

**MSc Ivana Dabić**  
Visoka tehnološka škola strukovnih studija,  
Šabac, Republika Srbija

UDK 543.48:577.164.2

**Dr Ljubica Mijić**  
Visoka tehnološka škola strukovnih studija,  
Šabac, Republika Srbija

Istraživanja

**Mr Gordana Jovanović**  
Visoka tehnološka škola strukovnih studija,  
Šabac, Republika Srbija

**Dr Ljiljana Tanasić**  
Visoka poljoprivredna škola strukovnih studija,  
Šabac, Republika Srbija

Primljen: 18. X 2015.

## **OPTIMIZACIJA SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE MODIFIKOVANE NA MIKROTITAR PLOČE ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA VITAMINA C**

**SAŽETAK:** Cilj ovog rada je bio da se optimizuje jedna od najviše korišćenih metoda za određivanje sadržaja vitamina C, koja je modifikovana na mikrotitar ploče, radi manjeg utroška i regenasa i analizirane supstance. Kao sredstvo za ekstrakciju korišćena je 1% *meta*-fosforna kiselina. Metoda se zasniva na redoks reakciji askorbinske kiseline sa 2,6-dihlorindofenolom, pri čemu dolazi do redukcije 2,6-dihlorindofenola u bezbojno jedinjenje. Kako ni u jednom do sada objavljenom gde je korišćen ovaj test nije precizno navedena koncentracija 2,6-dihlorindofenola kao reagensa ni vreme inkubacije, u rada su optimizovani ovi parametri. Da bi se odredila koncentraciju askorbinske kiseline, merena je apsorbacija za četiri uzorka različitih koncentracija (13 mg/cm<sup>3</sup>, 29 mg/cm<sup>3</sup>, 50 mg/cm<sup>3</sup>, 72 mg/cm<sup>3</sup>), na svakih 5 minuta tokom jednog časa. Na osnovu dobijenih rezultata, utvrđeno je da je najoptimalnije vreme 5 minuta, pri koncentraciji od 72 mg/cm<sup>3</sup>.

**KLJUČNE REČI:** askorbinska kiselina, 2,6-dihlorindofenol, spektrofotometrijske metode.

### **Uvod**

Sve više informacija o pozitivnom efektu unosa vitamina C na zdravlje, uzrokovalo je pojavu velikog broja farmaceutskih preparata, hrane i napitaka sa deklarisanim sadržajem vitamina C. Pored toga, sve veću važnost za medicinu predstavlja i određivanje nivoa askorbinske kiseline u plazmi, serumu, urinu i različitim tkivima. Svesni značaja utvrđivanja sadržaja vitamina C u pomenutim uzorcima, analitičari decenijama razvijaju metode za kvantifikaciju askorbinske kiseline (AK) u različitim uzorcima, što je rezultiralo velikim brojem različitih eksperimentalnih postupaka.

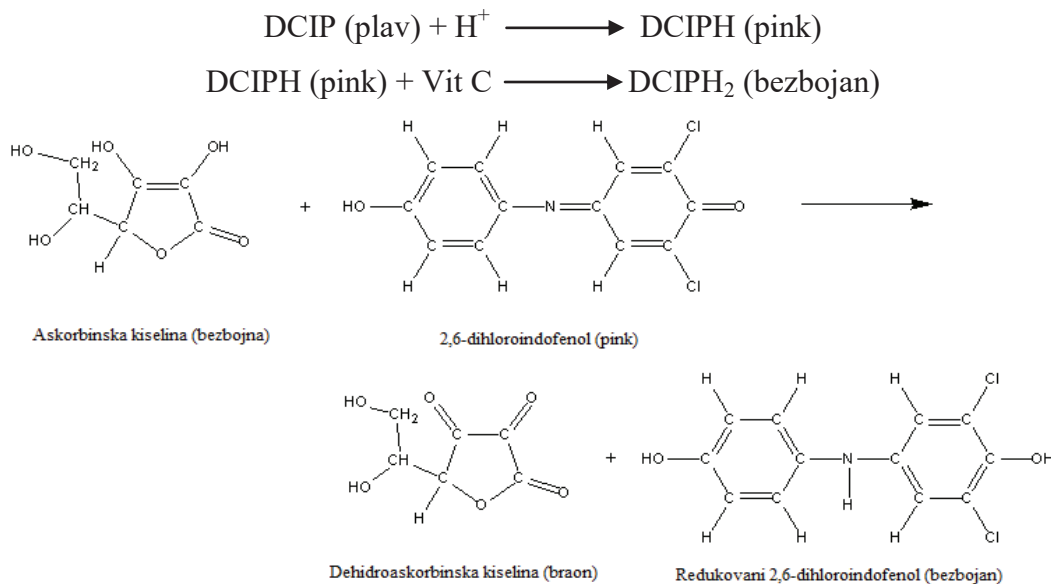
UV/VIS spektrofotometrijske metode su posebno zanimljive za određivanje sadržaja vitamina C zbog svoje brzine, jednostavnosti i komercijalne pristupačnosti. Više reagenasa kao što su 2,6-dihlorindofenol (DCIP), dimetoksidihinon, ninhidrin, 1-aminoantrahinon

