

Kvalitativno i kvantitativno određivanje askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline pomoću UHPLC-MS/MS

Zelić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:456644>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-27**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE
ASKORBINSKE I DEHIDROASKORBINSKE KISELINE
POMOĆU UHPLC-MS/MS

DIPLOMSKI RAD

PETRA ZELIĆ

Matični broj: 193

Split, listopad 2024.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE
ASKORBINSKE I DEHIDROASKORBINSKE KISELINE
POMOĆU UHPLC-MS/MS

DIPLOMSKI RAD

PETRA ZELIĆ

Matični broj: 193

Split, listopad 2024.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

**QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION
OF ASCORBIC AND DEHYDROASCORBIC ACID USING
UHPLC-MS/MS**

DIPLOMA THESIS

PETRA ZELIĆ

Parent number: 193

Split, October 2024.

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet

Diplomski studij kemije – Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Mentor: izv. prof. dr. sc. Franko Burčul

KVALITATIVNO I KVANTITATIVNO ODREĐIVANJE ASKORBINSKE I DEHIDROASKORBINSKE KISELINE POMOĆU UHPLC-MS/MS

Petra Zelić, 193

Sažetak:

Askorbinska kiselina ili vitamin C je jedan od najvažnijih i najpoznatijih vitamina neophodan za pravilno funkcioniranje ljudskog organizma te je poznati antioksidans. U izradi ovog diplomskog rada razvijena je metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje askorbinske kiseline (AA) te dehidroaskorbinske kiseline (DHA) kao njenog oksidacijskog produkta, a oba spoja se smatraju vitaminom C. U tu svrhu je korištena tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti povezana s detektorom masa s trostrukim kvadrupolom u negativnom načinu, snimanjem specifičnih prijelaza.

Pritom su optimizirani po jedan kvantitativni i jedan kvalitativni prijelaz, redom, 175 → 115 m/z, 175 → 87 m/z za AA i 173 → 143 m/z, 173 → 71 m/z za DHA. Kao pokretna faza korištena je 0,1 % vodena otopina octene kiseline, dok je odjeljivanje učinjeno pomoću C18 kromatografske kolone pri temperaturi od 20 °C i protoku od 0,7 mL/min. Spektrometar masa je korišten s elektrosprej ionizacijom, temperature ionizatora 350 °C i napona kapilare -3600 V. Konstruirana krivulja umjeravanja je podijeljena u dva koncentracijska raspona od 0,5 µg/mL do 5,0 µg/mL te od 10 µg/mL do 50 µg/mL. Granice dokazivanja i određivanja su izračunane i omjera signala i šuma, i redom iznose, 2,1 ng/mL; 7,2 ng/mL za AA i 18,7 ng/mL; 62,3 ng/mL za DHA. Vrednovanjem točnosti, preciznosti, robusnosti metode te prikladnosti sustava i stabilnosti otopina radnog standarda (koja značajno opada tijekom 24 sata) potvrđena je prikladnost iste pri kvalitativnom i kvantitativnom određivanju AA i DHA.

Ključne riječi: vitamin C, askorbinska kiselina, dehidroaskorbinska kiselina, UHPLC-MS/MS, trostruki kvadrupol, vrednovanje

Rad sadrži: 70 stranica, 41 sliku, 22 tablice, 5 priloga, 32 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Mario Nikola Mužek	predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Lea Kukoč Modun	član
3. izv. prof. dr. sc. Franko Burčul	mentor

Datum obrane: 29. listopada 2024.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology

Master study of Chemistry – Organic Chemistry and Biochemistry

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

Mentor: Asst. Prof. Franko Burčul, PhD

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF ASCORBIC AND DEHYDROASCORBIC ACID USING UHPLC-MS/MS

Petra Zelić, 193

Abstract:

Ascorbic acid or vitamin C is one of the most important and well-known vitamins essential for proper functioning of the human body and it is a known antioxidant. In this thesis, a method was developed for qualitative and quantitative determination of ascorbic acid (AA) and dehydroascorbic acid (DHA) as its oxidation product; both compounds are considered as vitamin C. For this purpose, ultra-high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass detector was used in negative mode, by recording specific transitions.

One quantitative and one qualitative transition were optimized, respectively, $175 \rightarrow 115$ m/z, $175 \rightarrow 87$ m/z for AA and $173 \rightarrow 143$ m/z, $173 \rightarrow 71$ m/z for DHA. A 0.1% aqueous solution of acetic acid was used as the mobile phase, while separation was performed using a C18 chromatographic column at a temperature of 20°C and a flow rate of 0.7 mL/min. Mass spectrometry was used with electrospray ionization, ionizer temperature of 350°C and capillary voltage of -3600 V. The calibration curve was divided into two concentration ranges, from 0.5 µg/mL to 5.0 µg/mL and from 10 µg/mL to 50 µg/mL. The limits of detection and quantification were calculated from the signal-to-noise ratio and are respectively 2.1 ng/mL; 7.2 ng/mL for AA and 18.7 ng/mL; 62.3 ng/mL for DHA. By validating the accuracy, precision, and method robustness, as well as system suitability and stability of working standard solutions (which significantly decreases over 24 hours), the method's suitability for qualitative and quantitative determination of AA and DHA was confirmed.

Keywords: vitamin C, ascorbic acid, dehydroascorbic acid, UHPLC-MS/MS, triple quadrupole, validation

Thesis contains: 70 pages, 41 figures, 22 tables, 5 supplements, 32 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of diploma thesis:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Asst. Prof. Mario Nikola Mužek, PhD | chair person |
| 2. Asst. Prof. Lea Kukoč Modun, PhD | member |
| 3. Asst. Prof. Franko Burčul, PhD | supervisor |

Defence date: October 29, 2024.

Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Franka Burčula i neposrednim vodstvom Ane Vučak, mag. chem. u razdoblju od travnja do listopada 2024. godine.

Dio opreme korištene u ovom radu financiran je iz projekta EU „Funkcionalna integracija Sveučilišta u Splitu, PMF-ST, PFST te KTF-ST kroz razvoj znanstveno-istraživačke infrastrukture u Zgradi tri fakulteta“, KK. 01.1.1.02.0018"

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak diplomskog rada je razvijanje metode za odjeljivanje te kvalitativno i kvantitativno određivanje askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline uz pomoć spregnute tehnike tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti-spektrometrija masa s trostrukim kvadrupolom.

Razvoj i optimizacija analitičke metode sadržava:

- Snimanje spektara masa i UV-Vis spektara askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline
- Odabir početnih iona najvećeg signala, odnosno najvećeg odziva na detektoru te praćenje specifičnih reakcija fragmentacije pri različitim energijama sraza s inertnim plinom
- Odabir optimalnih parametara rada spektrometra masa
- Odabir optimalnih parametara rada tekućinskog kromatografa

Vrednovanje analitičke metode sadržava:

- Određivanje najpogodnijeg koncentracijskog raspona otopina i linearnosti metode, odnosno izradu krivulja umjeravanja
- Ispitivanje točnosti, ponovljivosti, srednje preciznosti i robusnosti metode promjenom brzine protoka pokretne faze te promjenom temperature kolone
- Ispitivanje prikladnosti sustava analizom ponovljivosti injektiranja te određivanje selektivnosti metode i stabilnosti standarda
- Određivanje linearnog dinamičkog područja te računanje granica dokazivanja i granica određivanja
- Analizu realnog uzorka

SAŽETAK

Askorbinska kiselina ili vitamin C je jedan od najvažnijih i najpoznatijih vitamina neophodan za pravilno funkcioniranje ljudskog organizma te je poznati antioksidans. U izradi ovog diplomskog rada razvijena je metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje askorbinske kiseline (AA) te dehidroaskorbinske kiseline (DHA) kao njenog oksidacijskog produkta, a oba spoja se smatraju vitaminom C. U tu svrhu je korištena tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti povezana s detektorom masa s trostrukim kvadrupolom u negativnom načinu, snimanjem specifičnih prijelaza.

Pritom su optimizirani po jedan kvantitativni i jedan kvalitativni prijelaz, redom, 175 → 115 m/z, 175 → 87 m/z za AA i 173 → 143 m/z, 173 → 71 m/z za DHA. Kao pokretna faza korištena je 0,1 % vodena otopina octene kiseline, dok je odjeljivanje učinjeno pomoću C18 kromatografske kolone pri temperaturi od 20 °C i protoku od 0,7 mL/min. Spektrometar masa je korišten s elektrosprej ionizacijom, temperature ionizatora 350 °C i napona kapilare -3600 V. Konstruirana krivulja umjeravanja je podijeljena u dva koncentracijska raspona od 0,5 µg/mL do 5,0 µg/mL te od 10 µg/mL do 50 µg/mL. Granice dokazivanja i određivanja su izračunane i omjera signala i šuma, i redom iznose, 2,1 ng/mL; 7,2 ng/mL za AA i 18,7 ng/mL; 62,3 ng/mL za DHA. Vrednovanjem točnosti, preciznosti, robusnosti metode te prikladnosti sustava i stabilnosti otopina radnog standarda (koja značajno opada tijekom 24 sata) potvrđena je prikladnost iste pri kvalitativnom i kvantitativnom određivanju AA i DHA.

Ključne riječi: vitamin C, askorbinska kiselina, dehidroaskorbinska kiselina, UHPLC-MS/MS, trostruki kvadrupol, vrednovanje

Abstract

Ascorbic acid or vitamin C is one of the most important and well-known vitamins essential for proper functioning of the human body and it is a known antioxidant. In this thesis, a method was developed for qualitative and quantitative determination of ascorbic acid (AA) and dehydroascorbic acid (DHA) as its oxidation product; both compounds are considered as vitamin C. For this purpose, ultra-high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass detector was used in negative mode, by recording specific transitions.

One quantitative and one qualitative transition were optimized, respectively, $175 \rightarrow 115$ m/z, $175 \rightarrow 87$ m/z for AA and $173 \rightarrow 143$ m/z, $173 \rightarrow 71$ m/z for DHA. A 0.1% aqueous solution of acetic acid was used as the mobile phase, while separation was performed using a C18 chromatographic column at a temperature of 20°C and a flow rate of 0.7 mL/min. Mass spectrometry was used with electrospray ionization, ionizer temperature of 350°C and capillary voltage of -3600 V. The calibration curve was divided into two concentration ranges, from 0.5 µg/mL to 5.0 µg/mL and from 10 µg/mL to 50 µg/mL. The limits of detection and quantification were calculated from the signal-to-noise ratio and are respectively 2.1 ng/mL; 7.2 ng/mL for AA and 18.7 ng/mL; 62.3 ng/mL for DHA. By validating the accuracy, precision, and method robustness, as well as system suitability and stability of working standard solutions (which significantly decreases over 24 hours), the method's suitability for qualitative and quantitative determination of AA and DHA was confirmed.

Keywords: vitamin C, ascorbic acid, dehydroascorbic acid, UHPLC-MS/MS, triple quadrupole, validation

Sadržaj

UVOD	2
1. OPĆI DIO	4
1.1. Vitamin C.....	4
1.1.1. Askorbinska kiselina (AA).....	7
1.1.2. Dehidroaskorbinska kiselina (DHAA).....	9
1.2. Kromatografija.....	11
1.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	12
1.2.2. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UHPLC)	14
1.3. Spektrometrija masa (MS).....	15
1.3.1. Ionski izvori.....	16
1.3.2. Analizator masa.....	17
1.3.3. Tandemska spektrometrija masa (MS/MS)	18
1.4. Vrednovanje metoda	19
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	21
2.1. Korištena oprema, kemikalije i instrumentacija	21
2.1.1. Korištene kemikalije	21
2.1.2. Korištena oprema	23
2.2. Priprema otopina.....	25
2.2.1. Odabir otapala	25
2.2.2. Stabilizatori	25
2.2.3. Standardne otopine	25
2.2.4. Miksture radnih otopina	26
2.2.5. Otopine za optimizaciju MS/MS.....	26
2.2.6. Otopine pri kreiranju krivulje umjeravanja	26
2.2.7. Otopine za vrednovanje metode	27

2.3.	Optimizacija tandemске spektrometrije masa (MS/MS)	27
2.4.	Optimizacija tekućinske kromatografije (LC)	28
3.	REZULTATI I RASPRAVA	29
3.1.	Optimizacija spektrometrije masa (MS)	29
3.1.1.	Pozitivan ili negativan način rada	29
3.1.2.	Ulazni tlak plina u kolizijskoj ćeliji	31
3.1.3.	Identifikacija i kvantifikacija u svrhu odjeljivanja	32
3.1.4.	Identifikacija analita korištenjem DAD detektora	33
3.1.5.	Prijelaz ion prekursor → ion produkt	35
3.1.6.	MS/MS optimizacija	36
3.1.7.	Ostali parametri	37
3.2.	Optimizacija tekućinske kromatografije (LC)	38
3.2.1.	Vrijeme zadržavanja i način rada kromatograma	38
3.2.2.	Odabir pokretne faze	40
3.2.3.	Organski modifikator	41
3.2.4.	Odabir nepokretne faze	42
3.2.5.	Odabir optimalnog protoka	45
3.2.6.	Odabir optimalne temperature kolone	46
3.3.	Vrednovanje metode	48
3.3.1.	Raspon i linearnost	48
3.3.2.	Granica dokazivanja i granica određivanja	51
3.3.3.	Specifičnost	52
3.3.4.	Točnost	53
3.3.5.	Ponovljivost	54
3.3.6.	Srednja preciznost	55
3.3.7.	Robusnost	56
3.3.8.	Stabilnost	57

3.3.9. Prikladnost sustava – ponovljivost injektiranja.....	58
3.4. Analiza realnog uzorka.....	59
4. ZAKLJUČAK.....	61
5. POPIS KRATICA I SIMBOLA	63
6. LITERATURA.....	66
7. PRILOZI	69

UVOD

Vitamin C je vitamin od osobite važnosti za ljudsko zdravlje i život. Potrebno ga je unositi u obliku hrane jer ljudski organizam ne posjeduje enzime potrebne za sintezu vitamina C. Sudjeluje u važnim biokemijskim mehanizmima kao što su imunološke reakcije obrane od upalnih procesa u tijelu, apsorpciji željeza te pomaže u radu organa kao što su pluća. Stimulira sintezu kolagena i karnitina te nekih hormona. Ima prepoznato antioksidativno djelovanje protiv stvaranja slobodnih radikala *in vivo* i *in vitro* sprječavajući tako reakcije oksidacije stanice te se koristi i kao aditiv u hrani u svrhu produženja valjanosti proizvoda. Pojam vitamina C se ne odnosi samo na askorbinsku kiselinu već uključuje i ostale spojeve koji pokazuju biološku aktivnost askorbinske kiseline. Najvažniji oksidirani oblik askorbinske kiseline je dehidroaskorbinska kiselina koja uz askorbinsku kiselinu predstavlja analit od interesa. Pri optimalnim oksidativnim uvjetima, askorbinska kiselina se lako pretvara u dehidroaskorbinsku kiselinu. Dehidroaskorbinska kiselina je prilično nestabilna te se dalje razgrađuje na 2,3-diketoglukonsku kiselinu koja nema biološku aktivnost kao vitamin C. Vitamin C pokazuje stanovitu nestabilnost u otopinama, a intenzitet nestabilnosti ovisi o vrsti otapala i faktorima okoline kao što su pH, temperatura te izlaganje svjetlosti. Prethodna istraživanja su pokazala kako je dehidroaskorbinska kiselina reaktivnija i stabilnija od askorbinske te kako je reakcija oksidacije askorbinske kiseline odgovorna za većinu poznatih učinaka vitamina C. Askorbinska i dehidroaskorbinska kiselina imaju podjednaku ulogu u oksidativnom stresu, a pod određenim uvjetima vitamin C pokazuje i prooksidativni učinak. Askorbinska i dehidroaskorbinska kiselina predstavljaju iznimno važne komponente prehrane što dovodi do povećanja interesa za simultanom analizom istih imajući na umu da se zdravstveni aspekt kvalitete voća i povrća procjenjuje upravo prema sadržaju vitamina C.

Tekućinska kromatografija je jedna od najmoćnijih tehnika odjeljivanja današnjice, a tekućinska kromatografija visoke (HPLC) te ultravisoke djelotvornosti (UHPLC) se smatraju najboljim izborom pri odjeljivanju askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline iz smjese. Povezivanjem tekućinske kromatografije s detektorom kao što je spektrometar masa, točnije s trostrukim kvadrupolom kao analizatorom masa, obavljanje analize askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline se dodatno pospješuje.

Pri izradi diplomskog rada optimizirana je, a kasnije i vrednovana metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline te odjeljivanje istih iz

smjese uporabom tehnike tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti spregnute sa spektrometrijom masa koristeći trostruki kvadrupol kao analizator masa.

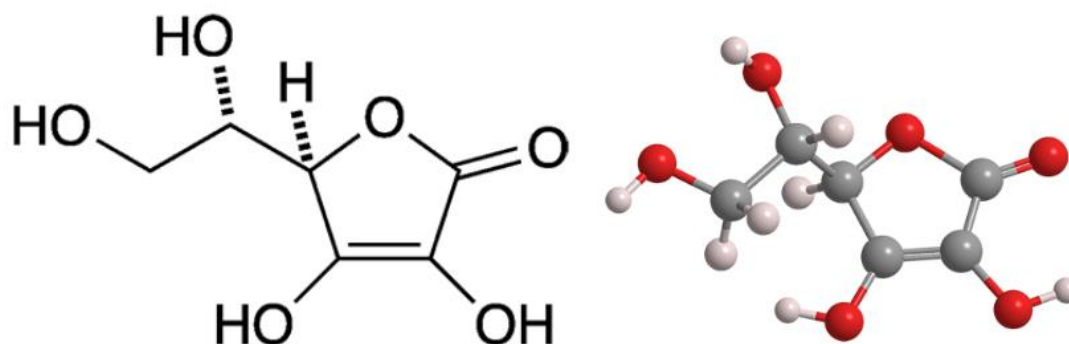
1. OPĆI DIO

1.1. Vitamin C

Vitamin C je jedan od najvažnijih i najpoznatijih vitamina te je od esencijalne važnosti za život.¹ Jedan od glavnih razloga njegove popularnosti su benefiti koje pruža za ljudsko zdravlje. Također se koristi kao aditiv u hrani zbog svojeg antioksidativnog djelovanja čime pridonosi stabilnosti proizvoda.²

Kemijski je najjednostavniji od svih vitamina te je stoga jedan od prvih izoliran i karakteriziran. U industriji ga se proizvodi više nego bilo kojeg drugog vitamina, odnosno više nego svih drugih vitamina skupa.² Znatni porast u proizvodnji vitamina C dogodio se tijekom COVID-19 pandemije kada je bio korišten za tretiranje COVID-19 pacijenata.³

Vitamin C je L-enantiomer askorbinske kiseline (AA). Prepoznatljiv je po svojem monoionu askorbatu koji posjeduje svojstva kiseline i baze. Pod pojam vitamina C također spada i prvi oksidacijski produkt L-askorbinske kiseline, dehidroaskorbinska kiselina (DHAA).^{4,5} Na sobnoj temperaturi je svjetlo žuti kristalni prah, gotovo bez mirisa i kiselog okusa. Pokazuje dobru topljivost u vodi (100 mg/mL) te time spada u vitamine topljive u vodi. Dok je u slabo polarnim i nepolarnim otapalima, poput etera i ulja netopljiv.³ Struktura ovog vitamina otkrivena je 1960-tih pomoću X-zraka i neutronske difrakcije.⁴



Slika 1. Struktura L-askorbinske kiseline⁶

Unatoč strukturnoj jednostavnosti ove molekule, njezina biokemijska svojstva su složena za proučavanje radi složenosti njezinih redoks procesa. No, upravo iz tih razloga postoji veliki interes za primjenom vitamina C kao redukcijskog sredstva u anorganskim sustavima.

