
Vojislav Gligorovski

Poređenje analitičkih metoda za određivanje vitamina C u farmaceutskim preparatima

Razvijena je kinetička metoda za određivanje vitamina C čija je tačnost i preciznost upoređena sa pet analitičkih metoda, određivanjem količina vitamina C u realnim uzorcima. Metoda se zasniva na praćenju inhibirane reakcije metilenskog plavog sa vitaminom C. Procenjeni optimalni uslovi su sledeći: pH = 3.0, koncentracija metilenskog plavog: 9.6 mg/L, koncentracija jona vanadata: 21.2 mg/L. Vitamin C se ovom metodom može odrediti i u prisustvu vitamina B1 i B9, glukoze, fruktoze, saharoze i rastvorljivog skroba. Metoda je upoređena sa jodimetrijom, dve kiselinsko-bazne titracije, spektrofotometrijom i HPLC-MS metodom. Svih šest metoda ispitane su na tri tipa uzorka: tablete vitamina C Galenika i Ekofarm i prašak za razmućivanje Cedevita. Poređenjem deklariranih i određenih vrednosti mase zaključuje se da je HPLC-MS metoda najpogodnija za određivanje vitamina C u sva tri uzorka. Pored HPLC-MS metode za određivanje veće količine vitamina C (prva dva uzorka) pogodna je i jodimetrija dok su za manje količine (uzorak Cedevite) pogodnije kinetička metoda i spektrofotometrija.

Uvod

Vitamin C je naziv za L-askorbinsku kiselinu i njene soli. Spada u grupu hidrosolubilnih vitamina i predstavlja jak antioksidant koji redukuje slobodne radikale nastale pri metaboličkim procesima. Askorbinska kiselina je prisutna u voću i

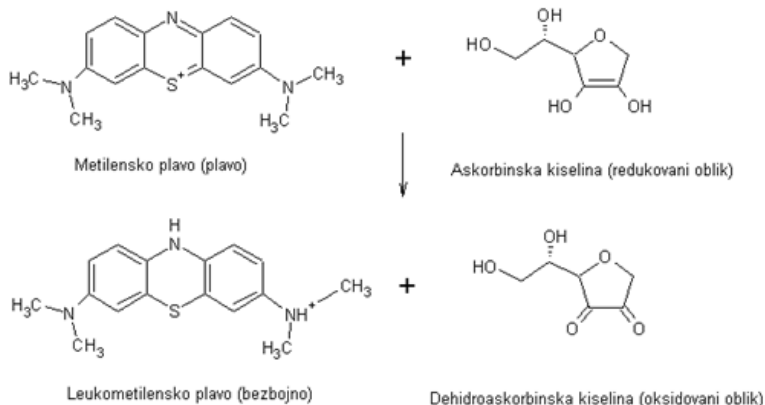
povrću, gde se nalazi u svim zelenim delovima biljke (Brody 1994). Preporučena dnevna doza za odrasle ljude je 90 mg na dan, a ne savetuje se uzimanje dnevne doze veće od 2000 mg jer u tim količinama vitamin C oštećuje bubrege (US Recommended Dietary Allowance, RDA). Najčešće se ishranom postiže dovoljan unos ovog vitamina. U slučajevima hipovitaminoze (uglavnom izazvane stresom) vitamin C se uzima u vidu tableta za oralnu upotrebu. Bolest koja nastaje kao posledica dugotrajnog nedostatka vitamina C u organizmu se naziva skorbut. Karakteristični simptomi skorbuta su promene na koži i vezivnom tkivu usled poremećaja u sintezi kolagena.

Usled apsorpcije u ultraljubičastoj (UV) oblasti i kiselih i redukcionih svojstava, brojni su načini njegove kvantifikacije: jodimetrijski, acidimetrijski, hromatografski, spektrofotometrijski i elektrohemijski (Cvetković *et al.* 2012). Zbog nestabilnosti vitamina C na vazduhu i svetlosti potrebna je njegova česta kontrola u farmaceutskim preparatima metodom koja je brza i primenljiva na takvu vrstu uzoraka, ali koja ima i opravdanje sa komercijalnog stanovišta (Milutinović i Vulović 2002).

Spektrofotometrijske metode se zasnivaju na praćenju količine svetlosti koju apsorbuje rastvor određene supstance date koncentracije. Posebna vrsta spektrofotometrijskih metoda su kinetičke metode kod kojih se koncentracija ispitivanog analita određuje merenjem brzine reakcije u kojoj on učestvuje (Perez-Bendito i Silva 1988).

