

**UNIVERZITET CRNE GORE**  
**METALURŠKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**HEMIJSKA TEHNOLOGIJA**

Milović Anastasija

**Spektrofotometrijsko određivanje vitamina C u  
prisustvu različitih stabilizatora**

MASTER RAD

Podgorica, 2023. godine

**UNIVERZITET CRNE GORE**  
**METALURŠKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**HEMIJSKA TEHNOLOGIJA**

Milović Anastasija

**Spektrofotometrijsko određivanje vitamina C u  
prisustvu različitih stabilizatora**

MASTER RAD

Podgorica, 2023. godine

## PODACI I INFORMACIJE O MAGISTRANDU

Ime i prezime: Anastasija Milović

Datum i mjesto rođenja: 11.07.1998. godine; Nikšić

Institucija: Univerzitet Crne Gore - Podgorica

Naziv završenog osnovnog studijskog programa i godina završetka studija: Hemijska tehnologija, 2020. godine

## INFORMACIJE O MAGISTARSKOM RADU

Naziv studija: Hemijska tehnologija

Naslov rada: Spektrofotometrijsko određivanje vitamina C u prisustvu različitih stabilizatora

Fakultet: Metalurško-tehnološki fakultet

## UDK, OCJENA I ODBRANA MASTER RADA

UDK:

Datum prijave rada: 09.02.2023. godine

Datum prihvatanja teme: 07.04.2023. godine

Mentor: Prof. dr Vesna Vukašinović Pešić, vanredni profesor

Komisija za ocjenu rada:

Prof. dr Nada Blagojević, MTF, predsjednik

Prof. dr Vesna Vukašinović-Pešić, MTF, mentor

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, član

Komisija za odbranu radu:

Prof. dr Nada Blagojević, MTF, predsjednik

Prof. dr Vesna Vukašinović-Pešić, MTF, mentor

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, MTF, član

Lektor: Autolektura

Datum odbrane: 2023. godine

## **IZJAVA O AUTORSTVU**

Kandidat: Anastasija Milović

Na osnovu člana 22 Zakona o akademskom integritetu, ja, dolje potpisana

**IZJAVLJUJEM**

pod punom krivičnom i materijalnom odgovornošću da je master rad pod nazivom „Spektrofotometrijsko određivanje vitamina C u prisustvu različitih stabilizatora” rezultat sopstvenog istraživačkog rada da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica i da je navedeni rad moje originalno djelo.

U Podgorici,

Potpis studenta:

## **Zahvalnica**

*U ovih par riječi želim da iskažem zahvalnost prvenstveno mojim profesoricama prof. dr Vesni Vukašinović Pešić, prof.dr Nadi Blagojević i prof. dr Biljani Damjanović Vratnici koje su svojim znanjem i stručnošću pomogle mi da svoje master studije uspješno privedem kraju.*

*Takođe moram da pomenem i svoju porodicu koja je uvijek bili tu za mene, pružali mi nesebičnu podršku, ljubav i razumjevanje na putu ka ostvarenju svojih ciljeva.*

*Prijateljima hvala što su bili izvor inspiracije i motivacije. Vaše riječi ohrabrenja, sesije učenja i neizmjerna prijateljstva su ovaj put učinili zabavnim i nazaboravnim. Zahvalna sam što vas imam uz sebe.*

*Ovaj master rad ne bi bio moguć bez vaše ljubavi, podrške i vođstva.*

**Anastasija Milović**

## IZVOD

U ovom radu vršena je spektrofotometrijska analiza stabilnosti vitamina C u četiri stabilizatora: citratno-fosfatnom puferu, citratno-fosfatnom puferu u prisustvu EDTA, 1 M hlorovodoničnoj kiselini, kao i 1 M hlorovodoničnoj kiselini u prisustvu EDTA. Praćenjem stabilnosti askorbinske kiseline, utvrđeno je da je u pomenutim stabilizatorima askorbinska kiselina stabilna više od 3 sata. Dobijene su regresione jednačine za spektrofotometrijska ispitivanja vitamina C u svim korišćenim stabilizatorima sa odgovarajućim analitičkim karakteristikama. Za dobijene kalibracione dijagrame korelacioni koeficijent (R) se kretao od 0,9989 do 0,9994, što ukazuje na jaku linearnu vezu između koncentracije askorbinske kiseline i apsorbancije mjerene na 250 nm. U radu je ispitivana i selektivnost metode na osnovu uticaja pojedinih interferirajućih komponenti na sadržaj vitamina C. Dobijeni kalibracioni dijagrami su korišćeni za određivanje vitamina C u standardnom rastvoru ( $6 \cdot 10^{-5}$  M) i realnim uzorcima čija je koncentracija vitamina C navedena na deklaraciji u opsegu od 30-1000 mg (7 suplemenata vitamina C kupljenih u lokalnim apotekama u Podgorici). Radi provjere pouzdanosti spektrofotometrijskih metoda vitamin C je određivan i usvojenim analitičkim metodama za određivanje vitamina C (jodimetrija i HPLC). Provjeravanjem preciznosti određivanja askorbinske kiseline, korišćenjem standardnog rastvora poznate koncentracije, predloženim spektrofotometrijskim metodama dobijena su niska relativna standardna odstupanja (od 0,55 do 1,26%), a najmanje odstupanje je dobijeno metodom gdje se kao stabilizator koristila 1 M HCl i EDTA (0,55%). Takođe limit kvantifikacije je najniži kad se koristi 1 M HCl i EDTA kao stabilizator ( $0,76 \cdot 10^{-6}$  M). Molarne apsorptivnosti dobijene za sve četiri metode su imale visoke vrijednosti ( $7,32 \cdot 10^3 - 8,49 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) što pokazuje da su sve metode visoko osjetljive.

Na osnovu dobijenih rezultata u ovom master radu, pokazalo se da se spektrofotometrijske metode uz odgovarajuće stabilizatore mogu koristiti kao pogodne metode za određivanje vitamina C u ispitivanim realnim uzorcima i da se mogu koristiti kao alternativa već usvojenim metodama, a posebno spektrofotometrijska metoda kod koje je kao stabilizator korišćen sistem 1M HCl i EDTA. Kod svih ispitivanih realnih uzoraka pokazalo se da je najbolje slaganje rezultata između spektrofotometrijske metode sa stabilizatorom 1 M HCl i EDTA i HPLC metode. Ovo je posebno izraženo kod rezultata dobijenih ispitivanjem uzoraka koji u svom sastavu nemaju dodatih komponenti.

*Ključne riječi:* vitamin C, stabilizatori, spektrofotometrija, jodimetrija, HPLC

## ABSTRACT

In this study, spectrophotometric analysis of vitamin C stability in four stabilizers was performed: citrate-phosphate buffer, citrate-phosphate buffer in the presence of EDTA, 1 M hydrochloric acid, as well as 1 M hydrochloric acid in the presence of EDTA. By monitoring the stability of ascorbic acid, it was found that in the mentioned stabilizers ascorbic acid is stable for more than 3 hours. Regression equations were obtained for spectrophotometric studies of vitamin C in all used stabilizers with appropriate analytical characteristics. For the obtained calibration diagrams, the correlation coefficient (R) ranged from 0.9989 to 0.9994, indicating a strong linear relationship between the concentration of ascorbic acid and the absorbance measured at 250 nm. The paper also examined the selectivity of the method based on the influence of certain interfering components on the content of vitamin C. The resulting calibration diagrams were used to determine vitamin C in standard solution ( $6 \cdot 10^{-5}$  M) and real samples whose concentration of vitamin C is indicated on the label in the range of 30-1000 mg (7 vitamin C supplements purchased at local pharmacies in Podgorica). In order to verify the reliability of spectrophotometric methods, vitamin C was determined by adopted analytical methods for determining vitamin C (iodimetry and HPLC). By checking the accuracy of determination of ascorbic acid, using a standard solution of known concentration, the proposed spectrophotometric methods obtained low relative standard deviations (from 0.55 to 1.26%), and the smallest deviation was obtained by a method where 1 M HCl and EDTA (0.55%) were used as stabilizers. Also, the quantification limit is lowest when using 1 M HCl and EDTA as a stabilizer ( $0.76 \cdot 10^{-6}$  M). Molar absorbances obtained for all four methods had high values ( $7.32 \cdot 10^3$  -  $8.49 \cdot 10^3$   $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) which shows that all methods are highly sensitive.

Based on the results obtained in this master paper, it has been shown that spectrophotometric methods with appropriate stabilizers can be used as suitable methods for determining vitamin C in the tested real samples and that they can be used as an alternative to the already adopted methods, especially spectrophotometric method in which the system 1M HCl and EDTA were used as a stabilizer. In all tested real samples, it was shown that the best matching of results was between spectrophotometric method with stabilizer 1 M HCl and EDTA and HPLC method. This is particularly pronounced in the results obtained by testing samples that have no added components in their composition.

*Keywords:* vitamin C, stabilizers, spectrophotometry, iodimetry, HPLC

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	9
2. TEORIJSKI DIO .....	10
2.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE VITAMINA C .....	10
2.1.1. Fiziološka funkcija .....	12
2.1.2. Antioksidativna i prooksidativna sposobnost .....	13
2.2. PRIMJENA VITAMINA C .....	16
2.3. STABILNOST VITAMINA C .....	17
2.3.1. Uticaj pH vrijednosti i koncentracije na stabilnost vitamina C u rastvorima .....	18
2.3.2. Uticaj temperature na stabilnost vitamina C .....	19
2.3.3. Uticaj UV svjetlosti na stabilnost vitamina C .....	20
2.4. IZVOR VITAMINA C .....	20
2.5. ODREĐIVANJE VITAMINA C .....	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	26
3.1. INSTRUMENTI I HEMIKALIJE .....	26
3.1.1. Instrumenti .....	26
3.1.2. Hemikalije i realni uzorci .....	27
3.2. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE VITAMINA C .....	29
3.2.1. Praćenje stabilnosti vitamina C uz prisustvo različitih stabilizatora .....	29
3.2.2. Snimanje kalibracionih pravih za određivanje vitamina C .....	30
3.2.3. Uticaj interferirajućih komponenti na određivanje vitamina C .....	30
3.3. ODREĐIVANJE VITAMINA C METODOM TITRACIJE .....	31
3.4. ODREĐIVANJE VITAMINA C HPLC METODOM .....	32
3.5. STATISTIČKE METODE .....	33
4. REZULTATI I DISKUSIJA .....	34
4.1. SNIMANJE SPEKTARA ASKORBINSKE KISELINE U PRISUSTVU RAZLIČITIH STABILIZATORA .....	34
4.2. STABILNOST VITAMINA C UZ PRISUSTVO RAZLIČITIH STABILIZATORA .....	36
4.3. KALIBRACIONI DIJAGRAMI RASTVORA ASKORBINSKE KISELINE U RAZLIČITIM STABILIZATORIMA .....	39
4.4. ODREĐIVANJE ASKORBINSKE KISELINE U PRISUSTVU OMETAJUĆIH KOMPONENTI .....	49
4.5. SADRŽAJ VITAMINA C U REALNIM UZORCIMA .....	51
5. ZAKLJUČAK .....	53
6. LITERATURA .....	55



## 1. UVOD

Vitamin C, poznat kao askorbinska kiselina, je vitamin rastvorljiv u vodi koji igra vitalnu ulogu u održavanju dobrog zdravlja. To je esencijalni nutrijent koji ljudsko tijelo ne može proizvesti i mora se unositi hranom ili suplementima. Vitamin C je uključen u mnoge važne funkcije u organizmu, uključujući proizvodnju kolagena, apsorpciju gvožđa i funkciju imunog sistema. Takođe je snažan antioksidans koji pomaže u zaštiti organizma od štetnih slobodnih radikala koji mogu da oštete ćelije i doprinesu razvoju hroničnih bolesti. Vitamin C se nalazi u raznim namirnicama, uključujući citrusno voće, bobice, kivi, paradajz, paprike i lisnato povrće. Adekvatan unos vitamina C važan je za opšte zdravlje i dobrobit, a nedostatak može dovesti do niza zdravstvenih problema.

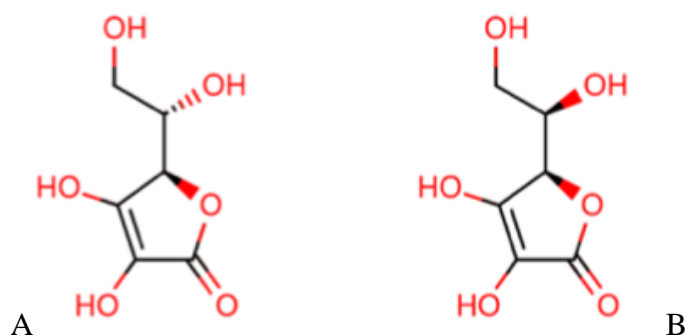
U ovom master radu je u teorijskom dijelu dat literaturni pregled o osobinama vitamina C, funkciji, izvorima, njegovoj stabilnosti, preventivnim i terapijskim svojstvima kao i metodama određivanja. S obzirom na veliku nestabilnost ovog vitamina potrebno je prisustvo odgovarajućih stabilizatora kako bi se spriječila ili usporila njegova razgradnja. Zbog toga su u eksperimentalnom dijelu rada vršena sledeća istraživanja:

- Izbor pogodnog stabilizatora koji će inhibirati oksidaciju vitamina C u vodenim rastvorima određeni vremenski period. Stabilnost će se pratiti mjerenjem promjene apsorbanace na radnoj talasnoj dužini za vitamin C u datom stabilizatoru;
- Dobijanje linearne regresione jednačine sa analitičkim karakteristikama predložene spektrofotometrijske metode za određivanje vitamina C ( osjetljivost metode, odsječak baždarnog pravca, standardna devijacija odsječka, standardna devijacija nagiba, koeficijent korelacije, granica detekcije, granica određivanja, linearni opseg, molarna apsorptivnost, relativna standardna devijacija);
- Ispitivanje selektivnosti predložene spektrofotometrijske metode kroz ispitivanje uticaja interferirajućih komponenti na direktno spektrofotometrijsko određivanje vitamina C u prisustvu odabranog stabilizatora;
- Određivanje vitamina C predloženom metodom u realnim uzorcima;
- Provjera pouzdanosti određivanja sadržaja vitamina C predloženom metodom tako što će se paralelno vršiti i određivanja sa već usvojenim analitičkim metodama.

## 2. TEORIJSKI DIO

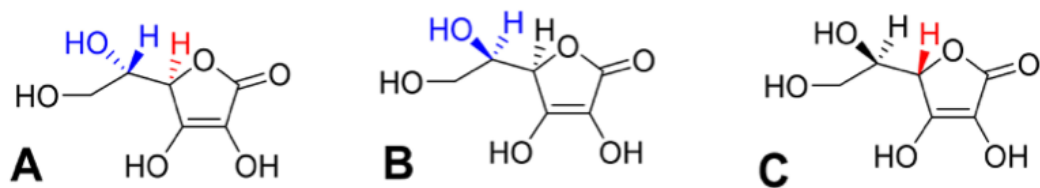
### 2.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE VITAMINA C

Askorbinska kiselina  $C_6H_8O_6$  (L-enantiomer, slika 1), obično poznata kao vitamin C je praškasta supstanca bijele boje, kiselog ukusa i lako rastvorljiva u vodi. Sastoji se od šest atoma ugljenika ( $C_6H_8O_6$ ) čija struktura liči strukturi glukoze. Pored ugljenika ona sadrži i 8 atoma vodonika i 6 atoma kiseonika povezanih dvostrukim i jednostrukim kovalentnim vezama. To je aldono-1,4-lakton heksanske kiseline sa endiol grupom na ugljenicima 2 i 3. Kao esencijalni mikronutrijent, askorbinska kiselina igra vitalnu ulogu u održavanju normalnih metaboličkih procesa i homeostaze u ljudskom tijelu, a D-izoaskorbinska kiselina je stereoizomer askorbinske kiseline (slika 1). Čelije sisara ne mogu da sintetišu askorbinsku kiselinu zbog nedostatka L-gulono-1,4 lakton oksidaze, koja je esencijalni enzim za proizvodnju askorbinske kiseline (Hasan i sar., 2015; Cheng i sar., 2022).



**Slika 1.** Stereoizomeri askorbinske kiseline – (A) L-askorbinska kiselina i (B) D-izoaskorbinska kiselina (Yin i sar., 2022).

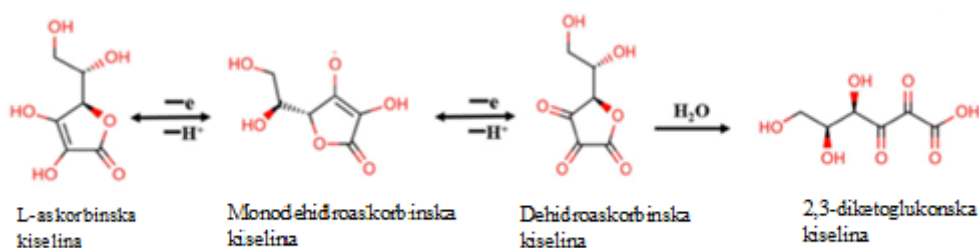
Askorbinska kiselina obuhvata i njen oksidovani oblik, L-dehidroaskorbinsku kiselinu, koja se lako može pretvoriti u L-askorbinsku kiselinu u ljudskom tijelu. Vitamin C (slika 2A) je veoma značajan za ljudsko zdravlje uglavnom zbog svojih antioksidativnih svojstava. Njen epimer eritorbinska kiselina (slika 2B), takođe poznata kao izoaskorbinska kiselina ili D-araboaskorbinska kiselina, koja se koristi kao aditiv za hranu, i njen enantiomer D-askorbinska kiselina (slika 2C) su takođe djelimično aktivni kao vitamin C. Međutim, oni se slabo zadržavaju u tkivima i brže se izlučuju iz organizma (Zilva, 1935; Robertson, 1963; Hornig, 1975; Englard i Seifter, 1986; Sauberlich i sar., 1996; Rodrigues i sar., 2001).



**Slika 2.** Optički izomeri vitamina C; (A) L-askorbinska kiselina, (B) eritorbinska kiselina, (C) D-askorbinska kiselina (Englard i Seifter, 1986)

Vitamin C se najvećim dijelom nalazi u voću i povrću, dok ga u nekim biljkama koje se koriste u kozmetici ima u manjoj koncentraciji. Povrće i voće služe kao prirodni izvori unosa vitamina C. Međutim, ovaj vitamin se danas dosta unosi u organizam u vidu suplemenata proizvedenih industrijski iz D-glukoze, a postupak obuhvata nekoliko složenih hemijskih i biotehnoloških faza (Ullah i sar., 2011; Gunter i Hanspeter, 2014;).

Glavni izazov u razvoju proizvoda koji sadrže askorbinsku kiselinu je njena visoka nestabilnost i reaktivnost. Askorbinska kiselina se reverzibilno oksiduje u dehidroaskorbinsku kiselinu (DHA) nakon izlaganja svjetlosti, toploti, jonima prelaznih metala i alkalnoj sredini. DHA dalje nepovratno hidrolizuje formirajući 2,3-diketogulonsku kiselinu (slika 3). Posljednjih decenija, mnoga istraživanja se rade u cilju pronalaženja što boljih načina zaštite askorbinske kiseline od uticaja faktora okruženja, kao što je recimo inkapsulacija askorbinske kiseline slojevima različitog materijala (Yin i sar., 2022).

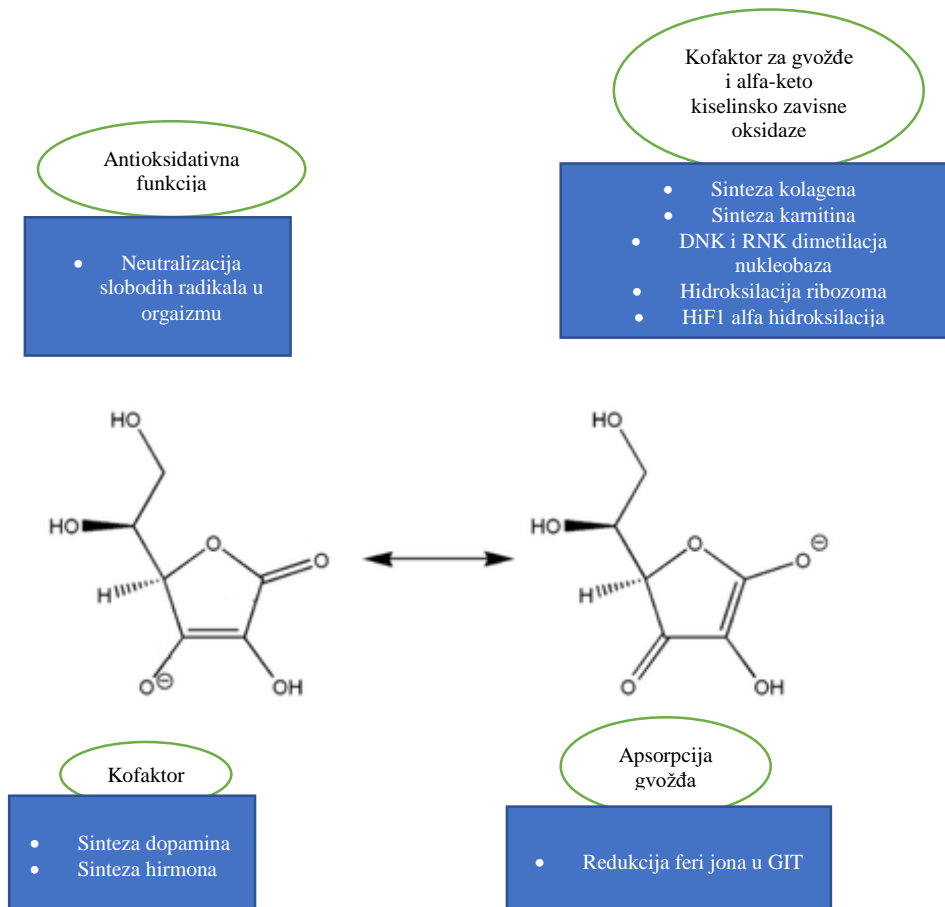


**Slika 3.** Degradacija L-askorbinske kiseline u dehidroaskorbinsku kiselinu i nepovratna hidroliza u 2,3-diketogulonsku kiselinu (Yin i sar., 2022)

Unošenje prirodne i sintetičke askorbinske kiseline ishranom je jedini način da se održe fiziološke potrebe organizma za ovim vitaminom. Dobro poznati simptom nedostatka askorbinske kiseline (skorbut) povezan je sa oštećenjem vezivnog tkiva koji karakteriše krhko tkivo i slabo zarastanje rana (Bei, 2013).