Provedena su mnogobrojna istraživanja o reakcijama askorbinske kiseline i metalnih iona u različitim otopinama. Kod koordinacijske kemije vitamina C dolazi do problema radi niskih konstanti stabilnosti molekule te otežanog procesa kristalizacije kompleksa.⁴

Kako sisavci nemaju sposobnost sinteze vitamina C zbog nedostatka biosinteznog enzima potrebno je osigurati dovoljan unos kako ne bi došlo do pojave skorbuta. Postoji širok spektar voća i povrća koji služe kao izvor vitamina C poput citrusa (naranča, limun), rajčice, kupusa i krumpira koji su njime bogati te su neki od njih navedeni u tablici 1. Sintetski proizvedeni vitamin C koji konzumiramo u obliku suplemenata ima istu funkciju i biodostupnost kao i onaj dobiven iz hrane. Unutar suplemenata može ga se naći u različitim strukturama poput askorbinske kiseline, kalcijevog askorbata, natrijevog askorbata, askorbinske kiseline s bioflavonodima i dr. Također se nalazi u različitim oblicima poput praha, tvrdih gumenih tableta, tekućine te gumenih bombona kako bi se zadovoljile preferencije potrošača.³

Tablica 1. Tip hrane i koncentracija vitamina C³

Naziv	Lat.naziv	Vitamin C (mg/100 g)
Grejp	<i>Citrus x paradisi</i>	39,4
Limun	<i>Citrus limon</i>	53
Limeta	<i>Citrus x aurantiifolia</i>	29,1
Naranča	<i>Citrus sinensis</i>	59
Peršin	<i>Petroselinum crispum</i>	133
Jagoda	<i>Fragaria x ananassa</i>	59
Rajčica	<i>Solanum lycopersicum</i>	17,8

Sudjeluje u nekolicini biokemijskih mehanizama poput imunološkog odgovora, funkciji pluća, adsorpciji raznih komponenti poput lijekova i metala (najpoznatije željeza).^{1,3} Stimulira sintezu kolagena i karnitina te nekih hormona.⁷ Pospješuje depigmentaciju kože inhibirajući sintezu

melanina i njegovih intermedijera koji spadaju u skupinu slobodnih radikala. Stoga se često koristi u tretiranju hiperpigmentacije.³

Služi kao regulator u sintezi kolagena koji je količinski najučestaliji protein u životinja (kod ljudi čini 30 % proteina tijela). Konzumacijom vitamina C u obliku suplementa povećava produkciju kolagena, a distribucija kolagena ovisi o prisutnosti, odnosno odsutnosti vitamina C.^{8,9}

Vitamin C je vodotopljiv antioksidans kojega pronalazimo u izvanstaničnoj tekućini i citosolu stanice, gdje se odvijaju razne funkcije imunološke homeostaze. To predstavlja područje stanice bogato leukocitima čija se količina tijekom infekcije ili stresa smanjuje tijekom njihovog obrambenog djelovanja. Smanjenja koncentracija vitamina C je povezana sa slabijim djelovanjem leukocita.¹⁰

U slučaju deficita vitamina C u organizmu kroz duži period dolazi do pojave skorbuta. Njegovi simptomi uključuju rasklimane zube, potkožno krvarenje i krvarenje desni. Popratni simptomi su umor, bolovi u zglobovima, anemija, oticanje nogu, a nedovoljna konzumacija vitamina C također može utjecati na stanje kože. Dolazi do sporijeg zacjeljenja rana i zadebljanja rožnatog sloja kože. Također može uzrokovati pojavu visokog tlaka, kardiovaskularnih bolesti, srčanog udara i sl.³

Vitamin C se u kozmetici često nalazi u obliku seruma te služi poboljšanju hidratacije, smanjenju crvenila, ujednačavanju tena kože, sprječavanju nastanka bora, ubrza zacjeljivanje rana te smanjenju podočnjaka.³

Sportaši ga često konzumiraju u obliku suplementa nakon intenzivnih treninga kako bi ubrzali oporavak mišića. Naime, istraživanja pokazuju da unosom 1000 mg vitamina C dnevno kroz period od nekoliko tjedana dolazi do bržeg oporavka mišićne mase te smanjene pojave mišićne upale kod muške populacije nakon trčanja u trajanju od 90 minuta. Druga istraživanja pokazuju da uzimanjem visoke koncentracije vitamina C dolazi do poboljšane tjelesne izvedbe tokom treninga te smanjenja oksidativnog stresa.^{3,11}

Ima široku primjenu u prehrambenoj industriji zbog dobrobiti za zdravlje te se stoga često nalazi u proizvodima poput žitnih pahuljica, voćnih sokova, sušenog mesa itd. Također ima ulogu konzervansa zbog čega se dodaje prehrambenim proizvodima poput džemova, kruha, sušenog mesa. Sprječava promjenu boje hrane inhibirajući oksidaciju lipida čime se održava stabilnost postojeće boje.³

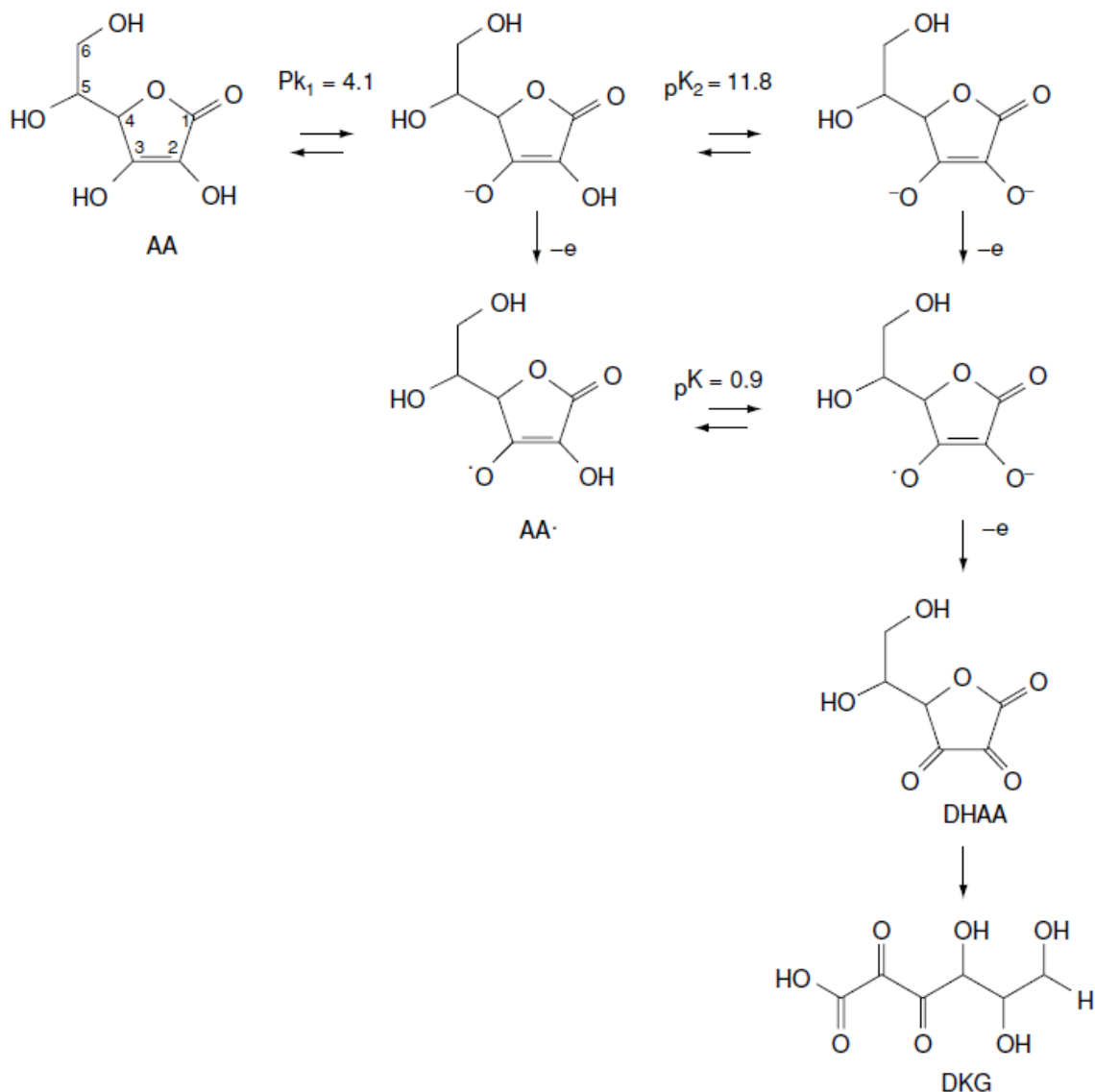
1.1.1. Askorbinska kiselina (AA)

Prema IUPAC-u naziv L-askorbinske kiseline je (2R)-2-[(1S)-1,2-dihidroksietil]-3,4-dihidroksi-2H-furan-5-on.¹² Ima gotovo planarnu peteročlanu prstenastu strukturu s dva kiralna centra. Osim što pospješuje oksidativno-redukcijske reakcije, ima relativno stabilne intermedijere koji su slobodni radikali. Konstante brzina nastajanja askorbat radikala su visoke, odnosno reakcija nastajanja radikala je brza. Proces raspada nastalih radikala je relativno spor te se odvija putem disproporcioniranja. Sposobnost nastajanja slobodnih radikala može znatno usporiti ili spriječiti oksidacije inicirane radikalima. Askorbinska kiselina reagira s reaktivnim kisikovim i dušikovim spojevima poput superoksid radikal aniona, hidroperoksilnog radikala, peroksinitrita te nitroksilnih radikal aniona.¹³

Askorbinska kiselina se često povezuje sa zaštitom lipida, DNA i proteina od oksidativnog stresa. Primjerice, kada peroksi radikali nastanu u plazmi, askorbinska kiselina će najviše reagirati s njima od svih prisutnih antioksidansa. Askorbinska kiselina je 103 puta više reaktivna od višestruko nezasićenih masnih kiselina u reakcijama s peroksi radikalima.¹³

Pri oksidativno povoljnim uvjetima dolazi do reverzibilnog procesa oksidacije askorbinske kiseline (AA) u dehidroaskorbinsku (DHAA). DHAA je poprilično nestabilna te pri oksidativnim uvjetima dolazi do daljnje ireverzibilne razgradnje u 2,3-diketoglukonsku kiselinu (DKG) pri čemu dolazi do otvaranja laktonskog prstena DHAA čime dolazi do gubitka aktivnosti vitamina C te time i antioksidativnih svojstava. Navedeni reakcijski put oksidacije askorbinske kiseline preko dehidroaskorbinske kiseline do 2,3-diketoglukonske kiseline prikazan je na slici 2. AA je oblik vitamina C koji se nalazi u znatno većoj koncentraciji od DHAA u biološkim sustavima.^{1,14}

Askorbinska kiselina (AA) i dehidroaskorbinska kiselina (DHAA) predstavljaju vitamin C te se koncentracija istoga mjeri kao zbroj koncentracija AA i DHAA.⁷ Određivanje količine vitamina C zasnovano je na odvajanju kiselina od ostalih tvari što se obavlja separacijskim tehnikama. Najbolja separacijska tehnika je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) te tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UHPLC).¹⁵



Slika 2. Reakcijski put oksidacije askorbinske kiseline, AA do 2,3-diketoglukonske kiseline (DKG)¹⁴

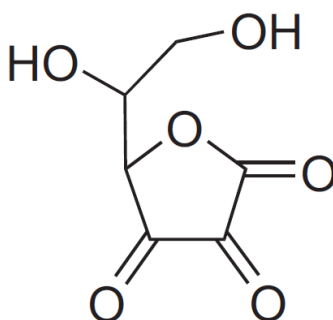
Kiselost askorbinske kiseline je uzrokovana niskim pK_a protona na kisiku-3. Nije naročito stabilna u vodenom mediju, a pri visokim pH vrijednostima (> 10,0) dolazi do raspada unutar nekoliko sati ili čak nekoliko minuta. Askorbinska kiselina je stabilna u krvi (dan ili više), pri pH vrijednostima nižim od 3,0, ili pri temperaturi nižoj od -20 °C (stabilnost se mjeri u tjednima ili čak mjesecima).¹³ Fizikalna i kemijska svojstva askorbinske kiseline prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Fizikalna i kemijska svojstva askorbinske kiseline¹⁴

Formula	C ₆ H ₈ O ₆
Molarna masa (g/mol)	176,13
Točka taljenja (°C)	190 – 192
pH	3
pK ₁	4,17
pK ₂	11,57
Topljivost: Voda	1 g/3 mL
Alkohol	1 g/30 mL

1.1.2. Dehidroaskorbinska kiselina (DHAA)

Dehidroaskorbinska kiselina (DHAA) je oksidacijski produkt askorbinske kiseline koji je nestabilan pri fiziološkim pH vrijednostima te spontano i potpomognut enzimima prelazi u 2,3-diketoglukonski kiselinu (DKG).¹⁶ Može postojati u nekoliko oblika poput hidratiziranog poluketala koji ima strukturu sličnu glukozi te se stoga u tijelu prenosi putem glukoznih transporta.¹⁵



Slika 2. Struktura dehidroaskorbinske kiseline¹⁶

U sustavima koji su lagano kiseli ili neutralni ne dolazi do ionizacije dehidroaskorbinske kiseline te je lagano hidrofobna zbog čega lakše penetrira u membrane stanica od askorbinske kiseline. Reagira s nekolicinom aminokiselina dajući smeđi proizvod koji pridonosi kvarenju hrane.¹⁶

Količina vitamina C s vremenom u hrani znatno opada. Askorbinska kiselina je podložna oksidaciji do DHAA koja se dalje brzo i ireverzibilno oksidira do DKG pri neutralnom pH. Ove reakcije se odvijaju u prisutnosti kisika, tragova metala te su ubrzane povećanjem topline i u neutralnim, tj. lužnatim pH vrijednostima sustava. Dakle, dolazi do znatnog smanjenja količine vitamina C u hrani s vremenom skladištenja te kuhanjem. Tako npr. krumpir kroz pet mjeseci od berbe izgubi 50 % vitamina C. Dok tijekom kuhanja dolazi do još istaknutijeg pada. Alternativno, metode kraće termičke obrade mogu smanjiti gubitak vitamina C te tako da se sustav kuhanja zakiseli kako bi se stabilizirala DHAA.¹⁶

Askorbinska kiselina i dehidroaskorbinska kiselina u biološkim sustavima su u ravnoteži. Za razliku od AA, ne postoji precizan način mjerenja DHAA jer ne postoji način direktne analize DHAA u biološkim sustavima. Najčešće DHAA se određuje indirektno redukcijom uzorka u svrhu određivanja AA + DHAA. Stoga se provode daljnja istraživanja u svrhu razlikovanja količine DHAA od AA u biološkim sustavima. Jedan od njih je analiza uzoraka pomoću visokodjelotvorne tekućinske kromatografije potpomognute spektrometrom masa (HPLC/MS).¹⁵ Fizikalna i kemijska svojstva dehidroaskorbinske kiseline prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Fizikalna i kemijska svojstva dehidroaskorbinske kiseline³¹

Formula	$C_6H_6O_6$
Molarna masa (<i>g/mol</i>)	174.11
Točka taljenja ($^{\circ}C$)	228
pH	3-4
pK_a	3.90
Topljivost: Voda	190 g/L
DMSO	10 mg/mL

1.2. Kromatografija

Kromatografija (grč. *chroma* – boja, grč. *graphein* – pisati) je fizikalna metoda odjeljivanja komponenti uzorka temeljena na njihovoj različitoj raspodjeli između nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) faze.^{18,19}

Otkrio ju je ruski botaničar Mihail Semjonovič Cvet koji ju je primjenjivao za separaciju biljnih pigmenta poput klorofila i ksantofila. Koristio je staklenu kolonu ispunjenu kalcijevim karbonatom (nepokretna faza) kroz koju bi prolazila otopina uzorka (pokretna faza) te bi došlo do vizualno primjetnog razdvajanja komponenti u obliku različito obojenih vrpca.¹⁹

Kromatografija obuhvaća raznoliku grupu tehnika koje omogućuju separaciju i identifikaciju blisko povezanih komponenti kompleksnih mješavina (mnoge od ovih separacija nisu moguće bilo kojom drugom metodom). Kod svih kromatografskih metoda uzorak se nalazi otopljen unutar pokretne faze (tekućina, plin ili superkritični fluid). Takva pokretna faza se propušta kroz nepokretnu fazu koja je fiksirana unutar kolone ili na krutoj podlozi. Pokretna i nepokretna faza se biraju prema komponentama koje se želi razdvojiti, odnosno uzimaju se one faze koje osiguravaju separaciju komponenti između dvaju faza. Dolazi do različite raspodjele komponenti zbog različitosti otpora nepokretne faze kretanju zasebnih komponenti pokretne faze. Što je kretanje teže to će se ta komponenta duže zadržati unutar kolone. Dolazi do razdvajanja komponenti te nastanka vrpca koje se potom kvalitativno i kvantitativno analiziraju.¹⁹

Kromatografske tehnike podijeljene su u dvije kategorije:

- ovisno o načinu uspostave kontakta između nepokretne i pokretne faze:
 - kromatografija u koloni – pokretačka sila je tlak
 - plošna kromatografija – pokretačka sila je gravitacija ili kapilarnost
- ovisno o tipu pokretne i nepokretne faze te njihovoj ravnoteži:
 - tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography*, LC)
 - plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC)
 - fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima (engl. *supercritical fluid chromatography*, SFC)¹⁹

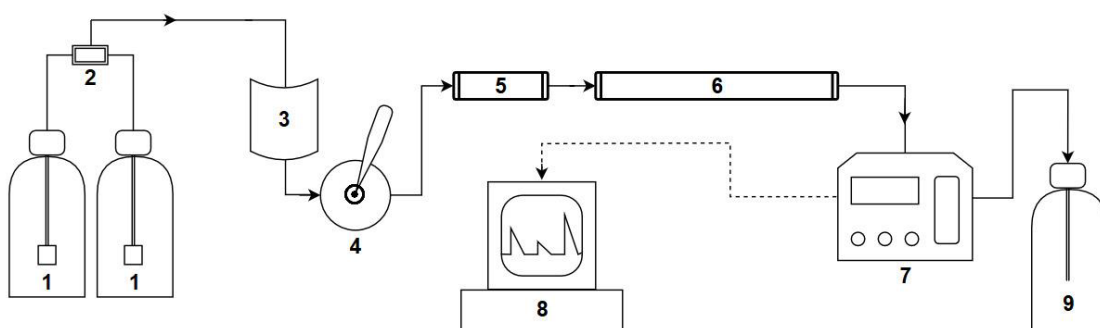
Kromatogram daje pojedinačnu kvalitativnu informaciju o svakoj vrsti unutar uzorka: vrijeme zadržavanja ili poziciju na nepokretnoj fazi nakon određenog vremena eluiranja. Dodatne

informacije mogu se iščitati uključujući različite nepokretne i pokretne faze te različite temperature eluiranja. No, i dalje znatno manje informacija u usporedbi s NMR, IR, ili spektrom masa. To ne znači da kromatografija nema važnu kvalitativnu primjenu. Koristi se u raznim granama znanosti za određivanje prisutnosti, tj. odsutnosti određenih komponenti. Također treba naglasiti da kromatografija možda neće uspješno identificirati prisutnost određene komponente u uzorku, ali generalno daje siguran dokaz odsutnosti određene vrste. Dakle, ako ne dolazi do nastanka signala u standardnom vremenu zadržavanja komponente, komponenta ili nije u uzorku ili joj je koncentracija ispod granice dokazivanja.¹⁹

1.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography*, HPLC) je izvedba kolonske tekućinske kromatografije s najširokom primjenom. Znanstvenici ju primjenjuju za separaciju i identifikaciju raznih organskih, anorganskih i bioloških materijala.^{19,20}

Na početku razvoja tekućinske kromatografije (engl. *liquid chromatography*, LC) znanstvenici su primijetili znatno povećanje efektivnosti kolone smanjenjem veličine čestica nepokretne faze. 1960-tih godina razvijena je tehnologija koja može koristiti čestice promjera 3 - 10 μm . Nastala tehnologija zahtijevala je korištenje sofisticiranih instrumenata pri visokom tlaku radi ubrzavanja provedbe analize, odnosno postizanja zadovoljavajuće brzine protoka pokretne faze. Danas gotovo sva tekućinska kromatografija koristi tlak kao pokretačku silu pokretne faze te se LC i HPLC često koriste kao istoiznačnice.^{19,20}



Slika 3. Shematski prikaz HPLC uređaja: spremnici pokretne faze (1); otplinjavač (2); crpka (3); injektor (4); pretkolona (5); kolona (6); detektor (7); računalo (8); spremnik otpada (9)²⁰

Razlog popularnosti leži u visokoj osjetljivosti, fleksibilnosti, jednostavnosti automatizacije, mogućnosti separacije nehlapljivih i termički osjetljivih vrsti te mogućnosti primjene na komponente bitne u industriji, mnogim područjima znanosti te javnosti. (npr. proteini, nukleinske kiseline, lijekovi, pesticidi, antibiotici, steroidi itd.).²⁰

Pokretna faza mora biti čista, bez otopljenih plinova i mehaničkih nečistoća. Stoga prije ulaska u kolonu nalaze se mikroporozni filter i otplinjavač koji pomoću inertnih plinova uklanjaju otopljene plinove. Na samu brzinu protoka pokretne faze može se utjecati pomoću crpke. Protok može biti izokratan (sastav je tijekom cijelog mjerenja isti) ili gradijentan (sastav se mijenja s vremenom). Injektor služi za unos uzorka unutar pokretne faze. Postoje različite izvedbe injektora, ali najčešći je automatski čime se smanjuje pogreška kod unosa uzorka. Tako injektirani uzorak u obliku pokretne faze ulazi u kolonu gdje dolazi do separacije komponenti zbog različitih interakcija (afiniteta) sa nepokretnom fazom. U svrhu produženja životnog vijeka kolone ispred nje može se postaviti pretkolona koja služi kao dodatna zaštita kolone od mogućih preostalih nečistoća. Generalno se koristi vrlo sitno punilo za kolone kako bi se smanjila potrošnja pokretne faze. Prolaskom pokretne faze dolazi do separacije komponenti koje potom dolaze do detektora koji potom šalje signal do računala gdje se dobije rezultat mjerenja, odnosno kromatogram (ovisnost koncentracije komponente o vremenu eluiranja ili volumenu).^{19,20}

Ne postoji univerzalni LC detektor, nego se koristi onaj koji je najprikladniji ovisno o vrsti od interesa. Idealni detektor je inertan, osjetljiv i ponovljiv te će davati odziv u što kraćem vremenu neovisno o brzini prolaska pokretne faze, biti će jednostavan za upotrebu te prikladan za korištenje s različitim otapalima.^{19,21} Tako se koriste infracrveni apsorpcijski detektori poput Fourierove transformacije infracrvene spektroskopije (engl. *Fourier Transform Infrared*, FTIR), detektori raspršenja svjetlosti u uparenom uzorku (engl. *Evaporative Light-Scattering Detector*, ELSD), detektori indeksa loma (engl. *Refractive Indeks Detector*, RID), spektrometar masa (engl. *Mass Spectrometer*, MS).^{19,20}

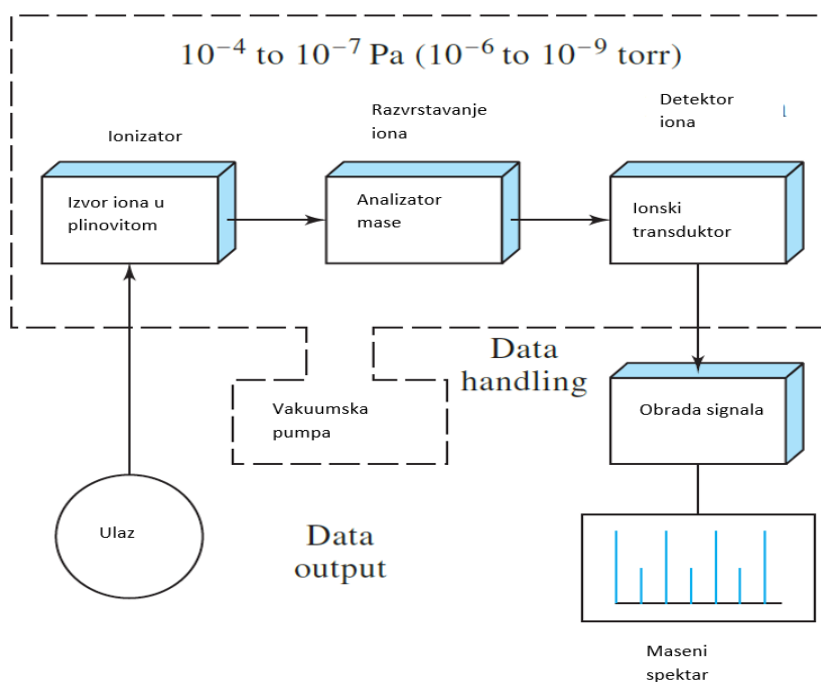
1.2.2. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UHPLC)