U ovom radu ispitivane su dve spektrofotometrijske metode za određivanje koncentracije vitamina C. Jedna je spektrofotometrijsko određivanje vitamina C merenjem apsorbanse u UV delu spektra koja se javlja usled prisustva askorbinske kiseline (Selimović *et al.* 2011). Druga

Vojislav Gligorovski (1995), Beograd, Skadarska 17, učenik 3. razreda Matematičke gimnazije u Beogradu



Slika 1. Jednačina reakcije metilenskog plavog sa askorbinskom kiselinom

Figure 1. Equation of reaction of methylene blue with ascorbic acid

pripada kinetičkim metodama i zasnovana je na praćenju zavisnosti brzine reakcije boje metilensko plavo sa askorbinskom kiselinom od koncentracije askorbinske kiseline. Na brzinu ove reakcije utiče prisustvo jona prelaznih metala kao što su bakar(II), vanadijum(V), gvožđe(III) i mangan(II) (Khan i Sarwar 2001). Reakcija između askorbinske kiseline i metilenskog plavog data je na slici 1.

Hromatografske metode podrazumevaju razdvajanje komponenti smeše koja se ispituje pre kvalitativne ili kvantitativne analize njenih sastojaka. Za kvantitativno određivanje vitamina C od hromatografskih metoda najčešće se koristi kuplovana HPLC-MS tehnika (High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry).

Pet najkorišćenijih metoda za određivanje askorbinske kiseline su spektrofotometrija, titracija uz bromtimol-plavo kao indikator, titracija uz fenolftalein kao indikator, jodimetrija, HPLC-MS. Ni za jednu od njih se ne može reći da je najpogodnija jer one preciznije zahtevaju skupe aparate ili reagense dok one jeftinije imaju manju preciznost ili su potpuno neprimenljive na realne uzorke vitamina C. Uprkos dostupnosti i efikasnosti kinetičkih metoda, postoji relativno mali broj koje se koriste za određivanje vitamina C.

Cilj ovog rada je razvijanje nove kinetičke metode za određivanje askorbinske kiseline i njeno poređenje sa do sada korišćenim metodama za određivanje vitamina C uz ispitivanje primenljivosti na realnim uzorcima.

Materijal i metode

Eksperiment se sastojao od šest etapa tokom kojih je pri svakoj korišćena druga metoda za određivanje vitamina C. Prvi korak se razlikovao od ostalih po tome što je u njemu razvijena nova metoda za kvantifikaciju vitamina C, dok su tokom ostalih pet korišćene do sada poznate metode: spektrofotometrija, dve kiselinsko-bazne titracije, jodimetrijska titracija i HPLC-MS. Kinetička metoda je zahtevala dodatan rad u odnosu na ostale korišćene metode jer za nju nisu bili poznati optimalni uslovi, te su tako određene optimalne koncentracije reaktanata i ispitivanja njena selektivnost prema supstancama koje se najčešće nalaze zajedno sa vitaminom C u komercijalno dostupnim proizvodima.

Kinetička metoda

Kinetička metoda je razvijena praćenjem brzine reakcije boje metilensko plavo sa askorbinskom kiselinom (Ascorbic acid, AA) pri talasnoj dužini na kojoj se javlja maksimum apsorpcije boje metilensko plavo (Methylene Blue, MB), koja iznosi 665 nm. Izraz za brzinu te reakcije je (Khan i Sarwar 2001):

$$v = k \cdot [\text{MB}] \cdot [\text{AA}] \cdot [\text{H}^+]$$

Apsorbance pripremljenih rastvora merene su uređajem Thermo Scientific Evolution 60S UV-Visible Spectrophotometer u kvarcnim kivetama optičkog puta $a = 1.0$ cm, pri temperaturi okoline $t = (25.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$. Kao slepa proba korišćen je rastvor u kome su koncentracije pufera,

vode i vitamina C jednake kao i u ispitivanoj smeši. Merenja apsorbance su započinjana 12 s nakon dodavanja poslednjeg reaktanta. pH vrednost smeše je iznosila (3.0 ± 0.2), merena je pH-metrom i održavana je konstantom pomoću pufera koji se sastojao od limunske kiseline koncentracije 0.1000 mol/L i natrijum-hidrogen-fosfata koncentracije 0.2000 mol/L. Ispitivana smeša je pripravljena dodavanjem rastvora reaktanta u kivetu, sledećim redosledom: 0.5 mL pufera, 0.5 mL rastvora metilenskog plavog, 0.5 mL destilovane vode, 0.5 mL rastvora amonijum-vanadata i na kraju 0.5 mL rastvora askorbinske kiseline.

