neuspešnosti te metode, bomo razvili novo metodo, s katero bomo DHA določevali posredno z redukcijo. Ustreznost razvite metode bomo preverili z validacijo in nato validirano metodo uporabili v stabilnostni študiji. Stabilnost AA bomo vrednotili kot vsebnost AA, z nastankom njegovega oksidacijskega produkta DHA in z vizualnim pregledom vzorcev.

Namen naše stabilnostne študije bo ugotoviti stabilnost AA v obliki praška pri različnih pogojih v časovnem obdobju do šestega tedna. Askorbinsko kislino bomo izpostavili dejavnikom, za katere predpostavljamo, da lahko vplivajo na njegoovo stabilnost in sicer povišanim temperaturam (40 °C, 60 °C in 80 °C) in različnim koncentracijam kisika (pod 0,5 %, 2 %, 5 %, 10 % in 21 % kisika). Vzorci AA, ki bodo izpostavljeni tem izbranim pogojem, bodo vsebovali samo AA. Poleg teh bo del vzorcev predstavljala zmes askorbinske kisline in škroba v razmerju 1 : 9, ker želimo s tem čim bolj realno posnemati trdne farmacevtske oblike z AA ter preveriti vpliv vezane vode v škrobu na stabilnost AA.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

UČINKOVINA:

- Askorbinska kislina, 99,5 %, Krka d.d., Novo mesto
- Dehidroaskorbinska kislina, Sigma-Aldrich

VZORCI:

- 1000 mg praškasta zmes askorbinske kisline in škroba v razmerju 1 : 9
- 100 mg askorbinske kisline v obliki praška

TOPILA IN REAGENTI:

- acetonitril, LiChrosolv[®], HPLC grade, $\geq 99,9$ %, Merck
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (dinatrijev hidrogenfosfat dihidrat) - for analysis, Emsure[®], Merck
- $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3 \text{H}_2\text{O}$ (natrijev acetat trihidrat) - for analysis, Emsure[®], Merck
- CH_3COOH (ocetna kislina) – 100 %, anhydrous for analysis, Emsure[®], Merck
- H_3PO_4 (fosforna kislina) - 85 %, For Laboratory, Research or Manufacturing use, J.T. Baker
- N-cetil-N,N,N-trimetilamonijev bromid (CTAB), pro analysi, Merck
- metafosforna kislina 33,5 % - 36,5 %, pro analysi, Fluka
- NaOH (natrijev hidroksid), pellets for analysis, Emsure[®], Merck
- tris-(2-karboksietil) fosfin hidroklorid (TCEP), powder, ≥ 98 %, Sigma-Aldrich
- 4,5-dimetil-1,2-fenildiamin (DMPD), 98 %, Sigma-Aldrich
- etilendiamintetraocetna kislina (EDTA), Titriplex[®] III, Merck
- voda: Milli Q, pridobljena iz prečiščene vode z aparatom Millipore Milli Q

APARATURE:

- HPLC instrument (Hewlet Packard, Series 1100) z binarno črpalko, razplinjevalcem, kolonskim termostatom, avtomatskim vzorčevalnikom (autosampler) brez hlajenja, UV-diode array detektorjem in programsko opremo EMPOWER
- avtomatska pipeta, 50 - 1000 μL , 100 - 5000 μL , Eppendorf
- tehtnica, XP 205, Mettler Toledo
- ultrazvočna kadička Sonis 20, Iskra pio d.o.o.

- vibrirajoči mešalnik (vorteks), EV-100, Tehnica Železniki
- magnetno mešalo, Metrohm AG Herisau Switzerland
- centrifuga, Multifuge 1 S-R, Heraeus
- pH meter, Mettler Toledo
- klima komora, SB 1/300, Weiss
- termostat, Ehret
- termostat, Heraeus instruments

3.2. RAZVOJ HPLC METODE ZA DOLOČEVANJE ASKORBINSKE IN DEHIDROASKORBINSKE KISLINE

3.2.1. Kromatografski pogoji

Vzorci smo analizirali na HPLC instrumentu (Hewlett Packard, serija 1100). Uporabljali smo Synergy Hydro-RP 80A (4 μm , 150 x 3,00 mm, Phenomenex) kromatografsko kolono. Temperaturo kolone smo nastavili na 40 °C. Pretok mobilne faze skozi kolono je bil 0,6 mL/min. Valovna dolžina UV detektorja je bila 245 nm. Injicirali smo 20 μL vzorca na začetku razvoja metode, kasneje po 5 μL .

Mobilna faza je sestavljena iz 40 mM fosfatnega pufra (pH 3,5) in acetonitrila v volumskem razmerju 95 : 5 s 5 mM koncentracijo ionsko parnega reagenta CTAB.

3.2.2. Priprava raztopin

Priprava mobilne faze

40 mM fosfatni pufer smo pripravili tako, da smo v litrsko bučo dodali 5,678 gramov dinatrijevega hidrogenfosfata dihidrata in dopolnili z Milli Q vodo do oznake. Bučo smo pustili v UZ kadički približno 5 minut. Vsebino smo prelili v čašo, ki smo jo postavili na magnetno mešalo ter počasi dodajali fosforno kislino do pH vrednosti 3,5. Nato smo pripravili mešanico fosfatnega pufra in acetonitrila v volumskem razmerju 95 : 5.

V mešanico fosfatnega pufra in acetonitrila smo počasi (za zmanjšanje penjenja) dodajali ionsko parni reagent cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB), ki tvori z ionizirano spojino nevtralen kompleks in ga uporabljamo za boljše ločevanje ioniziranih snovi na reverzno-fazni koloni. 5 mM raztopino cetiltrimetilamonijevega bromida (CTAB) smo pripravili tako, da smo natehtali 1,822 grama CTAB za pripravo enega litra raztopine.

Standardna raztopina askorbinske kisline

Standardno raztopino askorbinske kisline smo pripravili tako, da smo 5,0 mg askorbinske kisline natehtali v 10 mL bučko in jo dopolnili z acetatnim pufrom s pH 3,7 ali z metafosforno kislino s pH 5,5 oziroma 5,7 do oznake ter za približno 5 minut pustili v UZ kadički. 0,5 mg/mL koncentracija AA predstavlja v nadaljnji interpretaciji rezultatov 100 % koncentracijo AA. Z redčenjem z ustreznim topilom smo pripravili tudi 1, 2,5, 5, 10, 15, 20, 80, 85, 90, 95 in 97,5 % raztopine AA.

Standardna raztopina dehidroaskorbinske kisline

V 10 mL bučko smo natehtali 4,94 mg dehidroaskorbinske kisline, ki v nadaljnji interpretaciji rezultatov predstavlja 100 % raztopino DHA in dopolnili z acetatnim pufrom s pH 3,7 ali z metafosforno kislino s pH 5,5 oziroma 5,7 do oznake. Nato smo bučko pustili v UZ kadički za približno 5 minut. Iz osnovne 100 % raztopine DHA smo z redčenjem pripravili tudi 1, 2,5, 5, 10, 20, 30 in 40 % raztopino DHA. Končna koncentracija DHA v vzorcih je bila dvakrat nižja, saj smo v postopku reakcije dodali v enakem volumskem razmerju derivatizacijski reagent ali reducent.

Acetatni pufer

Za pripravo enega litra 80 mM koncentracije acetatnega pufru s pH 3,7 smo v bučo natehtali 10,89 gramov natrijevega acetata trihidrata in dodali 292,24 miligramov EDTA (1 mM) ter do oznake dopolnili z Milli Q vodo. Nato smo v raztopino počasi dodajali oetno kislino do želenega pH.

Metafosforna kislina

50 mM raztopino metafosforne kisline smo pripravili tako, da smo v litrsko bučo natehtali 3,999 g metafosforne kisline in dopolnili z Milli Q vodo do oznake. Približno 5 minut smo bučo pustili v UZ kadički, da se je vsa metafosforna kislina raztopila. Tako pripravljena raztopina je imela pH 1,9. Za pripravo metafosforne kisline s pH 5,5 oziroma 5,7 smo dodajali 1 M raztopino natrijevega hidroksida do želenega pH.

Za pripravo 1 M raztopine NaOH smo v 100 mL bučko natehtali 4,0 g natrijevega hidroksida in dopolnili z Milli Q vodo do oznake. Nato smo pustili bučko v UZ kadički približno 5 minut.

Raztopina derivatizacijskega reagenta 4,5-dimetil-1,2-fenildiamina (DMPD)

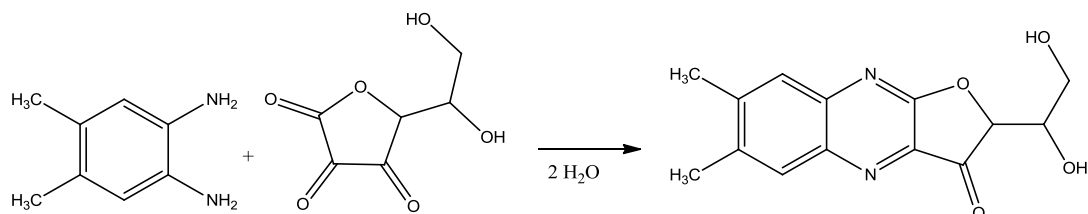
DMPD raztopino smo pripravili tako, da smo natehtali 10 mg DMPD v 10 mL bučko in dopolnili do oznake z acetatnim pufrom s pH 3,7 ali pa z metafosforno kislino s pH 5,7.

Raztopina reducenta tris-(-2-karboksietil) fosfina (TCEP)

Pripravljali smo različne koncentracije raztopine reducenta TCEP. Za pripravo 30 mM raztopine smo natehtali 43,0 mg v 5 mL bučko, jo dopolnili z metafosforno raztopino do oznake in pustili v UZ kadički približno 5 minut. Iz 30 mM TCEP smo z redčenjem z metafosforno kislino pripravili tudi 2, 10 in 20 mM raztopine TCEP. Končna koncentracija TCEP v reakcijski mešanici je bila dvakrat nižja, saj smo procesu reakcije dodali v enakem volumskem razmerju raztopino DHA.

3.2.3. Postopek derivatizacije in redukcije dehidroaskorbinske kisline

Za potek derivatizacije smo vnesli v epruveto 300 μ L raztopine DHA in enak volumen raztopine DMPD. Nato smo epruveto rahlo stresali na vorteksu in 10 minut centrifugirali pri 3500 obratih na minuto in 20 $^{\circ}$ C. Po končanem centrifugiranju smo iz epruvete prenesli supernatant v vialo, različno dolgo inkubirali na sobni temperaturi in analizirali s HPLC instrumentom. Slika 4 prikazuje potek derivatizacije DHA.



Slika 4: Reakcija derivatizacije DHA z DMPD (povzeto po 2)

Za potek redukcije smo vnesli v epruveto 300 μ L DHA z določeno koncentracijo, dodali enak volumen raztopine reducenta TCEP in stresali na vorteksu približno pol minute. Po končanem stresanju smo raztopino prenesli v vialo. To raztopino smo različno dolgo inkubirali na sobni temperaturi in nato analizirali s HPLC instrumentom.

3.3. VREDNOTENJE ANALIZNE METODE

3.3.1. KONČNA HPLC METODA

3.3.1.1. Kromatografija

Kromatografski pogoji so bili enaki, kot so navedeni v poglavju 3.2.1..

3.3.1.2. Postopek redukcije dehidroaskorbinske kisline

V epruveto smo vnesli 300 μ L DHA z izbrano koncentracijo in dodali enak volumen 5 mM raztopine reducenta TCEP in stresali na vorteksu približno pol minute. Po končanem stresanju smo raztopino prenesli v vialo. Nato smo raztopino približno 15 minut inkubirali na sobni temperaturi in analizirali s HPLC instrumentom.