UHPLC predstavlja inovativnu verziju HPLC-a. Promjer čestica punila kolone je manji od 2 μm čime je skraćeno vrijeme provođenja analize, postignuto bolje razdvajanje komponenti te veća osjetljivost. Primjenjuju se kolone manjih dimenzije jer što je kraći put difuzije to je brzina prolaza komponenti veća. Dok su dimenzije kolona manje, temperatura i tlak sustava su veći (do 65 °C i 10⁸ Pa). Povećanjem temperature dolazi do smanjenja viskoznosti pokretne faze što osigurava brži protok uzorka, odnosno kraće vrijeme analize.^{22,23} Također, kromatogrami dobiveni UHPLC tehnikom imaju uže pikove što rezultira nižim granicama određivanja pojedinih komponenti uzorka.²⁴

1.3. Spektrometrija masa (MS)

Spektrometrija masa (engl. *Mass spectrometry*, MS) je vjerojatno najčešće korištena tehnika analitičke kemije jer se njome mogu dobiti informacije o elementarnom sastavu uzorka; kvantitativnom i kvalitativnom sastavu kompleksnih uzoraka; strukturi i kompoziciji krutih površina; strukturi organskih, anorganskih i bioloških molekula te zastupljenost izotopa atoma unutar smjese.¹⁹

Ireverzibilna je tehnika koja je bazirana na produkciji karakterističnih iona unutar plinovite faze koji se potom razdvajaju s obzirom na omjer mase i naboja, m/z . Slika 5. prikazuje princip rada spektrometra masa. Ulaz služi za uvođenje mikro količina uzorka u izvor iona gdje dolazi do bombardiranja komponenti elektronima, fotonima, ionima ili molekulama čime dolazi do prelaska komponenti u plinovito stanje. Ionizaciju je moguće postići primjenom termalne ili električne energije.¹⁹



Slika 4. Shematski prikaz spektrometra masa¹⁹

Nastali ioni koji su obično pozitivnog naboja se ubrzavaju te ulaze u analizator mase. Analizator masa sadrži transdudktor pomoću kojega konvertira strujanje iona u električni signal. Dobiveni signal je potrebno povećati kako bi ga računalo moglo prepoznato te generirati.¹⁹

1.3.1. Ionski izvori

Kako je spektrometrija masa bazirana na formiranju iona analita, onda je i područje djelovanja i primjene ove tehnike određeno procesom ionizacije uzorka. Spektar masa određene molekulske vrste znatno ovisi o metodi ionizacije. U tablici 4. nabrojani su neki od mnogobrojnih ionskih izvora koji spadaju u tri glavne skupine: izvori plinske faze, izvori desorpcije i izvori desorpcije okoline. Kod plinske faze prvo dolazi do isparavanja pa zatim ionizacije analita. Dok kod desorpcije dolazi do direktnog prelaska krutog ili kapljevitog analita u plinovite ione. Prednost desorpcijskih izvora je mogućnost primjene kod nehlapljivih i termički nestabilnih uzoraka. Izvori desorpcije okoline imaju sposobnost ionizacije uz minimalno prethodno tretiranje uzorka. Komercijalni MS imaju dodatke koji omogućavaju zamjenu ionskih izvora.¹⁹

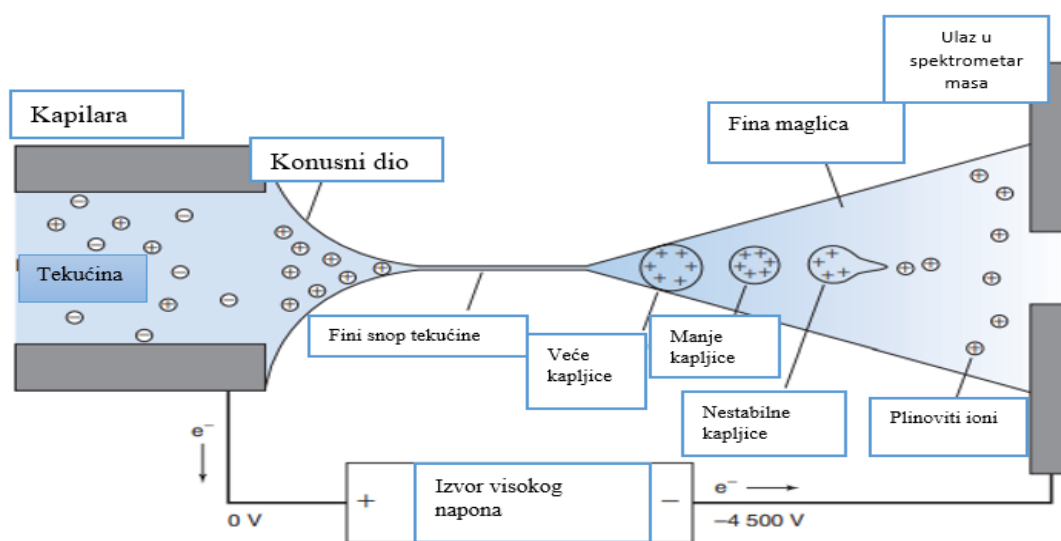
Tablica 4. Ionski izvori spektrometrije masa¹⁹

Osnovna podjela	Tip ionizacije	Način ionizacije
Plinovita faza	Ionizacija elektronima (EI) Kemijska ionizacija (CI) Ionizacija poljem (FI)	Ubrzani elektroni Reakcija s plinovitim ionima Visokonaponska elektroda
Desorpcija	Desorpcija polja (FD) Elektroaspršivanjem (ESI) Matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI) Desorpcija plazmom (PD) Bombardiranjem brzim atomima (FAB) Sekundarnim ionima (SIMS) Termoraspršivanjem (TS)	Visokonaponska elektroda Električno polje Laserski snop Fizijski fragmenti ²⁵² Cf Snop atoma Snop iona Visoka temperatura
Desorpcija okoline	Desorpcija elektroaspršenja (DESI) Direktna analiza u vremenu ((DART)	Nabijene kapljice Uzbuđeni atomi ili molekule

Izvori plinovite faze su generalno ograničeni na termalno stabilne uzorke s točkom vrenja manjom od 500 °C koji većinom imaju komponente molekularne mase manje od 1000 Da. Desorpcija i desorpcija okoline ne zahtijevaju isparavanje analita te su stoga primjenjive na molekule molekularne mase čak i od 10⁵ Da.¹⁹

Ionizacija elektroraspršenjem (engl. Electrospray Ionization, ESI)

Ionizator kao izvor ionizacije koristi električno polje. Analiti zajedno s pokretnom fazom prolaze kroz usku kapilaru na koju je primijenjen visoki napon što rezultira stvaranjem finih kapljica koje putuju prema suprotno nabijenoj elektrodi. Tijekom putovanja prema elektrodi, otapalo isparava, kapljice se posljedično smanjuju uslijed odbojnih sila te nastaju ioni u plinskoj fazi koji putuju dalje prema detektoru (slika 6). Spomenuta ionizacija elektroraspršenjem je jedna od najčešće korištenih tipova ionizacije kod tekućinske kromatografije.¹⁸

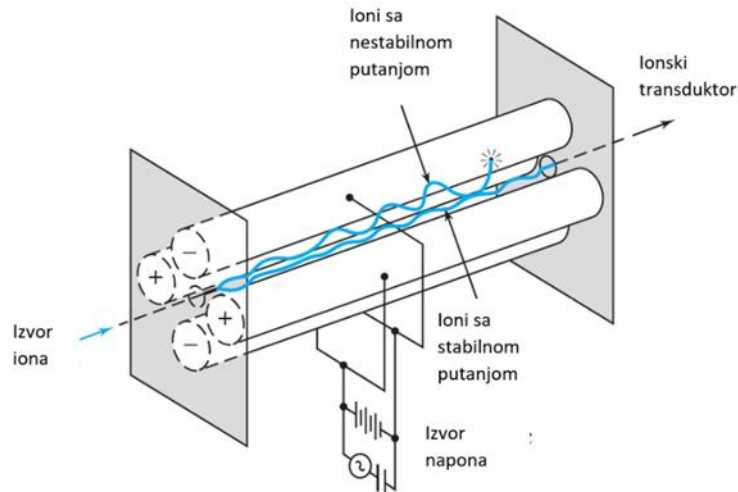


Slika 6. Shematski prikaz ionizacije elektroraspršenjem²⁸

1.3.2. Analizator masa

Analizatori masa omogućuju mjerenje omjera mase i naboja (m/z) iona analita te odjeljivanje komponenti uzorka ovisno o njemu. Analizatori masa dolaze u različitim izvedbama poput kvadrupolnog analizatora, magnetskog sektorskog analizatora, analizatora s ionskom stupicom itd.^{19,25}

Kvadrupolni analizator (engl. *Quadrupole Mass Analyzer, Q*) prikazan na slici 7. je najčešće korišteni MS kod spektrometrije masa. Manji je, jeftiniji, pokazuje veću izdržljivost od većine te je moguće dobiti cijeli spektar masa za manje od 100 ms.¹⁹



Slika 7. Shematski prikaz kvadrupolnog analizatora mase¹⁹

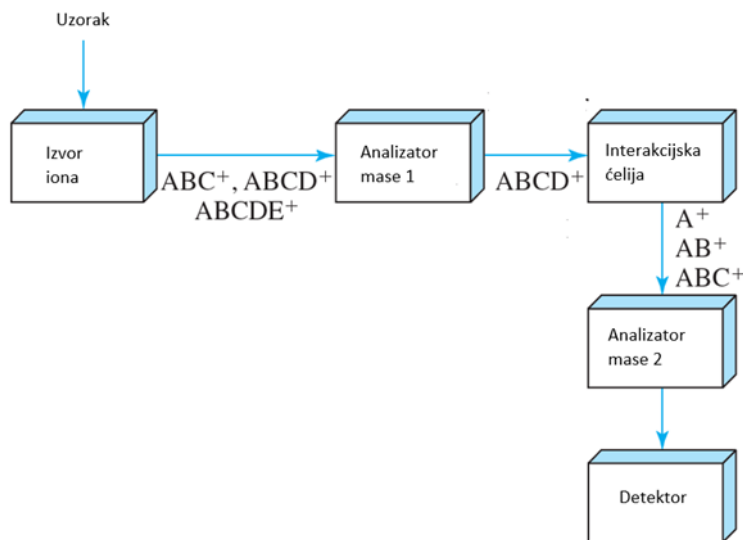
Sastoji se od četiri paralelne cilindrične elektrode. Povezuju se nasuprotne elektrode tako da je jedna spojena na negativni terminal, a druga na pozitivni. Ionizirane komponente uzorka ulaze u analizator te dolazi do sudara s elektrodama pri čemu se neutraliziraju. Samo ioni analita određenog m/z omjera uspiju doći do ionskog transduktora. Kvadrupolni analizator služi kao "filter masa".¹⁹

Moguće je koristiti i kombinacije analizatora mase (tandemska spektrometrija masa) čime je moguće promatrati pojedinačne ione analita. Ovakva analiza daje informacije o ioniziranim fragmentima početnog analita.^{19,25}

1.3.3. Tandemska spektrometrija masa (MS/MS)

Tandemska spektrometrija masa (engl. *Tandem Mass Spectrometry*, MS/MS) je tehnika koja omogućava dobivanje spektra masa odabranih fragmentiranih iona. Slika 8. prikazuje shematsku izvedbu MS/MS-a. Uzorak se dovodi do područja izvora iona gdje dolazi do formiranja iona i fragmenata analita, koji potom ulaze u prvi analizator mase gdje dolazi do raspodjele komponenti s obzirom na m/z vrijednosti. Ioni određenih m/z vrijednosti zatim idu do interakcijske ćelije unutar koje dolazi do disocijacije iona djelovanjem neutralnog kolizijskog plina. Nastali fragmenti ulaze u sljedeći analizator mase u kojemu dolazi do

ponovne raspodjele komponenti ovisno o m/z vrijednostima. Na kraju ulaze u detektor gdje se formira električni signal koji se zatim šalje na računalo gdje se obrađuju dobiveni rezultati.¹⁹



Slika 8. Shematski prikaz tandemске spektrometrije mase¹⁹

Trostruki kvadrupol

Trostruki kvadrupol sadrži dva analizatora mase koji omogućavaju mjerenje na dvama različitim mjestima unutar prostora. Ioni analita ulaze u prvi kvadrupol (Q1) koji služi kao filter na osnovi omjera mase i naboja. Tako izdvojeni ioni izlaze iz prvog analizatora i ulaze u drugi kvadrupol (q). Unutar njega pod djelovanjem radio-frekvencije dolazi do disocijacije iona. Takvi ioni ulaze u zadnji kvadrupol (Q3) u kojem se provodi finalna analiza iona na osnovi omjera mase i naboja.¹⁹

1.4. Vrednovanje metoda

Vrednovanje metode provodi se kako bi se odredila prikladnost korištenja metode za željeni proces. Provodi se promatranjem osjetljivosti, stabilnosti uzorka, ponovljivosti, lakoće provođenja metode, troškova procesa i vremena trajanja analize.^{26,27}

Osnovni parametri vrednovanja analitičke metode prema Međunarodnoj konferenciji o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonization, ICH*) su: točnost, preciznost

(ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost,), raspon, linearnost, granice dokazivanja i određivanje, robusnost te specifičnost.²⁶

Točnost razmatra podudaranje dobivenih podataka s pravom ili očekivanom vrijednosti. Izražava se kao apsolutna i relativna pogreška.¹⁸

Preciznost predstavlja stupanj raspršenosti, tj. stupanj podudaranja podataka dvaju ili više mjerenja koja su provedena na isti način. Izražava se kao relativno standardno odstupanje, a moguće ju je promatrati na više načina:

- **Ponovljivost** daje uvid u preciznost mjerenja u malim vremenskim intervalima kada su uvjeti konstanti.²⁶
- **Srednja preciznost** predstavlja uvjete laboratorija tokom provedbe procesa (uvjeti pojedinačnih dana, razlike korištenih uzoraka itd.).
- **Obnovljivost** govori o preciznosti mjerenja između laboratorija.

Robusnost predstavlja otpornost metode na male, namjerne promjene parametara mjerenja čime se definira pouzdanost iste tijekom uobičajene primjene.²⁶

Raspon je interval najmanje i najveće koncentracije analiza pri kojima odabrana metoda pokazuje zadovoljavajući stupanj točnosti, linearnosti i preciznosti.²⁶

Linearnost predstavlja mogućnost metode da unutar određenih parametara daje rezultate direktno proporcionalne koncentraciji analita.²⁶

Granica dokazivanja (GD) je najmanja koncentracija analita pri kojoj se može dokazati njezina prisutnost bez kvantifikacije.²⁶

Granica određivanja (GO) je najmanja koncentracija analita koju je moguće kvantitativno odrediti (s određenom točnosti i preciznosti).²⁶

Specifičnost je mogućnost određivanja odabranog analita u prisutnosti drugih vrsta (matrice, onečišćenje itd.).²⁶

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Korištena oprema, kemikalije i instrumentacija

2.1.1. Korištene kemikalije

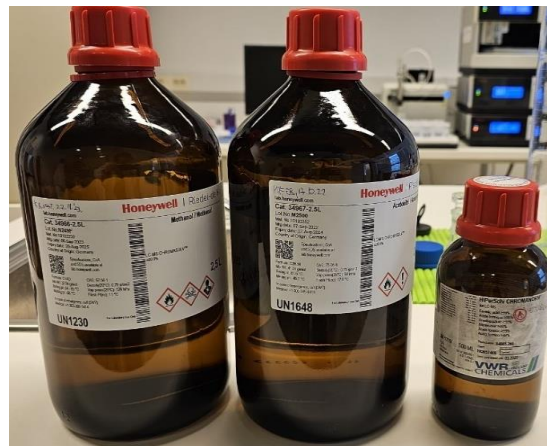
Za izradu analitičkog ispitivanja korištene su kemikalije navedene u tablici 5.

Tablica 5. Korištene kemikalije

Naziv	Sažeta strukturna formula	Relativna molekulska masa	CAS broj	Proizvođač	Čistoća
Askorbinska kiselina	C ₆ H ₈ O ₆	176,12 g/mol	50-81-7	Sigma-Aldrich, Njemačka	≥ 99 %
Dehidroaskorbinska kiselina	C ₆ H ₆ O ₆	174,11 g/mol	490-83-5	Sigma-Aldrich, Njemačka	≥ 95 %
Acetonitril	C ₃ H ₃ N	41,05 g/mol	75-05-8	Honeywell, Njemačka	≥ 99,9 %
Metanol	CH ₄ O	32,04 g/mol	67-56-1	Honeywell, Njemačka	≥ 99,9 %
Mravlja kiselina	HCO ₂ H	46,03 g/mol	64-18-6	VWR Chemicals, SAD	≥ 99 %
Octena kiselina	C ₂ H ₄ O ₂	60,05 g/mol	64-19-7	Grammol, Hrvatska	99,0 %
Etilendiamintetraoctena kiselina	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ × H ₂ O	372,2 g/mol	6381-92-6	/	/
<i>o</i> -fosforna kiselina	H ₃ PO ₄	97,99 g/mol	7664-38-2	Carlo Erba Reagents,	85-87 %
<i>m</i> -fosforna kiselina	HPO ₃	79,98 g/mol	37267-86-0	Acros Organics, Njemačka	40-46 %
Oksalna kiselina	C ₂ H ₂ O ₄ × 2H ₂ O	126,05 g/mol	6153-56-6	Kemika, Hrvatska	p.a.



Slika 9. Standardi L-askorbinske kiseline i L-dehidroaskorbinske kiseline korišteni za izradu standardnih otopina



Slika 10. Mravlja kiselina, metanol i acetonitril korišteni u optimizaciji pokretne faze



Slika 11. *o*-Fosforna kiselina (85 %), *m*-fosforna kiselina, oksalna kiselina korištene pri izradi standardnih otopina kao stabilizatori askorbinske kiseline

2.1.2. Korištena oprema

Popis korištene opreme:

1. Kolone:

- ZORBAX Eclipse XDB - C18, dim.(mm) 100×3,5 (3,5µm), Agilent Technologies, SAD
- Accucore™ C8, dim.(mm) 50×2,1 (2,6 µm), Thermo Fischer Scientific, SAD
- Accucore™ C18, dim.(mm) 150×2,1 (2,6 µm), Thermo Fischer Scientific, SAD

2. Analitička vaga: AT261 DR (Mettler Toledo, SAD)

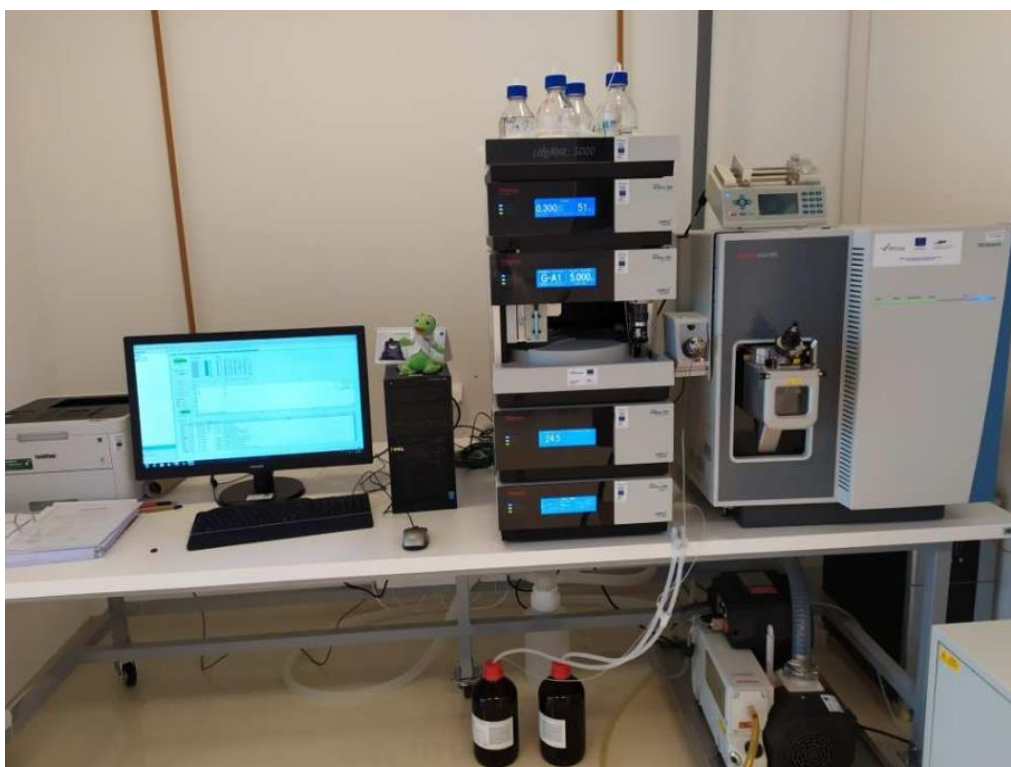
3. Pipete: Tacta (Sartorius, Njemačka)

4. Uređaj za pročišćavanje vode: Purelab Flex 3 (Elga, SAD)

5. Instrument - Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti: Dionex Ultimate 300 (Thermo Fischer Scientific, SAD)

6. Detektor - Spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom: TSQ Quantis (Thermo Fischer Scientific, SAD)

Za upravljanje korištenim instrumentom korišten je računalni program Chromeleon (Chromeleon 7.2.10., Thermo Fischer Scientific, SAD).