diazonijum so, 2',7'-dihlorfluorescin i dr., korišćeni su za određivanje vitamina C (Arya i sar., 1998).

Za spektrofotometrijsko određivanje vitamina C najvčešće se koristi DCIP. Plavi DCIP se redukuje u pink DCIPH, odnosno bezbojan DCIPH<sub>2</sub> kada se doda AK u kiseloj sredini (Arya i sar., 2001). Metoda Klein i Perry-a (1982), zasnovana na ovoj reakciji, pogodna je za određivanja sadržaja vitamina C u smrznutom, svežem i dehidriranom voću i povrću, voćnim sokovima i biljnim ekstraktima. Askorbinska kiselina se ekstrahuje 1% *meta*-fosfornom kiselinom iz odgovarajućeg uzorka na sobnoj temperaturi. Kao smetnje za određivanje vitamina C, mogu je javiti minerali i tioli (Hossu i Magearu, 2004).

### 1. Metodologija istraživanja

Za potrebe ispitivanja sadržaja vitamina C odabrana je odabrana je modifikovana metoda Klajn i Perry-ja (1982), prilagođena za mikroploče, radi manjeg utroška i regenera i analizirane supstance. Metoda je pogodna za određivanja sadržaja vitamina C u smrznutom, svežem i dehidriranom voću i povrću, voćnim sokovima i biljnim ekstraktima. Metoda se zasniva na redoks reakciji askorbinske kiseline sa 2,6-dihlorindofenolom (DCIP), pri čemu dolazi do redukcije 2,6-dihlorindofenola u bezbojno jedinjenje (Slika 1).



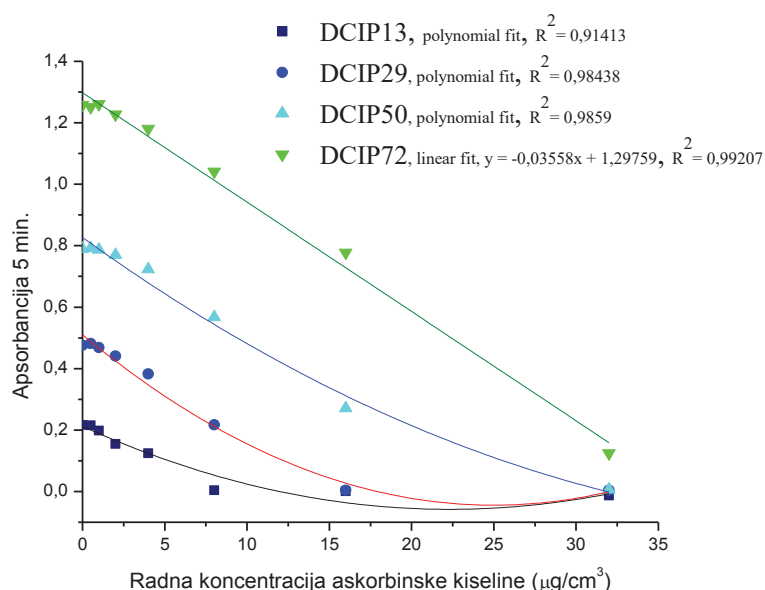
**Slika 1.** Redoks reakcija između askorbinske kiseline (C-vitamina) i 2,6-dihlorindofenola