3.3.2. VREDNOTENJE VALIDACIJSKIH PARAMETROV HPLC METODE

Validacija je dokumentiran postopek preizkušanja in potrjevanja, da katerikoli material, proces, postopek, aktivnost, sistem, oprema ali mehanizem, ki ga uporabljamo pri razvoju, proizvodnji, kontroli, vodi do pričakovanih rezultatov (40).

V skladu po ICH smernicah smo pri validaciji ovrednotili naslednje parametre: selektivnost, natančnost, linearnost, točnost, meja zaznavnosti, meja določitve in robustnost (41).

3.3.2.1. Selektivnost

Selektivnost analize metode je njena sposobnost, da točno in specifično meri količino oziroma koncentracijo preiskovane snovi v vzorcu v prisotnosti možnih dodatnih komponent, ki izhajajo iz učinkovine ali placeba (41).

Selektivnost metode smo določili tako, da smo analizirali vzorce čiste raztopine askorbinske kisline, čiste raztopine dehidroaskorbinske kisline, topila metafosforne kisline s pH 5,5 in reagenta TCEP na valovni dolžini 245 nm. Nato smo kromatograme prekrili in preverili ali je na retencijskem času od AA prisotna kakšna interferenca iz drugih vzorcev.

3.3.2.2. Natančnost

Natančnost je stopnja skladanja med posameznimi testnimi rezultati, če je analiza opravljena na več paralelkah istega homogenega vzorca. Običajno jo izražamo s standardnim odmikom ali relativnim standardnim odmikom (enačbi 4, 5) (35).

Enačba 4: Standardni odmik Enačba 5: Relativni standardni odmik, izražen v odstotkih

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (4) \qquad \text{RSD} = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}} \quad (5)$$

RSD = relativni standardni odmik (%)

x_i = vrednosti posameznih meritev

\bar{x} = povprečna vrednost vseh meritev

n = število meritev

Natančnost lahko ovrednotimo na tri načine:

- s ponovljivostjo znotraj dneva (ponovljivost metode, ponovljivost kromatografskega sistema)
- z vmesno ponovljivostjo
- z obnovljivostjo / reproducibilnostjo

Pri izvajanju ponovljivosti metode pripravimo šest paralelk raztopin vzorca iz iste serije vzorca brez sprememb operaterja, instrumenta, laboratorija. Pri izvajanju ponovljivosti kromatografskega sistema injiciramo najmanj šestkrat do desetkrat zaporedno isti standard ali standardno raztopino in merimo odgovore detektorja. Isti analitik mora izvesti merjenja na istem instrumentu, pod enakimi pogoji v istem laboratoriju (41).

Vmesno ponovljivost določimo tako, da primerjamo rezultate, ki smo jih dobili z analizo po najmanj šestih določitvah istega homogenega vzorca. Analiza se izvaja v istem laboratoriju, s tem da jo izvedeta različna analitika v različnih dnevih in po možnosti na različnih instrumentih (41).

Reproducibilnost ocenjujemo na podlagi rezultatov analiz med laboratoriji (41).

V našem primeru smo izvajali natančnost metode znotraj dneva in med dnevi ter natančnost injiciranja oziroma ponovljivost kromatografskega sistema.

Znotrajdnevno natančnost metode za določevanje AA smo preverjali tako, da smo osemkrat pripravili 100 % raztopino AA v metafosforni kislini s pH 5,5. Izračunali smo povprečni odziv in RSD vrednost osmih paralelk.

Za preverjanje natančnosti metode smo postopek ponovili še drugi in tretji dan, kjer smo pripravili za posamezen dan tri paralelke ter izračunali povprečne vrednosti odzivov in RSD vrednosti za posamezni dan. Nato smo izračunali še povprečno vrednost odziva in RSD vrednost med tremi dnevi skupaj (meddnevno natančnost).

Delovanje HPLC instrumenta smo preverili z natančnostjo injiciranja 100 % koncentracije AA (šestkrat zaporedno) in izračunali povprečni odziv in RSD vrednost šestih meritev.

Postavili smo kriterij, da je metoda določevanja vsebnosti zdravilne učinkovine (AA) še natančna, če RSD vrednost ne presega 2 %.

Znotrajdnevno natančnost metode za določevanje DHA z redukcijo smo preverili tako, da smo pripravili šest 10 % raztopin DHA z 5 mM koncentracijo TCEP. Izmerili smo odzive nastalega produkta AA iz šestih raztopin in izračunali njihovo povprečno vrednost ter RSD. Na podoben način smo preverili še meddnevno ponovljivost redukcije, le da smo drugi in tretji dan namesto šestih paralelk, pripravili tri paralelke.

Sprejemljiv kriterij za natančnost metode določevanja vsebnosti DHA je, če RSD vrednost ne presega 10 %, kar je običajni kriterij za sorodne snovi.

3.3.2.3. Linearnost

Linearnost je lastnost, ki nam pove ali so izmerjeni signali v določenem koncentracijskem območju sorazmerni koncentraciji analizirane snovi v vzorcih. Sorazmernost je lahko direktna ali po definirani matematični transformaciji. Pri določevanju linearosti je potrebno izvesti meritve vsaj petih različnih koncentracij (41). Iz podatkov izračunamo enačbo linearne regresije ($y = kx + b$, kjer je k naklon premice, b pa odsek na osi y).

Linearnost AA smo določili v območju delovne koncentracije pri stabilnostni študiji in sicer med 80 % in 100 %. Iz osnovne 100 % raztopine AA smo z redčenjem pripravili 80, 85, 90, 95 in 97,5 % raztopine AA. Za potrebe vrednotenja redukcije DHA smo preverili še linearnost AA v nižjih koncentracijah (1, 2,5, 5, 10, 15 in 20 %) in v obeh primerih določili enačbo linearne regresije z determinacijskim koeficientom.

Linearnost redukcije DHA smo določevali v koncentracijskem območju od 1 % do 20 % DHA s 5 mM koncentracijo reducenta TCEP. Iz posameznih raztopin smo izmerili odzive AA, ki nastanejo po redukciji DHA in določili enačbo linearne regresije z determinacijskim koeficientom.

Linearnost v koncentracijskem območju med 2,5 % in 20 % DHA smo dodatno potrdili tudi na posreden način z razliko med celokupno koncentracijo AA in koncentracijo AA pred redukcijo z upoštevanjem izkoristka redukcije. Pripravili smo pet različnih raztopin AA, ki so vsebovale še DHA v različnem koncentracijskem razmerju (97,5 % AA z 2,5 % DHA, 95 % AA s 5 % DHA, 90 % AA z 10 % DHA, 85 % AA s 15 % DHA in 80 % AA z 20 % DHA). Za vsako raztopino smo pripravili dve paralelki. V eno paralelko smo dodali reducent TCEP, v drugo pa le topilo. Nato smo izmerili odzive AA pri paralelkah, kjer je potekala redukcija in

pri tistih, kjer ni bilo dodanega reducenta. Iz razlike odzivov in upoštevanjem izkoristka redukcije (73,74 %) smo posredno določevali koncentracije DHA.

Postavili smo kriterij, da mora biti determinacijski koeficient večji ali enak vrednosti 0,999 za določevanje vsebnosti učinkovin oziroma nad 0,99 za določevanje vsebnosti sorodnih snovi.

3.3.2.4. Točnost

Je merilo, s katerim pokažemo, da dobimo z uporabo določene analitske metode pravilne rezultate. Pri tem ugotavljamo odstopanje povprečja izmerjenih rezultatov od dejanske vrednosti. Izvesti je potrebno minimalno devet določitev na minimalno treh koncentracijskih nivojih, ki so običajno 80 %, 100 % in 120 % delovne koncentracije. Na vsakem koncentracijskem nivoju izvedemo analizo vsaj treh določitev. Izračunamo povprečno vrednost za točnost po enačbi 6 (41).

Enačba 6: Izračun točnosti

$$\text{Točnost (\%)} = \frac{C_i}{C_t} \times 100 \quad (6)$$

C_i = izmerjena koncentracija

C_t = teoretična (deklarirana) koncentracija

V našem primeru smo iz enačbe umeritvene premice izračunali izmerjene koncentracije AA (1 – 20 % in 80 – 100 %) in DHA (1 – 20 %). Točnost smo določili po enačbi 6 čez celotno območje linearosti AA in DHA.

Določili smo, da je metoda točna, če so vrednosti za točnost v območju med 98 % in 102 % za določevanje vsebnosti učinkovin, za določevanje vsebnosti sorodnih snovi pa med 90 % in 110 %.

3.3.2.5. Meja zaznavnosti in meja določitve

Meja zaznavnosti (enačba 7) je najmanjša koncentracija analizirane snovi, ki jo pod predpisanimi pogoji analize lahko zaznamo, ni pa nujno, da jo kvantitativno določimo.

Meja določitve (enačba 8) je parameter limitnih testov. Je najmanjša koncentracija analizirane snovi v vzorcu, ki jo lahko kvantitativno določimo pod predpisanimi pogoji analize. Enačbi 7 in 8 prikazujeta izračun meje zaznavnosti in meje določitve (41).

Enačba 7: Meja zaznavnosti

Enačba 8: Meja določitve

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times SD}{\bar{K}} \quad (7)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times SD}{\bar{K}} \quad (8)$$

SD – standardni odmik iz začetnih vrednostih premic (n),

\bar{K} – povprečje naklonov premic (1., 2., 3. dan)

Iz treh enačb premic (določevanje linearnosti DHA) smo dobili podatke za izračun meje zaznavnosti in meje določitve. Podatka, ki smo ju potrebovali za izračun meje določitve sta bila standardni odmik, ki ga dobimo iz začetnih vrednostih premic (n) in povprečje naklonov premic.

3.3.2.6. Robustnost

Je sposobnost ohranjanja kvalitete rezultata pri majhnih, vendar preišljenih spremembah parametrov metode in zagotavlja njeno zanesljivo uporabo (41). V okviru robustnosti smo opredelili stabilnost standardne raztopine AA.

3.4. STABILNOSTNA ŠTUDIJA

Pripravili smo zmes AA in škroba v masnem razmerju 1 : 9, ki smo jo s pestilom strli v terilnici. Nato smo natehtali po 1 gram zmesi, jo zapakirali v posebnem »zračnem balonu« pri različnih koncentracijah kisika (pod 0,5, 2, 5, 10 in 21 %) in na koncu še zavarili, da bi ohranili želeno koncentracijo kisika v času stabilnostne študije. Zapakirane vzorce smo položili v klima komoro oziroma termostat z različno nastavljenimi temperaturami (40, 60, 80 °C). Pripravili smo tudi vzorce AA brez škroba. V tem primeru smo natehtali po 200 mg čiste AA in jo na podoben način zapakirali in zavarili v zračnem balonu ter nato vzorce pustili v klima komori in termostatih. Vzorce smo pustili različno dolgo na omenjenih pogojih (0, 1, 2, 4, 6 tednov) in jih nato analizirali.

Pri vsaki časovni točki (0, pred postavitvijo vzorcev na pogoje, 1., 2., 4., 6. teden) smo vzeli del vzorcev iz klima komore oziroma termostata. Vzorce smo pripravili po postopku za redukcijo (3.2.3). Iz vsakega vzorca smo za vsak pogoj v dveh paralelkah pripravili 200 % raztopini vzorca (1 mg/mL) z metafosforno kislino s pH 5,5. V vsako 200 % raztopino smo v enakem volumskem razmerju dodali topilo metafosforno kislino ali pa raztopino reducenta. Z dodatkom raztopine reducenta TCEP, smo reducirali morebitni oksidacijski produkt DHA do AA ter analizirali celokupno koncentracijo AA (AA z DHA), v drugo raztopino smo dodali topilo metafosforno kislino in s tem analizirali le AA iz vzorca. Za vrednotenje vsebnosti AA smo pripravili 100 % koncentracijo standardne raztopine AA in določili njen odziv na HPLC instrumentu, s katerim smo primerjali odzive raztopin posameznih vzorcev (enačba 9). Na osnovi razlike med celokupno koncentracijo AA po redukciji (vsota AA in DHA) in AA pred redukcijo smo z upoštevanjem izkoristka redukcije (enačba 10) izračunali koncentracijo DHA v vzorcu (enačba 11).