Slika 12. Tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti sa spektrometrom masa s trostrukim kvadrupolom



Slika 13. Uređaj za pročišćavanje vode

2.2. Priprema otopina

2.2.1. Odabir otapala

Prije početka mjerenja, potrebno je definirati i odabrati najpogodnije otapalo uzimajući u obzir analit, odnosno njegova kemijska i fizikalna svojstva kako bi se osiguralo uspješno otapanje istog. Najpogodnije otapalo u potpunosti otapa analit te se u svim omjerima miješa s istim. Kako askorbinska kiselina, tako i dehidroaskorbinska kiselina, se potpuno otapaju u vodi te je kao otapalo izabrana ultračista voda dobivena preko uređaja za pročišćavanje vode.

2.2.2. Stabilizatori

Askorbinska kiselina je vrlo nestabilna u vodenoj otopini i brzo se razgrađuje na dehidroaskorbinsku kiselinu što otežava eksperimentalni rad. Pregledom literature je nađeno da se stabilnost askorbinske kiseline može pospješiti. U svrhu sprječavanja spomenute pojave, nađeno je kako se pripremljenim otopinama standarda mogu dodati stabilizacijski agensi kao što je merkptoetanol (stabilnost nekoliko tjedana), *m*-fosforna kiselina (10 dana na 0-4 °C), *o*-fosforna kiselina (2 dana), oksalna kiselina (3 dana), također i octena kiselina te EDTA.^{29,30,32} Od navedenog je isproban dodatak EDTA (maseni udio 0,05 %), *m*-fosforne kiseline (volumni udio 1 %), *o*-fosforne kiseline (volumni udio 5 %), oksalne kiseline (koncentracija 10 mM) i octene kiseline (volumni udio 0,1 %). Svaki od stabilizatora prekrio je signale analita na kromatogramu te se odustalo od njihove primjene. Stoga, kako bi se utjecaj degradacije analita mogao zanemariti, sve su otopine i uzorci svježije pripremani i čuvani u mračnim (smeđe bočice) i hladnim uvjetima (0-4 °C).

2.2.3. Standardne otopine

Otopine standarda, askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline pripremane su i analizirane unutar dva sata. Za pripremu otopina korišteno je smeđe posuđe i vijale kako bi se smanjio utjecaj svjetla koje pospješuje degradaciju askorbinske kiseline. Pripravljene uzorci su čuvani u

hladnjaku, praškasti uzorci standarda su skladišteni u zamrzivaču te su parametri instrumenta postavljeni tako da je uzorkivač održavao temperaturu od 4 °C, a kolona je termostatirana na 20 °C. Uzorci su time sačuvani od utjecaja viših temperatura koje ubrzavaju raspad askorbinske kiseline. Dobro skladišteni uzorci sačuvani su također od negativnog utjecaja prisutnosti kisika i mogućnosti kontaminacije istih sa stranim agensima kao što su kiseline i baze.

2.2.4. Miksture radnih otopina

Prilikom dnevne pripreve otopina čistih standarda, pripremane su također radne otopine, smjese oba analita (AA i DHAA) u određenim poznatim koncentracijama kako bi se ispitalo i optimiziralo njihovo odjeljivanje iz smjese.

2.2.5. Otopine za optimizaciju MS/MS

Optimizacija MS/MS parametara zahtijevala je pripremu pojedinačnih otopina oba analita. Izvagano je 1,1 mg standarda AA, odnosno 0,7 mg standarda DHAA te otopljeno u odmjerneji tikvici od 10 mL. Dobivena je otopina AA koncentracije 0,11 mg/mL (110 ppm) te otopina DHAA koncentracije 0,07 mg/mL (70 ppm).

2.2.6. Otopine pri kreiranju krivulje umjeravanja

Izrada krivulje umjeravanja zahtjeva mjerenje pri različitim koncentracijama otopina standarda.

U odmjerneji tikvici od 10 mL pripravljena je početna otopine jednake koncentracije od 0,1 mg/mL za askorbinsku i dehidroaskorbinsku kiselinu. Za izradu krivulje umjeravanje viših koncentracija korišteno je devet radnih otopina koncentracija redom od više, 50 µg/mL, 45 µg/mL, 40 µg/mL, 35 µg/mL, 30 µg/mL, 25 µg/mL, 20 µg/mL, 15 µg/mL i 10 µg/mL. Kao novo područje koncentracija je potom uzet raspon od 5 µg/mL do 0,5 µg/mL te je odabrano pet otopina koncentracija redom od više, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 0,75 µg/mL i 0,50 µg/mL. Skup spomenutih otopina dobiven je razrjeđenjem otopine koncentracije od 5 µg/mL kako bi se izbjegla pogreška uslijed razrjeđivanja otopina viših koncentracija.

2.2.7. Otopine za vrednovanje metode

Za vrednovanje metode u rasponu koncentracija od 10 µg/mL do 50 µg/mL uzete su tri koncentracije i to niska koncentracija (LQC) od 10 µg/mL, srednja koncentracija od 30 µg/mL (MQC) te visoka koncentracija (HQC) od 45 µg/mL. Za vrednovanje metode u rasponu od 0,5 do 5 µg/mL korištena je otopina koncentracije 2,5 µg/mL.

2.3. **Optimizacija tandemске spektrometrije masa (MS/MS)**

Otopina standarda askorbinske kiseline koncentracije 110 µg/mL te otopina standarda dehidroaskorbinske kiseline koncentracije 70 µg/mL direktno je injektirana u spektrometar masa. Omogućen je protok pokretne faze kroz ionski izvor spektrometra masa te obavljena optimizacija parametara spektrometrije masa. Uzorak je ioniziran elektroraspršenjem (engl. *Electrospray ionisation*, ESI) u pozitivnom i negativnom načinu rada. Parametri za rad spektrometra su odabrani pomoću modula za optimizaciju u programu Chromeleon. Odabrani su parametri za rad spektrometra masa koji su rezultirali najvećim odzivom detektora za svaki od analita.

Prilikom optimizacije parametara spektrometrije masa odabrani su glavni ioni nastali ionizacijom molekula askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline. Kako bi se omogućilo analiziranje spomenutih iona potrebno je praćenje pojedinačnih specifičnih prijelaza iona (eng. *Selected Reaction Monitoring*, SRM). Uređaj snima i pretražuje spektre fragmentacije i vrši automatsku optimizaciju napona fokusirajućih leća (radiofrekventne leće, RF leće) za kvantitativni ion te pritom prati energije sraza (engl. *Collision Energy*, CE) za sve specifične prijelaze.

Zaključno, optimizirani su sljedeći parametri spektrometra masa:

- Način rada spektrometra,
- Napon elektrospreja na kapilari, engl. *Spray Voltage*,
- Ulazni tlak plina argona u kolizijskoj ćeliji (CID, engl. *Collision – Induced Dissociation Gas*),
- Energija sraza, CE,
- Protok plina potreban za stvaranje fine maglice (engl. *Sheath Gas*),
- Protok pomoćnog plina za stvaranje fine maglice (engl. *Auxiliary Gas*),
- Protok plina koji poboljšava stvaranje fine maglice (engl. *Sweep Gas*),
- Napon fokusirajućih leća, RF.

2.4. Optimizacija tekućinske kromatografije (LC)

Otopine analita poznate koncentracije su pripremljene netom prije početka mjerenja te su postavljene na postolje unutar instrumenta. Mjerenje je pokrenuto preko računalnog programa, a sve u cilju dobivanja početnih signala na kromatogramu i te UV-Vis spektara nakon čega je uslijedila provjera slaganja kromatografske metode s optimiziranim parametrima spektrometrije masa. Optimizacija tekućinske kromatografije uključuje odabir optimalne pokretne i nepokretne faze, organskih modifikatora dodanih pokretnoj fazi, zatim odabir izokratnog ili načina rada s gradijentom pokretnih faza. Odabiru se optimalni uvjeti rada kao što je temperatura kolone, protok te volumen injektiranja. Konačna metoda je skraćena na tri minute u svrhu uštede vremena te kemikalija korištenih u provedenim analizama. Svrha spomenutih postupaka je razvoj metode sa što većim odzivima na detektoru kako bi se omogućilo bolje razdvajanje analita od interesa unutar smjese.

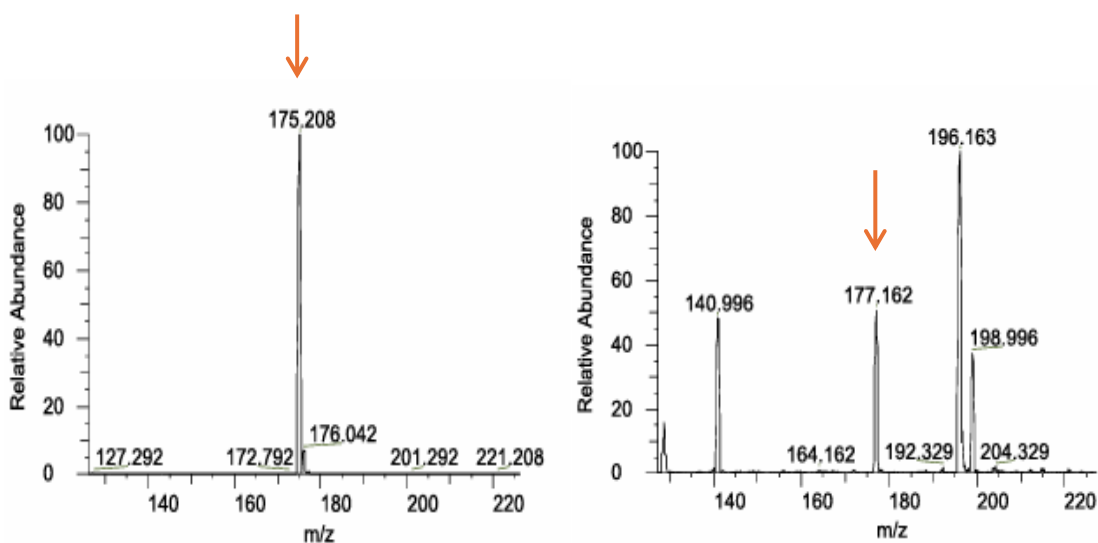
3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Optimizacija spektrometrije masa (MS)

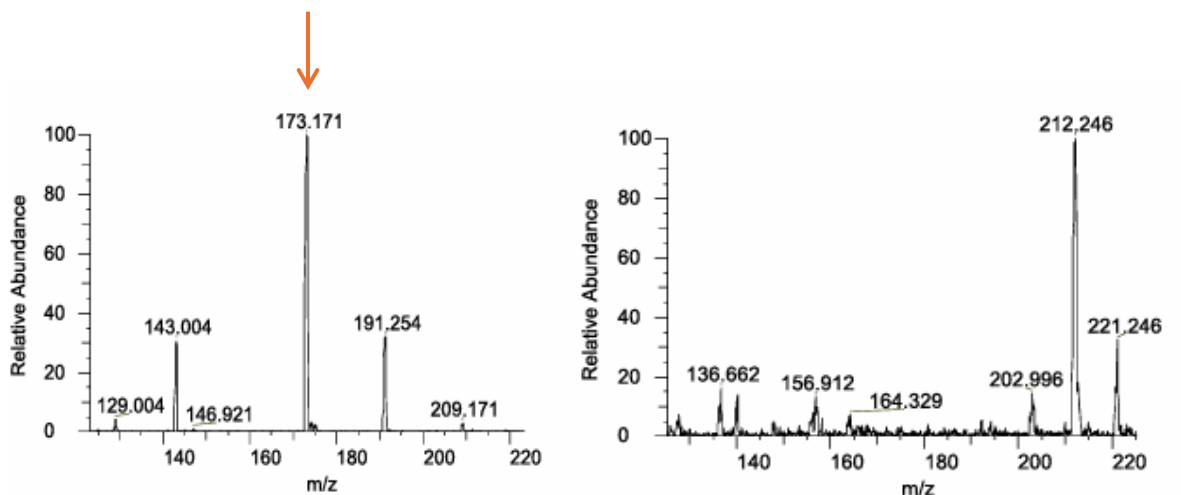
3.1.1. Pozitivan ili negativan način rada

Analizirani su spektri iona prekursora za svaki od analita pri pozitivnom i negativnom načinu rada. Pozitivni način rada detektira samo pozitivno nabijene, odnosno protonirane ione dok negativni način rada detektira negativno nabijene, odnosno deprotonirane ione. Dobiveni spektri se uspoređuju s ciljem odabira načina rada koji daje signale molekulskih iona najvećih odziva prema detektoru.

Pozitivni način rada ne omogućuje identifikaciju molekulskog iona za dehidroaskorbinsku kiselinu te ne daje spektre masa zadovoljavajućih intenziteta niti su isti razmatrani u daljnjim postupcima optimizacije metode. Nakon izvršene optimizacije izabran je negativni način rada spektrometra jer je za oba analita kod molekulskog pika postignut zadovoljavajući intenzitet u navedenom načinu rada. Optimizacija protoka plinova u spektrometru masa, energija sraza za sve prijelaze, napon kapilare i napon fokusirajućih leća su optimizirani i raspravljani isključivo u negativnom načinu rada.

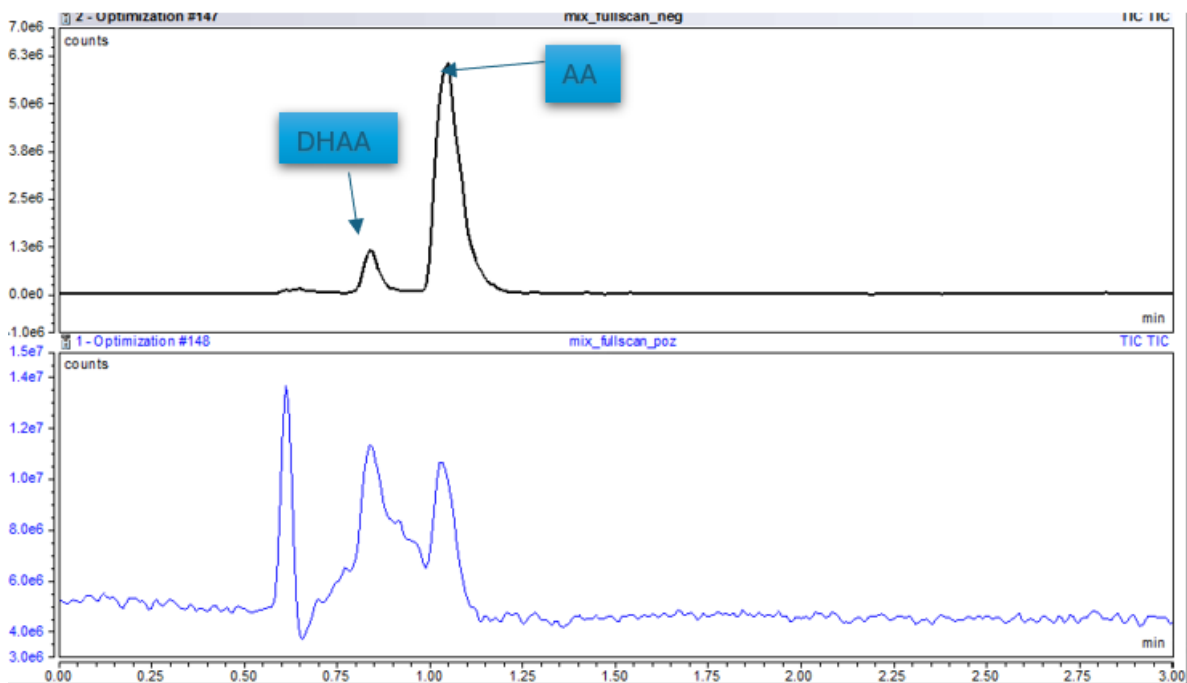


Slika 14. Spektar masa askorbinske kiseline snimljen u negativnom (desno) i pozitivnom načinu rada (lijevo)



Slika 15. Spektar masa dehidroaskorbinske kiseline snimljeni u negativnom (desno) i pozitivnom načinu rada (lijevo)

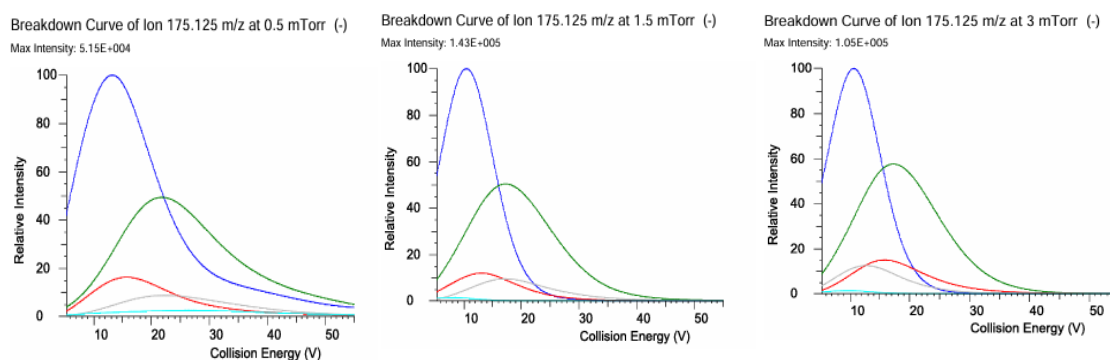
Pozitivni način rada ne daje zadovoljavajuće spektre masa niti za jedan od analita od interesa niti omogućuje razdvajanje komponente iz smjese što je vidljivo na slici 16.



Slika 16. Usporedba pozitivnog i negativnog načina rada kromatografa

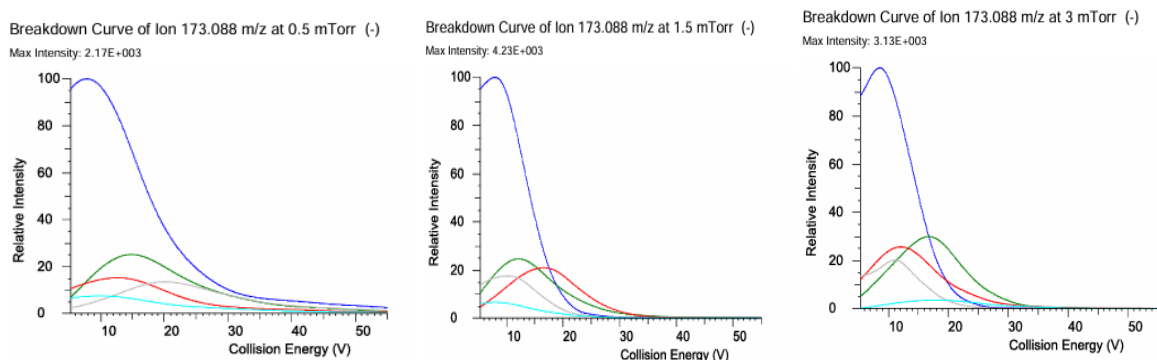
3.1.2. Ulazni tlak plina u kolizijskoj ćeliji

U svrhu optimiziranja standardna otopina askorbinske kiseline koncentracije 110 $\mu\text{g/mL}$, odnosno standardna otopina dehidroaskorbinske kiseline koncentracije 70 $\mu\text{g/mL}$, su injektirane u spektrometar masa pri različitim vrijednostima ulaznog tlaka plina argona u kolizijskoj ćeliji. Optimizacija se provela u negativnom načinu rada s vrijednostima tlakova od 0,5 mTorr, 1,5 mTorr te 3,0 mTorr. Krivulja disocijacije molekuskog iona za askorbinsku kiselinu prikazuje najslabiju fragmentaciju pri 0,5 mTorr, dok su relativni intenziteti fragmentacije slični pri vrijednostima tlakova od 1,5 i 3,0 mTorr (slika 17).



Slika 17. Usporedba signala dobivenih različitim ulaznim tlakovima argona u kolizijskoj ćeliji za askorbinsku kiselinu

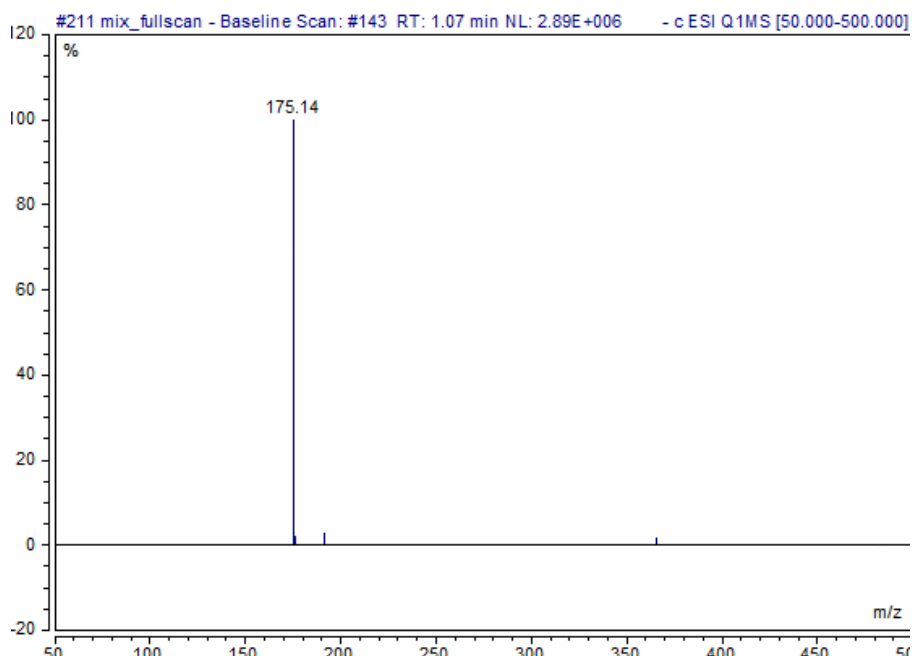
Krivulje disocijacije molekuskog iona dehidroaskorbinske kiseline prikazuju kako je relativni intenzitet nastalih iona najnižih vrijednosti pri tlaku od 0,5 mTorr. Intenzitet novonastalih iona pri tlaku od 1,5 mTorr ima najviše vrijednosti (slika 18). Analizom dobivenih podataka za oba spoja, utvrđeno je da tlak CID plina od 1,5 mTorr daje signal najvećeg odziva na detektoru, smatra se optimalnim tlakom te je isti korišten u daljnjem razvoju metode.