Svako određivanje brzine reakcije askorbinske kiseline sa MB je ponavljano tri puta, pripremanjem tri rastvora istih koncentracija reaktanta. Vrednost brzine koja je unošena na kalibracionu krivu je medijana te tri vrednosti, vrednost apsolutne greške vrednosti brzine na kalibracionoj krivi računata je kao polovina razlike maksimalne i minimalne određene brzine u okviru tri merenja.

U cilju konstruisanja kalibracione krive pogodne za precizno određivanje što većeg opsega koncentracija askorbinske kiseline ispitane su i određene optimalne koncentracije jona vanadijuma(V) i MB.

Određivanje optimalne koncentracije amonijum-vanadata. U ovom eksperimentu je korišćen amonijum-vanadat i ispitivan je njegov uticaj na brzinu oksidacije MB. Korišćeni rastvori amonijum-vanadata su prethodno standardizovani kompleksometrijski. Najpre su joni vanadata redukovani pomoću sumpor(IV)-oksida (dobijenog u reakciji 32.0 mg kalijum-metabisulfita i 2.0 mL koncentrovane hlorovodonične kiseline) do vanadil-jona koji se vezuju za etilendiamintetrasirćetnu kiselinu (EDTA). EDTA je dodavana u rastvor vanadil-jona u višku i višak EDTA retitrovano standardnim rastvorom cink(II)-hlorida koncentracije 0.0109 mol/L (pripremljenog rastvaranjem 0.7134 g granula cinka u koncentrovanoj hlorovodoničnoj kiselini). Za konstruisanje grafika zavisnosti brzine reakcije od koncentracije jona vanadata su korišćeni rastvori amonijum-vanadata u sledećim koncentracijama 1.0, 2.1, 3.7, 5.2, 6.5, 9.4 mg/L.

Određivanje optimalne koncentracije metilenskog plavog. Za konstruisanje zavisnosti

brzine reakcije od koncentracije metilenskog plavog su korišćeni rastvori metilenskog-plavog u koncentracijama od 0.8, 1.6, 3.4, 6.4, 9.6 i 12.8 mg/mL.

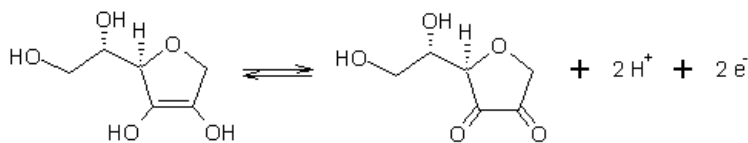
Konstruisana je kalibraciona kriva koja predstavlja zavisnost brzine reakcije askorbinske kiseline sa MB od koncentracije askorbinske kiseline. Brzina reakcije je određivana kao koeficijent pravca linearnog dela grafika zavisnosti apsorbance rastvora od vremena na talasnoj dužini od 665 nm. Za konstrukciju kalibracione krive korišćeni su rastvori askorbinske kiseline u sledećim koncentracijama: 2.6, 3.9, 5.9, 8.9, 13.3, 17.3, 20.8 i 25.0 g/L.

Pri određivanju koncentracija askorbinske kiseline u tabletama proizvođača Ekofarm i Galenika ovom metodom, suspenzija tablete je filtrirana. Filtriranje je rađeno kako bi se eliminisala potencijalna greška merenja apsorbance koja bi nastala usled zamućenja koje potiče od punioca (mikrokristalna celuloza, natrijum-kroksarmeloza, magnezijum-stearat, laktoza, kukuruzni skrob).

Za ispitivanje selektivnosti kinetičke metode korišćena su jedinjenja koja se najčešće nalaze zajedno sa askorbinskom kiselinom u komercijalno dostupnim proizvodima i koja bi potencijalno mogla da ometaju određivanje vitamin C menjajući brzinu reakcije sa metilenskim plavim: fruktoza, glukoza, saharoza, tiamin (vitamin B1), folna kiselina (vitamin B9) i rastvorljivi skrob. Koncentracija vitamina C u smešama korišćenim za ispitivanje selektivnosti iznosila je 13.3 g/L. Rastvori korišćeni za ispitivanje selektivnosti dobijeni su rastvaranjem sledećih masi supstanci u po 25 mL vode: 0.0633 g tiamin-dihlorida, 0.0832 g folne kiseline, 0.3398 g fruktoze, 0.3398 g glukoze, 0.6468 g saharoze i 0.0332 g skroba. Kao slepa proba pri ispitivanju selektivnosti korišćen je rastvor u kome su koncentracije pufera, vode, vitamina C i ispitivanog interferirajućeg agensa iste kao i u ispitivanoj smeši.