S slikanjem vzorcev v posameznih časovnih točkah smo opazovali tudi vizualne spremembe vzorcev (obarvanost).

3.5. OBDELAVA PODATKOV

Za urejanje in obdelavo podatkov smo uporabili program Excel (Microsoft Office 2007). Preglednice in grafe smo oblikovali z namenom lažjega razumevanja in predstavitve dobljenih rezultatov. Pri risanju določenih kemijskih reakcij smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 12,0.

Pri stabilnostni študiji smo vsebnost AA in DHA v vzorcu izračunali po enačbah 9, 10 in 11.

Enačba 9: Vsebnost askorbinske kisline, izražena v odstotkih

$$\text{Vsebnost askorbinske kisline (\%)} = (k \times P_x / m_x) \times 100 \quad (9)$$

(koeficient $k = (m_{st} / P_{st}) \times F$, pomnožen z 10 v zmesi AA s škrobom v masnem razmerju 1 : 9, ker je masa AA enaka 1/10 mase zmesi ($F = 10$). V primeru, ko imamo v vzorcih le AA, je $F = 1$.)

m_{st} , P_{st} = masa standarda AA in njegov odziv

m_x , P_x = masa vzorca in odziv AA po redukciji

Koncentraciji standardne raztopine AA in AA v raztopini vzorca sta bili enaki pri določevanju vsebnosti AA.

Enačba 10: Izračun izkoristka redukcije, izražen v odstotkih

$$\text{Izkoristek redukcije (\%)} = \frac{\text{odziv AA po redukciji}}{\text{odziv standarda AA}} \times 100 \quad (10)$$

Za izračun izkoristka redukcije smo potrebovali vrednost odziva čistega standarda AA pri točno določeni koncentraciji in odziv po redukciji DHA do AA, pri čemer izhajamo iz iste začetne koncentracije AA in DHA. Nato smo izračunali izkoristek redukcije, ki je količnik med vrednostjo odziva AA dobljenega po redukciji določene koncentracije DHA s 5 mM TCEP in vrednostjo odziva enake koncentracije standarda AA. Končni izkoristek 73,74 % smo dobili iz izračuna povprečnih vrednosti izkoristkov redukcije med 7,14 % DHA in 5 mM TCEP.

Enačba 11: Izračun vsebnosti dehidroaskorbinske kisline

$$\text{Vsebnost dehidroaskorbinske kisline} = (C_{AA_{\text{cel}}} - C_{AA}) / X_{\text{red}} \quad (11)$$

$C_{AA_{\text{cel}}}$ = celokupna vsebnost AA in DHA v vzorcu (po redukciji), izražena v %

C_{AA} = vsebnost AA v vzorcu (pred redukcijo), izražena v %

X_{red} = izkoristek redukcije (73,74 %)

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Za namen določevanja stabilnosti askorbinske kisline in njenega oksidativnega produkta dehidroaskorbinske kisline smo najprej razvili ustrezno analizo metodo, njeno primernost preverili z validacijo in nato v nadaljevanju v stabilnostni študiji z njo merili AA in DHA.

4.1. RAZVOJ ANALIZNE METODE

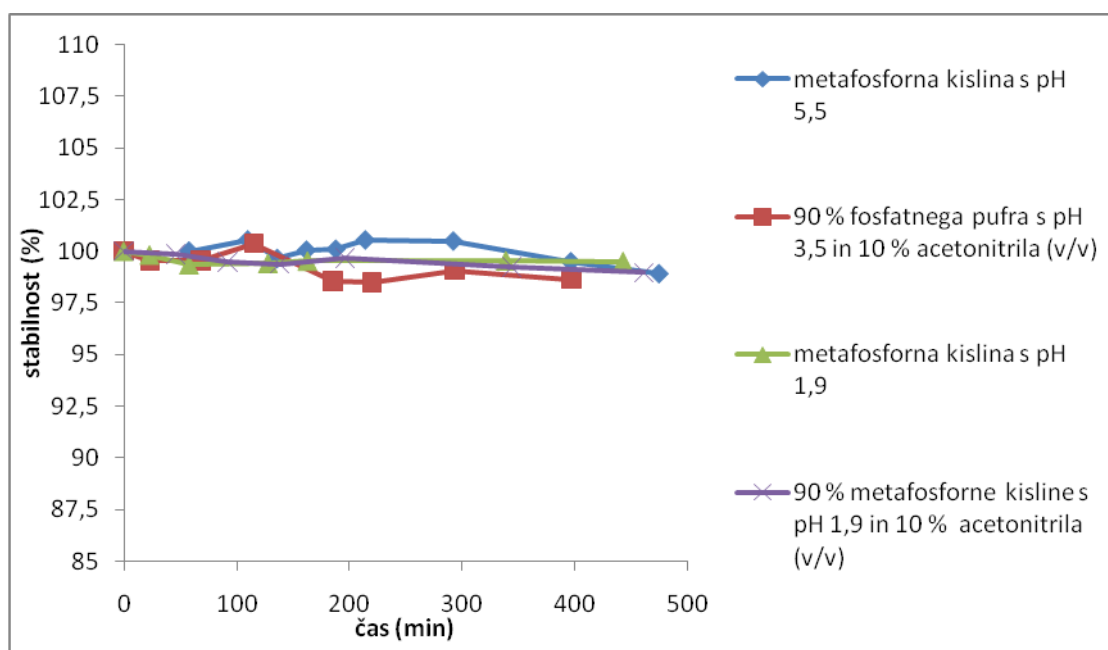
Iz pregleda literature smo se odločili za HPLC metodo, s katero smo nameravali določevati AA direktno na valovni dolžini 245 nm, njen oksidacijski produkt DHA pa posredno, ker slabo absorbira UV svetlobo na valovni dolžini nad 200 nm oziroma v območju določevanja AA (245 nm). Ena od možnosti detektiranja DHA je derivatizacija DHA s 4,5-dimetil-1,2-fenildiaminom (DMPD) in posredno določevanje derivata pri valovni dolžini 360 nm. Druga opcija je redukcija DHA s tris (2-karboksietil) fosfin hidrokloridom (TCEP) do nastanka AA. V tem primeru se na osnovi razlike med celokupno AA po redukciji in AA pred redukcijo določi koncentracijo DHA.

4.1.1. DOLOČEVANJE ASKORBINSKE KISLINE

Kot osnova za določevanje vsebnosti askorbinske kisline nam je služil članek Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and acetaminophen in pharmaceuticals (31). Na začetku razvoja metode smo privzeli kromatografske pogoje iz članka. Uporabili smo Synergy Hydro-RP kromatografsko kolono z mobilno fazo z izokraskim izpiranjem, ki je sestavljena iz 40 mM koncentracije fosfatnega pufru (pH 3,5) in acetonitrila v volumskem razmerju 90 : 10 in z dodatkom ionsko parnega reagenta CTAB (5 mM). Pri takšni sestavi mobilne faze se je AA slabo zadrževala na koloni, zato smo spremenili volumsko razmerje fosfatnega pufru z acetonitrilom na 95 : 5 in jo naredili bolj polarno. Posledično se je retencijski čas AA ustrezno podaljšal na približno 3 minute. Kot topilo za pripravo standardne raztopine AA smo prvotno kot v članku (31) uporabljali acetatni pufer s pH 3,7, vendar smo ga zaradi slabše stabilnosti AA zamenjali z metafosforno kislino s pH 5,5 (33, 42). Ugotovili smo, da je AA v omenjenem topilu stabilna vsaj prvih 400 minut (slika 5). Vsebnost AA smo določevali s HPLC metodo na valovni dolžini 245 nm. Pri razvoju metode smo uporabljali 0,50 mg/mL askorbinske kisline, ki v nadaljnji interpretaciji rezultatov predstavlja 100 % koncentracijo AA.

Za preverjanje selektivnosti metode smo analizirali raztopine AA, DHA, reducenta TCEP in čistega topila (metafosforna kislina s pH 5,5). Le pri vzorcu AA smo opazili kromatografski vrh pri treh minutah, ki pripada AA (slika 14). S tem smo potrdili selektivnost metode.

Preden smo pristopili h kvantitativnemu vrednotenju AA, smo morali zagotoviti, da uporabimo primerno topilo za stabilizacijo standardne raztopine AA. Znano je namreč, da je AA v določenih raztopinah nestabilna, zato smo preverili njeno stabilnost v štirih različnih raztopinah (slika 5). V vseh topilih (slika 5) je bila AA relativno stabilna prvih 400 minut, kar je dovolj dolgo časovno obdobje za namen naših analiz.



Slika 5: Stabilnost askorbinske kisline v različnih raztopinah

4.1.2. DOLOČEVANJE DEHIDROASKORBINSKE KISLINE

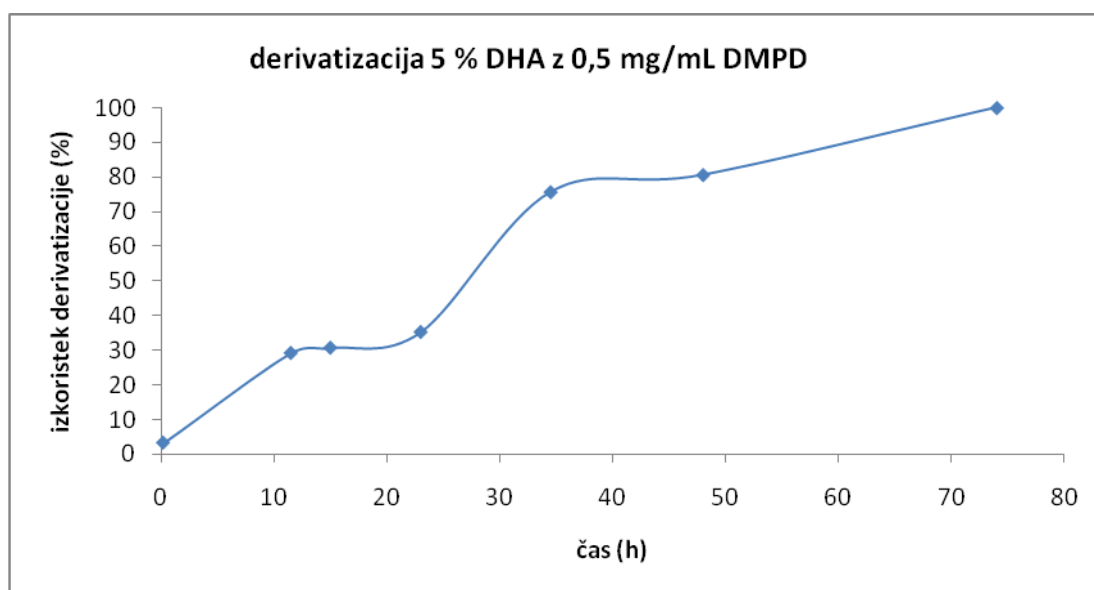
DHA dobro absorbira UV svetlobo v raztopini pri 185 nm, vendar slabo absorbira UV svetlobo nad 200 nm. Merjenje pri 185 nm ni ponovljivo, točno in selektivno, ker pri tej valovni dolžini absorbirajo še druge snovi, kot so sestavine pufrov in raztopljeni plini. DHA se zato pogosto določa posredno s predhodno redukcijo v AA in z merjenjem razlike v koncentraciji AA v vzorcu pred in po redukciji. DHA se lahko posredno določa tudi na drug način in sicer z derivatizacijo na primer z benzamidinom ali z 4,5-dimetil-1,2-fenildiaminom do tvorbe fluorescenčnih produktov (32). Poleg omenjenih metod lahko za določevanje DHA uporabimo tudi masno spektrometrijo, kjer se zaobide problematična UV detekcija. V okviru našega dela smo se odločili, da najprej poskusimo postaviti metodo z derivatizacijo, ker naj bi bila ta metoda bolj selektivna.

