УНИВЕРЗИТЕТ У ПРИШТИНИ
ПРИРОДНОМАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Владан Р. Ђурић

ЕФЕКАТ АНТИОКСИДАНТНИХ ВИТАМИНА НА АКТИВНОСТ ПЕРОКСИДАЗЕ РЕНА

Докторска дисертација

Косовска Митровица, 2014.

ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ
I. Аутор
Име и презиме: Владан Р. Ђурић
Датум и место рођења: 14. 12. 1963.
Садашње запослење: Сарадник на Пољопривредном факултету у Лешку
II. Докторска дисертација
Наслов: Ефекат антиоксидантних витамина на активност пероксидазе рена
Број страница: 108
Број слика: 61 слика и 14 табела
Број библиографских података: 213
Установа и место где је рад израђен: Технички факултет у Бору; Институт за рударство и металургију, Бор; Природно-математички факултет у Нишу
Научна област (УДК): 577.151.1 : [577.164.2 + 577.161.1]
Ментор: др Видослав Декић
III. Оцена и обрана
Датум пријаве теме: 05.03.2013.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: 1. др Видослав Декић, доцент, Природно-математички факултет, Косовска Митровица, ментор 2. др Весна Станков-Јовановић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Ниш 3. др Биљана Декић, доцент, Природно-математички факултет, Косовска Митровица
Комисија за оцену докторске дисертације: 1. др Видослав Декић, доцент, Природно-математички факултет, Косовска Митровица, ментор 2. др Весна Станков-Јовановић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Ниш 3. др Биљана Декић, доцент, Природно-математички факултет, Косовска Митровица 4. др Ранко Симоновић, редовни професор, Природно-математички факултет, Косовска Митровица 5. др Сузана Самаржија-Јовановић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Косовска Митровица
Комисија за одбрану докторске дисертације: 1. др Видослав Декић, доцент, Природно-математички факултет, Косовска Митровица, ментор 2. др Весна Станков-Јовановић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Ниш 3. др Биљана Декић, доцент, Природно-математички факултет, Косовска Митровица 4. др Ранко Симоновић, редовни професор, Природно-математички факултет, Косовска Митровица 5. др Сузана Самаржија-Јовановић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Косовска Митровица
Датум одбране дисертације:

ЕФЕКАТ АНТИОКСИДАНТНИХ ВИТАМИНА НА АКТИВНОСТ ПЕРОКСИДАЗЕ РЕНА

ИЗВОД

Сви витамини су есенцијални нутрицијенти који се морају обезбедити исхраном. Њихова употреба у свакодневном животу захтева развој нових и модификацију постојећих метода за контролу и одређивање концентрације ових супстанци у различитим прехрамбеним производима и различитим фазама њихове производње.

Витамини C, E и A припадају антиоксидантима тј. молекулима који су добри акцептори електрона и који спречавају оксидацију молекула из окружења, док сами бивају оксидовани. На тај начин они неутрализују или спречавају настајање слободних радикала.

Као извор једне радикалске врсте употребљена је ензимска рекција разлагања водоник-пероксида пероксидазом рена уз оксидацију косупстрата, какви су ароматични амини бензидин и о-толидин. Ови косупстрати су и хромогени, чије оксидоване форме апсорбују светлост у видљивом делу спектра, па се брзина њихове оксидације користи као мера ензимске активности и може се пратити спектрофотометријски. Утицај у води растворљивих облика антиоксидантних витамина (L-аскорбинске киселине, токоферол и ретинол-ацетата) на ток ове реакције је посматран при различитим условима.

Утврђено је да токоферол-ацетат нема утицаја на активност ензима и судбину оксидованих форми косупстрата. Са друге стране, витамин C се надовезује на ензимску ракцију редукцијом оксидованог косупстрата одлажући појаву апсорпционог максимума оксидованих косупстрата, што се манифестује као период индукције, све док квантитативно не пређе у дехидроаскорбинску киселину. Тако је ова реакција искоришћена за одређивање концентрације витамина C у раличитим препаратима за суплементирање људске исхране. Током овог дела истраживања праћена је стабилност водених раствора витамина C у присуству различитих стабилизирајућих супстанци и њихов утицај на активност пероксидазе, одређени су кинетички биохемијски параметри (K_M, V_{max}), услови мерења су оптимизовани у односу на концентрацију сваке компоненте реакцијске смеше. Конструисане су калибрационе праве за косупстрате - бензидин и о-толидин при различитим pH вредностима и испитан утицај појединих страних супстанци.

Естар витамина A (ретинол-ацетат) испољава улогу некомпетитивног инхибитора пероксидазе рена, што се одражава смањењем брзине оксидације косупстрата и омогућава одређивање и овог витамина истом методом. Током овог дела истраживања одређени су кинетички параметри (K_M, $V_{max,}$ K_I).

Мерење активности пероксидазе у присуству витамина C и A у смеши омогућава одређивање њиховог односа. На основу тих истраживања је формирана детерминациона матрица за симултано одређивање витамина C и A.

Утврђено је да ова ензимска реакција која обухвата ензим, супстрат, косупстрат и оба витамина веома осетљива на присуство разних страних супстанци које су у стању да интерферирају са свим компонентама у смеши, па ова метода има ограничену употребу на веома пречишћене супстанце у заједничкој смеши, као што је то случај током састављања формула за суплементирану исхрану људи и животиња.

Кључне речи: *витамин C, ретинол-ацетат, пероксидаза рена, некомпетитивна инхибиција, спектрофотометријска метода.*

THE EFFECT OF ANTIOXIDANT VITAMINS ON ACTIVITY OF HORSERADISH PEROXIDASE

ABSTRACT

The all vitamins are essential nutrients that must be supplied by diet. Their use in everyday life demands development of new methods, and modification of existing ones, for control and determination of these substances' concentration in various food products and various stages of their production.

Vitamins C, E and A belong to antioxidants i.e. molecules characterized as good electron acceptors that prevent oxidation of other molecules in their environment, being oxidized themselves. That way they neutralize or prevent formation of free radicals.

Enzymatic reaction of hydrogen peroxide dissolution by horseradish peroxidase, with oxidation of cosubstrates, such as aromatic amines benzidine and o-tolidine, was used as the source of a radical species. These cosubstrates also are chromogens, and their oxidized forms absorb light in visible part of spectrum, so their oxidation rate is used as a measure of enzyme activity and can be observed by spectrophotometry. The effect of hydrosoluble forms of antioxidant vitamins (L-ascorbic acid, tocopherol and retinol acetate) on this reaction course has been observed in various conditions.

It has been found that tocopherol acetate had no effect on enzyme activity and destiny of cosubstrate oxidized forms. On the other hand, vitamin C (L-ascorbic acid) supplements the enzymatic reaction by reduction of oxidized cosubstrate delaying absorption maximum of oxidized cosubstrates, which is manifested as lag time, until it is quantitatively transformed to dehydroascorbic acid. So this reaction has been used to determine vitamin C concentration in various dietary supplement preparations. During this part of the study we investigated stability of vitamin C water solutions in presence of various stabilizing substances and their effect on peroxidase activity. We also determined kinetic biochemical parameters (K_M, V_{max}), and optimized measurement conditions in regard to concentration of every component of reaction mixture. Calibration curves were constructed for cosubstrates benzidine and o-tolidine in various pH environments, and effect of some foreign substances was observed.

Ester of vitamin A (retinol acetate) plays the role of a noncompetitive horseradish peroxidase inhibitor, which is reflected as decreased rate of cosubstrate oxidation, and can be used for determination of this vitamin content by the same method. Kinetic parameters (K_M, $V_{max,}$ K_I) were determined during this part of the study.

Measuring peroxidase activity in presence of vitamins C and A mixture enables determining their ratio. Determination matrix for simultaneous measuring vitamins C and A was formed on the basis of this investigation.

It has been established that this enzymatic reaction involving the enzyme, substrate, cosubstrate and two vitamins, is very sensitive to presence of various foreign substances, that are capable to interfere with the all components in reaction mixture, so this method has limited application for highly purified substances in mixture, which is case in composing formulas of dietary supplements for humans and animals.

Key words: *vitamin C, retinol acetate, horseradish peroxidase, noncompetitive inhibition, spectrophotometric method.*

САДРЖАЈ

Листа скраћеница и симбола

$A^{\cdot}$	оксидовани облик косупстрата
AH	редуковани облик косупстрата
$AscH_2$	L-аскорбинска киселина
$Asc^{\cdot -}$	семидехидроаскорбил радикал
BH_4	(6R)-5,6,7,8,-тетрахидро-l-биоптерин
V_{max}	максимална брзина
GC	гасна хроматографија
GSH	редуковани глутатион
GSSG	оксидовани глутатион
DHA	L-дехидроаскорбинска киселина
DCPIP	2,6-дихлорфенолиндофенол
DQ	дикват
E	ензим
EDTA	етилендиаминтетрасирћетна киселина
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*
ES	комплекс ензим-супстрат
ESR	електронска парамагнетна резонанција
ETC	електрон транспортни систем
EFSA	*European Food Safety Autority*
ИП	индукциони период
Kat	каталаза
K_I	константа инхибиције
K_M	Михаелисова константа
K_S	константа дисоцијације
LDL	липопротеин ниске густине
LH	липид (масна киселина)
МПО	мијелопероксидаза
NMR	нуклеарна магнетна резонанција
ПДУ	препоручен дневни унос

ПЕР	пероксидаза рена
R	коефицијент корелације
ROS	реактивне врсте кисеоника
RNS	реактивне врсте азота
RCS	реактивне врсте угљеника
RSS	реактивне врсте сумпора
РСС	разблажење стране супстанце
Р5Ф	рибоза-5-фосфат
S	супстрат
SD	стандарна девијација
СР	слободни радикали
Tau	таурин
USDA	*United States Department of Agriculture*
FDA	*Food and Drug Administration*
ФЗГ	фосфат зависна глутаминаза
HPLC	течна хроматографија високих перформанси
CEC	капиларна електро-хроматографија
Cit	цитрулин
ЦПФ	циклус пентоза фосфата
TFA	трифлуорсирћетнакиселина
TLC	танкослојна хроматографија

1. Увод

Глобализација савреманог друштва поставља стандарде у свим областима људског деловања. Посебан акценат се ставља на производњу и обраду хране и воде за пиће као предуслов квалитета живљења. Нутриционисти и фармацеути додатно заговарају корекцију нутритивних вредности хране уз суплементирање различитим витаминима и минералима, ради продужења њених хранљивих својстава и у циљу очувања здравља и превенцију од болести људи и животиња.

Такав концепт нужно укључује и системе за контролу безбедности у свим фазама призводње и дистрибуције намирница, а од хемичара изискује стално изналажење нових или модификацију постојећих метода хемијских анализа и њихово прилагођавање најразличитијим узорцима прехрамбених производа. Очекује се да те методе одликује репродуктивност, прецизност, осетљивост, селективност, брзина извођења, те примењивост тих техника. Према тим критеријумима ензимске кинетичке методе заузимају водеће место у модерној аналитичкој хемији.

Пероксидаза је ензим који има широку примену од синтезе природних производа до биоремедијације воде и тла. Овај ензим је заступљен код свих организама, од микроба до виших организама и учествује у неколико различитих физиолошких процеса. Његова примарна улога се огледа у разлагању ендогеног водоник-пероксида и том приликом се формирају вода и слободни радикали. Из тог разлога, овај реакцијски механизам може да послужи као извор слободних радикала у различитим *in vitro* огледима.

Брзину разлагања водоник-пероксида овим ензимом олакшава присуство његових косупстрата као донора водоника (акцептора електрона). Ову улогу могу имати разни арил феноли и арил амини. Праћење апсорпционог максимума ових хромогена, омогућава спектрофотометријско мерење каталитичке активности пероксидазе.

Молекули који су добри акцептори електрона и спречавају оксидацију других молекула из окружења, а сами бивају оксидовани, представљају антиоксиданте. Тим механизмом они неутрализују или спречавају настајање слободних радикала.

Антиоксидантима припадају разни полифеноли, тиоли, амини итд, док ту улогу у организму преузимају првенствено глутатион, затим витамини C, E и A, као и ензими - супероксид дисмутаза, каталаза, пероксидаза и др.

Сви витамини су есенцијални нутрицијенти који се морају обезбедити исхраном, а чији се недостатак манифестује низом структурних и функционалних поремећаја. Из тог разога је њихово присуство у суплементарним дијететским призводима готово неизбежно. Са друге стране, већина ових препарата, због начина припремања и конзумације, укључује, у води растворљиве форме и витамина растворљивих у уљима, какви су A и E. У суплементарним формулама они се најчешће не налазе у својим природним облицима, већ се појављују као витамински еквиваленти у форми естара сирћетне или палмитинске киселине.

У току овог истраживања је праћена активност пероксидазе рена у присуству косупстрата бензидина и његовог деривата, о-толидина, под различитим условима. На пренос електрона од водоник-пероксида преко пероксидазе до молекула косупстрата, може утицати и присуство антиоксиданата. Па тако, док L-аскорбинска киселина тренутно редукује оксидоване молекуле косупстрата, стабилизујући електроне пероксида кроз молекул дехидроаскорбинске киселине, естар токоферола се понаша инертно, док ацетат ретинола испољава инхибиторско дејство на пероксидазу рена. Ефекти ових процеса се могу посматрати независно у току једне исте реакције, што омогућава симултано одређивање ових антиоксиданата.

Имајући у виду ове чињенице, дошло се на идеју о модификацији постојеће спектрофотометријске методе за детерминацију аскорбинске киселине пероксидазом рена, за шта је било потребно предузети следеће кораке:

i. Утврдити оптималне услове за мерење каталитичке активности пероксидазе у присуству водоник-пероксида, као супстрата, и бензидина и о-толидина као косупстрата;
ii. Испитати зависност брзине реакције од концентрације сваког од реактаната при различитим pH вредностима у различитим пуферским системима;
iii. Стабилизовати растворе L-аскорбинске киселине у присуству различитих стабилизирајућих супстанци током довољно дугог временског периода, потребног за извођење огледа и утврдити њихов утицај на активност пероксидазе;
iv. Испитати утицај L-аскорбинске киселине на каталитичку активност пероксидазе;
v. Утврдити опсеге линеарности калибрационих дијаграма зависности брзине каталитичке реакције од концентрације L-аскорбинске киселине;
vi. Испитати утицај токоферол и ретинол ацетата на брзину реакције;

vii. Одредити услове под којима долази до инхибиције перокидазе рена ретинол-ацетатом;

viii. Одредити кинетичке параметре реакције (K_M, V_{max}), врсту инхибиције и константу инхибиције (K_I);

ix. Одредити границе детекције и квантификације методе;

x. Припремити модел узорак за симултано одређивање витамина у смеши;

xi. Испитати утицај пратећих супстанци (стабилизатора, пуфера и појединих металних јона) на брзину реакције;

xii. Применити методу за одређивање садржаја L-аскорбинске киселине и ретинол-ацетата у реалним узорцима, као што су премикси за састављање суплементираних формула.

2. Општа разматрања

2.1. Слободни радикали

Слободни радикали (СР) представљају атоме, молекуле или јоне који у последњем електонском нивоу садрже неспарени електрон. Из тог разлога их одликује висока реактивност, па стога кратак полуживот и ниска специфичност према реактантима. Могу бити негативни, позитивни или без наелектрисања.

У класу тзв. реактивних врста, поред слободних радикала убрајају се и нерадикли, нестабилна једињења, која лако подлежу редукцији или аутооксидацији, а која имају карактер првих (Табела 1). У зависности од тога који атом представља активни центар молекула реактивне врсте, могу се разлоковати следеће категорије: реактивне врсте кисеоника (ROS), реактивне врсте азота (RNS), реактивне врсте угљеника (RCS) и реактивне врсте сумпора (RSS) [1].

Слободни радикали могу бити ендогеног и егзогеног порекла (Слика 1). Ћелије непрестално призводе слободне радикале и друге реактивне врсте током различитих метаболичких процеса [2]:

- приликом транспорта електрона у каскади респираторног ланца у митохондријама увек долази и до продукције мале количине слободних радикала ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2, $OH^{\bullet}$), која се значајно увећава и у хипероксији и у хипоксији;
- током инфламаторних оштећења и повреда, у процесу фагоцитозе код леукоцита, долази до продукције појединих ROS ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2, OCl^{-}), дејством NADPH-оксидазе и миелопероксидазе, усмерених према микроорганизмима у околном ткиву[1];
- као продукти уобичајене активности неких ензима (пероксидазе, ксантин-оксидазе, итд.),

[1]*Сличан процес се дешава приликом деструкције туморских ћелија од стране макрофага.*

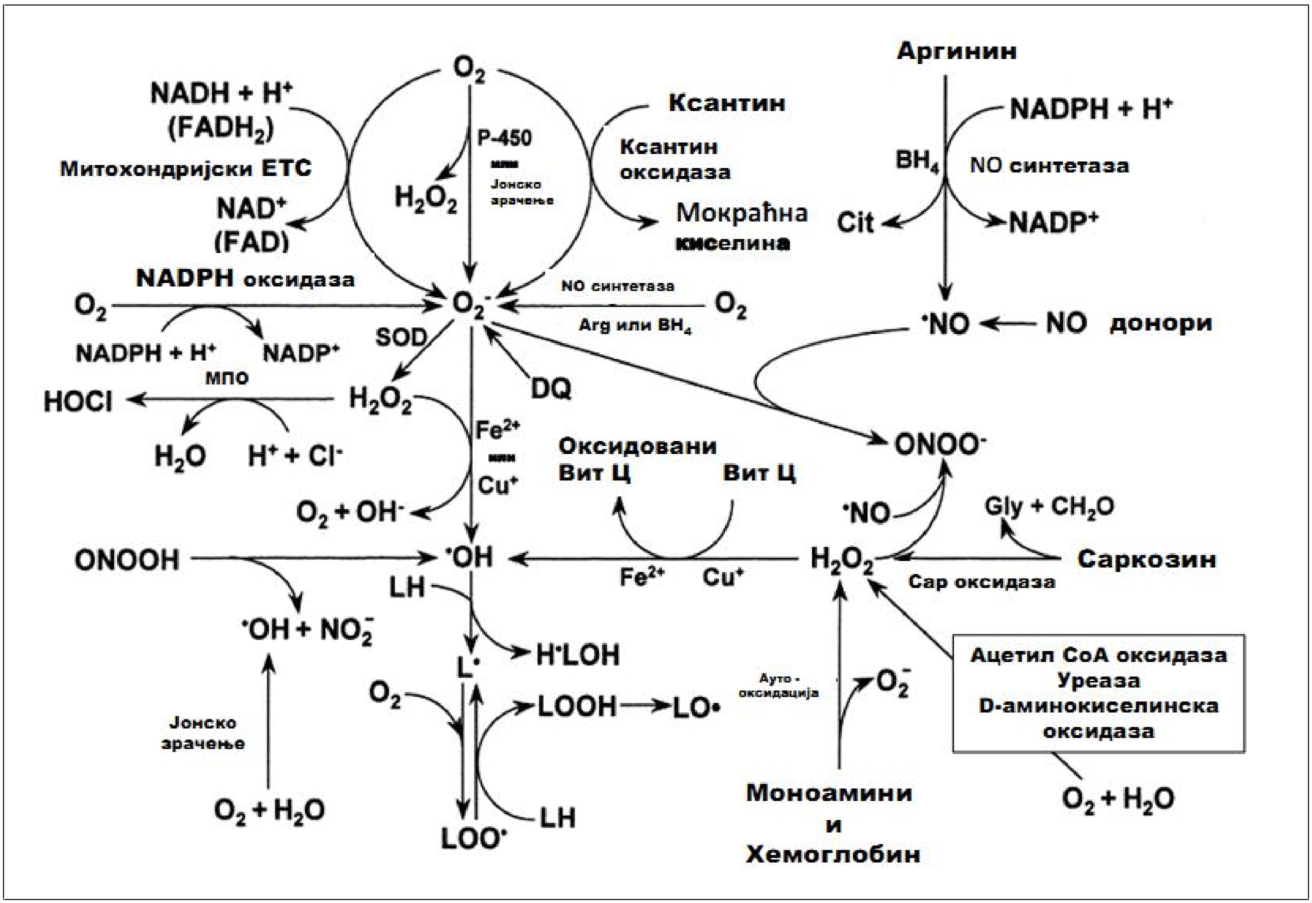
- у току рекција катализованих прелазним металима (Фентонова и Хабер-Веисова реакција) и др.

Табела 1. Реактивне врсте

	Радикали	Нерадикали
ROS	$O_2^{\cdot -}$ супероксидни анјон радикал $HO^{\cdot}$ хидроксил радикал $ROO^{\cdot}$ пероксил радикал $RO^{\cdot}$ алкосил радикал $HOO^{\cdot}$ хидропероксил радикал	H_2O_2 водоник-пероксид HOCl хипохлорна киселина O_3 озон $^1O_2$ кисеонични синглет
RNS	$ON^{\cdot}$ азот оксид радикал (моноксид) $O_2N^{\cdot}$ азот диоксид радикал	NO_2^- азот диоксид анјон N_2O_3 азот триоксид NO_2^+ нитронијум јон $ONOO^-$ пероксинитритни анјон $ROONO^-$ алкил пероксинитрит NO^- нитрозил анјон (синглет) NO^+ нитрозил катјон NO_2Cl нитрил хлорид
RCS	$R^{\cdot}$ алкил радикал $Cl_3C^{\cdot}$ трихлорметил радикал	
RSS	$RS^{\cdot}$ тиол радикали $GS^{\cdot}$ глутатиол радикал $GSSG^{\cdot -}$ диглутатион дисулфид анјон радикал	

Слика 1. Ендогени и егзогени извори реактивних кисеоничних врста.

За људску врсту су свакако најзначајнији они радикали који учествују у метаболичким процесима, а то су супероксидни анјон радикал, хидроксил и пероксил радикали, као и азот моноксид, кисеонични синглет и пероксинитритни анјон (Слика 2).



Слика 2. Механизам настанка ROS и RNS у ћелијама сисара [3].

Пероксил радикали су најбројнији међу радикалима, а постоје у два облика: растворљиви у води и липидима. Мада су сви биомолекули осетљиви на напад радикала, липиди из ћелије су најподложнији оштећењима. Липидни пероксил радикали нису најреактивнија врста, али са довољно дугим временом полуживота да нападну суседне полинезасићене масне киселине, ензиме и рецепторе ћелијске мемебране. Уколико се процес тренутно не заустави, превођење једног молекула масти у радикалску форму може покренути низ ланчаних реакција, и довести до структурног и функционалног оштећења мембране и смрти ћелије. Постоје индиције да ови радикали представљају главни узрок атеросклерозе, рака, болести јетре, Алцхајмерове болести и процеса старења [4,5,6].

Хидроксил радикали су најреактивнија кисеонична врста радикала (Табеле 2 и 3). Настали *in vivo*, ови радикали трају мање од 10^{-3} секунде јер се брзо комбинују са другим молекулима из непосредне близине, укључујући и макромолекуле. Овај кисеонични радикал може бити генерисан великом продуктивношћу у сваком делу ћелије. Поред директне штете коју наносе, они играју важну улогу у формирању пероксил радикала и подстицању ланчаних реакција липидне пероксидације. За хидроксил радикале се сматра да утичу на настајање атеросклерозе, онкогенезе, катаракте и ДНК мутација (Таб. 4)

Табела 2. Дужина полуживота реактивних кисеоничних врста [7].

Реактивне кисеоничне врсте	**Дужина полу-живота**
$HO^{\cdot}$	1 ns
$RO^{\cdot}$	1 µs
$LOO^{\cdot}$	7 s
$^{1}O_2$	1 µs
$NO^{\cdot}$	1-10 s
$ONOO^{-}$	0,05-1 s
$Q^{\cdot -}$	дани

Табела 3. Реакцијски потенцијал радикала.

Радикал	**mV**
$HO^{\cdot}$	+2300
$RO^{\cdot}$	+1600
$LOO^{\cdot}$	+1000
$GS^{\cdot}$	+920
$HU^{\cdot -}$	+590
$Toc^{\cdot}$	+480
$Asc^{\cdot -}$	+282

Табела 4. Последице интеракције слободних радикаласа интраћелијским макромолекулима.

Врста молекула	**Промене**	**Последице по ћелију**
Липиди	Пероксидација	Перфорација мембране и повећана пермеабилност Смрт ћелије
Протеини	Карбоксилација Стварање дисулфидних мостова Фрагментација	Убрзан катаболизам и скраћен век есенцијалних молекула Смањена ензимска активност Промена антигеничности
ДНК	Генске мутације	Промена генске експресије Губитак хетерозиготности

Супероксид радикал је намање реактивна кисеонична врста, са дугим временом полуживота, која може да се удаљи знатно од места настанка и најважнији је извор покретања хидроксил радикала *in vivo*. У комбинацији са другим реактивним врстама, као што је азот моноксид, даје реактивнији пероксинитритни анјон, који је јак оксиданс тио аминокиселина у протеинима (Слика 2). У присуству супероксид анјон радикала долази до пероксидације липопротеина ниске густине (LDL) депонованих на зидовима артерија, који постају најпре влакнасти, а затим подлежу калцификацији и тако блокирају проток крви.

У највећем броју случаја ћелија успева да својим механизмима неутралише дејство ових молекула, тако да они не нарушавају њену хомеостазу. Међутим, додатно оптерећење организма спољашним изворима реактивних врста (метаболизам ксенобиотика, јонизујуће зрачење, претерана физичка активност) доводи ћелију у стње алостазе. Уколико из неког разлога дође до отказивања природних механизама одбране, прети могућност нарушавања оксидативног статуса ћелије, што представља увод у зону оксидативног стреса и стање повећаног ризика за настајање различитих поремећаја и болести.

2.2. Атиоксиданти

Антиоксиданти су „супстанце које у малим концентрацијама у односу на супстрат (биомолекул) који се оксидује, значајно успоравају или спречавају оксидацију тог супстрата" [8].

Своју активност антиосиданти испољавају различитим механизмима. Захваљујући способности да делују као:

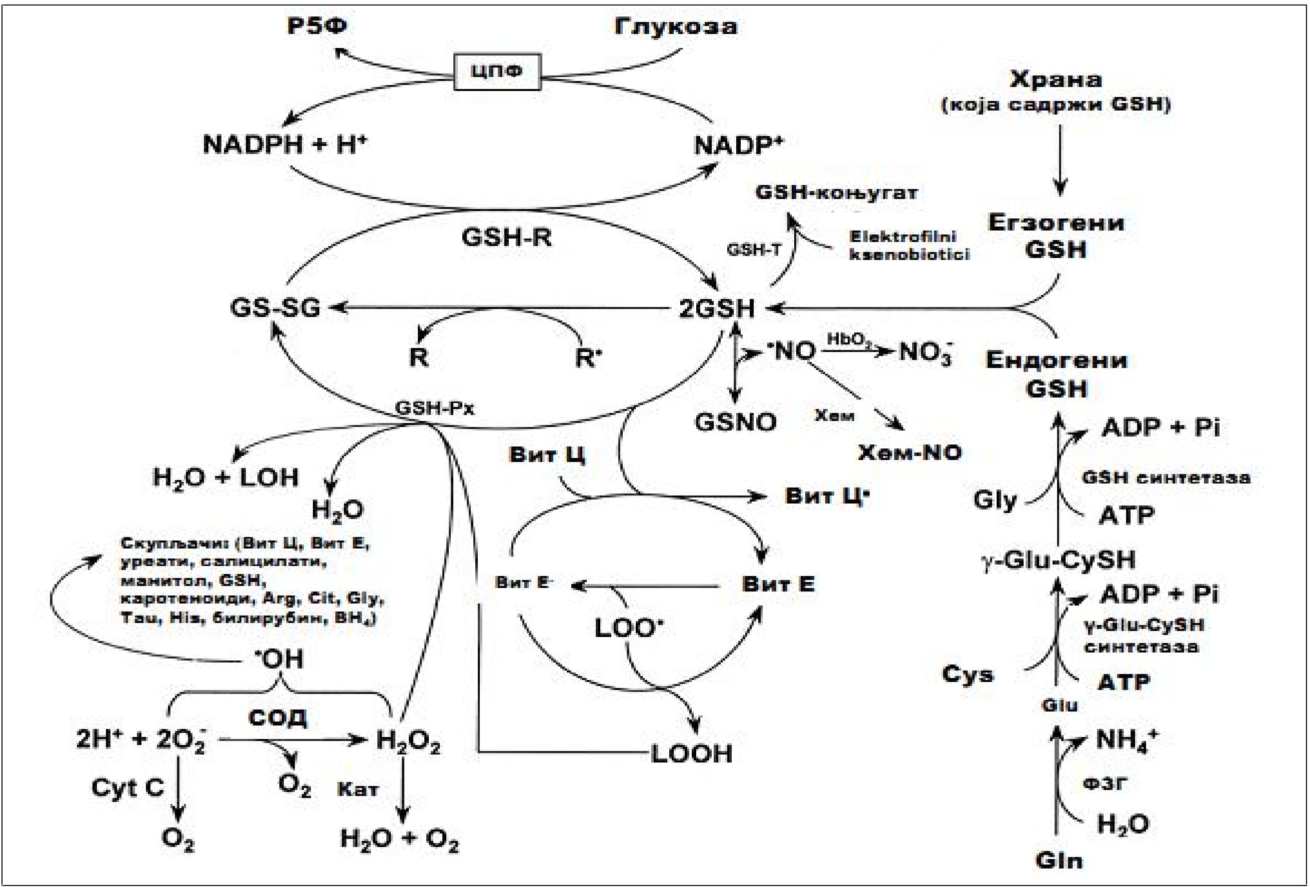
- „сакупљачи" слободних радикала,
- донори и акцептори електрона,
- донори водоника пероксил и хидроксил радикалима, и акцептори водоника угљеникових слободних радикала,

они штите ћелију од оксидативног стреса (Слика 3).

Примарну антиоксадативну заштиту организма обезбеђују:

- интрацелуларни ензими (супероксид дисмутаза, каталаза, пероксидаза, глутатион пероксидаза, редуктаза и трансфераза, тиол-дисулфид оксидоредуктаза и пероксиредоксини), који су специфични пре свега за реактивне врсте кисеоника, а делују на месту настанка ових слободих радикала;
- транспортни и метало протеини, који у свом саставу садрже пре свих јоне Fe^{2+} и Cu^{2+}, који онемогућавају њихово учешће у формирању слободних радикала (трансферин, феритин, лактоферитин, хемоплексин, албумин, церулоплазмин) и

- глутатион (γ-глутамил-цистеинил-глицин), трипептид који је у високим концентрацијама заступљен у свакој ћелији, представља главни ендогени антиоксидант[2].



Слика 3. Уклањање кисеоничних и азотових слободних радикала код сисара [3].

Секундарну антиоксидативну заштиту чине:

- ензими за репарацију ДНК, протеина и липида, који обнављају или уклањају оштећења биомолекула или њихових делова, насталих у условима оксидативног стреса [8] и
- неензимски ендогени и егзогени антиоксиданти (витамини C и E, коензим Q_{10}, β-каротен, мокраћна киселина, билирубин, флавоноиди, полифеноли), који делују у ћелијском и ванћелијском простору [9].

Оксидативни стрес, настаје као дисбаланс хомеостатских регулаторних механизама у организму (повећано стварање слободних радикала и/или недовољан антиоксидативни одбрамбени капацитет), узрокован једним или више стресогених фактора. Као последице ове

[2]*Интерцелуларни однос оксидованог (GSSG) и редукованог (GSH) облика глутатиона представља одраз оксидативног стања ћелије и меру његовог детоксикационог капацитета.*

неравнотеже јављају се промене у морфологији и функцији ћелије те нарушавање њеног интегритета, што се може завршити и смрћу саме ћелије.

Научна сазнања, која се тичу оксидативног стреса, током последњих деценија, узроковала су покретање опсежних фармацеутско-менаџерских активности и деловања на тржишту, са циљем унапређења општег здравља код људи. У том периоду јавља се потреба и за дефинисањем појма укупне антиоксидативне активности неке супстанце, као и метода за њено одређивање.

Из тог разлога је USDA (*United States Department of Agriculture*), пре више од десет година, подржала формирање једног јединственог концепта као стандарда за антиоксидантни потенцијал прехрамбених и фармацеутских производа.

2.2.1. ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*)

ORAC представља, најчешће, спектрофотометријски метод мерења антиоксидантног капацитета биолошких узорака*in vitro*[10, 11].

Овај метод се заснива на мерењу оксидативне деградације флуоресцентних молекула, какавје флуоресцин (ређе бета-пикоеритрин), након мешања са неким од иницијатора слободних радикала (најчешће азо-једињења). Азо – иницијатори, какав је и *2,2'-азобис (2-амидинопропан дихлорид)*, су једињења која се загревањем разлажу, стварајући пероксил радикале који оштећују флуоресцентни молекул, а чији се интензитет флуоресценције мери.

Антиоксиданти одлажу ову оксидативну деградацију флуоресцентних молекула са упоредивим ефектом, док се степен заштите коју испољи неки антиоксидант, квантификује, поређењем са антиоксидативном заштитом 6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилне киселине (Troloxa, у води растворљивог деривата витамина Е) као стандардом [12]. На тај начин би ORAC послужио као мерна јединица антиоксидантне активности биолошке супстанце, према појединим реактивним кисеоничним врстама[3].

Антиоксидантни капацитет се изражава у ORAC јединицама по 1г препарата или на 100 g прехрамбеног производа (Табела 5)[4].

---

[3]*У зависности од природе антиоксиданта, ова метода је прилагођена за антиоксиданте растворљиве у води (H-ORAC), односно липидима (L-ORAC). Збир ових двеју вредности представља укупни антиоксидантни капацитет (TAC-ORAC) [13, 14, 15].*

[4]*Процена је да се у организму, при просечним менталним и физичким активностима, свакодневно произведе толико слободних радикала да је за њихово неутралисање потребно унети у организам антиоксиданте чији капацитет износи око 3000-5000 ORAC јединица [19, 20].*

Табела 5. Антиоксидативни капацитет десет најпотентнијих намирница из групе воћа, поврћа и зачина (на 100 g производа) [16, 17, 18].

Воће	ORAC	Поврће	ORAC	Зачинско биље	ORAC
Аронија	16062	Бели лук	1939	Каранфилић	285500 – 314446
Суве шљиве	5770	Кељ	1770	Рузмарин	164000 – 174400
Суво грожђе	2830	Спанаћ	1260	Босиљак	155800 – 163700
Боровница	2400	Прокељ (клице)	980	Оригано	123300 – 265700
Купина	2036	Луцерка (клице)	930	Индијски шафран	109400 – 183200
Јагода	1540	Броколи	890	Цимет	105500 – 267536
Малина	1220	Репа	840	Жалфија	99900 – 240100
Авокадо	782	Црвена паприка	710	Першун	73500 – 74349
Поморанџа	750	Пасуљ	460	Мајчина душица	58900 – 67553
Црвени греипфрут	739	Црни лук	450	Црни бибер	25095 – 42400

Као што се слободни радикали разликују међу собом по степену реактивности и циљним молекулима које нападају, тако се и антиоксиданти међусобно разликују по активности у односу на одређене реактивне врсте [21]. Из тог разлога се антиоксидантна активност у односу на пероксинитритне и хидроксилне радикале мери модификованим NORAC и HORAC методама [22, 23].

Употреба ових метода је посебно значајна ради мерења антиоксидантног капацитета намирница и суплемената који садрже сложена једињења са брзо и споро делујућим антиоксидантним ефектом, као и супстанце са комбинованим ефектом у односу на различите радикале. На тај начин је било могуће проценити ефикасност неког препарата са антиоксидативним деловањем и декларативно гарантовати његов квалитет.

Основни и за сада непревазиђен проблем због чега ORAC-концепт, тј. покушај стандардизације антиоксидантног потенцијала прехрамбених производа, није до краја спроведен је тај, што осим за антиоксидантне витамине (C, E и A), ни за један други састојак из хране нема довољно показатеља да испољава антиоксидантну активност у организму. Другим речима, не постоје физиолошки докази који указују да нехранљиви састојци хране, као што су флавоноиди и полифеноли, који испољавају знатну антиоксидантну активност *in vitro* и тиме обезбеђују висок вештачки ORAC индекс, исказују икакав директан антиоксидантни ефекат у *in vivo* условима [24][5].

---

[5] *Са једне стране, поједине епидемиолошке студије доводе у везу конзумирање хране богате флавоноидима и полифенолима са смањењем ризика од настајња кардиоваскуларних поремећаја и рака [25]. Са друге стране, истраживања полифенолских диједетских суплемената су показала да преко 95% ових једињења претрпи брзу трансформацију у метеболит који се лако излучује путем мокраће, као и то, да повећање антиоксидантног капацитета крви, након конзумирања намирница богатим полифенолима не потиче од самих полифенола, већ од повећаног нивоа мокраћне киселине као њиховог метаболита. То индицира да организам ова једињења доживљава као ксенобиотике које треба елиминисати [26].*

Сходно томе, регулационе агенције, FDA (*Food and Drug Administration*) Сједињених Америчких Држава и EFSA (*European Food Safety Autority*) Европске Уније, су објавиле упутства која онемогућавају декларацију прехрамбених производа у којима се имплицира потенцијална здравствена корист од намирница које имају извештаје о ORAC вредностима и на тај начин спречиле могућу злоупотребу призвођача.

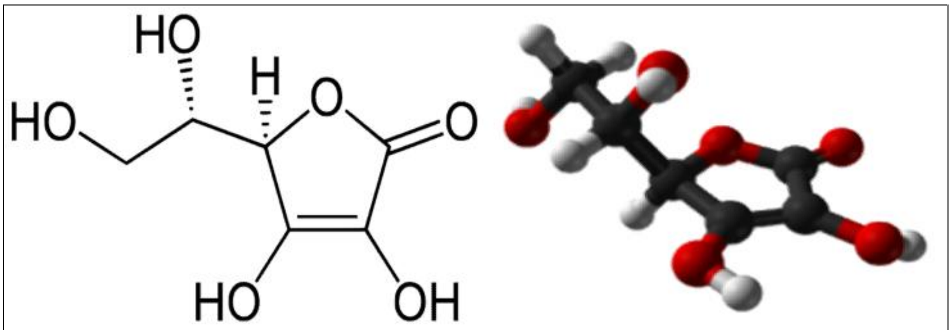
То је резултирало да USDA након више од једне деценије, маја 2012. године, повуче своју веб публикацију ORAC вредности хране уобичајене за америчко тржиште [27].

2.2.2. Антиоксидантни витамини

Витамини су есенцијални нутрицијети најчешће биљног, али и животињског, порекла, које људски организам мора да обезбеди исхраном. Витамини C, E и A, спадају у неензимске антиоксиданте који чине други ниво одбране од слободних радикала.

2.2.2.1. Витамин C

Витамин C или *2-оксо-L-трео-хексоно-1,4-лактон-2,3-енедиолили(R)-3,4- дихидрокси-5-((S)-1,2-дихидроксиетил)фуран-2(5H)-он*, представља L-енантиомер аскорбинске киселине (Слика 4). L-аскорбинска киселина ($AscH_2$) је дериват глукозе растворљив у води. Налази се у ткивима свих организама, али за више примате, већину слепих мишева и још неке кичмењаке, он представља незаменљив фактор који се надокнађује из хране.



Слика 4. Структурна формула L-аскорбинске киселине.

Најзначајније изворе витамина C, представља воће и поврће (Табела 6).

Табела 6. Десет најзначајнијих врста воћа и поврћа са највећим релативним садржајем витамина С [28][6].

Воће (100 g)	**Вит. C (mg)**	**Поврће (100 g)**	**Вит. C (mg)**
Шипурак	426	Чили паприка (зелена)	244
Рибизла	200	Црвена паприка	190
Киви	98	Першун (лист)	130
Црвена рибизла	80	Броколи	90
Лимун	77	Прокељ	80
Јагода	57	Купус	51
Поморанџа	53	Кељ	41
Грејпфрут	34	Диња	40
Мандарина	31	Карфиол	40
Малина	30	Бели лук	31

Витамин С је неопходан кофактор за низ ензима укључених у бројне метаболичке процесе, као што су: хидроксилација колагена, који доприноси одржавању хрскавичавог ткива и крвних судова [31, 32]; синтеза карнитина, који је одговоран за транспорт масних киселина кроз липидну мембрану митохондрија (можда и других органела) [33]; синтеза неких - стероидних хормона и неуротрансмитера [34]. Ипак, највећа пажња у последње време је усмерена ка његовом антиоксидантном деловању [35].

Потрошња намерница богатих витамином С, повезује се са смањеним ризиком од кардиоваскуларних и неуродегенеративних болести, као и многих врста рака. Међутим, испитивања која су користила биомаркере оксидантног оштећења ДНК база, нису дала убедљиве доказе да суплементирање аскорбатом смањује ниво оксидантног оштећења *in vivo*, осим можда код особа са веома ниским уносом овог витамина. Слично томе, из студија о генотоксичности појединих супстанци према прекидима ланаца ДНК, настанку микронуклеуса и хромозомским аберацијама, нема јасних доказа о заштитном ефекту витамина С. Са друге стране, постоје ограничени докази да суплементирање витамином С има благотворно дејство на васкуларне функције и смањење учесталости рака желуца у неким популацијама, али није јасно да ли такво деловање потиче од антиоксидантних својстава или неких других особина аскорбата [36].