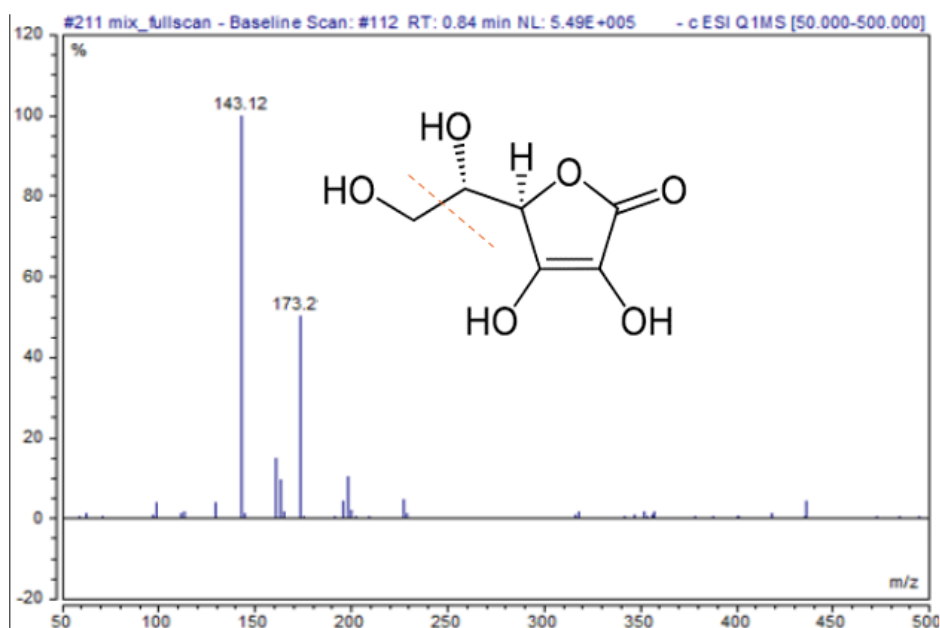
Slika 18. Usporedba signala dobivenih različitim ulaznim tlakovima argona u kolizijskoj ćeliji za dehidroaskorbinsku kiselinu

3.1.3. Identifikacija i kvantifikacija u svrhu odjeljivanja

Otopina standarda askorbinske kiseline koncentracije 110 $\mu\text{g/mL}$ te otopina standarda dehidroaskorbinske kiseline koncentracije 70 $\mu\text{g/mL}$ odvojeno su injektirane u spektrometar masa. Svakom od analita je snimljen MS te UV-Vis spektar da bi se što točnije identificirali. Uzorak je ioniziran elektroraspršenjem (ESI) u negativnom načinu rada.



Slika 19. Spektar masa askorbinske kiseline



Slika 20. Spektar masa dehidroaskorbinske kiseline

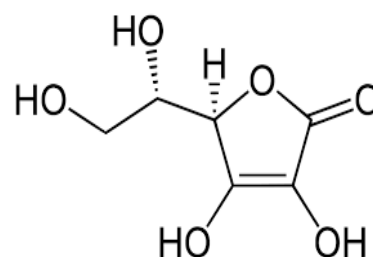
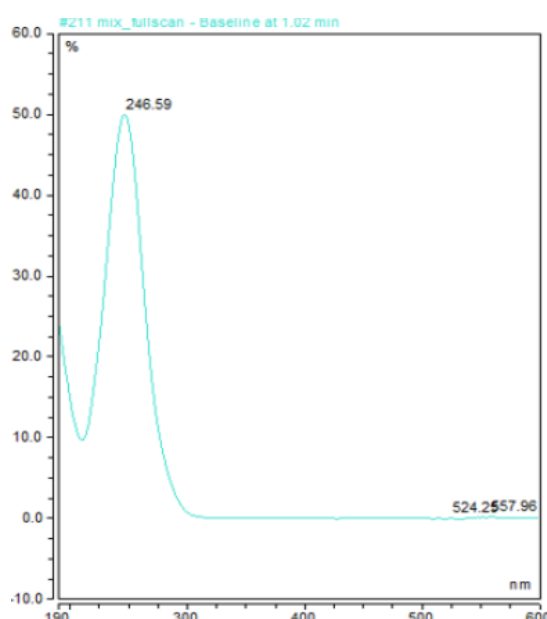
Molekulski ion askorbinske kiseline umanjena za H^+ iznosi $175,14 m/z$, a za dehidroaskorbinsku kiselinu koja je također umanjena za otpušteni H^+ ion iznosi $173,21 m/z$.

Na spektru masa dehidroaskorbinske kiseline vidljiv je i znatno veći signal od molekulskog pika na $143,12 m/z$ što se može objasniti odcjepljenjem metoksi skupine pobočnog lanca.

3.1.4. Identifikacija analita korištenjem DAD detektora

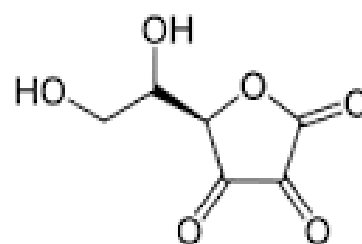
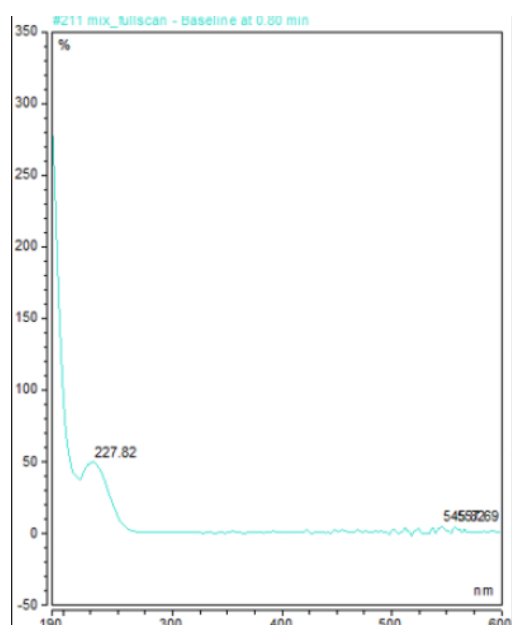
DAD detektor mjeri apsorbanciju analita u UV-Vis području elektromagnetskog zračenja. Molekule daju specifične spektre odnosno imaju određene vrijednosti valnih duljina pri kojima dolazi do apsorbancije. Dobiveni spektri doprinose dodatnoj potvrdi identifikacije analita. Pomoću računalnog programa postavljeno je snimanje spektara pri valnim duljinama od 190 do 600 nm, a apsorbancija je mjerena kod otopina pripremljenih za optimizaciju UHPLC metode. Uvidom u dostupnu literaturu, očekivan je maksimum apsorbancije u rasponu valnih duljina od 245 do 265 nm. Također nađeno je da dehidroaskorbinska kiselina apsorbira UV svjetlo pri 185 nm te da slabo apsorbira pri višim vrijednostima apsorbancije (iznad 220 nm). Većina metoda analize korištenjem UV svjetla snima isključivo askorbinsku kiselinu bez dehidroaskorbinske kiseline upravo zbog spomenutog razloga.³⁰

Pregledom dobivenih spektara, vidljivi su maksimumi apsorpcijskih vrpci pri 246,59 nm za askorbinsku te pri 227,82 nm za dehidroaskorbinsku kiselinu. Obavljena analiza spektara je potvrdila kako su ispitivani analiti uistinu očekivani spojevi.



Askorbinska kiselina

Mr=176,1241 g/mol



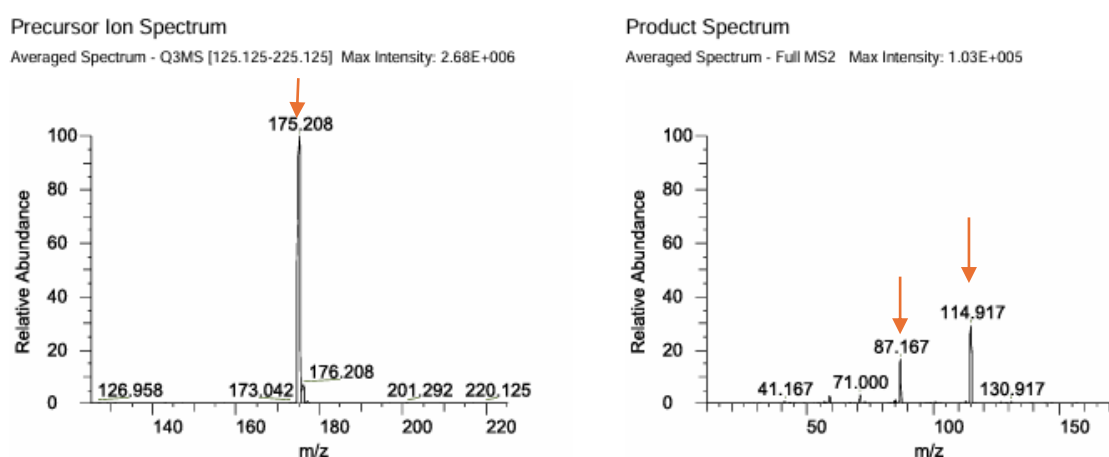
Dehidroaskorbinska kiselina

Mr=174,11 g/mol

Slika 21. UV-Vis spektar askorbinske kiseline (gore) i dehidroaskorbinske kiseline (dolje)

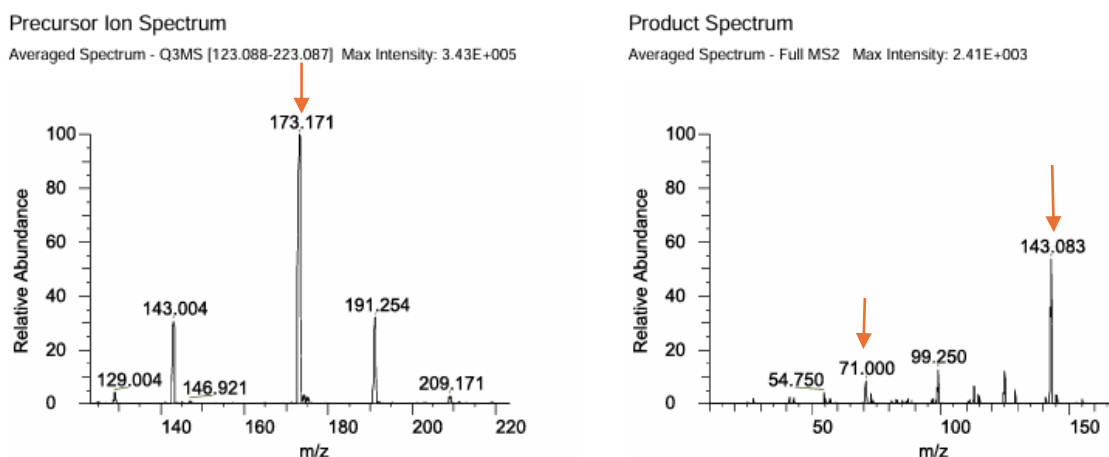
3.1.5. Prijelaz ion prekursor → ion produkt

Na slikama 22. i 23. su prikazani spektri masa iona prekursora i iona produkta za svaki od analita. Svaki od analita određen je specifičnim reakcijama fragmentacije molekulskog iona na jedan ili više iona produkta, a analiza spektara tako dobivenih pomaže u identifikaciji analita od interesa. Dva prijelaza s najvećim odzivom prema detektoru su definirana kao kvalitativni, odnosno potvrdni prijelazi ($175 \rightarrow 115$ i $175 \rightarrow 87$) za identifikaciju askorbinske kiseline (slika 22.).



Slika 22. Spektar masa iona prekursora i iona produkta za askorbinsku kiselinu

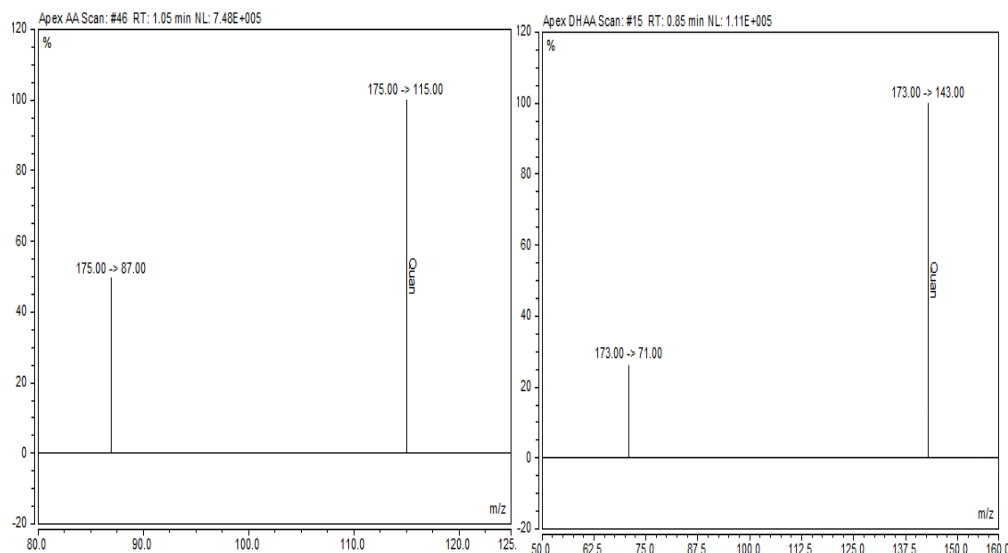
Analizom spektara prikazanih na slici 23., odabran je kvantitativni prijelaz i za dehidroaskorbinsku kiselinu ($173 \rightarrow 143$), te određen potvrdni prijelaz ($173 \rightarrow 71$).



Slika 23. Spektar masa iona prekursora i iona produkta za dehidroaskorbinsku kiselinu

3.1.6. MS/MS optimizacija

Otopine standarda askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline poznate koncentracije su injektirane u tekućinski kromatograf s MS/MS detektorom. MS/MS spektri su očitani radi dodatne potvrde identifikacije.



Slika 24. MS/MS spektar askorbinske kiseline (lijevo) i dehidroaskorbinske kiseline (desno)

Iz MS/MS spektra askorbinske kiseline vidljiva su dva produkta fragmentacije molekuskog iona. Prvi kvadrupol (Q1) očitava molekulski ion mase 175 m/z , točnije molekulski ion umanjen za H^+ ion. U drugom kvadrupolu se odvija kolizija molekuskog iona sa inertnim plinom argonom čime je uvjetovana daljnja fragmentacija molekuskog iona na manje ione te se specifični fragmenti propuštaju do trećeg kvadrupola gdje se snimaju karakteristični ioni fragmenata molekuskog iona (175→115 potvrđen kao kvantitativni prijelaz i potvrdni, odnosno kvalitativni prijelaz 175→87). Za dehidroaskorbinsku kiselinu se tako u prvom kvadrupolu (Q1) snima molekulski ion mase 173 m/z , ($M-H^+$) dok treći kvadrupol (Q3) snima karakteristične ione fragmenata molekuskog iona (kvantitativni 173→143 te kvalitativni 173→71).

3.1.7. Ostali parametri

Uz gore navedene parametre, optimizirani su i radiofrekventni napon leće (RF fokusirajuće leće), napon na kapilari (engl. *Spray Voltage*), protoci plinova potrebni u stvaranju fine maglice, temperatura kapilare potrebna za prijenos iona (engl. *Ion Transfer Tube Temperature*) te temperatura plina za stvaranje fine maglice (engl. *Vaporizer Temperature*). Za svaki od navedenih parametara dobivena je krivulja analizom koje su očitani signali najvećih intenziteta te izabrani optimalni uvjeti rada spektrometra masa. U tablici 6. prikazani su odabrani parametri, a u priložima 1. – 5. prikazane krivulje iz kojih su isti određeni.

Tablica 6. Optimizirani parametri spektrometrije masa za askorbinsku i dehidroaskorbinsku kiselinu

Parametar	Askorbinska kiselina	Dehidroaskorbinska kiselina
Način rada	Negativni način rada	
Napon na kapilari (V)	3600	
CID plin(mTorr)	1,5	
Protok plina potreban za stvaranje fine maglice (arb.*)	43,9	
Protok pomoćnog plina za stvaranje fine maglice (arb.)	6,1	
Protok plina koji poboljšava stvaranje fine maglice (arb.)	0,0	
Temperatura kapilare potrebna za prijenos iona (°C)	325	
Temperatura plina za stvaranje fine maglice (°C)	350	
RF (V)	62	67
Kvantitativni ion (m/z) (energija sraza, V)	175→115 (10 V)	173→143 (8V)
Potvrdni ion (m/z)	175→87 (17V)	173→71 (12V)

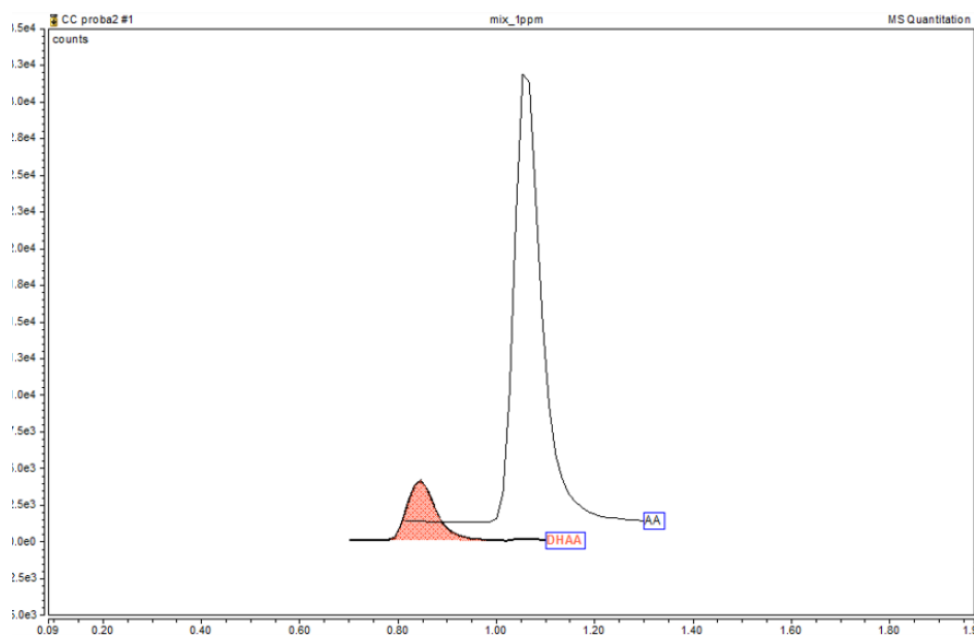
*arb. – proizvoljne jedinice

3.2. Optimizacija tekućinske kromatografije (LC)

Nakon optimizacije parametara spektrometra masa za askorbinsku i dehidroaskorbinsku kiselinu, može se pristupiti razvijanju kromatografske metode u svrhu odjeljivanja analita iz smjese.

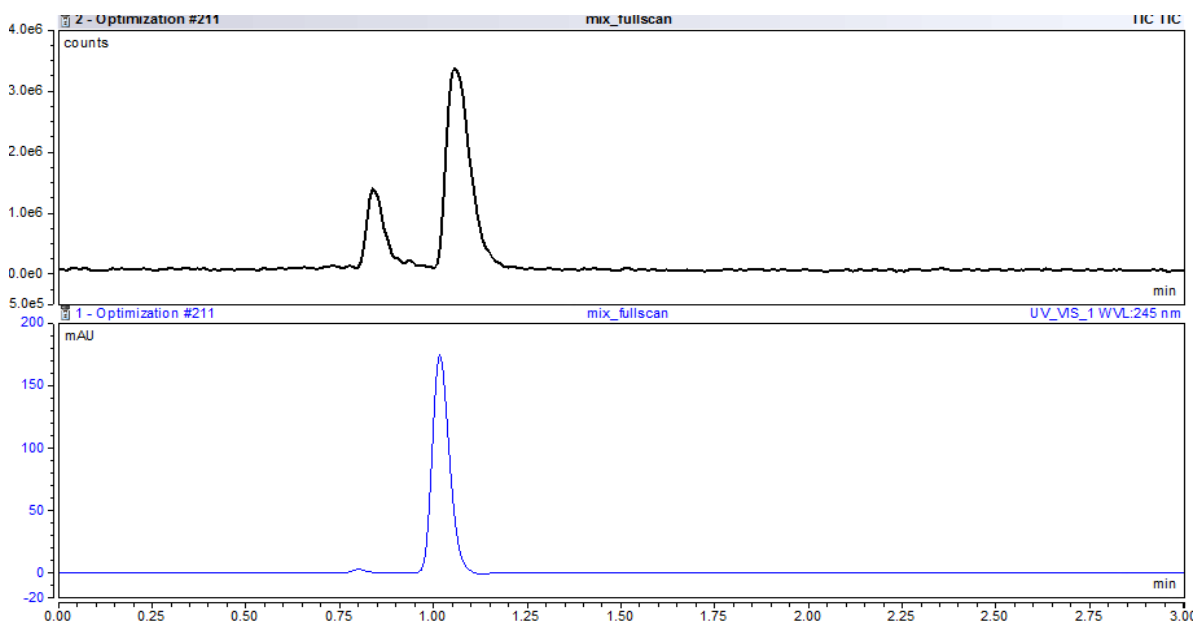
3.2.1. Vrijeme zadržavanja i način rada kromatograma

Na slici 25., prikazan je kvantifikacijski kromatogram askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline kojim je vidljivo kako obje komponente od interesa eluiraju unutar prve dvije minute od početka mjerenja. Predviđeno preklapanje površine signala dva analita spriječeno je razvojem i optimizacijom metode kako bi se analiti što bolje razdvojili te kvantificirali.