4.1.2.1. Določevanje dehidroaskorbinske kisline z derivatizacijo

Ta metoda naj bi bila dovolj občutljiva in selektivna za določevanje DHA. Za derivatizacijo DHA smo uporabili reagent 4,5-dimetil-1,2-fenildiamin (DMPD), ki je fluorogen in specifičen. Ostali reagenti s karbonilno skupino, kot so 2,4-dinitrofenilhidrazin, so manj specifični za DHA in derivatizacija poteka dlje časa (31). Kot osnova nam je služil članek Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and acetaminophen in pharmaceuticals (31).

Za reakcijo derivatizacije DHA z DMPD smo uporabili acetatni pufer s pH 3,7 in preverili, če poteče derivatizacija po 10 minutah, kot je navedeno v literaturnem viru (31). Iz slike 6 je razvidno, da derivatizacija ne poteče po desetih minutah, ampak s časom izkoristek derivatizacije narašča. Izkoristek derivatizacije smo definirali kot odziv derivata ob času proučevanja glede na odziv po 74 urah, ki smo ga privzeli kot 100 % derivatizacijo, čeprav verjetno poteka derivatizacija tudi po tem času, kar pa za nas iz eksperimentalnega stališča ni sprejemljivo.

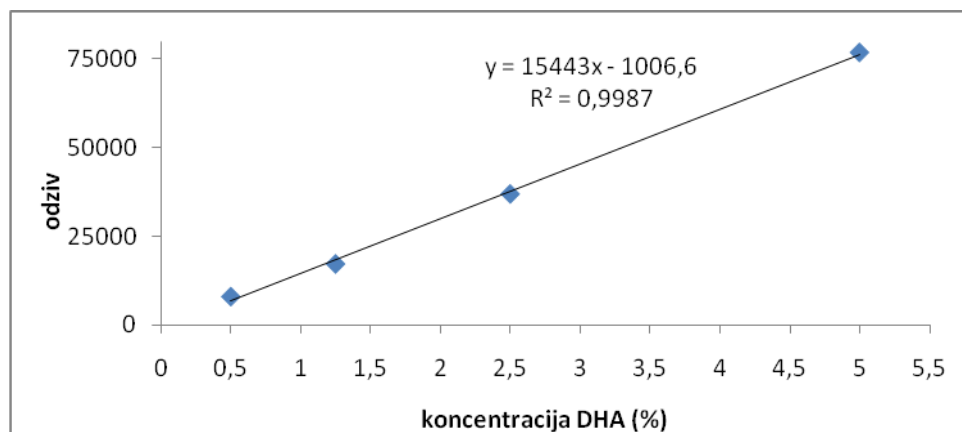
Kljub temu, da smo dokazali, da derivatizacija ne poteče po 10 minutah, smo želeli optimizirati to metodo, pri čemer smo prej še preverili ponovljivost in linearnost metode.



Slika 6 : Prikaz poteka derivatizacije 5 % DHA z 0,5 mg/mL DMPD

Povprečen izkoristek derivatizacije 2,5 % DHA z 0,5 mg/mL DMPD v acetatnem pufru s pH 3,7 je bil 2,59 %. Ponovljivosti po 12 minutah derivatizacije nismo potrdili, saj je bila RSD vrednost treh paralelk 16,25 %, kar je več od dovoljenega kriterija za sorodne snovi (10 %).

Derivatizirali smo tudi druge koncentracije DHA (0,5, 1,25, 2,5 in 5 %) z DMPD (0,5 mg/mL) v acetatnem pufru s pH 3,7. V eksperimentu smo spremljali odzive derivatizacije glede na koncentracije DHA in dokazali, da velja linearnost od 0,5 % do 5 % koncentracije DHA, saj je determinacijski koeficient 0,9987 (slika 7).



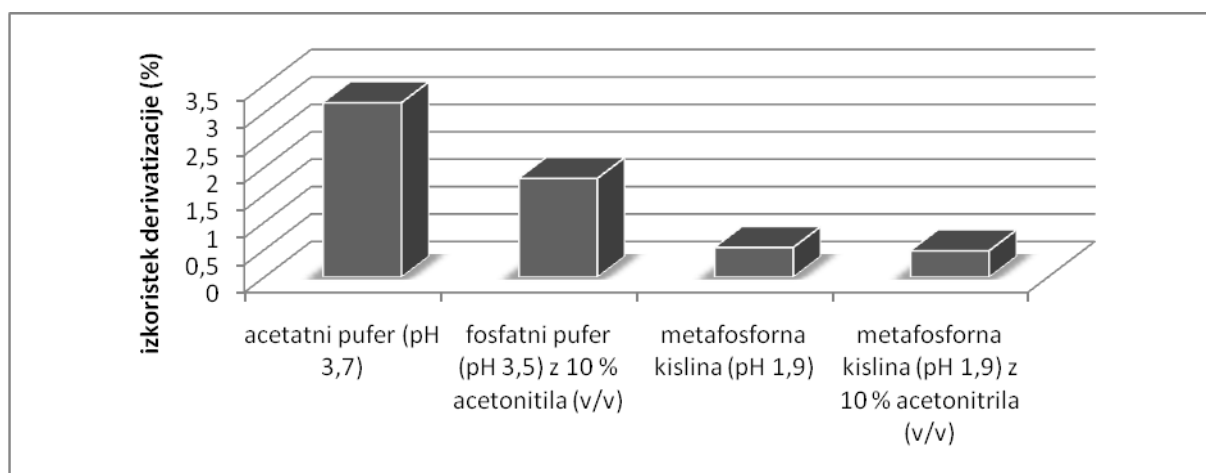
Slika 7: Linearnost derivatizacije DHA (0,5 % - 5 %) z DMPD

Metodo smo želeli optimizirati v smislu hitrejše derivatizacije in boljše ponovljivosti in sicer z uporabo ultrazvoka (UZ) in z zamenjavo topila, v katerem poteka derivatizacija.

Na splošno UZ pospeši reakcijo derivatizacije, toda v našem primeru se je izkazalo, da jo celo upočasni. Izkoristek derivatizacije 2,5 % DHA z 0,5 mg/mL DMPD je bil 1,75 % ob prisotnosti UZ (30 minut) in 2,59 % brez vpliva UZ.

Izkoristek derivatizacije smo želeli izboljšati tudi z zamenjavo topila. Izbrali smo si metafosforno kislino s pH vrednostjo 5,7, saj je v literaturi navedeno, da sta AA in DHA stabilni v metafosforni kislini (33), optimalna stabilnost AA pa je med pH vrednostjo 5,5 in 6,5 (42). S primerjavo izkoristkov derivatizacije 2,5 % DHA z 0,5 mg/mL DMPD v acetatnem pufru s pH 3,7 in metafosforni kislini s pH 5,7 smo ugotovili, da je po 12 minutah derivatizacije v metafosforni kislini izkoristek še slabši kot v acetatnem pufru, saj je bil v acetatnem pufru 2,59 %, v metafosforni kislini pa 1,73 %, a je ponovljivost derivatizacije boljša, saj je bila RSD vrednost petih paralelk 2,63 %.

Izkoristek derivatizacije smo preverili še z ostalimi topili, kjer je AA stabilizirana in sicer z 90 % raztopino fosfatnega pufru s pH 3,5 in 10 % acetonitrila (v/v), z metafosforno kislino s pH 1,9 in z 90 % metafosforno kislino s pH 1,9 in 10 % acetonitrila (v/v) ter primerjali z acetatnim pufrom s pH 3,7. Ugotovili smo, da je bil izkoristek derivatizacije najboljši v acetatnem pufru s pH 3,7 in sicer 3,18 %, najslabši pa v metafosforni kislini z 10 % (v/v) acetonitrila z 0,48 % izkoristkom derivatizacije (slika 8).



Slika 8: Vpliv različnih topil na izkoristek derivatizacije 5 % DHA z 0,5 mg/mL DMPD

Kljub nizkemu izkoristku derivatizacije smo preverili še selektivnost metode z reakcijo 50 % raztopine AA z 0,5 mg/mL DMPD v metafosforni kislini s pH 5,7 in dobili pri valovni dolžini 360 nm približno štirikrat večji odziv derivata od odziva, dobljenega po derivatizaciji med 2,5 % DHA in 0,5 mg/mL DMPD. Derivat lahko nastane zaradi nestabilnosti AA v topilu in posledične derivatizacije z oksidacijskim produktom DHA, nečistote v vzorcu AA, bolj verjetno pa zaradi reakcije med AA in DMPD. Dokazali smo, da je AA stabilen v metafosforni kislini prvih 400 minut (slika 5), prav tako ne vsebuje nečistote, kar smo pri naslednji metodi z redukcijo dokazali. Zato sklepamo, da tudi AA reagira z DMPD, kar pomeni, da metoda derivatizacije ni selektivna samo za DHA.

Zaključimo lahko, da derivatizacija ne poteče po 10 minutah, kot je omenjeno v članku (31). Poleg slabega izkoristka derivatizacije smo hkrati tudi dokazali, da je metoda slabo selektivna, saj tudi AA reagira z derivatizacijskim reagentom DMPD. Na osnovi teh rezultatov smo se odločili, da raje nadaljujemo z razvojem druge metode in sicer z metodo določevanja DHA z redukcijo.

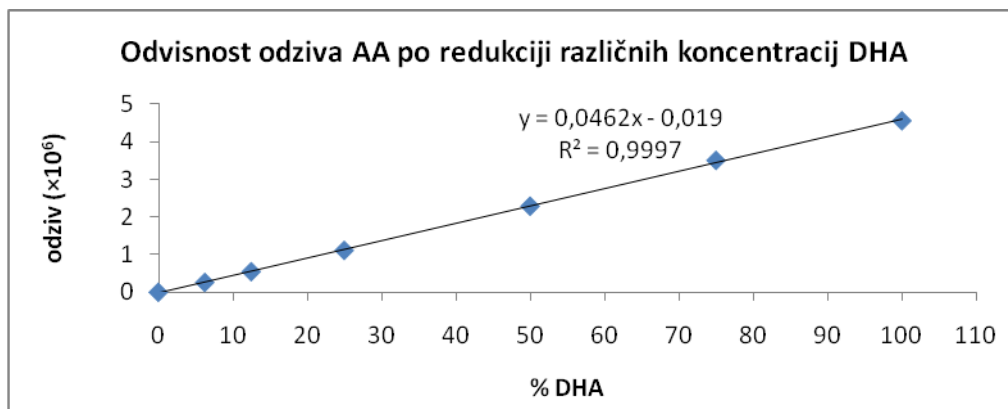
4.1.2.2. Določevanje dehidroaskorbinske kisline z redukcijo

DHA smo določevali posredno z redukcijo s tris (2-karboksietil) fosfin hidrokloridom (TCEP) do nastanka AA. Na osnovi razlike med celokupno AA po redukciji (vsota AA in DHA) in AA pred redukcijo smo določili koncentracijo DHA.