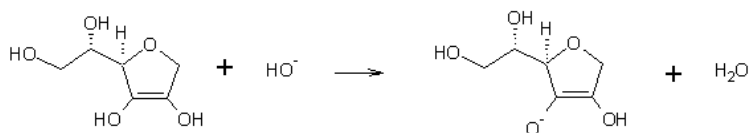
Ostale metode

Spektrofotometrijsko određivanje askorbinske kiseline. UV spektri askorbinske kiseline različitih koncentracija su snimani u opsegu talasnih dužina od 250 nm do 350 nm. Za konstrukciju kalibracione krive odnosno zavisnosti



Slika 2. Jednačina polureakcije oksidacije L-askorbinske kiseline do L-dehidroaskorbinske kiseline

Figure 2. Equation of oxidation of L-ascorbic acid to L-dehydroascorbic acid



Slika 3. Jednačina neutralizacije askorbinske kiseline

Figure 3. Equation of ascorbic acid neutralisation

apsorbance od koncentracije korišćeni su rastvori vitamina C sledećih masenih koncentracija: 4.2, 7.0, 9.8, 14.1, 18.3, 21.1, 23.9, 28.1 g/L.

Volumetrijske metode. U ovom radu koncentracija askorbinske kiseline određivana je i pomoću tri volumetrijske metode: jodimetrijska titracija uz škrob kao indikator, kiselinsko-bazna titracija uz bromtimol-plavo (Bromthymol blue, BTB) kao indikator i kiselinsko-bazna titracija uz fenolftalein (Phenolphthalein, PHPH) kao indikator.

Jodimetrijska metoda zasniva se oksidoredukciji askorbinske kiseline (slika 2).

Askorbinska kiselina je određena uz pomoć standardnog rastvora joda. U smeši joda i vode se nalazio i kalijum-jodid koji reaguje sa jodom i gradi stabilan trijodidni kompleks i time poboljšava rastvaranje joda u vodi (Jeffery *et al.* 1989). Indikator koji je korišćen za ovu titraciju je škrob koji sa jodom gradi inkluziono jedinjenje intenzivno plave boje. Koloidni rastvor joda je pripremljen rastvaranjem 1 g škroba sa 3 g kalijum-jodida u 100 mL vode. Rastvor joda je prethodno standardizovan rastvorom natrijum-tiosulfata koncentracije 0.1000 mol/L. Probe za titraciju su se sastojale od jedne tablete vitamina C sa deklarisanom masom od 500 mg koja je rastvorena u vodi i titrovana, dok su probe praška Cedevite pripremljene rastvaranjem 1.0000 g praha u vodi i titrovane. Svaka titracija za određeni uzorak je ponavljana po pet puta.

Kiselinsko-bazna titracija uz bromtimol-plavo kao indikator. Rastvor askorbinske kiseline je titrovao standardnim rastvorom natrijum-hidroksida koncentracije 0.1000 M. Završna tačka titracije je detektovana promenom boje rastvora iz žuto-narandžaste u plavu. Uzorci za ovu titraciju su pripremani kao i pri jodimetrijskoj titraciji. Svaka titracija za određeni uzorak je ponavljana po pet puta. Jednačina neutralizacije askorbinske kiseline data je na slici 3.

Kiselinsko-bazna titracija uz fenolftalein kao indikator. Rastvor askorbinske kiseline je titrovao standardnim rastvorom natrijum-hidroksida koncentracije 0.1000 M i završna tačka titracije je detektovana promenom boje rastvora iz bezbojne u roze. Uzorci za ovu titraciju su pripremani kao i pri jodimetrijskoj titraciji. Svaka titracija za određeni uzorak je ponavljana pet puta.