Процена је, да се дневне потребе за овим витамином код одраслих здравих особа крећу од 75 мг за жене, до 90 мг за мушкарце [37]. Сматра се, такође, да потребе за повећањем уноса витамина С имају пушачи, спортисти, радници на тешким физичким и

[6] *Због тога што су врло ретко или никако укључене у исхрану људи, нису обухваћене табелом, врсте као што су: Какаду шљива, Каму каму, Ацерола, Пасји трн или Баобаб, чији садржаји витамина С имају необично високе вредности, и то: 1000-5300, 2800, 1677, 695 и 400 mg/100 g, редом [29, 30].*

високостресним пословима, труднице и реконвалесценти. Њима се препоручује унос и преко 120 мг дневно [38]. Оно што збуњује научнике око одређивања ПДУ (препорученог дневног уноса), је да друге сродне животињске врсте које имају заједничку неспособност синтезе овог витамина и неоходност уноса екогеног витамина C, конзумирају 20 до 80 пута веће количине од хуманог референтног уноса [39].

Дужа дефицијенција витамина C, доводи до поремећаја у структури везивног ткива, што се манифестује променама на кожи, слузокожи, хрскавицама и зглобовима. Ова хиповитаминоза је позната као болест скорбут.

Антиоксидативне особине витамина C

Физиолошки активна форма витамина C је L-акорбинска киселина, док је D-енантиомер физиолошки неактиван. Када делује као антиоксидант, *in vitro*, L-акорбинска киселина се оксидацијом конвертује у L-дехидроаскорбинску киселину (DHA)[7].У организму се DHA може редуковати назад до $AscH_2$ дејством глутатиона [41]. Уколико из неког разлога не дође до ове редукције, при физиолошким pH вредностима, DHA хидролизује у 2,3-дикетогулонат [42] (Слика 5).

За витамин C, се показало да је у стању да неутрализује већину кисеоничних реактивних врста, али са различитом ефикасношћу [44-48]. Поред тога што неутрализује хидроксил ($HO^{\bullet}$), алкоксил ($RO^{\bullet}$) и пероксил радикале ($ROO^{\bullet}$) донирањем водоника, аскорбат може такође неутралисати глутатиол ($GS^{\bullet}$) и токоферол радикале ($Toc^{\bullet}$), као и сопствене аскорбил радикале ($Asc^{\bullet -}$).

Стабилност

Стабилност водених раствора L-аскорбинске киселине зависи од више различитих фактора. Уколико у раствору нема онечишћења и металних јона, стабилност зависи од температуре, притиска, pH средине, светлости и аеробних услова у којима се раствор налази.

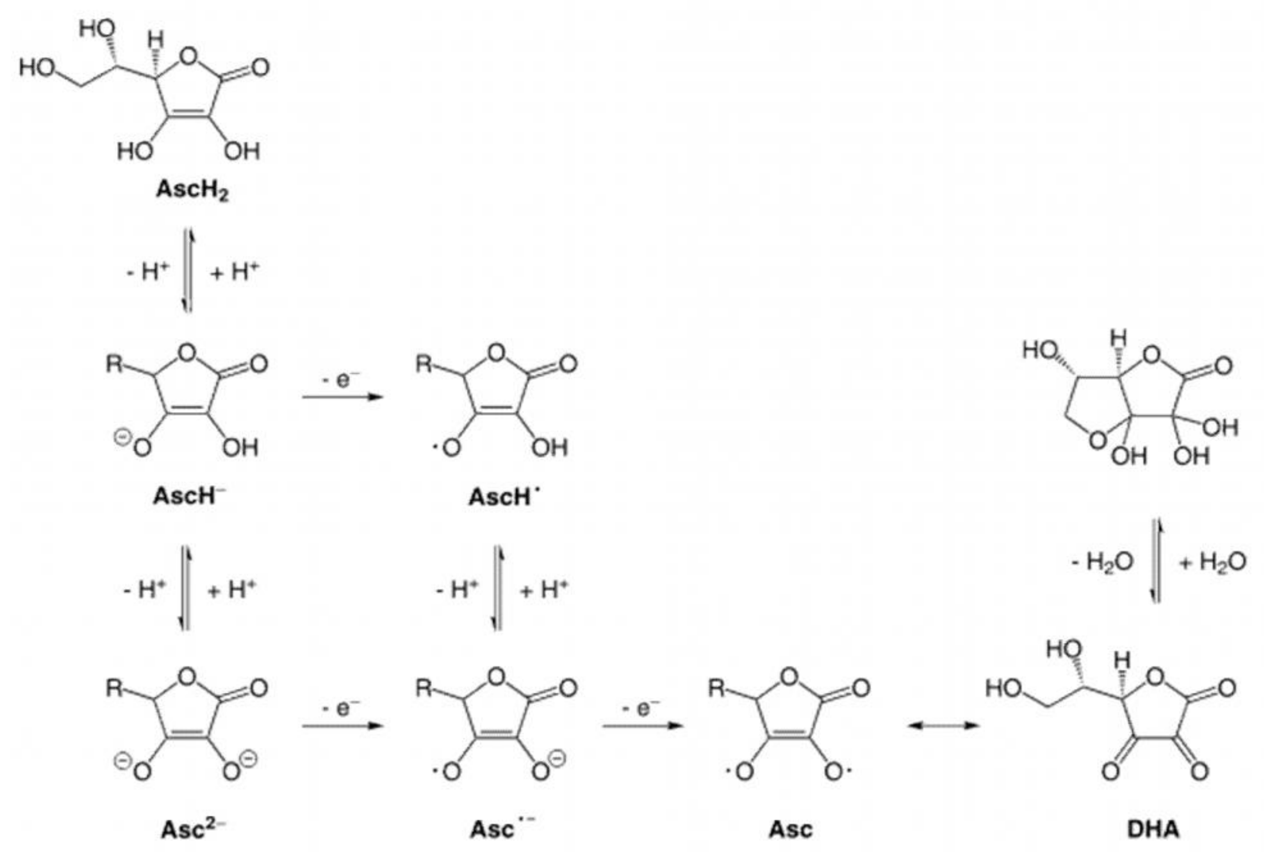
---

[7]Поједина истраживања су указала да витамин C, *in vitro* условима, може да испољи прооксидантна својства, тј. да прилком конвезије $AscH_2$ у DHA редукује присутне јоне прелазних метала (Fe^{3+}, Cu^{2+}) у нижа оксидациона стања (Fe^{2+}, Cu^{+}), која су склона иницирању радикалских врста (Фентонова реакција), који даље потенцијално доприносе липидној пероксидацији.

$Fe^{2+} + H_2O_2 + H^+ \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + H_2O$

$Fe^{3+} + AscH^- \rightarrow Fe^{2+} + Asc^{\bullet -} + H^+$

Међутим, слободних јона прелазних метала у организму готово да нема, они бивају хелатизовани или везани за поједине протеине [40].



Слика 5. Оксидациони механизам претварања L-аскорбинске киселине ($AscH_2$) преко ниско реактивног семидехидроаскорбил радикала ($Asc^{\cdot -}$) у L-дехироаскорбинску киселину (DHA) [43].

L-аскорбинска киселина је изразито осетљива на повећање температуре које доводи до њене деградације. Повећањем температуре и притиска, ова деградација се одвија као реакција првог реда [49, 50].

Брзина претварања $AscH_2$ у DHA, у аеробним условима је олакшана на вишим pH вредностима, другим речима, L-аскорбинска киселина је стабилнија у киселој средини [51]. Као најбољи медијум за хомогенизацију L-аскорбинске киселине се показала метафосфорна киселина ($(HPO_3)_3$), која стабилизује $AscH_2$ и у присуству кисеоника. $(HPO_3)_3$ се често користи за екстракцију витамина C из природних производа, пре свега да би се исталожили присутни протеини, и да би се инхибирала активност ендогене аскорбат оксидазе [52].

Са друге стране, повећањем температуре (> 100^{o}C) се стабилност водених раствора L-аскорбинске киселине смањује на нижим pH вредностима [50].

Садржај витамина C се у прехрамбеним производима снижава временом и пропорционално температури чувања [53]. Дуже излагање вишим температурама, приликом спремања хране, може знатно умањити садржај витамина C [54].

Витамин C је један од најшире коришћених дијететских суплемената, фортификаната и конзерванаса. На тржишту је доступан у облику капи, таблета, капсула, кристалног праха, смеша за пиће, мултивитаминских формулација, као и вишеструких антиоксидантних формулација. Дозира се у опсегу од 25 mg до 1,5 g.

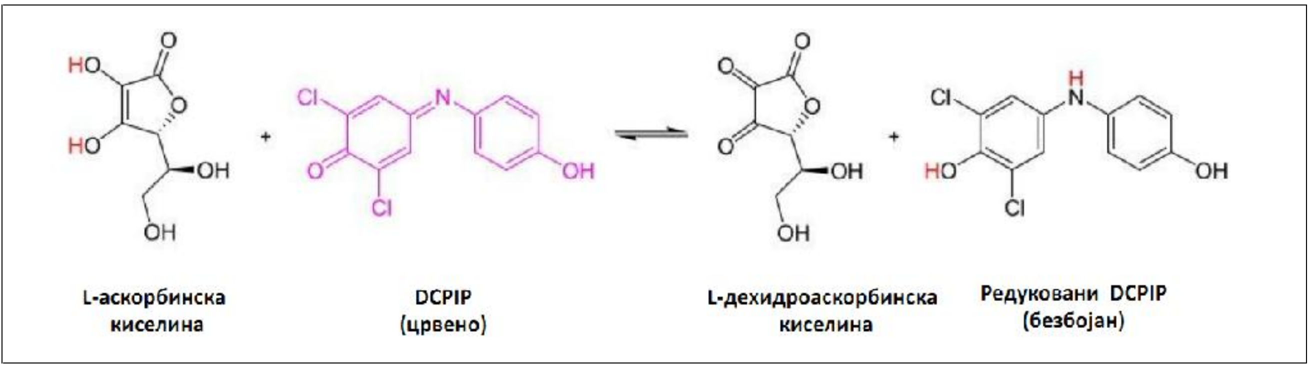
Методе за одређивање садржаја витамина C

Иако у литератури постоји велики број различитих метода за одређивање садржаја витамина C, како у најразличитијим производима, тако и у биолошким течностима, перманентно се настављају напори у потрази за новим методама.

Титриметријске методе

Витамин C је изразито редукујући агенс, са ниским редокс потенцијалом (0.18 и 0.08V на pH 4.5 і 6.4, редом) и на бази тог својства разрађено је низ метода за његово квантитативно одређивање.

Широку примену има Тилмансова метода која се заснива на редукцији натријумове соли 2,6-дихлорфенолиндофенола (DCPIP), у киселој средини (смеша метафосфорне и сирћетне киселине), где истовремено он има улогу индикатора. Оксидовани облик DCPIP тамно плаве боје у присуству $AscH_2$, прелази у безбојни редуковани облик (Слика6). Ова реакција је квантитативна [55].



Слика 6. Редукција DCPIP L-аскорбинском киселином.

Иако је ово званична метода, она није примењива у присуству Fe^{2+}, Sn^{2+}, Cu^{+}, SO_2, $S_2O_3^{2-}$ јона, затим танина, бетанина и сулфхидрилних једињења. Алкалне супстанце такође ометају одређивање витамина C овом методом [56].

Титрација узорака са аскорбинском киселином тетрахлор бензохиноном (хлоранилом) се одвија у присуству EDTA, који служи као индикатор и као маскирајуће средство. Ово одређивање ометају тиоли [57]. За одређивање аскорбинске киселине у свежем воћу користи се и титрација са дихидроксииндолом [58].

Неколико титрационих реагенаса за одређивање витамина С, укључује јод (I) или бром (Br).

N-бромсукцинамид као титрационо средство, користи скроб као индикатор. Редукујуће киселине и соли гвожђа не утичу на ток ове титрације, али се добијају незадовољавајући резултати приликом анализе сокова и производа од воћа који садрже метабисулфит као конзерванс [59].

За одређивање завршне тачке помоћу N-бромофталимида и N-бромосахарина, употребљава се хинолин жуто. Ова реакција се може искористити и за потенциометријско одређивање аскорбинске киселине. Цистеин и глутаминска киселина се укључују у овај реакцијски механизам [60]. Калијум јодат, калијум бромат и јод монохлорид као тирациона средства, користе скроб као индикатор. Међутим, показало се да сам скроб омета реакцију између јода и аскорбинске киселине.

Броматометријско одређивање витамина С, омогућавају и бројни индикатори: перфеназин [61], 1-амино-4-хидроксиантрахинон [62], азинске и оксазинске боје [63], феносафранин, апосафранин и сафранин Т [64].

Титрације о-јодобензоатом [65] и о-диацетоксијодобензоатом [66], се користе за одређивање аскорбинске киселине у неутралној средини. Као индикатор се користи смеша леуко-2,6-дихлорфенолиндолфенола и калијум јодида. Тиоуреа, тиосулфати и сулфиди утичу на одређивање, као и цистеин и глутатион, с тим што се они могу маскирати.

Употребом талијум(III) перхлората [67] и бакar(II) сулфата [68] у одређивању аскорбинске киселине у киселој средини, избегава се негативни утицај цитрата, тартарата, сукцината и малата, глукозе, фруктозе, као и металних јона Mn^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Ni^{2+},Co^{2+}, Zn^{2+}и Ba^{2+}. Садржај витамина С се процењује ретитрацијом вишка Tl^{3+} јодометријски. Недостатак ове методе је у томе што се примењује у инертној атмосфери, док је прелазак боје недовољно изражен.

Неколико метода које које као тирационо средство користе вариамин плаво, угљеник-тетрахлорид или хлороформ, омогућава употребу различитих индикатора, као што су меркури-хлорид, р-метокси крисодин, нафтол црно-плаво и амарант [69]. Соли Cu^{2+}, As^{3+}, Hg^{2+}, затим цистеин, тиоуреа, тиогликолна киселина, сулфиди и сулфити знатно утичу на ток ових одређивања.

Ce^{4+} сулфат је дуго употребљаван као реагенс који се користи за одређивање аскорбата и који се додаје у вишку, након чега је могућа ретитрација раствором Fe^{2+}соли, након 30 минута. Као индикатори могу послужити: дифенилбензидин, фероин, N-фенилантранилна киселина и родамин 6G, али у концентрацији вишој од концентрације титранта. Проблем који се јавља код ове методе је у томе што настали Cr^{3+} катализује ауто-оксидацију аскорбинске киселине што умањује реалне резултате [70].

Калијум-хексацијаноферат (III) се користи као титрационо средство у слабо алкалној средини уз употребу DCPIP, као индикатора [71]. Недостатак ове методе се огледа у употреби инертне атмосфере, због осетљивости хексацијаноферата (III).

Неколико титраната показало се подједнако добрим и у киселој и у базној средини, а такви су: Ce^{4+}, $Fe(CN)_6^{3-}$, V^{5+}, Mn^{3+}и Mn^{4+}, Fe^{3+}, Cu^{2+} и бромат, док су као индикатори коришћени: фероин, метилен плаво, толуидин плаво, азур А, В или С, тионин, бруцин и p-анисидин, редом [72].

Иако су титриметријске методе једноставне за извођење, бројни проблеми се јављају код употребе готово сваког титранта. На пример, стехиометријски односи у реакцији церијум(IV)-сулфата и аскорбинске киселине, варирају са временом, температуром и киселошћу средине; титрација са DCPIP је ефикасна само код чистих водених раствота аскорбинске киселине; присуство редукујићих супстанци утиче на завршну тачку титрације и чини анализу неспецифичном итд.

Електрохемијске методе

Одређивање аскорбинске киселине поларографским методама, се заснива на њеној електрохемијској оксидацији користећи најчешће живину електроду.

Методе које укључују капљућу живину електроду су коришћене за одређивање витамина С у зачинима, храни [73], воћу и поврћу [74], дечијим млечним формулама [75], фармацеутским производима и надбубрежној жлезди пацова [76], уз ацетатни или цитратни пуфер (pH 4,5-4,6). Утврђена је интерференција са формалдехидом.

Поларографија наизменичном струјом је коришћена као метод за симултано диференцијално одређивање L- и D- облика аскорбинске киселине [77].

Диференцијална пулсна хроматографија, је такође употребљена за одређивање витамина С, након његове кондензације са о-фенилен-диамином у 0,2 mol/L сирћетној киселини, у свежем и дехидрираном воћу и поврћу и фармацеутским производима [78, 79].

Ипак, ове методе нису у широј употреби, пре свега због присуства једињења која ометају мерења и којих се треба ослободити коришћењем разних техника за одвајање, као што су екстракције или хроматографије.

Друге волтаметријске методе за одређивање витамина С користе различите врсте електрода: конвенционалне [80-82], ротирајуће микродиск електроде [83], микро и вишеструке микро електроде [84] и електроде од угљеничне пасте [85]. Проблем код употребе стационарних електрода се јавља приликом понављања мерења, када долази до „обрастања“ електоде оксидационим производима.

Употребаферицинијум карбоксилне киселине као медијатора витамина С из фармацеутских производа и свежег воћа, омогућује употребу волтаметријске методе и код јако обојених, мутних и вискозних узорака [86].

Модификација електроде од угљеничне пасте макропрстенастим једињењима, омогућује волтаметријско одређивање витамина С, у опсегу 0,6-500 $\mu g/cm^2$ и границом детекције 0,1 $\mu g/cm^2$ [87].

Волтаметрија са правоугаоним импулсима, се такође може употребити за одређивање витамина С у слатким напицима и воћним соковима, у опсегу детекције 2,0-6,0 μmol/L [88].

Амперометријски сензори, за одређивање L-аскорбинске киселине се користе уз имобилизацију аскорбат оксидазе у измењеној колагенској мембрани или глуталдехиду, а производи се монтирају на Кларкову кисеоничну електроду. Присуство Cu^{2+}, Fe^{3+}, глукозе, EDTA и лимунске киселине није утицало на резултате мерења [89].

Биамперометријске титрације са јод монохлоридом, калијум јодатом, калијум пероксомоносулфатом или купри-перхлоратом, које су биле употребљаване за анализу фармацеутских производа који садрже витамин С, користиле су платинску или воском импрегнирану графитну електроду или двоструку графитну електроду [90].

Проточна анализа са амперометријском детекцијом, користи - имобилизациони реактор ензима или фотохемијску редукцију метиленског плавог у фталатном пуферу (pH 3,8), за одређивање витамина С у опсегу 5-90 $\mu g/cm^3$ и релативном стандардном девијацијом од 1,3-4,8 % [91-95].

Одређивање аскорбата потенциометријским титрацијама се изводи уз употребу DCPIP-а, N-бромосукцинимида, бакар-сулфата, јода, калијум-хексацијаноферата, тетрахлоро бензохинона и хексааминкобалта као титраната [96, 97]. Ове методе се теже примењују код узорка са адитивима, као што су мултивитаминске формулације које садрже минерале. Протеини и друге растворљиве органске материје, ометају ова одређивања.

Кулометрија има веома ограничену примену приликом одређивања витамина С. Ова метода се заснива на квантитативној оксидацији аскорбинске киселине на платинској аноди и захтева веома чисте растворе. Једна од ових техника укључује порозну угљеничну електроду, хексацијаноферат као медијатор и L-аскорбат оксидазу. Граница детекције ове методе износи 0,2 μmol/L [98, 99].

Хемилуминесцентне методе

Методе за одређивање аскорбинске киселине, засноване на хемилуминесценцији могу укључивати различите системе, као што су: Cu^{2+}–луминол, Ce^{4+}–родамин 6G, Fe^{2+}–луминол–O_2, $KMnO_4$–луминол, H_2O_2–хемин–луминоли H_2O_2–луминол–пероксидазу CL [100-106]. Овом техником се обезбеђује интервал одређивања између 2-60 μM, док граница детекције лежи у опсегу 1,0-6,2 μmol/L. Метода је применљива на узорцима воћа, поврћа, сокова итд.

Високо осетљива метода за одређивање аскорбинске киселине (1 ng/cm^3– 1 μg/cm^3) у таблетама и поврћу, која обухвата увођење реагенса применом проточне анализе, заснива се на инхибицији хемилуминесценције Fe(II)–луминол–O_2 система, аскорбинском киселином [107]. Још једна метода која користи проточну анализу, базирана је на фото-оксидацији аскорбинске киселине, интервал одређивања ове технике износи 1 nmol/L – 0,3 mmol/L[108].

Ове методе су веома осетљиве, али њихов недостатак је недовољна селективност у ралним узорцима.

Кинетичке методе

Примена кинетике у аналитичкој хемији је ограниченог значаја, осим када реакција споро достиже равнотежу.

Већина ових метода се заснива на редукционом ефекту аскорбинске киселине, нпр. DCPIP-а (109) (λ_{max}= 522 nm) или толуидин плавог (110) (λ_{max}= 600 nm). Међутим, време извођења једног мерења износи најмање 20 минута. Метод који укључује DCPIP, омогућује одређивањеу аскорбинске киселине (0,2 – 500 μmol/L), у узорцима сока од наранџе, першуна и кромпира, са прецизношћу од 98; 95 и 90 % редом, у односу на стварне вредности.

Сличне кинетичке методе обухватају мерење смањења апсорбанце Co(III)–EDTA на 540 nm (111) или употребу 5-[N-(3,5-дихлорохинонимин]-8-хидроксихинолина (112) у реакционој смеши која садржи 20 % етанол и 0,08 mol/L Брајтон-Робинсонов пуфер (pH 5,5).

Одређивање витамина С каталитичком кинетичком спектрофотометријом (λ_{max}= 555 nm) у концентрацијама изнад 0,6 μg/cm^3 је вршено уз употребу родамина В, ванадијум јона и калијум-бромата у пуферу (HCl/KH_2PO_4) (113).

Мада нуде предност повећане осетљивости, кинетичка мерења захтевају и репродуктивност при компликованом мешању аналита са реагенсима и одређено време одвијања реакције, па су сходно томе ове методе подложне грешкама, које настају услед промене брзине реакције или стварања колоида.

Одређивање аскорбинске киселине у воћним соковима и фармацеутским производима могуће је и употребом методе засноване на инхибицији реакције између хлороводоничне киселине и бромата. Обезбојавање метил-оранжа производима реакције се користи за праћење реакције спектрофотометријски на 510 nm. Линерни опсег зависи од концентрације бромата. Граница детекције је 7,6 μmol/L, а опсег калибрације 8 μmol/L - 1,2 mmol/L [109].

Оксидација аскорбинске киселине помоћу Cu(II)-2,9-диметил-1,10-фенантролина (неокупроин (Nc)) у амонијум-ацетату на pH 7, је искоришћена као основа спектрофотометријске методе, којом је праћен производ реакције бис(Nc)-бакар(I) хелат на 450 nm. Метода се повинује Беровом закону у опсегу између 8 и 80 μmol/L. Флавоноиди интерферирају са овим реагенсом [110,111].

Витамин C, интерферира са ензимом пероксидазом, а под извесним условима и сам може бити њен косупстрат, смањујући брзину оксидације њених косупстрата приликом пероксидазног разлагања водоник-пероксида. Промене у апсорбанцији на одређеној таласној дужини одговарајућих реагенаса, су у корелацији са концентрацијом аскорбата. Као хромогени реагенси су коришћени 4-аминоантипирин и 3,5-дихлоро-2-хидроксифенил сулфонат [112], о-толидин [113], о-дианизидин и 3,3’,5,5’-тетраметилбензидин [114].

За спектрофотометријско одређивање витамина C се користе и прилагођене проточне анализе. Једна од њих употребљава 2-меркаптоетанол као носач протока [115]. Разлике у апсорбанцији аскорбинске киселине и дехидроаскорбинске киселине су биле искоришћене за одређивање њихових остатака у соковима и фармацеутским производима. Многе супстанце које садрже хромофоре или незасићене угљеничне везе озбиљно утичу на апсорбанцију на 245 nm.

Системи за проточну анализу који користе влакнасте оптичке сензоре [116] или роботизовану екстракцијску процедуру [117] аутоматизују одређивање витамина C у храни. Поједине процедуре обухватају оксидацију аскорбинске киселине са жива(II) хлоридом и превођење дехидроаскорбинске киселине у кондензат са о-фенилен диамином.

Поједине методе проточне спектрофотометрије користе анилин као чврсту фазу реактора који садржи бакар(II) фосфат, са линеарним опсегом 5 – 40 μmol/L на 480 nm [118] или модификовани силицијум диоксид, чији је линеарни опсег 10 – 100 μmol/L на 265 nm [119].

Већина ових метода је ограничена на одређивање витамина С у биолошким течностима, бројним интерференцијама које утичу на читав хемијски систем, као и ниском фреквенцијом узорковања.

Флуориметријске методе

Флуориметријске анализе се могу користити за одређивање витамина С у различитим узорцима укључујући воће, поврће и људски серум.

Многе флуориметријске методе се базирају на формирању флуоресцентног производа [120], познатом реакцијом између дехидроаскорбинске киселине и о-фенилен диамина, укључујући и званичну методу [121], која обухвата оксидацију аскорбинске киселине различитим оксидационим средствима. Тако, једна од микрофлуорометријских метрода користи DCPIP као оксидационо средство [122].

За одређивање укупног садржаја витамина С у људском серуму, била је коришћена метода ултрамикрофлуорометрије која се заснива на реакцији дехидроаскорбинске киселине са 1,2-диамино-4,5-диметокси-бензеном [123].

Разне модификације ових метода обухватају и употребу различитих средстава за екстракцију, па је тако коришћена јефтинија оксална киселина уместо екстракционе смеше метафосфорна /сирћетна киселина [124].

Проточна спектрофлуорометријска кинетичка метода је коришћена за одређивање укупног садржаја витамина С (0,025 – 1,0 μg/ml), а заснована је на ензимски повезаној реакцији у којој настаје флуоресцентни производ хиноксиалин [125].

Онечишћења из узорака могу знатно да промене реалне вредности садржаја витамина С у њима [126]. Недостаци који се јављају код употребе ових метода леже у томе што нема директног одређивања витамина С и што резултати захтевају калкулацију и корекцију висине пикова, као и то што су флуоресцентни молекули јако осељиви на промену pH.

Хроматографске методе

Течна хроматографија може послужити као метода за издвајање и одређивање витамина С. Неколико метода користи високо-поларне колоне, док мобилну фазу представљују смеше у различитим односима ацетонитрила и метил алкохола у фосфатно/цитратно/ацетатном пуферу [127 -130].

Овом техником је могуће одредити и оксидовану и редуковану форму витамина С у различитим узорцима. Мобилну фазу су представљали раствори ацетонитрила и воде (фосфатни пуфер, pH 4,2) (4:1) или ацетонитрила и калијум дихидрогенфосфата (3:1/1:1), док су производи праћени у ултраљубичастој области на 210 и 254 nm.

На сличан начин, укупни садржај витамина C је праћен након редукције дехидроаскорбинске киселине хемоцистеином на 244 nm [131].

Одређивање витамина Ц након хроматографског раздвајања је праћено различитим, методама детекције: електрохемијски [132, 133] или флуорометријски [134]. Граница детекције ових метода се креће око 0,1 mg /100 g узорка.

Код појединих метода се користе неполарне угљоводоничне колоне за одређивање витамина C у урину, биљним екстрактима и млечним формулама. Мобилну фазу представљали су: 0,8 % метафосфорна киселина, 1 % фосфорна киселина, 1,5 % амонијум-дихидрогенфосфат, натријум-хексан сулфонат/метанол (85:15) [135], смеша раствора калијум дихидрогенфосфата (0,5 %) и дитиотреитол (0,1 %) [136]. Овом техником успешно је издвојена аскорбинска киселина од осталих у води растворљивих витамина. Исто тако успешно је обављено одвајање аскорбинске, дехидроаскорбинске, D-изоаскорбинске и дикетогулонске киселине.

Многе технике течне хроматографије користе колоне паковане са анјон измењивачком смолом које садрже $-NR^{+}$ групе везане за чврсту фазу, најчешће силика гел. Мобилну фазу код ових метода чине натријум-ацетат, ацетатни пуфер или натријум-дихидрогенфосфат, док је за детекцију витамина C употребљена нека од електрохемијских метода или UV детекција на 254 или 265 nm [137].

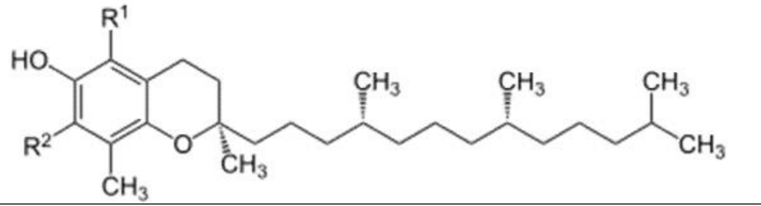
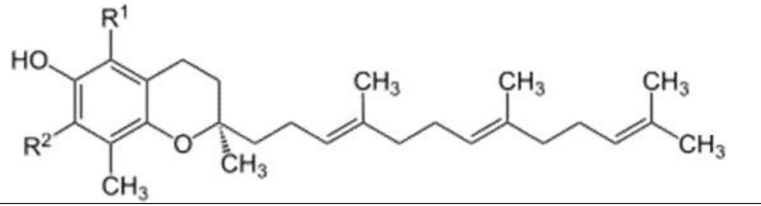
Катјон измењивачке колоне се такође могу употребити за одређивање витамина C у фармацеутским сировинама и воћу. Оне укључују стирен-дивинилбензен или поливинил-пиролидин, као катјон измењиваче [138, 139].

Одређивање аскорбинске киселине гасном хроматографијом је спроведено након растварања узорка (хране или ткива) у пиридину. Линеарност је добијена у рангу 2-10 mg/ml [140].

За одређивање витамина C се ређе користе методе електрофорезе [141, 142], ^{13}C NMR или HMR спектрометрије [143, 144] или ESR спектрометрије [145, 146].

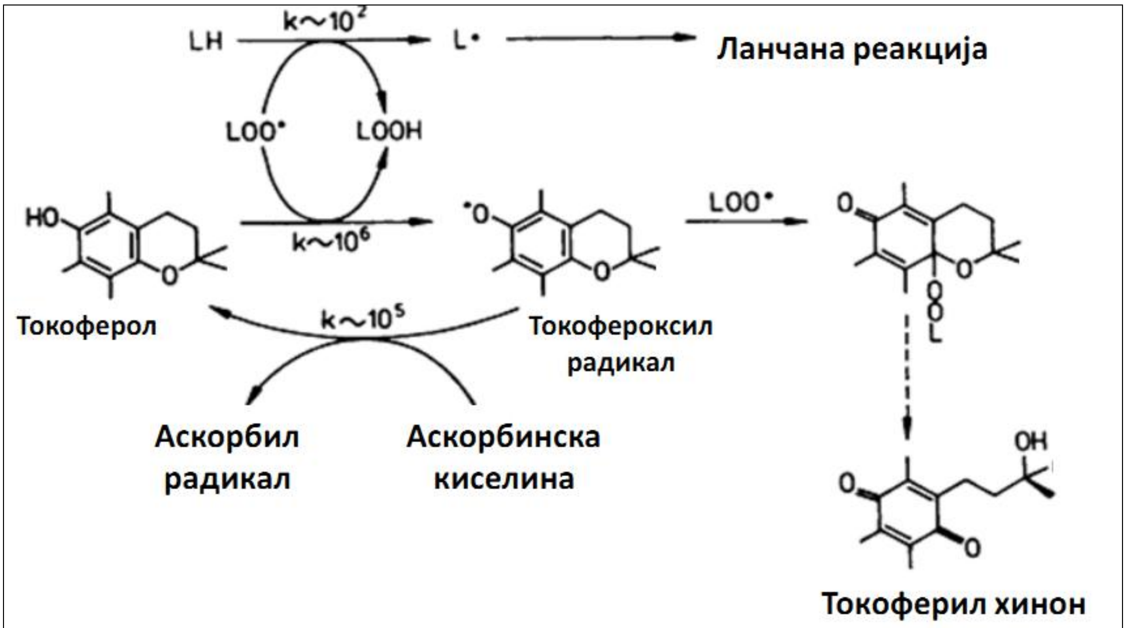
2.2.2.2. Витамин E

Витамин E се јавља у осам различитих форми, четири токоферола (α, β, γ и δ) и исто толико токотриенола (α, β, γ и δ) (Слика 7).

Структура токоферола и токотриенола	Форма	R_1	R_2
	α-	CH_3	CH_3
	β-	CH_3	H
	γ-	H	CH_3
	δ-	H	H

Слика 7. Структура витамина Е.

Овај есенцијални нутрицијент, представља антиоксидант растворљив у липидима, са низом других функција у организму. Сви су деривати фенола и сви садрже прстен хроманола са хидроксилном групом, преко које могу да донирају атом водоника и на тај начин редукују слободне радикале (Слика 8). Хидрофобни бочни ланац омогућава растварање у липидима, односно пенетрацију у биолошке мембране.



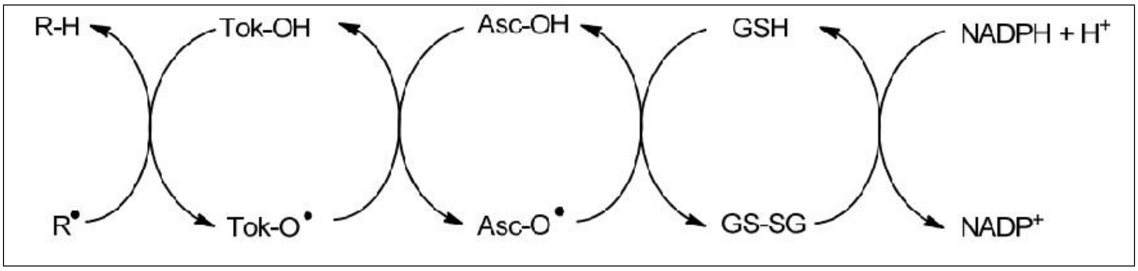
Слика 8. Активност витамина Е као антиоксиданта [7].

За разлику од витамина C, где је физиолошки активан само L-енентиомер, код токоферола је активан само D – облик. Синтетички витамин Е, представља рацемску смешу.

Када је у питању антиоксидантна активност витамина Е, сматра се да је његова главна биохемијска функција неутрализација органских пероксил радикала (LOO˙). Ови радикали се могу стварати, од полинезасићених масних киселина фосфолипидних мембрана или липопротеина након одвајања водоника у процесу иницијације. На тај начин се пероксил радикал преводи у релативно стабилнији липидни хидропероксид, док формирани токофероксил радикал омогућава прекидање радикалске ланчане реакције. Константе брзине реакције токоферола са различитим пероксил радикалима се крећу између 0,1 mmol/L·s и 1 nmol/L·s [147].

Процењује се да садржај витамина Е у појединим ткивима указује на њихову потенцијалну осетљивост према оштећењима од различитих оксиданата, као што су пероксил, хидроксил и алкоксил радикали, кисеонични синглет радикал и неколико кисеоник-метал комплекса [148].

In vitro студије су показале да аскорбинска киселина делује синергијски са витамином Е, тако да витамин С редукује токофероксил радикал и враћа радикал-сакупљачку активност токоферола [149]. У организму функцију регенератора токоферола може преузети глутатион (Слика 9).



Слика 9. Антиоксидантна мрежа.

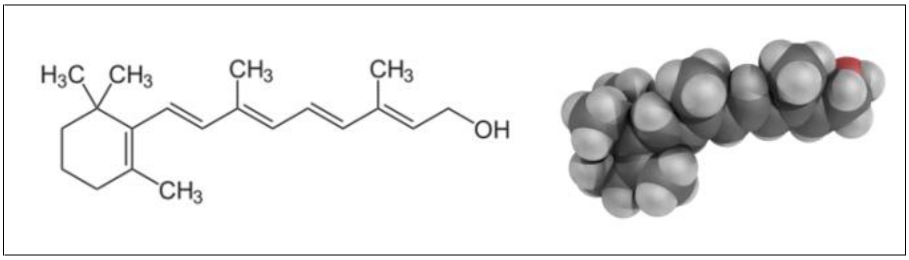
Својом антиоксидантном активношћу витамин Е штити незасићени бочни ланац витамина А и каротена од пероксидације, повећавајући њихову биолошку активност.

Комерцијално се витамин Е дистрибуира као α-токоферол или у форми естара, као токоферол-ацетат, који је стабилнији и мање подложан оксидацији.

За одређивање витамина Е користи се већи број метода у зависности од циља анализе и природе узорка. У неким случајевима је потребно одредити α-токоферол, док се у другима захтева одређивање и токоферола и токотриенола. У сваком случају, узорак је неопходно претходно третирати, јер је витамин Е најчешће везан за мембране, липопротеине и лизозоме, па је потребно елиминисати утицај протеина и угљених хидрата. У ту сврху се користе органски растварачи (најчешће етанол и метанол), док се из узорка који имају нижи садржај липида користи екстракција диетил-етром. Узорке богате мастима је потребно претходно сапонификовати. За одређивање самог витамина користе аналитичке процедуре, као што су TLC, GC, HPLC и CEC [150].

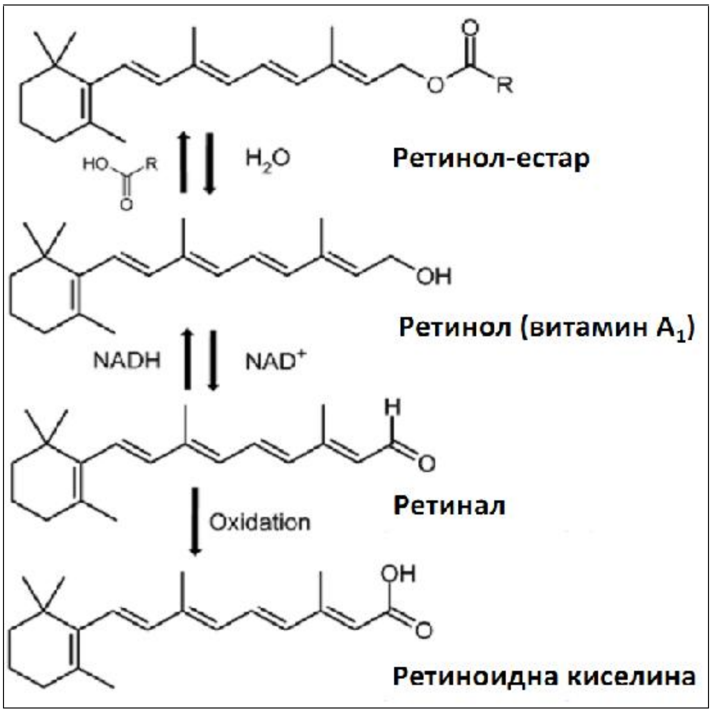
2.2.2.3. Витамин А

У ужем смислу, витамин А се назива ретинол или витамин A_1 или {(2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-3,7-диметил-9-(2,6,6-триметилциклохекс-1-енил)нона-2,4,6,8-тетраен-1-ол} (Слика 10).

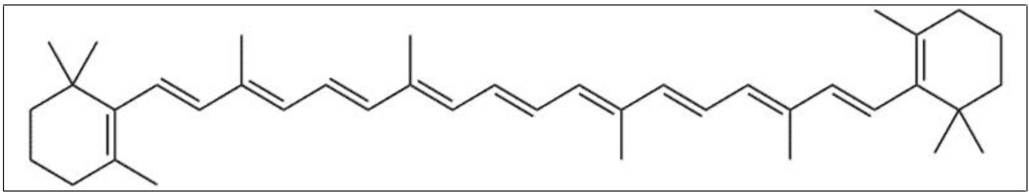


Слика 10. Структурна формула ретинола.

Заправо витамин А представља групу неколицине нерастворљивих угљоводоника. Сви припадају ретиноидима, односно, дериватима ретиноинске киселине (естри, етри или алкохолни деривати) (Слика 11) или су његови провитамини, од којих је нејзначајнији β-каротен (Слика 12), из кога посредством бета-каротен 15,15’-монооксигеназе настаје витамин А.



Слика 11. Различити облици ретиноида.



Слика 12. Структура β-каротена.

Деловање витамина А се углавном огледа у везивању за ендоћелијске рецепторе, па тако последично утиче на синтезу специфичних протеина [151]. Важан је за диференцијацију и раст епителних ћелија и учествује у формирању пигмента ока - родопсина.

Продужени систем коњугованих двоструких веза омогућава овим молекулима антиоксидантна својства. Утврђено је да β-каротен деактивира кисеонични синглет $^1O_2$, што омогућава боље разумевање биолошке функције β-каротена и других каротеноида, међутим остаје питање да ли се кисеонични синглети јављају још негде осим у фотосензитивним реакцијама [152]. Поред тога, β-каротен веома ефикасно редукује трихлорметилпероксил радикал и инхибира оксидацију појединих једињења пероксил радикалима [153]. Ликопен, аналог β-каротена отвореног ланца, је најефикаснији неутализатор кисеоничног синглета од свих каротеноида [154,155].