Osnova za vrednotenje redukcije DHA z reducentom TCEP je bil članek z naslovom Reduction of dehydroascorbic acid at low pH (33). Po članku smo za pripravo standardnih raztopin DHA in TCEP uporabili metafosforno kislino s pH 1,9. Preverjali smo izkoristek

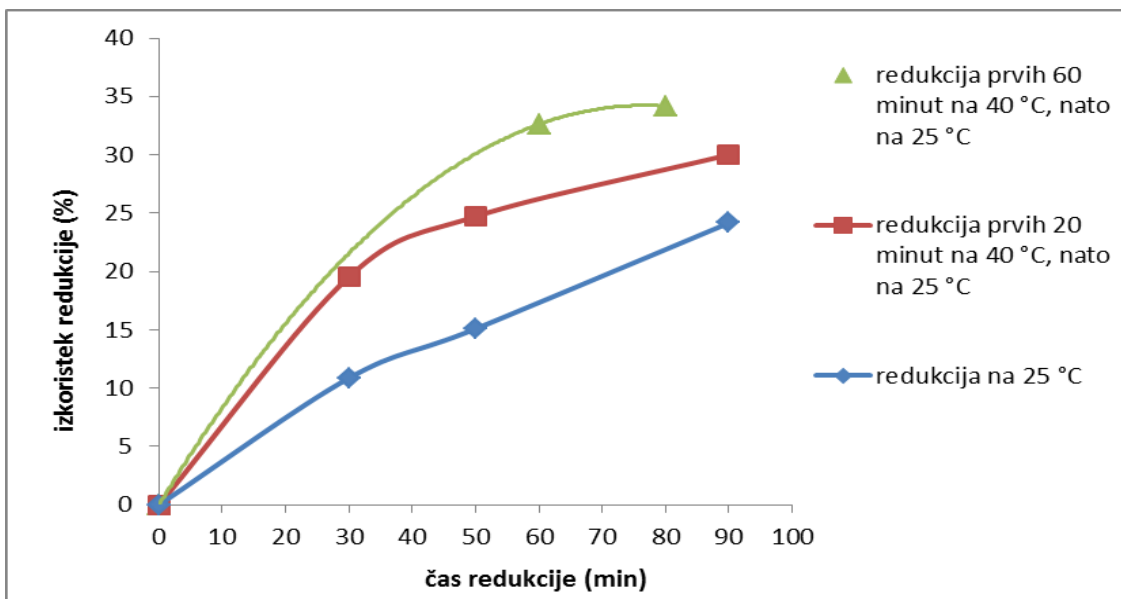
redukcije in linearnost odzivov AA po redukciji različnih koncentracij DHA (6,25, 12,5, 25, 50, 75 in 100 %) s 15 mM TCEP pri sobni temperaturi. S tem smo pokrili množinska koncentracijska razmerja med DHA in TCEP od 1:85 do 1:5. V članku je podan rezultat, da v raztopini DHA s TCEP z razmerjem 1:50 poteče 99 % redukcije po 17 minutah, v raztopini z razmerjem 1:5 pa poteče enak delež redukcije po 180 minutah (33).

Pri redukciji različnih koncentracij DHA s 15 mM TCEP smo dobili odzive za nastalo AA, na podlagi katerih smo izračunali posamezne izkoristke redukcij. Ti so bili med 35 % in 38 % po 160 minutah reakcije v metafosforni kislini s pH 1,9, kar je bistveno manj, kot je navedeno v literaturnem viru (33). Kljub temu, da smo uporabili različna razmerja med DHA in TCEP, smo opazili, da so izkoristki redukcije relativno konstantni, kar se kaže tudi v dobri linearnosti (slika 9), saj je determinacijski koeficient 0,9997.



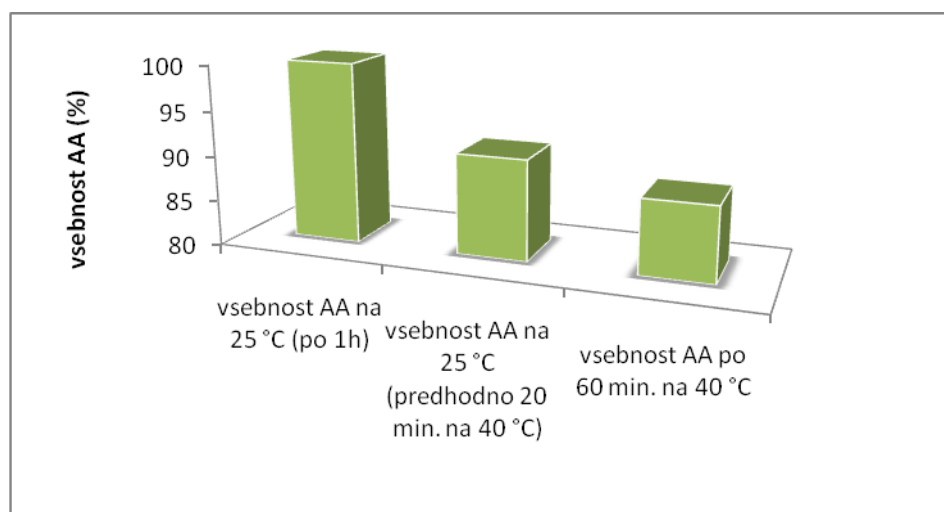
Slika 9: Linearnost odzivov redukcije glede na koncentracije DHA (6,25 % - 100 %)

Glede na to, da je izkoristek redukcije pri sobni temperaturi nizek, smo ga želeli izboljšati s segrevanjem na povišani temperaturi 40 °C. Reakcija je prvih 20 minut oziroma 60 minut potekala na temperaturi 40 °C, nato pa na sobni temperaturi.



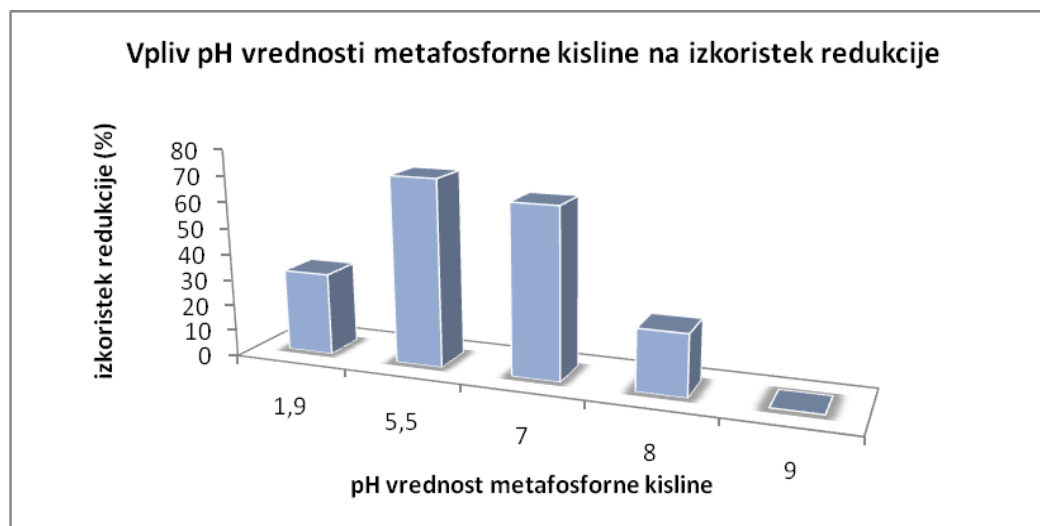
Slika 10: Vpliv temperature in izkoristek redukcije v metafosforni kislini s pH 1,9

Na sliki 10 je razvidno, da je pri temperaturi 40 °C izkoristek redukcije večji kot pri sobni temperaturi, ki je bil 15,09 % po 50 minutah. Izkoristek redukcije, kjer je reakcija potekala prvih 20 minut na 40 °C in nato še 40 minut na sobni temperaturi je bil 24,72 %, medtem ko je bil izkoristek redukcije, ki je 60 minut potekala na temperaturi 40 °C 34,16 %. Izkoristki redukcije so torej višji pri segrevanju, vendar dvig temperature hkrati zmanjša stabilnost askorbinske kisline (slika 11). V primeru dvajset minutnega segrevanja AA v metafosforni kislini s pH 1,9 na temperaturi 40 °C in nato približno 40 minutne inkubacije na sobni temperaturi je vsebnost AA 91,10 %, v primeru 60 minutnega segrevanja pa 88,21 %. Brez segrevanja pa je vsebnost AA po 1 uri 100 %.



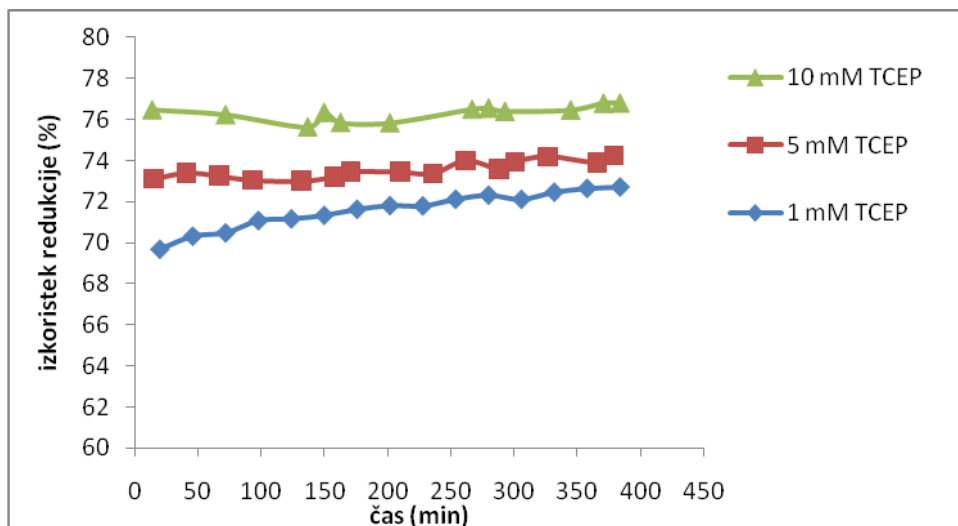
Slika 11: Stabilnost askorbinske kisline po 1 h v metafosforni kislini s pH 1,9

V nadaljevanju razvoja metode smo spremljali vpliv pH vrednosti metafosforne kisline na izkoristek redukcije. Sprememba pH vrednosti metafosforne kisline vpliva na izkoristek redukcije. Pri redukciji DHA z 1 mM koncentracijo TCEP se je izkoristek pri uporabi metafosforne kisline s pH 1,9 iz 31,73 % povečal na 71,80 % v metafosforni kislini s pH 5,5. Z nadaljnjim dvigom pH vrednosti metafosforne kisline se izkoristek redukcije zmanjšuje (slika 12).



Slika 12: Vpliv pH vrednosti metafosforne kisline na izkoristek redukcije.

Izkoristek redukcije smo želeli optimizirati tudi z dvigom koncentracije reducenta TCEP. Z dvigom koncentracije reducenta TCEP iz 1 mM na 5 mM se je izkoristek redukcije povečal iz 71,80 % na 73,74 %. Opazili smo, da ob prisotnosti 1 mM koncentracije reducenta poteče redukcija po približno 200 minutah, medtem ko opazimo pri 5 mM koncentraciji plato krivulje oziroma potek redukcije že po približno 15 minutah. Če uporabimo 10 mM koncentracijo TCEP, dobimo približno 76 % izkoristek redukcije (slika 13). Kljub temu, da je izkoristek redukcije pri uporabi 10 mM koncentracije TCEP malenkost boljši kot pri 5 mM TCEP, smo se za nadaljnje raziskave odločili za slednjega zaradi manjše porabe reagenta in posledično nižjih stroškov.



Slika 13: Prikaz izkoristka redukcije 7,14 % DHA z 1, 5 in 10 mM koncentracijo TCEP

Če povzamemo, redukcija DHA s 5 mM in 10 mM TCEP je ponovljiva in poteče po 15 minutah pri uporabi metafosforne kisline s pH 5,5. Hkrati je AA stabilna v metafosforni kislini s pH 5,5. Ustreznost potencialne metode za vrednotenje DHA z redukcijo smo preverili z validacijo.

4.2. VALIDACIJA METODE

Validirali smo kromatografsko metodo za določevanje AA, kar predstavlja osnovo tudi za določanje DHA, ki se reducira v AA. Nato smo vrednotili še postopek redukcije DHA v AA. V skladu z ICH smernicami smo pri validaciji metod preverili naslednje parametre: selektivnost, natančnost, linearnost, točnost, mejo detekcije, mejo določitve in robustnost.