Određivanje askorbinske kiseline pomoću HPLC-MS. Za hromatografsko razdvajanje i merenja apsorbance korišćen je aparat tipa Agilent Technologies 12000 Infinity Series. Za razdvajanje je korišćena kolona tipa ZORBAX Eclipse XDB-C18 dimenzija 4.6 × 50 mm pomoću mobilne faze koja se sastojala od smeše 2% vodenog rastvora sirćetne kiseline i acetonitrila. Uzorci propušteni kroz kolonu su dobijeni pomoću rastvora askorbinske kiseline u vodi HPLC čistoće koncentracije 30.8 g/L. Kalibraciona kriva je konstruisana u opsegu kon-

centracija od 1.54 g/L do 30.8 g/L i predstavlja zavisnost površine ispod pika na hromatogramu od koncentracije askorbinske kiseline.

U eksperimentu su korišćene sledeće supstance: L-askorbinska kiselina (Centrohema, p. a.), metilensko plavo (sintetisano u IS Petnica), amonijum-vanadat (Kemika, p. a.), hlorovodonična kiselina (Lachner, 35%), cink u granulama (Zorka Šabac, p. a.), natrijum-tiosulfat (Kemika, p. a.), limunska kiselina (Kemika, p. a.), natrijum-hidrogenfosfat (Kemika, p. a.), kalijum-metabisulfid (Kemika, p. a.), α -tokoferol (Sigma Aldrich, p. a.), D-fruktoza (Kemika, p. a.), D-glukoza (Zorka Šabac, p. a.), saharoza (Sunoko), tiamin-dihlorid (Merck, p. a.), folna kiselina (sintetisano u IS Petnica), kalijum-jodid (Centrohema, p. a.), jod (Centrohema, p. a.) i skrob (Kemika, p. a.). Realni uzorci korišćeni za poređenje metoda su: tablete vitamina C proizvođača Galenika i Ekofarm sa deklariranih 500 mg vitamina C i prašak za razmućivanje Cedevita sa deklariranih 3.10 mg vitamina C po 1 g praha.

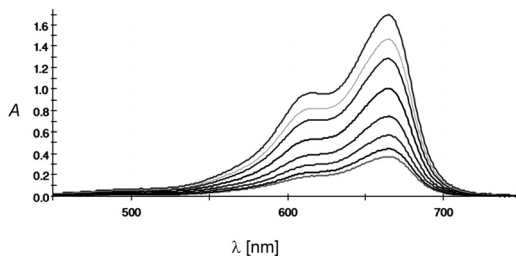
Rezultati

Kinetička metoda

Za optimalnu koncentraciju vanadijuma je uzeta najviša ispitana koncentracija koja iznosi 21.2 mg/L (9.4 mg/L preračunato na koncentraciju jona vanadijuma) jer se pri tim uslovima reakcija odvija najsporije pa je zato tada opseg linearne zavisnosti apsorbance od vremena najširi. Ova koncentracija vanadatnog jona je korišćena pri ispitivanju uticaja koncentracije MB na brzinu reakcije i pri konstruisanju kalibracione krive.

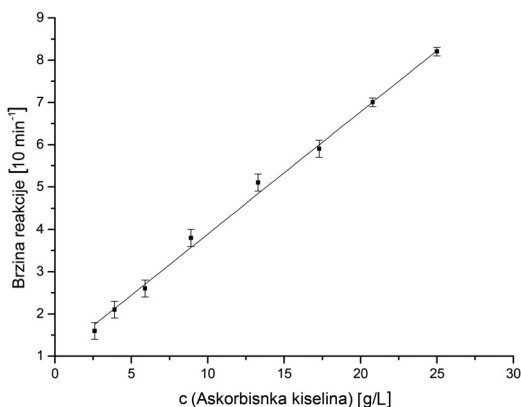
Za optimalnu koncentraciju metilenskog plavog je odabrana koncentracija od 9.6 $\mu\text{g/mL}$. Pri višim koncentracijama od ove početna apsorbance je veća od 2.0, a pri tako visokim vrednostima apsorbance se merenje smatra nepouzdanim. Pri nižim koncentracijama metilenskog plavog od optimalne manja je promena apsorbance tokom vremena čime se povećava relativna greška određivanja brzine reakcije. Ova koncentracija MB je korišćena pri konstruisanju kalibracione krive.

Promena koncentracije metilenskog plavog uočava se kroz promene spektra metilenskog



Slika 4. Vis-spektri metilenskog plavog nakon određenog vremena od početka reakcije (odozgo naniže, spektri nakon 0, 10s, 20, 30, 45, 65, 85 i 100 sekundi)

Figure 4. Vis-Spectra of methylene blue recorded after specific time intervals from the beginning of the reaction (from above to below, spectra after: 0, 10,



Slika 5. Zavisnost promene apsorbance u vremenu od koncentracije AA-Kalibraciona kriva za kinetičku metodu

Figure 5. Dependence of change of absorbance during time on conc. of AA-Calibration curve for kinetic method

plavog tokom vremena (slika 4). Masene koncentracije reaktanata korišćene za snimanje ovih spektara su $\gamma(\text{MB}) = 15 \text{ mg/L}$, $\gamma(\text{AA}) = 25 \text{ g/L}$, $\gamma(\text{VO}_3^-) = 21.2 \text{ mg/L}$.