### 2.1.1. Fiziološka funkcija

Zbog brojnih fizioloških funkcija vitamina C u organizmu rađena su brojna istraživanja ovog vitamina (Padayatty i Levine, 2016). Može se reći da je njegova funkcija dominantno povezana sa svojom sposobnošću doniranja elektrona. Vitamin C učestvuje u nekoliko procesa koji se odnose na sintezu kolagena, sintezu hormona (noradrenalin/adrenalin i peptidni hormoni), sintezu karnitina, transkripciju gena i regulaciju translacije putem različitih mehanizama (hidroksilacija transkripcionih faktora, tRNK i ribozoma, proteini, demetilacija DNK i histona), eliminacija tirozina, zaštita od reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i smanjenje koncentracije gvožđa u gastrointestinalnom traktu (GIT) (slika 4) (Padayatty i Levine, 2016). Sve ove oksigenaze zavisne od vitamina C imaju metal, gvožđe ili bakar u svom aktivnom mjestu.



**Slika 4.** Prikaz fizioloških funkcija vitamina C (Padayatty i Levine, 2016)

### 2.1.2. Antioksidativna i prooksidativna sposobnost

Nusproizvodi normalnog ćelijskog metabolizma su reaktivne vrste kiseonika (ROS), uključujući superoksidni radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ), singletni kiseonik ( $^1O_2$ ), vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ) i visoko reaktivni hidroksilni radikal ( $OH^{\bullet}$ ). Štetan efekat ROS-a je da može pokrenuti kaskadu radikala, proizvodeći hidroksil slobodne radikale i druge destruktivne vrste. Oni dalje indukuju oštećenje proteina i DNK, peroksidaciju lipida i konačno dovode do apoptoze ćelije (Su i sar., 2019). Kada antioksidativni odbrambeni sistem organizma ne može u potpunosti da eliminiše toksične ROS nakupljene u ćelijama, dolazi do pojave tzv. „oksidativnog stresa“ (Dalle-Dnne i sar., 2003).

Pored enzimskih reakcija, koje spadaju u prirodni odbrambeni antioksidativni sistem organizma, ROS se takođe može eliminisati putem neenzimskih sredstava kao što su antioksidansi. Jedan od njih je i askorbinska kiselina koja hvatanjem slobodnih radikala i drugih vrsta kiseonika, može zaštititi ćelije od oksidativnog oštećenja izazvanog ROS-om. Antiradikalna sposobnost obično odražava antioksidativnu sposobnost, a askorbinska kiselina u hrani i biosistemima djeluje kao antioksidans. Kao najefikasniji i prirodni antioksidans sa najmanje neželjenih efekata, askorbinska kiselina može da inhibira različite bolesti izazvane oksidativnim stresom u tijelu, kao što su rak, kardiovaskularne bolesti, starenje i katarakta. Istraživanja su pokazala da je mortalitet od ovih bolesti obrnuto povezan sa koncentracijom askorbinske kiseline u plazmi (Da Cruz i sar., 2018).

U poređenju sa drugim polifenolima ili flavonoidnim antioksidansima, askorbinska kiselina prekida lančanu reakciju slobodnih radikala kroz disproporcionisanje reakcija, a proizvodi reakcije kao što su DHA i 2,3-diketogulonska kiselina (slika 3) nisu radikali i ne djeluju štetno (Su i sar., 2019; Sukalović i sar., 2010).

Askorbinska kiselina se takođe koristi kao antioksidans za zaštitu senzornih i nutritivnih svojstava hrane. Koristi se kao sredstvo protiv tamnjenja povrća i voća uzrokovanog oksidacijom (Sukalović i sar., 2010). Askorbinska kiselina inhibira pojavu smeđe boje tako što redukuje o-hinon (obojen), koji proizvodi polifenol oksidaza, u bezbojan difenol kroz proces koji se naziva „reakcija deaktivacije“ (Altunkaya i Gokmen, 2008). Takođe, dodavanje askorbinske kiseline smanjuje pH sredine i samim tim utiče na smanjenje aktivnosti polifenol oksidaze (Landi i sar., 2013).

U mesnim proizvodima, askorbinska kiselina se široko koristi kao prirodni reagens za održavanje stabilnosti boje tako što inhibira oksidaciju lipida koji dovode do promjene boje (Caiyun i sar., 2021).

U poređenju sa drugim organskim kiselinama kao što su jabučna, limunska i vinska kiselina, askorbinska kiselina je pokazala najbolji zaštitni efekat na kvalitet suhomesnatih proizvoda (Kim i sar., 2019). Površina svinjskog mesa naprskana askorbinskom kiselinom i mješavinom askorbinske kiseline i ekstrakta ruzmarina održava dobru stabilnost boje, sadržaj vode i pH posle skladištenja zamrzavanjem (Perlo i sar., 2018). Međutim, askorbinska kiselina najčešće se ne navodi kao sastojak na pakovanju ovih proizvoda jer ne predstavlja hranjivu komponentu već sredstvo za održavanje stabilnosti boje (Fredriksen i sar., 2009).

Značaj askorbinske kiseline se ogleda i prilikom obnavljanju  $\alpha$ -tokoferola i tetrahidrobiopterina, a smatra se da ima biološki značaj jer su ove aktivnosti povezane sa zaštitom od endotelne disfunkcije (Mortensen i Lykkesfeldt, 2014, Oudemans-van Straaten i sar., 2014; Carr i Maggini, 2017)

Formirani slobodni radikal askorbata, takođe poznat kao monodehidroaskorbat ili semidehidroaskorbat, prilično je stabilan i može se detektovati u biološkim tečnostima u koncentraciji od 10 nM (May, 2012; Padayatty i sar., 2003). Ovaj radikal nije mnogo reaktivan ali iz dva molekula ovog radikala može nastati dehidroaskorbinska kiselina, a može se takođe i direktno transformisati u askorbinsku kiselinu pomoću enzima zavisnih od nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) ili nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), kao što su tioredoksin reduktaza (koji održava redoks ravnotežu između oksidovanih i redukovanih stanja molekula u živim organizmima) i citohrom B5 reduktaza (koji se još naziva i metemoglobin) (Banhegyi i sar., 1997; May, 2012; May i Harrison, 2013).

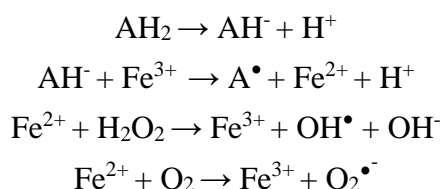
Postoje istraživanja koja pokazuju da vitamin C utiče na oporavak tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>). Ustanovljeno je da su veće koncentracije vitamina C prisutne u plazmi povezane sa višim koncentracijama tetrahidrobiopterina (Kim i Park, 2010).

Uloga vitamina C u prevenciji endotelne disfunkcije je dodatno potvrđena drugim istraživanjima: (1) sprječava adheziju leukocita na endotelne ćelije uzrokovanu i oksidovanim "low density lipoproteins" (LDL-om) i dimom cigareta, smanjuje nivoe reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) u endotelnim ćelijama in vitro, poboljšava širenje krvnih sudova (vazodilataciju), normalizuje TBARS (supstance reaktivne sa tiobarbiturnom kiselinom, neselektivni marker peroksidacije lipida) kod pušača (Motoyama i sar., 1997; Gokce i sar., 1999; Wu i sar., 2002; Gligorovski i sar., 2013).

Još jedna uloga vitamina C je da se unošenjem u većim koncentracijama može ponašati kao prooksidans i ovo svojstvo je potencijalno korisno za liječenje raka. Prooksidativna aktivnost se definiše kao sposobnost antioksidanasa da redukuju jone prelaznih metala u niže oksidaciono stanje (Fentonova reakcija) (Batalova i sar., 2016). Uloga askorbinske kiseline je

da održi jone prelaznih metala ovih enzima u redukovanom obliku kako bi ispoljila svoju maksimalnu fiziološku aktivnost (Padh, 1990; Patak i sar., 2004).

U Fentonovoj reakciji, jone prelaznih metala kao što je  $\text{Fe}^{3+}$  redukuje askorbinska kiselina, a zatim  $\text{Fe}^{2+}$  dalje reaguje sa kiseonikom i vodonik-peroksidom da bi se formirali visoko aktivni i destruktivni hidroksilni radikali (Rietjens i sar., 2002).



$\text{AH}_2$  - askorbinska kiselina;  $\text{AH}^-$  - askorbat anjon;  $\text{A}^\bullet$  - askorbil radikal;  $\text{OH}^\bullet$  - hidroksil radikal;  $\text{O}_2^{\bullet-}$  - superoksidni radikal

Dakle, prooksidativna aktivnost askorbinske kiseline povezana je sa interakcijom sa jonima prelaznih metala (naročito gvoždem i bakrom). U uslovima visoke koncentracije askorbata, vitamin C katalizuje redukciju slobodnih jona prelaznih metala, što izaziva stvaranje kiseonikovih radikala. Redukovani joni gvožđa reaguju sa vodonik-peroksidom i formiraju reaktivne hidroksilne radikale ili peroksidne jone. Ova reakcija se dešava u prisustvu kiseonika (Kaźmierczak-Barańska, 2020).

Kao prirodni antioksidans, askorbinska kiselina uglavnom postoji u kombinaciji sa drugim komponentama (antioksidansima) u prirodnim proizvodima, što može proizvesti aditivne ili čak sinergističke efekte. Askorbinska kiselina i vitamin E, kao antioksidansi imaju važan inhibitorski efekat na autooksidaciju polinezasićenih lipozoma ćelijske membrane in vivo i oksidaciju lipida in vitro (Liu i sar., 2008).

Sinergija između  $\alpha$ -tokoferola i askorbinske kiseline zasniva se na sposobnosti askorbinske kiseline da regeneriše  $\alpha$ -tokoferol i održava njegov antioksidativni kapacitet (Niki, 2014).

U majonezu, dodata askorbinska kiselina deluje kao lipidni antioksidans ili prooksidans u zavisnosti od prisustva ili odsustva antioksidansa rastvorljivog u mastima, tj. vitamina E. U sistemu koji sadrži vitamin E, sinergistički antioksidativni efekat ova dva vitamina je jači od prooksidativnog efekata askorbinske kiseline.

Pored toga, dehidroaskorbinska kiselina može nepovratno razgraditi i proizvesti visoko reaktivne karbonilne međuproizvode, koji mogu izazvati glikozilaciju proteina. Ovo je

neenzimska, nespecifična reakcija između karbonilnih i amino grupa, koja se javlja kod raznih bolesti povezanih sa starosnom dobi (Scheffler i sar., 2019).

Vrijedi napomenuti da prooksidacija askorbinske kiseline može indukovati uništenje ćelija raka, čime se u određenoj mjeri ispoljavaju anti-kancerogeni efekti vitamina C.

## **2.2. PRIMJENA VITAMINA C**

Zbog svoje biološke aktivnosti askorbinska kiselina se uglavnom koristi kao antioksidans za inhibiciju tamnjenja hrane i kao dodatak u ishrani ljudi.

Obogaćivanje prehrambenih proizvoda različitim dodacima može poboljšati njenu nutritivnu vrijednost. Takvi proizvodi često sadrže niz bioaktivnih jedinjenja. Na primjer, dodavanjem kalcijuma i antioksidanasa kao što su vitamini C i E u proizvode od mesa, može se dobiti kvalitetan proizvod sa visokokvalitetnim životinjskim proteinima, mastima, multivitaminima i mineralima. Askorbinska kiselina u ovakvim proizvodima pored toga što predstavlja nutritivni aditiv, održava ukus i boju proizvoda, a takođe i sprečava stvaranje nitrozamina u mesu (Nitin i sar., 2015). Takođe je dobro poznato da polifenol oksidaza katalizuje enzimsko posmeđivanje fenolnih supstrata da bi se dobio melanin tamne boje. Ovo tamnjenje utiče na senzorni kvalitet proizvoda i smanjuje broj potrošača koji takav proizvod žele da kupe. Ispitivanja su pokazala da dodavanje mikrokapsula ksiloglukana koje sadrže askorbinsku kiselinu u pečenu hranu, kao što su pljeskavice, može značajno da inhibira tamnjenje koje se javlja tokom procesa pripreme i da zadrži senzorne kvalitete proizvoda (Comunian i sar., 2013)

Natrijum askorbat, kao antioksidans, može da odloži razgradnju vitamina A (Zhou i sar., 2021). Takođe, pokazano je da kombinacija butilovanog hidroksitoluena i askorbinske kiseline značajno inhibira oksidaciju i izomerizaciju vitamina A u obranom mlijeku u prahu tokom termički kontrolisanog skladištenja (Liu i sar., 2018).

Pokazalo se da askorbinska kiselina poboljšava kvalitet hljeba i ojačava mu strukturu kada se doda tokom proizvodnje, iako dolazi do degradacije askorbinske kiseline usled pečenja hljeba na visokoj temperaturi (Tsaloeva i sar., 2013).

Kao dodatak ishrani, askorbinska kiselina igra važnu ulogu kao kofaktor u mnogim biološkim procesima (Lall i Lewis., 2007). Takođe ima veoma važnu ulogu pri liječenju nekih bolesti, kao što su: rak, infekcije, itd. Postoje istraživanja da vitamin C koji se daje oralno može biti efikasan u sprečavanju razvoja određenih vrsta maligniteta (npr. karcinom pluća, kolorektalni adenom, rak endometrijskog tkiva). Oralni unos vitamina C u visokim dozama mogao bi biti efikasan u prevenciji raka. Nema čvrstih dokaza da vitamin C ima pozitivan uticaj protiv



kardiovaskularnih bolesti. Vitamin C je važan za diferencijaciju i funkciju imunih ćelija i ćelija epitelne barijere. Za vitamin C se takođe pokazalo da smanjuje pH urina te da je zato koristan u prevenciji urinarnih infekcija.

Kada se unese u tijelo, vitamin C se metabolički razgrađuje i može stvoriti oksalnu kiselinu kao nusproizvod. Oksalna kiselina zapravo snižava pH vrijednost urina, čineći ga kiselijim. Važno je napomenuti da uticaj askorbinske kiseline na pH vrijednost urina može biti privremen i zavisi od količine unesene askorbinske kiseline te od individualne reakcije organizma (Traxer i sar., 2003).

Vitamin C ima široku primjenu u farmaceutskoj industriji. Koristi se u formulaciji nekih lijekova, na primjer kao antioksidans u oftamološkim kapima, a takođe može da se koristi kao dodatak nekim lijekovima koji se koriste protiv astme i alergija. U ovim farmaceutskim preparatima, vitamin C može da se nalazi u čvrstom i tečnom agregatnom stanju. U farmaceutskim proizvodima može da se dodaje kao sastojak za regulisanje pH vrijednosti ili kao antioksidans kako bi se očuvala stabilnost aktivnih supstanci u lijeku. Naučno je dokazano da se vitamin C aktivno bori protiv tamnih fleka i hiperpigmentacija na koži, te se tako veoma često dodaje i u neke kozmetičke preparate, u vidu krema, seruma i losiona. On takođe može da pospješi i sintezu kolagena u koži (Klepo i sar., 2021).

Nedostatak vitamina C poznat je kao skorbut. Skorbut je potencijalno fatalan, a iznenadna smrt nastaje kao posledica cerebralnog/miokardnog krvarenja ili upale pluća. Biohemijski, smatra se da se pri koncentracijama vitamina C u plazmi ispod 11 mM javljaju klinički simptomi skorbuta. Međutim, simptomi se ne vide osim ako ukupan sadržaj vitamina C u tijelu ne padne ispod 300–400 mg (Hodges i sar., 1971; WHO, 1999; Padayatty i Levine, 2016; Carr i Maggini, 2017; Granger i Eck, 2018).

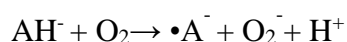
### **2.3. STABILNOST VITAMINA C**

Vodeni rastvori vitamina C su nestabilni jer kiseonik i drugi oksidansi, visok pH, visoka temperatura i joni metala izazivaju njegovu razgradnju. Dugotrajno kuvanje, a posebno ključanje sa velikom količinom vode, dovodi do prelaska vitamina C u vodu i samim tim značajno smanjuje sadržaj vitamina C u hrani. Čak i blanširanje dovodi do relativno velikih gubitaka vitamina C. Iznenadujuće, prženje može zadržati dovoljnu količinu vitamina. Međutim, čini se da se kuvanjem na pari ili u maloj količini vode može postići bolje očuvanje vitamina C. Gubici nastaju čak i ako su svi spoljni faktori eliminisani na minimum jer se oksidacione reakcije odvijaju unutar materijala zbog prisustva oksidaze askorbinske kiseline.

Dakle, idealna metoda obrade je brza termička inaktivacija enzima sa minimalnom količinom vode praćena brzim hlađenjem. Temperatura takođe ima veliki uticaj na stabilnost skladištenja. Sa povećanjem temperature dolazi do značajnijih gubitaka ovog vitamina. Međutim, tokom dugotrajnog skladištenja, količina vitamina C se značajno smanjuje čak i ako se održavaju uslovi pod kojima se javljaju samo mali gubici tokom kratkotrajnog skladištenja. Ukratko, najbolji način da voće i povrće sačuva duže vrijeme što veći sadržaj vitamina C je duboko zamrzavanje (WHO, 1999; Levine i sar., 1999; Davey i sar., 2000; Leškova i sar., 2006; Wang i sar., 2018; Phillips i sar., 2010; Putschala i sar., 2013).

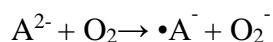
### 2.3.1. Uticaj pH vrijednosti i koncentracije na stabilnost vitamina C u rastvorima

Askorbinska kiselina je nestabilna u vodenim rastvorima, a njena degradacija se smatra glavnim uzrokom promjene kvaliteta i boje tokom skladištenja i obrade hrane. Analiza stabilnosti askorbinske kiseline je od najveće važnosti tokom njene primjene. Pored uticaja spoljašnjih faktora, na stabilnost askorbinske kiseline u rastvoru utiče i njena koncentracija. Da bi se obezbjedio dovoljan sadržaj askorbinske kiseline u proizvodu, obično se u prehrambenoj industriji doda povećan sadržaj askorbinske kiseline (Oey i sar., 2006). Međutim, neke studije su pokazale da je prekomjerna količina askorbinske kiseline (AH<sub>2</sub>) sklona autooksidaciji pri čemu nastaju anjoni dehidroaskorbinske kiseline, prema sledećoj reakciji:



Međutim, autooksidacija askorbinske kiseline zavisi od pH vrijednosti. Bez katalizujućeg uticaja prelaznih metala, spontana oksidacija ove kiseline u neutralnim uslovima je prilično spora. Pri pH 7, 99,9 % askorbinske kiseline je u obliku askorbata (AH<sup>-</sup>), kao i male količine askorbinske kiseline (AH<sub>2</sub>, ~0,1 %) i askorbat dianjona (A<sup>2-</sup>, 0,005 %) (pK<sub>a1</sub> = 4,2 i pK<sub>a2</sub> = 11,6) (Buettner i sar., 1988).

Koncentracija A<sup>2-</sup> se povećava 10 puta za svaku jedinicu povećanja pH vrijednosti. Autooksidacija se dešava preko A<sup>2-</sup>, čime se povećava brzina oksidacije askorbinske kiseline i njena hidroliza do 2,3-diketogulonske kiseline u alkalnom rastvoru (Yang i Buettner, 2010).