β-каротен поседује нижу реактивност према радикалима у односу на аскорбинску киселину и α-токоферол. Кооперативне интеракције између ових витамина када се заједно нађу у систему, очекују се између аскорбинске киселине и α-токоферола, као и између α-токоферола и β-каротена [156].

Витамин А је фото и термо осетљива супстанца, која се релативно брзо разграђује дејством дневне и ултраљубичасте светлости, док се у присуству кисеоника лако оксидује и разлаже, градећи епоксиде [52].

У биљкама се овај витамин налази у облику провитамина, док главне животињске изворе представљају јетра, млеко и млечни призводи, жуманце јаја и риба. У ткиву животиња и морских организама је присутан у естерификованом облику.

Авитаминоза витамина А најчешће настаје због неадекватне прехране или при хроничним болестима код којих је смањена апсорпција масти. Једна од хиповитаминоза је и ноћно слепило (никталопатија). Помањкање овог витамина смањује способност адаптације на таму, што је у основи хемијски процес у којем се ствара родопсин. Недостатак овог витамина утиче и на поремећаје на кожи (157).

Препоручене дневне дозе за витамин А се, у зависности од узраста и пола, крећу од 3000-5000 U.

Хипервитаминоза овог есенцијалног нутрицијента је могућа приликом уноса изразито високих количина ретиноида, нарочито код деце, али и одраслих након дуготрајног лечења кожних болести или непримереном аутомедикацијом [158]. Хипервитаминоза витамина А и код људи и код животиња, се јавља повећањем ретинил естара у крвном серуму и поред тога што је садржај ретинола остао нормалан [159, 160].

Ретинол ацетат је честа форма витамина А, заступљена у суплементима у исхрани, мултивитаминских инстант напитака, као и козметичких средстава за заштиту коже. Молекули витамина А су у стању да се уграде у фосфолипидни двослој ћелијске мембране [161], што доводи до повећања њене пермеабилности, док примена већих концентрација од физиолошких (>70 μmol/L) може изазвати лизу ћелије, натицање митохондрија као и хемолизу еритроцита [162].

Са неким протеинима, какви су серумски албумин, β-лактоглобулин и протеин хумане плазме који везује ретинол, витамин A_1 гради комплексе растворљиве у води [163]. Исто тако, утврђено је да *in vitro* значајно инхибира ароматазу одговорну за раст тумора када се налази у концентрацијама изнад >0,2 μmol/L[8].

Одређивање витамина А

Једна од првих метода за одређивање витамина А у животињским производима (јаја, млеко, кајмак, павлака, маслац, серум) је била Кар-Прајсова метода, која се заснивала на формирању обојеног кондензационог производа у реакцији између витамина А и $SbCl_3$ или $SbCl_5$, након извршене сапонификације и екстаховања у хлороформу [52].

Модификацијом ове методе могуће је спектрофотометријско одређивање витамина А, употребом трифлуорсирћетне киселине (TFA) као хромогеног реагенса на 620 nm [165].

Истовремено одређивање ретинил и ретинол естара је могуће извршити након хроматографског одвајања на колони, флурометријски или спектрофотометријски са TFA [166]. Такође је могуће симултано одређивање ретинил и ретинол естара, течном хроматографијом високих перформанси (HPLC), на UV подручју на 330 nm из крвног серума, са границом детекције од 50 μg/L [167].

HPLC метода се користи за сепарацију ретинола, α-токоферола и β-каротена из серума, чије су концентрације одређиване апсорбцијом у видљивом и UV подручју и амперометријски са стакластом угљеничном електродом [168].

[8] *Та инхибиција припада мешовим типу, па тако ретинол смањује и V_{max} и K_M овог ензима [164].*

Временом је HPLC метода истиснула друге методе за анализу узорака који садрже витамине растворљиве у мастима. Након HPLC раздвајања, за детекцију токоферола, токотриенола, ретинола и њихових естара, најчешће се примењује флуориметријска техника, која је прецизнија од UV детекције, али мање прецизна од електрохемијске методе [169].

2.2.3. Пероксидаза

Ензим пероксидаза (E.C.1.11.1.7), игра значајну улогу у различитим физиолошким процесима микроорганизама, биљака и животиња [170, 171]. Пероксидазе одређене биолошке врсте, углавном, представљају смешу изоензима[9]. Тако је из рена (*Armoracia rusticana*) изоловано више од 40 изоензима пероксидазе, од којих је изоензим C најзаступљенији [173].

Све пероксидазе се могу према структури поделити у три групе, које показују мање од 20 % идентичности у редоследу аминокиселина [174]. У групу I спадају цитохром с пероксидаза из квасца, аскорбат пероксидаза из хлоропласта и цитосола биљних ћелија и бактеријске пероксидазе, групи II припадају екстрацелуларне пероксидазе гљивица (нпр. лигнин- и манганпероксидаза), док групу III чине секреторне пероксидазе, где спада и пероксидаза рена [175].

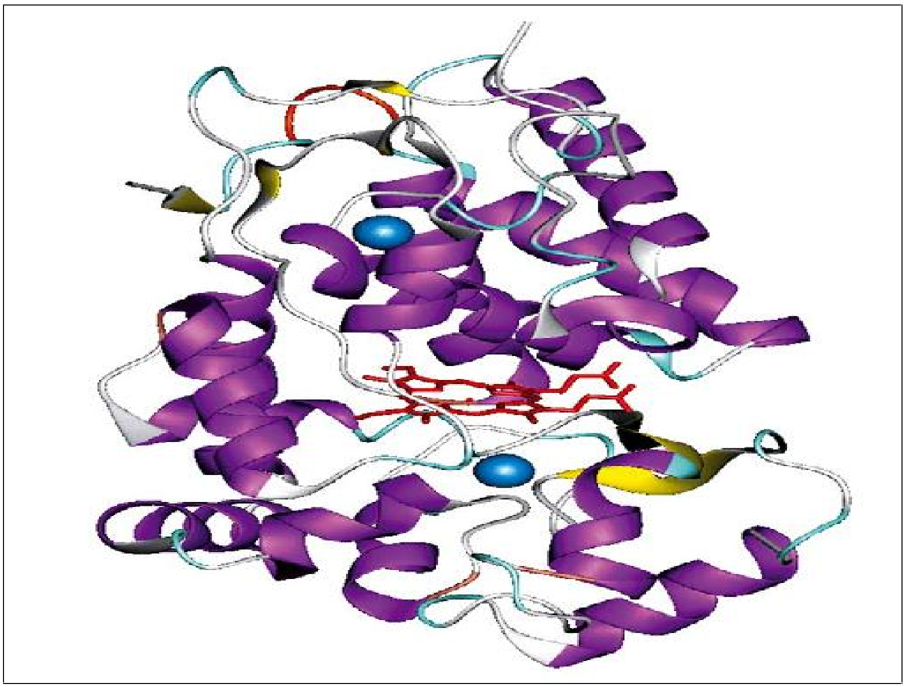
Изоензим C има молекулску масу од 44 kDa и састоји се од 308 аминокиселинских остатака и 8 угљенохидратних ланаца [176]. На N-терминалном крају се налази везан пироглутамат, док је C-терминални крај на коме се налази аминокиселина Сер308, хетероген. У молекулу постоје 4 дисулфидне везе између Cys остатака 11-91, 44-49, 97-301 и 177-209, као и један јонски мост између Asp99 и Arg123.

Пероксидазе су по структури двокомпонентни ензими, са хемом (гвожђе(III) протопорфирин IX) везаним за гликопротеински део молекула. Пероксидаза из рена садржи и везани калцијум (2,0 и 1,4 мола Ca по молу изоензима C и A, редом) који стабилизује молекул ензима са седам координативних веза (Слика 13). Оба метална центра (Fe^{2+}и Ca^{2+}) су битна за структурни и функционални интегритет ензима [177].

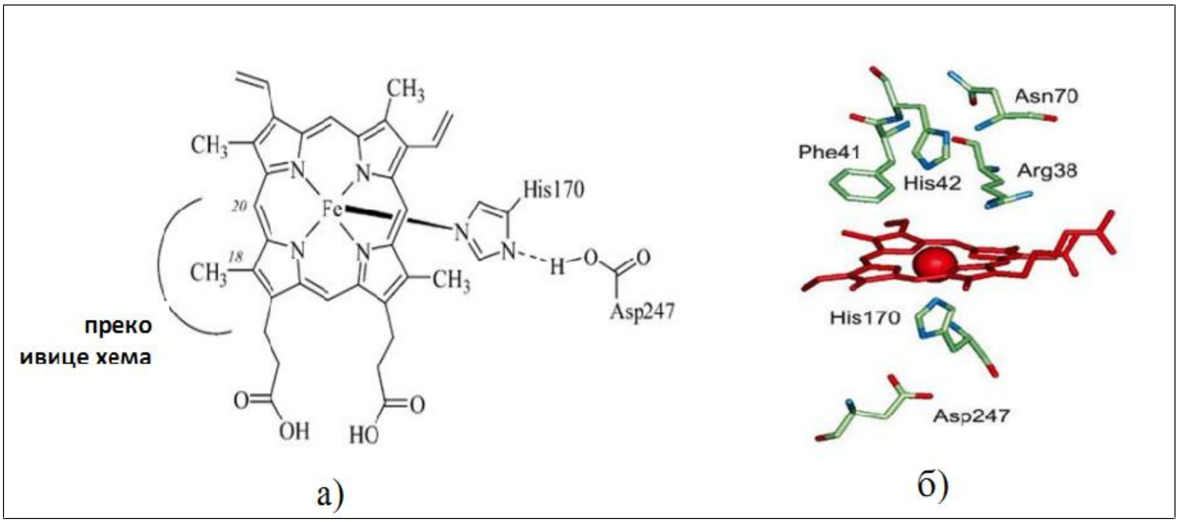
Хем је везан за ензим преко His170 (тзв. проксимални хистидински остатак), док је друго аксијално кординативно место (дистално место) слободно да веже водоник пероксид (Слика 14а).

---

[9]*Изоензими пероксидазе се према киселости могу поделити у три групе: кисели изоензими од A_1 до A_3; неутрални од B_1 до B_3, C_1 и C_3; базни изоензими D и од E_1 до E_6 [172].*



Слика 13.Тродимензионална структура изоензима C пероксидазе рена. Хем (обојено црвено) се налази између дисталног и проксималног подручја, од којих сваки садржи по један јон калцијума (плаве лоптице). α-хеликоидне и β-плочасте структуре представљене су љубичасто, односно жуто.



Слика 14. Хем пероксидазе је координативно повезан са His170, док Asp247 помаже контроли His170. Ароматични косупстати се оксидују „преко ивице" хема, али се не везују за гвожђе хема.

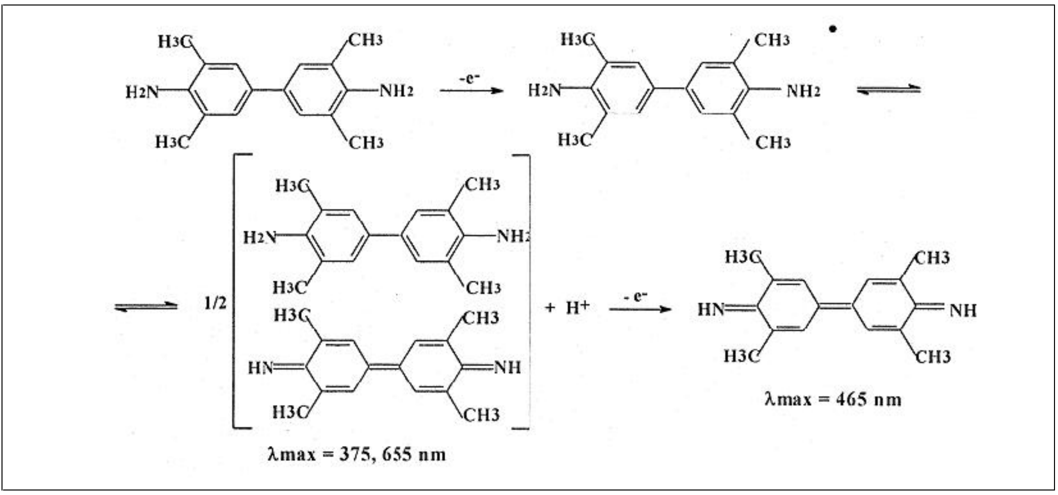
Главни супстрати и једини молекули који директно реагују са ензимом су пероксиди, и то обе форме, слободна форма водоник-пероксида и његови органски комплекси или соли.

Мали молекули као што су угљен-моноксид, цијанид, флуорид и азид могу да се вежу са дисталне стране хема и тако инхибирају активност пероксидазе. Неки се везују само њиховим протонованим формама, које се додатно стабилизују водоничним везама са дисталне стране преко Arg38 и His42 (Слика 14б).

О улози пероксидазе у ћелији се говори првенствено у смислу регулисања нивоа интрацелуларног H_2O_2 [178,179]. Пероксидаза трансформише пероксид у воду и кисеонични радикал, кога у присуству косупстрата – донора водоника (AH_2), преводи у нови молекул воде, док се косупстрат претвара у одговарајући слободни радикал ($AH^{\cdot}$), као у следећој једначини:

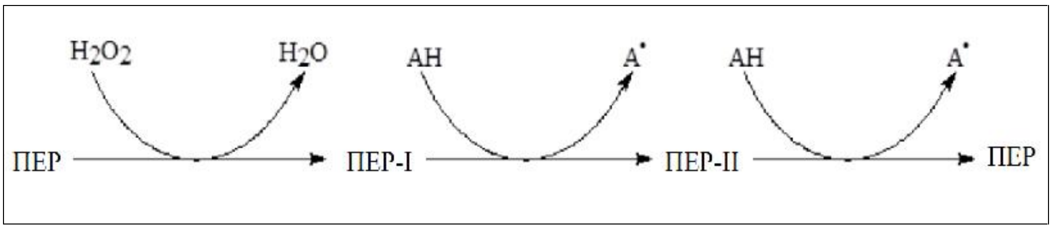
$$2AH_2 + ROOH \rightarrow 2AH^{\cdot} + ROH + H_2O$$

На тај начин, електони активираног кисеоника бивају прослеђени према молекулима косупстрата који их донекле стабилизују својим резонантним структурама, спречавајући њихово хемијско деловање на виталне ћелијске функције (Слика 15).



Слика 15. Пример једноелектронске оксидације 3,3’,5,5’-тетраметил бензидина и његова стабилизација резонатним структурама[180].

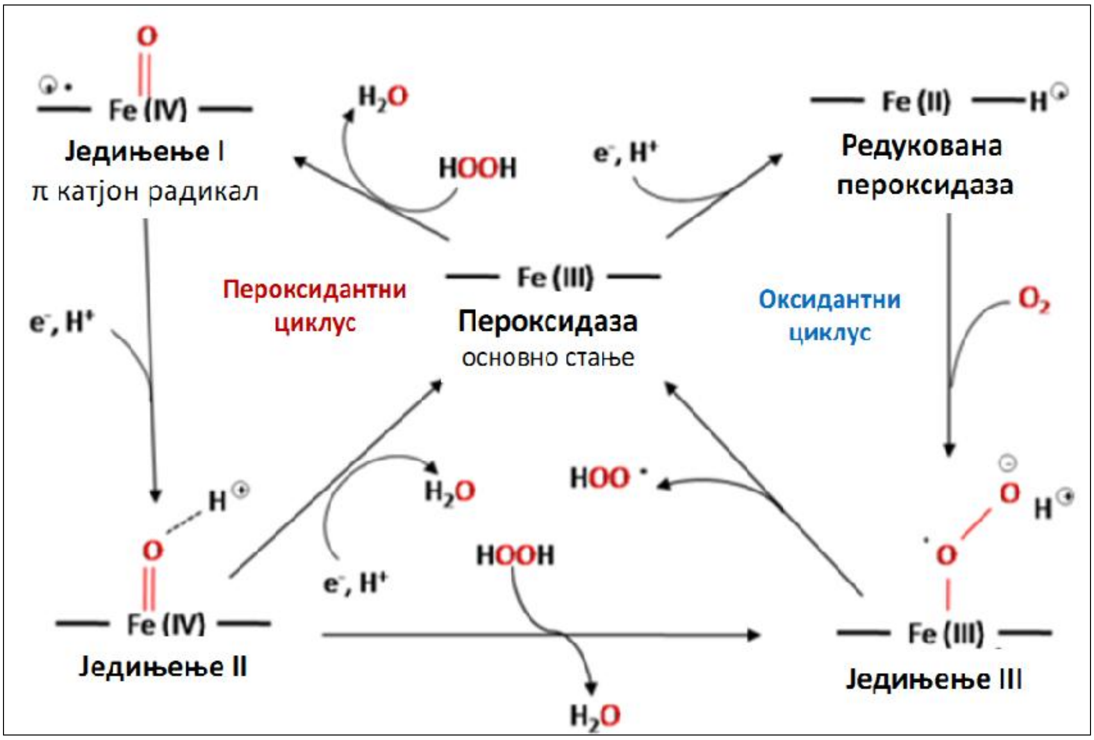
Пероксидаза припада класи оксидоредуктаза и за већину важи један генерални механизам каталитичке активности (Слика16).



Слика 16. Генерални механизам каталитичке активности пероксидазе (ПЕР). AH и $A^{\cdot}$ представљају редуковани, односно оксидовани облик косупстрата (донора водоника).

Као косупстрати могу да служе многи феноли, аминофеноли, ароматични амини и киселине, индофеноли, леуко боје, аскорбинска киселина, неке аминокиселине, нитрити и низ других једињења.

Ензим поседује не само пероксидазну него и оксидазну активност (Слика 17), тако да катализује оксидацију читавог низа једињења неактивираним молекулским кисеоником [175]. Нађено је да уклањање хема (третирањем са HCl и ацетоном), доводи до губитка пероксидантне активности, али да оксидантна активност остаје неизмењена [181].



Слика 17. Оксидационо-редукциони циклус пероксидазе рена.

Први корак каталитичког циклуса је реакција између H_2O_2 и Fe(III) релаксираног ензима и стварања тзв. једињења I, то је интермедијер са вишим оксидационим стањем, које обухвата оксиферил центар и порфирински катјон радикал. Пре стварања једињења I, формира се прелазни облик (једињење 0), детектован у реакцији пероксидазе рена и пероксида, на ниској температури и описано је као Fe(III)-хидроперокси комплекс [182]. Стварање тзв. једињења II, захтева присутност косупстрата – донора водоника. Обе Fe(IV) оксиферил врсте и једињење I и једињење II су моћни оксиданти са редокс потенцијалом близу +1V. Следећи редукциони корак са косупстратом враћа једињење II у основно стање ензима.

У одређеним условима улогу косупстрата може преузети и сам H_2O_2, који тако постаје и акцептор и донор електрона у исто време, али то за последицу има знатно смањење, па чак и потпуни губитак активности ензима [183, 184]. Тако је утврђено да растућа концентрација пероксида, мерено на pH 6,3, може брзо да разори читав молекул ензима, формирањем нестабилног комплекса, насталог између два молекула H_2O_2 и гвожђа у центру хема.

Оксидација косупстрата пероксидазом се јавља на ивици хема. То се дешава у региону који обухвата протоне C18 и C20 (Слика 14а). Реактивни агенси који могу да измене молекул пероксидазе на C18 и C20 атому хема, доводе до гомилања радикалских врста, што указује да је пероксидаза рена веома осетљив молекул, који је много мање ефикасан катализатор трансфера кисеоника, у односу на цитохром P450 [185].

Пероксидазе имају широку примену, па су тако пероксидазе из соје [186], репе [187], рена и других извора, коришћене за детоксикацију отпадних вода које садрже феноле и друге ароматичне материје, као и за уклањање пероксида из појединих намирница и индустријских вода [188-191].

Лигнин и манган пероксидазе, изоловане из беле трулежи (*Phanerochaete chrysosporium*) се успешно користе за биоизбељивање у индустрији папира [192].

Боје које се користе у штампаријама, колор фотографији и текстилној индустрији, су не ретко отпорне на биолошку разградњу и могу представљати велики проблем загађења околине. У новије време расте интерес за њихову деградацију употребом пероксидаза [193,194].

Пероксидазе различитих извора се такође могу користити за полимеризацију фенолних једињења и ароматичних амина, као што су карданол [195], полианилин [196, 197], полиакриламид [198] итд.

Елиминација непријатних мириса, који потичу од фенола, индола, тиола, масних киселина, амонијака и водоник сулфида, насталих у шталама, у процесу анаеробне трансформације животињског отпада, могућа је употребом пероксидазе (млевеног рена) и водоник пероксида [199, 200].

Биосензори који су засновани на пероксидазним електродама имају примену у аналитици, за одређивање пероксида и органских хидропероксида [201], ароматичних фенола и амина у наномоларним количинама [202,180].

У комерцијалне сврхе, пероксидаза се користи у дијагностичкој опреми, за одређивање глукозе, алкохола и мокраћне киселине из серума и мокраће [113, 188], као и у имунолошким тестовима (*ELISA*) за откривање (обележавање) антитела и антигена [203].

У „трансфер“ електрона, са пероксида на косупстрат, могу се укључити поједини антиоксиданти. Тако би витамин C, који и сам може постати косупстрат пероксидазе [204], мада је његов афинитет ка формирању тернарног комплекса са ензимом и супстратом, знатно мањи у односу на конкурентне косупстрате (арил феноле и арил амине), могао куплованом неензимском реакцијом редуковати оксидоване молекуле косупстрата, док се сам оксидује до дехидроаскорбинске киселине, имобилишући електроне пероксида [113]:

$$\text{AsK} + 2\text{A}^{\cdot}_{(\text{обојен})} \rightarrow \text{DHAsK} + 2\text{AH}_{(\text{безбојан})}$$

Ова реакција је квантитативна, па се у *in vitro* огледима уз адекватан избор косупстрата (хромогена - индикатора) може искористити за одређивање витамина C [112, 114, 204-206].

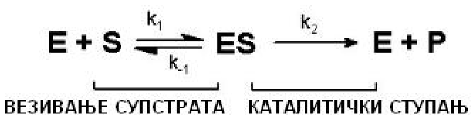
2.3. Кинетика ензимских реакција

Под ензимском активношћу се подразумева особина ензима да одређеном брзином катализује трансформацију супстрата у производ. Проучавање ензимске кинетике пружа увид у механизме по којима се одвијају ове реакције. На тај начин стиче се увид и у њихову улогу у метаболизму, у то како је њихова активност контролисана у ћелијама и на који начин лекови, отрови и дроге могу инхибирати њихову активност.

Брзина ензимом катализоване реакције зависи од више фактора, као што су: концентрације ензима, супстрата, простетске групе и косупстрата, температура и притисак, pH и врста медијума, јонске силе у раствору, присуство инхибитора и активатора, као и изложеност одређеној атмосфери и зрачењу [207].

2.3.1. Приступ Михаелис-Ментенове

Још пре више од сто година, Браун и Анри, су објавили идеју да у ензимски катализованој реакцији ензим (E) са супстратом (S) прво гради комплекс (ES), који се затим разлаже на слободни ензим и производ (P):

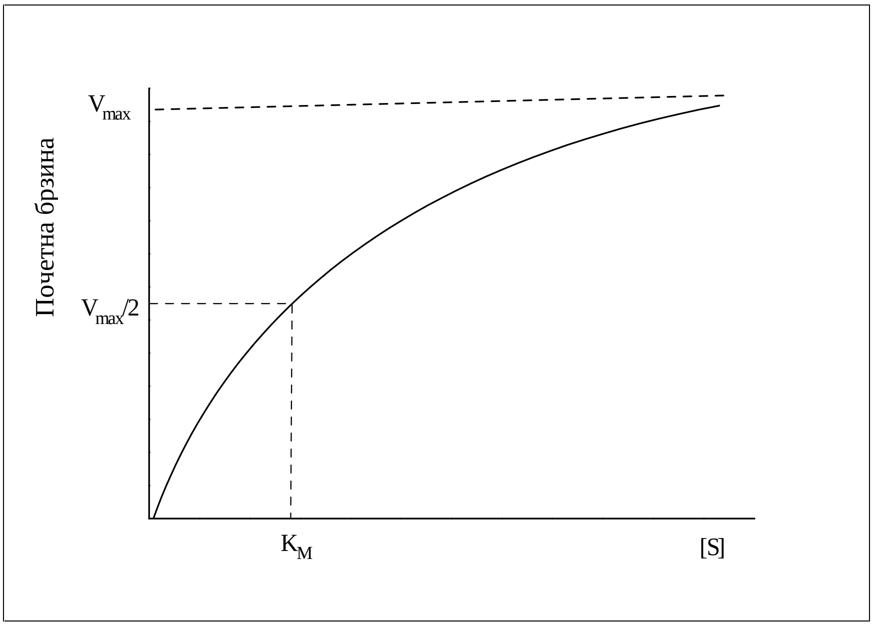


Основна поставка Михаелис-Ментенове теорије, која је убрзо уследила, а која полази од премисе да је концентрација ензима знатно мања од концентрације супстрата и која је у већини случајева потврђена експериментом, била је да се равнотежно стање између ензима и супстрата (E + S) са једне и комплекса (ES) са друге стране успоставља много брже него што почиње разлагање ES комплекса на производ и ензим, те да су комплекс и компоненте у равнотежи.

Зависност почетних брзина (v) катализоване реакције од концентрације супстрата углавном има облик хиперболе (Слика 18) и може се представити једначином:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Одређивање параметара V_{max} и K_M, који представљају карактеристике одређеног система ензим-супстрат, изузетно је важно при проучавању механизма ензимске реакције *in vitro*, јер омогућава сагледавање стабилности комплекса ES, односно степен засићења ензима при одређеној концентрацији супстрата, а самим тим и процену његове физиолошке концентрације, те упоређивање различитих узорака (препарата). Праћење промена и осталих параметара (температура, pH, ефектори), помаже приликом одређивања структуре ензима и разумевања његове функције и регулације *in vivo*.

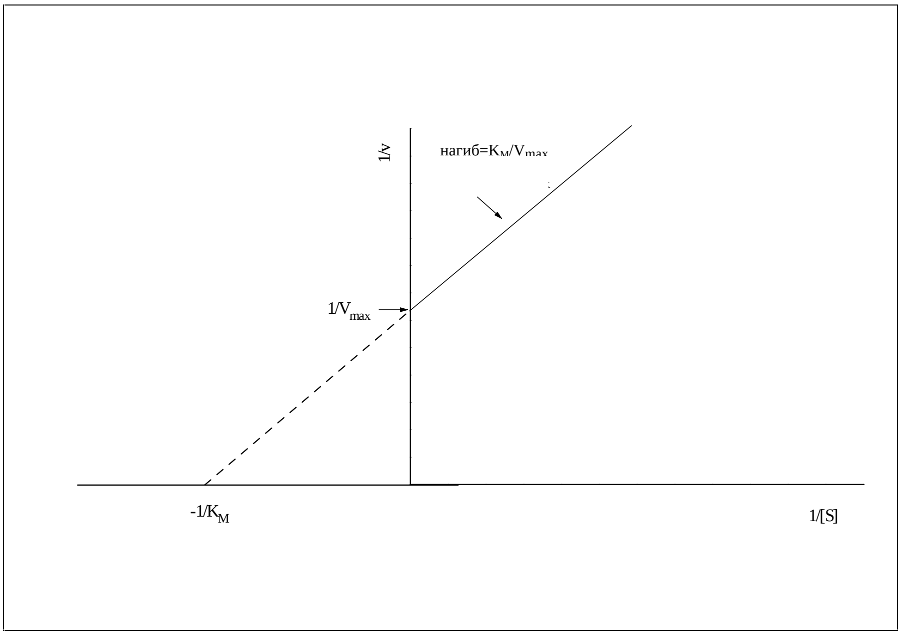


Слика 18. Зависност почетне брзине ензимом катализоване реакције од концентрације супстрата.

Приликом експериментисања са вишим концентрацијама супстрата, често долази до промена у реакционој средини (ефекат соли, непродуктивни комплекс ES и сл.), што омета тачност одређивања почетних брзина, па једначина хиперболе није најпогоднија за одређивање кинетичких параметара. Стога се једначина Михаелис-Ментенове може трансформисати у облике који као графички израз представљају праву. Најчешће примењивану линеарну трансформацију предложили су Лајнвивер и Барк[10]:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Зависност реципрочне вредности почетне брзине (1/*V*) од реципрочних вредности концентрације супстрата 1/[S] је линеарна (Слика 19). Одсечак на x-оси једнак је $-1/K_M$, док одсечак на y-оси износи $1/V_{max}$.



Слика 19. Лајнвивер-Барков дијаграм зависности реципрочних вредности, почетне брзине (1/*V*) од концентрације супстрата 1/[S].

[10]Постоји више предложених начина линеаризације Михаелис-Ментенове једначине. Према трансформацији Едиа и Хофста, једначина приказује зависност почетне брзине (*V*) од односа *V/[S]*:

$$v = -K_M \cdot \frac{v}{[S]} + V_{max}$$

Хенс и Вулф предлажу трансформацију, која приказује зависност концентрације супстрата [S] од односа [S]/*v*:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{[S]}{V_{max}}$$

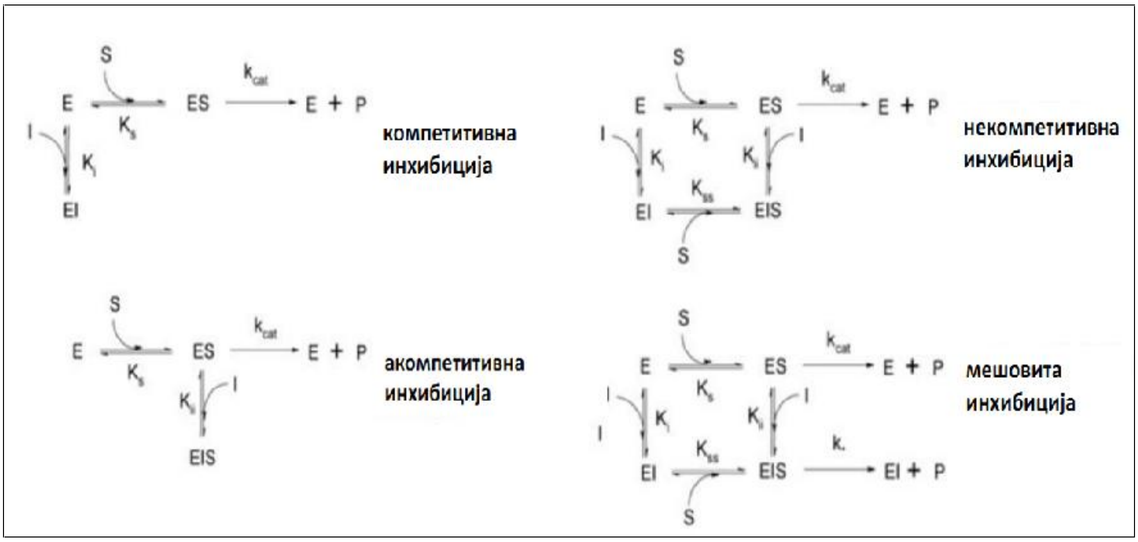
2.3.2. *Инхибиција ензима*

Супстанце које узрокују поремећај нормалних метаболичких реакција се најчешће називају отровима, а оне које поново успсотављају нарушену равнотежу у организму - лековима. И једне и друге могу бити инхибитори ензимски контолисаних процеса.

Инхибиторима ензима се називају оне супстанце које смањују или потпуно елиминишу њихову активност, не реметећи битно тродимензионалну структуру протеинског молекула.

Проучавање инхибиције пружа доста информација о механизму ензимске катализе, о топографији активног места, као и о конформацији прелазног стања, па самим тим и информацију о висини енергетске баријере.

Инхибиција може бити иреверзибилна и реверзибилна. Код прве се инхибитор везује за ензим ковалентно или довољно јако, па је дисоцијација вема спора или немогућа. Раверзибилна инхибиција дозвољава регенерацију ензимске активности уколико се инхибитор уклони из система (дијализа, филтрација и др.). Овај тип инхибиције карактерише константа инхибиције (K_I) која заправо представља константу дисоцијације комплекса ензим-инхибитор. Инхибиција може бити: компетитивна, некомпетитивна, мешовита и акомпетитивна (Слика 20). Различити инхибитори различито утичу на вредности K_M и V_{max}, па се анализирањем промена ових кинетичких параметара у присуству инхибитора може установити тип инхибиције.



Слика 20. Различити типови инхибиције на хипотетичку ензимску реакцију.

Компетитивна (конкурентна) инхибиција

Инхибитори који изазивају ову врсту инхибиције углавном су структурни аналози супстрата, који се везују за активно место у ензиму и онемогућавају везивање правог супстрата, другим речима, и супстрат и инхибитор се надмећу око истог места везивања за ензим. Зависност почетне брзине ензимске реакције од концентрације супстрата у присуству компетитивног инхибитора описује Михаелис-Ментенова једначина, на следећи начин:

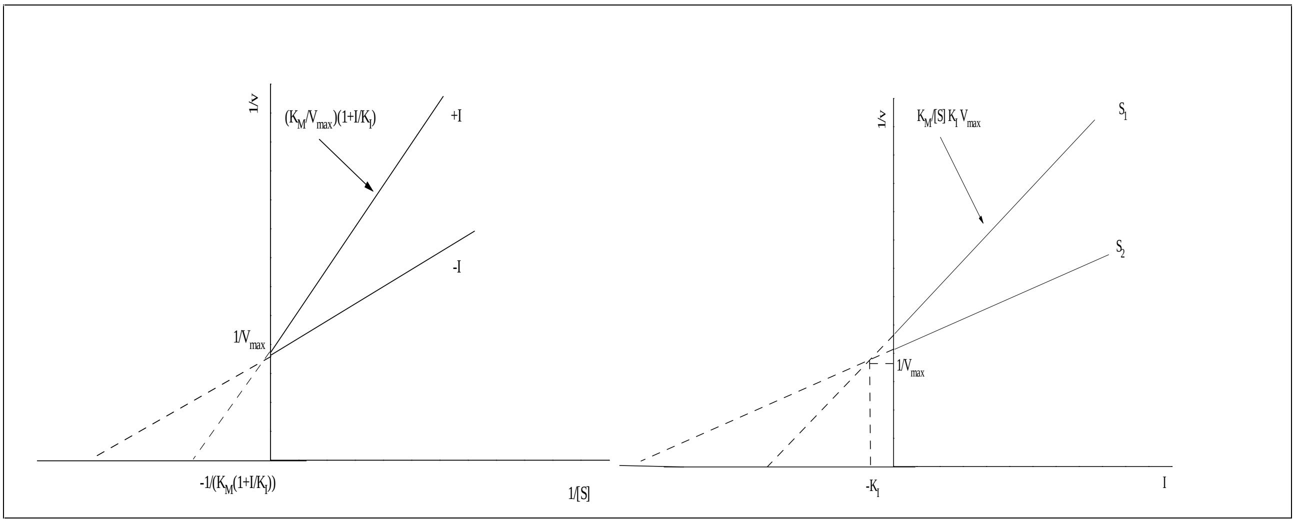
$$\mathrm{v} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_M (1 + \frac{[I]}{K_I})}$$

Компетитивни инхибитори не мењају вредност V_{max}, али повећавају вредност K_M ензима, што указује на смањење афинитета ензима према супстрату (Слика 21). Интензитет инхибиције се изражава константом инхибиције K_I. Уколико је позната концентрација инхибитора, могуће је одредити K_I на основу Лајнвивер-Баркове једначине:

$$\frac{1}{\mathrm{v}} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{[S] \cdot V_{\max}} \cdot (1 + \frac{[I]}{K_I})$$

или Диксонове једначине:

$$\frac{1}{\mathrm{v}} = \frac{1}{V_{\max}} (1 + \frac{K_M}{[S]}) + \frac{1}{[S]} \cdot \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{K_I}$$



а) б)

Слика 21. Компетитивна инхибиција. а) Лајнвивер-Барков график, б) Диксонов график.

Некомпетитивна инхибиција

Некомпетитивни инхибитори се реверзибилно повезују за неко место молекула ензима које се разликује од активног места (али је у одређеној кооперацији са њим), мењајући тако конформацију ензима, што чини комлекс ензим-супстрат инактивним. Максимална брзина реакције се смањује као последица привидно смањене концентраціје ензима. Са друге стране, вредност Км се не мења.

Кинетичком анализом се добија:

$$\mathrm{v} = \frac{V_{\max} /(1 + \frac{[I]}{K_I})}{1 + \frac{K_M}{[S]}}$$

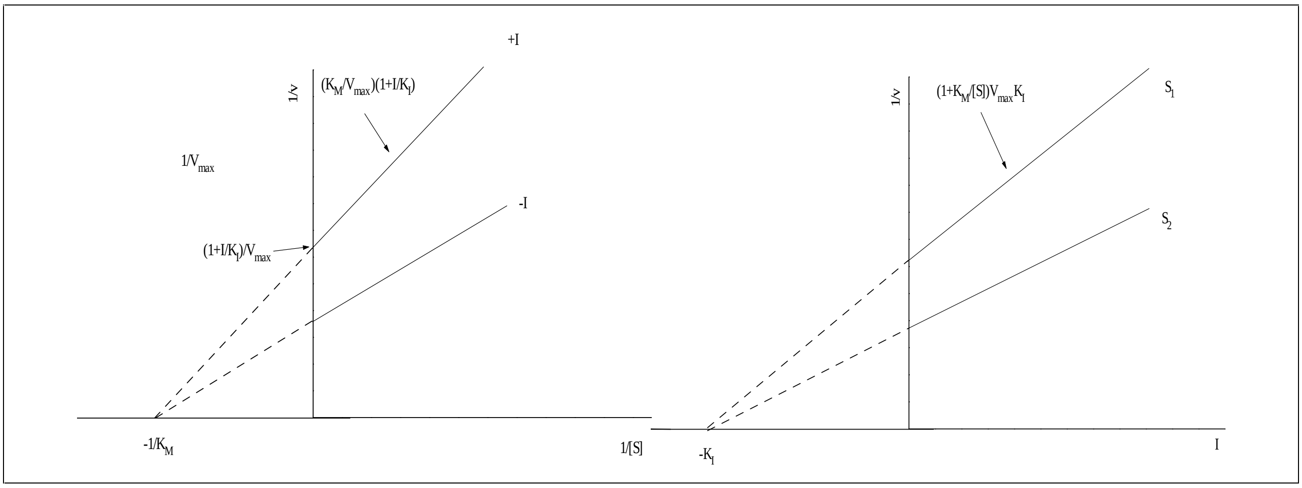
што је опет једначина хиперболе, па линеаризација по Лајнвиверу и Барку даје:

$$\frac{1}{\mathrm{v}} = \frac{1}{V_{\max}}(1 + \frac{K_M}{[S]})(1 + \frac{[I]}{K_I})$$

Односно по Диксону:

$$\frac{1}{\mathrm{v}} = \frac{1}{V_{\max}}(1 + \frac{K_M}{[S]}) + [I]\frac{1}{V_{\max} K_I}(1 + \frac{K_M}{[S]})$$

Одговарајући дијаграми по овим једначинама су дати на слици 22.



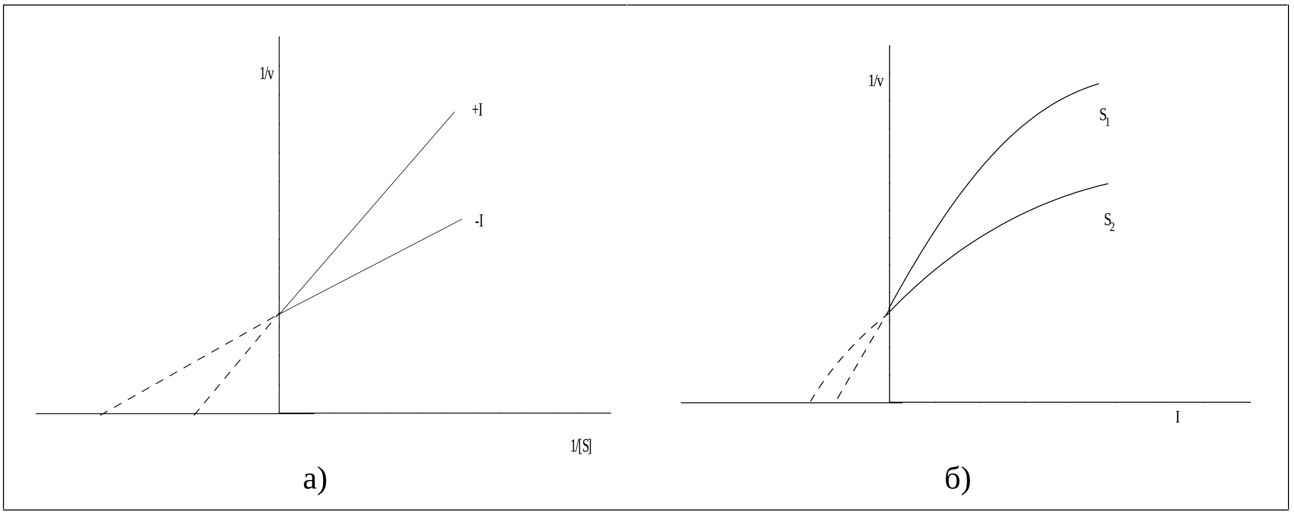
а) б)

Слика 22. Некомпетитивна инхибиција. а) Лајнвивер-Барков график, б) Диксонов график.