## 2. Rezultati diskusija

### 2.1. Određivanje apsorbance u zavisnosti od koncentracije

Sadržaj AK u ispitivanim uzorcima se određuje na osnovu standardne kalibracione krive (zavisnost apsorbancija - koncentracija standardnog rastvora askorbinske kiseline). S obzirom da u radu gde je prvi put objavljena ova metoda (Klein i Perry, 1982), ali ni u drugim radovima gde je korišćen ovaj test, nije precizno navedena koncentracija DCIP reagensa ni vreme inkubacije, u radu su optimizovani ovi parametri, kako bi se dobili uslovi pri kojima se postiže linearna zavisnost apsorbancija - koncentracija AK. Merenja apsorbancije (515 nm) su vršena na svakih 5 min u toku 1 h, za četiri različite koncentracije DCIP: 13 mg/cm<sup>3</sup>, 29 mg/cm<sup>3</sup>, 50 mg/cm<sup>3</sup> i 72 mg/cm<sup>3</sup>, i za seriju dvostrukih razblaženja askorbinske kiseline (5-320 µg/cm<sup>3</sup>).

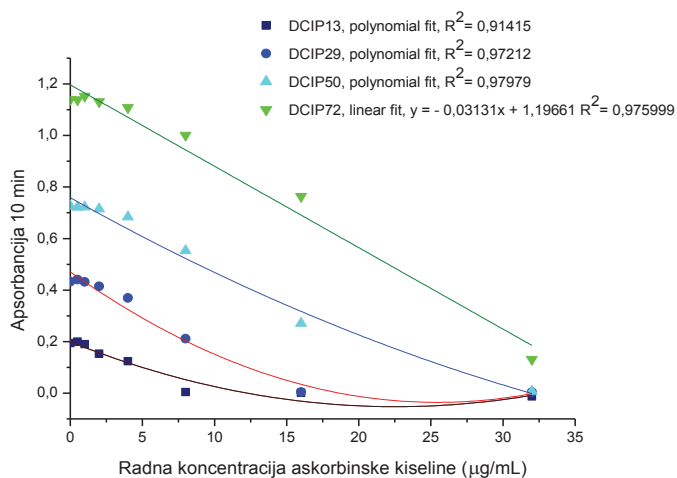
Na Grafiku 1. predstavljena je apsorbancija radnih rastvora AK pri različitoj koncentraciji DCIP (13 mg/cm<sup>3</sup>, 29 mg/cm<sup>3</sup>, 50 mg/cm<sup>3</sup>, 72 mg/cm<sup>3</sup>), merena posle 5 min, odakle se može videti da ne postoji linearna zavisnost pri koncentraciji DCIP od 13, 29 i 50 mg/cm<sup>3</sup>, dok je kod DCIP72 (72 mg/cm<sup>3</sup>) postignuta linearna zavisnost sa  $R^2 = 0.99207$  (koeficijent korelacije).



**Grafik 1.** Kalibraciona kriva za određivanje vitamina C u ispitivanim uzorcima: zavisnost apsorbancije od koncentracije AK nakon 5 min

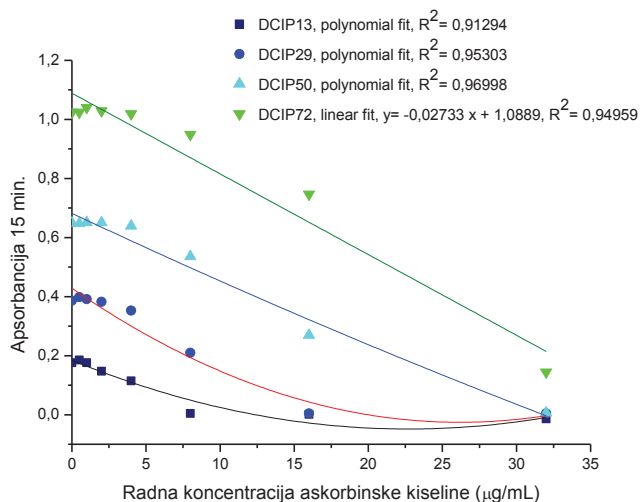
Na Grafiku 2., predstavljena je zavisnost apsorbancije radnih rastvora AK pri različitoj koncentraciji DCIP (13 mg/cm<sup>3</sup>, 29 mg/cm<sup>3</sup>, 50 mg/cm<sup>3</sup>, 72 mg/cm<sup>3</sup>), merena posle

10 min, na osnovu koga vidimo da ne postoji linearna zavisnost, sem kod DCIP72, gde je koeficijent korelacije  $R^2 = 0.97599$ .