Treba napomenuti da se pH vrijednost rastvora askorbinske kiseline mijenja sa procesom njene degradacije. Na primjer, ukoliko je pH početnog rastvora askorbinske kiseline alkalna na kraju procesa razgradnje ove kiseline vrijednost pH bi bila oko 7,3, usled procesa razgradnje ove kiseline (Li i sar., 2016).

U kiselim rastvorima, proizvodi nastali razgradnjom askorbinske kiseline su nastali usled reakcije sa kiseonikom. U aerobnim uslovima, dehidroaskorbinska kiselina se dalje razgrađuje u 2-furonsku kiselinu i 3-hidroksi-piron. Glavni proizvod razgradnje u anaerobnoj sredini je furfural, a međuproizvod ne uključuje dehidroaskorbinsku kiselinu (Yuan i Chen, 1998).

Međutim, u alkalnim rastvorima, glavni proizvodi askorbinske kiseline su 2-metilfuran, 2,4-dimetilfuran, 2-acetil-5-metilfuran i 2-metil-2-ciklopentanon (Li i sar., 2016).

### **2.3.2. Uticaj temperature na stabilnost vitamina C**

Askorbinska kiselina se ozbiljno razgrađuje toplotom, a nestabilnost askorbinske kiseline u termički obrađenoj hrani otežava njenu primjenu. Razgradnja askorbinske kiseline uključuje složene reakcije oksidacije i intermolekularnog preuređivanja i smatra se jednim od glavnih razloga za promjene kvaliteta i boje tokom obrade i skladištenja hrane (Du i sar., 2012).

Analizom uticaja temperature i pritiska na promjenu koncentracije askorbinske kiseline u industrijskim sokovima, otkriveno je da je dominantan faktor koji određuje stabilnost askorbinske kiseline temperatura, koja direktno utiče na brzinu njene razgradnje (Dhakal i sar., 2018).

Proizvodi koji sadrže askorbinsku kiselinu, kao što je voćni sok, moraju da se podvrgnu visokotemperaturnoj pasterizaciji kako bi se garantovala sigurnost i stabilnost. Upotreba relativno niske temperature (75 °C) za termičku obradu i temperature skladištenja ispod 25 °C je optimalna za održavanje sadržaja askorbinske kiseline u proizvodu (Akyildiz i sar., 2021).

Furfural je jedan od glavnih proizvoda razgradnje askorbinske kiseline, koji može da polimerizuje ili da se kombinuje sa aminokiselinama da bi formirao smeđe melanoide, izazivajući tamnjenje proizvoda sokova koji sadrže askorbinsku kiselinu (Yuan i Chen, 1998).

Štaviše, termički oksidovana askorbinska kiselina je identifikovana kao potencijalni prekursor furana, a koji predstavlja moguću kancerogenu supstancu koja se obično proizvodi u nekim zagrijanim prehrambenim proizvodima (Seok i sar., 2015).

Na temperaturama iznad 100 °C, prisustvo kiseonika ima veći uticaj na razgradnju askorbinske kiseline nego temperatura. Stoga je uklanjanje celokupnog kiseonika, uključujući rastvoreni

kiseonik, najbolji način da se askorbinska kiselina sačuva na visokim temperaturama (Al Fata i sar., 2018).

### **2.3.3. Uticaj UV svjetlosti na stabilnost vitamina C**

Askorbinska kiselina apsorbuje ultraljubičasto zračenje u opsegu talasnih dužina od 229–330 nm i podliježe degradaciji (Koutchma, 2009).

Formiranje slobodnih radikala izazvanih UV zračenjem može ubrzati gubitak askorbinske kiseline. Askorbinska kiselina nastavlja da se razgrađuje i nakon UV tretmana. Veće početne vrijednosti UV doze zračenja i temperatura skladištenja ubrzavaju razgradnju askorbinske kiseline u kasnijoj fazi (Tikekar i sar., 2015).

Pored toga, pH rastvora takođe utiče na foto-razgradnju askorbinske kiseline. U alkalnim uslovima,  $AH^-$  proizveden jonizacijom  $AH_2$  je skloniji foto-degradaciji od  $AH_2$ . Treba napomenuti da sastojci u proizvodima mogu da apsorbuju ili rasipaju UV zračenje, čime utiču na razgradnju askorbinske kiseline. Niacinamid, kao komponenta vitaminskog B-kompleksa sa vitaminom C, djeluje kao akcelerator fotodegradacije čime se smanjuje stabilnost askorbinske kiseline prilikom izlaganja UV zračenju (Ahmad i sar., 2018).

## **2.4. IZVOR VITAMINA C**

Za razliku od mnogih drugih vitamina, sadržaj vitamina C u raznim namirnicama je generalno relativno visok (10–100 mg/100 g), a u nekim slučajevima dostiže jedinice grama na 100 g svježe mase. Ovo je vjerovatno povezano sa činjenicom da se vitamin C formira iz šećera, koji su uobičajena jedinjenja u različitim organizmima. Najveći dio dnevnog unosa vitamina C dolazi iz voća i povrća, koji su u mnogim zemljama dostupni tokom cijele godine. Veliki dio se unosi i konzumiranjem krompira i bezalkoholnih pića, uključujući i sokove. U tabeli 1 su nabrojane namirnice bogate vitaminom C koje potiču iz različitih djelova svijeta (Rodrigues i sar., 2001; Mezadri i sar., 2008; Williams i sar., 2016).

Većina ljudi unosi potrebnu dnevnu količinu vitamina C redovnom konzumacijom voća i voćnih sokova. Sadržaj ovog vitamina u voću i povrću varira u zavisnosti od vrste i regiona. Generalno, guava, crna ribizla, kivi i jagode su dobri izvori ovog vitamina. U poređenju sa najbogatijim izvorima vitamina, citrusi sadrže znatno manju, ali dovoljnu količinu vitamina C (Ariharan i sar., 2012; Gull i sar., 2012; Vagiri i sar., 2013, Ellong i sar., 2015; Elbsheer A i sar., 2018).

S obzirom na povrće, povrće kupusnjača, posebno brokoli, kelj i paprika, takođe su bogat izvor ovog vitamina (Martinez i sar., 2005; Dominguez i sar., 2014). Sadržaj vitamina C u fermentisanom kupusu (kiseli kupus) je čak i viši nego u većini svežeg povrća (Penas i sar., 2010; Pekala i sar., 2011). Nasuprot tome, krompir ima relativno nizak sadržaj vitamina C, ali igra važnu ulogu u njegovom unosu jer se konzumira u velikim količinama (Kulen i sar., 2013). Svježe aromatično bilje (korijander, peršun, vlasac), koje je često sastojak salata od povrća, takođe značajno doprinosi njihovom ukupnom sadržaju vitamina C (Santos i sar., 2014).

Alge koje pripadaju različitim taksonomskim grupama takođe nisu zanemarljivi izvori. Kao što se može vidjeti iz tabele 1, sadržaj vitamina C u pojedinačnim biljnim vrstama je veoma promjenljiv zbog mnogih faktora, uključujući mjesto uzgoja, vrijeme berbe (faza zrenja), vremenske uslove, geografsku širinu, genotip, agrotehnologiju, analitičku metodu koja se koristi za određivanje i pripremu uzorka (Kalso i sar., 2002; Righu i sar., 2007; Zheng i sar., 2009; Cardoso i sar., 2011; Vagiri i sar., 2013).

Najbogatiji izvori vitamina C, kao što su kakadu šljiva, camu-camu, acerola, šipak i plodovi morske krkavine, uglavnom se koriste za proizvodnju dodataka ishrani (tabela 1).

Zbog zdravstvene uloge askorbinske kiseline, ona je takođe bitna komponenta za obogaćivanje drugih prehrambenih proizvoda, kao što su, recimo, mliječni proizvodi koji su popularna pića širom svijeta. Na primjer, mlijeko i sojino mlijeko su obogaćeni askorbinskom kiselinom, uključujući izomere askorbata i askorbinske kiseline, da bi se poboljšala apsorpcija gvožđa u tankom crevu (Ozer i sar., 2007; Lee Chong i sar., 2019).

**Tabela 1.** Sadržaj vitamina C u različitim namirnicama (Dosedo i sar., 2021)

Namirnica	Sadržaj vitamina C	Referenca
<i>Kakada šljiva</i>	1360–22,490(b)	Williams i sar., 2016; Vagiri i sar., 2013
<i>Camu-camu</i>	850–5000(a)	Rodrigues i sar., 2001; Justi i sar., 2000
<i>Acerola</i>	820–4023(a)	Mezadri i sar., 2008; Cardoso i sar., 2011
<i>Zvezdasto voće</i>	1626(c)	Ariharan i sar., 2012
<i>Guava</i>	89–989(c)	Rodrigues i sar., 2001 Gull i sar., 2012 McCook-Russell i sar., 2012
<i>Bilimbi</i>	2698(a)	Ariharan i sar., 2012
<i>Indijski orah</i>	555(a)	Ellong i sar., 2015
<i>Emblic</i>	469(a)	Raghu i sar., 2007
<i>Crna ribizla</i>	148–310(d)	Vagiri i sar., 2013

		Riemersma i sar., 2000
<i>Kivi</i>	60–78(a)	Davey i sar., 2000 Ellong i sar., 2015
<i>Jagoda</i>	65(a)	Ellong i sar., 2015
<i>Narandža</i>	41–58(a)	Ellong i sar., 2015 Davey i sar., 2000 Najwa i sar., 2017
<i>Limun</i>	30d 31(a)	Najwa i sar., 2017 Njoku i sar., 2011
<i>Mandarina</i>	27(a)	Ellong i sar., 2015
<i>Jabuka</i>	11–35(a)	Kevers isar., 2016
<i>Kruška</i>	7–29(a)	Kevers isar., 2016
<i>Brokoli</i>	25–130(a)	Domínguez-Perles i sar., 2014
<i>Kelj</i>	51–120(a)	Domínguez-Perles i sar., 2014
<i>Paprika</i>	107–154(a)	Martínez i sar., 2005
<i>Krompir</i>	8–30(a)	Küleni sar., 2013 Davey i sar., 2000
<i>Paradajz</i>	9–17(a)	Roberts i sar., 2007 Georgé i sar., 2011
<i>Kiseli kupus</i>	103–277(a)	Peñas i sar., 2010
<i>Šipak</i>	40–360 (a)	Roman i sar., 2013 Turkben isar., 2010
<i>Korijander</i>	8–98(a)	Santos i sar., 2014 Singh isar., 2001
<i>Vlašac</i>	93(a)	Santos i sar., 2014
<i>Peršun</i>	59(a)	Santos i sar., 2014
mg/100 g (a) – svježe mase, (b)- suve mase, (c) soka, (d) - mg/100 cm <sup>3</sup> soka.		

## 2.5. ODREĐIVANJE VITAMINA C

Vitamin C se najčešće određuje u voću, povrću i farmaceutskim proizvodima. Metode koje se koriste za određivanje vitamina C u navedenim proizvodima su najčešće metode spektrofotometrije, titracije, HPLC i elektrohemijske metode. Spektrofotometrija se koristi za mjerenje apsorpcije svjetlosti vitamina C pri određenoj talasnoj dužini, dok se titracija koristi za određivanje koncentracije vitamina C u uzorku pomoću reakcije sa oksidacionim sredstvima. HPLC metoda predstavlja metodu tečne hromatografije za razdvajanje i kvantifikaciju vitamina C u uzorcima, dok se elektrohemijske metode temelje na mjerenju električne struje generirane reakcijom vitamina C na elektrodi. Ova metoda omogućava precizno određivanje vitamina C u industrijskim proizvodima kako bi se osigurao kvalitet i

sigurnost proizvoda. Vitamin C se može određivati u najrazličitijim uzorcima, uključujući voće, povrće, sokove, dodatke prehrani, prehrambene proizvode, kozmetiku, kao i u farmaceutskim i biološkim (krv, urin) uzorcima. U voću i povrću se vitamin C često određuje za utvrđivanje nutritivne vrijednosti proizvoda. U dodacima farmaceutskim i prehranbenim proizvodima, kao i kozmetičkim preparatima vitamin C se određuje kako bi se osiguralo da su proizvodi u skladu sa propisanim standardima. Takođe se može odrediti u biološkim uzorcima kako bi se pratio nivo vitamina C u tijelu.

Voćni sokovi su jedna od grupa navedenih proizvoda koja se dosta ispituje, radi utvrđivanja kvaliteta proizvoda i da li su oni u skladu sa propisanim standardima. Neki od tih sokova jesu sokovi od narandže, ananasa, marakuje, jagode itd. (Zaninil i sar., 2018). Pored voćnih sokova, ispitivanja se mogu vršiti i na svježem i osušenom voću i povrću kako bi se utvrdila količina prisutnog vitamina C. Ova ispitivanja se najčešće vrše spektrofotometrijskim metodama (Zaninil i sar., 2018). Pored ispitivanja čistog vitamina C mogu se vršiti ispitivanja i natrijum-askorbata, kalcijum-askorbata itd. U ovakvim radovima se često diskutuje o stabilnosti vitamina C u različitim rastvorima (Hiatt i sar., 2011). Ispitivanja se u velikoj mjeri vrši i na farmaceutskim proizvodima, gdje se pomoću spektrofotometrijske metode može utvrditi da li se količina vitamina C koja je naznačena na etiketi nalazi i u samom proizvodu. Često, zbog nestabilnosti askorbinske kiseline, naznačena količina vitamina C na ambalaži se ne poklapa sa eksperimentalno dobijenim rezultatima, te se tako ispitivanja moraju vršiti različitim metodama (Selimović i Salkić, 2011).

Uticaj faktora kao što su svjetlost, temperatura, pH, prisustvo kiseonika i metalnih jona, moraju se uzeti u obzir prilikom određivanja vitamina C. Koncentracija L-askorbinske kiseline može da se smanji tokom izlaganja UV svjetlu (smanjenje na 80%), prirodnom svjetlu u providnoj posudi (smanjenje na 84%) i u zatamnjenoj boci (smanjenje na 96%) (Dosedel i sar., 2021).

Prema tome, treba preduzeti niz preventivnih koraka kako bi se izbjegla degradacija analita prilikom obrade materijala za određivanje L-askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline. Generalno, treba obezbjediti brz transport uzorka u laboratoriju u tamnom kontejneru na niskoj temperaturi. Neki stabilizatori, kao što su meta-fosforna kiselina, trihlorsirćetna kiselina, homocistein, trifluorosirćetna kiselina, oksalna kiselina, EDTA, Dl-alanin, natrijum-oksalat, kalijum-cijanid, kao i neki puferi u prisustvu EDTA (za heliranje nepoželjnih metalnih jona), često se dodaju prije skladištenja ili pripreme komercijalnih uzorka. Ponekad se ove supstance takođe mogu kombinovati sa puferima ili organskim rastvaračima kao što su metanol i acetonitril (Nováková, 2008; Szocs, 2020; Lykkesfeldt, 2015).

Dokazano je da su DL-alanin i natrijum-oksalat dobri stabilizatori vitamina C u prisustvu puferskog rastvora kalijum-dihidrogenfosfata i dinatrijum-hidrogenfosfata. Male koncentracije vitamina C u ovakvim rastvorima stabilne su 30 min (Salkić i sar., 2007; Selimović i Salkić, 2011; Shera i sar., 2015).

Kao stabilizator vitamina C može da se koristi i kalijum-cijanid koji stabilizuje vitamin C jedan sat na sobnoj temperaturi. Upravo iz ovih razloga on je pogodan za korišćenje jer može dovoljno dugo da stabilizuje vitamin C i omogući UV analizu. Ovaj stabilizator sprečava formiranje kompleksa jona askorbinske kiseline i metala i stoga efikasno inhibira oksidaciju L-askorbinske kiseline. Kao jako dobar stabilizator vitamina C u farmaceutskim proizvodima pokazao se puffer napravljen od limunske kiseline i dinatrijum-hidrogenfosfata u prisustvu EDTA gdje je stabilnost vitamina C bila 5h (Salkić i Selimović, 2007).

Kao stabilizatori su ispitivani cistein i natrijum-metabisulfit. Sa povećanjem koncentracije natrijum-metabisulfita znatno se povećava stabilnost vitamina C u flaširanim sokovima u trajanju čak od 5 nedjelja (Maeda i sar., 1986).

Koji će stabilizator da se koristi u velikoj mjeri zavisi i od načina skladištenja proizvoda, tj. da li se proizvod čuva na tamnijim ili svjetlijim mjestima. U kozmetičkim preparatima kao stabilizatori mogu da se koriste i DL- metionin, sorbitol, dekstroza, natrijum-tiosulfat i mnogi drugi u zavisnosti od toga šta je glavni sastojak polaznog proizvoda. Naučno je dokazano da palmitinska kiselina, prisutna kao emulgator, ima veći uticaj na stabilnost askorbinske kiseline u proizvodima gdje je glavni sastojak miristinska i stearinska kiselina (Shera i sar., 2015).

Pored navedenih stabilizatora koji se koriste prilikom određivanja vitamina C, kao oksidant se može koristiti i  $\text{KMnO}_4$ . U ovim uslovima često se određivanje vitamina C vrši u voćnim sokovima. Određivanje vitamina C u farmaceutskim proizvodima, komercijalno dostupnim, može da se vrši i pomoću bromokrezol ljubičaste kao nove jednostavne i brze metode za kvantifikaciju askorbinske kiseline (Klepo i sar., 2021)

Pregledom rada (Selimović i Salkić, 2011) zaključuje se da šećeri poput glukoze, fruktoze, saharoze ne ometaju spektrofotometrijsko određivanje vitamina C. Zaključeno je da ovi šećeri u masenom odnosu od čak 200 puta u odnosu na masu vitamina C u posmatranom uzorku ne ometaju njegovo određivanje. Takođe, negativna greška izazvana nitritom može se pripisati oksidaciji L-askorbinske kiseline ovim oksidantom u kiseloj sredini. Pošto svojstva apsorpcije L-askorbinske kiseline zavise od pH vodenog rastvora, pozitivna greška izazvana hidrogenkarbonatom može se pripisati povećanju pH rastvora L-askorbinske kiseline. Negativne greške izazvane limunskom i vinskom kiselinom mogu se pripisati smanjenju pH



vrijednosti rastvora askorbinske kiseline nakon dodavanja organskih kiselina (Selimović i Salkić, 2011).

U naučnom radu Zaninila i saradnika (2018) smatra se da greške prilikom spektrofotometrijskog određivanja vitamina C potiču od velike nestabilnosti vitamina C, a i od prisutnosti redukujućih šećera u posmatranim uzorcima, poput glukoze. Ovo se objašnjava time da tokom analize redukujući šećer može da reaguje sa  $\text{KMnO}_4$  kao oksidacionim sredstvom, i na taj nači ometa određivanje vitamina C u uzorcima. Redukcija je bila nešto veća u sistemima koji sadrže glukoze od onih koji sadrže samo vitamin C. Ovo upravo predstavlja dokaz da redukcionni šećer prisutan u soku ometa kvantifikacijsku analizu vitamina C u uzorcima, što zahtjeva korekciju rezultata. Koncentracija vitamina C se povećala za oko 10 % u sistemu koji sadrži glukoze (Zaninil i sar., 2018).

Vitamin C se može odrediti u biološkim uzorcima kako bi se pratio nivo ovog vitamina u tijelu. Međutim, zbog kompleksnosti samog matriksa bioloških uzoraka, određivanje vitamina C u ovim uzorcima se izbjegava. Stabilnost L-askorbinske kiseline prilikom njenog određivanja u različitim uzorcima je glavni problem. Pošto je vitamin C poznati antioksidans, njegova oksidacija u ljudskom tijelu u dehidroaskorbinsku kiselinu je predložena kao in vitro marker oksidativnog stresa. Međutim, oksidacija se dešava prilično brzo, a samim tim i vještački nakon sakupljanja uzorka. Iako je dehidroaskorbinska kiselina daleko stabilnija od L-askorbinske kiseline, ona i dalje može biti podvrgnuta nepovratnoj hidrolizi u 2,3-diketogulonsku kiselinu. Koncentracija dehidroaskorbinske kiseline kod zdravih odraslih osoba je ispod 2% od L-askorbinske kiseline (Kallio i sar., 2002; Karlsen i sar., 2005). Najnovije metode za ova određivanja uključuju kapilarnu elektroforezu, tečnu hromatografiju i elektrohemijske biosenzore pored komercijalno dostupnih kompleta koji se mogu koristiti u rutinskim primjenama (Wang, 2014).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. INSTRUMENTI I HEMIKALIJE

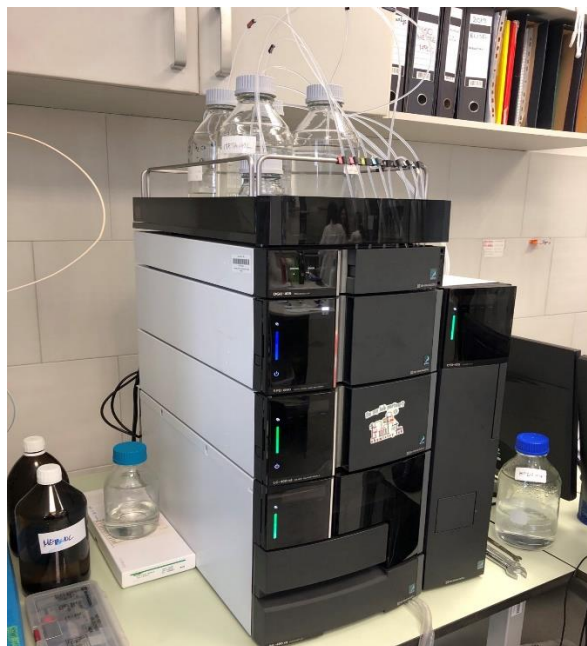
##### 3.1.1. Instrumenti

Eksperimentalni dio ovog master rada je rađen na Metalurško-tehnološkom fakultetu u Podgorici, u laboratoriji za Analitičku hemiju i Instrumentalne metode i u Institutu za javno zdravlje, Podgorica.