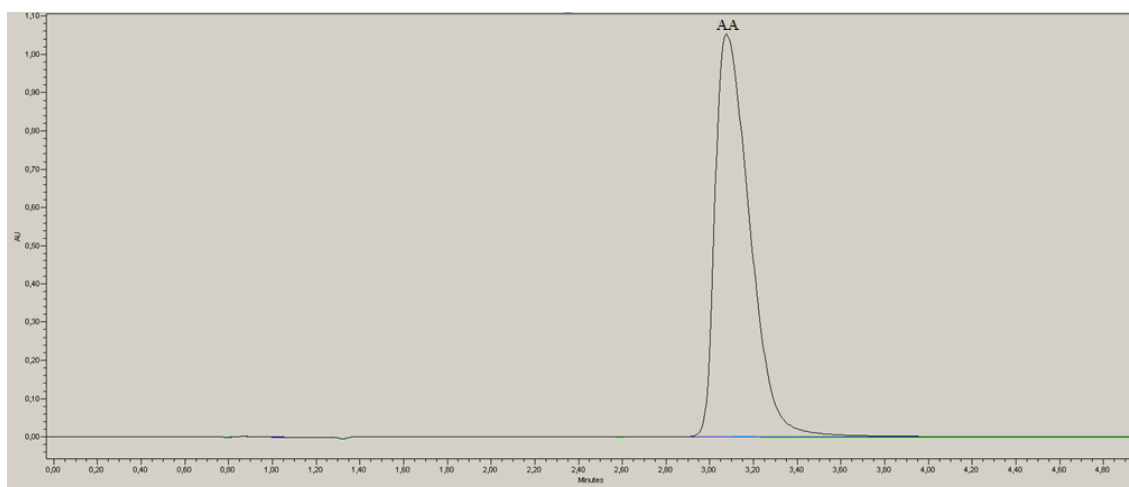
4.2.1. VALIDACIJA METODE ZA DOLOČEVANJE VSEBNOSTI ASKORBINSKE KISLINE

4.2.1.1. Selektivnost

Selektivnost metode smo določili tudi tako, da smo analizirali vzorce čiste askorbinske kisline, čiste dehidroaskorbinske kisline, topila metafosforne kisline s pH 5,5 in reagenta TCEP. Nato smo kromatograme prekrili in preverili ali je pri retencijskem času (3 minute) od AA prisotna kakšna interferenca iz drugih vzorcev.

Pri snemanju kromatograma čistega AA in AA s TCEP smo dobili skoraj identično površino vrha pri retencijskem času 3 minut. To nakazuje, da ni prisotnega DHA kot nečistote v AA.

Metoda je selektivna, saj je pri retencijskem času treh minut prisoten le kromatografski vrh za AA (slika 14).



Slika 14: Prekriti HPLC kromatogrami raztopin askorbinske kisline, dehidroaskorbinske kisline, metafosforne kisline s pH 5,5 in reducenta TCEP. Kromatografski vrh pri treh minutah predstavlja AA.

4.2.1.2. Natančnost

Natančnost meritve odziva askorbinske kisline smo dokazali tako znotraj posameznega dneva, kot tudi med dnevi, saj RSD vrednosti ne presegajo dovoljene meje, ki je 2 % za vrednotenje vsebnosti učinkovin (preglednica IV).

Preglednica IV: Natančnost meritve odziva 100 % koncentracije askorbinske kisline znotraj in med dnevi

Dan	Povprečni odziv	RSD znotraj dneva (%)
1. (8 paralelk)	11921891	1,71
2. (3 paralelke)	11677168	0,99
3. (3 paralelke)	11828469	1,59
Povprečni odziv med dnevi	11809176	
RSD med dnevi (%)	1,05	

Z natančnostjo injiciranja smo preverili delovanje HPLC instrumenta. Iz preglednice V lahko razberemo, da je ponovljivost injiciranja zelo dobra z RSD 0,10 %.

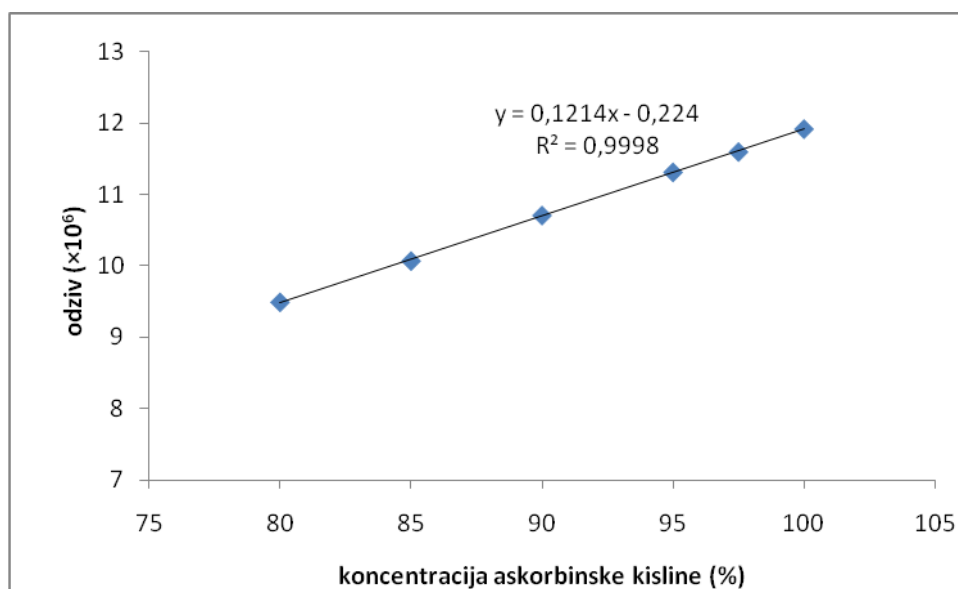
Preglednica V: Natančnost injiciranja 100 % koncentracije askorbinske kisline

Št. injiciranj	Odziv
1	12070631
2	12082220
3	12104540
4	12087205
5	12085957
6	12099455
Povprečni odziv	12088335
RSD (%)	0,10

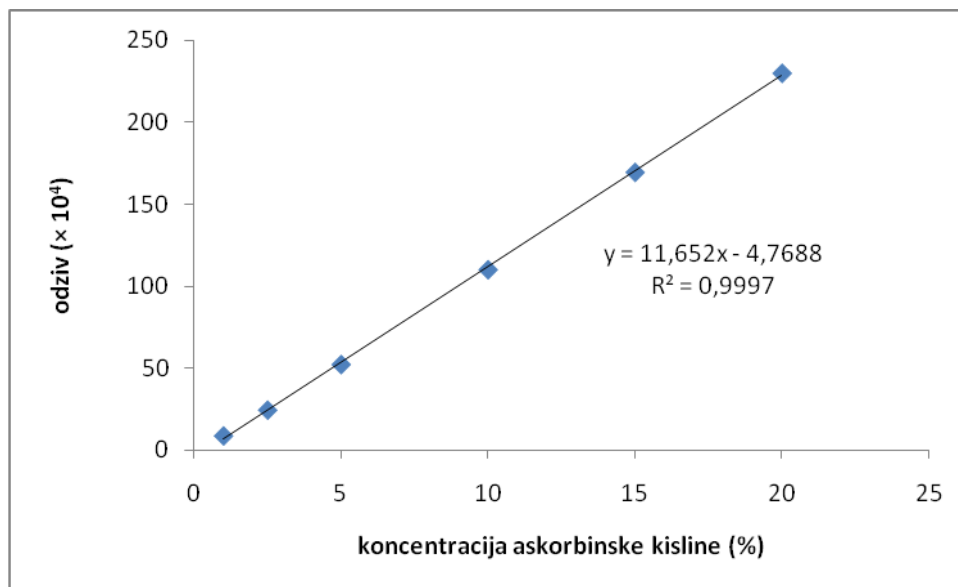
4.2.1.3. Linearnost

Iz slike 15 je razvidno, da je odziv askorbinske kisline linearno odvisen od njene koncentracije v koncentracijskem območju med 80 in 100 %, v katerem se nahaja tudi delovna koncentracija AA v kasnejši stabilnostni študiji. Determinacijski koeficient je enak 0,9998 in je znotraj predpisanega kriterija.

Za potrebe vrednotenja redukcije DHA, kjer pričakujemo nižje koncentracije AA, smo preverili še linearnost AA v nižjem koncentracijskem območju (1 % - 20 % AA). Dokazali smo tudi linearnost AA v koncentracijskem območju med 1 % - 20 %, saj je determinacijski koeficient enak 0,9997 (slika 16).



Slika 15: Linearnost AA v koncentracijskem območju med 80 in 100 %



Slika 16: Linearnost AA v koncentracijskem območju med 1 % in 20 %

4.2.1.4. Točnost

Točnost metode AA smo potrdili v koncentracijskem območju med 80 % (0,40 mg/mL) in 100 % (0,50 mg/mL), saj so vrednosti znotraj mejnega območja med 98 % in 102 % (preglednica VI).

Preglednica VI: Točnost metode pri različnih koncentracijah (80 % - 100 %) AA

koncentracija AA (%)	točnost (%)
80	100,10
85	99,82
90	100,10
95	100,07
97,5	99,91
100	100,05

Točnost metode AA v nižjem koncentracijskem območju (2,5 % in 20 % AA) je malenkost nižja, a še vedno znotraj mejnega območja 90 % - 110 % za sorodne snovi (preglednica VII).

Preglednica VII: Točnost metode različnih koncentracij (1 % - 20 %) AA

koncentracija AA (%)	točnost (%)
1	116,28
2,5	100,43
5	97,90
10	98,55
15	99,65
20	100,64

4.2.1.5. Robustnost

V okviru robustnosti smo preverjali stabilnost AA v metafosforni kislini s pH 5,5, ki je medij za pripravo vzorcev AA. Prvih 400 minut je vsebnost AA v območju med 99,5 % in 100,0 % glede na začetno vsebnost AA (slika 5), kar pomeni, da je potrebno vzorce analizirati znotraj tega časovnega intervala.

4.2.2. VALIDACIJA METODE ZA DOLOČEVANJE DEHIDROASKORBINSKE KISLINE

4.2.2.1. Selektivnost

Ker DHA vrednotimo preko AA, uporabljamo tudi v tem primeru isti kromatografski sistem in pogoje kot pri metodi za določevanje vsebnosti AA. Selektivnost te metode smo dokazali že pri poglavju 4.2.1.1..

4.2.2.2. Natančnost

Natančnost metode za redukcijo DHA smo dokazali tako znotraj posameznega dneva, kot tudi med dnevi, saj so vrednosti RSD znotraj dovoljenih mejah ± 10 % za sorodne snovi (preglednica VIII).