Kako je brzina reakcije prvog reda i u odnosu na metilensko-plavo i u odnosu na askorbinsku kiselinu, ista je brzina promene koncentracije metilenskog-plavog i vitamina C. Zahvaljujući tome, moguće je konstruisati kalibracionu krivu za

vitamin C praćenjem promene koncentracije metilenskog-plavog (slika 5).

Konstruisana kalibraciona kriva ima nagib $k = (29.5 \pm 0.6) \times L / (g \times \text{min})$.

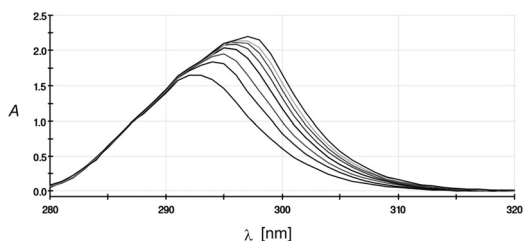
Selektivnost metode predstavljena je kao procenat odstupanja brzine reakcije u prisustvu ometajuće supstance od brzine reakcije kada ometajuća supstanca nije prisutna.

Tabela 1. Selektivnost kinetičke metode

Ometajuća supstanca	Odstupanje brzine (%)	Odnos količinskih koncentracija ometajuće supstance i askorbinske kiseline
Fruktoza	0.3	1 : 1
Glukoza	0.1	1 : 1
Saharoza	1.9	1 : 1
Tiamin	0.1	1 : 10
Folna kiselina	0.3	1 : 100
Rastvorljivi skrob	1.4	1 : 10 (maseni odnos)

Rezultati ispitivanja selektivnosti metode su prikazani u tabeli 1, i iz njih se može zaključiti da nijedna od ispitivanih supstanci ne ometa određivanje askorbinske kiseline ovom metodom.

Mase vitamina C u uzorcima određene svim metodama – kinetičkom metodom, spektrofotometrijski,



Slika 6. UV-Vis spektri vodenih rastvora vitamina C različitih koncentracija

Figure 6. UV-Vis spectra of aqueous vitamin C solutions with different concentrations

metrijski, jodimetrijskom titracijom, kiselinsko-baznom titracijom uz bromtimol-plavo kao indikator, kiselinsko-baznom titracijom uz fenolftalein kao indikator i određivanje askorbinske kiseline pomoću HPLC-MS-a, prikazane su u tabeli 2.

Spektrofotometrijsko određivanje askorbinske kiseline. Na slici 6 uočava se batohromno pomeranje maksimuma apsorpcije rastvora od 294 nm do 299 nm sa povećanjem koncentracije vitamina C.

U ovoj metodi kalibraciona kriva je konstruisana snimanjem apsorbanca pri talasnoj dužini od 299 nm jer se na toj vrednosti najbolje uočava razlika između dva susedna spektra. Koeficijent nagiba kalibracione krive je $k = (4.6 \pm 0.1) \times 10^{-2}$ L/g.

Tabela 2. Mase askorbinske kiseline [mg] u ispitivanim uzorcima

Metoda	Uzorak		
	Tablete Ekofarm	Tablete Galenika	Cedevita 1000 mg
Kinetička	508±10	511±11	3.13±0.06
Spektrofotometrijska	522±12	534±12	2.02±0.05
Jodimetrijska titracija	496±5	498±4	25.8±0.5
Kiselinsko-bazna titracija uz BTB kao ind.	500±2	502±2	223±2
Kiselinsko-bazna titracija uz PHPH kao ind.	508±9	510±11	228±5
HPLC-MS	498±6	498±6	2.04±0.03

Tabela 3. Preciznost metoda (%)

Spektrofotometrija	Kinetička metoda	Titracija uz HPH	HPLC-MS	Jodimetrija	Titracija uz BTB
2.2	2.0	2.0	1.3	1.0	0.4

Tabela 4. Relativna odstupanja rezultata dobijenih navedenim metodama u odnosu na HPLC-MS