U svrhe ovog ispitivanja korišćeni su BUCK Scientific 105 UV-VIS spektrofotometar (slika 5) sa kvarcnim kivetama 1 cm i Shimadzu UHPLC LC-40DXS (slika 6).



**Slika 5.** *BUCK Scientific 105 UV-VIS spektrofotometar*



**Slika 6.** *Shimadzu UHPLC LC-40DXS*

### 3.1.2. Hemikalije i realni uzorci

Askorbinska kiselina -  $C_6H_8O_6$

Hlorovodonična kiselina - HCl

Etilendiamintetraacetat EDTA -  $C_{10}H_{16}N_2O_8$

Citratna kiselina -  $C_6H_8O_7$

Dinatrijum-hidrogenfosfata  $Na_2HPO_4$

0,01 M rastvor joda

Glukoza -  $C_6H_{12}O_6$

DL- alanin -  $C_3H_7NO_2$

Vinska kiselina -  $C_4H_6O_6$

Barijum-karbonat -  $BaCO_3$

Magnezijum-hlorid -  $MgCl_2$

Kalcijum-hlorid -  $CaCl_2$

Cink-hlorid -  $ZnCl_2$

Natrijum-hidroksid - NaOH

Dikalijum -fosfat -  $K_2HPO_4$

Sve upotrebljene hemikalije su bile p.a. čistoće.

Uzorci suplemenata vitamina C koji su korišćeni u ovom radu kupljeni su u lokalnim apotekama u Podgorici. Ispitivani su uzorci suplemenata različitih proizvođača „Pharmanova“, „Abela pharm“, „Bios line“, „Inpharm“, „Max medica“, „Hemofarm“, „GSK“. Svi ovi uzorci su imali naznačene koncentracije vitamina C na deklaraciji i one su se kretale u opsegu od 30 mg do 1000 mg. Neki uzorci su bili u obliku šumećih tableta ili praškova, a neki u obliku tablete. Pored askorbinske kiseline, u ovim uzorcima su se nalazili magnezijum, kalijum, cink, natrijum kao i neki aditivi poput aroma i zaslađivača. U tabeli 2 su dati podaci vezani za ispitivane suplemente (slika 7).

**Tabela 2.** Podaci o uzorcima korišćenim u analizi

Broj uzorka	Proizvođač	Sadržaj vitamina C (mg)	Ostale komponente	Datum važenja suplementa
1	Hemofarm	500	-	03.2025.
2	Pharmanova	300	10 mg cink-citrata, sorbitol (zaslađivač), natrijum-askorbat, ksilitol (zaslađivač), trimagnezijum-citrat, kalcijum-karbonat, silicijum-dioksid, magnezijum-stearat (sredstvo protiv zgrudnjavanja), natrijum-citrat (regulator kiselosti), natrijum-karboksimetilcelulozu (za povećanje zapremine), aspartam i acesulfam K (zaslađivači), arome limuna i narandže.	05.2027.
3	GSK	1000	1000 mg kalcijum-laktat-glukonata, 327 mg kalcijum-karbonata.	08.2024.
4	AbelaPharm	1000	sorbitol, acesulfam K (zaslađivač) i aromu pomorandže.	07.2025.
5	Max Medica	500	mikrokristalnu celulozu, skrob, magnezijum-stearat, talk, boju i riboflavin.	01.2025.
6	Protect	500	-	04.2026.
7	Bios line	30	fruktozu, magnezijum-citrat (45 mg), natrijum-hlorid (170 mg), sredstvo zakiseljavanja: limunska kiselina, natrijum-citrat (105 mg), kalijum-citrat (130 mg), aroma: crvena narandža, korijen Rhodiola rosea, standardizovan na 3 % salidrozida, sredstvo protiv zgrudnjavanja: silicijum-dioksid, beta karoten, zaslađivač: sukraloza.	03.2024.



**Slika 7.** Uzorci korišćeni u analizi

## 3.2. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE VITAMINA C

Princip ove metode se zasniva na mjerenju intenziteta svjetlosti poslije prolaska kroz rastvor koji apsorbira svjetlost. Spektrofotometrija predstavlja apsorpcionu metodu koja se zasniva na praćenju zavisnosti apsorpcije od talasne dužine zračenja koje je prošlo kroz analiziranu supstancu. Spektrofotometrija predstavlja metodu koja se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu (Tomljanović, 2000).

Pored fluorimetrijskih i elektrohemijskih metoda, kao i tečne hromatografije i titracije, spektrofotometrija je metoda koja se sve više koristi za praćenje stabilnosti askorbinske kiseline, kako u voću i povrću, tako i u farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima (Selimović i Salki, 2011).

### 3.2.1. Praćenje stabilnosti vitamina C uz prisustvo različitih stabilizatora

Ispitivanje stabilnosti askorbinske kiseline vršeno je u rastvorima askorbinske kiseline uz prisustvo različitih stabilizatora: 1 M hlorovodonična kiselina (HCl), 1 M HCl i etilendiamintetraacetat (EDTA), 0,1 M citratno-fosfatni pufer i 0,1 M citratno-fosfatni pufer i EDTA.

Vodeni rastvor 1 M hlorovodonične kiseline (HCl) pravljen je od koncentrovane 35 % HCl.

Vodeni rastvor 1 M HCl sa EDTA je pravljen rastvaranjem 0,10 g EDTA u prethodno napravljenom 1 M HCl. pH vrijednost ovako dobijene kiseline iznosila je 1,8.

Vodeni rastvor citratno–fosfatnog pufera dobijen je mješanjem rastvora citratne kiseline koncentracije 0,0073 M i vodenog rastvora dinatrijum-hidrogenfosfata koncentracije 0,0073 M. Rastvori citratne kiseline i dinatrijum-hidrogenfosfata pomenutih koncentracija dobijeni su rastvaranjem 1,40 g citratne kiseline i 1,30 g dinatrijum-hidrogenfosfata u 1000 cm<sup>3</sup> destilovane vode. pH vrijednost ovako dobijenog pufera je iznosila 3.

Citratno–fosfatni pufer sa EDTA je dobijen rastvaranjem 0,10 g EDTA u prethodno pripremljenom rastvoru citratno-fosfatnog pufera. pH vrijednost ovako dobijenog rastvora iznosila je 3,2.

Rastvori askorbinske kiseline koncentracija  $1 \cdot 10^{-4}$  M i  $5 \cdot 10^{-5}$  M su pravljeni odmjeravanjem određene mase čvrste supstance i rastvarani u pomenutim stabilizatorima u normalnim sudovima zapremine 50 cm<sup>3</sup>.

Apsorpcioni spektri ovih rastvora su snimani u opsegu talasnih dužina od 200–350 nm. Dobijeno je da je maksimalna apsorpcija askorbinske kiseline koncentracija  $1 \cdot 10^{-4}$  M i  $5 \cdot 10^{-5}$  M u svim ispitivanim stabilizatorima na talasnoj dužini od 250 nm ( $\lambda=250$  nm). U cilju

praćenja stabilnosti vitamina C mjerena je apsorbancija ovih rastvora na talasnoj dužini maksimuma apsorbanice ( $\lambda=250$  nm) svakih 10 min u vremenskom periodu od najmanje 3 h.

### **3.2.2. Snimanje kalibracionih pravih za određivanje vitamina C**

Osnovni rastvor askorbinske kiseline koncentracije  $1 \cdot 10^{-3}$  M je pravljen odmjeravanjem određene mase čvrste supstance i rastvaranjem u 1 M HCl, 1 M HCl i EDTA, 0,1 M citratno - fosfatnom puferu i 0,1 M citratno-fosfatnom puferu i EDTA.

Za formiranje kalibracionih dijagrama u ispitivanim stabilizatorima pravljen je serija standardnih rastvora askorbinske kiseline u opsegu koncentracija  $1 \cdot 10^{-5}$  M do  $9 \cdot 10^{-5}$  M. Ovi rastvori su pravljeni od osnovnog rastvora askorbinske kiseline u šest normalnih sudova od  $50 \text{ cm}^3$  gdje je redom odmjeravano  $0,5 \text{ cm}^3$ ,  $1 \text{ cm}^3$ ,  $2 \text{ cm}^3$ ,  $3 \text{ cm}^3$ ,  $4 \text{ cm}^3$  i  $4,5 \text{ cm}^3$ , a zatim su ovi sudovi dopunjeni do crte rastvorima odgovarajućih stabilizatora. Snimana je apsorbancija ovih rastvora, sa prethodno baždarenim instrumentom pomoću slijepe probe. Slijepa proba u zavisnosti od rastvora askorbonske kiseline koji se ispitivao je bila 1 M HCl, 1 M HCl i EDTA, 0,1 M citratno-fosfatni pufer i 0,1 M citratno-fosfatni pufer i EDTA. Za formiranje kalibracionog dijagrama snimanje je vršeno na talasnoj dužini od 250 nm. Snimanja su odrađena u 3 probe. Dobijeni kalibracioni dijagrami su služili za određivanje koncentracija askorbinske kiseline u ispitivanim realnim uzorcima. Na osnovu ovih snimanja date su analitičke karakteristike predložene spektrofotometrijske metode. Preciznost metode je provjeravana analizom rastvora askorbinske kiseline koncentracije  $6 \cdot 10^{-5}$  M u različitim stabilizatorima i izračunavanjem relativnog standardnog odstupanja na osnovu pet ponovljenih određivanja ( $n=5$ ).

Za spektrofotometrijsko određivanje vitamina C u realnim uzorcima priprema je vršena rastvaranjem ispitivanih uzoraka u odgovarajućim stabilizatorima. Po potrebi su rastvori profiltrirani i vršeno je mjerenje apsorbanije rastvora na 250 nm i iz odgovarajućih jednačina kalibracionih dijagrama određivana koncentracija vitamina C.

### **3.2.3. Uticaj interferirajućih komponenti na određivanje vitamina C**

Poznato je da se askorbinska kiselina rijetko nalazi samostalno u različitim industrijskim proizvodima, bilo da je riječ o farmaceutskim, kozmetičkim ili prehrambenim proizvodima. Da bi se procjenila selektivnost spektrofotometrijske metode pri određivanju askorbinske kiseline u rastvor se dodaju različite komponente koje mogu potencijalno ometati njeno određivanje. Potencijalno ometajuće komponente jesu obično soli metala cinka, magnezijuma, bakra,

gvožđa. Pored soli ovih metala, u interferirajuće komponente mogu se ubrajati i nitriti, hidrogenkrbonat, benzoat, dok od organskih jedinjenja koja mogu izazvati grešku određivanja jesu vinska i limunska kiselina (Selimović i Salkić, 2011).

U ovom master radu kao ometajuće komponente za određivanje vitamina C su ispitivane: glukoza, DL-alanin, vinska kiselina, citratna kiselina, benzojeva kiselina, skrob i katjoni: Ba(II), Mg(II), Ca(II), dodatih u obliku soli ( $\text{BaCO}_3$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ). Pravljeni su rastvori ovih interferirajućih komponenti rastvaranjem poznatih količina ovih supstanci u rastvorima odgovarajućih stabilizatora. Zatim se alikvotni dio standardnog rastvora askorbinske kiseline u odgovarajućem stabilizatoru mješa sa poznatom količinom standardnog rastvora ometajuće supstance u tom istom stabilizatoru i dopuni se normalni sud do crte sa tim stabilizatorom. U ovako pripremljenom rastvoru je poznat tačan maseni odnos askorbinske kiseline i interferirajuće supstance. Apsorbancija ovako pripremljenog rastvora se mjerila na 250 nm prema rastvoru stabilizatora kao slijepoj probi. Iz već snimljenog kalibracionog dijagrama za određeni stabilizator određivana je koncentracija askorbinske kiseline i izračunata greška određivanja uz prisustvo odgovarajuće interferirajuće komponente.

### **3.3. ODREĐIVANJE VITAMINA C METODOM TITRACIJE**

Najčešće korišćene metode za određivanje vitamina C su metoda titracije, spektrofotometrijska metoda i metoda tečne hromatografije. Metoda titracije pomoću joda se smatra pouzdanom metodom za određivanje vitamina C, ali ipak se mora voditi računa o tome da li u ispitivanom rastvoru postoje neke druge redukujuće supstance koje će prije reagovati sa jodom, i na taj način ometati određivanje askorbinske kiseline.

U ovom radu se koristio standardni rastvor joda koncentracije 0,01 M p.a. čistoće, a kao indikator boje koristio se rastvor skroba. Završna tačka titracije je ona u kojoj ispitivani rastvor iz bezbojne prelazi u plavu boju.

Eksperimentalni dio je rađen tako što su uzorci tableta koje su u čvrstom obliku sprášeni pomoću avana i tučka, a zatim rastvoreni u destilovanoj vodi u normalnom sudu od 100 cm<sup>3</sup>. Na ovaj način su dobijeni rastvori askorbinske kiseline različitih koncentracija, u zavisnosti od količine askorbinske kiseline u posmatranom uzorku. Masa vitamina C se kretala u opsegu od 60 mg do 1000 mg po tableti. Od ovako pripremljenih rastvora pipetiralo se 3 do 10 cm<sup>3</sup> rastvora, i nakon dodatka rastvora skroba vršena titracija standardnim rastvorom joda koncentracije 0,01 M. Na osnovu utroška rastvora joda, s obzirom da jod i vitamin C reaguju u odnosu 1:1 izračunata je masa askorbinske kiseline u ispitivanim uzorcima.

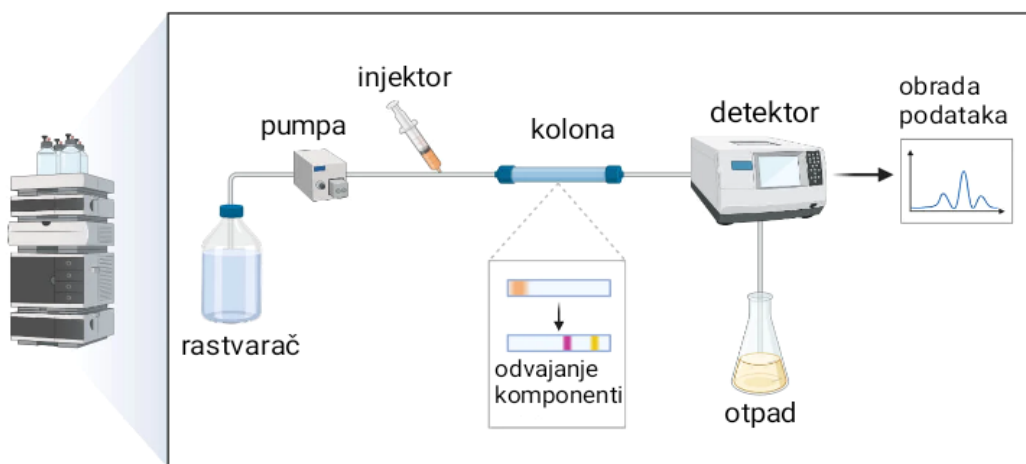
$$V(I_2) \cdot n(I_2) = m_{vit\ c} / M_{vit\ c}$$

### 3.4. ODREĐIVANJE VITAMINA C HPLC METODOM

Tečna hromatografija visoke efikasnosti (HPLC) je metoda koja omogućava razdvajanje, izolovanje, identifikaciju i kvantitativnu analizu komponenata iz uzorka na osnovu fizičko-hemijskih procesa koji se dešavaju na granici dvije faze koje se ne miješaju. Jedna faza je stacionarna i može biti čvrsta ili tečna. Druga faza je mobilna, ona je tečna i pumpama, koje stvaraju visok pritisak, se potiskuje kroz stacionarnu fazu. Fizičko-hemijski proces koji je dominantan u hromatografskom sistemu definiše retencioni mehanizam, odnosno vrijeme zadržavanja komponente u stacionarnoj fazi. Kod tečne hromatografije visoke efikasnosti komponente iz uzorka raspodjeljuju se između stacionarne i mobilne faze na osnovu različite adsorpcije na stacionarnoj fazi (kod tečno-čvrste), odnosno na osnovu različite rastvorljivosti između dvije faze koje se ne miješaju (kod tečno-tečne) hromatografije. Takođe, razdvajanje komponenata se može vršiti i po mehanizmu jonske izmjene i raspodjele po veličini molekula. HPLC hromatografijom se mogu analizirati i termički nestabilne supstance, kao što su biološki aktivna jedinjenja.

Ova tehnika zahtijeva precizno postavljanje optimalnih uslova u pogledu izbora mobilne i stacionarne faze. To podrazumijeva poznavanje analita kako bi se, pri odabranim uslovima, postiglo najbolje razdvajanje, a zatim identifikacija i određivanje sadržaja svih komponenata uzorka (Medenica i Pejić, 2018).

Na slici 8 prikazan je sistem HPLC metode.

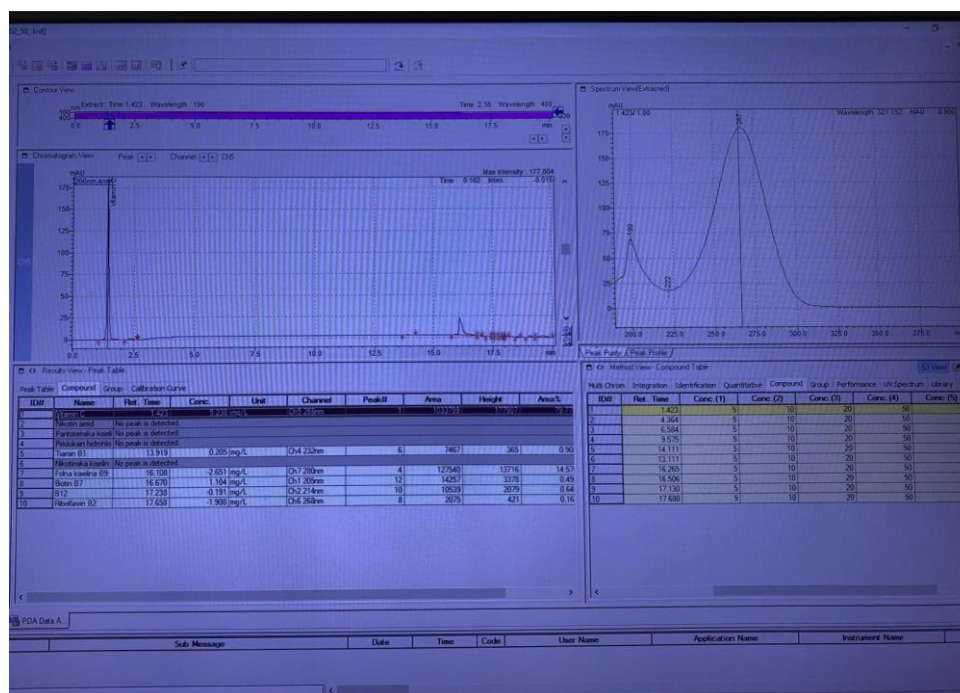


Slika 8. Tečni homatograf visokie efikasnostii i njegovi djelovi

(<https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/#hplc-principle> )



U ovom radu određivanje vitamina C je vršeno pomoću tečne hromatografije visoke efikasnosti koja se smatra standardnom metodom za testiranje kontrole kvaliteta suplemenata i lijekova. Uslovi pod kojima je vršeno ispitivanje su: protok - 0,45 mL/min, mobilne faze - fosfatni pufer čija je pH vrijednost 7 i acetonitril, radna talasna dužina - 266 nm, i injektovana faza je 20  $\mu$ L. Priprema uzoraka: realni uzorci vitamina C su rastvarani u mobilnoj fazi, najčešće 25 mL (u zavisnosti od sadržaja vitamina C po uzorku, zavisi i koje će se razblaženje koristiti). Zatim je dotato 100  $\mu$ L 0,25 M NaOH. Ovako pripremljeni uzorci su tretirani u ultrazvučnom kupatilu 25 min, pri čemu se vodilo računa da se za fotolabilni vitamin C koristi folija i izbjegava zagrijavanje. Nakon toga rastvori su profiltrirani kroz filter papir i microfilter i kao takvi korišćeni za HPLC analizu. Jedan od primjera spektra vitamina C, iz realnog uzorka, određivanog putem tečne hromatografije dat je na slici 9.