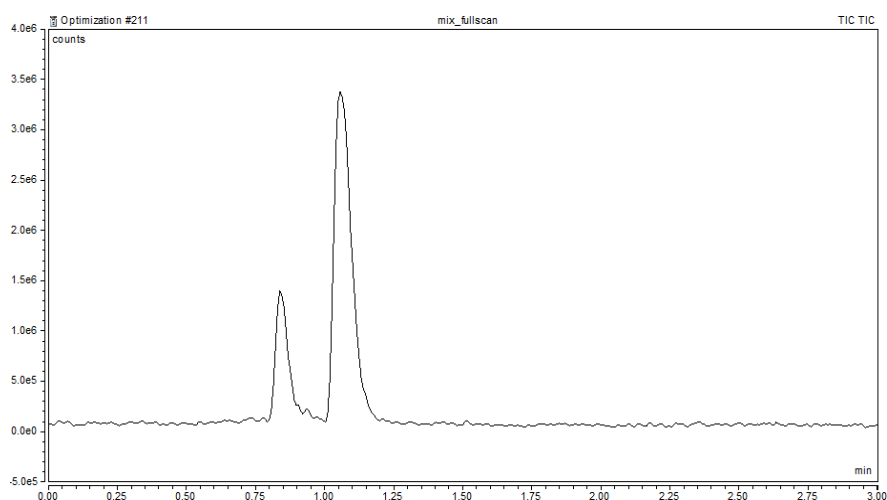
Slika 25. Kvantifikacijski kromatogram za askorbinsku i dehidroaskorbinsku kiselinu

Prije daljnjeg optimiziranja parametara tekućinske kromatografije, potrebno je izabrati način rada kromatografa koji daje najveće odzive na detektoru. U tu svrhu su promatrani TIC i UV-Vis način snimanja prikazani na slici 26.



Slika 26. Usporedba kromatograma za askorbinsku i dehidroaskorbinsku kiselinu koristeći TIC način rada i UV-Vis način rada pri 245 nm

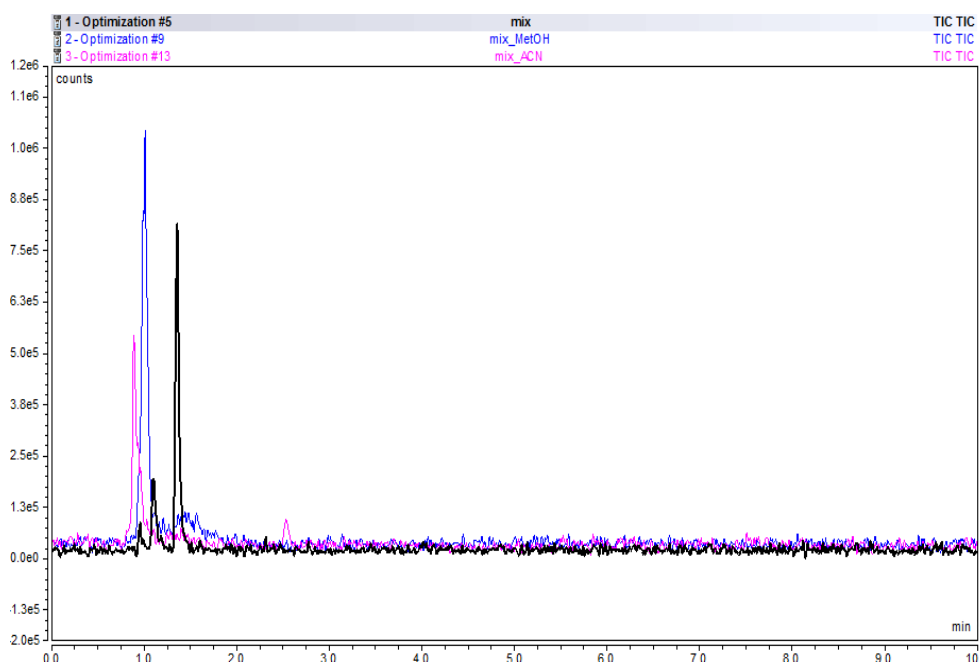
TIC (eng. *Total Ion Chromatogram*) je način snimanja kromatograma koji uzima u obzir cjelokupni intenzitet signala (ukupnu struju iona) kroz cijelo vrijeme mjerenja te se kao takav pokazao boljim pri razvoju metode za kvalitativnu i kvantitativnu analizu askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline (slika 27.) s obzirom da dehidroaskorbinska kiselina ne daje zadovoljavajući odziv na detektoru pri korištenju UV-Vis načina rada pri 245 nm.



Slika 27. Kromatogram ukupne struje iona (TIC) otopine askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline

3.2.2. Odabir pokretne faze

Optimizacija tekućinske kromatografije započela je odabirom najpogodnije pokretne faze za analizu askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline. U tu svrhu je pripravljena otopina smjese askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline s približnim koncentracijama od 30 µg/mL (30 ppm). U izboru pokretne faze, korištena je voda kao polarno otapalo, manje polarni metanol te acetonitril kao nepolarno otapalo. U radu je korišten uređaj čiji se rad zasniva na kromatografiji obrnutih faza te su sve dostupne nepokretne faze nepolarne. Korištenjem vode kao najpolarnijeg korištenog otapala omogućen je nastanak signala najvećih intenziteta te je postignuto razdvajanje analita (slika 28). Zbog navedenog je u daljnjim mjerenjima korištena isključivo voda kao pokretna faza.



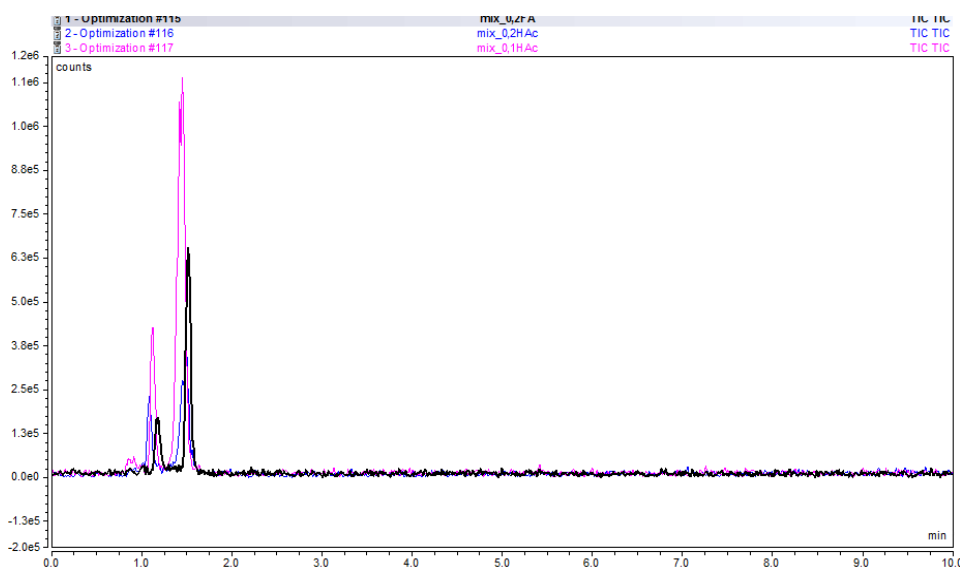
Slika 28. Usporedba kromatograma dobivenih korištenjem različitih pokretnih faza

3.2.3. Organski modifikator

Modifikatori su spojevi čijim se dodatkom u pokretnu fazu ili uzorke analita pospješuje odvajanje, ionizacija ili detekcija analita čime se utječe na osjetljivost metode pri malim koncentracijama analita. U razvoju metode korišten je ESI izvor ionizacije te se modifikatori dodaju kako bi se potpomogla ionizacija analita. U tom slučaju se dodaju kiseli modifikatori koji protoniraju analite ili bazni modifikatori koji iste deprotoniraju.

U razvoju metode korišteni su kiseli organski modifikatori: 0,2 %-tna mravlja kiselina u vodi, 0,2 %-tna te 0,1 %-tna octena kiselina u vodi. Pri optimizaciji je korištena kolona XDB-C18, dimenzija 100 mm × 3,0 mm s unutarnjim promjerom od 3,5 μm.

Rezultati optimizacije uporabom različitih organskih modifikatora prikazani su na slici 29.



Slika 29. Usporedba kromatograma dobivenih korištenjem organskih modifikatora (0,2%-tna vodena otopina mravlje kiseline, 0,2 %-tna vodena otopina octene kiseline, 0,1 %-tna vodena otopina octene kiseline)

Optimalni organski modifikator za razvijenu metodu je 0,1 %-tna vodena otopina octene kiseline čiji dodatak u pokretnu fazu daje najveće signale na detektoru.

3.2.4. Odabir nepokretne faze

U razvijanju metode korištene su dostupne kolone XDB-C18, ACC-C8 i ACC-C18, a u tablici 7. se nalaze njihove specifikacije. Kao pokretna faza je korištena voda s dodatkom 0,1 %-tne octene kiseline. Korištena je otopina standarda askorbinske kiseline i dehidroaskorbinske kiseline s poznatom približnom koncentracijom od 50 µg/mL (50 ppm).

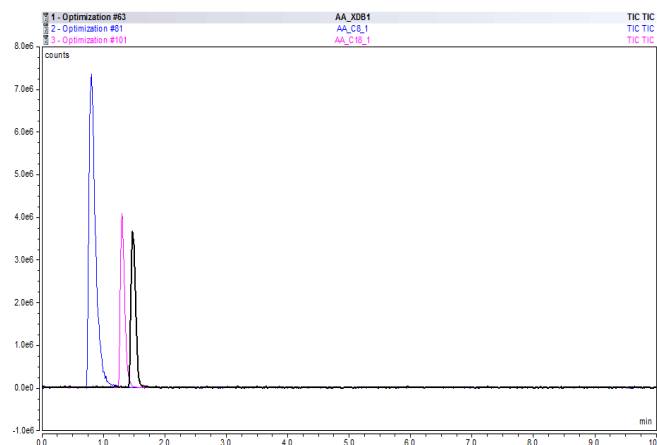
Tablica 7. Specifikacije korištenih kolona

Naziv kolone	Dimenzije kolone	Promjer čestica	Vrsta čestica
Thermo Scientific™ Accucore™ C8	50 mm × 2,1 mm	2,6 µm	C8, neporozna jezgra porozan omotač
Thermo Scientific™ Accucore™ C18	150 mm × 2,1 mm	2,6 µm	C18, neporozna jezgra porozan omotač
Agilent™ Zorbax Eclipse XDB-C18	100 mm × 3,0 mm	3,5 µm	C18, potpuno porozna

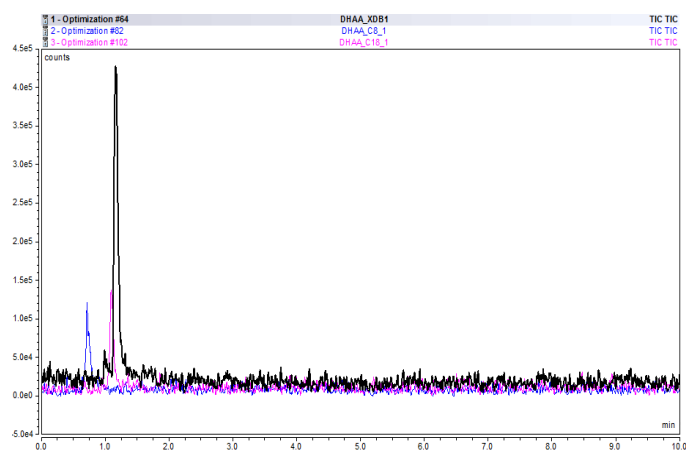
Kolona ACC-C8 sadržava čestice s neporoznom jezgrom, ali poroznim omotačem s C8 alkilnim lancima. Druge dvije kolone imaju čestice s C18 alkilnim lancima različitih svojstava čestica. Kolone s C18 alkilnim lancima imaju jače hidrofobne interakcije s analitom zbog duljih nepolarnih lanaca zbog čega se analiti različitih polarnosti različito zadržavaju na koloni što za posljedicu imaju bolje razdvajanje signala. Za razliku od kolone ACC-18 koja sadržava čestice neporozne jezgre s poroznim omotačem, kolona XDB-C18 je potpuno porozna s većim promjerom čestica što uzrokuje više interakcija s analitima od interesa te je pri korištenju jedino spomenute kolone dehidroaskorbinska kiseline eluirala u dovoljnoj količini dajući zadovoljavajući signal na kromatogramu.

Uslijedila je usporedba dobivenih kromatograma (slika 30. – 32.) za odabir pokretne faze. Prilikom odabira najpogodnije kolone vodilo se računa o visini signala svakog od analita, ali i o razdvajanju istih unutar smjese. Iako je askorbinska kiselina imala najpogodnije odzive na detektoru korištenjem kolone ACC-C18, dehidroaskorbinska kiselina je imala najveće odzive na detektoru za kolonu XDB-C18 te je primjenom iste omogućeno optimalno razdvajanje

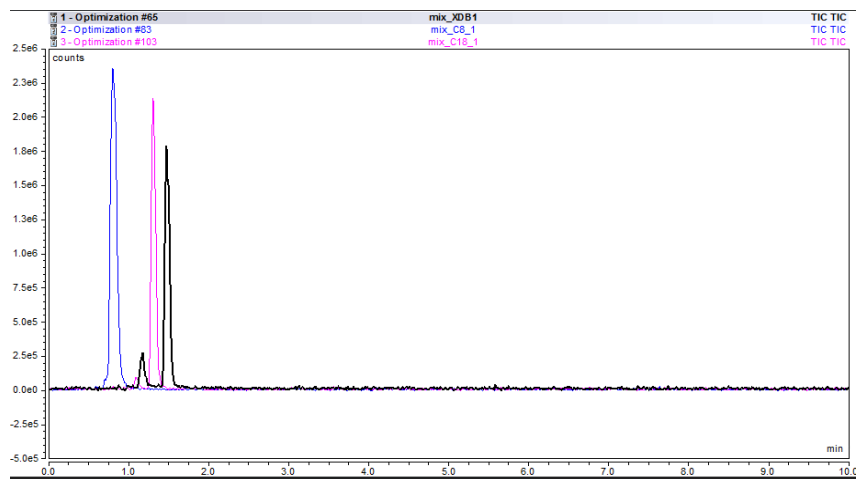
komponenti. Stoga je kao najpogodnija nepokretna faza u daljnjem razvoju metode korištena kolona XDB-C18.



Slika 30. Usporedba kromatograma za askorbinsku kiselinu (lijevo) i dehidroaskorbinsku kiselinu (desno) dobivenih korištenjem različitih kolona



Slika 31. Usporedba kromatograma za dehidroaskorbinsku kiselinu dobivenih korištenjem različitih kolona



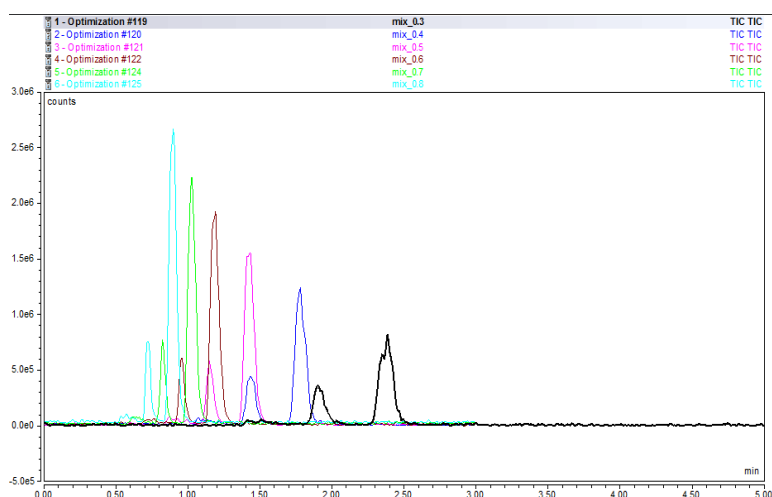
Slika 32. Usporedba kromatograma za smjesu analita korištenjem različitih kolona

3.2.5. Odabir optimalnog protoka

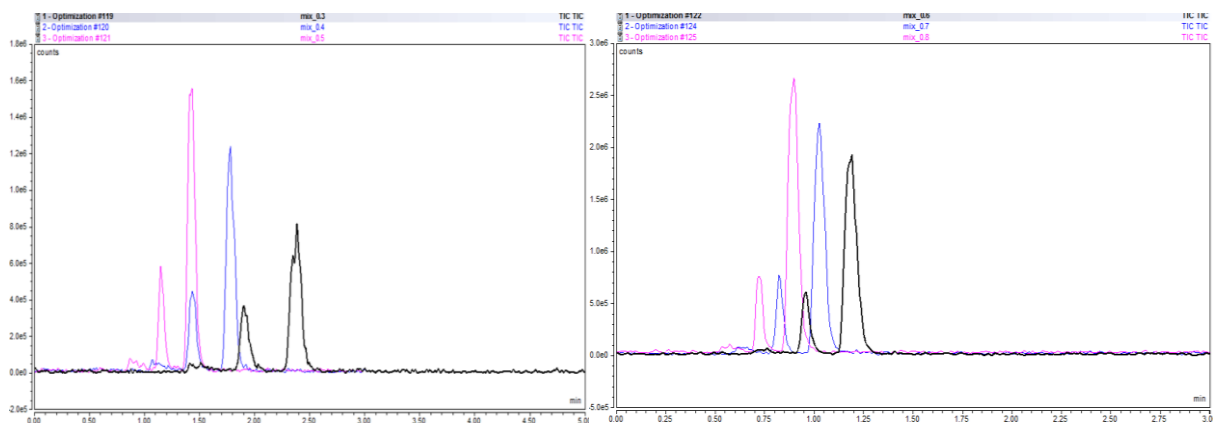
Nakon odabira pokretne, nepokretne faze te organskih modifikatora i otapala za pokretnu fazu, određeni su optimalni uvjeti mjerenja, u prvom redu protok kroz kolonu te temperatura iste.

Na računalnom program moguće je podesiti vrijednosti protoka te su postavljene vrijednosti istih u rasponu od 0,3 mL/min do 0,8 mL/min. Analizom signala dobivenih različitim vrijednostima protoka može se zaključiti kako brži protok pokretne faze uzrokuje bolje odzive na detektoru te je odabran protok u vrijednosti od 0,7 mL/min kojim je postignuto zadovoljavajuće razdvajanje analita, a pri kojem ne dolazi do značajnog povećanja tlaka na koloni.

Rezultati analize prikazani su u nastavku (slika 33. i 34.).



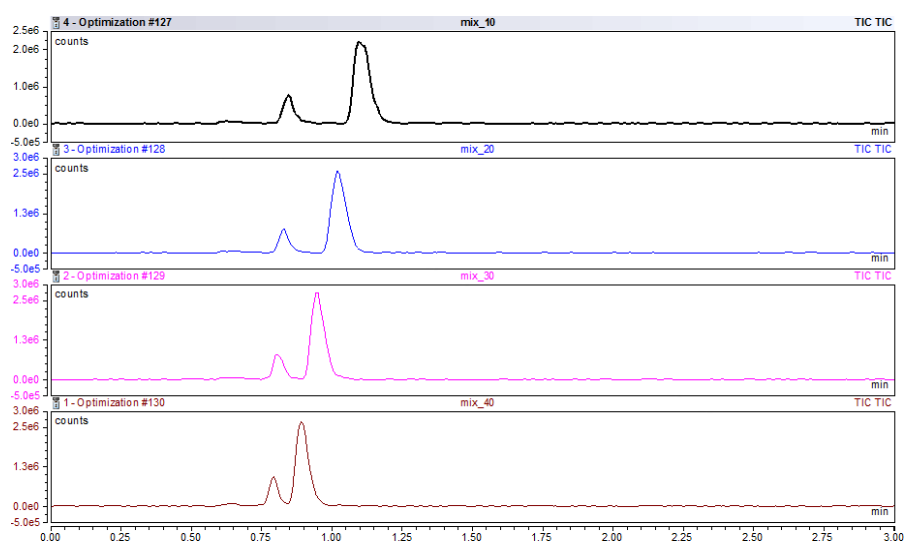
Slika 33. Usporedba kromatograma dobivenih korištenjem različitih brzina protoka pokretne faze



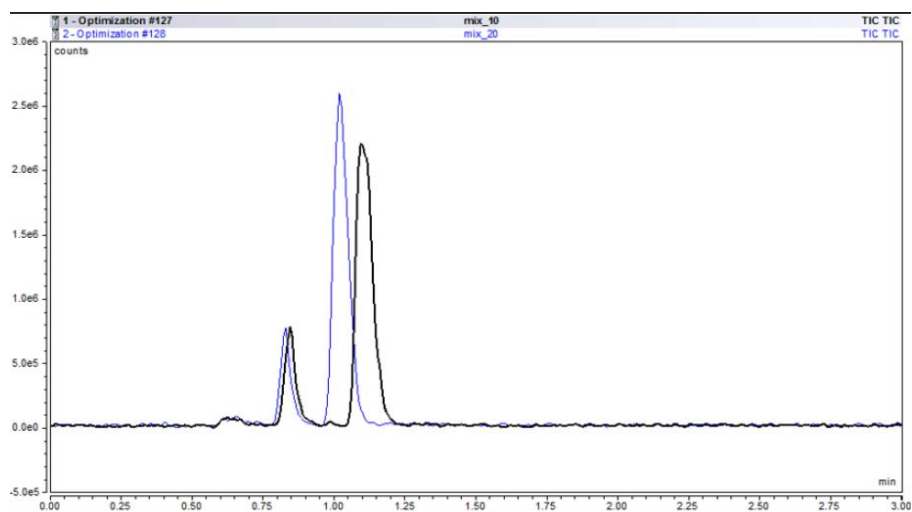
Slika 34. Usporedba kromatograma različitih vrijednosti protoka

3.2.6. Odabir optimalne temperature kolone

Pri optimizaciji temperature kolone, preko računalnog programa su podešene temperature u vrijednosti od 10 °C, 20 °C, 30 °C i 40 °C. Usporedbom kromatograma dobivenih uslijed korištenja različitih temperatura kolone (slika 35. i 36.), može se zaključiti kako niže temperature dovode do bolje separacije analita te da povišenjem iste ne dolazi do povećanja inteziteta signala. Stoga je odabrana temperatura od 20 °C koja je korištena u daljnjem razvoju metode.