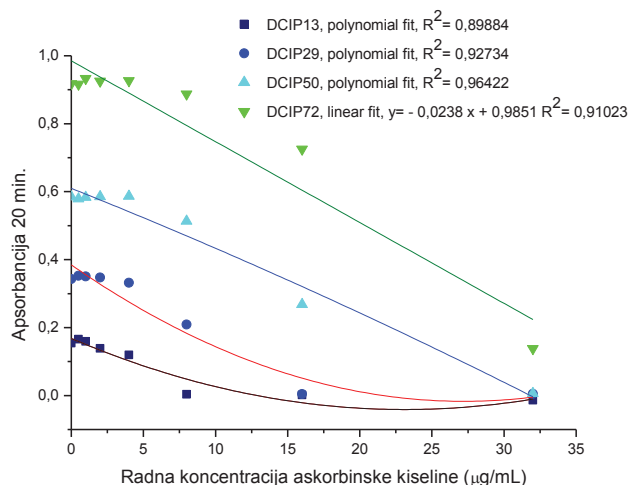


**Grafik 2.** Kalibraciona kriva za određivanje vitamina C u ispitivanim uzorcima: zavisnost apsorbancije od koncentracije AK nakon 10 min

Na Grafiku 3. predstavljena je apsorbancija radnih rastvora AK pri različitoj koncentraciji DCIP (13, 29, 50 i 72 mg/cm<sup>3</sup>) merena posle 15 min, a na Grafiku 4. posle 20 min.



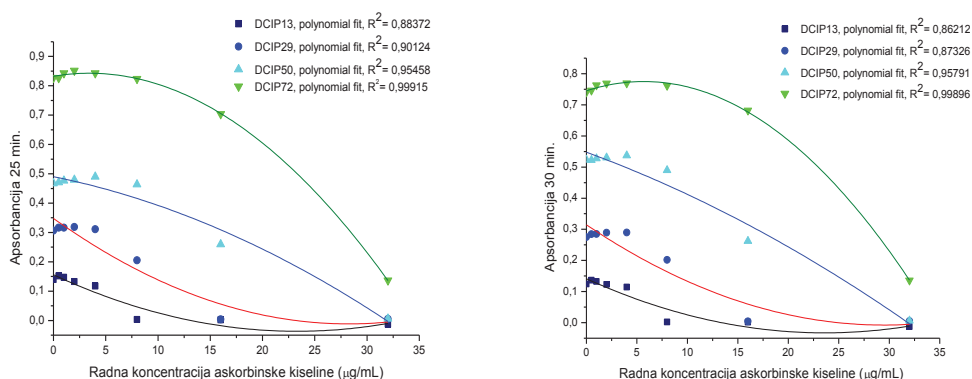
**Grafik 3.** Kalibraciona kriva za određivanje vitamina C u ispitivanim uzorcima: zavisnost apsorbancije od koncentracije AK nakon 15 min