У дијаграму по Лајнвиверу и Барку, пресек правих може бити изнад, испод или на 1/[S] оси. Пресек се налази на 1/[S] само ако је $K_I = K_S$.

Парцијално компетитивна инхибиција

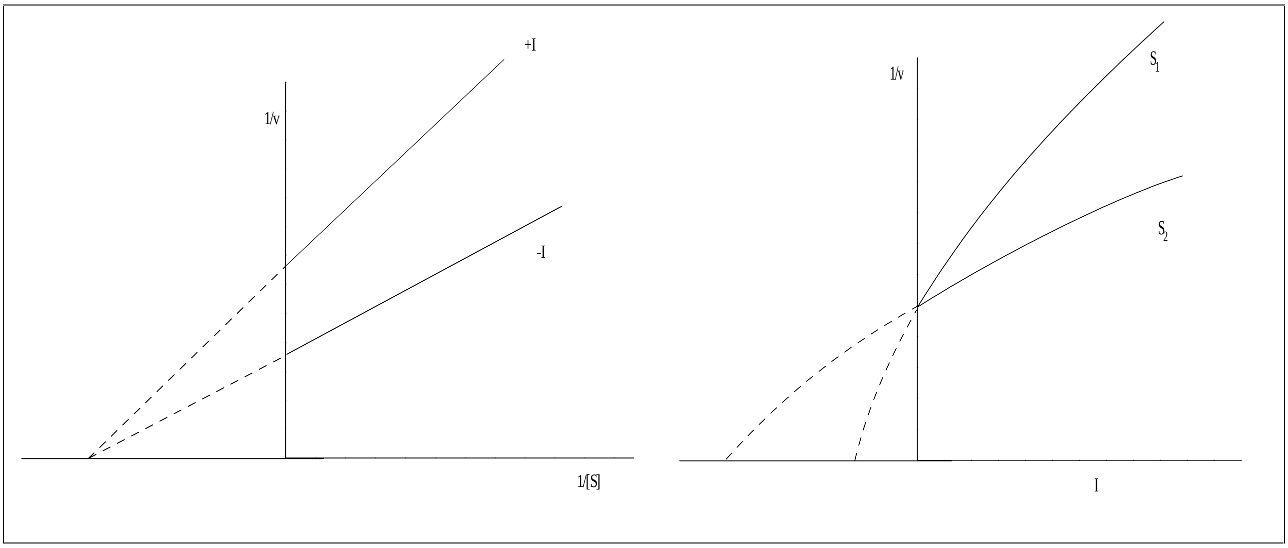
Док се код потпуне компетитивне инхибиције супстрат и инхибитор везују за исто место у региону активног места, повећавајући Михаелисову константу, дотле се код парцијално (делимично) компетитивне инхибиције, инхибитор везује најчешће за неко друго место на ензиму ометајући везивање супстрата за активни центар, као да је афинитет супстрата према ензиму смањен. У овом случају се тернарни комплекс ензим-инхибитор-супстрат разлаже дајући производ истом брзином као и бинарни комплекс ензим-супстрат. Лајнервивер-Баркови дијаграми се у оба случаја не разликују, али се разлика уочава на Диксоновим дијаграмима (Слика 23).



Слика 23. Парцијало компетитивна инхибиција ензима: а) Лајнвивер-Барков дијаграм, б) Диксонов дијаграм зависности.

Парцијално некомпетитивна инхибиција

Код чисте некомпетитивне инхибиције тернарни комплекс ензим-инхибитор-супстрат је потпуно инактиван, док је код парцијално некомпетитивне инхибиције овај комлекс ипак делимично активан. Ако брзина разлагања комплекса ензим-инхибитор-супстрат тежи нули, онда се ова инхибиција своди на чисту некомпетитивну инхибицију, а уколико је она знатно већа од брзине разлагања Михаелисовог комлекса ензим-супстрат, онда се инхибитор понаша као активатор. Дијаграми који описују овај тип инхибиције, приказани су на слици 24.

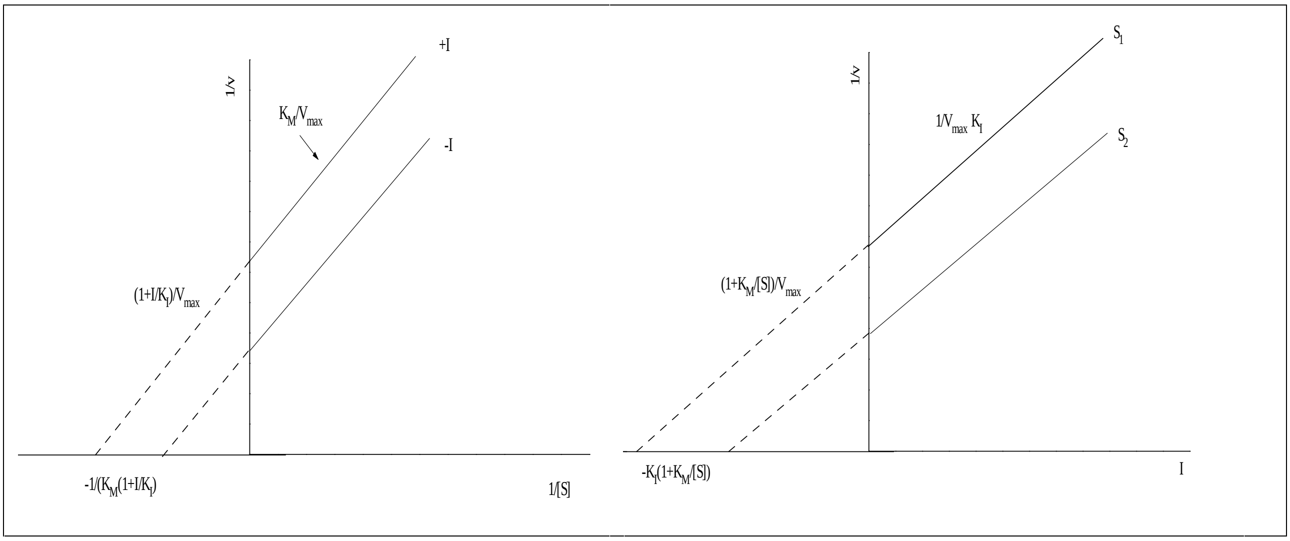


a) b)

Слика 24. Парцијално некомпетитивна инхибиција: а) Лајнвивер-Барков дијаграм, б) Диксонов дијаграм зависности.

Акомпетитивна инхибиција

Овај тип инхибиције је веома редак, инхибитор се не везује за слободни ензим, већ само за комплекс ензим-супстрат, онемогућавајући дисоцијацију тог комлекса на слободни ензим и производ реакције. Кинетички параметри K_M и V_{max} се сразмерно смањују, тако да се њихов однос не мења. Дијаграми који описују овај тип инхибиције, приказани су на слици 25.

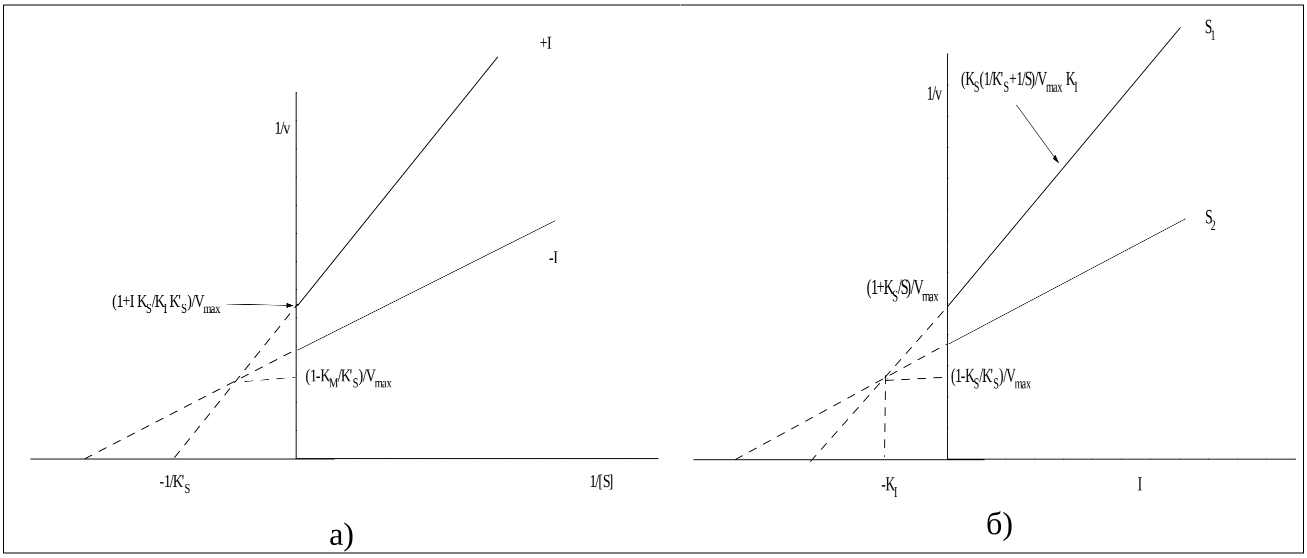


a) b)

Слика 25. Акомпетитивна инхибиција: а) Лајнвивер-Барков дијаграм, б) Диксонов дијаграм зависности.

Мешовита инхибиција

Код мешовите инхибиције, инхибитор се понаша и као компетитивни и као некомпетитивни инхибитор, тј. везује се и за активно место ензима и за неко друго место, мењајући конформацију протеинског молекула. Том приликом се мењају вредности и K_M и V_{max}. Дијаграми који описују овај тип инхибиције по Лајнвивер-Баркуи по Диксону, налазе се на слици 26.



Слика 26. Мешовита инхибиција. а) Лајнвивер-Барков дијаграм, б) Диксонов дијаграм зависности.

2.3.3. Инхибиција пероксидазе

Постоје два значајна аспекта проучавања инхибиције пероксидазе. Први се односи на њену физиолошку улогу у регулисању ендогеног водоник пероксида, а други на њену комерцијалну употребу. Тако би инхибиција пероксидазе у ћелији могла допринети повећању нивоа водоник-пероксида, а самим тим нарушавању хомеостазе ћелије и њено потенцијално увођење у оксидативни стрес.

Са друге стране инхибиција пероксидазе би утицала на прецизност бројних метода за одређивање и ефикасност у процесима биодеградације и ремедијације. Исто тако, постоје тестови и аналитичке методе где је активност пероксидазе непожељна, а најчешће коришћени инхибитори су NaN_3 и њен главни супстрат, водоник пероксид [170].

Пероксидаза је веома осетљива на присуство многих металних јона, посебно на соли живе које инхибирају њену активност. Са друге стране јони Fe^{3+} стимулишу ту активност

[208], док се јони земноалкалних метала и салицилати при нижим концентрацијама понашају као умерани активатори [209].

EDTA при нижим концентарцијама не утиче на активност пероксидазе, док други хелирајући агенси могу умањити релативну активност [173].

Утицај фенола и његових деривата који ступају у реакцију са пероксидазом може бити различит и зависи од односа њихових редокс-потенцијала према потенцијалу косупстрата-индикатора. Тако једињења са вишим вредностима потенцијала инхибирају каталитичку активност пероксидазе из кикирикија, док она са нижим редокс-потенцијалом преузимају улогу примарног косупстрата, што се даље манифестује појавом индукционог периода у односу на сигнал индикатора [180].

Индол-сирћетна киселина из групе биљних хормона ауксина, која такође припада косупстратима пероксидазе, може се оксидовати и у присуству и у одсуству водоник-пероксида. Укључивањем L-аскорбинске киселине у реакцију, она се може понашати и као компетитивни и као некомпетитивни инхибитор, у зависности од релативног односа концентрација ензима и витамина C. При концентрацијама L-аскорбинске киселине када је само један њен молекул везан за активно место ензима, индол-сирћетна киселина се понаша као компетитивни инхибитор конкуришући за исто место на ензиму. Када је активно место засићено са два молекула L-аскорбинске киселине, она се везује за неко друго подручје на ензиму нарушавајући интеракцију активног места и супстрата и тада се понаша као некомпетентни инхибитор [204].

3. Експериментални део

3.1. Апарати

У току рада коришћени су следећи апарати:

- Спектрофотометар Phillips PU 8620
- Спектрофотометар Beckman DU-65
- pH метар, Hana HI 207
- Аналитичка вага, Kern ABT
- Аутоматске пипете

3.2. Реагенси и раствори

Сви основни водени раствори су припремани употребом дејонизоване воде са проводљивошћу од 0,5 μS/cm^2 (осим уколико експеримент није другачије захтевао). Све употребљене хемикалије су биле p.a. чистоће.

Препарат пероксидазе рена, чистоће 200 kU/g, био је Меркове (Немачка) производње. Раствори ензима су припремани непосредно пре извођења огледа, у распону концентрација од 1 до 30 U/L, разблаживањем од основног раствора који је био припреман растварањем 50 mg (10000 U) у 1000 ml дејонизоване воде.

Раствори водоноик-пероксида (Мерк, Немачка) у распону концентрација од 0,04 до 2 mmol/L, су припремани разблаживањем основног раствора, добијеног растварањем 95 ml 33,3 % водоник пероксида у 1000 ml дејонизоване воде, чија је тачна концентрација проверавана стандардном перманганометријском методом [210].

Раствори бензидина (Реанал, Мађарска) и о-толидина (Центрохем, Београд) припремани су у распону од 0,1 до 5 mmol/L, од основног раствора концентрације 50 mmol/L, добијеног растварањем 0,9210 g бензидина у 5ml 1% CH_3COOH, односно 1,0615 g о-толидина у 5 ml 1% HCl, а затим допуњавани до 100 ml, дејонизованом водом [210].

Основни раствор (0,1 mol/L) L-аскорбинске киселине (Галеника, Београд) припреман је растварањем 17,613 g супстанце у 1000 ml дејонизоване воде, док су радни раствори били у распону концентрација од 0,4 μmol/L до 10 mmol/L, без и у присуству различитих стабилизирајућих компоненти различитих концентрација. Концентрације ових раствора су праћене стандардном методом помоћу 2,6-дихлорфенол-индолфенола [211].

Као стабилизирајуће супстанце су употребљене: метафосфорна, ортофосфорна, хлороводонична, сирћетна, оксална и етилен-диамино-тетрасирћетна (EDTA) киселина, о чијим растворима ће бити речи касније.

Основни раствори витамина А и Е су припремани, од препарата ретинол-ацетата (Алфа Асар, Немачка, 500 kU/g), односно токоферол-ацетата (Галеника, Београд, 54,52%), растварањем 1 g одговарајућег препарата у 1000 ml дејонизоване воде, а затим разблаживани до одговарајућих радних концентрација у распону од 1 до 500 U/ml, за ретинол, односно, од 1 до 500 mg/ml за токоферол.

Као медијуми одређеног pH употребљавани су следећи пуферски системи: ацетатни пуфер pH 4 (припреман у лабораторији, 180 ml 0,2 mol/L раствора натријум-ацетата и 820 ml 0,2 mol/L раствора сирћетне киселине), цитратни пуфери pH 5 и 6 (Фармиталија Карло Ерба), фосфатни пуфер pH 7 (Фишер Саентифик, ВБ) и боратни пуфер pH 8 (Фармиталија Карло Ерба). pH вредности пуфера су провераване pH метром, *Hana HI* 207.

3.3. Спектофотометријско одређивање активности пероксидазе

Релативна активност пероксидазе је праћена спектрофотометријски, мерењем промене апсорбанције током настајања оксидоване форме косупстрата, бензидина и о-толидина, у одговарајућем временском интервалу. У зависности од примењеног пуфера промене апсорбанције су праћене на: 410 nm (у ацетатном и цитратним пуферима), 362 nm (у фосфатном пуферу), односно 425 nm (у боратном пуферу) за бензидин и 630 nm (у ацетатном и цитратним пуферима), 411 nm (у фосфатном пуферу) и 436 nm (у боратном пуферу) за о-толидин.

Сви раствори су пре извођења мерења термостатирани на температури од 20 ^{o}C.

Мерења су извођена у стакленим киветама запремине 1ml. Реакциону смешу су чинили 0,5 ml одговарајућег пуфера, 0,1 ml косупстрата-индикатора бензидина или о-толидина, као и 0,2 ml H_2O и/или витаминске смеше (аскорбинска киселина, токоферол-ацетат и ретинол-ацетат). Кивета са реакцијском смешом је термостатирана на 25 ^{o}C током 1 минута, након чега је промена апсорбанције праћена од момента убризгавања 0,1 ml H_2O_2.

3.4. Избор стабилизирајућих агенаса

Како поједина мерења могу трајати и по 10 минута, па анализирање серије раствора изискује од више сати до неколико дана, од велике је важности одржати растворе у пројектованим концентрацијама, а то се посебно односи на веома нестабилне разблажене растворе L-аскорбинске киселине.

Праћење стабилности раствора без и уз употребу различитих концентација различитих стабилизирајућих агенаса је изведено излагањем серије раствора акорбинске киселине лабораторијској атмосфери у откривеним чашама (истог облика и запремине од 50 ml) и собној температури, током 12, 24, 48 и 96 сати, у три понављања. Концентрације аскорбинске киселине су праћене и стандарном волуметијском методом са 2,6-дихлорфенол-индолфенолом и спектрофотометријски у присуству пероксидазе рена.

Концентрације раствора аскорбинске киселине чија се стабилност мерила су биле 0,1; 1 и 10 mmol/L. Као медијуми за растварање аскорбинске киселине су примењивани следећи раствори стабилизирајућих супстанци:

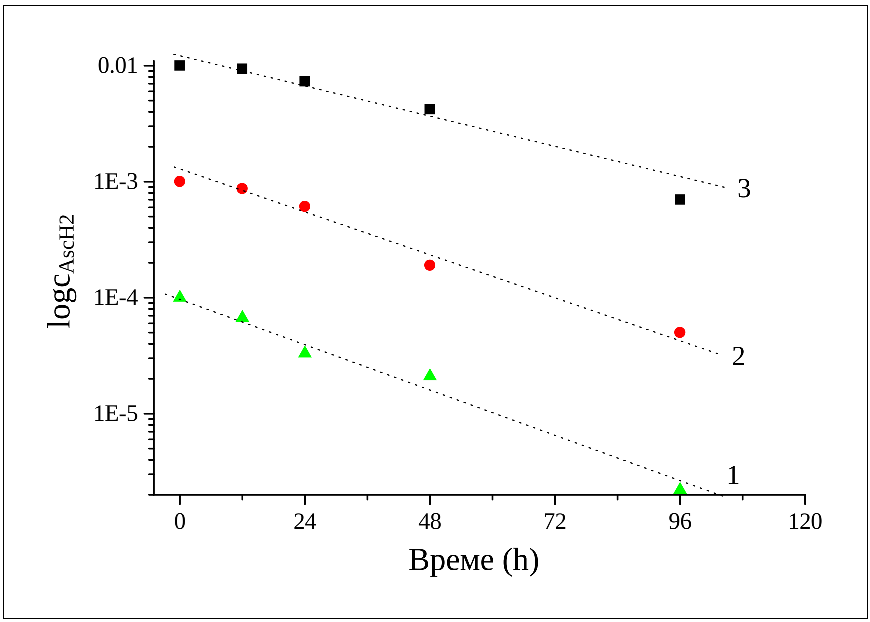
- дестилована вода проводљивости 15 $\mu S/cm^2$;
- ацетатни пуфер pH 4;
- цитратни пуфери pH 5 и 6;
- фосфатни пуфер pH 7;
- боратни пуфер pH 8;
- 0,5; 1 и 2 % раствори $(HPO_3)_3$;
- 0,5; 1 и 2 % раствори H_3PO_4;
- 0,5; 1 и 2 % раствори HCl;
- 50; 100 и 200 mmol/L раствори CH_3COOH;
- 50; 100 и 200 mmol/L раствори $H_2C_2O_4$;

- 0,5; 1 и 2 mmol/L раствори EDTA;
- смеше CH_3COOH и EDTA (50 : 0,5; 50 : 1; 100 : 0,5; 100 : 1) mmol/L.

4. Резултати истраживања са дискусијом

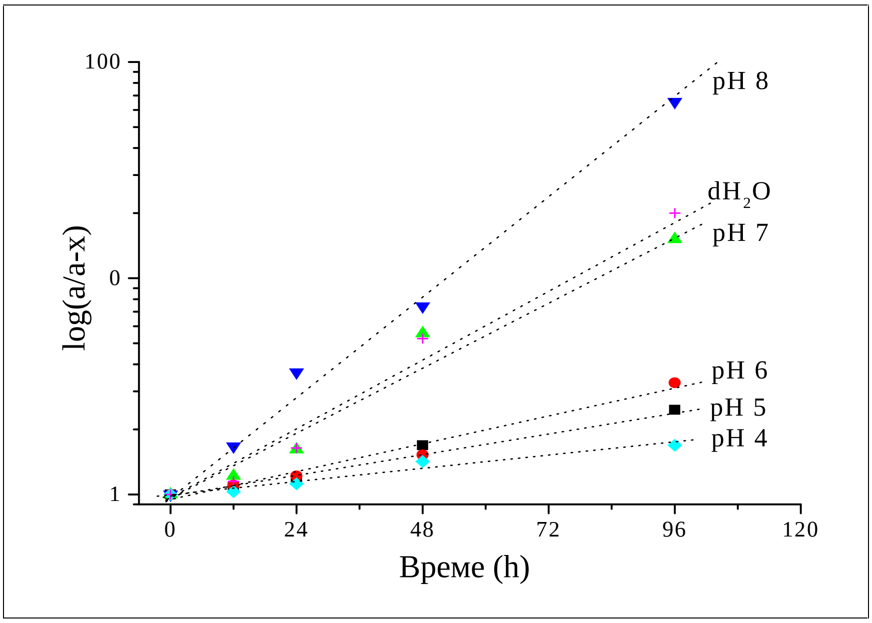
4.1. Стабилизација водених раствора L-аскорбинске киселине ($AscH_2$)

Раствори аскорбинске киселине су посебно нестабилни у присуству кисеоника из ваздуха, а њихова концентрација, уколико су остали услови константни, опада пропорцијално са временом и разблажењем (Слика 27). Претварање аскорбинске у дехидроаскорбинску киселину се одвија као реакција првог реда [206].



Слика 27. Трансформација аскорбинске киселине у дехидроаскорбинску киселину, у воденим растворима концентрација 0,1 (1); 1 (2) и 10 (3) mmol/L. Као растварач је употребљена дестилована вода 15 μS/cm^2. Константе брзина реакција износе 0,016; 0,025 и 0,038, а полувремена претварања 43,5; 28,4 и 18,3 h редом.

Стабилност водених раствора аскорбинске киселине зависи и од pH. Брзина претварања витамина C је олакшана на вишим pH вредностима (Слика 28 и Табела 7).



Слика 28. Зависност брзине трансформације аскорбинске киселине у дехидроаскорбинску киселину од pH, без употребе стабилизирајућих супстанци.

Табела 7. Константе брзине и полувремена претварања аскорбинске киселине концентрације 1 mmol/L, у зависности од pH средине.

pH средине	Константа брзине претварања *(k)*	Полувремена претварања $t_{1/2}$ *(h)*
pH 4	0,0049	142,1
pH 5	0,0085	81,9
pH 6	0,0094	74,1
dH_2O	0,0245	28,4
pH 7	0,0251	27,7
pH 8	0,0455	15,3

Примена различитих концентрација, различитих стабилизирајућих супстанци успорава деградацију аскорбинске киселине у различитом степену (Табела 8).

Као најефикаснији стабилизирајући агенс показала се метафосфорна киселина у чијем присуству је садржај витамина C током 24 сата остао готово непромењен, упркос чињеници да су водени раствори били изложени ваздуху у отвореним судовима и светлу.

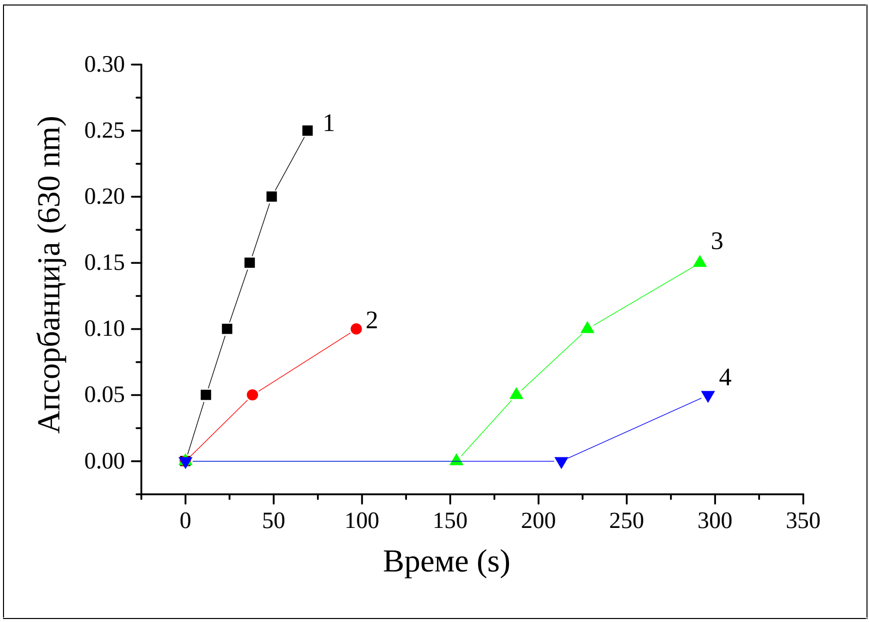
Табела 8. Садржај аскорбинске киселине у присуству различитих стабилизирајућих супстанци током 96 сати (изражено у % од почетне концентрације $AscH_2$, 1 mmol/L).

	12h	24h	48h	96h
Слепа проба	87,1	61,6	19,2	0.5
$(HPO_3)_3$ 0,5%	100	99,0	95,8	90,4
$(HPO_3)_3$ 1%	100	99,8	97,2	94,1
$(HPO_3)_3$ 2%	100	100	99,5	98,3
H_3PO_4 0,5%	97,4	93,0	89,5	83,6
H_3PO_4 1%	99,1	95,2	92,0	85,7
H_3PO_4 2%	100	96,4	93,1	89,9
HCl 0,5%	95,2	89,1	81,2	70,8
HCl 1%	97,8	91,4	80,5	72,2
HCl 2%	99,6	96,1	92,7	88,0
CH_3COOH 50 mmol/L	93,4	85,6	79,7	73,1
CH_3COOH 100 mmol/L	96,9	94,5	85,5	78,9
CH_3COOH 200 mmol/L	98,2	94,0	89,2	82,9
$H_2C_2O_4$ 50 mmol/L	93,0	89,8	83,9	72,3
$H_2C_2O_4$ 100 mmol/L	97,0	94,1	89,2	80,2
$H_2C_2O_4$ 200 mmol/L	97,8	94,9	90,4	83,8
EDTA 0,5 mmol/L	91,1	82,6	78,8	70,3
EDTA 1 mmol/L	93,5	85,6	79.7	75,3
EDTA 2 mmol/L	94,3	91,2	84,7	79,1
CH_3COOH 50 mmol/L EDTA 0,5 mmol/L	97,3	96,2	94,6	88,8
CH_3COOH 50 mmol/L EDTA 1 mmol/L	98,9	96,8	95,7	90,4
CH_3COOH 100 mmol/L EDTA 0,5 mmol/L	99,6	99,0	98,1	96,4
CH_3COOH 100 mmol/L EDTA 1 mmol/L	99,9	99,3	98,5	96,8

Са друге стране, резултати добијени употребом кинетичке методе уз пероксидазу, знатно су се разликовали од очекиваних, нереално указујући на виши садржај аскорбинске киселине у узорку (Слика 29), па и на спорију деградацију, што се односило и на употребу осталих неорганских стабилизатора (Табела 9).

Табела 9. Утицај стабилизирајућих супстанци на константе брзине претварања и полувремена претварања аскорбинске у дехидроаскорбинску киселину праћено стандарном и кинетичком метотом.

Стабилизирајући агенси		DCPIP метода		Кинетичка метода	
		k	$t_{1/2}$ *(h)*	*k*	$t_{1/2}$ *(h)*
Слепа проба		0,0245	28,4	0,0232	30,0
$(HPO_3)_3$	2%	$7{,}5\cdot10^{-5}$	9284	$5{,}4\cdot10^{-5}$	12998
H_3PO_4	2%	0,0011	663,1	0,0009	774,6
HCl	2%	0,0012	568,4	0,0011	650,4
CH_3COOH	100 mmol/L	0,0027	257,9	0,0026	273,1
$H_2C_2O_4$	100 mmol/L	0,0024	287,1	0,0027	256,4
EDTA	1 mmol/L	0,0049	140,7	0,0047	149,7
CH_3COOH EDTA	100 mmol/L 1 mmol/L	0,0010	678,4	$9{,}9\cdot10^{-4}$	703,3



Слика 29. Утицај метафосфорне киселине на брзину оксидације о-толидина и индукционо време приликом одређивања витамина С. Крива 1 приказује слепу пробу, без додатих супстанци. Крива 2 означава брзину оксидације у присуству $(HPO_3)_3$. Крива 3 представља брзину оксидације косупстрата у присуству $AscH_2$, након индукционог периода. Крива 4 приказује брзину оксидације у присуству аскорбинске и метафосфорне киселине. Услови: пероксидаза 10 U/L; о-толидин 0,5 mmol/L; H_2O_2 5 mmol/L; $AscH_2$ 1 mmol/L; $(HPO_3)_3$ 2 %; pH 5.

Разлог ове појаве треба тражити у опструкцији ензима услед делимичне денатурације протеинског молекула дејством ових јаких киселина, што се манифестује смањеном брзином претварања.

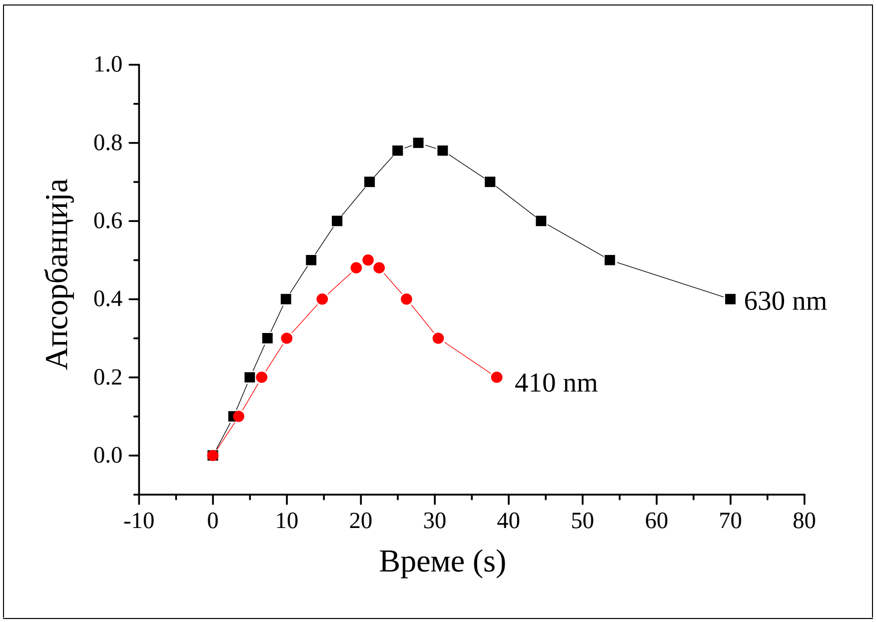
За разлику од стандардних неорганских стабилизатора употреба органских киселина као стабилизирајућих агенаса се показала мање ефикасном, али је смањила деградацију витамина C током 96 сати у односу на слепу пробу за више од 10 пута. Задовољавајући стабилизирајући ефекат показале су смеше CH_3COOH и EDTA, током довољно дугог временског периода потребног за извођење мерења и испољиле синергистичко дејство у односу на појединачне компоненте, док у примењеним концентацијама нису утицале на активност пероксидазе, па се самим тим нису негативно одразиле на конзистентност резултата.

У току даљег истраживања сви употребљени раствори аскорбинске киселине су садржавли исте количине стабилизирајућих компоненти CH_3COOH и EDTA, 100 mmol/L и 1 mmol/L, редом, што је узимано у обзир и приликом разблаживања основних раствора.

4.2. Разлагање водоник-пероксида пероксидазом рена

Као што је већ описано, ензим пероксидаза трансформише водоник-пероксид, који представља потенцијални мутагени агенс, у воду и кисеонични радикал. Та реакција је олакшана присуством косупстрата пероксидазе, као донора водоника, те ће ензим, настали кисеонични радикал, претворити такође у нови молекул воде, а сам косупстрат оксидовати у радикал, ниске реактивности. Сама природа косупстрата (ароматичност уз присуство хидроксилних и амино група) стабилизује неспарени електрон резонантним структурама, па је читав овај механизам усмерен ка неутрализацији радикала и спречавању оштећења виталних ћелијских функција.

Додатак водоник-пероксида у аналитичку смешу коју чине ензим пероксидаза и неки од косупстрата, доводи до брзе оксидације косустрата, што се може детектовати спектрофотометријски због тренутног развијања апсорпционог максимума на одговарајућој таласној дужини (Слика 30).

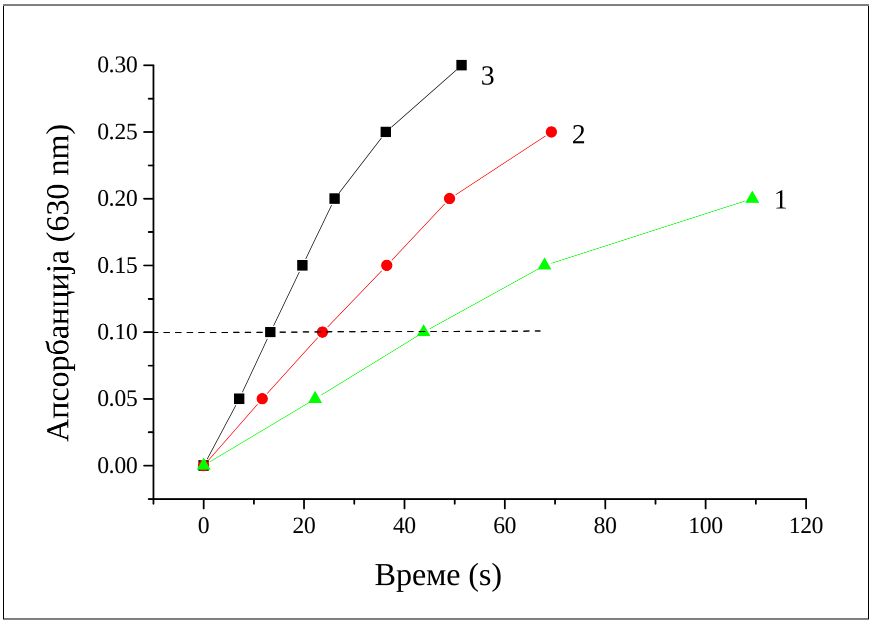


Слика 30. Формирање оксидационих продуката о-толидина (630 nm) и бензидина (410 nm), током разлагања водоник пероксида пероксидазом рена, при следећим условима реакције: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 1 mmol/L; еквимоларне количине о-толидина и бензидина 0,5 mmol/L; цитратни пуфер pH 6.

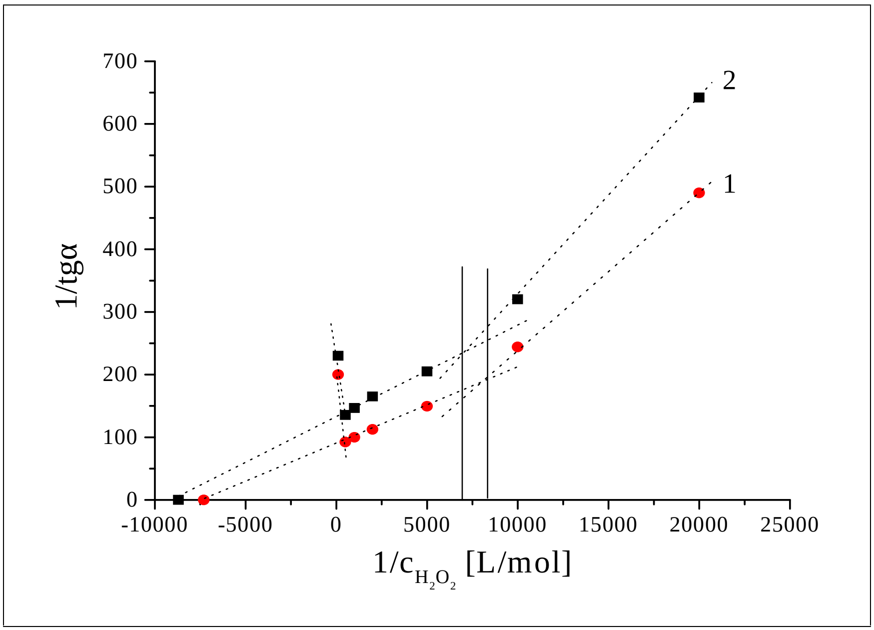
Брзина формирања оксидоване форме косупстрата може послужити као мера релативне активности пероксидазе. Почетну брзину (v_0) ове реакције можемо изразити као промену апсорбанције продукта, тј. оксидованог косупстрата са променом времена Δ[A]/Δ[*t*]. Графички се може представити тангенсом угла нагиба - (tgα) почетног, линеарног, дела криве. Ова брзина зависи од концентрација свих компоненти тернарног комплекса ензим-супстрат-косупстрат. Слика 31, показује зависност почетне брзине реакције од концентрације ензима. У условима огледа она је директно-пропорционална.

Брзина оксидације косупстрата је директно пропорционална концентацији супстрата, водоник-пероксида, али само при конценрацијама испод врдности за K_M (Слика 32).

Применом концентрација изнад тих вредности добија се права зависности чији пресек са *x* осом одређује Михаелисову константу. Даље повећање концентрације водоник-пероксида доводи до критичне тачке пресићења супстратом, инхибиције ензима и смањења брзине реакције, у литератури познато као - самоубиствена инактивација [212].

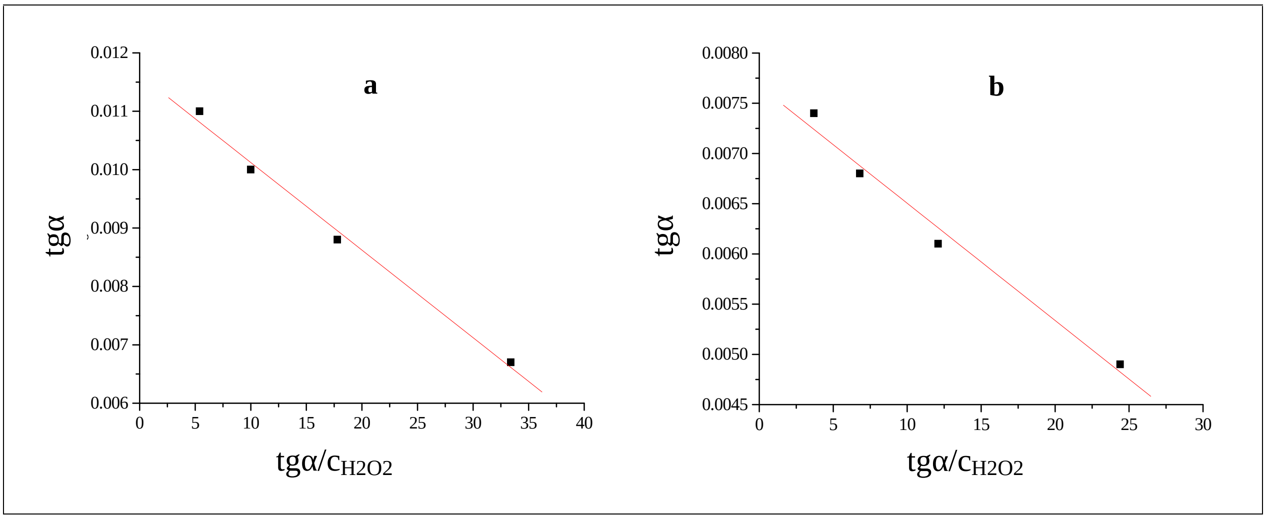


Слика 31. Утицај концентрације пероксидазе на брзину оксидације о-толидина. Услови реакције су: 1 mmol/L H_2O_2; *о*-толидин 0,5 mmol/L; пероксидаза 5 (1); 10 (2) и 20 (3) U/L. Релативне почетне брзине износе: 0,0080; 0,0042 и 0,0023 респективно.