Slika 35. Usporedba kromatograma dobivenih korištenjem različitih temperatura kolone



Slika 36. Usporedba kromatograma različitih vrijednosti temperature kolone

Konačni uvjeti UHPLC-a prikazani su u tablici 8.

Tablica 8. Optimalni uvjeti rada UHPLC-a

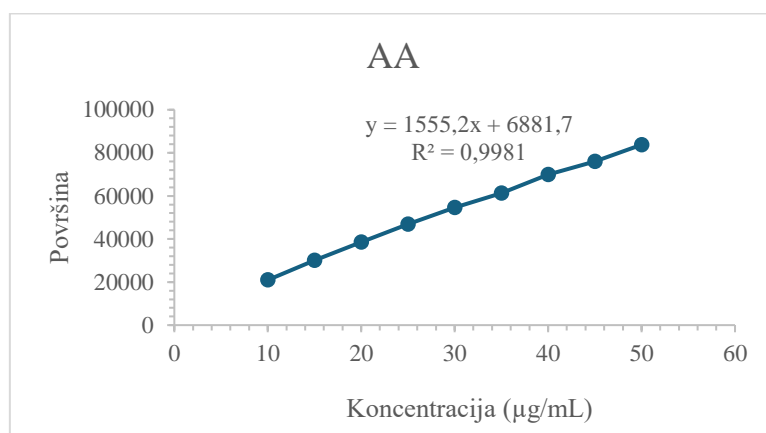
Nepokretna faza (kolona)	XDB-C18
Pokretna faza	Ultračista voda
Organski modifikator	0,1 %-tna octena kiselina
Protok	0,7 mL/min
Temperatura kolone	20°C
Volumen injektiranja	5 µL
Detektor	Trostruki kvadrupol (MRM način)

3.3. Vrednovanje metode

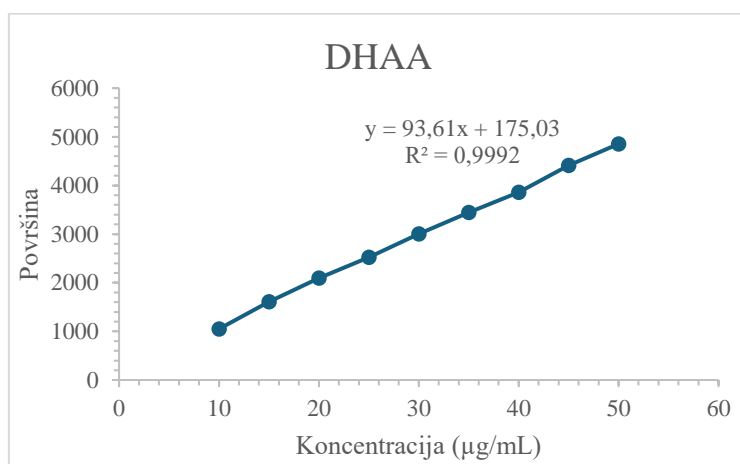
3.3.1. Raspon i linearnost

Kako bi se dobila zadovoljavajuća točnost i linearnost, koncentracijsko područje od 0,5 µg/mL do 50 µg/mL je podijeljeno na dvije krivulje umjeravanja za svaki od analita.

Pri izradi krivulje umjeravanja viših koncentracije korišteno je devet otopina koncentracija od 10 µg/mL do 50 µg/mL.

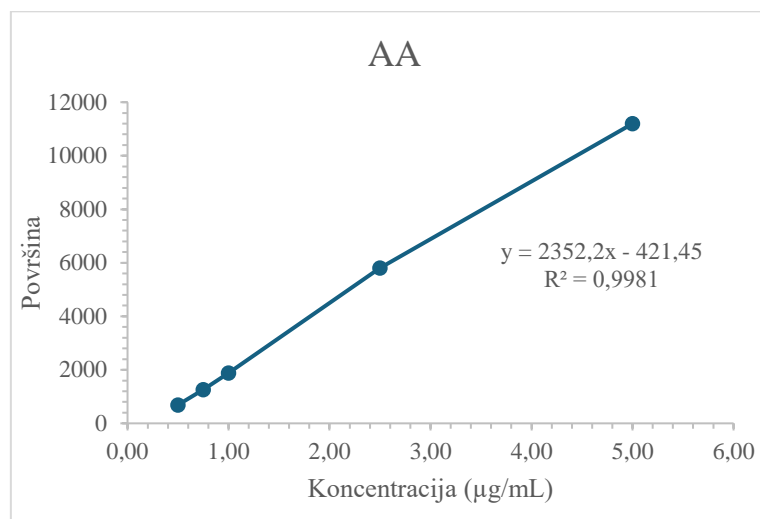


Slika 37. Krivulja umjeravanja askorbinske kiseline za koncentracijsko područje od 10 µg/mL do 50 µg/mL

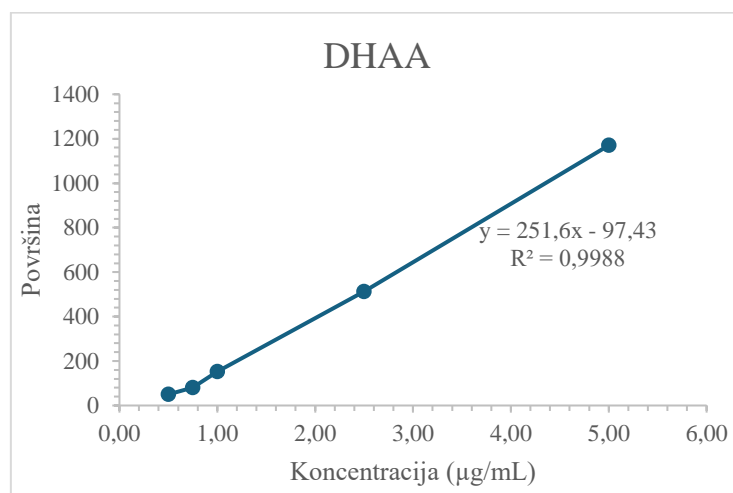


Slika 38. Krivulja umjeravanja askorbinske kiseline za koncentracijsko područje od 10 µg/mL do 50 µg/mL

Pri izradi krivulje umjeravanja nižih koncentracije korišteno je pet otopina koncentracija od 0,5 $\mu\text{g/mL}$ do 5,0 $\mu\text{g/mL}$.



Slika 39. Krivulja umjeravanja askorbinske kiseline za koncentracijsko područje od 0,5 $\mu\text{g/mL}$ do 5,0 $\mu\text{g/mL}$



Slika 40. Krivulja umjeravanja dehidroaskorbinske kiseline za koncentracijsko područje od 0,5 $\mu\text{g/mL}$ do 5,0 $\mu\text{g/mL}$

Linearnost metode se očituje u vrijednosti koeficijenta determinacije (R^2). Vrijednosti koeficijenata determinacije svakog od analita za pojedine krivulje umjeravanja vidljive su u tablici 9. i 10. Iz vrijednosti koeficijenta determinacije ($R^2 = 0,9981$) vidljivo je kako je postignuta dobra linearnost kada se razmatraju krivulje umjeravanja za askorbinsku kiselinu

(slika 37. i 39.). Najveća linearnost ($R^2 = 0,9992$) postignuta je kod krivulje umjeravanja za dehidroaskorbinsku kiselinu pri koncentracijskom rasponu od 10 $\mu\text{g/mL}$ do 50 $\mu\text{g/mL}$ (slika 38.). Krivulja umjeravanja prikazana na slici 40., pokazuje nešto manju linearnost ($R^2 = 0,9988$).

Tablica 9. Usporedba linearnost krivulja umjeravanja askorbinske kiseline

Askorbinska kiselina	Broj točaka, N	Nagib(a)	Odsječak(b)	R^2
	9	1555,2	6881,7	0,9981
	5	2352,2	-421,45	0,9981

Tablica 10. Usporedba linearnost krivulja umjeravanja dehidroaskorbinske kiseline

Dehidroaskorbinska kiselina	Broj točaka, N	Nagib(a)	Odsječak(b)	R^2
	9	93,61	175,03	0,9992
	5	251,6	-9743	0,9988

Dobivene R vrijednosti te vrijednosti nagiba za svaku od krivulja nalaze se u tablici 9. i tablici 10. S obzirom da nagib linearnog dijela krivulje umjeravanja predstavlja osjetljivost metode, može se zaključiti kako je razvijena metoda osjetljivija za askorbinsku kiselinu, a manje osjetljiva prema dehidroaskorbinskoj kiselini.

3.3.2. Granica dokazivanja i granica određivanja

Omjer signala i šuma za granicu dokazivanja iznosi 3, a za granicu određivanja iznosi 10.²⁶ Potrebno je definirati granicu dokazivanja i granicu određivanja pri ispitivanju uzoraka niskih koncentracija, odnosno kada se koncentracije uzoraka približavaju dvjema granicama. U tablici 11. i 12. prikazani su signali dobiveni uzastopnim injektiranjem analita.

Tablica 11. Signali dobiveni uzastopnim injektiranjem askorbinske kiseline

Signal	Visina	Šum	S/N
1	340420	23	14937
2	269021	17	16018
3	279230	31	9028
4	280048	18	15893
5	282171		
Srednja vrijednost	290178	22	13969
Standardno odstupanje	28542	6	3329
RSD (%)	9,84	29,48	23,83

Tablica 12. Signali dobiveni uzastopnim injektiranjem dehidroaskorbinske kiseline

Signal	Visina	Šum	S/N
1	24722	12	2083
2	18351	12	1484
3	17939	11	1636
4	18741	14	1368
5	19302	13	1460
Srednja vrijednost	19811	,12	1606
Standardno odstupanje	2791	1	283
RSD (%)	14,09	8,72	17,65

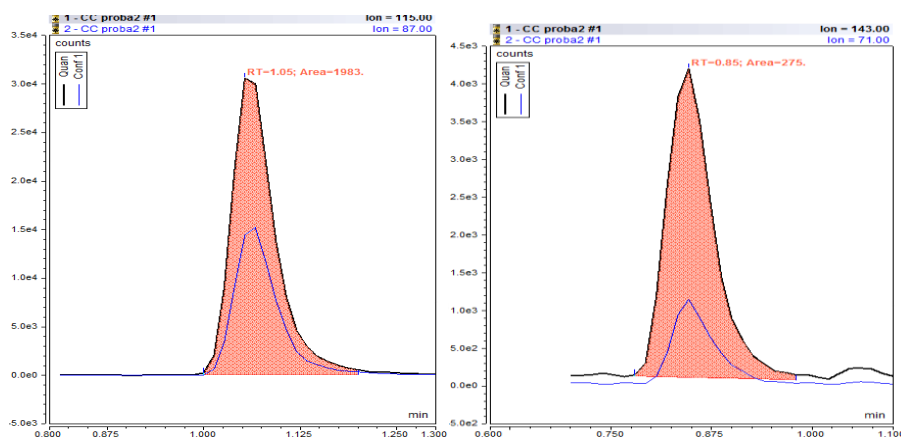
Pri određivanju granice dokazivanja (LoD, eng. *Limit of Detection*) i granice određivanja (LoQ, eng. *Limit of Quantification*) korištena je koncentracija askorbinske, odnosno dehidroaskorbinske kiseline od 10 µg/mL. Iz signala na detektoru te vrijednostima S/N (omjer visine signala i šuma) dobivenih četirima (askorbinska kiselina), odnosno pet uzastopnih injektiranja za dehidroaskorbinsku kiselinu dobivene su vrijednosti LoD i LoQ prikazane u tablici 13.

Tablica 13. Granice određivanja i dokazivanja za askorbinsku i dehidroaskorbinsku kiselinu

	Askorbinska kiselina	Dehidroaskorbinska kiselina
LoD (ng/mL)	2,1	18,7
LoQ (ng/mL)	7,2	62,3

3.3.3. Specifičnost

Specifičnost metode odnosno svojstvo metode da učinkovito odjeljuje analite od interesa uz što manje interferencija osigurana je korištenjem detektora spektrometra masa s trostrukim kvadrupolom, odnosno korištenjem MRM načina snimanja. Pri snimanju MRM spektra korištene su dvije različite reakcije fragmentacije za svaki od analita (Slika 41). Specifične reakcije fragmentacije su praćene na točno određenim optimiziranim energijama sraza s inertnim plinom čime se selektivnost dodatno povećava. Dakle, specifičnost UHPLC-MS/MS tehnike se očituje u mogućnosti razlikovanja reakcija fragmentacije pri kojima nastaju različiti produkti na temelju razlike u kolizijskoj energiji s argonom. Zbog navedenih razloga, optimizirana metoda se smatra specifičnom za određivane analite.



Slika 41. Specifičnost kvantitativnih prijelaza za askorbinsku (lijevo) i dehidroaskorbinsku kiselinu (desno)

3.3.4. Točnost

Točnost metode je svojstvo metode vrednovana usporedbom očekivane i dobivene vrijednosti koncentracija. Izražava se u obliku relativne pogreške, što je prikazano u tablici 13.

Tablica 13. Očekivane i eksperimentalno dobivene vrijednosti koncentracija te vrijednosti apsolutne i relativne pogreške (RE) za pojedino injektiranje

Askorbinska kiselina			Dehidroaskorbinska kiselina			
Očekivano	Eksperimentalno	Pogreška		Eksperimentalno	Pogreška	
µg/mL	µg/mL	Apsolutna	RE (%)	µg/mL	Apsolutna	RE (%)
10	9,35	-0,65	-6,54	9,04	-0,96	- 9,61
15	15,29	0,29	1,93	14,87	-0,13	- 0,89
20	20,50	0,50	2,49	20,36	0,36	1,80
25	25,11	0,11	0,46	25,69	0,69	2,77
30	30,22	0,22	0,74	30,63	0,63	2,10
35	34,91	-0,09	-0,25	34,97	-0,03	- 0,09
40	39,39	-0,61	-1,53	40,56	0,56	1,40
45	45,26	0,26	0,58	44,45	-0,55	- 1,22
50	49,97	-0,03	-0,06	49,43	-0,57	- 1,14
0,50	0,59	0,09	17,00	0,47	-0,03	- 5,40
0,75	0,71	-0,04	-5,20	0,72	-0,04	- 4,67
1,0	0,99	-0,01	-0,60	0,98	-0,02	- 2,30
2,5	2,42	-0,08	-3,12	2,65	0,15	5,84
5,0	5,04	0,04	0,74	4,94	-0,06	- 1,20

Vidljive su relativne pogreške (RE) u raponu od -6,54 do 17 % za askorbinsku te raspon od -9,61 do 5,84 % za dehidroaskorbinsku kiselinu što ukazuje na zadovoljavajuću točnost razvijene metode za kvantitativno i kvalitativno određivanje askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline.

3.3.5. *Ponovljivost*

Ponovljivost se ispituje na način da se otopina smjese dvaju analita od interesa kroz četiri različite koncentracije (jedna za niži raspon koncentracija, te LQC, MQC i HQC za viši raspon koncentracija) pripreme kroz pet ponavljanja, isti dan i od strane istog analitičara. Svaka od koncentracija i svako ponavljanje navedenih uzoraka je injektirano u instrument, izračunana je koncentracija pomoću krivulje umjeravanja te potom izračunano i relativno standardno odstupanje dobivene koncentracije (RSD %).

Vrijednosti RSD se nalaze unutar optimalnih vrijednosti, odnosno ispod 4 % isključujući otopine nižih koncentracija od 2,5 te 10 µg/mL. Visoke vrijednosti RSD za spomenute otopine ukazuju na moguće pogreške razrjeđenja uzorka pri pripravi nižih koncentracija.

Relativne standardne devijacije za svaku analiziranu koncentraciju askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline prikazane su u tablici 14.

Tablica 14. Ponovljivost

	Koncentracija	Askorbinska kiselina		Dehidroaskorbinska kiselina	
		Standardno odstupanje	RSD (%)	Standardno odstupanje	RSD (%)
Niže koncentracije	2,5 µg/mL	0,02	0,86	0,08	7,41
LQC	10 µg/mL	1,36	15,91	1,86	17,64
MQC	30 µg/mL	0,29	1,14	1,17	3,40
HQC	45 µg/mL	0,99	2,69	1,54	3,03

Može se, dakle zaključiti kako su razrjeđenja otopina napravljena precizno te da ne postoje znatne greške mjerenja na korištenoj instrumentaciji.

3.3.6. Srednja preciznost

Srednja preciznost se ispituje tako da se analize provode različitih dana i/ili od strane različitih analitičara, ali uz iste uvjete za iste koncentracije. Dobiveni rezultati analize su potom uspoređeni te prikazani u tablici 15.

Tablica 15. Srednja preciznost analize kroz dva dana sa dva različita analitičara

	Koncentracija	Askorbinska kiselina		Dehidroaskorbinska kiselina	
		Standardno odstupanje	RSD (%)	Standardno odstupanje	RSD (%)
Niže koncentracije	2,5 µg/mL	0,08	3,58	0,03	3,01
LQC	10 µg/mL	0,47	6,35	1,29	16,34
MQC	30 µg/mL	0,77	2,88	3,82	12,54
HQC	45 µg/mL	1,92	5,13	3,91	8,92

Visoke vrijednosti RSD ukazuju kako su se mjerenja obavila različitom preciznošću kroz dva dana te da dva analitičara nemaju jednaku preciznost kod pripreve otopina.

3.3.7. Robusnost

Robusnost metode je ispitana mjerenjem koncentracija otopina analita uz malu, namjernu promjenu vrijednosti protoka (0,6 mL/min i 0,8 mL/min) i temperature (16 °C, i 24 °C). U tu svrhu su korištene otopine analita u koncentracijama od 2,5 µg/mL, 10 µg/mL (LQC), 30 µg/mL (MQC) te 45 µg/mL (HQC). Dobiveni rezultati pokazuju kako promjene protoka i temperature u određenom rasponu znatno ne utječu na robusnost metode kada je riječ o askorbinskoj kiselini, dok je utjecaj nešto veći kada je riječ o dehidroaskorbinskoj kiselini (tablica 16. i 17.).

Tablica 16. Robusnost analize za parametar protoka

	Koncentracija	Askorbinska kiselina		Dehidroaskorbinska kiselina	
		Standardno odstupanje	RSD (%)	Standardno odstupanje	RSD (%)
Niže koncentracije	2,5 µg/mL	0,10	3,38	0,46	37,08
LQC	10 µg/mL	0,27	2,39	1,53	7,85
MQC	30 µg/mL	0,68	1,92	3,63	6,73
HQC	45 µg/mL	0,75	1,48	3,33	4,48

Tablica 17. Robusnost analize za parametar temperature

	Koncentracija	Askorbinska kiselina		Dehidroaskorbinska kiselina	
		Standardno odstupanje	RSD (%)	Standardno odstupanje	RSD (%)
Niže koncentracije	2,5 µg/mL	0,09	2,95	0,03	1,77
LQC	10 µg/mL	0,60	5,52	2,29	10,89
MQC	30 µg/mL	1,09	3,07	5,67	9,98
HQC	45 µg/mL	1,22	2,39	5,32	6,86

3.3.8. *Stabilnost*

Svojstvo stabilnosti analita u vodenoj otopini ispitano je ponavljajućim injektiranjem istih otopina standarda te promatranjem promjena odziva na detektoru unutar vremenskog okvira od 24 h. Otopine analita koncentracija 2,5 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL i 45 µg/mL su zasebno injektirane, a rezultati očitani na detektoru. Dobivena koncentracija je uspoređivana sa koncentracijama istih otopina nakon 1 h, 2 h, 3 h, 5 h te nakon 24 h (tablica 18).

Provedena analiza stabilnosti standardnih otopina pokazuje neznatno odstupanje u mjerenim koncentracijama u periodu od 5 sati nakon priprave otopina. Međutim, unutar 24 sata je vidljiva znatna degradacija analita askorbinske kiseline. Oksidacija askorbinske kiseline uzrokuje povišenje koncentracije dehidroaskorbinske kiseline kao njenog produkta. Isti trend nestabilnosti uočen je kod svih mjerenih koncentracija.

Tablica 18. Stabilnost analita za koncentracije od 2,5 i 30 µg/mL

	Askorbinska kiselina	Dehidroaskorbinska kiselina	Askorbinska kiselina	Dehidroaskorbinska kiselina
Koncentracija	2,5 µg/mL		30 µg/mL	
odmah	2,19	1,09	26,83	27,99
1 h	2,399	1,02	29,49	33,39
2 h	2,46	1,03	30,09	37,09
3 h	2,31	1,02	28,49	38,05
5h	2,13	1,04	26,78	40,02
24 h	0,34	1,06	/	72,53

3.3.9. Prikladnost sustava – ponovljivost injektiranja

Prikladnost sustava određena je kao ponovljivost injektiranja te je ispitana tako da je ista otopina standarda koncentracije 20 µg/mL injektirana kroz pet uzastopnih ponavljanja. Svakom injektiranju je pridružena koncentracija izračunata korištenjem krivulja umjeravanja dobivenih razvojem metode. Izračunato je relativno standardno odstupanje (RSD %) koje za askorbinsku kiselinu iznosi 0,13 %, odnosno 3,76 % za dehidroaskorbinsku kiselinu. Dobiveni rezultati parametra ponovljivosti injektiranja, odnosno niske vrijednosti relativne standardne devijacije (RSD) prikazane u tablici 19., potvrđuju prikladnost sustava.

Tablica 19. Ponovljivost sustava

MQC (µg/mL)	20			
	Askorbinska kiselina		Dehidroaskorbinska kiselina	
	Odziv	Koncentracija	Odziv	Koncentracija
1	36518	19,06	2269	22,37
2	36488	19,04	2253	22,19
3	36569	19,09	2317	22,88
4	36478	19,03	2439	24,19
5	36481	19,03	2399	23,76
Prosjek	36507	19,05	2335	23,08
Standardno odstupanje	38,00	0,02	81	0,87
RSD (%)	0,10	0,13	3,47	3,76

3.4. Analiza realnog uzorka

Metoda je testirana na realnim uzorcima Cedevite i vrećice Naturel Vitamin C. Otopina Cedevite je pripremljena otapanjem 0,1 g uzorka Cedevite u odmjerne tikvici od 10 mL pazeći pritom na donji meniskus prozirne otopine. Uzorak vitamina C iz vrećice je pripremljen vaganjem 0,03 g te otapanjem istoga u odmjerne tikvici od 250 mL. Pritom su deklarirana masa vitamina C za Cedevitu 213 mg u 100 g proizvoda, a deklarirana koncentracija vitamina C u vrećici od 3 g Naturel Vitamina C iznosi 500 mg. Spomenuti uzorci su profiltrirani kroz filter promjera čestica 0,2 μm te injektirani automatskim uzorkivačem u UHPLC-MS/MS unutar MRM načina snimanja. Pripravljene su otopine realnih uzoraka koncentracije 20 $\mu\text{g/mL}$ za uzorak Cedevite, odnosno 25 $\mu\text{g/mL}$ za uzorak Naturel Vitamin C.