Slika 9. Primjer spektra realnog uzorka vitamina C određenog pomoću HPLC metode

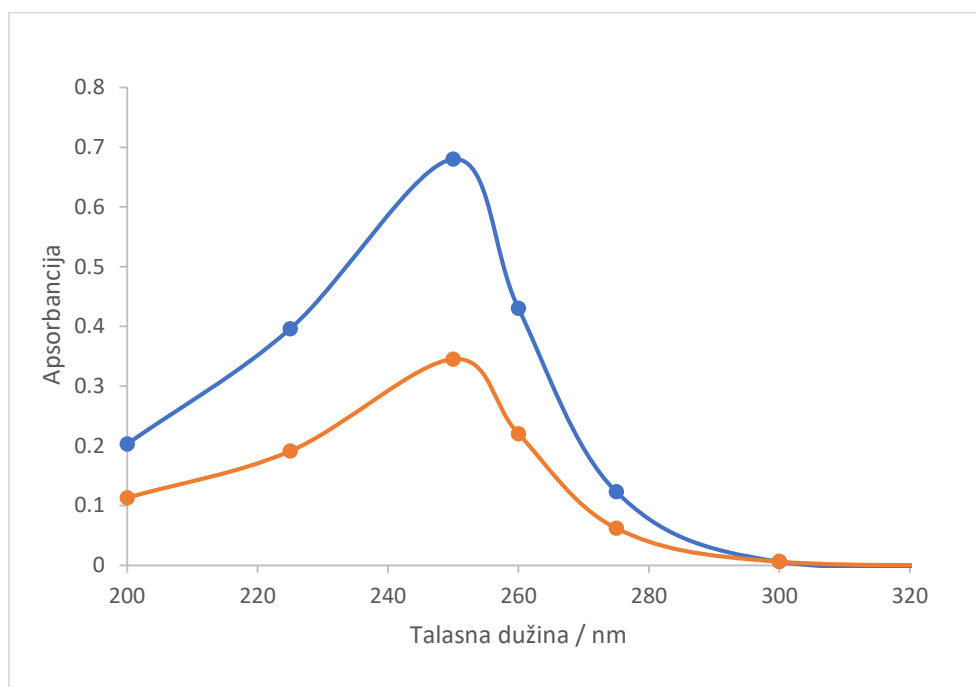
### 3.5. STATISTIČKE METODE

Molarna apsorptivnost, regresiona jednačina i korelacioni koeficijent su dobijeni obradom rezultata u Excel programu. Statistika ponovljenih mjerenja je dobijena korišćenjem programa statistički kalkulator Math 10.com.

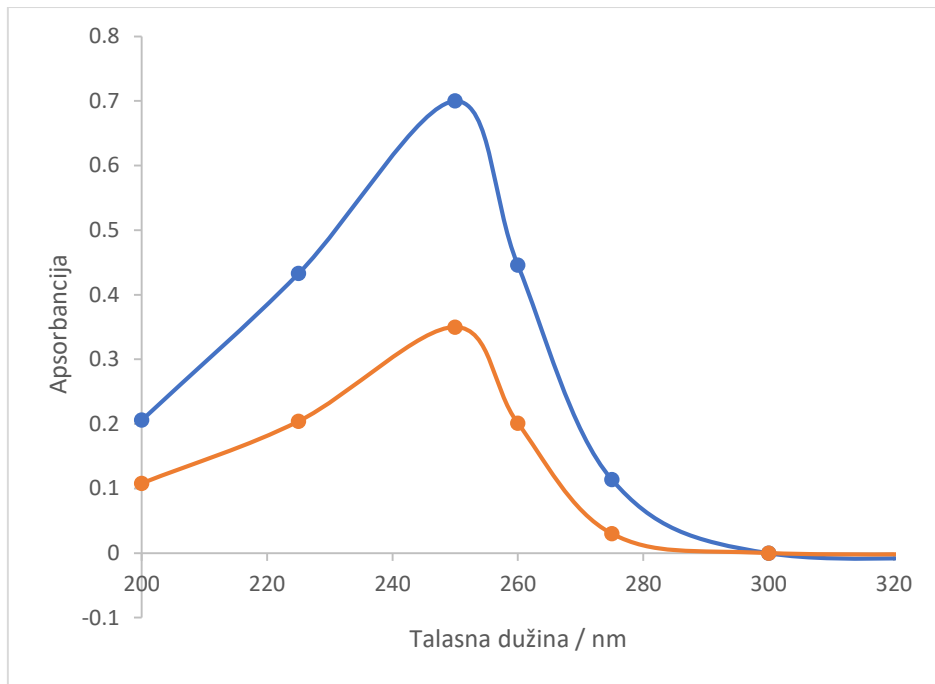
## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. SNIMANJE SPEKTARA ASKORBINSKE KISELINE U PRISUSTVU RAZLIČITIH STABILIZATORA

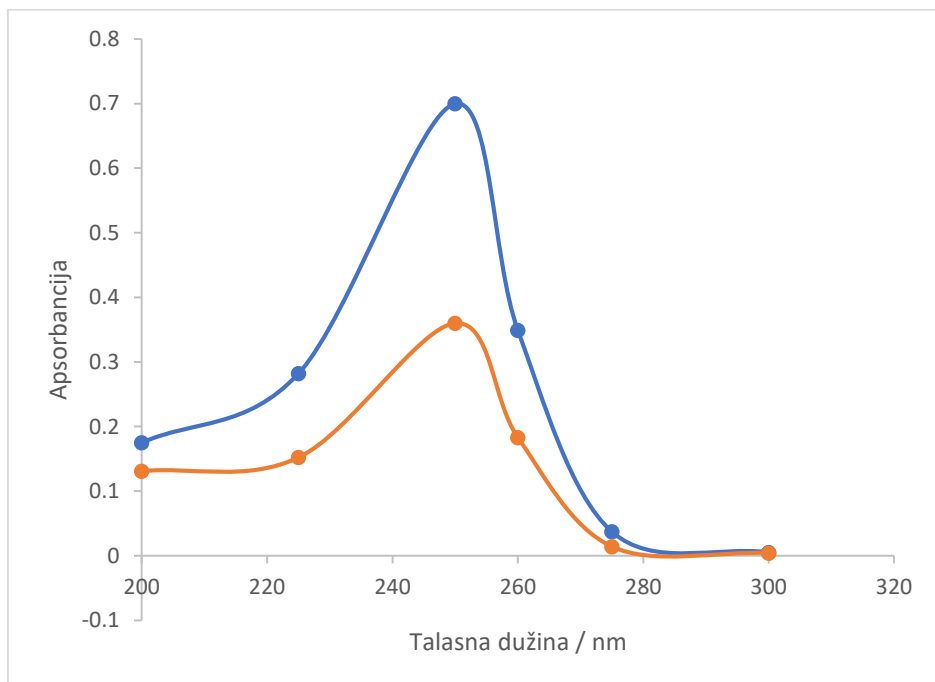
Spektri askorbinske kiseline koncentracija  $1 \cdot 10^{-4}$  M i  $5 \cdot 10^{-5}$  M snimani u stabilizatorima 0,1 M HCl, 0,1 M citratno-fosfatnom puferu, 0,1 M HCl u prisustvu EDTA i 0,1 M citratno-fosfatnom puferu u prisustvu EDTA prikazani su na slikama 10-13.



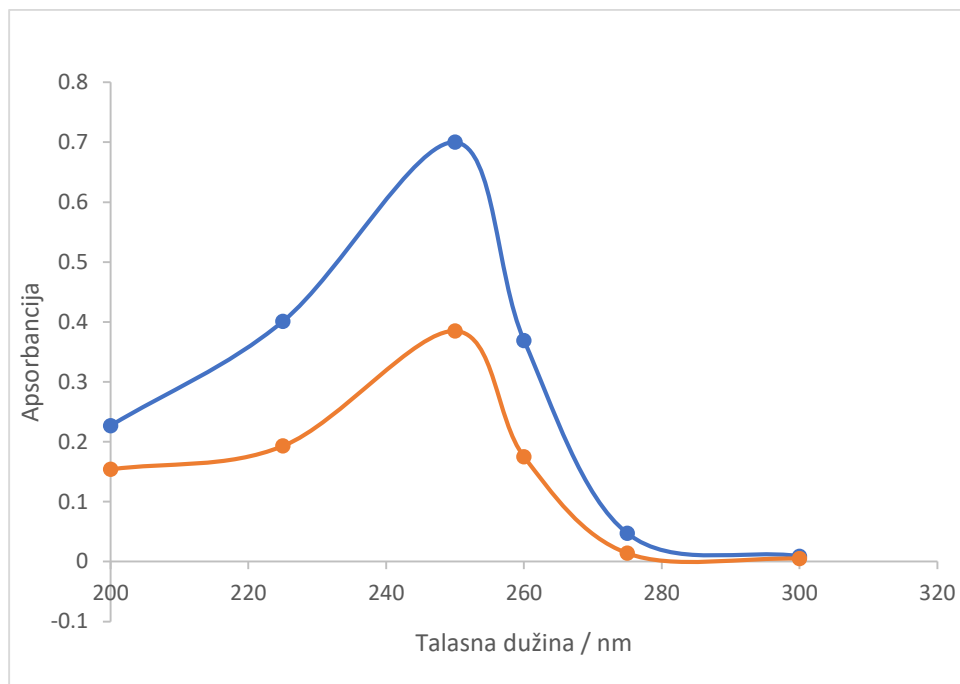
**Slika 10.** Spektar askorbinske kiseline koncentracija  $1 \cdot 10^{-4}$  M (plavo),  $5 \cdot 10^{-5}$  M (crveno) u 0,1 M citratno-fosfatnom puferu kao stabilizatoru



**Slika 11.** Spektar askorbinske kiseline koncentracija  $1 \cdot 10^{-4} M$  (plavo),  $5 \cdot 10^{-5} M$  (crveno) u  $0,1 M$  citratno-fosfatnom puferu i EDTA kao stabilizatoru



**Slika 12.** Spektar askorbinske kiseline koncentracije  $1 \cdot 10^{-4} M$  (plavo),  $5 \cdot 10^{-5} M$  (crveno) u  $1 M$  HCl kao stabilizatoru

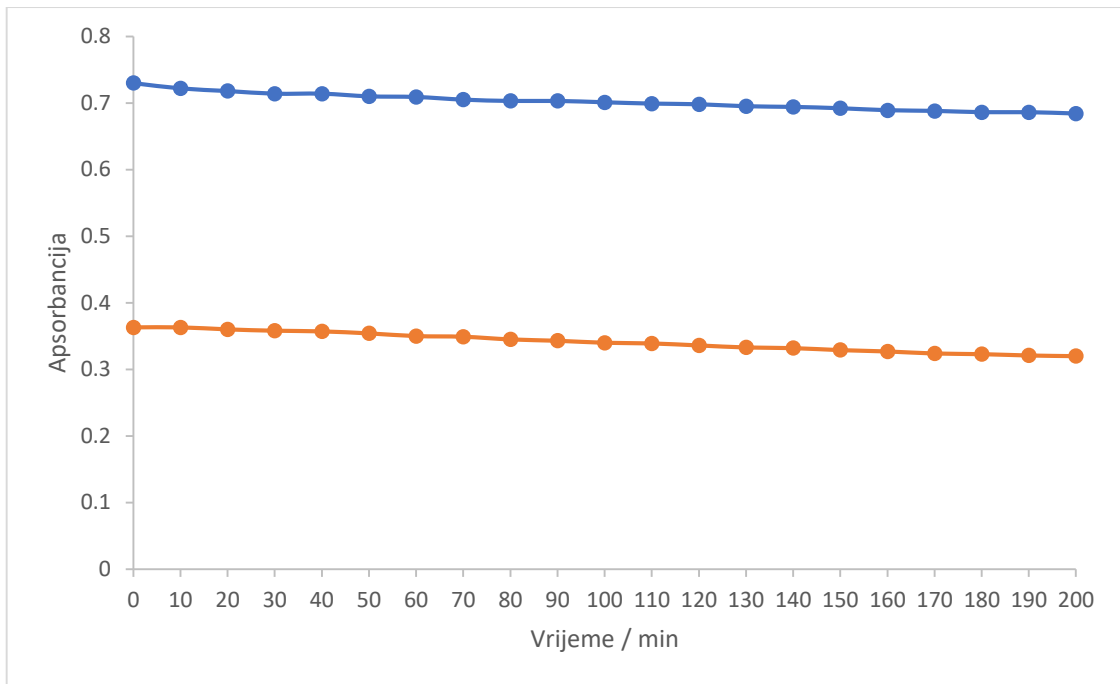


**Slika 13.** Spektar askorbinske kiseline koncentracije  $1 \cdot 10^{-4} M$  (plavo),  $5 \cdot 10^{-5} M$  (crveno) u  $1 M HCl$  i EDTA kao stabilizatoru

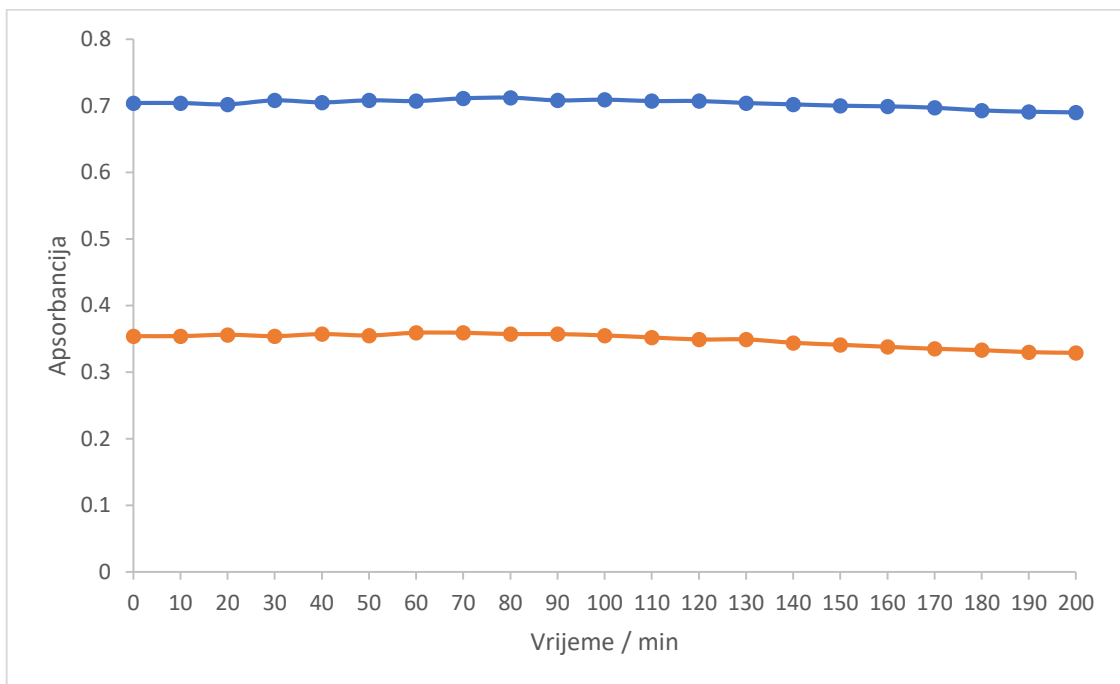
Iz apsorpcionih spektara se vidi da je radna talasna dužina na kojoj askorbinska kiselina maksimalno apsorbuje 250 nm bez obzira na koncentraciju askorbinske kiseline i upotrijebljeni stabilizator. Za dalja ispitivanja korišćena je ova talasna dužina.

#### **4.2. STABILNOST VITAMINA C UZ PRISUSTVO RAZLIČITIH STABILIZATORA**

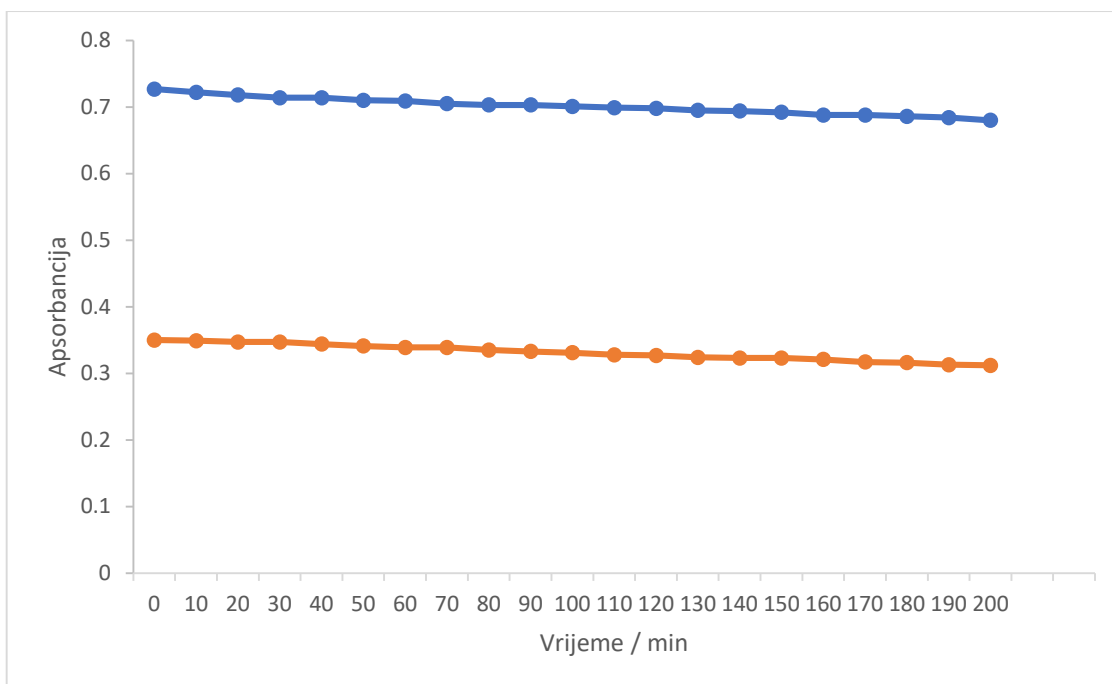
Stabilnost vitamina C se pratila u stabilizatorima  $1 M HCl$ ,  $0,1 M$  citratno-fosfatnom puferu,  $1 M HCl$  u prisustvu EDTA i  $0,1 M$  citratno-fosfatnom puferu u prisustvu EDTA na 10 minuta, u vremenskom trajanju od minimum 3 h (slike 14-17).



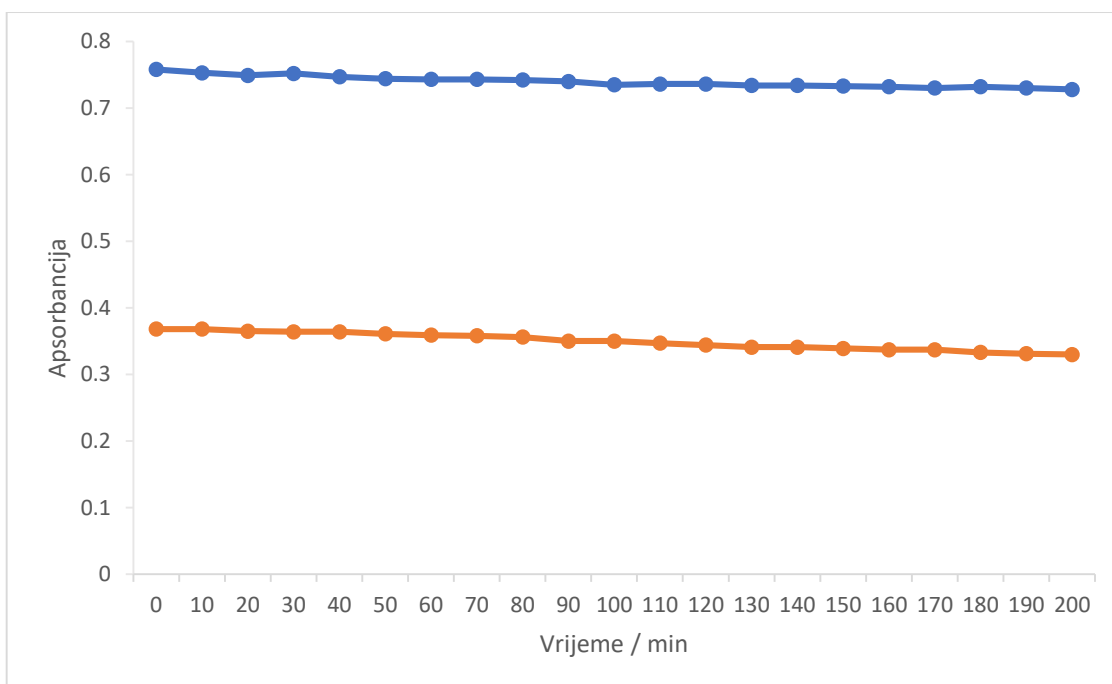
**Slika 14.** Praćenje stabilnosti rastvora askorbinske kiseline koncentracija  $1 \cdot 10^{-4} M$  (plavo),  $5 \cdot 10^{-5} M$  (crveno) u  $0,1 M$  citratno-fosfatnom puferu kao stabilizatoru



**Slika 15.** Stabilnost rastvora askorbinske kiseline koncentracija  $1 \cdot 10^{-4} M$  (plavo),  $5 \cdot 10^{-5} M$  (crveno) u  $0,1 M$  citratno-fosfatnom puferu i EDTA kao stabilizatoru



**Slika 16.** Stabilnost rastvora askorbinske kiseline koncentracija  $1 \cdot 10^{-4} M$  (plavo),  $5 \cdot 10^{-5} M$  (crveno) u  $1 M HCl$  kao stabilizatoru



**Slika 17.** Stabilnost rastvora askorbinske kiseline koncentracija  $1 \cdot 10^{-4} M$  (plavo),  $5 \cdot 10^{-5} M$  (crveno) u  $1 M HCl$  i EDTA kao stabilizatoru

Na osnovu slika 14-17, pokazano je da je askorbinska kiselina stabilna najmanje 3 sata u pomenutim stabilizatorima i da nije bilo većih promjena u apsorbanciji rastvora askorbinske kiseline.