Слика 32. Зависност брзине оксидације о-толидина (1) и бензидина (2) пероксидазом рена од концентрације водоник-пероксида. Услови реакције су: пероксиаза 10 U/L; о-толидин и бензидин у еквимоларним концентрацијама 1 mmol/L. Параметри уз о-толидин и бензидин су наведени редом: K_M = 0,137 mmol/L, Vmax = 5,5 mmol/Ls и K_M = 0,114 mmol/L, Vmax = 3,7 mmol/Ls.

Приказивање резултата из средишњег дела кривих дијаграмом на начин према Едију и Хофстију је илустровано сликом 33.



Слика 33. Еди-Хофстијев дијаграм зависности за: (а) о-толидин, Vmax = 12 mmol/Ls; K_M = 0,15 mmol/L и (б) бензидин Vmax = 7,7 mmol/Ls; K_M = 0,117 mmol/L.

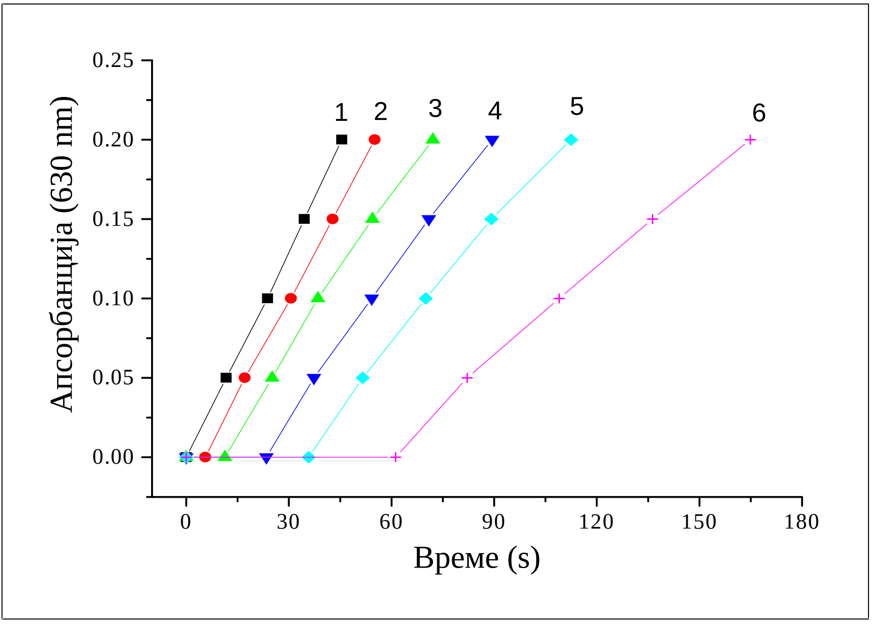
Примећује се да је брзина оксидације косупстрата као и Михаелисова константа, већа код о-толидина.

4.3. Кинетика оксидације L-аскорбинске киселине пероксидазом рена

Увођењем аскорбинске киселине у реакциону смешу, одвија се паралелна неензимска реакција, која оксидоване косупстрате истовремено редукује у почетно стање, што се манифестује одлагањем (индукционим периодом) појаве аналитичког сигнала, све док витамин C не пређе квантитативно у дехидроаскорбинску киселину. Овај индукциони период се показао као користан и прецизан кинетички параметар у праћењу реакционог механизма који одражава вредности реципрочне почетној брзини реакције, $1/v_0$ тј. 1/tgα.

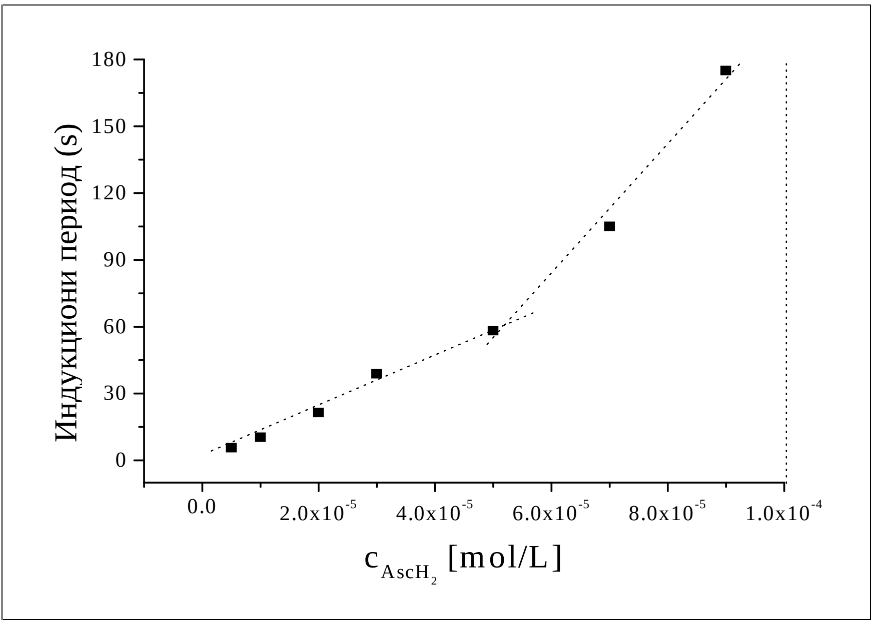
4.3.1. Утицај концентрације аскорбинске киселине на индукциони период

Дужина индукционог периода уколико су сви остали чиниоци (услови) реакције константни директно зависи од присутне количине витамина C (Слика 34).



Слика 34. Ефекат аскорбинске киселине на кинетику пероксидазне реакције, праћен при следећим условима: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,1 mmol/L; о-толидин 1 mmol/L; цитратни пуфер pH 6; крива 1 означава слепу пробу, криве 2-6 $AscH_2$ концентрације 5; 10; 20; 30 и 50 μmol/L, редом. Коефицијенти правца кривих, занемарујући индукциони период, износе 0,0041 (1); 0,0040 (2); 0,037 (3); 0,0032 (4); 0,0029 (5) и 0,0021 (6) (в. сл. 48).

Крива зависности индукционог периода од концентације аскорбинске киселине је приказана на слици 35.



Слика 35. Зависност индукционог периода од концентрације аскорбинске киселине, праћено при следећим условима: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,1 mmol/L; о-толидин 0,5 mmol/L; цитратни пуфер pH 6.

Са аналитичке тачке гледишта употребљив је само линеарни део криве ради конструисања калибрационе праве. Опсег линеарне зависности је са стране виших концентрација аскорбинске киселине лимитиран концентрацијом водоник-пероксида. Како је редукција пероксида, као и оксидација аскорбинске киселине двоелектронска реакција, у случају њиховог стехиометријског еквивалента у раствору не би било расположивих молекула H_2O_2 који би оксидовали косупстрат – индикатор, па би изостао пораст апсорбанције на одговарајућој таласној дужини.

Детерминација нижих концентрација витамина C је ограничена концентрацијом самог ензима, јер сувише ниске концентрације пероксидазе бивају инхибиране водоник-пероксидом, док је оксидација при вишим концентрацијама ензима превише брза, а кратак индукциони период не омогућава довољну прецизност током мерења.

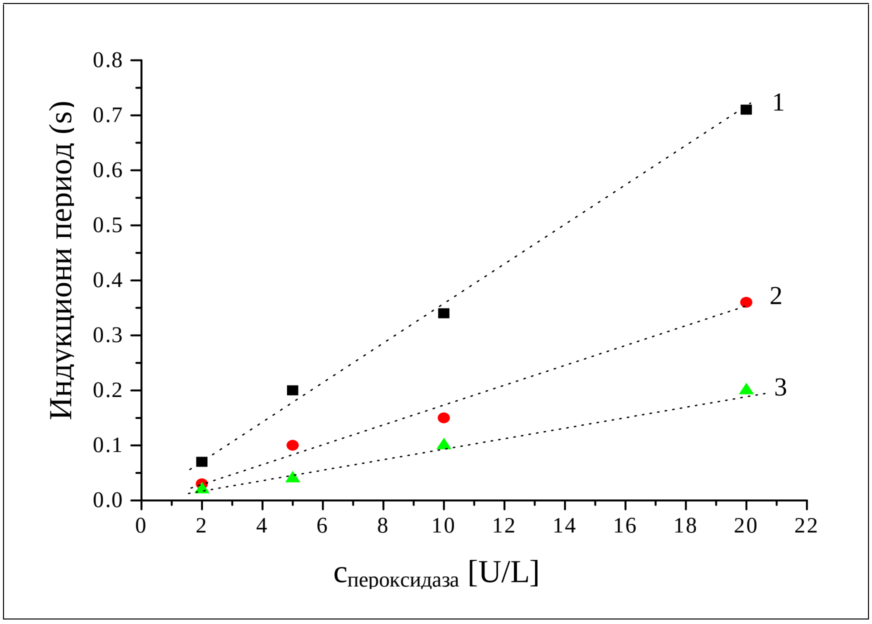
Индукциони период при одређеној концентрацији аскорбинске киселине, уствари представља време за који одговарајућа концентрација ензима разложи извесну количину водоник-пероксида еквивалентну количини аскорбинске киселине. Како брзина оксидације косупстрата директно зависи од концентрације пероксида, она ће у тренутку мерења бити пропорцијално умањена за примењену количину аскорбинске киселине.

4.3.2. Утицај концентрације пероксидазе на индукциони период

За разлику од аскорбинске киселине, утицај концентрације ензима пероксидазе на дужину индукционог периода је обрнуто пропорционалан. Крива зависности у овом случају представља хиперболу, па је зато зависност индукционог периода од реципрочне вредности концентрације ензима линеарна (Слика 36).

Коефицијенти правца добијених кривих стоје у међусобном односу 0,035 : 0,018 : 0,010, што указује да је зависност индукционог периода од реципрочне вредности концентрације ензима, такође дефинисана једначином праве $Y=A+BX$.

Примена одређених концентрација пероксидазе је лимитирана односом концентрација ензим/супстрат. При нижим концентрацијама ензима осећа се инхибиторни ефекат пероксида услед чега опада активност пероксидазе што се манифестује знатним повећањем индукционог периода. Са друге стране више концентрације пероксидазе убрзавају реакцију до немерљивих брзина.



Слика 36. Утицај концентрације ензима на реципрочну вредност индукционог периода, при различитим концентрацијама аскорбинске киселине. Услови реакције: H_2O_2 2 mmol/L; о-толидин 0,5 mmol/L; цитратни пуфер pH 6, $AscH_2$ 5 μmol/L (1); 20 μmol/L (2) и 50 μmol/L(3).

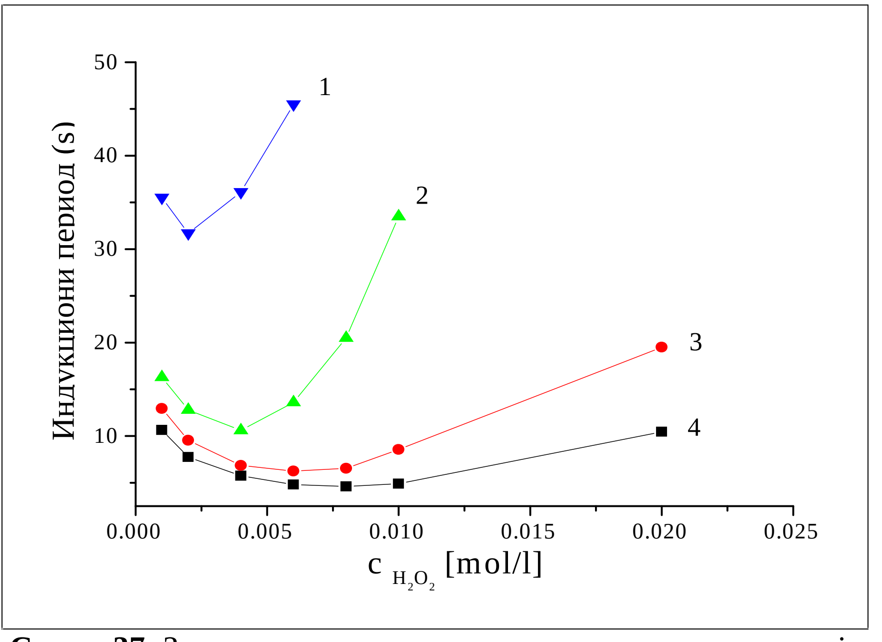
4.3.3. Утицај концентрације водоник-пероксида

Крива зависности почетне брзине оксидације косупстрата од концентрације водоник-пероксида обухвата три сегмента (поглавље 4.2. слика 32.).

Први сегмент се односи на највише концентрације пероксида када је концентрација супстрата знатно већа од концентрације ензима и када долази до инхибиције супстратом.

Ранији радови су утврдили да у одређеним условима, када концентрација водоник-пероксида расте у односу на концентрацију пероксидазе, може доћи до формирања нестабилног комплекса између два молекула H_2O_2 и гвожђа у хему, што може делимично или потпуно да инхибира ензим [184].

Такав ефекат је утврђен у приближном односу концентрација 5 U/l : 2,5 mmol/L, ензима пероксидазе и водоник-пероксида, респективно (Слика 37).



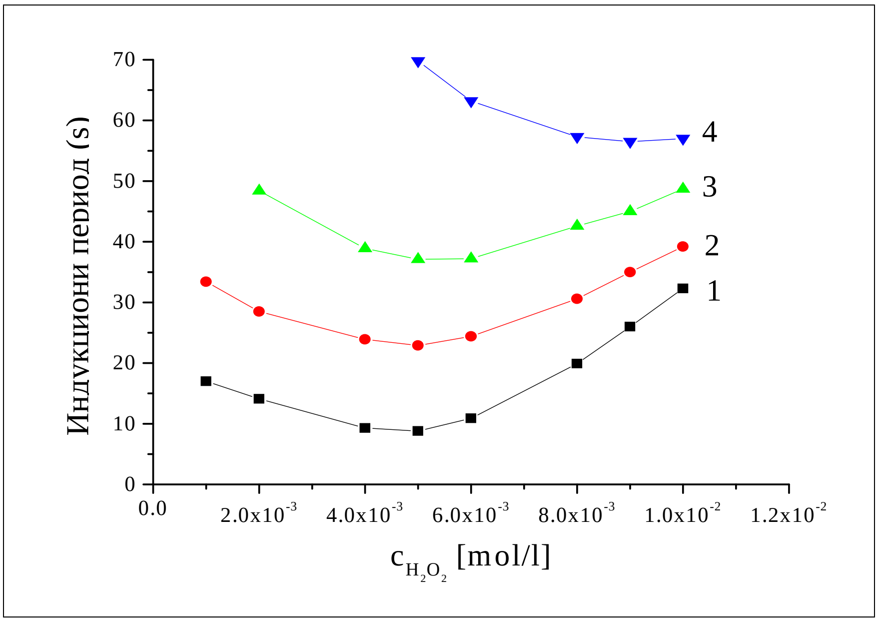
Слика 37. Зависност индукционог периода од концентрације водоник-пероксида, при различитим концентрацијама ензима. Услови реакције: пероксидаза 5 (1), 10 (2), 20 (3), 30 (4) U/L; о-толидин 0,5 mmol/L; аскорбинска киселина 0,1 mmol/L; цитратни пуфер pH 6.

Промена концентрације аскорбинске киселине при константној концентрацији ензима, није утицала на количник ензим/супстрат у условима појаве инхибиторног ефекта само док посредна неутрализација водоник-пероксида аскорбинском киселином није довела концентрацију пероксида испод критичне тачке за настајање неактивног комплекса (Слика 38), и померила критичну тачку ка вишим вредностима концентрације пероксида.

Други сегмент, се налази у домену стехиометријских односа ензим/супстрат, где су концентрације пероксида изнад вредности за Михаелисову констатнту. Овај део криве се обично користи за одређивање кинетичких параметара. Лајнвивер-Барков дијаграм зависности при оваквом стању система приказан је на слици 39.

Како присуство аскорбинске киселине заправо умањује садржај супстрата за исту количину у тренутку појаве аналитичког сигнала (индукционог времена) то је немогуће одредити Михаелисову костанту користећи индукционо време као меру активности ензима, уколико се вредности за умањену количину пероксида не узму у обзир.

Трећи сегмент криве зависности почетне брзине оксидације косупстрата од концентрације водоник-пероксида, где су концентрације супстрата испод стехиометријског односа према ензиму и када је повећање индукционог времена директно пропорционално количини примењеног супстрата, може се користити за конструисање калибрационих правих за одређивање аскорбинске киселине.

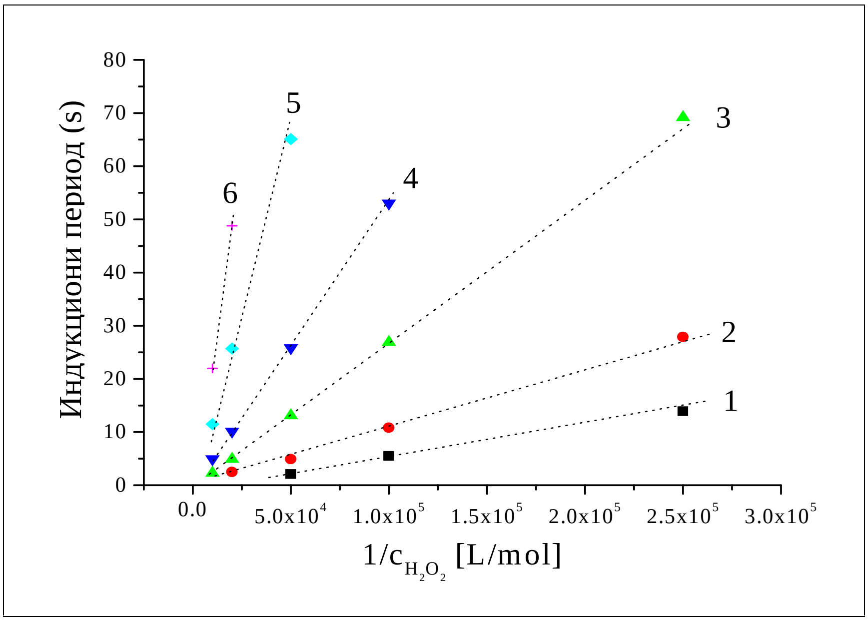


Слика 38. Зависност индукционог периода од коцентрације водоник-пероксида, при различитим концентрацијама аскорбинске киселине. Услови реакције: пероксидаза 10 U/L; о-толидин 0,5 mmol/L; аскорбинска киселина 0,1 (1); 0,4 (2); 1 (3) и 4 (4) mmol/L; цитратни пуфер pH 6.

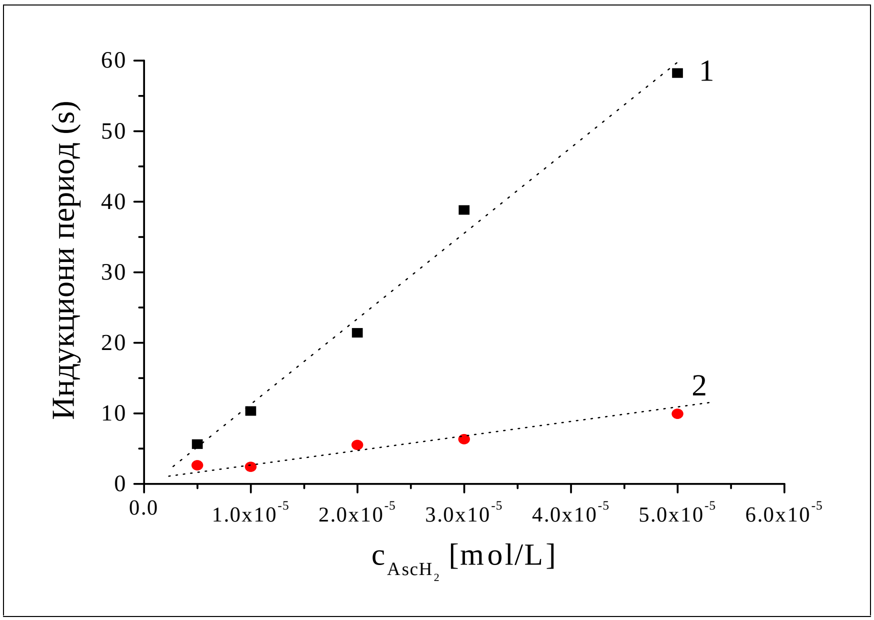
Због прецизности мерења, концентрација аскорбинске киселине је подешавана тако да њена горња граница за одређивање износи половину концентрације употребљеног водоник-пероксида (Слика 39).

Смањење концентрације аскорбинске киселине утиче на смањење индукционог времена, а вредности овог параметра испод 10 секунди, доводиле би до значајнијих грешака приликом мерења (Слика 40).

Као критеријум за избор доње границе одређивања аскорбинске киселине у односу на примењену концентрацуију пероксида узето да вредност индукционог периода не буде испод 10 секунди.



Слика 39. Зависност индукционог периода од инверзних вредности коцентрације водоник-пероксида. Услови реакције: пероксидаза 10 U/L; о-толидин 0,5 mmol/L; аскорбинска киселина 0,4 (1); 0,8 (2); 2 (3); 4 (4); 10 (5) и 20 (6) μmol/L; цитратни пуфер pH 6.

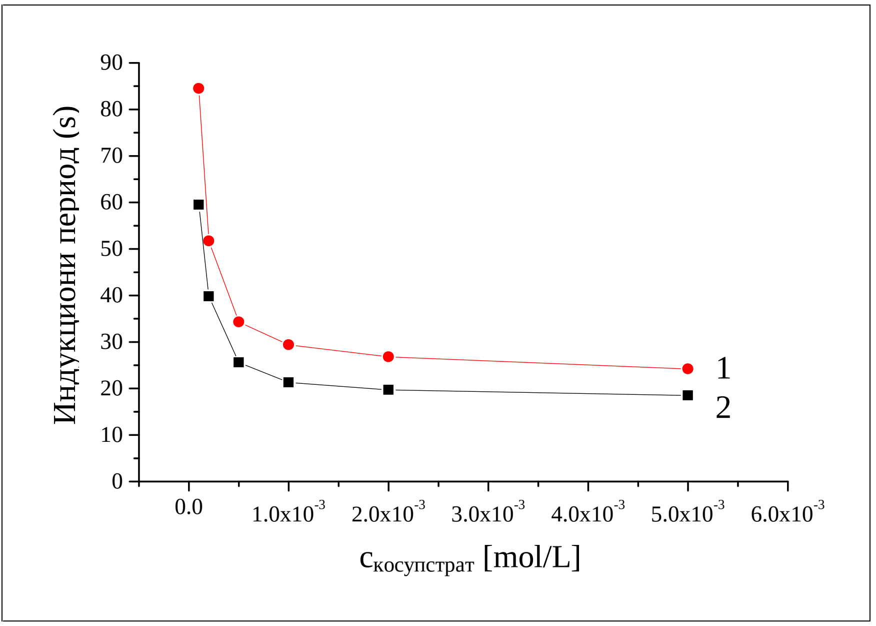


Слика 40. Калибрационе праве за одређивање аскорбинске киселине при различитим концентрацијама водоник-пероксида. Услови реакције: пероксидаза 10 U/L; о-толидин 0,5 mmol/L; водоник-пероксид 0,1 (1) и 2 (2) mmol/L.

4.3.4. Утицај косупстрата

Косупстрати пероксидазе се повезују са ензимом градећи тернарни комплекс ензим-супстрат-косупстрат. Различити косупстрати се карактеришу различитим афинитетима према ензиму и различитим редокс потенцијалом, па донирање водоника тече различитим брзинама. Бензидин и његов дериват о-толидин, су косупстрати пероксидазе чији оксидовани облици апсорбују у видљивом делу спекта, док положај апсорпционог максимума зависи од pH средине.

Употреба еквимоларних количина ових косупстратних молекула, показује да оксидација бензидина тече спорије од оксидације о-толидина при истим условима (Слика 41). Овај тренд се приликом конструисања калибрационих правих манифестује различитим нагибима правих (Слике 44-47).

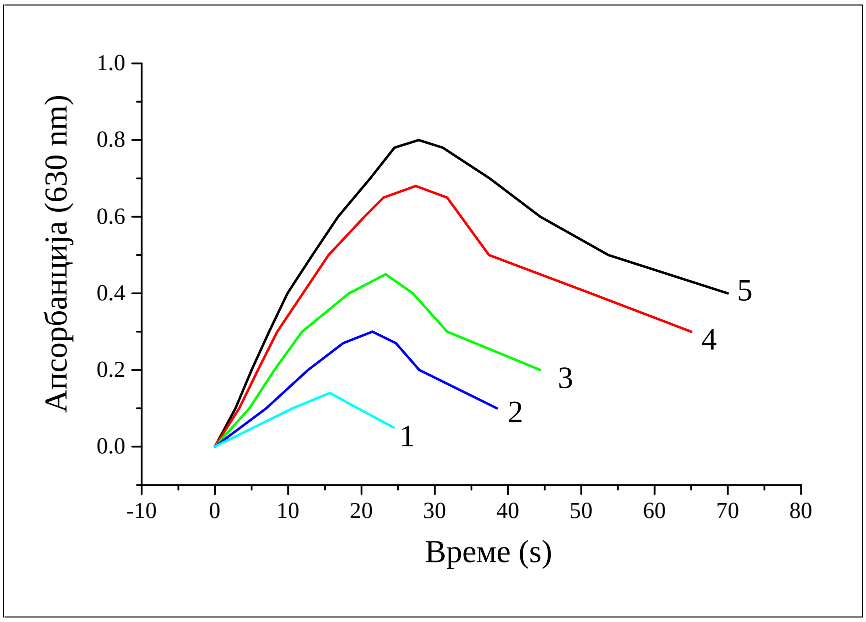


Слика 41. Утицај концентрације косупстрата бензидина (1) и о-толидина (2) на идукциони период. Услови реакције су: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 1 mmol/L; аскорбинска киселина 0,1 mmol/L; цитратни пуфер pH 6.

Повећање концентрације изнад вредности од 1 mmol/L, при примењеним концентрацијама супстрата и ензима, не смањује значајно индукционо време.

Калибрациона права конструисана уз бензидин као косупстрат пероксидазе има већи коефицијенат правца у односу на калибрациону праву добијену уз о-толидин, што је указује на већу осетљивост бензидина као индикатора. Међутим, водени раствори бензидина после неколико сати прелазе у колоидно стање, што се негативно одражава на транспарентност раствора током мерења и репродуктивност мерења се доводи у питање.

Смањењем концентрације косупстрата смањује се површина испод апсорпционог максимума (Слика 42), што при употреби нижих вредности нужно доводи до већих експерименталних грешака.

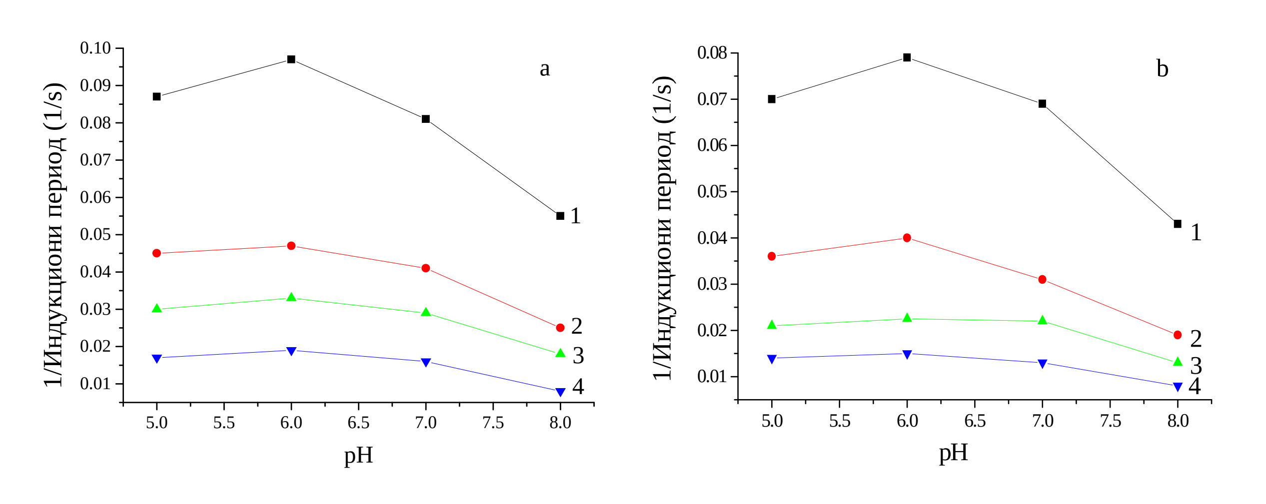


Слика 42. Интензитет апсорбанције оксидованог облика о-толидина при различитим концентрацијама. Услови реакције су: о-толидин 0,05 (1); 0,1 (2); 0,2 (3); 0,5 (4) и 1 (5) mmol/L; периксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,1 mmol/L; цитратни пуфер pH 6.

4.3.5. Утицај pH средине

pH оптимум сваког ензима у природи одредила је молекуларна еволуција. Када је реч о пероксидази рена, њу синтетишу секреторне ћелије, након чега она прелази и бива активна у екстрацелуларном простору, где је pH средине благо кисела [213].

Ранији радови [114, 206] указују да pH оптимум пероксидазе лежи између 4,5 и 6.5, и да ензимска активност опада са повећањем базности средине (Слика 43).

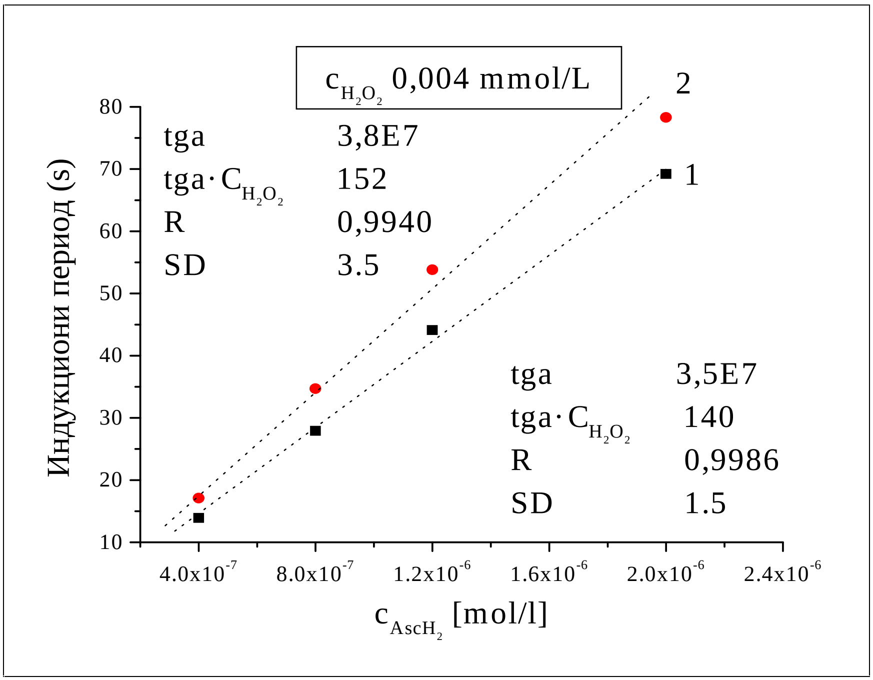


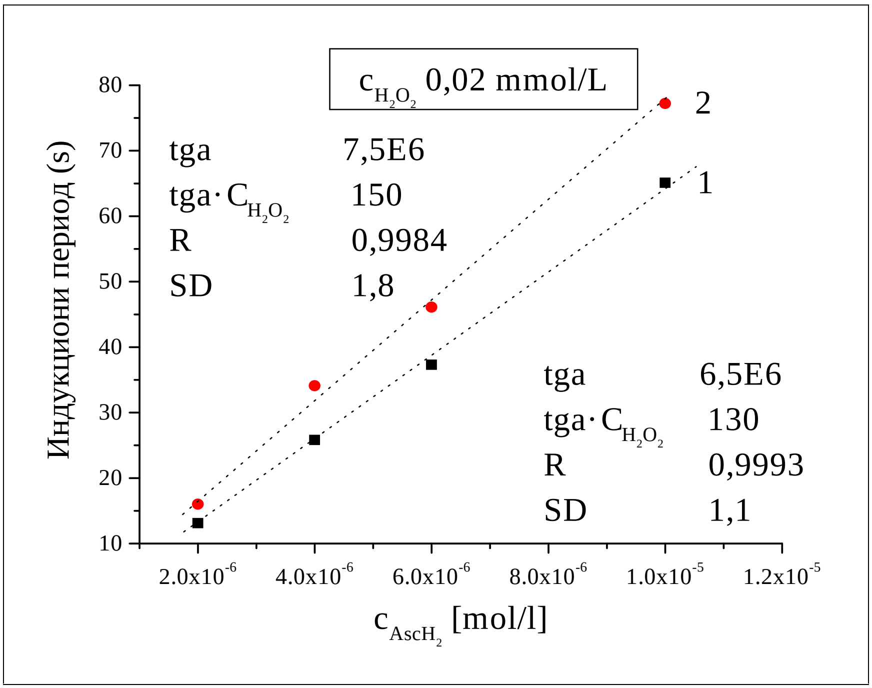
Слика 43. Утицај pH средине на активност пероксидазе у функцији концентрација водоник-пероксида и аскорбинске киселине у присуству о-толидина (а) и бензидина (б), као косупстрата. Услови реакције: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,1 mmol/L; о-толидин 0,5 mmol/L; аскорбинска киселина 10 (1); 20 (2); 30 (3) и 50 (4) μmol/L.

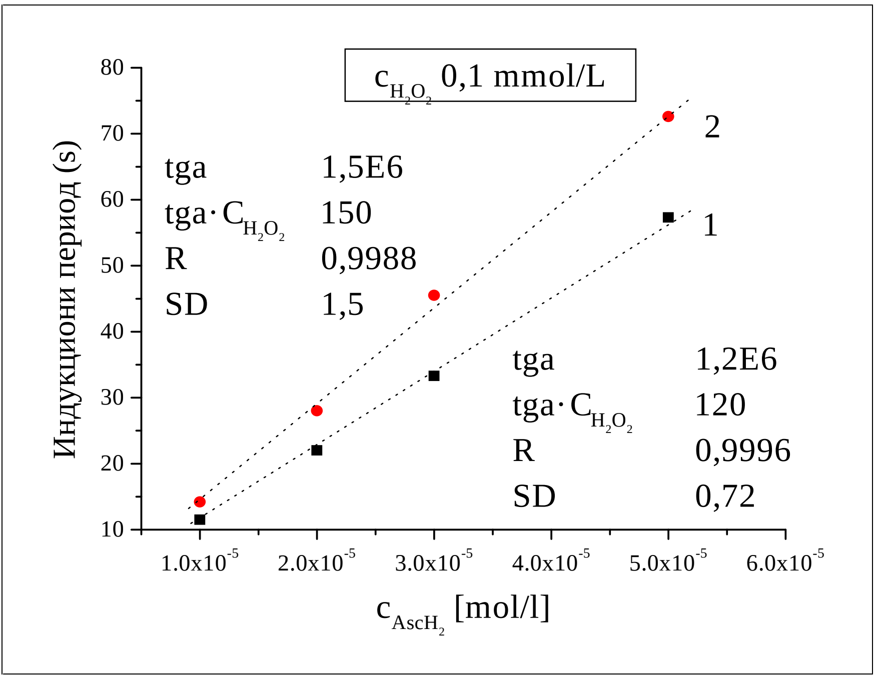
Може се уочити да је активост пероксидазе рена највећа у цитратном пуферу pH 6, а најнижа у боратном пуферу pH 8.

4.3.6. Калибрационе праве за одређивање аскорбинске киселине

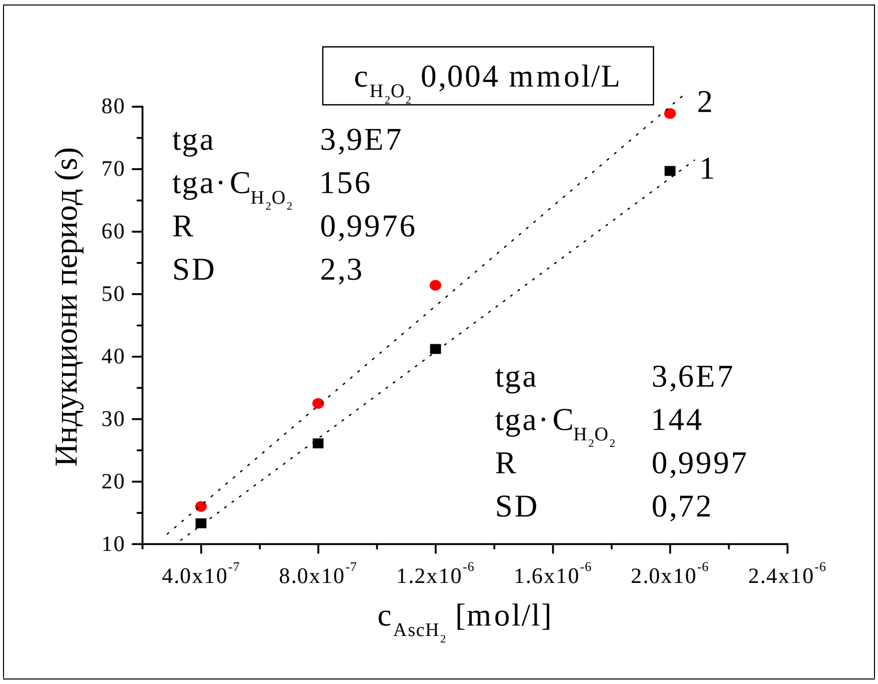
Аскорбинска киселина је одређивана у серији стабилизованих водених раствора у опсегу концентрација од 0,4 до 50 μmol/L (које међусобно стоје у односу 1 : 125), при константној концентрацији пероксидазе 10 U/L. Да би читав опсег био обухваћен овом методом, серију је било потребно поделити у три сета, лимитираних концентрацијом водоник-пероксида тако да она буде већа од највише концентрације аскорбинске киселине у сету два пута. Концентрације H_2O_2 стоје у међусобном односу 1 : 5 : 25, по сетовима. Испод калибрационих правих, наведени су подаци за: коефицијент правца праве (tgα); релативни коефицијент правих, да би се оне могле поредити међусобно у оквиру исте серије, добијен је као производ коефицијента правца и кореслодентне концентрације пероксида ($tg\alpha \cdot C_{H2O2}$); коефицијент корелације (R) и стандарда девијација (SD).