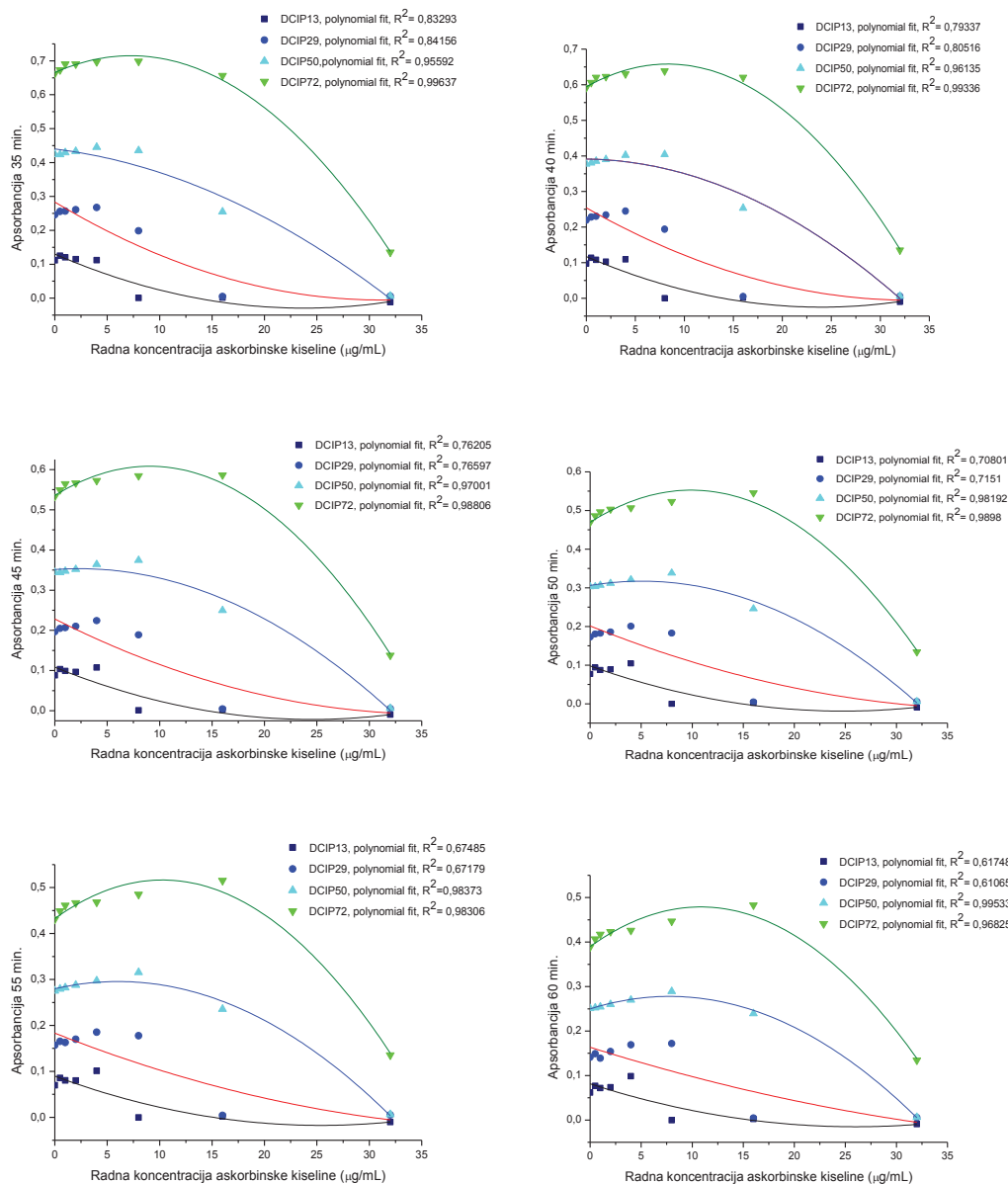


**Grafik 4.** Kalibraciona kriva za određivanje vitamina C u ispitivanim uzorcima: zavisnost apsorbancije od koncentracije AK nakon 20 min

Na osnovu dobijenih podataka može se uočiti da je jedino pri koncentraciji DCIP od 72 mg/cm<sup>3</sup> postignuta linearna zavisnost, ali je koeficijent korelacije  $R^2$  bio 0.94959, odnosno 0.91023, što nam ukazuje da se linearna zavisnost smanjuje sa porastom vremena inkubacije.

U radu je dalje vršeno određivanje optimalnog vremena inkubacije, što je prikazano u gtaficima zavisnosti apsorbancije od koncentracije AK, mereni nakon 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 i 60 min (Grafik 5).





**Grafik 5.** Kalibraciona kriva za određivanje vitamina C u ispitivanim uzorcima: zavisnost apsorbancije od koncentracije AK nakon 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 i 60 min

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da se linearna zavisnost apsorbancije od koncentracije AK postiže korišćenjem DCIP koncentracije 72 mg/cm<sup>3</sup> i pri inkubaciji do 20 min. Radi lakšeg poređenja, u Tabeli 1. predstavljene su  $R^2$  vrednosti dobijene pri linearnom fitu zavisnosti apsorbancija-koncentracija AK u različitim vremenskim intervalima. Zadovoljavajuća vrednost koeficijenta korelacije  $R^2$  (>0.99), postiže se nakon inkubacije u toku 5 min, pa su zato koncentracija DCIP od 72 mg/cm<sup>3</sup> i vreme inkubacija od 5 min, odabrani kao optimalni parametri za određivanje sadržaja vitamina C.

**Tabela 1.** Koeficijenti korelacije ( $R^2$ ) pri različitim intervalima inkubacije

Vreme merenja apsorbance (DCIP, 72 mg/cm <sup>3</sup> )	Jedanačina prave	Vrednost $R^2$
5 minuta	$y = -0.03558x + 1.29759$	0.99207
10 minuta	$y = -0.03131x + 1.19661$	0.97599
15 minuta	$y = -0.02733x + 1.0889$	0.94959
20 minuta	$y = -0.0238x + 0.9851$	0.91023

## 2.2. Vrednosti standarda za askorbinsku kiselinu

Ovaj test je primenjen i za određivanje standardnog rasvora AK u tri koncentracije (200  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , 150  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ), kako bi se proverila tačnost metode. Primer rezultata za standard, prikazan je u Tabeli 2, a provera je rađena svakog dana prilikom određivanja sadržaja vitamina C.