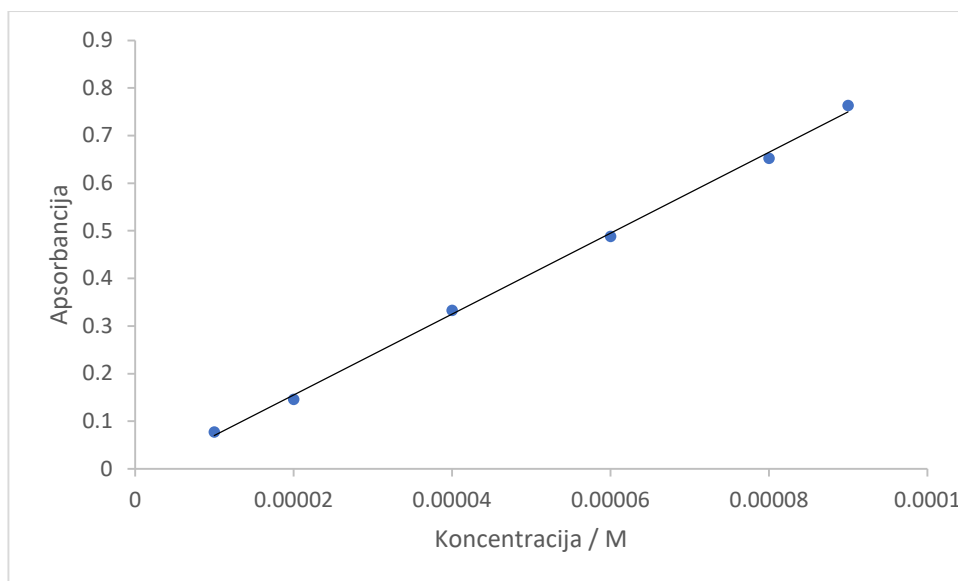
### 4.3. KALIBRACIONI DIJAGRAMI RASTVORA ASKORBINSKE KISELINE U RAZLIČITIM STABILIZATORIMA

Kalibracioni dijagrami rastvora askorbinske kiseline snimljeni su u koncentracionom opsegu od  $1 \cdot 10^{-5}$  do  $9 \cdot 10^{-5}$  M, u stabilizatorima 1 M HCl, 0,1 M citratno-fosfatnom puferu, 1 M HCl u prisustvu EDTA i 0,1 M citratno-fosfatnom puferu u prisustvu EDTA, na prethodno utvrđenoj radnoj talasnoj dužini od 250 nm. Snimanje kalibracionih dijagrama je odrađeno 3 puta. Jednačine pravih su date kao srednja vrijednost tri određivanja. Na osnovu dobijenih kalibracionih dijagrama vršeno je spektrofotometrijsko određivanje koncentracije vitamina C.

Na slici 18 je prikazan kalibracioni dijagram rastvora askorbinske kiseline u 0,1 M citratno-fosfatnom puferu. Dobijene vrijednosti apsorbancija za formiranje kalibracionog dijagrama date su u tabeli 3.

**Tabela 3.** Vrijednosti apsorbancija korišćene za formiranje kalibracionog dijagrama rastvora askorbinske kiseline u 0,1 M citratno-fosfatnom puferu kao stabilizatoru

Koncentracija rastvora askorbinske kiseline (M)	Apsorbancija
$1 \cdot 10^{-5}$	$0,077 \pm 0,016$
$2 \cdot 10^{-5}$	$0,146 \pm 0,003$
$4 \cdot 10^{-5}$	$0,333 \pm 0,006$
$6 \cdot 10^{-5}$	$0,488 \pm 0,001$
$8 \cdot 10^{-5}$	$0,652 \pm 0,002$
$9 \cdot 10^{-5}$	$0,763 \pm 0,001$



**Slika 18.** Kalibracioni dijagram rastvora askorbinske kiseline u 0,1 M citratno-fosfatnom puferu kao stabilizatoru

Jednačina prave glasi:

$$y = 8,49 \cdot 10^3 x - 0,0149; R = 0,9992$$

Za datu kalibracionu pravu (slika 18) preciznost metode je provjeravana analizom rastvora askorbinske kiseline koncentracije  $6 \cdot 10^{-5}$  M u citratno-fosfatnom puferu kao stabilizatoru izračunavanjem relativnog standardnog odstupanja na osnovu pet ponovljenih određivanja (n=5), (tabela 4).

**Tabela 4.** Vrijednosti apsorbance rastvora askorbinske kiseline koncentracije  $6 \cdot 10^{-5}$  M u 0,1 M citratno-fosfatnom puferu kao stabilizatoru (n=5)

Broj mjerjenja	Apsorbancija
1	0,480
2	0,488
3	0,478
4	0,490
5	0,489



Na osnovu jednačine kalibracione prave i dobijenih vrijednosti apsorbancija izračunate su koncentracije napravljenog rastvora. Za izračunate vrijednosti koncentracije određene su: srednja vrijednost, medijana, standardna devijacija, minimalna i maksimalna vrijednost, suma i relativna standardna devijacija (RSD) (tabela 5).

**Tabela 5.** Statistika ponovljenih mjerenja

Srednja vrijednost	$5,908 \cdot 10^{-5}$
Medijana	$5,925 \cdot 10^{-5}$
Standardna devijacija	$0,053 \cdot 10^{-5}$
Minimum	$5,83 \cdot 10^{-5}$
Maksimum	$5,95 \cdot 10^{-5}$
Suma	$23,63 \cdot 10^{-5}$
Broj mjerenja	5
RSD (%)	0,89

U tabeli 6 su date analitičke karakteristike predložene metode: nagib kalibracione prave, odsječak kalibracione prave, linearnost, korelacioni koeficijent (R), molarna absorbtivnost ( $\epsilon$ ), limit detekcije (LOD), limit kvantifikacije (LOQ), standardna devijacija odsječka (SD odsječka), standardna devijacija nagiba (SD nagiba) i relativna standardna devijacija (RSD).

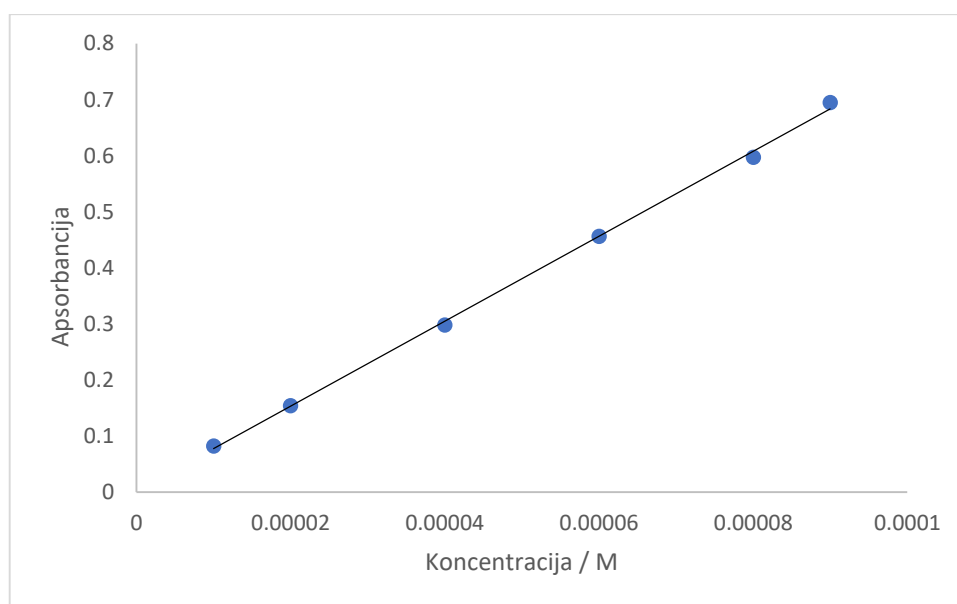
**Tabela 6.** Analitičke karakteristike predložene metode

<b>Analitička karakteristika</b>	<b>Vrijednost</b>
Nagib kalibracione prave	$8,49 \cdot 10^3$
Odsječak kalibracione prave	0,0149
SD odsječka	0,0114
SD nagiba	120,2
LOQ (M)	$1,34 \cdot 10^{-5}$
LOD (M)	$0,40 \cdot 10^{-5}$
Linearnost (M)	$1,34 \cdot 10^{-5} - 9 \cdot 10^{-5}$
R	0,9992
$\epsilon$ ( $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	$8,49 \cdot 10^3$
RSD (%)	0,89

Na slici 19 je prikazan je kalibracioni dijagram rastvora askorbinske kiseline u 0,1 M citratno-fosfatnom puferu i EDTA kao stabilizatoru. Dobijene vrijednosti apsorbancija za formiranje kalibracionog dijagrama date su u tabeli 7.

**Tabela 7.** Vrijednosti apsorbancija korišćene za formiranje kalibracionog dijagrama rastvora askorbinske kiseline u 0,1 M citratno-fosfatnom puferu i EDTA kao stabilizatoru

Koncentracija rastvora askorbinske kiseline (M)	Apsorbancija
$1 \cdot 10^{-5}$	0,082±0,004
$2 \cdot 10^{-5}$	0,154±0,001
$4 \cdot 10^{-5}$	0,298±0,002
$6 \cdot 10^{-5}$	0,456±0,001
$8 \cdot 10^{-5}$	0,597±0,001
$9 \cdot 10^{-5}$	0,695±0,009



**Slika 19.** Kalibracioni dijagram rastvora askorbinske kiseline u 0,1 M citratno-fosfatnom puferu i EDTA kao stabilizatoru

Jednačina date kalibracione prave sa slike 19 je:

$$y = 7,58 \cdot 10^3 x - 0,0016; R = 0,9994$$

Za datu kalibracionu pravu (slika 19) preciznost metode je provjeravana analizom rastvora askorbinske kiseline koncentracije  $6 \cdot 10^{-5}$  M u citratno-fosfatnom puferu i EDTA kao stabilizatoru izračunavanjem relativnog standardnog odstupanja na osnovu pet ponovljenih određivanja (n=5), (tabela 8).

**Tabela 8.** Vrijednosti apsorbance rastvora askorbinske kiseline koncentracije  $6 \cdot 10^{-5}$  M u 0,1 M citratno-fosfatnom puferu i EDTA kao stabilizatoru (n=5)

Broj mjerjenja	Apsorbancija
1	0,456
2	0,448
3	0,457
4	0,454
5	0,455

Na osnovu jednačine kalibracione prave i dobijenih vrijednosti apsorbancija izračunate su koncentracije napravljenog rastvora. Za izračunate vrijednosti koncentracije određene su: srednja vrijednost, medijana, standardna devijacija, minimalna i maksimalna vrijednost, suma i relativna standardna devijacija (RSD) (Tabela 9).

**Tabela 9.** Statistika ponovljenih mjerjenja

Srednja vrijednost	$5,9808 \cdot 10^{-5}$
Medijana	$5,981 \cdot 10^{-5}$
Standardna devijacija	$0,062 \cdot 10^{-5}$
Minimum	$5,889 \cdot 10^{-5}$
Maksimum	$6,059 \cdot 10^{-5}$
Suma	$29,90 \cdot 10^{-5}$
Broj mjerjenja	5
RSD (%)	1,04

U tabeli 10 su date analitičke karakteristike predložene metode: nagib kalibracione prave, odsječak kalibracione prave, linearnost, korelacioni koeficijent (R), molarna absorbtivnost ( $\epsilon$ ), limit detekcije (LOD), limit kvantifikacije (LOQ), standardna devijacija odsječka (SD odsječka), standardna devijacija nagiba (SD nagiba) i relativna standardna devijacija (RSD).

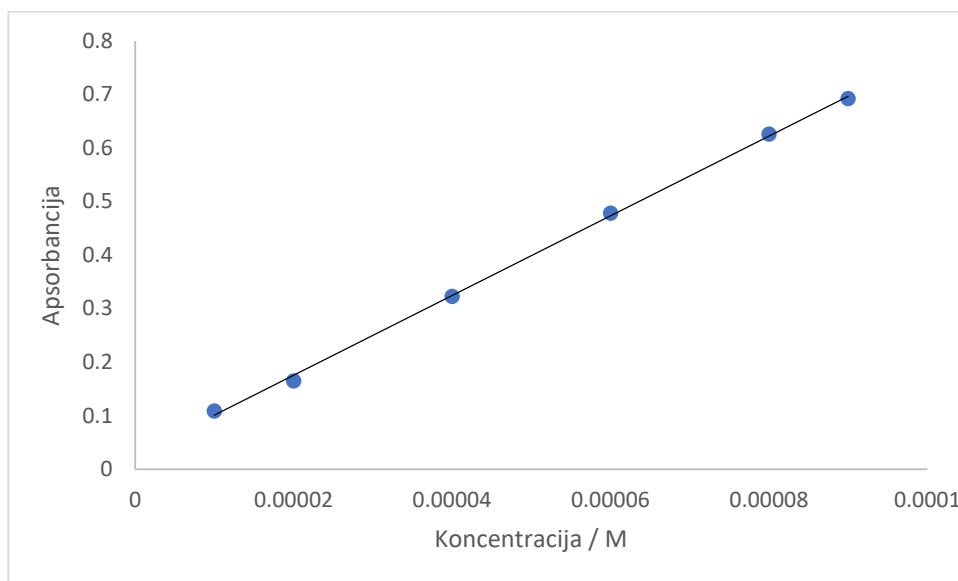
**Tabela 10.** Analitičke karakteristike predložene metode

<b>Analitička karakteristika</b>	<b>Vrijednost</b>
Nagib kalibracione prave	$7,58 \cdot 10^3$
Odsječak kalibracione prave	0,0016
SD odsječka	0,0009
SD nagiba	65,2
LOQ (M)	$1,19 \cdot 10^{-6}$
LOD (M)	$3,56 \cdot 10^{-7}$
Linearnost (M)	$1,19 \cdot 10^{-6} - 9 \cdot 10^{-5}$
R	0,9994
$\epsilon$ ( $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	$7,58 \cdot 10^3$
RSD (%)	1,04

Na slici 20 prikazan je kalibracioni dijagram rastvora askorbinske kiseline u 1 M HCl kao stabilizatoru. Dobijene vrijednosti apsorbancija za formiranje kalibracionog dijagrama date su u tabeli 11.

**Tabela 11.** Vrijednosti apsorbancije korišćene za formiranje kalibracionog dijagrama rastvora askorbinske kiseline u 1 M HCl kao stabilizatoru

Koncentracija rastvora askorbinske kiseline (M)	Apsorbancija
$1 \cdot 10^{-5}$	$0,125 \pm 0,001$
$2 \cdot 10^{-5}$	$0,165 \pm 0,003$
$4 \cdot 10^{-5}$	$0,323 \pm 0,007$
$6 \cdot 10^{-5}$	$0,478 \pm 0,014$
$8 \cdot 10^{-5}$	$0,626 \pm 0,008$
$9 \cdot 10^{-5}$	$0,692 \pm 0,002$



**Slika 20.** Kalibracioni dijagram rastvora askorbinske kiseline u 1 M HCl kao stabilizatoru

Jednačina prave je:

$$y = 7,32 \cdot 10^3 x + 0,0355; R = 0,9989$$

Za datu kalibracionu pravu (slika 20) preciznost metode je provjeravana analizom rastvora askorbinske kiseline koncentracije  $6 \cdot 10^{-5}$  M u 1 M HCl kao stabilizatoru izračunavanjem relativnog standardnog odstupanja na osnovu pet ponovljenih određivanja ( $n=5$ ), (tabela 12).

**Tabela 12.** Vrijednosti apsorbance rastvora askorbinske kiseline koncentracije  $6 \cdot 10^{-5}$  M u 1 M HCl kao stabilizatoru ( $n=5$ )

Broj mjerjenja	Apsorbancija
1	0,480
2	0,486
3	0,478
4	0,474
5	0,479

Na osnovu jednačine kalibracione prave i dobijenih vrijednosti apsorbancija izračunate su koncentracije napravljenog rastvora. Za izračunate vrijednosti koncentracije određene su: srednja vrijednost, medijana, standardna devijacija, minimalna i maksimalna vrijednost, suma i relativna standardna devijacija (RSD) (Tabela 13).

**Tabela 13.** Statistika ponovljenih mjerenja

Srednja vrijednost	6,084
Medijana	6,058
Standardna devijacija	0,077
Minimum	5,99
Maksimum	6,174
Suma	30,421
Broj mjerenja	5
RSD (%)	1,26

U tabeli 14 su date analitičke karakteristike predložene metode: nagib kalibracione prave, odsječak kalibracione prave, linearnost, korelacioni koeficijent (R), molarna absorbtivnost ( $\epsilon$ ), limit detekcije (LOD), limit kvantifikacije (LOQ), standardna devijacija odsječka (SD odsječka), standardna devijacija nagiba (SD nagiba) i relativna standardna devijacija (RSD).

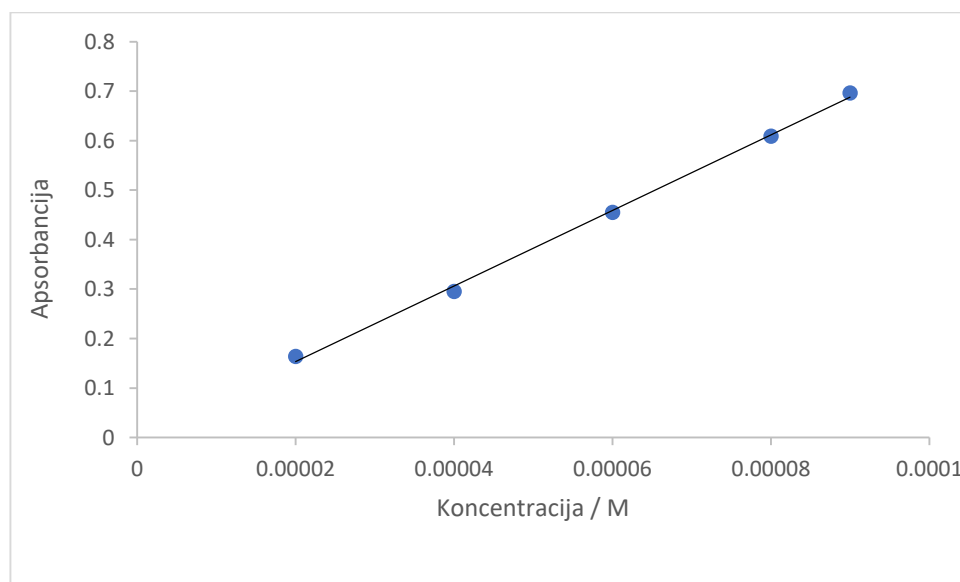
**Tabela 14.** Analitičke karakteristike predložene metode

<b>Analitička karakteristika</b>	<b>Vrijednost</b>
Nagib kalibracione prave	$7,32 \cdot 10^3$
Odsječak kalibracione prave	0,0355
SD odsječka	0,003
SD nagiba	80,5
LOQ (M)	$4,1 \cdot 10^{-6}$
LOD (M)	$0,123 \cdot 10^{-5}$
Linearnost (M)	$4,1 \cdot 10^{-6} - 9 \cdot 10^{-5}$
R	0,9989
$\epsilon$ ( $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	$7,32 \cdot 10^3$
RSD (%)	1,26

Na slici 21 prikazana je kalibracioni dijagram rastvora askorbinske kiseline u 1 M HCl i EDTA kao stabilizatoru. Dobijene vrijednosti apsorbancija za formiranje kalibracionog dijagrama date su u tabeli 15.

**Tabela 15.** Vrijednosti apsorbancija korišćene za formiranje kalibracionog dijagrama rastvora askorbinske kiseline u 1 M HCl i EDTA kao stabilizatoru

Koncentracija rastvora askorbinske kiseline (M)	Apsorbancija
$2 \cdot 10^{-5}$	$0,164 \pm 0,002$
$4 \cdot 10^{-5}$	$0,295 \pm 0,003$
$6 \cdot 10^{-5}$	$0,455 \pm 0,002$
$8 \cdot 10^{-5}$	$0,609 \pm 0,001$
$9 \cdot 10^{-5}$	$0,696 \pm 0,006$



**Slika 21.** Kalibracioni dijagram rastvora askorbinske kiseline u 1 M HCl i EDTA kao stabilizatoru

Jednačina prave:

$$y = 7,63 \cdot 10^3 x + 0,0011; R = 0,9992$$

Za datu kalibracionu pravu (slika 21) preciznost metode je provjeravana analizom rastvora askorbinske kiseline koncentracije  $6 \cdot 10^{-5}$  M u 1 M HCl i EDTA kao stabilizatoru izračunavanjem relativnog standardnog odstupanja na osnovu pet ponovljenih određivanja (n=5), (tabela 16).