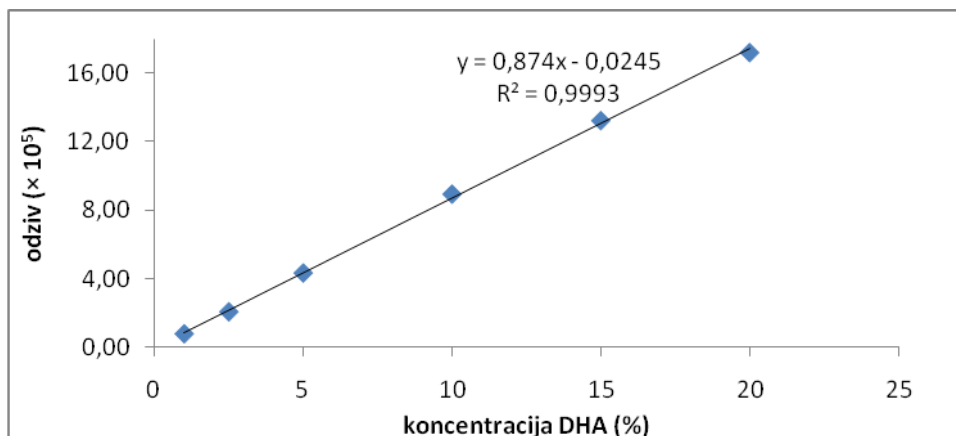
Preglednica VIII: Natančnost redukcije 10 % DHA znotraj in med dnevi

Dan	Povprečje odzivov	RSD znotraj dneva (%)
1. (6 paralelk)	880917	0,58
2. (3 paralelke)	906561	0,27
3. (3 paralelke)	908545	0,27
Povprečni odziv med dnevi	898674	
RSD med dnevi (%)	1,71	

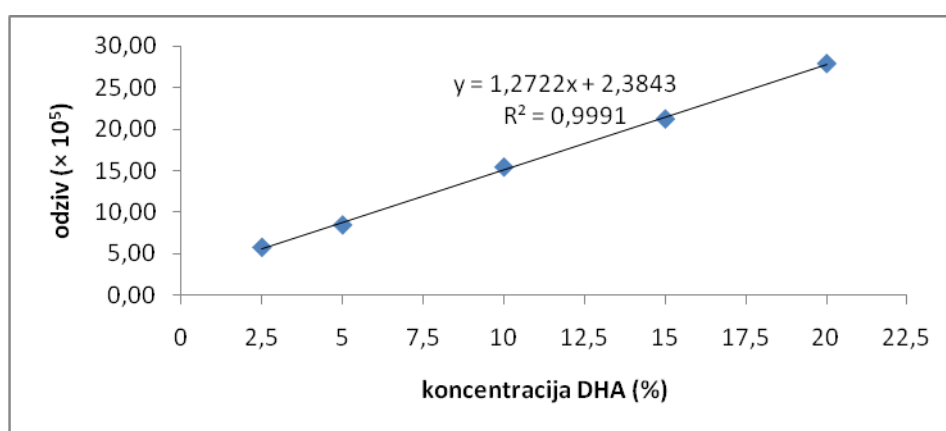
4.2.2.3. Linearnost

Iz slike 17 je razvidno, da je odziv redukcije linearno odvisen od koncentracije DHA (%). V koncentracijskem območju med 1 % in 20 % DHA velja linearnost. Determinacijski koeficient je 0,9993 in je večji od predpisane vrednosti 0,99.

Linearnost v koncentracijskem območju med 2,5 % in 20 % DHA smo dodatno potrdili tudi na posreden način v prisotnosti AA, kar predstavlja realni vzorec kasnejše stabilnostne študije z izračunom razlike med celokupno koncentracijo AA (po redukciji) in koncentracijo AA (pred redukcijo), kar predstavlja vsebnost DHA (slika 18). Determinacijski koeficient je bil 0,9991.



Slika 17: Odvisnost odziva AA po redukciji od koncentracije DHA (%)



Slika 18: Posredni način dokazovanja linearnosti DHA

4.2.2.4. Točnost

V koncentracijskem območju med 1 % in 20 % DHA velja točnost metode znotraj in med dnevi, saj so rezultati točnosti v intervalu med 90 % in 110 % (preglednica IX).

Preglednica IX: Prikaz točnosti redukcije znotraj in med dnevi

koncentracija DHA (%)	točnost znotraj dneva (%)	točnost med dnevi (%)
1	91,98	107,44
2,5	95,51	99,55
5	99,79	98,11
10	102,69	100,12
15	101,27	100,10
20	98,72	100,01

4.2.2.5. Meja zaznavnosti in meja določitve

Meja zaznavnosti DHA je pri koncentraciji 0,35 % ($1,72 \times 10^{-3}$ mg/mL), meja določitve pa 1,06 % ($5,19 \times 10^{-3}$ mg/mL). Parametra sta izračunana po ustreznih enačbah iz poglavja 3.3.2.5.

Na osnovi validacijskih parametrov, ki so vsi znotraj predpisanih oziroma postavljenih mej, smo dokazali primernost metode za določevanje vsebnosti askorbinske kisline in metode za določevanje dehidroaskorbinske kisline preko redukcijske metode.

4.3. STABILNOSTNA ŠTUDIJA

Ker o stabilnosti AA v trdnem agregatnem stanju obstaja bolj malo podatkov, smo se odločili, da bomo naredili stabilnostno študijo AA v trdni farmacevtski obliki in sicer na vzorcih praškov. Namen študije je bil ugotoviti vpliv pomembnih zunanjih dejavnikov, kot sta temperatura in kisik, na oksidacijo askorbinske kisline v trdni obliki. Askorbinsko kislino smo izpostavili na povišane temperature 40, 60 in 80 °C in na različne koncentracije kisika (pod 0,5, 2, 5, 10 in 21 % kisika). Prvotno so bili vzorci sestavljeni iz zmesi askorbinske kisline in škroba v razmerju 1 : 9, ker smo želeli čim bolj realno posnemati trdne farmacevtske oblike z askorbinsko kislino in hkrati preučevati tudi vpliv vlage na njeno stabilnost. Med šest tedensko študijo smo ugotovili, da je zmes AA in škroba nehomogena, saj smo opazili velika odstopanja pri določitvi vsebnosti AA in DHA med paralelkami. Zato smo kasneje pripravili tudi vzorce, ki so vsebovali le askorbinsko kislino in jih izpostavili enakim pogojem kot zmes AA. Vsebnost AA in DHA smo določili v skladu s postopki, opisanimi v točki 3.5. (enačbi 9, 11). Prav tako smo opazovali organoleptične lastnosti (obarvanost) vzorcev v obravnavanih časovnih točkah.

V zmesi AA in škroba smo opazili trend padanja vsebnosti AA še zlasti po 6. tednu na pogojih od najnižje koncentracije kisika do najvišje, pri temperaturi 80 °C (preglednica X). Toda rezultati vsebnosti AA niso verodostojni in zanesljivi, ker je zmes nehomogena. Kljub temu lahko sklepamo, da vlaga (nedefinirana vsebnost), ki je vezana na škrob, bistveno vpliva na stabilnost AA, še zlasti pri najvišjih vrednostih prisotnega kisika. V zmesi AA in škroba smo opazili le naključno nihanje vsebnosti DHA med različnimi pogoji. V prihodnje bi bilo smiselno optimizirati homogenizacijo vzorca in še enkrat proučiti stabilnost pri izbranih pogojih.

Preglednica X: Prikaz vsebnosti (povprečje dveh paralelek) AA in DHA v zmesi AA in škroba (1 : 9) po 6 tednih na različnih pogojih

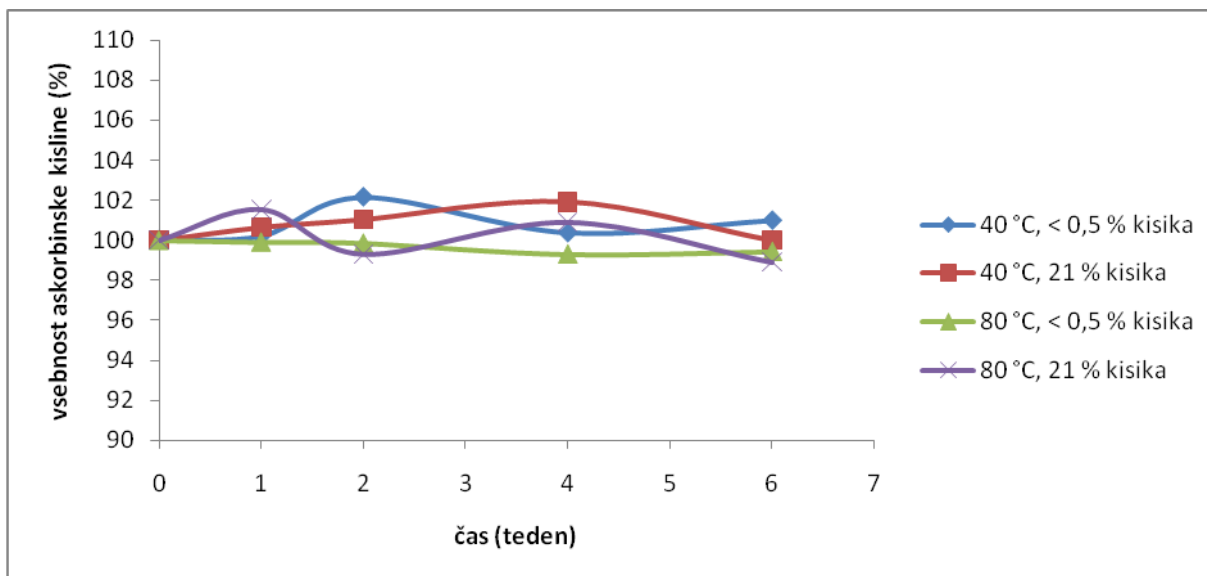
konc. kisika (%)	vsebnost AA (%), 40 °C	vsebnost AA (%), 60 °C	vsebnost AA (%), 80 °C	vsebnost DHA (%), 40 °C	vsebnost DHA (%), 60 °C	vsebnost DHA (%), 80 °C
< 0,5	115,86	115,37	126,82	/	2,08	2,60
2	114,72	108,50	100,63	1,07	0,46	1,31
5	116,25	116,19	101,33	1,52	2,00	1,94
10	113,21	103,67	88,39	2,15	0,86	1,51
21	113,72	107,09	62,18	1,70	1,73	1,96

Po drugi strani smo ugotovili, da je bila vsebnost askorbinske kisline v vseh vzorcih brez škroba, ki so bili izpostavljeni različnim koncentracijam kisika in temperaturam med 99 % in 102 % od začetka študije pa do 6. tedna. Vsebnost AA v vzorcih je rahlo odstopala šele po šestih tednih shranjevanja na temperaturi 80 °C in sicer od približno 99,5 % pri koncentraciji kisika pod 0,5 % do približno 99 % pri 21 % koncentraciji kisika (preglednica XI). Vzorec, ob času nič, ki ga nismo izpostavili zunanjim pogojem, je vseboval 100,0 % AA. Za ponazoritev dobre stabilnosti AA, je na sliki 19 prikazana vsebnost AA znotraj šest tedenske študije pri mejnih pogojih (npr. 40 °C in pod 0,5 % kisika oziroma 80 °C in 21 % kisika).

Preglednica XI: Prikaz vsebnosti AA in DHA v vzorcih AA brez škroba, ki so bili 6 tednov izpostavljeni v različni koncentraciji kisika in temperaturi

konc. kisika (%)	vsebnost AA (%), 40 °C	vsebnost AA (%), 60 °C	vsebnost AA (%), 80 °C	vsebnost DHA (%), 40 °C	vsebnost DHA (%), 60 °C	vsebnost DHA (%), 80 °C
< 0,5	100,98	100,47	99,44	1,33	1,46	2,12
2	100,85	100,61	99,42	0,69	1,33	1,63
5	100,76	100,70	99,67	1,38	1,84	1,67
10	100,03	99,92	98,80	2,27	1,92	1,34
21	100,01	100,38	98,91	2,38	1,79	2,32

Vsebnost dehidroaskorbinske kisline je po 6 tednih nihala med vzorci, ki so bili izpostavljeni različnim koncentracijam kisika in temperaturam in sicer od približno enega do dveh procentov. Približno 2 % DHA so vsebovali vzorci, ki so bili izpostavljeni najvišjim koncentracijam kisika pri vseh treh temperaturah (preglednica XI). Zaradi majhnega razpada AA je logično, da ni bistvenih razlik v vsebnosti DHA v vzorcih. Razlike bi se najverjetneje videle, če bi podaljšali čas študije.