Uzorak	Metoda				
	Kinetička metoda	Spektrofotometrija	Jodimetrija	Titracija uz BTB	Titracija uz PHPH
Tablete Ekofarm	2.1%	4.7%	0.3%	0.5%	2.1%
Tablete Galenika	2.6%	6.8%	<0.1%	0.8%	2.4%
Cedevita	34.8%	1.0%	93.5%	>100%	>100%

Jodimetrijska titracija askorbinske kiseline. Koncentracija rastvora joda je određena titracijom standardnog rastvora natrijum-tiosulfata koncentracije 0.1000 mol/L. Određena koncentracija rastvora joda iznosila je 0.1024 mol/L. Ovako standardizovan rastvor joda korišćen je za jodimetrijske titracije.

Određivanje askorbinske kiseline pomoću HPLC-MS-a. Konstruisana kalibraciona kriva ima nagib $k = (318 \pm 4) \times 10^{-2} \text{L/mg}$.

Diskusija

Primećeno je da je vrednost mase vitamina C u svakom uzorku veća kada je određivana kiselinsko-baznom titracijom u kojoj je korišćen fenolftalein kao indikator u odnosu na kiselinsko-baznu titraciju u kojoj je korišćen bromtimol-plavo indikator. To se može objasniti činjenicom da je fenolftalein jednobojni indikator dok je bromtimol-plavo dvobojni, što znači da pri titraciji uz fenolftalein uočavanje završne tačke titracije zavisi od koncentracije indikatora, dok kod bromtimol-plavog to nije slučaj. Poređenjem sa deklarisanim masama možemo zaključiti da je bromtimol-plavo pogodniji indikator za izvođenje kiselinsko-baznih titracija askorbinske kiseline.

Najveće variranje određene mase u zavisnosti od metode se zapaža kod uzorka Cedevite. Velike količine vitamina C određene u Cedeviti jodimetrijom i kiselinsko-baznim titracijama se mogu objasniti neselektivnošću titracija. U Cedeviti postoje i druga redukciona sredstva, pored askorbinske kiseline koje mogu redukovati jod. Pri jodimetrijskoj titraciji, sve one reaguju sa jodom i ometaju određivanje vitamina C. Analogno tome, svaka supstanca koja ima kiselinska svojstva, a potiče iz ispitivanih uzoraka Cedevite reaguje sa natrijum-hidroksidom koji se koristi pri kiselinsko-baznim titracijama. Usled toga, dobijaju se i po nekoliko desetina puta veće vrednosti za mase vitamina C u uzorcima Cedeviti u odnosu na deklarisanu vrednost.

Takođe se uočava da je jodimetrija pogodna metoda za određivanje vitamina C u uzorcima u kojima nema supstanci sa sličnim hemijskim karakteristikama vitaminu C koje bi redukovale jod. Masa vitamina C u uzorcima određena spektrofotometrijski je veća u odnosu na masu određenu HPLC-MS-om što se može objasniti pomeranjem maksimuma apsorpcije batohromno usled povećanja koncentracije.

Metode su upoređene po preciznosti. Uočava se da je najpreciznija volumetrijska titracija uz bromtimol-plavo kao indikator (tabela 3). Ukoliko za referentnu metodu uzmemo HPLC-MS,

rezultate možemo predstaviti i kao odstupanja mase određene svakom od metoda u odnosu na masu određenu HPLC-MS-om (tabela 4).

Na osnovu podataka iz tabele 4 se uočava da je pored metode HPLC-MS za određivanje veće količine vitamina C (uzorci sa deklariranih 500 mg vitamina C) pogodna i jodimetrija dok je za manje količine (uzorak Cedevite sa deklariranih 3.10 mg vitamina C po 1 g praha) odgovarajuća spektrofotometrija kao jedna od najselektivnijih metoda.

Zaključak

Kinetička metoda razvijena u ovom radu je upoređena sa pet stadarnih metoda za određivanje vitamin C po tačnosti, preciznosti i selektivnosti. Metoda se zasniva na praćenju brzine reakcije boje metilensko plavo sa askorbinskom kiselinom u prisustvu jona vanadijuma(V) kao inhibitora u kiseloj sredini. Optimalni uslovi za određivanje vitamina C kinetičkom metodom su: pH = 3.0, koncentracija metilenskog plavog 9.6 mg/L i koncentracija vanadatnog jona 21.2 mg/L. Razvijena kinetička metoda je selektivna prema skrobu, glukozi, fruktozi, saharozi, tiaminu i folnoj kiselini. Utvrđeno je da determinisana masa vitamina C može značajno varirati u zavisnosti od korišćene metode usled postojanja ostalih komponenti u smeši koje imaju hemijska svojstva slična vitaminu C. Tablete vitamina C mogu se precizno odrediti svim metodama uz granice relativne greške od oko 2%, dok su najpreciznije HPLC-MS i jodimetrija. Vitamin C u Cedeviti se može odrediti HPLC-MS metodom, kinetičkom metodom i spektrofotometrijom uz relativne greške ne veće od 2.2%, dok se pri jodimetriji i kiselinsko-baznim titracijama dobijaju nekoliko stotina puta veće količine vitamina C usled osobina titranta.