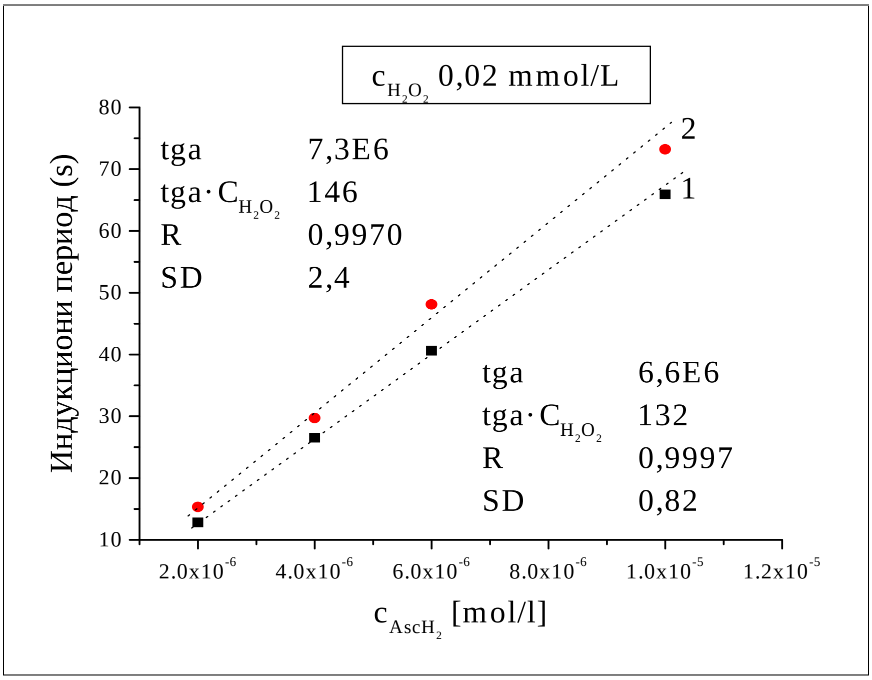

c H2O2 0,004 mmol/L
tga 3,8E7
tga·C H2O2 152
R 0,9940
SD 3.5
tga 3,5E7
tga·C H2O2 140
R 0,9986
SD 1.5
2
1
Индукциони период (s)
c AscH2 [mol/l]
4.0x10-7
8.0x10-7
1.2x10-6
1.6x10-6
2.0x10-6
2.4x10-6
10
20
30
40
50
60
70
80

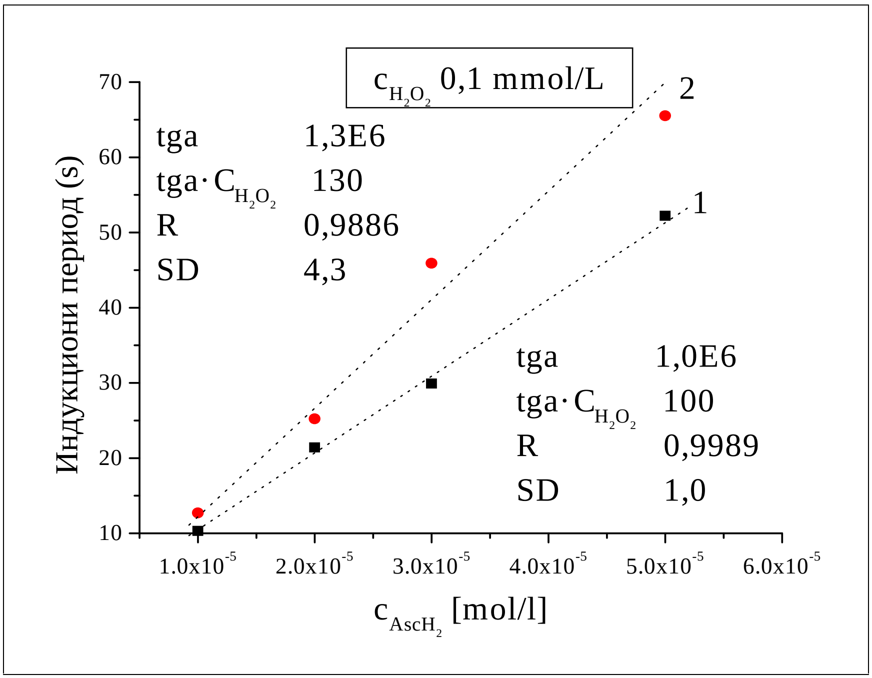

c H2O2 0,02 mmol/L
tga 7,5E6
tga·C H2O2 150
R 0,9984
SD 1,8
tga 6,5E6
tga·C H2O2 130
R 0,9993
SD 1,1
2
1
Индукциони период (s)
c AscH2 [mol/l]
2.0x10-6
4.0x10-6
6.0x10-6
8.0x10-6
1.0x10-5
1.2x10-5
10
20
30
40
50
60
70
80



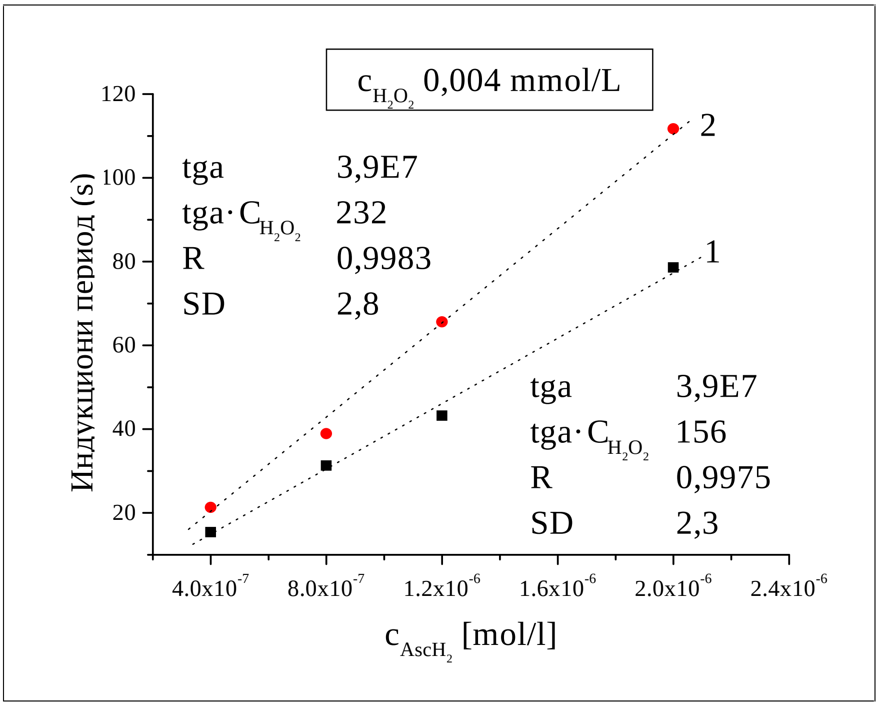
Слика 44. Калибрационе праве за одређивање аскорбинске киселине у опсегу од 0,4 до 50 μmol/L при одговарајућим концентацијама супстрата (H_2O_2) и следећим условима одређивања: пероксидаза 10 U/L; еквимоларне количине ***о-толидина*** (1) и ***бензидина*** (2) 0,5 mmol/L и цитратни пуфер ***pH 5***.



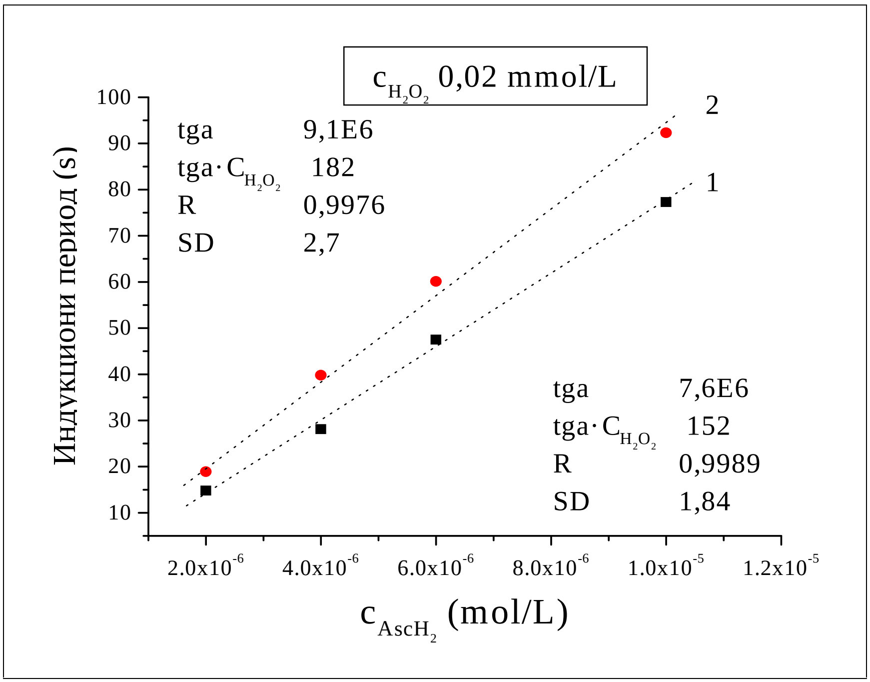




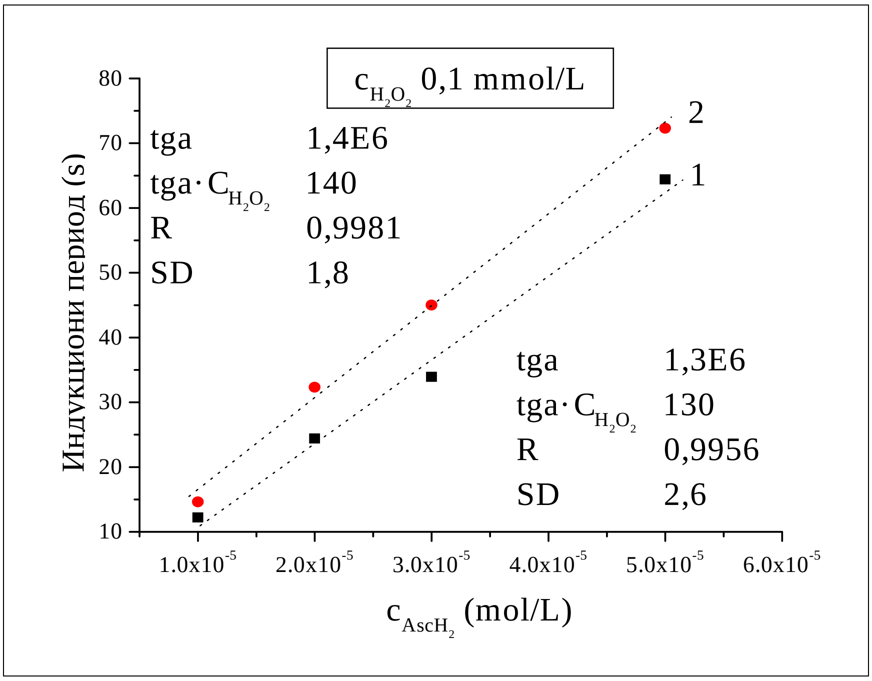
Слика 45. Калибрационе праве за одређивање аскорбинске киселине у опсегу од 0,4 до 50 μmol/L при одговарајућим концентрацијама супстрата (H_2O_2) и следећим условима одређивања: пероксидаза 10 U/L; еквимоларне количине ***о-толидина*** (1) и ***бензидина*** (2) 0,5 mmol/L и цитратни пуфер ***pH 6***.



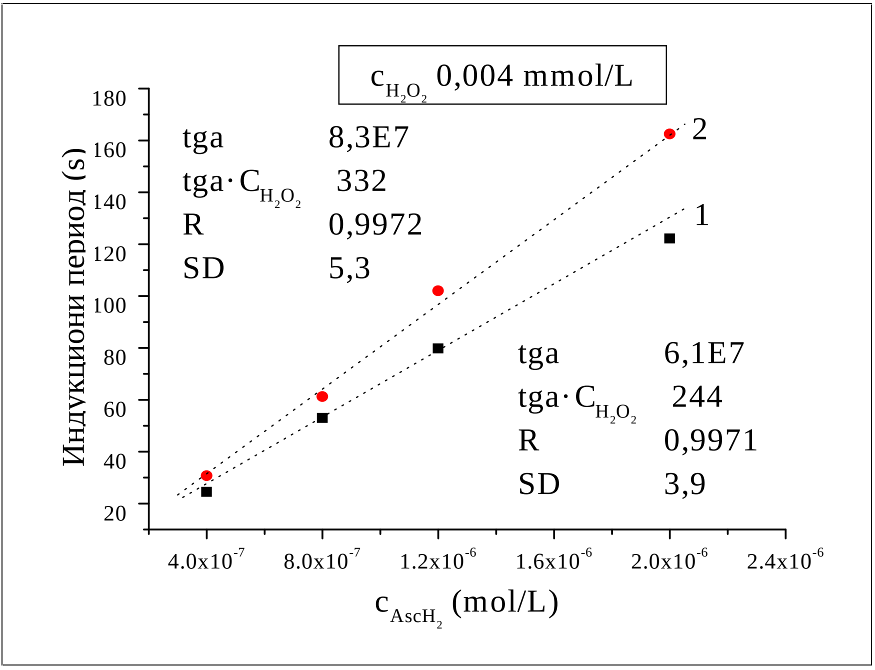
$c_{H_2O_2}$ 0,004 mmol/L
tga 3,9E7
tga·$C_{H_2O_2}$ 232
R 0,9983
SD 2,8
tga 3,9E7
tga·$C_{H_2O_2}$ 156
R 0,9975
SD 2,3
2
1
Индукциони период (s)
120
100
80
60
40
20
4.0x10^{-7}
8.0x10^{-7}
1.2x10^{-6}
1.6x10^{-6}
2.0x10^{-6}
2.4x10^{-6}
c_{AscH_2} [mol/l]

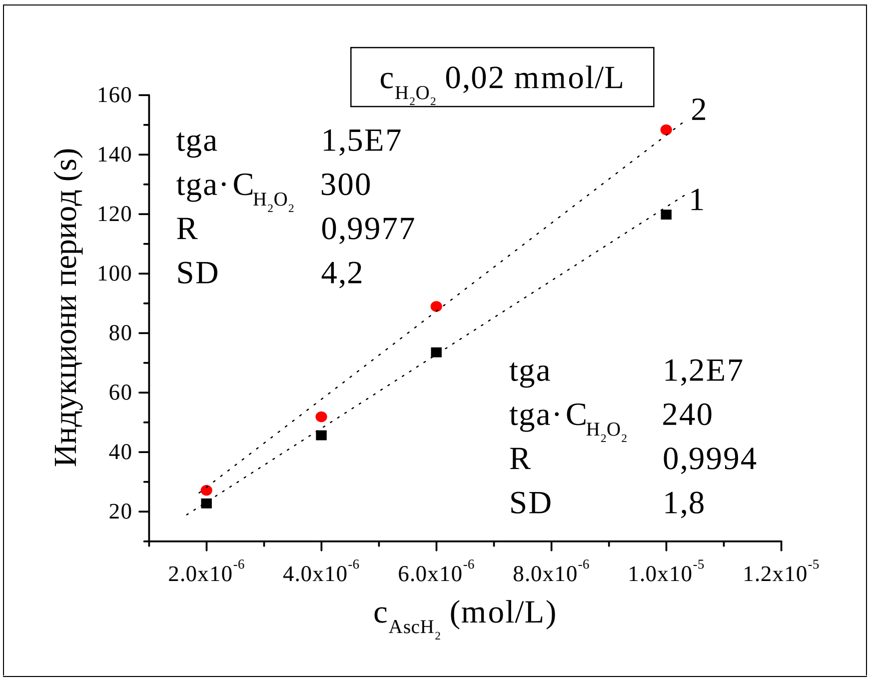


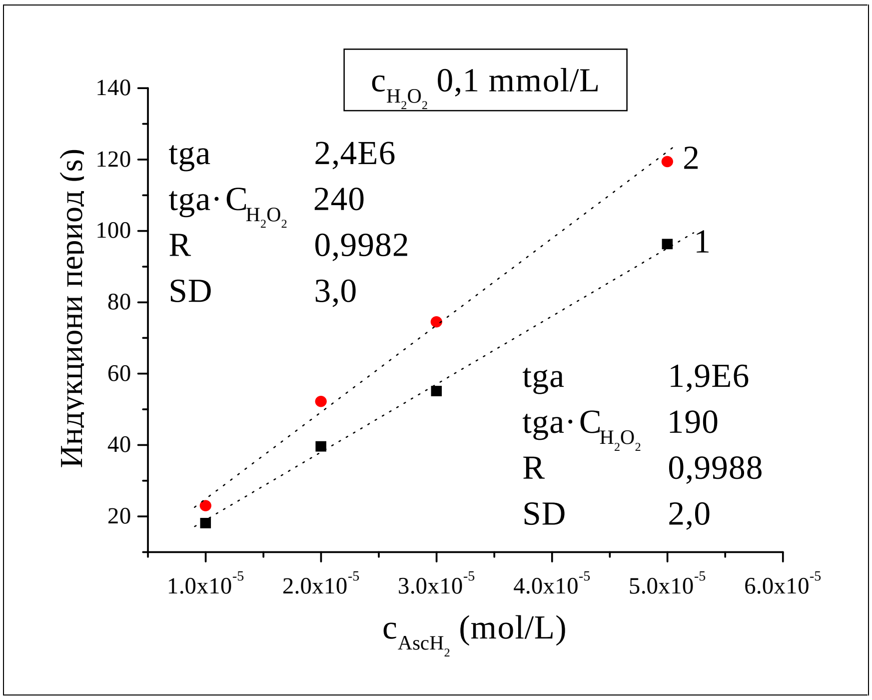
$c_{H_2O_2}$ 0,02 mmol/L
tga 9,1E6
tga·$C_{H_2O_2}$ 182
R 0,9976
SD 2,7
tga 7,6E6
tga·$C_{H_2O_2}$ 152
R 0,9989
SD 1,84
2
1
Индукциони период (s)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
2.0x10^{-6}
4.0x10^{-6}
6.0x10^{-6}
8.0x10^{-6}
1.0x10^{-5}
1.2x10^{-5}
c_{AscH_2} (mol/L)



Слика 46. Калибрационе праве за одређивање аскорбинске киселине у опсегу од 0,4 до 50 μmol/L при одговарајућим концентрацијама супстрата (H_2O_2) и следећим условима одређивања: пероксидаза 10 U/L; еквимоларне количине ***о-толидина*** (1) и ***бензидина*** (2) 0,5 mmol/L и цитратни пуфер ***pH 7***.







Слика 47. Калибрационе праве за одређивање аскорбинске киселине у опсегу од 0,4 до 50 μmol/L при одговарајућим концентрацијама супстрата (H_2O_2) и следећим условима одређивања: пероксидаза 10 U/L; еквимоларне количине ***о-толидина*** (1) и ***бензидина*** (2) 0,5 mmol/L и цитратни пуфер ***pH 8***.

Са дијаграма који приказују калибрационе криве се види да су коефицијенти правца правих добијених уз бензидин без изузетка виши у односу на праве добијене уз о-толидин за исти сет коцентрација, што указује да се транспорт водоника са бензидина на пероксидазу обавља спорије, у односу на брзину преноса са о-толидина.

У базној средини (pH 8) где је активност пероксидазе рена нижа него у неутралној и слабо киселој, вредности за индукционо време су у просеку веће за око два пута, што потенцијално омогућава детерминацију два пута нижих концентација аскорбинске киселине.

Коефицијенти корелације су у свим случајевима знатно изнад вредности 0,99, што указује на пуну линеарну корелацију између концентрације аскорбинске киселине (као зависно променљиве) и индукционог периода (као независно променљиве).

Стандардна девијација расте са порастом pH вредности, док је просечна стандардна девијација уз о-толидин нешто нижа (1,69) у односу на просек при бензидину (2,97).

4.3.7. Испитивање утицаја страних супстанци

Тестиран је утицај неколико супстанци, пре свих стабилизатора раствора и екстракционих средстава аскорбинске киселине, као и појединих компоненти из фармацеутских производа које се налазе у комбинацији са витамином C, на прецизност његовог одређивања (Табела 10). То је учињено додавањем раствора страних супстанци у серију радних раствора витамина C чија је концентрација тестирана. Концентације раствора страних супстанци су биране по томе како је званична метода то захтевала, када је реч о стабилизаторима и екстракционим средствима, односно у ком се односу страна супстанца налази у већини фармацеутских производа, када се ради о активним састојцима суплемената.

Табела 10. Утицај страних супстанци на одређивање садржаја аскорбинске киселине (1 mmol/L = 176,1 mg/l) у односу на слепу пробу изражено у процентима. РСС представља разблажење стране супстанце.

Страна супстанца		РСС 2:1	РСС 1:1	РСС 1:2
$(HPO_3)_3$	2%	-	37,4	28,5
H_3PO_4	2%	-	22,7	16,2
HCl	2%	-	29,3	18,4
$H_2C_2O_4$	1%	6,9	7,0	-1,3
CH_3COOH	0,1 mol/L	-0,5	0,8	1,1
EDTA	1 mmol/L	-1,6	-0,3	0,3
CH_3COOH EDTA	0,1 mol/L 1 mmol/L	-2,7	1.4	0,9
2-ацетоксибензоева киселина	(2:1)[11]	-15,4	-19,2	-8,8
Fe^{2+}	(1:3)	3,8	-3,6	-1,8
Zn^{2+}	(1:100)	4,5	-2,1	-0,9
$C_6H_{12}O_6$	(5:1)	0,7	0,8	-0,5
Токоферол ацетат	(1:10)	-1,1	0,7	0,7
Ретинол ацетат	(1,5:1)	10,4	4,5	0,5

4.3.8. Примена поступка

Реакциони систем ензим/супстрат/косупстрат/антиоксидант/пуфер, обухвата више супстанци које утичу једна на другу на различите начине. Увођење нових компоненти додатно оптерећује систем што се у значајној мери одражава на резултате мерења, те је одређивање кинетичких параметара реакције недовољно поуздано.

Иако су резултати добијени кинетичком методом упоредиви са резултатима добијеним статндардном DCPIP методом (Табела 9), они су задовољавајући само приликом одређивања аскорбинске киселине у препаратима, који не садрже друге активне компоненте (Табела 11).

[11]*Масени однос, страна супстанца : витамин C.*

Табела 11. Садржај аскорбинске киселине (mg) уразличитим препаратима, добијен применом ензимске методе, уз косупстрате о-толидин и бензидин и при pH 6 и 8.

Препарат витамина C	Декларативни садржај (mg)	О-толидин		Бензидин	
		pH 6	pH 8	pH 6	pH 8
Препарат 1	500	511,8±10,4	491,0±14,5	516,3±9,7	504,3±11,2
Препарат 2	1000	1011,4±13,1	1007,6±16,3	1008,8±11,0	996,5±9,3
Препарат 3	50	53,2±6,8	52,4±7,1	48,5±8,9	47,6±10,3
Препарат 4	240	204,6±12,9	215,8±5,5	212,2±14,6	220,0±15,4
Препарат 5	250	134,8±19,7	167,9±24,1	151,9±21,8	178,6±31,6

Препарат 1 - таблета, Витамин C, Галеника а. д. Београд. Помоћне супстанце: микрокристална целулоза, кроскармелоза-натријум, магнезијум-стеарат, безводна лактоза и кукурузни скроб.

Препарат 2 - прашак, Витамин C, Б. Г. Фарм, Београд, без помоћних супстанци.

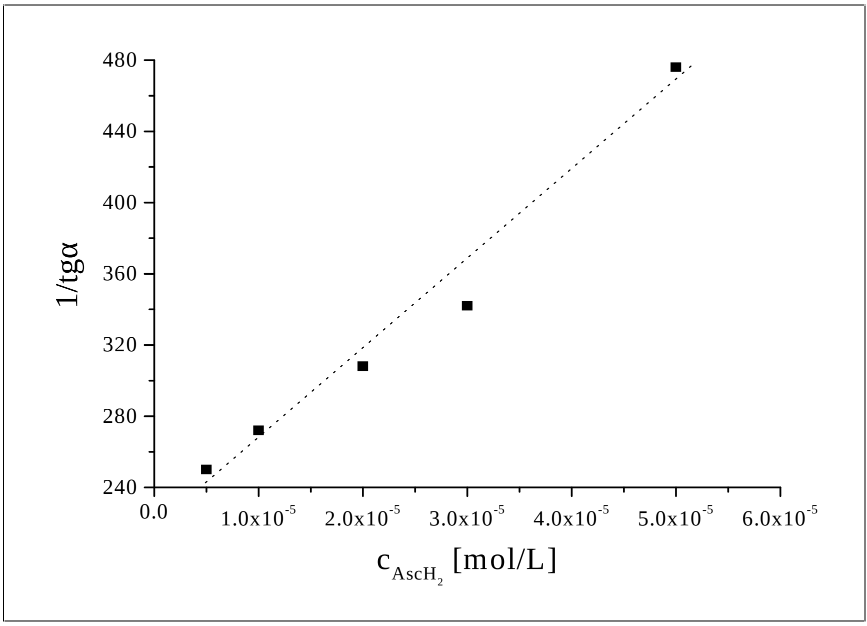
Препарат 3 - прашак, Лакорастворљиви витамин C, Иванчић и синови д. о. о., Београд. Пратећа супстанца, 450 mg глукоза.

Препарат 4 - шумећа таблета, Аспирин плус C, Бајер, Немачка. Поред витамина C садржи и 400 mg ацетилсалицилне киселине и помоћне супстанце: натријим-дихидрогенцитрат, натријум-хидрогенкарбонат, лимунска киселина безводна и натријум-карбонат безводни.

Препарат 5 - шумећа таблета, Суправит ACE+Zn+Se, Кенди, Бугарска. Помоћне супстанце: 25 mg α-токоферол-ацетата, 333 mg ретинол-ацетата, 300 μg фолне киселине, 15 mg цинк-сулфата, 30 μg натријум-селената и помоћне супстанце: лимунска киселина, глукоза, регулатор киселости (E500ii), арома мандарине, заслађивач (E951), хумектант (PEG 6000) и бета каротен.

4.3.9. Коефицијенти правца као аналитички параметар

У току индукционог периода промена вредности апсорбанције на изабраној таласној дужини је једнака нули (Δ[Abs] = 0). Други део криве, након индукционог периода, Δ[Abs]/Δt представља брзину оксидације косупстрата и такође се може искористити као параметар реакцијског система, јер одражава измењено стање након антиоксидантног ефекта аскорбинске киселине, што се може закључити са слике 34, а видети на слици 48.



Слика 48. Зависност реципрочних вредности почетних брзина реакције од концентрације аскорбинске киселине. Услови реакције: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,1 mmol/L; о-толидин 1 mmol/L; цитратни пуфер pH 6.

Док индукциони периоди представљају еквивалент реципрочних вредности почетних брзина ($1/v_0$), дотле се коефицијенти правца tgα односе као директне вредности почетне брзине (v_0).

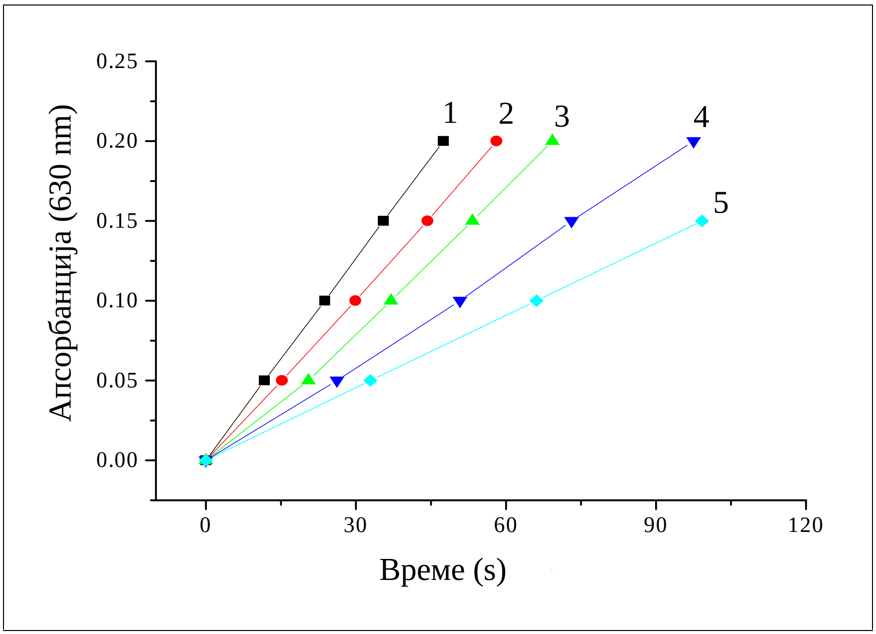
Недостаци оваквог начина приказивања су: дужина трајања мерења (у овом случају се прати ток читаве реакције, за разлику од праћења индукционог периода када је мерење могуће прекинути), што нужно доводи до повећања експерименталне грешке; при појединим условима (pH, ниска концентрација косупстрата), долази до појаве једва мерљивог апсорпционог скока, као и то што се до вредности нагиба кривих долази након прорачуна, док се индукциони период може очитати директно са калибрационе праве.

4.4. Инхибициони ефекат ретинол-ацетата на пероксидазу рена

У току испитивања утицаја страних супстанци на одређивање концентрације витамина C примећено је знатно одступање од очекиваних резултата приликом додавања одређених количина ретинол-ацетата. То је указало на могућ утицај ретинол-ацетата на механизам каталитичке реакције или на синергични ефекат са витамином C

4.4.1. Утицај ретинол-ацетата на пероксидазу рена без присуства витамина С

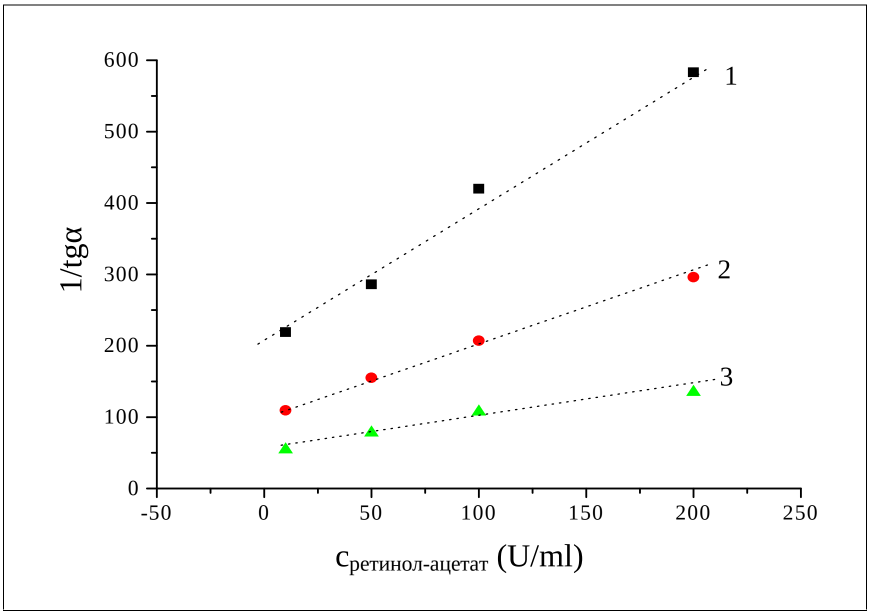
Мерења активности пероксидазе обављена без присуства аскорбинске киселине показала су смањење брзине оксидације косупстрата, сразмерно додатој количини ретинол-ацетата (Слика 49). Како је у овом случају изостала појава индукционог периода, то су резултати указивали на непостојање антиоксидантног ефекта према молекулима косупстрата, тј. радикалима бензидинских деривата.



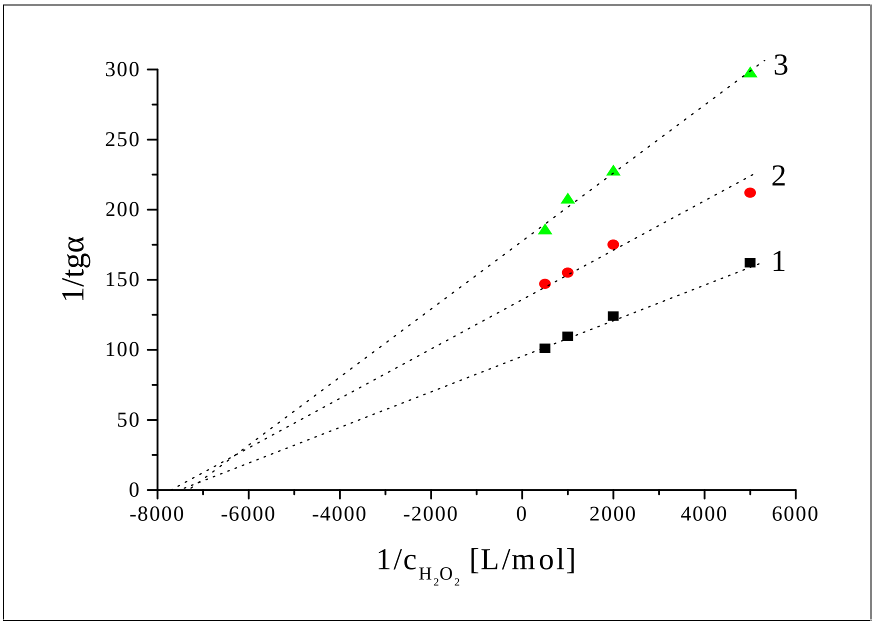
Слика 49. Утицај ретинол-ацетата на брзину оксидације о-толидина пероксидазом рена. Услови реакције: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,1 mmol/L; о-толидин 0,5 mmol/L; крива 1 означава слепу пробу, док се криве од 2 до 5 односе на ретинол-ацетат додат у концентрацијама 10, 50; 100 и 200 U/ml, редом. Релативне почетне брзине, изражене као tgα, износе: 0,0041 (1); 0,0034 (2); 0,003 (3); 0,002 (4) и 0,0015 (5).

Повећање концентрације пероксидазе сразмерно повећава брзину оксидације о-толидина (Слика 50).

Лајнвивер-Барков дијаграм зависности реципрочних вредности брзине реакције од реципрочних вредности концентрације супстрата приказан је на слици 51. Како су се праве зависности брзине реакције од концентрације супстрата секле приближно у једној тачки на у-оси, а да се она није променила у односу на слепу пробу без присутног ретинол-ацетата, то је закључено да ретинол-ацетат инхибира ензим пероксидазу рена и да та инхибиција припада некомпетитивном типу. На овај начин утврђено је да Михаелисова константа износи 0,13± 0,01 mmol/L.

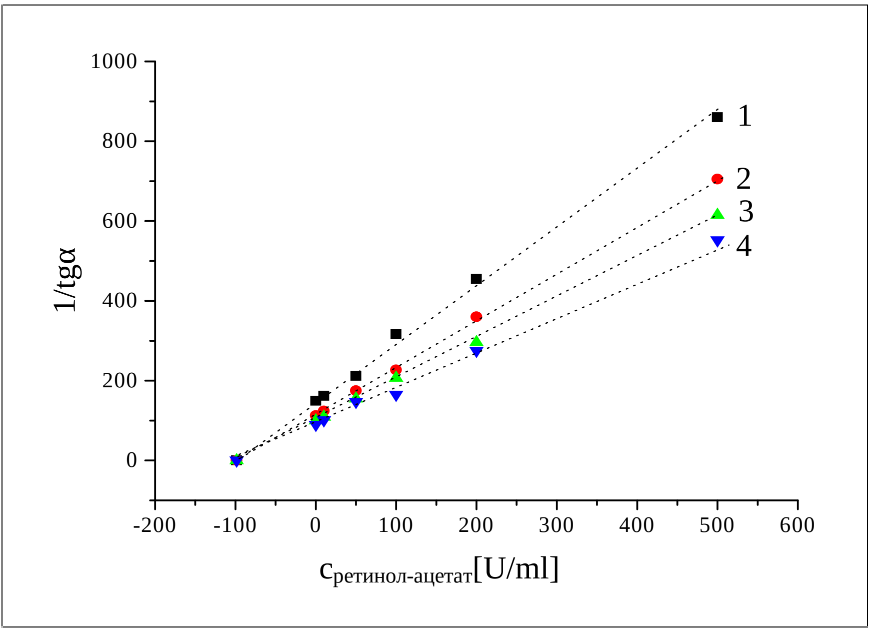


Слика 50. Утицај концентрације пероксидазе на брзину оксидације косупстрата о-толидина у присуству ретинол-ацетата. Услови реакције: пероксидаза 5 (1); 10 (2) и 20 (3) U/L; H_2O_2 1 mmol/L; о-толидин 0,5 mmol/L; pH 6.



Слика 51. Лајнвивер-Барков дијаграм зависности реципрочних вредности почетне брзине од реципрочних вредности водоник-пероксида у присуству ретинол-ацетата 10 (1); 50 (2); 100 (3) U/ml. Остали услови: пероксидаза 10 U/L; о-толидин 0,5 mmol/L; pH 6. K_M износи 0,13±0,01 mmol/L.

Диксонов дијаграм зависности реципрочних вредности почетне брзине од концентрације ретинол-ацетата дат је на слици 52. Пресек правих са y-осом даје вредност за константу инхибиције (K_I), при чему је утврђено да она износи 98,5±5,0 U/ml.

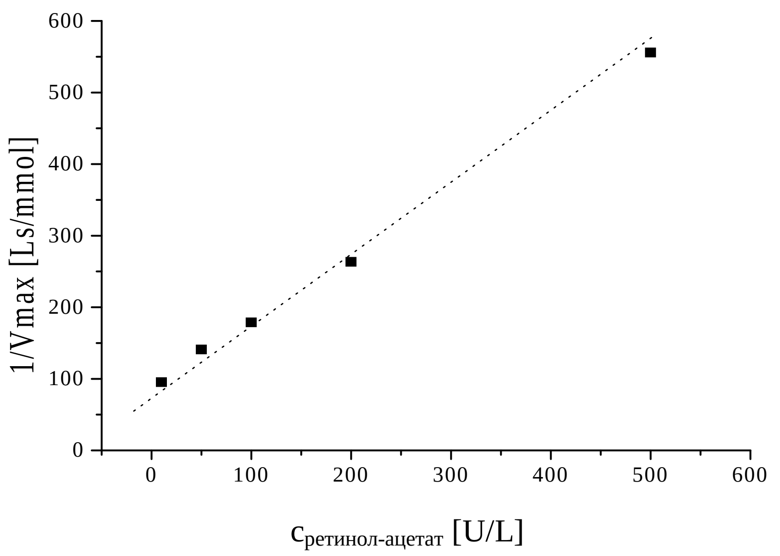


Слика 52. Диксонов дијаграм зависности реципрочне вредности почетне брзине реакције од концентрације ретинол-ацетата. Услови рекције: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,2 (1); 0,5 (2); 0,1 (3) и 2 (4) mmol/L; о-толидин 0,5 mmol/L; pH 6. K_I износи 98,5±5,0 U/ml. Коефицијент корелације R је свуда износио преко 0,99.

Према Еди-Хофстијевим дијаграмима зависности почетне брзине од количника почетне брзине и концентрације супстрата, утврђене су вредности и за максималну брзину (V_{max}) инхибиторске реакције, на основу којих је конструисан дијаграм зависности реципрочних вредности максималних брзина од концентрације ретинол-ацетата (Слика 53).

На основу овог дијаграма се види да максимална брзина реакције опада са повећањем концентрације ретинол-ацетата, а да Михаелисова константа (K_M) износи 0,124±0,015 mmol/L.

Употребом овог поступка анализиран је узорак сировинске компоненте за израду тзв. шумећих таблета и инстант напитака у праху, ретинол-ацетата на носачу (Галеника, Београд), декларативног износа 524,519 kU/g. Након растварања 1 g препарата у 1000 ml дејонизоване воде и разблажења 2, 5 и 10 пута, приступило се мерењу уз водоник-пероксид концентрација 0,2 и 2 mmol/L, резултати мерења дати су у табели 12.



Слика 53. Зависност реципрочних врености максималних брзина (добијених на основу Еди-Хофстијевих дијаграма) од концентрације ретинола.

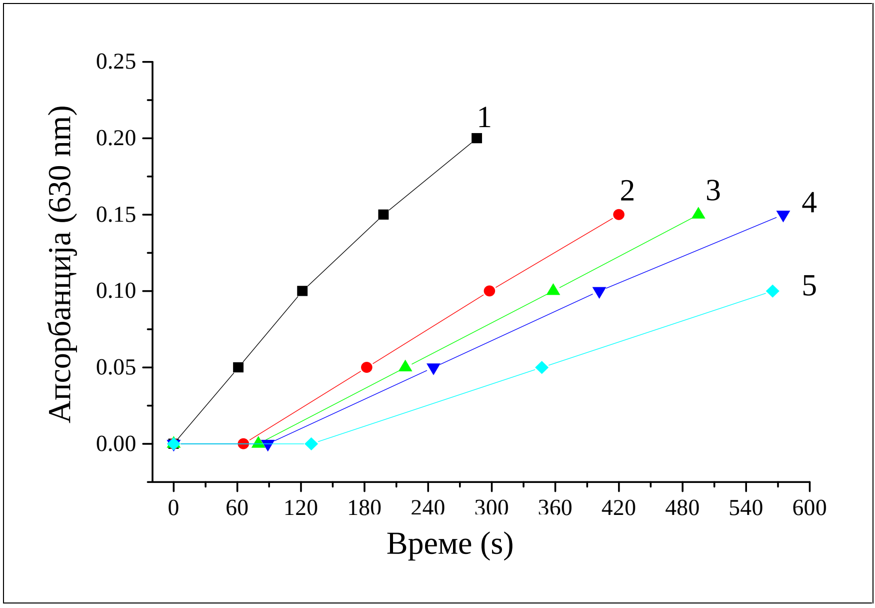
Табела 12. Садржај ретинол-ацетата у узорку сировинске компоненте.

Разблажење	tg α (H_2O_2 0,2 mmol/L)	tg α (H_2O_2 2 mmol/L)	Ретинол-ацетат (kU/L)
1:2 (262,260 kU/L)	0,0018	0,0031	283,0±17,5
1:5 (104,904 kU/L)	0,0033	0,0049	110,1±9,8
1:10 (52,452 kU/L)	0,0043	0,0070	55,5±6,4

Добијени резултат 557,0 kU/g, се разликовао за 6,3 %, у односу на декларативну вредност.

4.4.2. Утицај ретинол-ацетата на пероксидазу рена у присуству витамина C

Увођење оба витамина у реакциону смешу појачава њихове појединачне ефекте на оксидацију бензидинских деривата. Док је аскорбинска киселина привремено присутна у систему и утиче на кинетику реакције смањењем садржаја водоник-пероксида, дотле ретинол-ацетат делује перманентно својим инхибиторним ефектом на пероксидазу, привидно смањујући њену концентрацију. На тај начин долази и до повећања индукционог времена и до смањења почетне брзине реакције (Слика 54).