**Tabela 16.** Vrijednosti apsorbance rastvora askorbinske kiseline koncentracije  $6 \cdot 10^{-5}$  M u 1 M HCl i EDTA kao stabilizatoru

Broj mjerjenja	Apsorbancija
1	0,456
2	0,455
3	0,457
4	0,460
5	0,461

Na osnovu jednačine kalibracione prave i dobijenih vrijednosti apsorbancija izračunate su koncentracije napravljenog rastvora. Za izračunate vrijednosti koncentracije određene su: srednja vrijednost, medijana, standardna devijacija, minimalna i maksimalna vrijednost, suma i relativna standardna devijacija (RSD) (Tabela 17).

**Tabela 17.** Statistika ponovljenih mjerjenja

Srednja vrijednost	$5,986 \cdot 10^{-5}$
Medijana	$6,98 \cdot 10^{-5}$
Standardna devijacija	$0,033 \cdot 10^{-5}$
Minimum	$5,95 \cdot 10^{-5}$
Maksimum	$6,03 \cdot 10^{-5}$
Suma	$29,93 \cdot 10^{-5}$
Broj mjerjenja	5
RSD (%)	0,55



U tabeli 18 su date analitičke karakteristike predložene metode: nagib kalibracione prave, odsječak kalibracione prave, linearnost, korelacioni koeficijent (R), molarna apsorbtivnost ( $\epsilon$ ), limit detekcije (LOD), limit kvantifikacije (LOQ), standardna devijacija odsječka (SD odsječka), standardna devijacija nagiba (SD nagiba) i relativna standardna devijacija (RSD).

**Tabela 18.** Analitičke karakteristike predložene metode

<b>Analitička karakteristika</b>	<b>Vrijednost</b>
Nagib kalibracione prave	$7,63 \cdot 10^3$
Odsječak kalibracione prave	0,0011
SD odsječka	0,0006
SD nagiba	55
LOQ (M)	$0,79 \cdot 10^{-6}$
LOD (M)	$0,24 \cdot 10^{-6}$
Linearnost (M)	$0,79 \cdot 10^{-6} - 9 \cdot 10^{-5}$
R	0,9992
$\epsilon$ ( $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	$7,63 \cdot 10^3$
RSD (%)	0,55

Na osnovu slika 18-21 ustanovljeno je da se korelacioni koeficijent (R) kreće od 0,9989 do 0,9994 što ukazuje na jaku linearnu vezu između koncentracije askorbinske kiseline i apsorbanije mjerene na 250 nm. Provjeravanjem preciznosti određivanja askorbinske kiseline predloženim spektrofotometrijskim metodama dobijena su niska relativna standardna odstupanja koja se kreću od 0,55 do 1,26 %. Pokazalo se da najmanje odstupanje ima metoda gdje se kao stabilizator koristila 1 M HCl i EDTA (0,55 %). Takođe limit kvantifikacije je najniži kad se koristi 1 M HCl i EDTA kao stabilizator ( $0,76 \cdot 10^{-6}$  M). Molarne apsorptivnosti dobijene za sve četiri metode su imale visoke vrijednosti ( $7,32 \cdot 10^3 - 8,49 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) što pokazuje da su sve metode visoko osjetljive.

#### **4.4 ODREĐIVANJE ASKORBINSKE KISELINE U PRISUSTVU OMETAJUĆIH KOMPONENTI**

U ovom master radu praćen je uticaj interferirajućih komponenti na određivanje vitamina C (glukoza, DL-alanin, vinska kiselina, citratna kiselina, benzojeva kiselina, škrob i katjoni:

Ba(II), Mg(II), Ca(II), dodatih u obliku soli (BaCO<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>,) u cilju određivanja selektivnosti predložene spektrofotometrijske metode. Dobijeni rezultati relativne greške određivanja u prisustvu interferirajućih komponenti dati su u tabeli 19.

**Tabela 19.** Uticaj ometajućih supstanci na spektrofotometrijsko određivanje askorbinske kiseline u ispitivanim stabilizatorima

Naziv ometajuće supstance	Maseni odnos ometajuće supstance i askorbinske kiseline	Greška (%)			
		1 M HCl	1 M HCl i EDTA	0,1 M citratno-fosfatni pufer	0,1 M citratno-fosfatni pufer i EDTA
Glukoza	50	0,0	0,0	0,0	0,0
Tartaratna kiselina	5	-1,10	-0,60	-1,11	-0,91
Citratna kiselina	10	-1,50	-0,53	-0,87	-1,13
Benzojeva kiselina	0,05	0,0	0,0	0,0	0,0
Skrob	0,25	0,0	0,0	0,0	0,0
DL alanin	10	0,0	0,0	0,0	0,0
Barijum (II)	1,2	0,3	0,0	0,4	0,0
Magnezijum (II)	0,01	-1,0	0,0	-0,9	0,0
Kalcijum (II)	1	0,2	0,0	0,4	0,0

Na osnovu literaturnog pregleda nađeno je da interferirajuća supstanca u masenom odnosu koji je korišćen ne ometa određivanje askorbinske kiseline ako relativna greška nije veća od  $\pm 5,0$  % (Salkić i sar., 2009).

Rezultati dobijeni ovim ispitivanjem su pokazali da 50 puta veća količina glukoze, 5 puta veća količina tartaratne kiseline, 10 puta veća količina citratne kiseline, 0,05 puta veća količina benzojeve kiseline, 0,25 puta veća količina skroba i 10 puta veća količina DL-alanina ne utiču na spektrofotometrijsko određivanje askorbinske kiseline. Kad je u pitanju uticaj ispitivanih katjona (Ba(II), Mg(II), Ca(II)), na spektrofotometrijsko određivanje askorbinske kiseline, uočeno je da je relativna greška manja od 5 %, što se u pojedinim slučajevima može objasniti prisustvom EDTA koja sprečava oksidaciju askorbinske kiseline (Salkić i sar., 2009).

#### 4.5. SADRŽAJ VITAMINA C U REALNIM UZORCIMA

Rezultati određivanja vitamina C u realnim uzorcima spektrofotometrijskom, titrimetrijskom i HPLC metodom dati su u tabeli 20 (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija).

**Tabela 20.** *Uporedni rezultati ispitivanja askorbinske kiseline spektrofotometrijskom, titrimetrijskom i HPLC metodom u realnim uzorcima*

Uzorak	Masa vitamina C naznačena na deklaraciji proizvoda (mg)	Masa vitamina C dobijena spektrofotometrijskom metodom (mg)				Masa vitamina C dobijena metodom titracije (mg)	Masa vitamina C dobijena metodom HPLC (mg)
		1 M HCl	1 M HCl i EDTA	0,1 M Citratno-fosfatni pufer	0,1 M Citratno-fosfatni pufer i EDTA		
1	500	439,8 $\pm$ 2,73	472,3 $\pm$ 2,40	439,9 $\pm$ 2,53	459,9 $\pm$ 2,81	500,0 $\pm$ 1,53	469,22
2	300	338,2 $\pm$ 2,81	309,9 $\pm$ 2,02	339,9 $\pm$ 2,18	319,8 $\pm$ 3,75	300,0 $\pm$ 1,13	229,4
3	1000	901,2 $\pm$ 7,11	901,0 $\pm$ 5,16	908,9 $\pm$ 5,73	924,8 $\pm$ 6,15	971,2 $\pm$ 4,14	870,8
4	1000	965,8 $\pm$ 3,13	961,1 $\pm$ 2,05	975,3 $\pm$ 2,03	975,6 $\pm$ 3,14	987,9 $\pm$ 2,57	949,25
5	500	465,5 $\pm$ 6,16	475,3 $\pm$ 5,01	460,1 $\pm$ 6,15	455,7 $\pm$ 5,14	522,4 $\pm$ 4,12	470,5
6	500	450,2 $\pm$ 2,36	461,5 $\pm$ 2,07	463,7 $\pm$ 2,67	465,3 $\pm$ 3,01	490,0 $\pm$ 1,87	458,7
7	30	26,05 $\pm$ 1,58	29,4 $\pm$ 1,09	26,45 $\pm$ 1,65	26,5 $\pm$ 1,67	33,0 $\pm$ 0,36	28,1

**Tabela 21.** *Relativna standardna devijacija uporednih rezultata ispitivanja askorbinske kiseline spektrofotometrijskom i titrimetrijskom metodom u realnim uzorcima*

Uzorak	RSD spektrofotometrijskih metoda (%)				RSD titracione metode (%)
	1 M HCl	1 M HCl i EDTA	0,1 M Citratno-fosfatni pufer	0,1 M Citratno-fosfatni pufer i EDTA	
1	0,62	0,51	0,58	0,61	0,31
2	0,83	0,65	0,64	1,17	0,38
3	0,79	0,57	0,63	0,67	0,43
4	0,32	0,21	0,21	0,32	0,26
5	1,35	1,05	1,34	1,13	0,79
6	0,52	0,45	0,58	0,65	0,38
7	6,05	3,71	6,21	6,3	1,09

Često se rezultati analize askorbinske kiseline u komercijalnim uzorcima dobijeni eksperimentalnim putem ne poklapaju sa rezultatima naznačenim na deklaraciji proizvoda. Najčešći razlozi za to su nestabilnost askorbinske kiseline: lako se oksiduje, osjetljiva je na svjetlost odnosno fotosenzitivna je, pa se iz tog razloga mora čuvati na tamnom mjestu, osjetljiva je na visoke temperature. Takođe, na koncentraciju vitamina C u realnim uzorcima utiče i prisustvo ostalih komponenti koje su dodate u ispitivane realne uzorke, kao i vrijeme (proizvodnje i isteka roka) što se može uočiti na osnovu dobijenih rezultata koji su prikazani u tabeli 20. Iz tabele 20 može se uočiti da se korišćenjem spektrofotometrijske, titrimetrijske i HPLC metode dobijaju rezultati koji se manje ili više razlikuju od vrijednosti naznačenih na deklaraciji proizvoda što je upravo uticaj prethodno navedenih faktora. Kada je u pitanju preciznost korišćenih spektrofotometrijskih metoda (tabela 21) najpreciznije rezultate daje spektrofotometrijska metoda kod koje je kao stabilizator korišćen sistem 1M HCl i EDTA (RSD vrijednosti 0,21-3,71 %) što je vjerovatno posljedica prisustva EDTA koja sprečava oksidaciju askorbinske kiseline (Salkić i Selimović, 2009). Može se uočiti iz tabele 20 da je koncentracija vitamina C u realnim uzorcima određena spektrofotometrijskim metodama uz stabilizatore u većini određivanja veća u odnosu na koncentraciju vitamina C određenu HPLC metodom što se može objasniti time da se HPLC metodom prije kvalitativne i kvantitativne analize sastojaka vrši razdvajanje komponenti u uzorku, a što nije slučaj sa spektrofotometrijskom metodom. Međutim, primjena HPLC metode je uslovljena upotrebom skupih instrumenata i reagenasa (Salkić i Selimović, 2009). Vrlo često se za određivanje vitamina C koristi jodimetrijska metoda koja je brza, jednostavna i jeftina. Međutim, kad se koristi ova metoda, na rezultate mogu da utiču supstance sa sličnim osobinama vitaminu C, što se može uočiti iz rezultata navedenih u tabeli 20. Ispitivane spektrofotometrijske metode uz odgovarajuće stabilizatore su se pokazale kao pogodne metode za određivanje vitamina C u ispitivanim realnim uzorcima i mogu se koristiti kao alternative već usvojenim metodama, posebno spektrofotometrijska metoda kod koje je kao stabilizator korišćen sistem 1M HCl i EDTA. Kod svih ispitivanih realnih uzoraka pokazalo se da je najbolje slaganje rezultata između spektrofotometrijske metode sa stabilizatorom 1 M HCl i EDTA i HPLC metode. Ovo je posebno izraženo kod rezultata dobijenih ispitivanjem uzoraka 1 i 6 koji u svom sastavu nemaju dodatih komponenti (tabela 20). Takođe se može vidjeti (tabela 21) da su bez obzira na metodu ispitivanja najveće vrijednosti RSD (1,09-6,3 %) dobijene za uzorak 7 koji je bio sa najnižom koncentracijom vitamina C.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom master radu vršeno je spektrofotometrijsko određivanje vitamina C u prisustvu različitih stabilizatora: 0,1 M citratno-fosfatnog pufera, 0,1 M citratno-fosfatnog pufera u prisustvu EDTA, 1 M hlorovodonične kiseline i 1 M hlorovodonične kiseline u prisustvu EDTA. Snimanjem spektara askorbinske kiseline u sva četiri stabilizatora dobijeno je da je maksimalna apsorbancija na talasnoj dužini 250 nm, a praćenjem vrijednosti apsorbancija askorbinske kiseline na ovoj talasnoj dužini dobijeno je da su rastvori stabilni najmanje 3 sata. Snimanjem apsorbancija serije rastvora askorbinske kiseline u opsegu koncentracija od  $1 \cdot 10^{-4}$  do  $9 \cdot 10^{-5}$  M dobijene su regresione jednačine za spektrofotometrijska ispitivanja vitamina C u svim korišćenim stabilizatorima sa odgovarajućim analitičkim karakteristikama. Vrijednosti korelacionih koeficijenata (R) za dobijene kalibracione dijagrame su od 0,9989 do 0,9994, što ukazuje na jaku linearnu vezu između koncentracije askorbinske kiseline i apsorbancije.

Ispitivanje uticaja interferirajućih komponenti (glukoza, DL-alanin, vinska kiselina, citratna kiselina, benzojeva kiselina, skrob i katjoni: Ba(II), Mg(II), Ca(II)) na određivanje vitamina C je pokazalo da su spektrofotometrijske metode uz korišćene stabilizatore selektivne (RSD manje od 5 %).

Provjeravanjem preciznosti određivanja askorbinske kiseline, korišćenjem standardnog rastvora poznate koncentracije, predloženim spektrofotometrijskim metodama dobijena su niska relativna standardna odstupanja (od 0,55 do 1,26 %), a najmanje odstupanje je dobijeno metodom gdje se kao stabilizator koristila 1 M HCl i EDTA (0,55 %). Takođe, limit kvantifikacije je najniži kad se koristi 1 M HCl i EDTA kao stabilizator ( $0,76 \cdot 10^{-6}$  M). Molarne apsorbivnosti dobijene za sve četiri metode su imale visoke vrijednosti ( $7,32 \cdot 10^3$  -  $8,49 \cdot 10^3$   $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) što pokazuje da su sve metode visoko osjetljive.

Dobijeni kalibracioni dijagrami su korišćeni za spektrofotometrijsko određivanje vitamina C u realnim uzorcima (7 suplemenata vitamina C). Radi provjere pouzdanosti spektrofotometrijskih metoda vitamin C je određivan i već usvojenim analitičkim metodama za određivanje vitamina C (jodimetrija i HPLC). Na osnovu dobijenih rezultata pokazalo se da se spektrofotometrijske metode, korišćene u ovom master radu, mogu koristiti kao pogodne metode za određivanje vitamina C u ispitivanim realnim uzorcima i da se mogu koristiti kao alternativa već usvojenim metodama, a posebno spektrofotometrijska metoda kod koje je kao stabilizator korišćen sistem 1M HCl i EDTA. Kod svih ispitivanih realnih uzoraka pokazalo se da je najbolje slaganje rezultata između spektrofotometrijske metode sa stabilizatorom 1 M

HCl i EDTA i HPLC metode. Ovo je posebno izraženo kod rezultata dobijenih ispitivanjem uzoraka koji u svom sastavu nemaju dodatih komponenti.

## 6. LITERATURA

1. Ahmad, I.; Mobeen, M.F.; Sheraz, M.A.; Ahmed, S.; Anwar, Z.; Shaikh, R.S.; Hussain, I.; Ali, S.M. Photochemical interaction of ascorbic acid and nicotinamide in aqueous solution: A kinetic study. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2018, 182, 115–121.
2. Al Fata, N.; George, S.; Dlalal, N.; Renard, C.M.G.C. Influence of partial pressure of oxygen on ascorbic acid degradation at canning temperature. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2018, 49, 215–221.
3. Altunkaya, A.; Gokmen, V. Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Chem.*, 2008, 107, 1173–1179.
4. Ariharan, V.N.; Kalirajan, K.; Devi, V.N.; Prasad, P. An exotic fruit which forms the new natural source for vitamin-C. *Rasayan J. Chem.*, 2012, 5, 356.
5. Batalova, V.N.; Slizhov, Y.G.; Chumakov, A.A. Parameters for Quantitative Evaluation of the Radical-Generating (Pro-Oxidant) Capacity of Metal Ions and the Radical-Scavenging Activity of Antioxidants Using Voltammetric Method. *J. Sib. Fed. Univ. Chem.*, 2016, 9, 60–67.
6. Bei, R. Effects of vitamin C on health: A review of evidence. *Front. Biosci.*, 2013, 18, 1017–1029.
7. Caiyun, L.; Jie, L.; Shoulei, Y.; Qingzhang, W. Research progress on application of ascorbic acid in food. *Food Sci. Technol.* 2021, 46, 228–232.
8. Cardoso, P.C.; Tomazini, A.P.B.; Stringheta, P.C.; Ribeiro, S.M.R.; Pinheiro-Sant'Ana, H.M. Vitamin C and carotenoids in organic and conventional fruits grown in Brazil. *Food Chem.* 2011, 126, 411–416.
9. Carr, A.C.; Maggini, S. Vitamin C and immune function. *Nutrients* 2017, 9, 1211.
10. Chen, G.; Chang, T.M.S. Dual effects include antioxidant and pro-oxidation of ascorbic acid on the redox properties of bovine hemoglobin. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2018, 46, 983–992.
11. Comunian, T.A.; Thomazini, M.; Alves, A.; Junior, F.E.D.M.; Balieiro, J.C.D.C.; Favaro-Trindade, C.S. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. *Food Res. Int.* 2013, 52, 373–379.
12. Da Cruz, M.C.R.; Perussello, C.A.; Masson, M.L. Microencapsulated ascorbic acid: Development, characterization, and release profile in simulated gastrointestinal fluids. *J. Food Process Eng.* 2018, 41, e12922. 277,

13. Dalle-Donne, I.; Rossi, R.; Giustarini, D.; Milzani, A.; Colombo, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* 2003, 329, 23–38.
14. Davey, M.W.; Montagu, M.V.; Inzé, D.; Sanmartin, M.; Kanellis, A.; Smirnoff, N.; Benzie, I.J.J.; Strain, J.J.; Favell, D.; Fletcher, J. Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agr.* 2000, 80, 825–860.
15. Dhakal, S.; Balasubramaniam, V.M.; Ayvaz, H.; Rodriguez-Saona, L.E. Kinetic modeling of ascorbic acid degradation of pineapple juice subjected to combined pressure-thermal treatment. *J. Food Eng.* 2018, 224, 62–70.
16. Domínguez-Perles, R.; Mena, P.; García-Viguera, C.; Moreno, D.A. Brassica foods as a dietary source of vitamin C: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2014, 54, 1076–1091.
17. Dosedo M., Jirkovský E., Macáková K, Kujovská L., Javorská L., Pourová J., Mercolini L., Remião F., Nováková L., Mladenka P., et al., Vitamin C—Sources, Physiological Role, Kinetics, Deficiency, Use, Toxicity, and Determination, *Nutrients*, 2021, 615(13), 2-34.
18. Du, J.; Cullen, J.J.; Buettner, G.R. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim. Et Biophys. Acta-Rev. Cancer*, 2012, 1826, 443–457.
19. Elbsheer A., Development of Methods for the Determination of Vitamin C Content in some Dry Fruits and Leaves, Laloub and Mesquite (*Balanites aegyptiaca* and *Prosopis juliflora*), *Doktorska teza*, Sudan University of Science and Technology, 2018, 2-131.
20. Ellong, E.; Billard, C.; Adenet, S.; Rochefort, K. Polyphenols, carotenoids, vitamin C content in tropical fruits and vegetables and impact of processing methods. *Food Sci. Nutr.* 2015, 6, 299–313.
21. Englard, S.; Seifter, S. The biochemical functions of ascorbic acid. *Annu. Rev. Nutr.* 1986, 6, 365–406.
22. Förstermann, U.; Sessa, W.C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur. Heart J.* 2012, 33, 829–837d.
23. Fredriksen, J.; Løken, E.B.; Borgejordet, Å.; Gjerdevik, K.; Nordbotten, A. Unexpected sources of vitamin C. *Food Chem.* 2009, 113, 832–834.
24. Gligorovski V., Poređenje analitičkih metoda za određivanje vitamina C u farmaceutskim preparatima, *Zbornik radova Petničke sveske* 2013, 72, 425-433.
25. Gokce, N.; Keaney, J.F., Jr.; Frei, B.; Holbrook, M.; Olesiak, M.; Zachariah, B.J.; Leeuwenburgh, C.; Heinecke, J.W.; Vita, J.A. Long-term ascorbic acid administration reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1999, 99, 3234–3240.