Koristeći dobivene krivulje umjeravanja iz poglavlja 3.4.1., određene su koncentracije analita od interesa iz pojedinih uzoraka, a izmjerene koncentracije analita iz realnih uzoraka prikazane su u tablici 20. i 21.

Tablica 20. Prikaz dobivenih koncentracija askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline iz uzorka Cedevite

Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)		
	Askorbinska kiselina	Dehidroaskorbinska kiselina
Cedevita	20,61	0,72
	20,03	0,69
	20,63	0,72
Prosjek	20,42	0,71
Standardno odstupanje	0,34	0,02
RSD (%)	1,66	2,16

Tablica 21. Prikaz dobivenih koncentracija askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline iz uzorka dodatka prehrani (vrećica Naturel Vitamin C)

Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)		
	Askorbinska kiselina	Dehidroaskorbinska kiselina
Vitamin C (vrećica)	24,51	1,81
	24,70	1,96
	25,06	2,13
Prosjek	24,75	1,97
Standardno odstupanje	0,28	0,16
RSD (%)	1,12	8,18

Uzete su prosječne koncentracije askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline te su računski dobivene mase analita askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline u uzorcima (tablica 22.).

Tablica 22. Usporedba deklariranih masa vitamina C s izmjerenim masa askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline u uzorcima

Realni uzorak	Deklarirana masa vitamina C	Izmjerena masa	
		AA	DHAA
Cedevita	213 mg / 100 g proizvoda	203 mg	7 mg
Naturel	500 mg / 3g proizvoda (1 vrećica)	603 mg	48 mg

Navedenim postupcima ispitana je i potvrđena primjenjivost metode na analizu askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline iz realnih uzoraka.

4. ZAKLJUČAK

Razvijena je metoda za istovremeno kvalitativno i kvantitativno određivanje askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline koristeći tehniku UHPLC-MS/MS.

Kao otapalo za pripremu standardnih otopina askorbinske i dehidroaskorbinske kiseline korištena je ultračista voda.

Provedenom optimizacijom spektrometrije masa je određeno kako je optimalni negativan način rada spektrometra. Napon elektrospreja na kapilari je 3600 V, a ulazni tlak plina u kolizijskoj ćeliji iznosi 1,5 mTorr. Protoci plinova potrebni u stvaranju fine maglice iznose redom, protok plina za stvaranje fine maglice iznosi 43,9 arb., protok pomoćnog plina za stvaranje fine maglice iznosi 6,1 arb., protok plina za poboljšavanje fine maglice iznosi 0 arb.

Određeni su kvantitativni prijelaz 175→115 pri energiji sraza 10 V i kvalitativni prijelaz 175→87 pri energiji sraza 17 V uz napon fokusirajućih leća od 62 V za askorbinsku kiselinu. Za dehidroaskorbinsku kiselinu su određeni kvantitativni prijelaz 173→143 pri energiji sraza 8 V i kvalitativni prijelaz 173→71 pri energiji sraza 12 V uz napon fokusirajućih leća od 67 V.

Provedenom optimizacijom tekućinske kromatografije određeno je kako je optimalna pokretna faza 0,1 % vodena otopina octene kiseline. Kao nepokretna faza korištena je kolona ZORBAX Eclipse XDB – C18, dimenzija 100 mm × 3,5 mm te veličinom čestica od 3,5 μm. Optimizirani uvjeti kromatografa su protok pokretne faze od 0,7 mL/min, temperatura kolone od 20 °C te volumen injektiranja od 5 μL. Kao detektor u spektrometriji masa korišten je spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom i MRM načinom snimanja.

Kreirane su dvije krivulje umjeravanja. Krivulja umjeravanja u koncentracijskom rasponu od 10 μg/mL do 50 μg/mL te krivulja umjeravanja koncentracijskog raspona od 0,5 μg/mL do 5,0 μg/mL za oba određivana analita. Iz dobivenih krivulja umjeravanja, a očitavajući vrijednosti R^2 za svaki analit može se zaključiti kako je dobivena metoda osjetljivija prema analitu askorbinske kiseline, a nešto manje osjetljiva prema dehidroaskorbinskoj kiselini. Određene su granice dokazivanja za askorbinsku (0,0021 μg/mL) i dehidroaskorbinsku kiselinu (0,0187 μg/mL) te granice određivanja (0,0072 μg/mL za askorbinsku i 0,0623 μg/mL za dehidroaskorbinsku kiselinu). Odgovarajuća specifičnost se postiže uporabom spektrometra masa s trostrukim kvadrupolom te pospješena korištenjem MRM načina snimanja. Ispitani su parametri točnosti, ponovljivosti, srednje preciznosti izraženi u obliku relativne standardne

devijacije te je nađeno kako vrijednosti istih neznatno odstupaju od zadanih. Određeno je kako je metoda robusna za promjene protoka pokretne faze te za promjene temperature kolone. Ispitivanjem stabilnosti otopina standarda određeno je da stabilnost analita, osobito kada je riječ o askorbinskoj kiselini, značajno opada tijekom 24 sata. Ponavljanjem injektiranja istih otopina standarda određene poznate koncentracije ispitana je i potvrđena prikladnost sustava.

Naposljetku, analizom realnih uzoraka – praha za pripravu napitaka koji sadrže analite od interesa i određivanjem istih, potvrđena je primjenjivost kreirane metode za buduće analize.

5. POPIS KRATICA I SIMBOLA

AA – askorbinska kiselina (engl. *Ascorbic Acid*)

DHAA – dehidroaskorbinska kiselina (engl. *Dehydroascorbic Acid*)

IUPAC – Međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic Acid*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)

UHPLC – tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*)

pK_a – konstanta disocijacije kiseline

pH – mjera kiselosti (lat. *Potentia Hydrogenii*)

LC – tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*)

GC – plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*)

SFC – fluidna kromatografija pri superkričnim uvjetima (engl. *Supercritical fluid chromatography*)

NMR – nuklearna magnetska rezonancija (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*)

IR – infracrvena spektroskopija (engl. *Infrared Spectroscopy*)

FTIR – Fourierova transformacija infracrvene spektroskopije (engl. *Fourier transform Infrared*)

ELSD – detektor raspršenja svjetlosti u uparenom uzorku (engl. *Evaporative Light-Scattering Detector*)

RID – detektor indeksa loma (engl. *Refractive Indeks Detector*)

MS – spektrometar masa (engl. *Mass Spectrometer*)

ESI – ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionization*)

Q – kvadrupolni analizator (engl. *Quadrupole Mass Analyzer*)

MS/MS – tandemaska spektrometrija masa (engl. *Tandem Mass Spectrometry*)

ICH – Međunarodna konferencija o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonization*)

GD – granica dokazivanja (engl. *Limit of Detection, LoD*)

GO – granica određivanja (engl. *Limit of Quantification, LoQ*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *Ethylendiaminetetraacetic Acid*)

CAS – referentna arhiva za kemiju i primijenjenu kemiju (engl. *Chemical Abstracts Service*)

LQC – kontrola kvalitete na niskoj koncentraciji (engl. *Low Quality Control*)

MQC – kontrola kvalitete na srednjoj koncentraciji (engl. *Medium Quality Control*)

HQC – kontrola kvalitete na visokoj koncentraciji (engl. *High Quality Control*)

CID – ulazni tlak plina argona u kolizijskoj ćeliji (engl. *Collision – Induced Dissociation Gas*)

UV-Vis – ultraljubičasti i vidljivi dio elektromagnetskog zračenja (engl. *Ultraviolet and Visible emissions*)

DAD – detektor s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector*)

SRM – praćenje odabranih reakcija fragmentacije (engl. *Selected Reaction Monitoring*)

CE – energija sraza (engl. *Collision Energy*)

TIC – istovremeno snimanje ukupne struje iona (engl. *Total Ion Chromatogram*)

MRM – praćenje višestrukih reakcija fragmentacije (engl. *Multiple Reaction Monitoring*)

R^2 – korelacijski faktor

S/N – omjer signala i šuma (engl. *Signal to Noise Ratio*)

UHPLC-MS/MS – tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti spregnuta s tandemskom spektrometrijom masa (engl. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*)

RE – relativna pogreška (engl. *Relative Error*)

RSD – relativna standardna devijacija (engl. *Relative Standard Deviation*)

Arb. – proizvoljne (arbitrarne) jedinice

m/z – omjer mase i naboja (engl. *Mass to Charge Ratio*)

6. LITERATURA

1. *J. Fennol, A. Martínez, P. Hellín, P. Flores*, Simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in vegetables and fruits by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry, *Food Chem.*, **127** (2011) 340-344, doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.140.
2. *M. B. Davies, J. Austin, D. A. Partridge*, *Vitamin C: Its Chemistry and Biochemistry*. The Royal Society of Chemistry, Letchworth, 1991, str. 1-7.
3. *X. Z. See, W. S. Yeo, A. Saptorio*, A Comprehensive Review and Recent Advances of Vitamin C: Overview, functions, sources, applications, market survey and processes, *Chem. Eng. Res. Des.*, **206** (2024) 108-129, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2024.04.048>.
4. *B. Zümreoglu-Karan*, The Coordination Chemistry of Vitamin C: An Overview, *Coord. Chem. Rev.*, **250** (2006) 2295-2307, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.002>.
5. *A. Gentili, F. Caretti*, Analysis of Vitamins by Liquid Chromatography, *J. Liq. Chromatogr.*, (2013) 477-517, doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415806-1.00018-8>.
6. URL: <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/a/ascorbic-acid.html> (23.09.2024.)
7. *M. Szulika, M. Buszewska-Forajta, R. Kaliszan, B. Buszewski*, Determination of ascorbic acid and its degradation products by high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, *Electrophoresis*. **35** (2014) 585-592.
8. *R. B. Findik, F. Ilkaya, S. Guresci, H. Guzel, S. Karabulut, J. Karakaya*, Effect of vitamin C on collagen structure of cardinal and uterosacral ligaments during pregnancy, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **201** (2016), 31-35, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.03.022>.
9. *J. Yang, V. Kojasoy, G. J. Porter, R.T. Raines*, Pauli Exclusion by $n \rightarrow \pi^*$ Interactions: Implications for Paleobiology, *J. Am. Chem. Soc.*, (2024), doi:<https://doi.org/10.1021/acscentsci.4c00971>.

10. *M. Fuente, C. Sánchez, C. Vallejo, E. Díaz-Del Cerr*, Vitamin C and vitamin C plus E improve the immune function in the elderly, *Exp. Gerontol.*, **142** (2020), 111118, doi: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111118>.
11. *E. O'Connor, T. Mündel, M. J. Barnes*, Nutritional Compounds to Improve Post-Exercise Recovery, *Nutrients*, **14** (2022) 5069, doi: <https://doi.org/10.3390/nu14235069>.
12. *K. H. Hellwich, R. M. Hartshorn, A. Yerin, T. Damhus, A.T. Hutton*, Brief Guide to the Nomenclature of Organic Chemistry, *Pure Appl. Chem.*, **92** (2020), 527-539, doi: <https://doi.org/10.1515/pac-2019-0104>.
13. *R. B. Rucker, F. Steinberg*, *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Vol. 4. Elsevier Science, Nizozemska, 2014, str. 367-371.
14. *M.A. Kall*, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Vol. 2, Academic Press, **2003**, str. 316-324, doi: <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00068-7>.
15. *M. Levine, I. Ebunuwa, P. C. Violet*, *Essential and Toxic Trace Elements and Vitamins in Human Health*, Academic Press, **2020**, str. 241-262. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805378-2.00018-8>
16. *A. Podsędek*, Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review, *LWT – Food Sci. Technol.*, **40** (2007) 1-11, doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.07.023>.
17. *G. F. Combs, J. P. McClung*, *The Vitamins*, Academic Press, **2017**, str. 267-295, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802965-7.00010-1>.
18. *Nj. Radić, L. Kukoč Modun*, *Uvod u analitičku kemiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2016, str. 19-22.; 630-59.
19. *D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch*, *Principles of Instrumental Analysis*, 7th edition, Cengage Learning, Boston, 2016, str. 253-273; 501-536; 695-745.
20. *D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch*, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th edition, Mary Finch., Belmont, 2014, str. 847-934.
21. *B. Štraus, A. Stavljenić-Rukavina, F. Plavšić*, *Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju*, Medicinska naklada, Zagreb, 1997, str. 246-257.

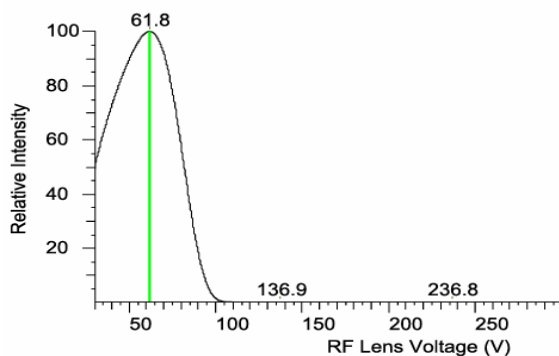
22. *M. Taleuzzaman, S. Ali, S. J. Gilani, S.S. Imam, A. Hafeez*, Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review, *Austin J. Anal. Pharm. Chem.*, **2** (2015), 1056.
23. *R. Basharat, V. Kotra, L. Yen Loong, A. Mathews, M. M. Kanakal, P. Devi, S. Nyamathulla, R. Varala, L. C. Ming, K. Sambasiva Rao, B. Hari Babu, M. Mujahid Alam*, Ultra Performance Liquid Chromatography (Mini-Review), *Orient. J. Chem.*, **37** (2021) 847-857, doi: <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/370411>.
24. *D.G. Watson*, *Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*, Vol. 3, Churchill Livingstone Elsevier, Edinburg, 2012, str. 353.
25. *M. Runje*, *Razvoj analitičkih metoda za određivanje onečišćenja u djelatnoj farmaceutskoj tvari nepafenaku*, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2018.
26. ICH Harmonised tripartite guideline, Validation of analytical procedure: Text and methodology Q2 (2005)
27. *A. Shrivastava, V. B. Gupta*, Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods, *Chron. Young Sci.* **2** (2011) 21-5, doi: <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>.
28. *D. C. Harris*, *Quantitative Chemical Analysis*, 7. izdanje, W. H. Freeman and Company, New York, 2007., str. 489.
29. *G. Burini*, Development of a quantitative method for the analysis of total L-ascorbic acid in foods by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **1154** (2007), 97-102, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.013>.
30. *L. Novakova, P. Solich, D. Solichova*, HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids, *Trend. Anal. Chem.*, **27** (2008), 942-958, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.08.006>.
31. URL: <https://www.caymanchem.com/product/29089/dehydroascorbic-acid> (13.10.2024)
32. *S. C. Moldoveanu*, Comparison of several HPLC methods for the analysis of vitamin C, *Biomed Chromatogr.*, **38** (2024), 1-11, doi: <https://doi.org/10.1002/bmc.5753>.

7. PRILOZI

Prilog 1. Radiofrekventni napon leće (lijevo askorbinska kiselina, desno dehidroaskorbinska kiselina)

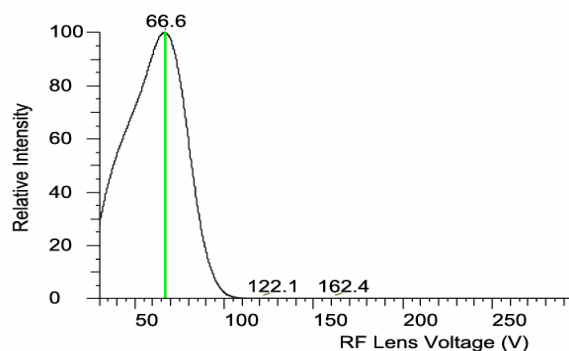
Optimizing RF Lens of Ion 175.000 in Q1MS (-)

Optimal Value: 62 V; Optimal Intensity: 1.35E+007



Optimizing RF Lens of Ion 173.000 in Q1MS (-)

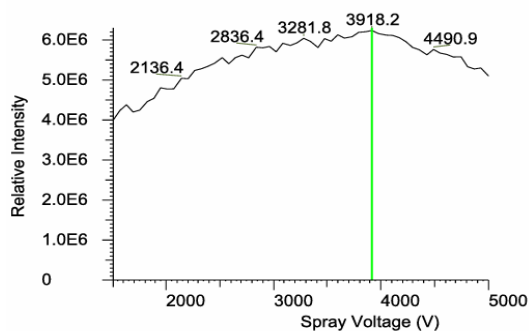
Optimal Value: 67 V; Optimal Intensity: 1.05E+005



Prilog 2. Napon na kapilari (lijevo askorbinska kiselina, desno dehidroaskorbinska kiselina)

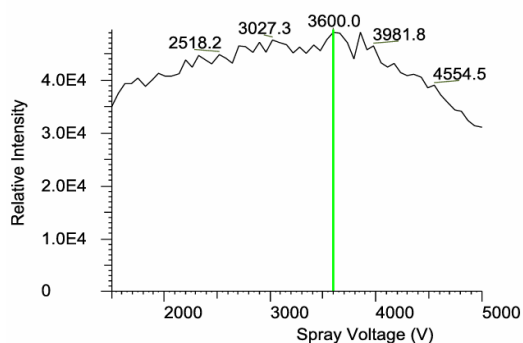
Optimizing Spray Voltage for Ion 175.000 in Q1MS (-)

Optimal Spray Voltage = 3918.182



Optimizing Spray Voltage for Ion 173.000 in Q1MS (-)

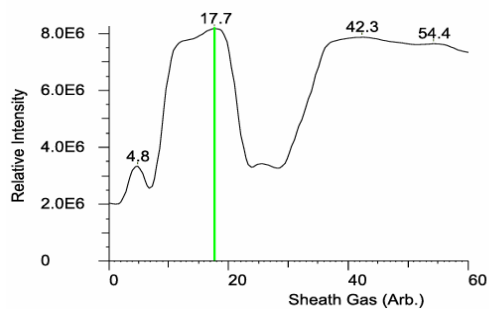
Optimal Spray Voltage = 3600



Prilog 3. Plin za stvaranje fine maglice (lijevo askorbinska kiselina, desno dehidroaskorbinska kiselina)

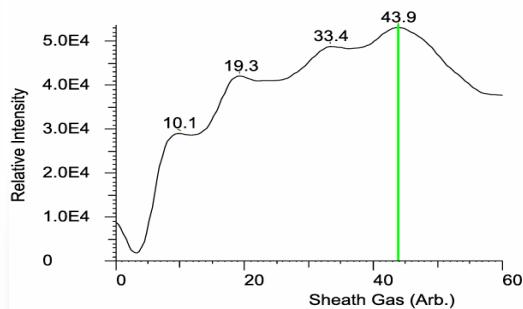
Optimizing Sheath Gas for Ion 175.000 in Q1MS (-)

Optimal Sheath Gas = 17.718



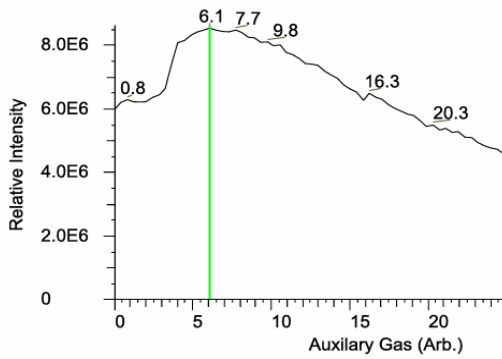
Optimizing Sheath Gas for Ion 173.000 in Q1MS (-)

Optimal Sheath Gas = 43.893

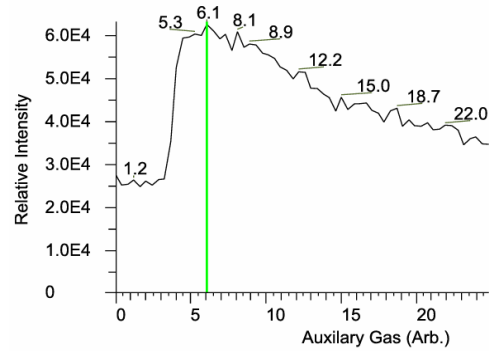


Prilog 4. Pomoćni plin za stvaranje fine maglice (lijevo askorbinska kiselina, desno dehidroaskorbinska kiselina)

Optimizing Auxiliary Gas for Ion 175.000 in Q1MS (-)
Optimal Auxiliary Gas = 6.098

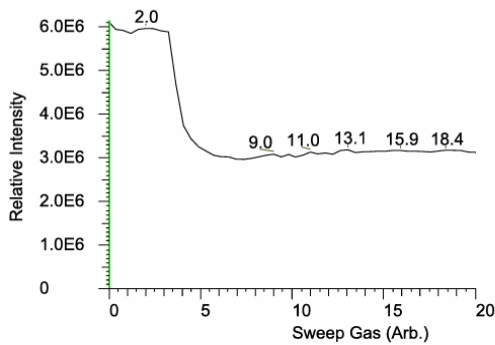


Optimizing Auxiliary Gas for Ion 173.000 in Q1MS (-)
Optimal Auxiliary Gas = 6.098



Prilog 5. Plin za poboljšavanje fine maglice (lijevo askorbinska kiselina, desno dehidroaskorbinska kiselina)

Optimizing Sweep Gas for Ion 175.000 in Q1MS (-)
Optimal Sweep Gas = 0



Optimizing Sweep Gas for Ion 173.000 in Q1MS (-)
Optimal Sweep Gas = 0