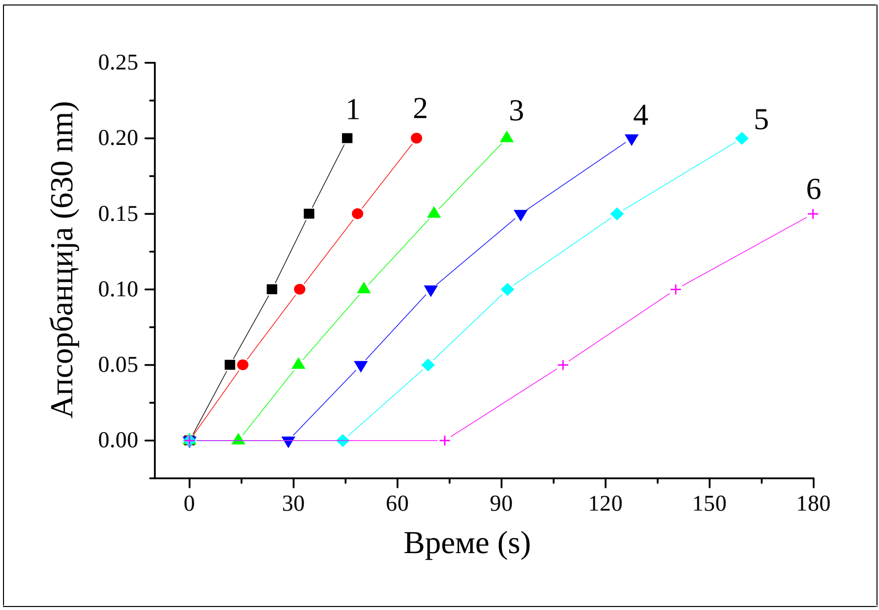
Слика 54. Утицај ретинол-ацетата на брзину оксдације о-толидина и индукциони период у присуству аскорбинске киселине. Услови реакције: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,02 mmol/L; о-толидин 0,5 mmol/L; аскорбинска киселина 0,01 mmol/L; крива 1 представља слепу пробу (без витамина), а криве (2-5) ретинол-ацетат додат у концентрацијама 0; 10; 50 и 100 U/ml, редом. Релативне почетне брзине изражене као $tg\alpha \cdot 10^{-4}$ износе: 8,2 (1); 4,3 (2); 3,6 (3); 3,2 (4) и 2,3 (4).

Иако су на први поглед ова два ефекта одвојена она се не могу изоловано посматрати. Тако се може уочити да се индукциони период продужава услед присуства ретинол ацетата пропорционално његовој концентацији.

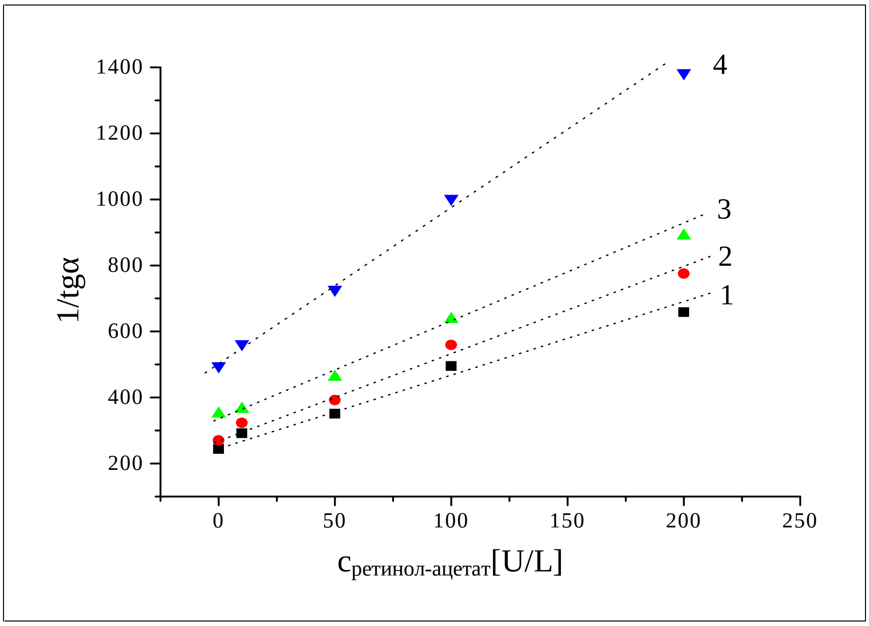
Са друге стране почетана брзина реакције при одређеној концентрацији ретинола се смањује пропорционално смањењу концентрације водоник-периксида због присуства витамина C (Слика 55).

Утицај ретинол ацетата на реципрочне вредности почетних брзина у присуству аскорбинске киселине, дат је Диксоновим дијаграмом на слици 56.

Повећање концентрације аскорбинске киселине доводи нужно да смањења актуелне концентрације водоник-пероксида, па самим тим и до смањења почетних брзина оксидације.

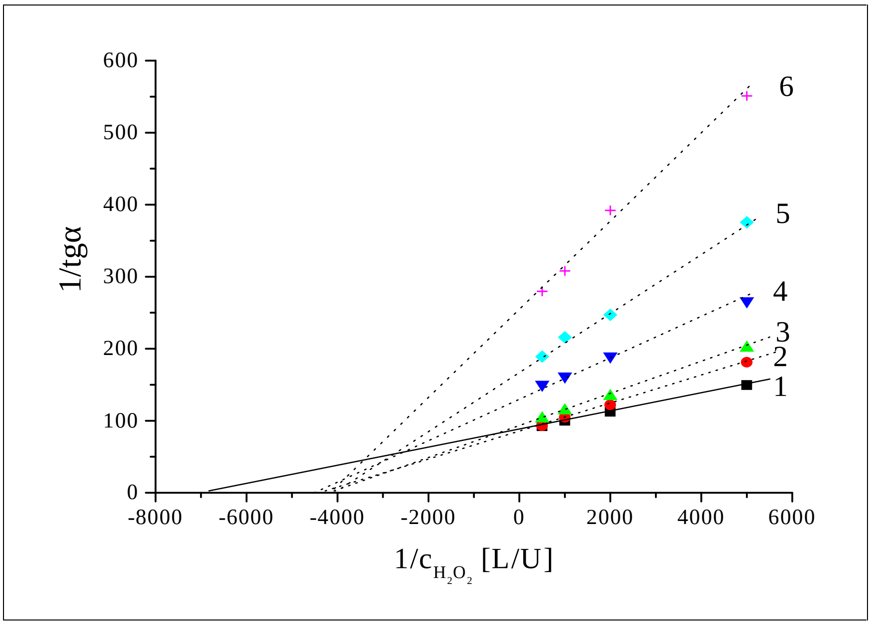


Слика 55. Утицај аскорбинске киселине на брзину оксидације о-толидина у присуству ретинол-ацетата. Услови реакције: пероксидаза 10 U/L; водоник-пероксид 0,1 mmol/L; о-толидин 0,5 mmol/L; pH 6; слепа проба (без витамина) (1); ретинол ацетат 50 U/L (2); ретинол-ацетат и аскорбинска киселина 10 (3); 20 (4); 30 (5); 50 (6) µmol/L. Релативне почетне брзине изражене као $tg\alpha \cdot 10^{-4}$ износе: 41,0 (1); 28,5 (2); 27,6 (3); 22,0 (4); 21,1 (5) и 14,0 (6).



Слика 56. Зависност релативне почетне брзине од концентрације ретинол-ацетата, без (1) и у присуству аскорбинске киселине (2-4). Услови реакције: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,1 mmol/L; о-толидин 0,5 mmol/L; крива 1 представља слепу пробу, а криве од 2 до 4, акорбинску киселину 10; 20 и 50 µmol/L, редом.

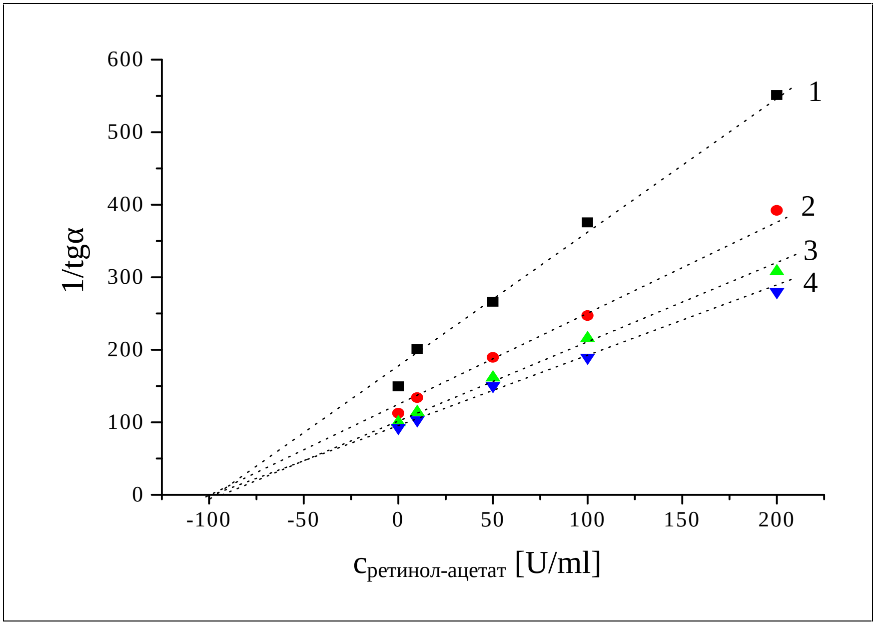
Исто тако, конструисање Лајнвивер-Барковог дијаграма је показало да привидно долази до промене Михаелисове константе, као последице неодговарајуће кореспонденције између тачака x-осе и ефективног садржаја водоник-пероксида у тренутку мерења (Слика 57).



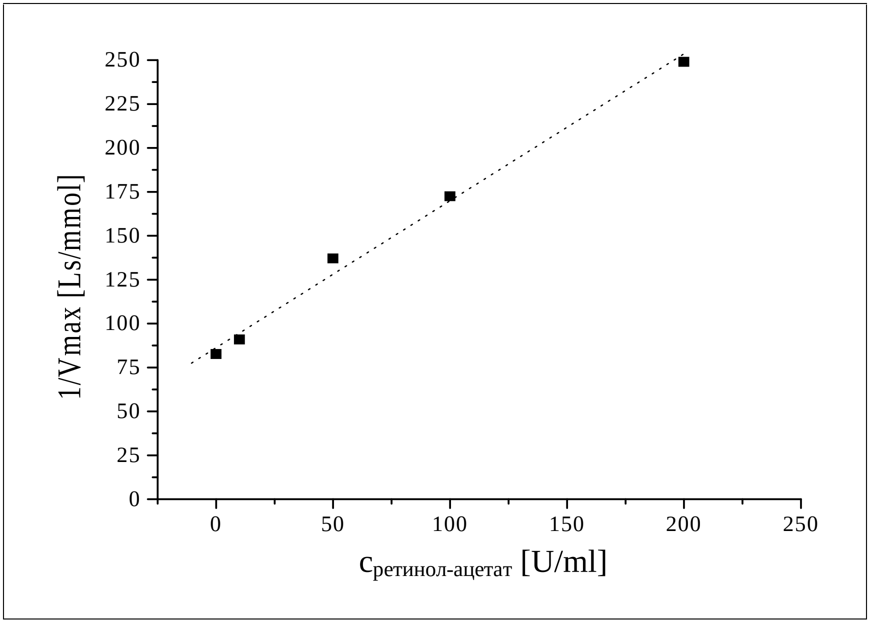
Слика 57. Лајнвивер-Барков дијаграм зависности реципрочних вредности почетне брзине од реципрочних вредности водоник-пероксида у присуству ретинол-ацетата и константну концентрацију аскорбинске киселине. Услови реакције: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,1 mmol/L; о-толидин 0,5 mmol/L. Слепа проба (без витамина) (1); аскорбинска киселина 50 µmol/L (2); ретинол-ацетат 10 (3); 50 (4); 100 (5) и 200 (6) U/ml. K_M слепе пробе износи 0,13±0,01, док у присуству витамина износи 0,22±0,01 mmol/L.

Са друге стране Диксонов дијаграм показује да у овом случају није дошло до промене K_I и да она и даље износи 98,5±5,0 U/ml (Слика 58).

Како се и очекивало максимална брзина реакције опада константно са повећањем концентрације ретинола што се и показало из Еди-Хофстијевих дијаграма, а илустровано на слици 59. Михаелисова константа добијена на овај начин је износила 0,23±0,02 mmol/L, на шта је утицало смањење концентрације пероксида услед присуства аскорбинске киселине.



Слика 58. Диксонов дијаграм зависности реципрочне вредности почетне брзине од концентрације ретинол-ацетата. Услови: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,2 (1); 0,5 (2); 1 (3) и 2 (4) mmol/L; аскорбинска 50 μmol/L; o-толидин 0,5 mmol/L; pH 6; K_I износи 98,5±5,0 U/ml.



Слика 59. Зависност реципрочних вредности максималних брзина реакције од концентрације ретинол-ацетата. Услови: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,1 mmol/L; аскорбинска киселина 50 μmol/L; o-толидин 0,5 mmol/L; pH 6.

4.5. Одређивање аскорбинске киселине и ретинол-ацетата у смеши

Резултати истраживања су показали да се ова метода може успешно користити за одређивање како аскорбинске киселине (у опсегу концентрација од 0,4 до 50 μmol/L), тако и за одређивање ретинол-ацетата (у опсегу концентрација од 10 до 500 U/ml).

И поред тога што се ефекти аскорбинске киселине и ретинол-ацетата на кинетику описане ензимске реакције сумирају, они се и даље могу посматрати преко два аналитичка сигнала - индукционо време и почетна брзина, и искористити за конструисање детерминационе матрице - аскорбинска киселина : ретинол-ацетат, којом би се симултано могле одредити обе супстанце у заједничком раствору (Табеле 13а и 13б).

Као основни критеријум је усвојено да концентрације ензима и косупстрата буду константне како би осцилације приликом мерења биле сведене на минимум. Серије смеше раствора су подељене у три сета који су лимитирани концентрацијом супстрата, водоник-пероксида, као и приликом конструисања калибрационих правих код аскорбинске киселине. Концентрације пероксида су испод вредности за K_M, што занчи да ензим није засићен супстратом. Тестиране су све концентрације оба витамина као и у појединачним случајевима.

Основна идеја се састоји у томе да не постоје две различите смеше аскорбинска киселина : ретинол-ацетат које карактеришу идентичне вредности параметара, индукциони период / почетна брзина оксидације косупстрата, при одређеној концентрацији водоник-пероксида.

Мерења обављена при вишим концентацијама ретинол-ацетата када је инхибиторски ефекат на ензим пероксидазу најинтензивнији, су показивала највећа одступања или је због прениске активности ензима аналитички сигнал изостајао. Са друге стране ниске концентрације ретинола нису изазивале довољно дискретну промену праћених параметара.

Табела 13а. Детерминациона матрица за одређивње аскорбинске киселине (0,4-50 μmol/L) и ретинол-ацетата (10-50 kU/L)у смеши.

		Ретинол – ацетат (kU/L)									
H_2O_2 (mmol/L)	$AscH_2$ (μmol/L)	0		10		20		30		50	
		ИП	$tg\alpha \cdot 10^{-4}$	ИП	$tg\alpha \cdot 10^{-4}$	ИП	$tg\alpha \cdot 10^{-4}$	ИП	$tg\alpha \cdot 10^{-4}$	ИП	$tg\alpha \cdot 10^{-4}$
0,004	0	-	0,164	-	0,131	-	0,129	-	0,121	-	0,115
	0,4	13,3	0,145	16,4	0,120	16,7	0,115	17,0	0,111	17.8	0,094
	0,8	26,1	0,131	32,1	0,109	33,2	0,096	34,0	0,084	35,1	0,078
	1,2	41,2	0,117	50,7	0,091	52,3	0,083	53,1	0,075	55,1	0,061
	1,6	54,4	0,095	64,9	0,082	67,1	0,075	70,8	0,068	73,6	0,055
	2	69,7	0,082	85,5	0,073	86,9	0,066	89,1	0,058	93,5	0,049
0,02	0	-	8,2	-	6,8	-	6,6	-	6,4	-	6,1
	2	12,8	7,5	15,4	6,2	16,0	6,0	16,7	5,8	17,7	5,5
	4	26,5	6,6	31,2	5,5	33,1	5,3	34,3	5,1	36,2	4,8
	6	40,6	5,8	45,8	4,8	48,1	4,5	49,9	4,4	52,8	4,2
	8	50,6	4,9	60,3	4,2	64,8	3,9	67,9	3,7	71,5	3,5
	10	65,9	4,3	79,9	3,6	81,5	3,4	84,7	3,3	88,8	3,1
0,1	0	-	41,0	-	34,3	-	33,1	-	31,2	-	28,5
	10	10,3	37,1	12,6	31,0	13,1	29,8	13,5	28,6	14,1	27,6
	20	21.3	32,8	24,1	27,4	26,0	25,5	27,1	24,0	28,5	22,0
	30	29,9	28,5	38,1	23,8	40,2	22,4	42,0	21,9	44,2	21,1
	40	42,0	24,0	51,2	21,2	52,4	19,4	55,3	18,5	56,8	17,1
	50	52,2	20,2	65,3	17,8	67,7	16,9	69,3	15,8	73,6	14,0

Табела 13б. Детерминациона матрица за одређивње аскорбинске киселине (0,4-50 μmol/L) и ретинол-ацетата (75-500 kU/L) у смеши.

		Р е т и н о л – а ц е т а т (kU/L)									
H_2O_2 (mmol/L)	$AscH_2$ (μmol/L)	75		100		150		200		500	
		ИП	$tg\alpha \cdot 10^{-4}$	ИП	$tg\alpha \cdot 10^{-4}$	ИП	$tg\alpha \cdot 10^{-4}$	ИП	$tg\alpha \cdot 10^{-4}$	ИП	$tg\alpha \cdot 10^{-4}$
0,004	0	-	0,093	-	0,085	-	0,074	-	0,063	-	0,035
	0,4	21,5	0,088	26.1	0,079	30,8	0,065	35,8	0,051	71,0	0,027
	0,8	42,0	0,071	48,3	0,066	62,2	0,051	73,4	0,041	137,2	0,012
	1,2	62,4	0,058	76,8	0,051	89,5	0,038	112,6	-	-	-
	1,6	84,6	0,050	103,1	0,046	124,7	0,030	-	-	-	-
	2	104,7	0,048	129,6	0,041	146,3	0,022	-	-	-	-
0,02	0	-	5,0	-	4,2	-	3,5	-	2,9	-	1,8
	2	20,5	4,7	24,8	3,8	31,1	3,1	36,4	2,5	57,5	1,6
	4	39,9	3,8	49,0	3,4	60,6	2,7	76,6	2,1	115,6	1,4
	6	61,0	3,5	77,2	2,8	92,9	2,4	107,9	1,9	177,5	1,3
	8	84,6	3,1	97,2	2,6	122,8	2,1	148,9	1,7	228,2	-
	10	102,7	2,7	129,8	2,3	155,6	1,9	196,8	1,6	-	-
0,1	0	-	24,1	-	20,2	-	17,5	-	15,2	-	8,8
	10	18,3	22,6	21,8	17,9	25,2	15,9	27,8	13,8	50,2	7,9
	20	36,1	18,0	44,9	15,7	53,2	14,5	55,1	11,9	102,8	7,0
	30	55,2	17,0	66,3	13,5	77,7	11,8	85,4	10,3	145,7	6,0
	40	74,4	14,7	89,9	11,2	98,1	10,2	114,2	9,0	199,9	5,2
	50	94,1	12,2	113,7	9,9	132,8	8,7	142,7	7,5	243,6	4,1

4.5.1. Модели узорака и примена поступка

Како је истакнуто, присуство страних супстанци знатно ремети одређивње витамина А и С, те се они без одвајања приказаном методом могу анализирати само у пречишћеном облику у заједничкој смеши, као приликом састављања премикса за суплементирану исхрану домаћих животиња.

Генерално се разликују два модела узорка који се растварањем и даљим разблаживањем могу довести у опсег концентрација за одређивање.

- Први тип представљају узорци код којих се обе компоненте налазе у домену концентрација које нуди детерминациона матрица.
- Други тип представљају узорци код којих се разблаживањем једна од супстанци доводи у опсег концентрација за одређивање, док се друга налази испод њега. Овај се случај може решити применом стандардног додатка друге супстанце у реакциону смешу.

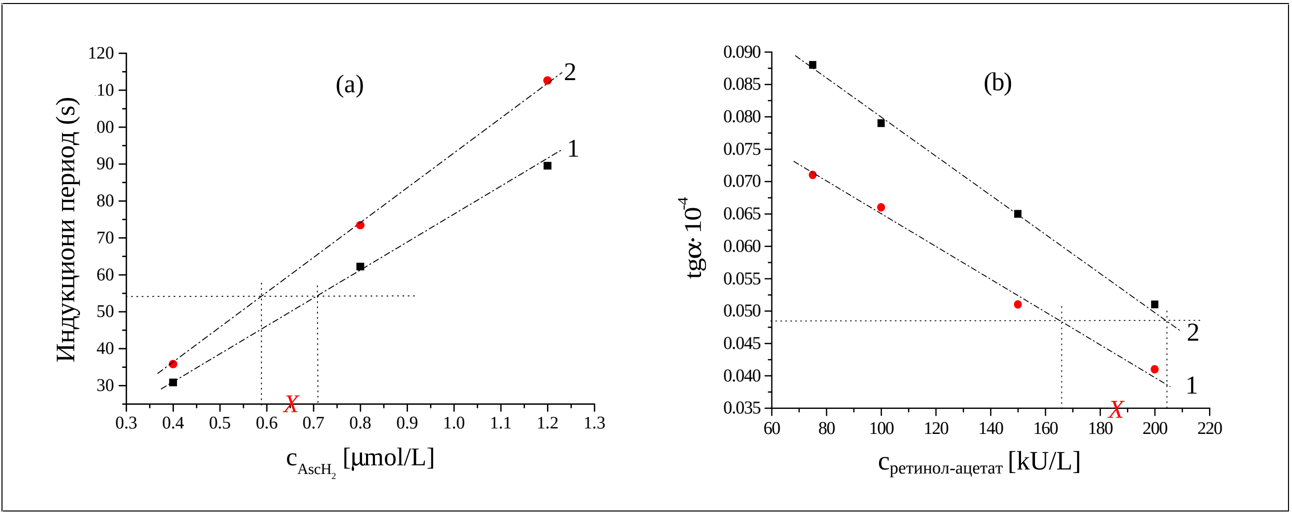
Анализирани су А+С витамински премикси за производњу препарата Ветмедике д.о.о., AD_3E+C Орал и Мултивитамин Орал (Табела 14).

Табела 14. Садржај витамина А и С у препаратима и одређивање њиховог односа у смеши.

	AD_3E+C Орал	Мултивитамин Орал
Витамин	A : C	A : C
Декларативни садржај	100000000 U/L : 50 mg/L (100000 kU/L) : (284 μmol/L)	10000000 U/L : 20 g/L (10000 kU/L) : (113,6 mmol/L)
Разблажење	1:500	1 : 2500
Садржај у аликвоту након разблажења	200 kU/L : 0,57 μmol/L	4,35 kU/L : 45,4 μmol/L
ИП	54,1*	44,5**
tgα	0,048	22,1
Резултат за аликвот	185,5±8,0 kU/L : 0,65±0,06 μmol/L	<7,5 kU/L : 38,8±4,4 μmol/L
Процењени садржај	92750±4000 kU/L : 325±30 μmol/L	<18750 kU/L : 97,0±11,0 mmol/L

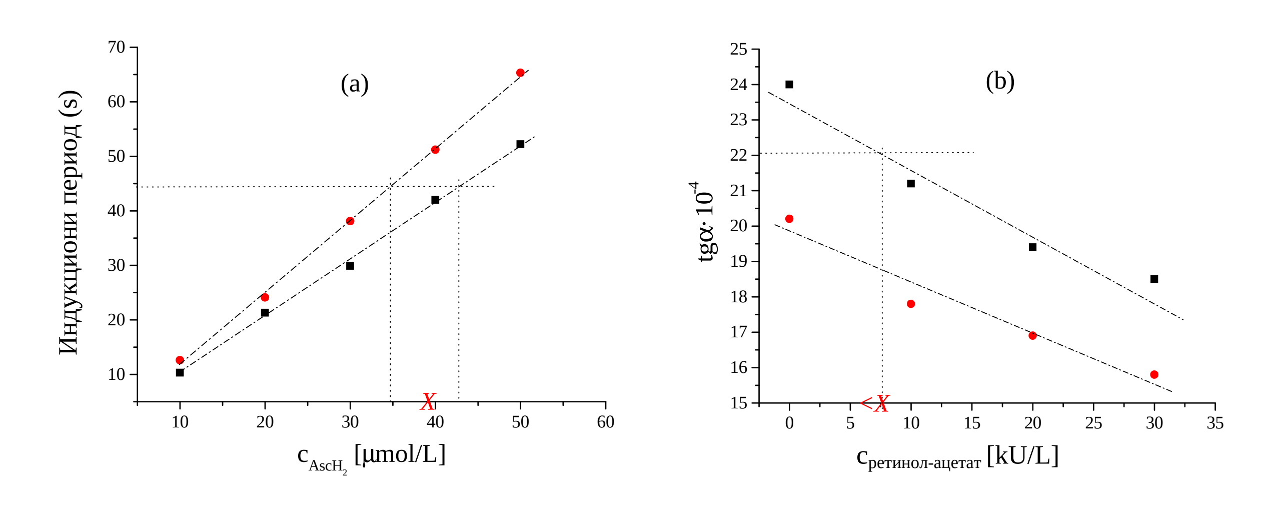
* Резултати за ИП и tgα добијени у сету који је одређен са концентрацијом водоник -пероксида 4 μmol/L.
** Резултати за ИП и tgα добијени у сету који је одређен са концентрацијом водоник -пероксида 100 μmol/L.

Концентрације витамина првог узорка се након разблажења налазе у области вредности покривених детерминационом матрицом па се резултати њиховог односа у аликвоту могу протумачити, прорачуном директно из детерминационе матрице (Табела 13б), где се види да су вредности за индукциони период (ИП) и почетну брзину оксидације (tgα) пале у домен од 0,4 до 0,8 μmol/L за акорбинску киселину и домен од 150 до 200 kU/l за ретинол-ацетат (болд) или конструисањем калибрационих правих (Слика 60).



Слика 60. Калибрационе праве за смешу аскорбинске киселина : ретинол-ацетат, при концентрацији пероксида 0,004 mmol/L. а) калибрационе праве за одређивање аскорбинске киселине, при концентрацији ретинол-ацетата 150 (1) и 200 (2) kU/l; б) калибрационе праве за одређивање ретинол-ацетат, при концентрацији аскорбинске киселине 0,4 (1) и 0,8 (2) μmol/L.

Други узорак садржи концентрације витамина А и С, у односу којем се једна од компоненти не може довести у опсег одређивања разблаживањем, па се њена концентрација након тога подешава стандардним додатком. Тако је анализом утврђено да се након разблаживања узорка концентрација витамина С налази у области одређивања, док се концентрација витамина А налази испод детекционог опсега. Након увођења стандардног додатака витамина А од 10 kU/L, добијене вредности за индукциони период (ИП) и почетну брзину оксидације (tgα) су пале у домен од 40 до 50 μmol/L за акорбинску киселину и домен од 0 до 10 kU/l за ретинол-ацетат (Табела 13а, болд). Концентрације аскорбата и ретинола могу се добити из конструисаних калибрационих правих (Слика 61).



Слика 61. Калибрационе праве за смешу аскорбинске киселина : ретинол-ацетат, при концентрацији пероксида 0,1 mmol/L. а) калибрационе праве за одређивање аскорбинске киселине, при концентрацији ретинол-ацетата 0 (1) и 10 (2) kU/l; б) калибрационе праве за одређивање ретинол-ацетат, при концентрацији аскорбинске киселине 40 (1) и 50 (2) μmol/L.

5. Закључак

Реакција разлагања водоник-пероксида пероксидазом рена у присуству косупстрата, као индикатора, послужила је за спектрофотометријско одређивање концентрације L-аскорбинске киселине и ретинол-ацетата у воденим растворима понаособ и у смеши. Током овог истраживања тестирана су два косупстрата, бензидин и његов дериват о-толидин у различитим пуферским системима у pH скали од 5 до 8. На основу добијених резултата могу се извести следећи закључци:

- У воденим растворима L-аскорбинска киселина је веома осетљива на: присуство страних супстанци (посебло металних јона и других молекула подложних редукцији), промену температуре, pH средине и изложеност кисеонику из ваздуха, па се лако оксидује до физиолошки неактивне L-дехидроаскорбинске киселине.

Стандардни стабилизирајући агенси, попут минералних киселина (мета и ортофосфорне и хлороводоничне киселине), конзервирају водене растворе аскорбинске киселине који не ометају одређивање класичним неензимским методама, као што су методе са 2,6-дихлорфенолинолфенолом (DCPIP) или калијум јодатом. Међутим, њихова природа онемогућава примену поменуте ензимске методе са пероксидазом рена због снажног инхибирајућег дејства на овај ензим, услед денатурационог ефекта.

Из тог разлога је тестирано неколико органских киселина као стабилизирајућих супстанци: лимунска, оксална, сирћетна и EDTA киселина и њихове смеше. Показало се да смеша CH_3COOH и EDTA (100 mmol/L и 1 mmol/L, редом) испољава задовољавајући стабилизациони ефекат (током 48 сати сачувано је 98,5 %, 1 mmol/L аскорбинске киселине), док утицај на пероксидазу није запажен.

- L-аскорбинска киселина се на посматрану ензимску реакцију надовезује као антиоксидант, редукујући пероксидазом оксидоване молекуле косупстрата што се манифестује ефектом индукционог периода, тј. времена до појаве апсорпционог максимума оксидоване форме косупстрата, који се прати спектрофотометријски на одређеној таласној дужини, која зависи од употребљене врсте косупстрата и pH средине. Ова реакција је квантитативна, па се индукциони период може искористити као мера концентрације аскорбата.

- Концентрација аскорбинске киселине која се ефикасно може одредити овом кинетичком методом првенствено је лимитирана употребљеном количином водоник-пероксида и износи од 1/10 до 1/2 његове концентрације, при константним концетрацијама ензима (2; 5; 10 и 20 U/L) и косупстрата (од 0,1 до 5 mmol/L). На тај начин се променом концентације водоник-пероксида 0,1; 0,02 и 0,004 mmol/L успешно може одредити аскорбинска киселина у опсегу концентрација од 0,4 до 50 μmol/L, при чему је било потребно конструисати три калибрационе праве.
- Ретинол-ацетат се понаша као некомпетитивни инхибитор ензима пероксидазе и не испољава антиоксидантне особине у односу на слободне радикале бензидинских деривата. Овај инхибиторски ефекат се манифестује смањењем почетне брзине оксидације косупстрата, што се може искористити за мерење концентрације ретинола. На овај начин се успешно може одредити ретинол-ацетат у опсегу концентрација од 10 до 200 kU/L.
- У смеши L-аскорбинска киселина и ретинол-ацетат делују синергистички на кинетику ензимске реакције. Том приликом долази да сумације њихових појединачних ефеката, што омогућава одређивање њиховог односа у смеши.

Заједнички ефекат који испољавају аскорбинска киселина и ретинол-ацетат, се са једне стране манифестује повећањем индукционог периода, а то повећање је еквивалентно инхибираној количини пероксидазе у односу на индукциони период који се добија уз исту концентрацију аскорбинске киселине без присутног ретинола. Са друге стране почетна брзина оксидације косупстрата уз одређену количину ретинол-ацетата, бива умањена присуством аскорбинске киселине у мери која је еквивалентна смањеној количини водоник-пероксида.

Другим речима, не постоје две различите смеше аскорбинске киселине и ретинол-ацетата које исказују идентичне, индукциони период и почетну брзину оксидације косупстрата.

На овај начин је могуће успешно одредити у ком се односу налазе аскорбинска киселина и ретинол-ацетат, када се њихове концентрације леже у опсегу од 0,4 до 50 μmol/L, за аскорбат и од 10 до 200 kU/L, за ретинол.

- Михаелисове константе (K_M) израчунате за реакцијски систем који не укључује аскорбинску киселину и ретинол-ацетат, добијене линеаризацијом по Лајнвиверу и Барку за косупстрате о-толидин и бензидин износе редом, 0,137 и 0,114 mmol/L, док линеаризацијом по Едију и Хофстију оне износе 0,15 и 0,117 mmol/L.

Максималне брзине (V_{max}) за овај систем за о-толидин, односно бензидин износе 5,5 и 3,7 mmol/Ls на основу линеаризације по Лајнививеру и Барку, тј. према Едију и Хофстију 12,0 и 7,7; респективно.

- Михаелисова константа за реакцијски систем који укључује ретинол-ацетат уз бензидин као косупстрат према Лајнививеру и Барку износи 0,130 mmol/L, док на основу линеаризације по Едију и Хофстију износи 0,124 mmol/L. Према Диксону, константа инхибиције (K_I) за овај систем износи 98,5 kU/L.
- Увођењем и витамина С у реакцијски систем K_I се није променила, па је износила 98,5 kU/L. K_M за овај систем се привидно изменила (0,22 mmol/L), што је узроковано смањењем концентрације водоник-пероксида услед присуства аскорбинске киселине.
- Присуство страних супстанци, попут неорганских стабилизатора и металних јона (Fe^{2+} и Zn^{2+}) знатно утичу на одређивање ових витамина, док утицај глукозе и токоферол-ацетата није забележен.
- Како ензим пероксидаза првенствено учествује у регулисању ендогеног водоник-пероксида, њена инхибиција ретинол-ацетатом изазвана евентуалном, неконтролисаном употребом дизбалансираних суплемената, би могла због повећања нивоа водоник-пероксида допринети нарушавању хомеостазе ћелије, додатно оптеретити ензим пероксидазу и потенцијално увеси ћелију у оксидативни стрес.

6. Литратура

1. M. Đukić, M. Ninković, M. Jovanović, *Journal of Medical Biochemistry*, **27(4)**, (2008) 409-425.
2. K. J. A. Davies, *IUBMB Life*, **50**, (2000) 279-289.
3. F. Yun-Zhong, Y. Sheng, W. Guoyao, *Nutrition*, **18**, (2002) 872-879.
4. M. N. Diaz, B. Frei, J. A. Vita, J. F. Keaney, *N. Engl. J. Med.*, **337**, (1997) 408-416.
5. W. Droge, *Physiol. Rev.*, **82**, (2002) 47-95.
6. T. Finkel, N. J. Holbrook, *Nature*, **408**, (2000) 239-247.
7. H. Sies, W. Stahl, *Am. J. Clitz. Nuir.*,**62**(suppl), (1995) 1315S-1321S.
8. B. Halliwell, *Free Radical Research Communications*, **9**, (1990) 1-32.
9. C. Kaur, H. C. Kapoor, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **36**, (2001) 703-725.
10. G. Cao, H. Alessio, R. Cutler, *Free Radic Biol Med*, **14(3)**, (1993) 303-311.
11. B. Ou, M. Hampsch-Woodill, R. Prior, *J. Agric. Food Chem.*, **49(10)**, (2001) 4619–4626.
12. R. Re, N. Pellegrini, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, *Free Radical Biol. Med.*, **26**, (1999) 1231-1237.
13. R. L. Prior, H. Hoang, L. Gu, X. Wu, M. Bacchiocca, L. Howard, M. Hampsch-Woodill, D. Huang, B. Ou, R. Jacob, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, (2003) 3273-3279.
14. D. Huang, B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J. A. Flanagan, E. K. Deemer, *J. Agric. Food Chem.*, ***50***, (2002) 1815-1821.
15. W. Xianli, L. Gu, J. Holden, D. B. Haytowitz, S. E. Gebhardt, G. Beecher, R. L. Ronald, L. Prior, *J. Food Compost. Anal*., **17**, (2004) 407-422.
16. K. Weller, *Agricultural Research*, **2**, (1999) 15-17.
17. Nutrient Data Laboratory, Agriculture Research Service, US Department of Agriculture, *Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of Selected Foods* (2007).
18. www.oracvalues.com.
19. G. Cao, S. L. Booth, J. A. Sadowski, R. L. Prior, *Am. J. Clin. Nutr.*, **68(5)**, (1998) 1081-1087.

20. G. Cao, R. M. Russell, N. Lischner, R. L. Prior, *J. Nutr*., **128(12)**, (1998) 2383-2390.
21. A. G. Schauss, X. Wu, R. L. Prior, B. Ou, D. Huang, J. Owens, A. Agarwal, G. S. Jensen, A. N. Hart, E. Shanbrom, *J. Agric. Food Chem.*, **54 (22)**, (2006) 8604-8610.
22. B. Ou, M. Hampsch-Woodill, J. Flanagan, E. K. Deemer, R. L. Prior, D. Huang, *J.Agric. Food Chem.*, **50**, (2002) 2772-2777.
23. H. Chung, H. Choi, H. Park, J. Choi, W. Choi, *J. Agric. Food Chem*., **49**, (2001) 3614-3621.
24. R. J. Williams, J. P. Spencer, C. Rice-Evans, *Free Radical Biology & Medicine*, **36 (7)**, (2004) 838–849.
25. I. C. Arts, P.C. Hollman, *American Journal Clinical Nutrition*, **81** (1 Suppl) (2005) 317S-325S.
26. S. B. Lotito, B. Frei, *Free Radic. Biol. Med*., **41(12)**, (2006) 1727–1746.
27. "Withdrawn: Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2 (2010)". USDA, Agricultural Research Service. 16 May 2012.
28. National Nutrient Database. Nutrient Data Laboratory of the US Agricultural Research Service.
29. J. C. Brand, C. Rae, J. McDonnell, A. Lee, V. Cherikoff, A. S. Truswell, *Food Technology in Australia*, **35(6)**, (1987) 293-296.
30. A. L.Vendramini, L. C. Trugo, *Food Chemistry*, **71(2)**, (2000) 195–198.
31. D. J. Prockop, K. I. Kivirikko, *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, (1995) 403–34.
32. B. Peterkofsky, *Am. J. Clin. Nutr.*,**54**(6 Suppl), (1991) 1135S–1140S.
33. C. J. Rebouche, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **54**(6 Suppl) (1991) 1147S–1152S.
34. M. Levine, K. R. Dhariwal, P. Washko, *J Nutr Sci Vitaminol.*, Spec No., (1992) 169–72.
35. S. J. Padayatty, A. Katz, Y. Wang, P. Eck, O. Kwon, J. Lee, S. Chen, C. Corpe, A.Dutta, *Journal of the American College of Nutrition*, **22(1)**, (2003) 18–35.
36. B. Halliwell, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **475(1–2)**, (2001) 29–35.
37. C. Kónya, P. Ferdinandy, *Br. J. Pharmacol.*, **147(2)**, (2006) 125–127.
38. A. C. Carr, B. Frei, *American Journal of Clinical Nutrition*, **69(6)**, (1999) 1086-1107.
39. K. Milton, *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **136(1)**, (2003) 47–59.
40. K. Satoh, H. Sakagami, *Anticancer research*, **17(2A)**, (1997) 1125–1129.
41. A. Meiste, *The Journal of biological chemistry*, **269(13)**, (1994) 9397–9400.

42. E. Gibbonsa, M. C. Allwooda, T. Nealb, G. Hardyc, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **25**,(2001) 605–611.

43. R. W. Welch, Y. Wang, A. Crossman, J. B. Park, K. L. Kirk, M. Levine, *J. Biol. Chem*., **270(21)**, (1995) 12584-12592.

44. M. Nishikimi, *Biochem Biophys Res Commun*, **63**, (1975) 463-468.

45. R. S. Bodannes, P. C. Chan, *FEBS Lett.*, **105**, (1979) 195-196.

46. D. E. Cabelli, B. H. J. Bielski, *I Phys. Chem*., **87**, (1983) 1809-1812.

47. A. Bendich, U. Machim, O. Scandurra, G. W. Burton, D. D. M. Wayner, *Adv. Free Radi.c Biol. Med*.,**2**, (1986) 419-444.

48. B. Halliwell, M. Wasil, M. Grootveld, *FEBS Lett*., **213**, (1987) 15-18.

49. M. C. Vieira, A. A. Teixeira, C. L. M. Silva, *Journal of Food Engineering*, **43(1)**, (2000) Pages 1–7.

50. I. Van der Broeck, L. Ludikhuyze, C. Weemaes, A. Van Loey, M. Hendricks, *Process optimisation and minimal processing of foods*, **4**, (1998) 12-17.

51. M. W. Davey, M. V. Montagu, D. Inzé, M. Sanmartin, A. Kanellis, N. Smirnoff, I. J. Benzie, J. J. Strain, D. Favell, J. Fletcher, *J. Sci. Food Agric*., **80,** (2000) 825–860.

52. M. Џамић, Практикум из Биохемије (1982) 497-530.

53. M. G. Roig, Z. S. Rivera, J. F. Kennedy, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **46(2)**, (1995) 107–115.

54. G. F. Combs, The Vitamins, Fundamental Aspects in Nutrition and Health (2nd ed.). San Diego, CA: Academic Press. (2001) 245–272.