Slika 19: Vsebnost askorbinske kisline v vzorcih tekom šest tedenske stabilnostne študije pri mejnih pogojih

Glede na to, da je trajala stabilnostna študija askorbinske kisline v trdni obliki le 6 tednov, smo z metodo HPLC ugotovili, da je v tem časovnem obdobju AA relativno stabilna, saj je njena vsebnost med 99 in 102 % v vzorcih pri vseh koncentracijah kisika in temperaturah, razen pri najbolj ekstremnih pogojih pri temperaturi 80 °C in koncentraciji kisika 10 % ali 21 % po šestem tednu, kjer je vsebnost AA padla pod 99,0 % (preglednica XI). Kljub temu, da so razlike v vsebnosti AA v vzorcih zelo majhne in da je vsebnost AA skoraj v vseh vzorcih blizu 100 %, smo opazili že po 4 tednih razliko v obarvanosti vzorcev. Vzorci, ki so bili izpostavljeni na temperaturi 40 °C in 60 °C, so bili belo obarvani pri vseh koncentracijah kisika. Vzorci, ki so bili izpostavljeni na temperaturi 80 °C, so bili že pri najnižji koncentraciji kisika (pod 0,5 %) svetlo rjavo obarvani, medtem ko so bili temno rjavo obarvani pri višji koncentraciji kisika (sliki 20, 21). V zmesi AA s škrobom smo opazili obarvanje že v krajšem časovnem obdobju in milejših pogojih. Rjavo obarvanje najverjetneje povzroča furfural, ki je eden od razpadnih produktov askorbinske kisline (slika 2). Furfurali pogosto polimerizirajo in tvorijo rjavo obarvane produkte, obseg nastanka pa je povezan z intenziteto barve (43).



Slika 20: Vzorca askorbinske kisline po štirih tednih shranjevanja na temperaturah 40 °C (levo) in 60 °C (desno) pri 21 % koncentraciji kisika.



Slika 21: Vzorca askorbinske kisline po štirih tednih shranjevanja na temperaturi 80 °C pri manj kot 0,5 % (levo) in 21 % (desno) koncentraciji kisika.

Furfuralov z našo metodo HPLC ne moremo vrednotiti, vendar vseeno sklepamo, da so prisotni v obarvanih vzorcih, zato bi bilo primerno uporabiti drugo metodo, s katero bi lahko dokazali poleg DHA tudi prisotnost morebitnih drugih razpadnih produktov askorbinske kisline. Ena od primernih metod bi bila masna spektroskopija, vendar je žal nismo imeli na voljo za uporabo. Pri nekaterih reakcijah, kot so na primer oksidacije, so poleg vsebnosti učinkovine pomembni tudi razpadni produkti, saj lahko zlasti pri oksidacijah nastajajo obarvani ali morda celo toksični produkti. Tudi v primeru AA smo pokazali, da določanje vsebnosti učinkovine, ni edini parameter za definiranje stabilnosti snovi, ampak lahko na kakovost pripravka vplivajo tudi spremembe organoleptičnih lastnosti, na primer obarvanost, ki se v našem primeru pojavi že pri majhni količini razpadnih produktov.

5. ZAKLJUČEK

V diplomski nalogi smo razvili ustrezno HPLC metodo za določevanje stabilnosti AA in DHA v trdni farmacevtski obliki. AA smo določevali direktno, medtem ko smo DHA določevali posredno na dva načina in sicer z derivatizacijo in redukcijo do nastanka AA.

Prvotno smo nameravali vrednotiti z eno kromatografsko metodo oba analita in sicer AA direktno, DHA pa selektivno z derivatizacijo z reagentom DMPD, a se je izkazalo, da je metoda nespecifična, z majhnim izkoristkom derivatizacije.

DHA smo določevali posredno z metodo redukcije do nastanka AA. Na osnovi razlike med celokupno koncentracijo AA po redukciji (vsota AA in DHA) in AA pred redukcijo smo z upoštevanjem izkoristka redukcije izračunali koncentracijo DHA v vzorcu. Redukcijo DHA smo izvedli s 5 mM koncentracijo reducenta TCEP, ki poteče v metafosforni kislini s pH 5,5 že po 15 minutah na sobni temperaturi in temnem prostoru. Izkoristek redukcije je 73,74 %.

Z validacijo smo dokazali, da sta metodi za določevanje vsebnosti AA in DHA ustrezni, saj so bili vsi validacijski parametri (selektivnost, natančnost, linearnost, točnost) znotraj predpisanih mej.

V stabilnostni študiji smo ugotovili, da povišana temperatura in različna koncentracija kisika nista imela posebnega vpliva na obstojnost AA v relativno kratkem času shranjevanja na izbranih pogojih, saj je bila vsebnost AA med 99 in 102 %. Rahel trend upada koncentracije AA je bil opazen le po šestih tednih na temperaturi 80 °C in sicer od približno 99,5 % pri koncentraciji kisika pod 0,5 % do 98,9 % pri 21 % koncentraciji kisika. Vsebnost DHA je bila v vseh vzorcih znotraj 1-2 %, kar je pričakovano zaradi majhnega razpada AA. Ta vrednost je znotraj napake metode.

Vzorci, ki so bili izpostavljeni temperaturi 80 °C vsaj štiri tedne, so bili pri vseh koncentracijah kisika rjavo obarvani. V zmesi AA in škroba se pojavi obarvanost že prej in pri milejših pogojih (40 °C), iz česar sklepamo, da ima vlaga, ki je vezana na škrob, pomemben vpliv na stabilnost AA. Organoleptične spremembe so najverjetneje posledica nastanka furfurala, ki je eden izmed razpadnih produktov AA.

Vsebnost čiste AA v trdni obliki pri različnih temperaturah in koncentracijah kisika je blizu 100 % tudi po šestih tednih. Vendar smo ugotovili, da vsebnost AA ni edini parameter za oceno kakovosti pripravka, ampak jo definiramo tudi s spremembo organoleptičnih lastnosti. V prihodnje bi bilo smiselno opazovati obnašanje AA v trdni obliki v daljšem časovnem obdobju, hkrati tudi optimizirati homogenizacijo zmesi AA in škroba ter po možnosti

uporabiti detekcijo razpadnih produktov AA z masno spektrometrijo, s čimer bi pridobili bolj relevantne podatke o vplivu koncentracije kisika, temperature in vlage na obstojnost AA.

6. LITERATURA

1. Davey MW, Montagu MV, Inze D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, Benzie I, Strain JJ, Favell D, Fletcher J: Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000; 80: 825-60.
2. Caballero B: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd Edition, Elsevier Science Ltd., Oxford, 2003: 316-32.
3. Mühleib F: *Vitamini za zdravje in dobro počutje*, DZS, Ljubljana, 1999: 80-4.
4. Rebouche CJ: Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1991; 54: 1147S-52S.
5. Patak P, Willenberg HS, Bornstein SR: Vitamin C is an important cofactor for both adrenal cortex and adrenal medulla. *Endocrine Research* 2004; 30(4): 871-75.
6. Nyssönen K, Poulsen HE, Hayn M, Agerbo P, Porkkala-Sarataho E, Kaikkonen J, Salonen R, Salonen JT: Effect of supplementation of smoking men with plain or slow release ascorbic acid on lipoprotein oxidation. *European Journal of Clinical Nutrition* 1997; 51: 154-63.
7. Urso ML, Clarkson PM: Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189: 41-54.
8. Sasazuki S, Sasaki S, Tsubono Y, Okubo S, Hayashi M, Tsugane S: Effect of vitamin C on common cold: randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition* 2006; 60: 9-17.
9. Burke KE: Interaction of vitamins C and E as better cosmeceuticals. *Dermatologic Therapy* 2007; 20: 314-21.
10. Špiclin P, Gašperlin M, Kmetec V: Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 2001; 222: 271-79.
11. Colven RM, Pinnel SR: Topical Vitamin C in Aging. *Clinics in Dermatology* 1996; 14: 227-34.
12. Duarte TL, Lunec J: Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radical Research* 2005; 39(7): 671-86.
13. Moshfegh A, Goldman J, Cleveland L: *What We Eat in America, NHANES 2001-2002: Usual Nutrient Intakes from Food Compared to Dietary Reference Intakes*. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service 2005.

14. Pauling L: Evolution and need for ascorbic acid. National Academy of Sciences 1970; vol. 67, No. 4: 1643-48.
15. Mindell E: Vitaminska biblija za novo tisočletje, Mladinska knjiga, Ljubljana, 2001: 88-91.
16. Hemilä H: Vitamin C supplementation and common cold symptoms: factors affecting the magnitude of the benefit. Medical Hypotheses 1999; 52(2): 171-78.
17. Ball G.F.M.: Bioavailability and analysis of vitamins in foods, Chapman and Hall, London 1998: 517-60.
18. UK Food Standards Agency: "Current EU approved additives and their E Numbers", <http://www.food.gov.uk/policy-advice/additivesbranch/enumberlist#.UW52jrVTCS0> povzeto 14. marca 2012.
19. Golob T: Določevanje vitamina C v krompirju – primerjava encimske metode s klasičnimi, magistrsko delo, Ljubljana, 1987.
20. <http://si.draagle.com>, povzeto aprila 2013.
21. Kimoto E, Tanaka H, Ohmoto T, Choami M: Analysis of the transformation products of dehydro-L-ascorbic acid by ion-pairing high-performance liquid chromatography. Analytical Biochemistry 1993; 214: 38-44.
22. Yuan JP, Chen F: Degradation of ascorbic acid in aqueous solution. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1998; 46: 5078-82.
23. Iwase H: 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: 317-26.
24. Musulin RR, King CG: Metaphosphoric acid in the extraction and titration of vitamin C. Journal of Biological Chemistry 1936; 116: 409-13.
25. Imer F, Sonmezoglu IC, Kozcaz M: The role of buffers on the kinetics of L-ascorbic acid oxidation catalyzed by copper (II). Italian Journal of Food Science 2003; n. 4, vol. 15: 521-29.
26. Connors KA, Amidon GL, Stella VJ: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists, 2nd edition, Wiley – Interscience, 1986: 208-20.
27. Pavlovska G, Tanevska S: Influence of temperature and humidity on the degradation process of ascorbic acid in vitamin C chewable tablets. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 2012.
28. Gökmen V, Kahraman N, Demir N, Ascar J: Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables. Journal of Chromatography A 2000; 881: 309-16.

29. Lisjak M, Špoljarević, Agić D, Andrić L: Praktikum iz fiziologije bilja, 2009: 72-73 (http://www.pfos.hr/~dsego/ispitna_literatura/praktikum_fiziologije_bilja.pdf), povzeto marca 2013.
30. Nisperos-Carriedo MO, Buslig BS, Shaw PE: Simultaneous detection of dehydroascorbic, ascorbic, and some organic acids in fruits and vegetables by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1992; 40: 1127-30.
31. Gioia MG, Andreatta P, Boschetti S, Gatti R: Development and validation of liquid chromatographic method for the determination of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and acetaminophen in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008; 48: 331-39.
32. Deutsch JC: Dehydroascorbic acid. *Journal of Chromatography A* 2000; 881: 299-307.
33. Wechtersbach L, Cigić B: Reduction of dehydroascorbic acid at low pH. *Journal of Biochemical Biophysical Methods* 2007; 70: 767-72.
34. Križaj I: Proteomika. Posvetovanje Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost: Metode za analizo proteoma, Ljubljana, 31. jan. in 1. feb. 2008: 19-33.
35. Žorž M: HPLC, Samozaložba, Ljubljana, 1991: 5, 140-4.
36. Štrancar A: Tečaj Osnove HPLC tehnik: zbornik predavanj: Osnove visokoločljivostne tekočinske kromatografije (HPLC), (s. n.), Ljubljana, 1998: 1-15.
37. Ahuja S, Scypinski S: *Handbook of modern pharmaceutical analysis, Preformulation*, Academic Press, 2001: 221.
38. Skoog D, West DM, Holler FJ: *Analytical Chemistry An Introduction*, 5th Edition, Saunders College Publishing, 1998: 355-79, 725-65.
39. Pihlar B: Tečaj Osnove HPLC tehnik: zbornik predavanj: Detektorji v HPLC tehniki, (s. n.), Ljubljana, 1998: 23-31.
40. <http://sl.scribd.com/doc/23022819/VALIDACIJE>), povzeto marca 2013.
41. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005.
42. Bühler V: *Vademecum for Vitamin Formulations*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1988
43. Rodriguez M, Sadler GD, Sims SA, Braddock RJ: Chemical changes during storage of an alcoholic orange juice beverage. *Journal of Food Science* 1991; 56: 475-79.