26. Granger, M.; Eck, P. Dietary vitamin C in human health. *Adv. Food Nutr. Res.* 2018, 83, 281–310.
27. Gull, J.; Sultana, B.; Anwar, F.; Naseer, R.; Ashraf, M.; Ashrafuzzaman, M. Variation in antioxidant attributes at three ripening stages of guava (*Psidium guajava* L.) fruit from different geographical regions of Pakistan. *Molecules* 2012, 17, 3165–3180.
28. Günter, P.; Hanspeter, H. *Industrial Production of L-ascorbic Acid (Vitamin C) and D-isoascorbic Acid*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2014; Volume 143, pp. 143–147
29. Hiatt, A. N., Ferruzzi, M. G., Taylor, L. S., & Mauer, L. J. Deliquescence behavior and chemical stability of vitamin C forms (ascorbic acid, sodium ascorbate, and calcium ascorbate) and blends. *International Journal of Food Properties*, 2011, 14(6), 1330–1348.
30. Hodges, R. E.; Hood, J.; Canham, J. E.; Sauberlich, H. E.; Baker, E. M. Clinical manifestations of ascorbic acid deficiency in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 1971, 24, 432–443.
31. Hornig, D. Distribution of ascorbic acid, metabolites and analogues in man and animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1975, 258, 103–118.
32. Kallio, H.; Yang, B.; Peippo, P. Effects of different origins and harvesting time on vitamin C, tocopherols, and tocotrienols in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) berries. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 6136–6142.
33. Kaźmierczak-Barańska, J. et al. "Two faces of vitamin C—antioxidative and pro-oxidative agent." *Nutrients*, 2020, 12.5: 1501.
34. Karlsen, A.; Blomhoff, R.; Gundersen, T. E. High through put analysis of vitamin C in human plasma with the use of HPLC with monolithic column and UV-detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2005, 824, 132–138
35. Kim, T. K.; Hwang, K. E.; Lee, M. A.; Paik, H. D.; Kim, Y. B.; Choi, Y. S. Quality characteristics of pork loin cured with green nitrite source and some organic acids. *Meat Sci.* 2019, 152, 141–145.
36. Kim, H. L.; Park, Y. Maintenance of cellular tetrahydrobiopterin homeostasis. *BMBRep.* 2010, 43, 584–592.
37. Kondakci, E.; Ozyurek, M.; Guclu, K.; Apak, R. Novel pro-oxidant activity assay for polyphenols, vitamins C and E using a modified CUPRAC method. *Talanta* 2013, 115, 583–589.
38. Koutchma, T. Advances in Ultraviolet Light Technology for Non-thermal Processing of Liquid Foods. *Food & Bioprocess Technol.* 2009, 2, 138–155.

39. Külen, O.; Stushnoff, C.; Holm, D.G. Effect of cold storage on total phenolics content, antioxidant activity and vitamin C level of selected potato clones. *J. Sci. Food Agric.* 2013, 93, 2437–2444.
40. Lall, S. P.; Lewis-McCrea, L. M. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish—An overview. *Aquaculture* 2007, 267, 3–19.
41. Landi, M.; Degl’Innocenti, E.; Guglielminetti, L.; Guidi, L. Role of ascorbic acid in the inhibition of polyphenol oxidase and the prevention of browning in different browning-sensitive *Lactuca sativa* var. *capitata* (L.) and *Eruca sativa* (Mill.) stored as fresh-cut produce. *J. Sci. Food Agric.* 2013, 93, 1814–1819.
42. Lee Chong, T.; Ahearn, E. L.; Cimmino, L. Reprogramming the epigenome with vitamin C. *Front. Cell Dev. Biol.* 2019, 7, 128.
43. Lešková, E.; Kubíková, J.; Kováčiková, E.; Košická, M.; Porubská, J.; Holcčíková, K. Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *J. Food Compos. Anal.* 2006, 19, 252–276.
44. Levine, M.; Rumsey, S.; Daruwala, R.; Park, J.; Wang, Y. Criteria and recommendations for vitamin C intake. *JAMA* 1999, 281, 1415–1423
45. Li, Y.; Yan, Y.; Yu, A. N.; Wang, K. Effects of reaction parameters on self-degradation of L-ascorbic acid and self-degradation kinetics. *Food Sci. Biotechnol.* 2016, 25, 97–104.
46. Liu, D. H.; Shi, J.; Ibarra, A. C.; Kakuda, Y.; Xue, S. J. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and beta-carotene mixtures on the DPPH free radical. *Lwt-Food Sci. Technol.* 2008, 41, 1344–1349.
47. Liu, G.; Huang, W.; Babii, O.; Gong, X.; Chen, L. Novel protein-lipid composites as nanoparticles with inner aqueous compartments as delivery systems of hydrophilic nutraceutical compounds. *Nanoscale* 2018, 10, 10629–10640
48. Long, C. L.; Maull, K. I.; Krishnan, R. S.; Laws, H. L.; Geiger, J. W.; Borghesi, L.; Franks, W.; Lawson, T. C.; Sauberlich, H. E. Ascorbic acid dynamics in the seriously ill and injured. *J. Surg. Res.* 2003, 109, 144–148.
49. Lykkesfeldt, J. Ascorbate and dehydroascorbic acid as biomarkers of oxidative stress: Validity of clinical data depends on vacutainer system used. *Nutr. Res.* 2012, 32, 66–69.
50. Maeda, E. E., & Mussa, D. M. D. N. The stability of vitamin C (L-ascorbic acid) in bottled and canned orange juice. *Food Chemistry*, 1986, 22(1), 51–58.
51. Martínez, S.; López, M.; González-Raurich, M.; Bernardo Alvarez, A. The effects of ripening stage and processing systems on vitamin C content in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2005, 56, 45–51

52. May, J. M. Vitamin C transport and its role in the central nervous system. *Subcell. Biochem.* 2012, 56, 85–103.
53. May, J. M.; Harrison, F. E. Role of vitamin C in the function of the vascular endothelium. *Antioxid. Redox Sign.* 2013, 19, 2068–2083.
54. May, J. M.; Qu, Z. C. Transport and intracellular accumulation of vitamin C in endothelial cells: Relevance to collagen synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005, 434, 178–186
55. Medenica M.; Pejić N. Instrumentalne metode, Univerzitet u Beogradu, 2018
56. Mezadri, T.; Villaño, D.; Fernández-Pachón, M.S.; García-Parrilla, M.C.; Troncoso, A.M. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. *J. Food Compos. Anal.* 2008, 21, 282–290
57. Mortensen, A.; Lykkesfeldt, J. Does vitamin C enhance nitric oxide bioavailability in a tetrahydrobiopterin-dependent manner? In vitro, in vivo and clinical studies. *Nitric Oxide.* 2014, 36, 51–57.
58. Motoyama, T.; Kawano, H.; Kugiyama, K.; Hirashima, O.; Ohgushi, M.; Yoshimura, M.; Ogawa, H.; Yasue, H. Endothelium- dependent vasodilation in the brachial artery is impaired in smokers: Effect of vitamin C. *Am.J. Physiol.* 1997, 273, 1644–1650.
59. Niki, E. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: In vitro and in vivo evidence. *Free Radic. Biol. Med.* 2014, 66, 3–12.
60. Nitin, M.; Sharma, B. D.; Kumar, R. R.; Pavan, K.; Prakash Malav, O.; Kumar Verma, A. Fortification of low-fat chicken meat patties with calcium, vitamin E and vitamin C. *Nutr. Food Sci.* 2015, 45, 688–702.
61. Nováková, L.; Solichová, D.; Pavlovicová, S.; Solich, P. Hydrophilic interaction liquid chromatography method for the determination of ascorbic acid. *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 1634–1644.
62. Ojeda, G. A.; Sgroppo, S. C.; Martin-Belloso, O.; Soliva Ortuny, R. Chitosan/tripolyphosphate nanoaggregates enhance the antibrowning effect of ascorbic acid on mushroom slices. *Postharvest Biol. Technol.* 2019, 156, 110934
63. Oudemans- van Straaten, H. M.; Spoelstrade Man, A. M.; de Waard, M. C. Vitamin C revisited *Crit. Care* 2014, 18, 460
64. Ozer, A.; Bruick, R. K. Nonheme dioxygenases: Cellular sensors and regulators jelly rolled in toone? *Nat. Chem. Biol.* 2007, 3, 144–153.
65. Padayatty, S. J.; Levine, M. Vitamin C: The known and the unknown and Goldilocks. *Oral. Dis.* 2016, 22, 463–493.

66. Padayatty, S. J.; Katz, A.; Wang, Y.; Eck, P.; Kwon, O.; Lee, J. H.; Chen, S.; Corpe, C.; Dutta, A.; Dutta, S. K.; et al. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.* 2003, 22, 18–35
67. Padayatty, S. J.; Levine, M. Vitamin C and myocardial infarction: The heart of the matter. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000, 71, 1027–1028.
68. Padh, H. Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 1990, 68, 1166–1173.
69. Patak, P.; Willenberg, H. S.; Bornstein, S. R. Vitamin C is an important cofactor for both adrenal cortex and adrenal medulla. *Endocr. Res.* 2004, 30, 871–875.
70. Pekala, J.; Patkowska-Sokola, B.; Bodkowski, R.; Jamroz, D.; Nowakowski, P.; Lochynski, S.; Librowski, T. L-Carnitine—Metabolic Functions and Meaning in Humans Life. *Curr. Drug Metab.* 2011, 12, 667–678.
71. Peñas, E.; Frias, J.; Sidro, B.; Vidal-Valverde, C. Chemical evaluation and sensory quality of sauerkrauts obtained by natural and induced fermentations at different NaCl levels from *Brassica oleracea* Var. capitata Cv. Bronco grown in Eastern Spain. Effect of storage. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 3549–3557.
72. Perlo, F.; Fabre, R.; Bonato, P.; Jenko, C.; Tisocco, O.; Teira, G. Refrigerated storage of pork meat sprayed with rosemary extract and ascorbic acid. *Cienc. Rural* 2018, 48.
73. Phillips, K. M.; Tarragó-Trani, M. T.; Gebhardt, S. E.; Exler, J.; Patterson, K. Y.; Haytowitz, D. B.; Pehrsson, P. R.; Holden, J. M. Stability of vitamin C in frozen raw fruit and vegetable homogenates. *J. Food Compos. Anal.* 2010, 23, 253–259.
74. Putchala, M. C.; Ramani, P.; Sherlin, H. J.; Premkumar, P.; Natesan, A. Ascorbic acid and its pro-oxidant activity as a therapy for tumours of oral cavity—A systematic review. *Arch. Oral Biol.* 2013, 58, 563–574.
75. Raghu, V.; Platel, K.; Srinivasan, K. Comparison of ascorbic acid content of *Embllica officinalis* fruits determined by different analytical methods. *J. Food Compos. Anal.* 2007, 20, 529–533.
76. Riemersma, R. A.; Carruthers, K. F.; Elton, R. A.; Fox, K. A. Vitamin C and the risk of acute myocardial infarction. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000, 71, 1181–1186
77. Rietjens, I.; Boersma, M. G.; de Haan, L.; Spenkelink, B.; Awad, H. M.; Cnubben, N.H.P.; van Zanden, J. J.; van der Woude, H.; Alink, G. M.; Koeman, J. H. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2002, 11, 321–333

78. Robertson, W. B. D-Ascorbic acid and collagen synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1963, 74, 137–139.
79. Rodrigues, R. B.; De Menezes, H. C.; Cabral, L. M. C.; Dornier, M.; Reynes, M. An Amazonian fruit with a high potential as a natural source of vitamin C: The camu-camu (*Myrciaria dubia*). *Fruits* 2001, 56, 345–354.
80. Salkić M., Keran H., Jašić M., Direct Spectrophotometric Determination of L-ascorbic Acid in the Presence of Potassium Cyanide, *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 2007, 72(4), 371-375.
81. Salkić M., Selimović A., Spektrofotometrijsko određivanje L- askorbinske kiseline u prisustvu etilendiamintetrasirćetne kiseline, limunske kiseline i dinatrijevog-hidrogenfosfata, *Technologica Acta*, 2009, 2(1), 13-18.
82. Santos, J.; Herrero, M.; Mendiola, J.; Oliva-Teles, M. T.; Ibáñez, E.; Delerue-Matos, C.; Oliveira, M. Fresh-cut aromatic herbs: Nutritional quality stability during shelf-life. *LWT* 2014, 59, 101–107.
83. Sauberlich, H. E.; Tamura, T.; Craig, C. B.; Freeberg, L. E.; Liu, T. Effects of erythorbic acid on vitamin C metabolism in young women. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996, 64, 336–346.
84. Scheffler, J.; Bork, K.; Bezold, V.; Rosenstock, P.; Gnanapragassam, V. S.; Horstkorte, R. Ascorbic acid leads to glycation and interferes with neurite outgrowth. *Exp. Gerontol.* 2019, 117, 25–30.
85. Selimović A., Salkić M., Direct spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in the presence of alanine as a stabilizer, *International Journal of Basic & Applied Sciences*, 2011, 11(02), 39-44.
86. Seok, Y. J.; Her, J. Y.; Kim, Y. G.; Kim, M. Y.; Jeong, S. Y.; Kim, M. K.; Lee, J. Y.; Kim, C. I.; Yoon, H. J.; Lee, K. G. Furan in Thermally Processed Foods—A Review. *Toxicol. Res.* 2015, 31, 241–253.
87. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. Principles of instrumental analysis. Cengage learning, 2017, 7, 746-782
88. Sheraz Ali M., Khan Fatima M., Ahmed S., Kazi Hafeez S., Ahmad I., Stability and Stabilization of Ascorbic Acid, *H&PC Today - Household and Personal Care Today*, 2015, 10(3), 22-25.
89. Shi, M. Y.; Xu, B. H.; Azakami, K.; Morikawa, T.; Watanabe, K.; Morimoto, K.; Komatsu, M.; Aoyama, K.; Takeuchi, T. Dual role of vitamin C in an oxygen-sensitive system: Discrepancy between DNA damage and cell death. *Free Radic. Res.* 2005, 39, 213–220.

90. Sotiriou, S.; Gispert, S.; Cheng, J.; Wang, Y.; Chen, A.; Hoogstraten-Miller, S.; Miller, G. F.; Kwon, O.; Levine, M.; Guttentag, S. H.; et al. Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival. *Nat. Med.* 2002, 8, 514–517.
91. Su, L. J.; Zhang, J. H.; Gomez, H.; Murugan, R.; Hong, X.; Xu, D.; Jiang, F.; Peng, Z. Y. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019, 2019, 5080843.
92. Sukalović, V. H. T.; Veljovic-Jovanovic, S.; Maksimovic, J. D.; Maksimovic, V.; Pajic, Z. Characterisation of phenol oxidase and peroxidase from maize silk. *Plant Biol.* 2010, 12, 406–413.
93. Szocs, A.; Vancea, S.; Kiss, I.; Donáth-Nagy, G. Quantification of plasma and leukocyte vitamin C by high performan celiquid chromatography with mass spectrometric detection. *J. Anal. Chem.* 2020, 75, 1168–1176.
94. Thomas C. Crawford, *Synthesis of L-Ascorbic Acid, Chemistry, Metabolism, and Uses Advances in Chemistry*; American Chemical Society: Washington, DC, 1982.
95. Tikekar, R. V.; Anantheswaran, R. C.; Laborde, L. F. Ascorbic Acid Degradation in a Model Apple Juice System and in Apple Juice during Ultraviolet Processing and Storage. *J. Food Sci.* 2015, 76, H62–H71.
96. Tomljanović M., *Instrumentalne kemijske metode I dio.*, U. G. HIJATUS, Zenica, 2000.
97. Traxer, O.; Huet, B.; Poindexter, J.; Pak, C. Y.; Pearle, M. S. Effect of ascorbic acid consumption on urinary stone risk factors. *J. Urol.* 2003, 170, 397–401.
98. Tsaloeva, M. R.; Dubtsov, G. G.; Bogdanov, A. R.; Pavlyuchkova, M. S. A vitamin-mineral premix for bakery products to be used in preventive diets. *Nutrition* 2013, 3, 29–31.
99. Ullah, M. F.; Khan, H. Y.; Zubair, H.; Shamim, U.; Hadi, S. M. The antioxidant ascorbic acid mobilizes nuclear copper leading to a prooxidant breakage of cellular DNA: Implications for chemotherapeutic action against cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2011, 67, 103–110
100. Vagiri, M.; Ekholm, A.; Öberg, E.; Johansson, E.; Andersson, S. C.; Rumpunen, K. Phenols and ascorbic acid in black currants (*Ribes nigrum* L.): Variation due to genotype, location, and year. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61, 9298–9306
101. Vandamme, E. J.; Revuelta, J. L. Industrial fermentation of vitamin C. In *Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments, and Antioxidants*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2016; pp. 161192.
102. Vasquez-Vivar, J.; Whitsett, J.; Martasek, P.; Hogg, N.; Kalyanaraman, B. Reaction of tetrahydrobiopterin with superoxide: EPR-kinetic analysis and characterization of the pteridine radical. *Free Radic. Biol. Med.* 2001, 31, 975–985.

103. Wang, J.; Law, C. L.; Mujumdar, A. S. The degradation mechanisms and kinetics of vitamin C in fruits and vegetables during thermal processing. In *Drying Technologies in Foods*; Nema, P.K., Kaur, B.P., Mujumdar, A.S., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2018; pp. 275–301.
104. Wang, X.; Li, L.; Li, Z.; Wang, J.; Fu, H.; Chen, Z. Determination of ascorbic acid in individual liver cancer cells by capillary electrophoresis with a platinum nanoparticles modified electrode. *J. Electroanal. Chem.* 2014, 712, 139–145
105. Williams, D. J.; Edwards, D.; Pun, S.; Chaliha, M.; Burren, B.; Tinggi, U.; Sultanbawa, Y. Organic acids in Kakadu plum (*Terminalia ferdinandiana*): The good (ellagic), the bad (oxalic) and the uncertain (ascorbic). *Food Res. Int.* 2016, 89, 237–244.
106. World Health Organization. *Scurvy and its Prevention and Control in Major Emergencies/Prepared by Zita Weise Prinzo*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1999.
107. Wu, F.; Tyml, K.; Wilson, J. X. Ascorbate in hibitsi NOS expression in endotoxin-and IFN gamma-stimulate dratskeletal muscle endothelial cells. *FEBS Lett.* 2002, 520, 122–126.
108. Xin Y., Kaiwen C., Hao C., Xing C., Shuai F., Yuanda S. and Liang L, Chemical Stability of Ascorbic Acid Integrated into Commercial Products: A Review on Bioactivity and Delivery Technology, *Antioxidants*, 2022, 153(11), 1-20.
109. Yang, S.; Buettner, G. R. Thermodynamic and kinetic considerations for the reaction of semiquinone radicals to form superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* 2010, 49, 919–962.
110. Yang, S.; Verhoeff, A. A.; Merx, D. W. H.; van Duynhoven, J. P. M.; Hohlbein, J. Quantitative Spatiotemporal Mapping of Lipid and Protein Oxidation in Mayonnaise. *Antioxidants* 2020, 9, 13.
111. Yin, X.; Chen, K.; Cheng, H.; Chen, X.; Feng, S.; Song, Y.; Liang, L. Chemical Stability of Ascorbic Acid Integrated into Commercial Products: A Review on Bioactivity and Delivery Technology. *Antioxidants* 2022, 11, 153.
112. Yuan, J. P.; Chen, F. Degradation of Ascorbic Acid in Aqueous Solution. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 5078-5082
113. Zaninil D., Sival M., Oliveria E., Mazalli M., Kamimura E., Maldonado R., Spectofotometric analysis of vitamin C in different matrices utilizing potassium permanganate, *European International Journal of Science and Technology*, 2018, 7(1), 70-84.
114. Zaporozhets O. A., Krushinskaya E. A., Determination of ascorbic acid by molecular spectroscopic Techniques, *Journal of analytical chemistry*, 2002, 57(4), 286-297.

115. Zheng, J.; Yang, B.; Tuomasjukka, S.; Ou, S.; Kallio, H. Effects of latitude and weather conditions on contents of sugars, fruit acids, and ascorbic acid in black currant (*Ribes nigrum* L.) juice. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 2977–2987
116. Zhou, H. B.; Huang, X. Y.; Bi, Z.; Hu, Y. H.; Wang, F. Q.; Wang, X. X.; Wang, Y. Z.; Lu, Z. Q. Vitamin A with L-ascorbic acid sodium salt improves the growth performance, immune function and antioxidant capacity of weaned pigs. *Animal* 2021, 15, 7113.
117. Zilva, S. S. The behaviour of l-ascorbic acid and chemically related compounds in the animal body. The influence of generalised ether anaesthesia on their urinary excretion. *Biochem. J.* 1935, 29, 2366–2368