55. Indian Pharmacopoeia, Photolithio Press, Faridabad, (1985) p. 49.

56. S.P. Arya , M. Mahajan, P. Jain, *Analytica Chimica Acta*, **417** (2000) 1–14.

57. K. K. Verma, A. Jain, R. Rawat, *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, **67(2)**, (1984) 262-265.

58. W. Zhou, M. Ji, Z. Mao, *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, **25**, (1990) 95.

59. M. Sarwar, Z. Iqbal, S. Zaidi, *Mikrochim. Acta (Wien)*, **2**, (1975) 699.

60. K. G. Kumar, P. Indrasenan, *Talanta*, **37**, (1990) 269.

61. H. P. Tarasiewicz, M. Tarasiewicz, N. Omieljaniuk, Z. Fresenius. *Anal. Chem.*, **303**, (1980) 412.

62. F. Salinas, F. G. Sanchez, C. Genestar, *Afindad*, **39**, (1982) 261.

63. P. V. Ramana, K. M. Rao, N. V. Rao, *J. Ind. Chem. Soc.*, **57**, (1980) 235.

64. N. V. Rao, C. K. Shastri, *J. Inst. Chem.*, **59**, (1987) 155.

65. K. K. Verma, *Talanta*, **29**, (1982) 41.

66. A. Sirivastava, S. K. Singh, *Analyst*, **113**, (1988) 259.
67. D. Gupta, P.D. Sharma, V.K. Gupta, *Talanta*, **22**, (1975) 913.
68. S. Shahine, *Mikrochim. Acta*, **1**, (1980) 123.
69. N. K. Murty, K. R. Rao, *J. Ind. Chem. Soc.*, **53**, (1976) 532.
70. G. G. Rao, G. S. Sastry, *Anal. Chim. Acta*, **56**, (1971) 325.
71. G. M. Skuridin, *Prom. Obraztsy Tovarnye Zanaki*, **45**, (1980) 192.
72. N. Rukmini, et al., *Int. Ser. Excerpta Med.*, **991**, (1992) 181.
73. P. Branca, *Boll. Chim. Unione Ital. Lub. Prov. Parte Sci.*, **6**, (1980) 143.
74. F. Sahbaz, G. Somer, *Food Chem.*, **44**, (1992) 141.
75. R. Barbera, R. Farre, M. J. Legarda, R. Pintor, *Alimentaria*, **247**, (1993) 89.
76. R. M. Issa, F.M. Abdel-Gawad, F.A. Aly, A. M. El-Shinawi, *J. Drug Res.*, **15**, (1984) 133.
77. C. Ratzkowski, J. Korol, *Can. Inst. Food Sci.Technol*., **10**, (1977) 215.
78 J. A. Rodrigues, P. Miranda, A. A. Barros, *Port. Electrochim. Acta*,**11**, (1993) 41.
79. S. J. Melnolasina, O. Perez Marquez, M. C. Martinez, J. Marquez, *Lebro Mem — Enuentro Nac. Electroquim.*, **4**, (1991) 297.
80. P. M. Korash, A. G. Eving, R. L. Wilson, R. M. Wightman, *J. Neurosci. Methods*, **10**, (1984) 215.
81. A. G. Fogg, A. M. Summan, *Analyst*, **108**, (1983) 691.
82. S. Kozar, et al., *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **329**, (1988) 760.
83. D. H. Carston, C. P. Jones, D. E. Williams, *Talanta*, **38**, (1991) 17.
84. M. Farrington, N. Jagota, J. M. Slater, *Analyst*, **119**, (1994) 233.
85. R. Sandulescu, R. Obrean, L. Roman, *Framacia*,**45**, (1997) 23.
86. M. H. Pournaghi-Azar, R. Ojani, *Talanta*, **44**, (1997) 297.
87. I. S. Vijaykumar, J. V. Priya, S. K. Ashwini, *Analytica Chimica Acta*, **439**, (2001) 291–297.
88. Y. S. Fung, S.Y. Mo, *Anal. Chim. Acta*, **261**, (1992) 375.
89. S. Uchiyama, Y. Umetsu, *Anal. Chim. Acta*, **255**, (1991) 53.
90. P. Riyazudin, J. Sankaran, *Chem. Environ. Res*., **2**, (1993) 87.
91. G. M. Greenway, P. Ongomo, *Analyst*, **115**, (1990) 1297.
92. K. Matsumoto, T. Tsukatani, S. Higuchi, *Sens. Mater*., **7**, (1995) 167.
93. L. E. León, *Talanta*, **43**, (1996) 1275.
94. M. Cheregi, A.F. Danet, *Anal. Lett*., **30**, (1997) 2625.
95. O. Friedrich, G. Sontag, F. Pittner, *Ernachrung*, **17**, (1993) 605.
96. T. A. K. Nasser, A. M. Al-Rikabi, T. T. Mansoor, *Anal. Lett*., **20**, (1987) 627.
97. A. Parczewski, *Acta Pol. Pharm*., **44**, (1987) 442.

98. S. Uchiyama, T. Yamaguchi, O. Hamamoto, S. Suzuki, *Bunseki Kagaku*, **38**, (1989) 286.

99. S. Uchiyama, Y. Haseba, S. Suzuki, *Electroanalysis*, **5**, (1993) 653.

100. M. Feng, J. Lu, Z. Zhang, S. Li, Y. Deng, *Fenxi Huaxue*, **23**, (1995) 70.

101. L. Wang, C. Zhu, G. Yang, J. Wu, H. Tong, S. Zhang, *Fenxi Huaxue*, **23**, (1995) 83.

102. H. Tang, Q. Luo, X. Yu, Y. Zeng, *Fenxi Huaxue*, **23**, (1995) 240.

103. J. M. Kim, Y. Huang, R. D. Schmid, *Anal. Lett*., **23**, (1990) 2273.

104. L. Wang, J. Wu, *Fenxi Shiyanshi*, **15**. (1996) 49.

105. Q. Ye, Z. Wanf, *Fenxi Huaxue*, **26**, (1998) 615.

106. A. Shen, B. Xu, M. Ji, J. Wu, *Fenxi Kexue Xuebao*, **13**,(1997) 347.

107. H. Chem, W. Qin, Z. Zhang, *Fenxi Huaxue*, **25**, (1997) 1079.

108. T. Perez-Ruiz, C. Martinez Lozano, A. Sanz, *Anal. Chim. Acta*, **308**, (1995) 299.

109. A. A. Ensafi, B. Rezaei, H. Movahedinia, *Spectrochimica Acta*, **58**, (2002), 2589–2594.

110. K. Güçlü, K. Sözgen, E. Tütem, M. Özyürek, R. Apak,*Talanta*, **65(5)**, (2005) 1226–1232.

111. M. Özyürek, K. Güçlü, B. Bektaşoğlu, R. Apak, *Analytica Chimica Acta*, **588(1)**, (2007) 88–95.

112. R. Q. Thompson, *Anal. Chem*., **59**, (1987), 1119-1121.

113. R. H. White-Stevens, *Clin. Chem*., **28(4)**, (1982), 578-588.

114. T. N. Shekhovtsova, S. V. Muginova, J. A. Luchinina, A. Z. Galimova, *Analytica Chimica Acta*, **573-574**, (2006) 125-132.

115. A. Jain, A. Chaurasia, K. K. Verma, *Talanta*, **42**, (1995) 779.

116. B. P. H. Schaffar, A. A. Dermal Bernad, R. D. Schmid, *GBF Monogr*., **13**, (1989) 229.

117. J. T. Vanderslice, D. J. Higgs, *J. Micronutr. Anal*., **6**, (1989) 109.

118. A. V. Pereira, O. Fatibello, *Anal. Chim. Acta*, **366**, (1998) 55.

119. J. C. B. Fernandes, G. de Oliveira Neto, L. T. Kubota, *Anal. Chim. Acta*, **366**, (1998) 11.

120. X. Shao, Y. Zhang, *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi*, **14**, (1994) 125.

121. Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 13th Edition, Washington, DC, (1980) 746–757.

122. N. Hongyong, P. Sanhe, *Yingyang Xuebao*, **6**, (1984) 293.

123. T. Iwata, S. Hara, M. Yamaguchi, M. Nakamura, Y. Ohkura, *Chem. Pharm. Bull*., **33**, (1985) 3499.

124. S. Weiquin, *Shipin Yu Fajiao Gongye*, **5**, (1986) 120.

125. H. Huang, R. Cai, Y. Du, Y. Zeng, *Anal. Chim. Acta*, **309**, (1995) 271.

126. J. Augustin, C. Beck, G.I. Marousek, *J. Food Sci*., **46**, (1981) 312.

127. A. W. Archer, V. R. Higgins, D. L. Perryman, *J. Assoc. Pub. Anal*., **18** (1990) 99.

128. M. Yoshida, T. Nishimune, K. Sureki, Korean, *J. Pharmacol*., **28**, (1992) 53.

129. M. Yoshida, *Osaka-furitsu Koshu Eisci Kenkyusho kenkyu Hokoku Shapuhin Eisci Hen*, **23**, (1992) 53.

130. G. M. Sapers, F. W. Dougles Jr., M. A. Ziolwski, R. I. Miller, K. B. Hicks, *J. Chromatogr*., **503**, (1990) 431.

131. D. B. Dennison, G. B. Troy, L. D. Hunter, *J. Agric. Food Chem*., **29**, (1981) 927.

132. H. Iwase, I. Ono, *J. Chromatogr. A*, **806**, (1998) 361.

133. D. A. Shell, A. M. Bode, *Biomed. Chromatogr*., **7,** (1993) 267.

134. A. Bognar, *Dtsch. Lebensm. Rundsch*., **84**, (1988) 73.

135. A. Bonomi, L. Lucchelli, A. Anglinetti, *Riv. Soc. Ital. Sci. Aliment*, **19**, (1990) 67.

136. J. Acar, V. Gokmen, *Fruit Process*, **6**, (1996) 198.

137. H. R. Kim, P. A. Seib, *J. Chromatogr. A*, **803**, (1998) 141.

138. Y. Miura, T. Maruyama, T. Koh, *Anal. Sci*., **11**, (1995) 617.

139. O. Philipp, B. Grosheny, H. D. Isengard, *Dtsch. Lebensm. Rundsch*., **92**, (1996) 13.

140. T. Watanabe, S. Murota, *Kobe Joshi Daigaku Kiyo*, **12**, (1981) 87.

141. V. Brandolini, F. Menziazi, S. Bader, M. Guarneri, *J. Cosmet. Sci*., **20**, (1998) 69.

142. K. Fukushi, S. Takeda, S. Wakida, M. Yamane, K. Higoshi, *J. Chromatogr. A*, **772**, (1997) 313.

143. G. G. Pinna, M. L. Ganadu, G. Crisponi, V. Murchi, *Asian J. Chem*., **6** (1994) 413.

144. M. I. Al-Ashimawi, M. F. Metwally, H. M. Saleh, O. A. Mansour, *Zhonghua Yaoxue Zazhi*, **43**, (1992) 359.

145. K. Satoh, Y. Ao, K. Asano, H. Sakagami, *Anticancer Res*., **17**, (1997) 3479.

146. B. Gonet, *Curr. Top. Biophys*., **18**, (1998) 202.

147. E. Niki, *Chem. Phys. Lipids*, **44**, (1987) 227-253.

148. I. M. Gebicki, G. Jurgens, H. Esterbauer, London: Academic Press, (1991) 371-397.

149. P. Lambelet, F. Saucy, I. Lolliger, *Experentia*, **41**, (1985) 13384-13388.

150. A. Ubaldi, G. Delbono, A. Fusari, P. Serventi, *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma*, **XXV**, (2005) 101-110.

151. D. L. Nelson, M. M. Cox, Principles of Biochemistry (4th ed.). New York: W. H. Freeman. (2005) ISBN 0-7167-4339-6.

152. I. R. Kanofsky, *Chem. Biol. Interact*, **70**, (1989) 1-28.

153. G. W. Burton, K. U. Ingold, *Science*, **224**, (1984) 569-573

154. P. Di Mascio, S. Kaiser, H. Sies, *Arch. Biochem. Biophy.*, **274**, (1989) 532-538.

155. P. Di Mascio, A. R. Sundquist, T. P. A. Devasagayam, *Methods Enzymol.*, **213**, (1991) 429-438.
156. E. Niki, N. Noguchi, H. Tsuchihashi, N.o Gotoh, *Am. J. Clin. Nutr.*, **62**(suppl), (1995) 1322S-1326S.
157. A. Sommer, *J. Nutr*., **138**, (2008) 1835-1839.
158. P. Lips, *N. Engl. J. Med*., **348(4)**, (2003) 1927–1928.
159. A. K. Mahlia, J. E. Smith,D. W.Goodman, *J. Lipid Res*., **16**, (1975) 180.
160. F. R. Smith, D. W. Goodman, *N. Engi. J. Med*., **294**, (1976) 805.
161. A. N. Nagapa, P. L. Kole, P. V. Pandi, K. Zeeyauddin, R. T. Patil, I. Shanmukha, J. *Colloid Interface Sci*., **271**, (2004) 416-418.
162. J. Hamzaha, T. M. E. Davisa, T. S. Skinner-Adamsa, J. Beilbyb, *Exp. Parasitol*., **107**, (2004) 136-144.
163. S. Futterman, J. Heller, *J. Biol. Chem*., **247**, (1972) 5168-5179.
164. H. P. Ciolino, Z. Dai, V. Neir, *J. Nutr. Biochem*., **22**, (2011) 522–526.
165. J. B. Neeld, A. N. Pearson, *J. Nutrition*, **79**, (1963) 454-462
166. A. Vahlquist, *J. Vitam. Nutr. Res*. **44**, (1974) 375.
167. M. G. M. DeRuyter, A. P. De Leenheer, *Clin. Chem*., **24(11)**, (1978) 1920-1923.
168. W. A. McCrehan, E. Schonberger, *Clin. Chem*., **33(9)**, (1987) 1585-1592.
169. J. L. Chavez-Servın, A. I. Castellote, M. C. Lopez-Sabater, *Journal of Chromatography A*, **1122**, (2006) 138–143.
170. B. Wen, D.J. Moore, *Drug Metab. Dispos*., **39**, (2011) 1511-1521.
171. I. Riikka, V. Loimaranta, J. Tenovuo, *Arch. Biochem. Biophys*., **445**, (2006) 261-268.
172. A. Scheeline, D. L. Olson, E. P. Williksen, G. A. Horras, *Chem. Rev*., **97**, (1997) 739–756.
173. R. Krieg, K. J. Halbhuber, Prog. *Histochem. Cytochem*., **45**, (2010) 81–139.
174. P. Limongi, M. Kjalke, J. Vind, J. W. Tams, T. Johansson, K. G. Welinder, *Eur. J. Biochem*., **227**, 270-276 (1995).
175. Ж. Б. Петронијевић, Општа и примењена ензимологија I, (2000) 221-223.
176. B. Mauiner, *Biochemie*, **69**, 3-9 (1987).
177. N. C. Veitch, *Phytochemistry*, **65**, (2004) 249–259.
178. R. Mittler, *Trends Plant Sci*., **7**, (2002) 405–410.
179. S. Shigeoka, T. Ishikawa, M. Tamoi, Y. Miyagawa, T. Takeda, Y. Yabuta, K. Yoshimura, *J. Exp. Biol*., **53**, (2002) 1305–1319.
180. N. A. Bagirova, T. N. Shekhovtsova, R. B. van Huystee, *Talanta*, **55**, (2001) 1151-1164.

181. В. А. Андреева, Фермент пероксидаза. Участие в зашитном механизме растений, Наука, Москва, 1988.
182. M. Filizola, G. H. Loew, *J. Am. Chem. Soc*., **122**, (2000) 18–25.
183. J. Hernandez-Ruiz, M. B. Arnao, A. N. P. Hiner, F. Garsia-Canovas, M. Acosta, *Biochem. J*., **345**, (2001) 107-114.
184. J. N. Rodriguez-Lopez, J. Hernandez-Ruiz, F. Garcia-Canovas, R. N. F. Thorneley, M. Acosta, M. B. Arnao, *J. Biol. Chem*., **272**, (1997) 5469–5476.
185. P. R. Ortiz de Montellano, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*., **32**, (1992) 89–107.
186. K. Kennedy, K. Alemany, M. Warith, *Water Research*, **28**, (2002)149–158.
187. M. A. Duarte-Vazquez, M. A. Ortega-Tovar, B. E. Garcia-Almendarez, C. Regalado, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **78**, (2003) 42–47.
188. E. Agostini, J. Hernandez-Ruiz, M. B. Arnao, S. R. Milrand, H. A. Tigier, M. Acosta, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **35**, (2002) 1–7.
189. S. V. Mohan, K. K. Prasad, N. C. Rao, P. N. Sarma, *Chemosphere*, **58**, (2005) 1097–1105.
190. J. Cheng, S. M. Yu, P. Zuo, *Water Research*, **40**, (2006) 283–290.
191. D. Fournier, A. Halasz, J. Spain, R. J. Spanggord, J. C. Bottaro, J. Hawari, *Applied Environmental Microbiology*, **70**, (2004)1123–1128.
192. V. T. Antonopoulos, M. Hernandez, M. E. Arias, E. Mavrakos, A. S. Ball, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57**, (2001) 92–97.
193. J. Z. Liu, T. L. Wang, T. L. Ji, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzyme*, **41**, (2006) 81–86.
194. S. M. A. G. U. De Souza, E. Forgiarini, A. A. U. De Souza, *Journal of Hazardous Materials*, **147**, (2007) 1073–1078.
195. Y. H. Kim, E. S. An, B. K. Song, D. S. Kim, R. Chelikani, *Biotechnology Letters*, **25**, (2003) 1521–1524.
196. W. Liu, J. Kumar, S. Tripathy, K. J. Senecal, L. Samuelson, *Journal of American Chemical Society*, **121**, (1999) 71–78.
197. I. Y. Sakharov, A. C. Vorobiev, J. J. C. Leon, *Enzyme Microbiology and Technology*, **33**, (2003) 661–667.
198. K. Iwahara, M. Hirata, Y. Honda, T. Watanabe, M. Kuwahara, *Biotechnology Letters*, **22**, (2000) 1351–1361.
199. E. M. Govere, M. Tonegawa, M. A. Bruns, E. F. Wheeler, P. H. Heinemann, K. B. Kephart, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **53**, (2005) 4880–4889.
200. E. M. Govere, M. Tonegawa, M. A. Bruns, E. F. Wheeler, K. B. Kephart, J. W. Voigt, *Bioresourse Technology*, **98**, (2007) 1191–1198.

201. J. B. Jia, B. Q. Wang, A. G. Wu, G. J. Cheng, Z. Li, S. J. Dong, *Analytical Chemistry*, **74**, (2002) 2217–2223.

202. F. D. Munteanu, A. Lindgren, J. Emneus, L. Gorton, T. Ruzgas, E. Csoregi, *Analytical Chemistry*, **70**, (1998) 2596–2600.

203. O. Kawamura, S. Sato, H. Kajii, S. Nagayma, K. Ohtani, J. Chiba, *Toxicoology*, **27**, (1989) 887–897.

204. V. V. Rogozin, T. V. Rogozina, *Biol. Bull*., **31**, (2004) 342-345.

205. F. Martinello, E. L. Da Silva, *Clinica Chemica Acta*, **373**, (2006) 108-116.

206. M. B. Arnao, C. Cano, J. Hernandez-Ruiz, F. Garcia-Canovas, M. Acosta, *Analytical Biohemistry*, **236**, (1996) 255-261.

207. A. G. Marangoni, Enzyme kinetics: A modern approach, John Willey & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2003.

208. S. A. Mohamed, K. O. Abulnaja, A. S. Ads, J. A. Khan, T. A. Kumosani, *Food Chem*., **128,** (2011) 725-730.

209. V. P. Pandey, U.N. Dwivedi, *J. Mol. Catal. B: Enzym*., **68**, (2011) 168-173.

210. В. Вајганд, Аналитика, Рад, Београд, 1986, 37.

211. Official Methods of Analysis of AOAC International, (1995) Chapter 45, Method 80, 16th ed.

212. K. J. Bayntona, J. K. Bewtrab, N. Biswasb, K. E.Taylora, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1206**, (1994) 272-278

213. Р. Кастори, М. Петровић, Ж. Станковић, Н. Петровић, Практикум из физиологије биља, Научна Књига, (1990) 125.

7. Списак слика и табела

7.1. Списак слика

Слика 16. Генерални механизам каталитичке активности пероксидазе (PR). AH i $A^{\bullet}$ представљају редуковани, односно оксидовани облик косупстрата (донора водоника).

Слика 17. Оксидационо-редукциони циклус пероксидазе рена.

Слика 18. Зависност почетне брзине ензимом катализоваане реакције од концентрације супстрата.

Слика 19. Лајнвивер-Барков дијаграм зависности реципрочних вредности, почетне брзине (1/*V*) од концентрације супстрата 1/[S].

Слика 20. Различити типови инхибиције на хипотетичку ензимску реакцију.

Слика 21. Компетитивна инхибиција. а) Лајнвивер-Барков график, б) Диксонов график.

Слика 22. Некомпетитивна инхибиција. а) Лајнвивер-Барков график, б) Диксонов график.

Слика 23. Парцијално компетитивна инхибиција ензима: а) Лајнвивер-Барков дијаграм, б) Диксонов дијаграм зависности.

Слика 24. Парцијално некомпетитивна инхибиција: а) Лајнвивер-Барков дијаграм, б) Диксонов дијаграм зависности.

Слика 25. Акомпетитивна инхибиција: а) Лајнвивер-Барков дијаграм, б) Диксонов дијаграм зависности.

Слика 26. Мешовита инхибиција. а) Лајнвивер-Барков дијаграм, б) Диксонов дијаграм зависности.

Слика 27. Трансформација аскорбинске киселине у дехидроаскорбинску киселину, у воденим растворима концентрација 0,1 (1); 1 (2) и 10 (3) mmol/L. Као растварач је употребљена дестилована вода 15 $\mu S/cm^2$. Константе брзина реакција износе 0,016; 0,025 и 0,038, а полувремена претварања 43,5; 28,4 и 18,3 h редом.

Слика 28. Зависност брзине трансформације аскорбинске киселине у дехидро-аскорбинску киселину од pH, без употребе стабилизирајућих супстанци.

Слика 29. Утицај метафосфорне киселине на брзину оксидације о-толидина и индукционо време приликом одређивања витамина С. Крива 1 приказује слепу пробу, без додатих супстанци. Крива 2 означава брзину оксидације у присуству $(HPO_3)_3$. Крива 3 представља брзину оксидације косупстрата у присуству $AscH_2$, након индукционог периода. Крива 4 приказује брзину оксидације у присуству аскорбинске и метафосфорне киселине. Услови: пероксидаза 10 U/L; о-толидин 0,5 mmol/L ; H_2O_2 5 mmol/L; $AscH_2$ 1 mmol/L; $(HPO_3)_3$ 2%; pH 5.

Слика 30. Формирање оксидационих продуката о-толидина (630 nm) и бензидина (410 nm), током разлагања водоник пероксида пероксидазом рена, при следећим условима реакције:

пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 1 mmol/L; еквимоларне количине о-толидина и бензидина 0,5 mmol/L; цитратни пуфер pH 6.

Слика 31. Утицај концентрације пероксидазе на брзину оксидације о-толидина. Услови реакције су: 1 mmol/L H_2O_2; *о*-толидин 0,5 mmol/L; пероксидаза 5 (1); 10 (2) и 20 (3) U/L. Релативне почетне брзине износе: 0,0080; 0,0042 и 0,0023 респективно.

Слика 32. Зависност брзине оксидације о-толидина (1) и бензидина (2) пероксидазом рена од концентрације водоник-пероксида. Услови реакције су: пероксиаза 10 U/L; о-толидин и бензидин у еквимоларним концентрацијама 1 mmol/L. Параметри уз о-толидин и бензидин су наведени редом: K_M = 0,137 mmol/L, Vmax = 5,5 mmol/Ls и K_M = 0,114 mmol/L, Vmax = 3,7 mmol/Ls.

Слика 33. Еди-Хофстијев дијаграм зависности за: (а) о-толидин, Vmax = 12 mmol/Ls; K_M = 0,1 mmol/L и (б) бензидин Vmax = 7,7 mmol/Ls; K_M = 0,1 mmol/L.

Слика 34. Ефекат аскорбинске киселине на кинетику пероксидазне реакције, праћен при следећим условима: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,1 mmol/L; о-толидин 1 mmol/L; цитратни пуфер pH 6; крива 1 означава слепу пробу, криве 2-6 $AscH_2$ концентрације 5; 10; 20; 30 и 50 μmol/L, редом. Коефицијенти правца кривих, занемарујући индукциони период, износе 0,0041 (1); 0,0040 (2); 0,037 (3); 0,0032 (4); 0,0029 (5) и 0,0021 (6) (в. сл. 48).

Слика 35. Зависност индукционог периода од концентрације аскорбинске киселине, праћено при следећим условима: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,1 mmol/L; о-толидин 0,5 mmol/L; цитратни пуфер pH 6.

Слика 36. Утицај концентрације ензима на реципрочну вредност индукционог периода, при различитим концентрацијама аскорбинске киселине. Услови реакције: H_2O_2 2 mmol/L; о-толидин 0,5 mmol/L; цитратни пуфер pH 6, $AscH_2$ 5 μmol/L (1); 20 μmol/L (2) и 50 μmol/L (3).

Слика 37. Зависност индукционог периода од концентрације водоник-пероксида, при различитим концентрацијама ензима. Услови реакције: пероксидаза 5 (1), 10 (2), 20 (3), 30 (4) U/L; о-толидин 0,5 mmol/L; аскорбинска киселина 0,1 mmol/L; цитратни пуфер pH 6.

Слика 38. Зависност индукционог периода од коцентрације водоник-пероксида, при различитим концентрацијама аскорбинске киселине. Услови реакције: пероксидаза 10 U/L; о-толидин 0,5 mmol/L; аскорбинска киселина 0,1 (1); 0,4 (2); 1 (3) и 4 (4) mmol/L; цитратни пуфер pH 6.

Слика 39. Зависност индукционог периода од инверзних вредности коцентрације водоник-пероксида. Услови реакције: пероксидаза 10 U/L; о-толидин 0,5 mmol/L; аскорбинска киселина 0,4 (1); 0,8 (2); 2 (3); 4 (4); 10 (5) и 20 (6) μmol/L; цитратни пуфер pH 6.

Слика 40. Калибрационе праве за одређивање аскорбинске киселине при различитим концентрацијама водоник-пероксида. Услови реакције: пероксидаза 10 U/L; о-толидин 0,5 mmol/L; водоник-пероксид 0,1 (1) и 2 (2) mmol/L.

Слика 41. Утицај концентрације косупстрата бензидина (1) и о-толидина (2) на идукциони период. Услови реакције су: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 1 mmol/L; аскорбинска киселина 0,1 mmol/L; цитратни пуфер pH 6.

Слика 42. Интензитет апсорбанције оксидованог облика о-толидина при различитим концентрацијама. Услови реакције су: о-толидин 0,05 (1); 0,1 (2); 0,2 (3); 0,5 (4) и 1 (5) mmol/L; периксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,1 mmol/L; цитратни пуфер pH 6.

Слика 43. Утицај pH средине на активност пероксидазе у функцији концентрација водоник-пероксида и аскорбинске киселине у присуству о-толидина (а) и бензидина (б), као косупстрата. Услови реакције: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,1 mmol/L; о-толидин 0,5 mmol/L; аскорбинска киселина од 10 (1); 20 (2); 30 (3) и 50 (4) μmol/L.

Слика 44. Калибрационе праве за одређивање аскорбинске киселине у опсегу од 0,4 до 50 μmol/L при одговарајућим концентацијама супстрата (H_2O_2) и следећим условима одређивања: пероксидаза 10 U/L; еквимоларне количине о-толидина (1) и бензидина (2) 0,5 mmol/L и цитратни пуфер pH 5.

Слика 45. Калибрационе праве за одређивање аскорбинске киселине у опсегу од 0,4 до 50 μmol/L при одговарајућим концентацијама супстрата (H_2O_2) и следећим условима одређивања: пероксидаза 10 U/L; еквимоларне количине о-толидина (1) и бензидина (2) 0,5 mmol/L и цитратни пуфер pH 6.

Слика 46. Калибрационе праве за одређивање аскорбинске киселине у опсегу од 0,4 до 50 μmol/L при одговарајућим концентацијама супстрата (H_2O_2) и следећим условима одређивања: пероксидаза 10 U/L; еквимоларне количине о-толидина (1) и бензидина (2) 0,5 mmol/L и цитратни пуфер pH 7.

Слика 47. Калибрационе праве за одређивање аскорбинске киселине у опсегу од 0,4 до 50 μmol/L при одговарајућим концентацијама супстрата (H_2O_2) и следећим условима одређивања: пероксидаза 10 U/L; еквимоларне количине о-толидина (1) и бензидина (2) 0,5 mmol/L и цитратни пуфер pH 8.

Слика 48. Зависност реципрочних вредности почетних брзина реакције од концентрације аскорбинске киселине. Услови реакције: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,1 mmol/L; о-толидин 1 mmol/L; цитратни пуфер pH 6.

Слика 49. Утицај ретинол-ацетата на брзину оксидације о-толидина пероксидазом рена. Услови реакције: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,1 mmol/L; о-толидин 0,5 mmol/L; крива 1 означава слепу пробу, док се криве од 2 до 5 односе на ретинол-ацетат додат у концентрацијама 10, 50; 100 и 200 U/ml, редом. Релативне почетне брзине, изражене као tgα, износе: 0,0041 (1); 0,0034 (2); 0,003 (3); 0,002 (4) и 0,0015 (5).

Слика 50. Утицај концентрације пероксидазе на брзину оксидације косупстрата о-толидина у присуству ретинол-ацетата. Услови реакције: пероксидаза 5 (1); 10 (2) и 20 (3) U/L; H_2O_2 1 mmol/L; о-толидин 0,5 mmol/L; pH 6.

Слика 51. Лајнвивер-Барков дијаграм зависности реципрочних вредности почетне брзине од реципрочних вредности водоник-пероксида у присуству ретинол-ацетата 10 (1); 50 (2); 100 (3) U/ml. Остали услови: пероксидаза 10 U/L; о-толидин 0,5 mmol/L; pH 6. K_M износи 0,13±0,01 mmol/L.

Слика 52. Диксонов дијаграм зависности реципрочне вредности почетне брзине реакције од концентрације ретинол-ацетата. Услови рекције: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,2 (1); 0,5 (2); 0,1 (3) и 2(4) mmol/L; о-толидин 0,5 mmol/L; pH 6. K_I износи 98,5±5,0 U/ml. Коефицијент корелације R је свуда износио преко 0,99.

Слика 53. Зависност реципрочних врености максималних брзина (добијених на основу Еди-Хофстијевих дијаграма) од концентрације ретинола.

Слика 54. Утицај ретинол-ацетата на брзину оксдације о-толидина и индукциони период у присуству аскорбинске киселине. Услови реакције: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,02 mmol/L; о-толидин 0,5 mmol/L; аскорбинска киселина 0,01 mmol/L; крива 1 представља слепу пробу (без витамина), а криве (2-5) ретинол-ацетат додат у концентрацијама 0; 10; 50 и 100 U/ml, редом. Релативне почетне брзине изражене као $tg\alpha \cdot 10^{-4}$ износе: 8,2 (1); 4,3 (2); 3,6 (3); 3,2 (4) i 2,3 (4).

Слика 55. Утицај аскорбинске киселине на брзину оксидације о-толидина у присуству ретинол-ацетата. Услови реакције: пероксидаза 10 U/L; водоник-пероксид 0,1 mmol/L; о-толидин 0,5 mmol/L; pH 6; слепа проба (без витамина) (1); ретинол ацетат 50 U/L (2); ретинол-ацетат и аскорбинска киселина 10 (3); 20 (4); 30 (5); 50 (6) μmol/L. Релативне почетне брзине изражене као $tg\alpha \cdot 10^{-4}$ износе: 41,0 (1); 28,5 (2); 27,6 (3); 22,0 (4); 21,1 (5) и 14 (6).

Слика 56. Зависност релативне почетне брзине од концентрације ретинол-ацетата, без (1) и у присуству аскорбинске киселине (2-4). Услови реакције: пероксидаза 10 U/L; H_2O_2 0,1 mmol/L; о-толидин 0,5 mmol/L; крива 1 представља слепу пробу, а криве од 2 до 4, акорбинску киселину 10; 20 и 50 μmol/L, редом.

Слика 57. Лајнвивер-Барков дијаграм зависности реципрочних вредности почетне брзине од реципрочних вредности водоник-пероксида у присуству ретинол-ацетата и константну

7.2. Списак табела

Табела 8. Садржај аскорбинске киселине у присуству различитих стабилизирајућих супстанци током 96 сати (изражено у % од почетне концентрације $AscH_2$ 1 mmol/L).

Табела 9. Утицај стабилизирајућих супстанци на константе брзине претварања и полувремена претварања аскорбинске у дехидроаскорбинску киселину праћено стандарном и кинетичком метотом.

Табела 10. Утицај страних супстанци на одређивање садржаја аскорбинске киселине (1 mmol/L = 176,1 mg/L) у односу на слепу пробу изражено у процентима. РСС представља разблажење стране супстанце.

Табела 11. Садржај аскорбинске киселине (mg) у различитим препаратима, добијен применом ензимске методе, уз косупстрате о-толидин и бензидин и при pH 6 и 8.

Табела 12. Садржај ретинол-ацетата у узорку сировинске компоненте.

Табела 13а. Детерминациона матрица за одређивње аскорбинске киселине (0,4-50 μmol/L) и ретинол-ацетата (10-50 kU/L) у смеши.

Табела 13б. Детерминациона матрица за одређивње аскорбинске киселине (0,4-50 μmol/L) и ретинол-ацетата (75-500 kU/L) у смеши.

Табела 14. Садржај витамина А и С у препаратима и детерминација њиховог односа симултаном методом.

Биографија

Владан Ђурић је рођен 14. 12. 1963. године у Приштини. Основну школу је завршио у Приштини, а средњу школу у Нишу. На студијској групи за хемију, Филозофског факултета у Нишу, дипломирао је 1991. године.

Магистарску тезу под насловом „Класификација протеинских аминокиселина у релацији са позицијом нуклеотидних база у кодонима“, је одбранио 2000. године на истом факултету, на Органско-биохемијском смеру.

Од 1993. године ради, на Пољопривредном факултету у Приштини. Тренутно је у звању асистента на предметима Органска хемија и Биохемија.

Списак радова и саопштења

Радови у међународном часопису – M23

i. **Đurić Vladan R**., Deletić Nebojša R., Stankov-Jovanović Vesna P., Simonović Ranko M., (2013): Inhibitory effect of retinol acetate on horseradish peroxidase., Hem. Ind. 67 (3) 419-426.

ii. Deletić N., S. Stojković, S. Gudžić, **V. Djurić**, and M. Aksić, (2012): Genotypic specificity of some winter wheat traits and their effect on grain yield. Genetika, Vol. 44(2): 251-258.

iii. Stojkovic S., N. Deletic, M. Aksic, D. Bekovic and **V. Djuric**, (2012): Variability parameters for yield components of different progeny types in an F maize population. Genetika, Vol 44(3): 441-448.

Радови саопштени на међународном скупу, штампани у целини–M33

iv. **Djurić, V**., Deletić, N., Stojković, S., Drašković, N., S. Stanković (2013): Stabilization of L-ascorbic acid waret solutions during its determination by horseradish peroxidase. Proceedings of the Fourth International Conference „Research People and Actual Tasks on Multidisciplinary Sciences“, Lozenec, Bulgaria, 12-16 June 2013, Vol. 2, 1-5.

v. Gudžić, N., Aksić, M., Gudžić, S., Deletić, N., **Djurić, V**., Stojković, S. (2011): Content of available iron and manganese of pseudogley in mid river part of Western Morava basin.

Proceedings of the Third International Conference „Research People and Actual Tasks on Multidisciplinary Sciences“, Lozenec, Bulgaria, 8-10 June 2011, Vol. 3, 301-305.

Радови саопштени на скупу међународног значаја, штампани у изводу - М34

vi. Radojković, I., Ćirić, I., Mitić, V., Ilić, M., **Đurić, V**., Stankov Jovanović, V (2010) Antioksidativne osobine pojedinih vrsta povrća, 10th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring regions, Vlasina, Book of Abstract, p. 96

vii. M. Ilić, V. Mitić, S. Nikolić- Mandić, **V. Đurić**, V. Stankov Jovanović, (2011) Determination of heavy metals in horseradish (Aromatika rusticana) and carrot (Daucus carota) from different locations, Euroanalysis 2011, 16th European Conference on Analytical Chemistry, „Challenges in Modern Analytical Chemistry“, Belgrade, Serbia EN36, session B

Радови у водећем часопису националног значаја –М51

viii. **Ђурић, В**., Делетић, Н., Станков-Јовановић, В., Стојковић, С. (2010): Присуство појединих тешких метала и микроелемената у коренастом поврћу на подручју југоисточне Србије. Агрознање, 11(4):149-157.

ix. Deletić, N., Stojković, S., **Đurić, V**., Biberdžić, M., Gudžić, S. (2010): Genotypic specificity of winter wheat nitrogen accumulation on an acid soil. Research Journal of Agricultural Science, Timisoara, Romania, 42(1):71-75.

x. Stojković, S., Deletić, N., **Đurić, V**., Biberdžić, M., Gudžić, S. (2010): Genetic and phenotypic variability of yield components in an F3 maize population. Research Journal of Agricultural Science, Timisoara, Romania. 42(2):297-301.

xi. Deletić, N., Stojković S., **Đurić, V**., Biberdžić, M. (2005): Individual and joint effect of yield components to grain yield in two maize synthetic populations. Scientifical papers of the Faculty of Agriculture, Timisoara, Romania, 37:13-18.

xii. Deletić, N., Stojković, S., **Đurić, V**., Gudžić, S., Biberdžić, M. (2005): The effect of a high selection intensity on the change of maize yield components’ additive variance. Genetika, 37(1):71-76.

xiii. Стојковић, С., Делетић, Н., **Ђурић, В**. (2006): Концентрација азота у биљци као индикатор продуктивности сората пшенице. Селекција и семенарство, 12(3-4):29-33.

xiv. Делетић, Н., Стојковић, С., **Ђурић, В**. (2006): Утицај компоненти приноса на принос зрна у различитим циклусима рекурентне селекције кукуруза. Селекција и семенарство, 12(3-4):21-27.

Радови саопштени на скупу националног значаја, штампани у целини -М63

xv. **Ђурић, В**., Станков-Јовановић, В., Делетић, Н., Стојковић, С. (2009): Садржај појединих тешких метала у коренастом поврћу. Зборник радова првог симпозијума са међународним учешћем „Пољопривреда, локални развој и туризам“, Врњачка Бања 21-23.12. 2009., 46-52.

xvi. **Ђурић, В**., Станков-Јовановић, В., Делетић, Н. (2010): Токсични елементи у коренастом поврћу у домаћинствима југоисточне Србије. Зборник радова XV саветовања о биотехнологији, Чачак 26-27.03.2010., 15(16):245-250.

xvii. Делетић, Н.,Стојковић, С., Гуџић, С., **Ђурић, В**. (2009): Вредности адитивне варијансе компоненти приноса кукуруза након три циклуса селекције високог интензитета. Зборник радова првог симпозијума са међународним учешћем „Пољопривреда, локални развој и туризам“, Врњачка Бања 21-23.12.2009., 18-23.

Радови саопштени на скупу националног значаја, штампани у изводу-М64

xviii. **Vladan R. Đurić**, Miloje M. Rakočević (1999): Aminokiselinski redosled iz dveju mutacionih matrica. 6. Jugoslovenski simpozijum biohemije, Beograd 15-17. 10. 1999. 13.

xix. Делетић, Н., **Ђурић, В**., Гуџић, Н. (2000): Генетска и фенотипска варијабилност приноса зрна и висине биљке код две синтетичке популације кукуруза. Зборник извода радова са III ЈУСЕМ-а. (Abstracts of 3rd JUSEM) Златибор, 28.05.-1.06.2000., 33.

xx. Делетић, Н., Стојковић, С., Гуџић, С., **Ђурић, В**., Аксић М. (2011): Генотипска специфичност неких својстава озиме пшенице и њихов утицај на принос. Зборник апстраката IV симпозијума Секције за оплемењивање организама Друштва генетичара Србије, Кладово 2-6.10.2011., 25.

xxi. Стојковић, С., Делетић, Н., Аксић М., Бековић, Д., **Ђурић, В**. (2011): Параметри варијабилности компоненти приноса код различитих типова потомстава једне F3 популације кукуруза. Зборник апстраката IV симпозијума Секције за оплемењивање организама Друштва генетичара Србије, Кладово 2-6.10.2011., 36.

Радови објављени из области докторске дисертације

Đurić Vladan R., Deletić Nebojša R., Stankov-Jovanović Vesna P., Simonović Ranko M., (2013): Inhibitory effect of retinol acetate on horseradish peroxidase., Hem. Ind. 67 (3) 419-426.

Djurić, V., Deletić, N., Stojković, S., Drašković, N., S. Stanković (2013): Stabilization of L-ascorbic acid waret solutions during its determination by horseradish peroxidase. Proceedings of the Fourth International Conference „Research People and Actual Tasks on Multidisciplinary Sciences", Lozenec, Bulgaria, 12-16 June 2013, Vol. 2, 1-5.