**Tabela 2.** Vrednosti standarda za askorbinsku kiseline

Određivanje standarda askorbinske kiseline	Apsorbancije radne probe i korekcije						Jednačina kalibracione krive, $R^2$	Očitana konc. ask.kis. ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ) sa standardnom devijacijom	
	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_{kor}$	$A_{sr}$	$A$			
Standard ( $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ )	100	0.955	0.980	0.984	0.043	0.973	0.930	$y = -0.03351x + 1.25286, 0.9973$	96.26 $\pm$ 4.65
	150	0.797	0.787	0.803	0.044	0.796	0.751	$y = -0.03351x + 1.25286, 0.9973$	149.65 $\pm$ 2.12
	200	0.580	0.569	0.605	0.041	0.585	0.544	$y = -0.03351x + 1.25286, 0.9973$	211.64 $\pm$ 5.47

## 3. Zaključak

U ovom radu vršena je optimizacija spektrofotometrijske metoda Klein i Perry (1982), koja je modifikovana za mikrotitar ploče. S obzirom da u publikaciji gde je prvi put objavljena ova metoda (Klein i Perry, 1982), ali ni u drugim radovima gde je korišćen ovaj test, nije precizno navedena koncentracija DCIP reagensa ni vreme inkubacije, u radu su optimizovani ovi parametri, kako bi se dobili uslovi pri kojima se postiže linearna zavisnost apsorbancija - koncentracija AK (sadržaj AK u ispitivanim uzorcima se određuje na osnovu standardne kalibracione krive zavisnosti apsorbancija-koncentracija standardnog rastvora

askorbinske kiseline). Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da se optimalni uslovi postižu pri koncentraciji DCIP reagensa od  $72 \text{ mg/cm}^3$  i inkubaciji u toku 5 min, jer je pri tim vrednostima kriva linearna.

#### LITERATURA

- [1] Arya, S. P., Mahajan, M. (2001): Spectrophotometric Determination of Vitamin C with Iron(II)- $\alpha$ ,  $\alpha'$  - bipyridyl Complex. Proceedings of the National Academy of Sciences, 12: 39.
- [2] Arya, S.P., Mahajan, M., Jain, P. (1998): Photometric Methods for the Determination of Vitamin C. *Analytical Sciences*, 14: 889-895.
- [3] Hossu, A.M., Magearu, V. (2004): Determination of vitamin C in pharmaceutical products with physico-chemical and bioanalytical technics. *Roumanian Biotechnological Letters*, 9: 1498.
- [4] Klein, B.P., Perry, A.K. (1982): Ascorbic Acid and Vitamin A Activity in Selected Vegetables from Different Geographical Areas of the United States. *Journal of Food Science*, 47: 941-945.

**Ivana Dabić, M.Sc.**

**Ljubica Mijić, Ph.D.**

**Gordana Jovanović, M.Sc.**

**Ljiljana Tanasić, Ph.D.**

#### OPTIMIZATION SPECTROPHOTOMETRIC METHOD MODIFIED ON MICROTITER PLATE FOR DETERMINATION OF VITAMIN C

##### *Summary*

The aim of this study was optimized one of the most popular method for determination of vitamin C, which has been modified in microtiter plates, because in order to reduce consumption of reagents and the analyte, As the extraction solvent used was 1% meta-phosphoric acid. The method is based on the redox reaction of ascorbic acid with 2,6-dichlorindophenol, wherein there is a reduction in 2,6-indophenol colorless compound. As in any reported so far where he used this test is not precisely indicate the concentration of 2,6-dichlorindophenol as reagents nor the incubation time, the first phase of this study, these parameters were optimized. In order to determine the concentration of ascorbic acid, we measured absorbance four different concentrations ( $13 \text{ mg/cm}^3$ ,  $29 \text{ mg/cm}^3$ ,  $50 \text{ mg/cm}^3$ ,  $72 \text{ mg/cm}^3$ ), for every 5 minutes for one hour, and by using a calibration curve obtained by the fact that is the most optimal time for 5 minutes, at a concentration of  $72 \text{ mg/cm}^3$ .

*Key words:* ascorbic acid, 2,6-dichlorindophenol, spectrophotometric method.