Ispitivanjem reakcija u kojima učestvuje vitamin C kao katalizator ili inhibitor koje imaju pogodnu kinetiku za spektrofotometrijsko praćenje može se pronaći nova kinetička metoda kojom se mogu dobiti pouzdaniji rezultati u odnosu na druge ispitivane metode, izuzev HPLC-MS.

Zahvalnost. Zahvaljujem se diplomiranom hemičaru Milošu Pešiću na konstruktivnim pre-

dlozima, masteru hemije Gordani Krstić na pomoći pri izradi eksperimentalnog dela rada, kao i saradnicima Stefanu Kociću, Mihajlu Novakoviću, Marinu Kuntiću i Edvinu Faku na sugestijama pri osmišljavanju i realizaciji teme. Veliku zahvalnost dugujem i studentima Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Vuku Vukoviću i Igoru Asanoviću na pomoći pri pisanju rada.

Literatura

Brody T. 1994. *Nutritional Biochemistry*. Academic Press

Cvetković B., Malbaša V., Lončar E., Nježić Z., Šimurina O., Filipčev B., Tepić A. 2012. Poređenje tehnika i metoda određivanja L-askorbinske kiseline u voću. *Hemijska industrija*, **66** (4): 553.

Jeffery G., Bassett J., Mendham J., Denney R. 1989. *Vogel's Textbook of quantitative chemical analysis*, Fifth edition. Avon: Bath press

Khan M., Sarwar A. 2001. The Influence of Transition Metal Ions on the Kineticsof Ascorbic Acid Oxidation by Methylene Blue in Strongly Acidic Media. *Turkish Journal of Chemistry*, **25**: 433.

Milutinović M., Vulović B. 2002. Poređenje kiselinsko-bazne titracije sa jodometrijskim metodama za određivanje vitamina C. *Petničke sveske*, 54: 199.

Perez-Bendito D, Silva M. 1988. *Kinetic methods in analytical chemistry*. Ellis Horword Limited

Selimović A., Salkić M., Selimović A. 2011. Direct spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in pharmaceutical preparations using sodium oxalate as a stabilizer. *International Journal of Basic & Applied Sciences IJBAS-IJENS*, **11** (02): 106.

Watada A. 1982. A High-performance Liquid Chromatography Method for Determining Ascorbic Acid Content of Fresh Fruits and Vegetables Horticultural Crops. *HortScience*, **17** (3): 334.

Vojislav Gligorovski

Comparison of Analytical methods for Vitamin C Determination in Pharmaceutical Dosages

Due to the relatively fast oxidation of vitamin C with oxygen to L-dehydroascorbic acid it is often necessary to control its quantity in pharmaceutical dosages via fast and efficient methods. For that purpose, the kinetic method is developed for the determination of vitamin C and its accuracy is compared with five standardized analytical methods through the determination of vitamin C in product samples. The kinetic method is based on the monitoring of the rate of inhibited reaction of methylene-blue with ascor-

bic acid. Optimal conditions for vitamin C determination are: pH = 3.0, $\gamma(\text{Methylene Blue}) = 9.6 \text{ mg/L}$, $\gamma(\text{VO}_3^-) = 21.2 \text{ mg/L}$. Ascorbic acid can be determined using the kinetic method in the presence of vitamin B1, vitamin B9, glucose, fructose, sucrose and soluble starch.

All six methods are tested on three different samples: vitamin C pills 500 mg, manufacturer Galenika, vitamin C pills 500 mg, manufacturer Ekofarm and powder Cedevita. Results show that the most suitable method for determination of vitamin C in all three samples is the HPLC-MS method. In addition to the HPLC-MS method, for determination of large amounts of vitamin C iodimetric titration is suitable, while for smaller amounts (Cedevita samples) the appropriate methods are the kinetic method and spectrophotometry.

