

# Analitičke metode za određivanje vitamina C u kozmetičkim proizvodima

---

Vukadinović, Nina

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:144752>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Nina Vukadinović

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **ANALITIČKE METODE ZA ODREĐIVANJE VITAMINA C U KOZMETIČKIM PROIZVODIMA**

## **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Zagreb, 2022.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

26. srpnja 2022.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

23. rujna 2022.

Mentor rada: prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Potpis:



## Sadržaj

|                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------|-----|
| § SAŽETAK.....                                               | VII |
| § 1. UVOD.....                                               | 3   |
| § 2. VITAMIN C .....                                         | 4   |
| 2.1. Općenito o vitaminu C.....                              | 4   |
| 2.2. Struktura i svojstva.....                               | 4   |
| § 3. KOZMETIČKA FORMULACIJA I STABILNOST .....               | 6   |
| 3.1. Zakonska i pravna regulativa .....                      | 7   |
| § 4. ANALITIČKE METODE.....                                  | 8   |
| 4.1. Kromatografske metode .....                             | 8   |
| 4.1.1. Uvod u kromatografske metode .....                    | 8   |
| 4.1.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ..... | 9   |
| 4.2. Spektroskopske metode .....                             | 11  |
| 4.3. Elektrokemijske metode .....                            | 14  |
| 4.3.1. Voltometrija .....                                    | 14  |
| 4.3.2. Potenciometrija.....                                  | 16  |
| § 5. ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA.....                           | 17  |
| § 6. ZAKLJUČAK .....                                         | 19  |
| § 7. LITERATURNI IZVORI.....                                 | XX  |



## § Sažetak

Vitamin C (L-askorbinska kiselina) je vitamin topljiv u vodi koji se koristi u dermatologiji zbog svojih antioksidativnih svojstava. Služi za sprječavanje i tretiranje promjena nastalih zbog fotostarenja kože i hiperpigmentacija. Reagira s kisikovim reaktivnim vrstama sprječavajući procese koji utječu na starenje kože. Askorbinska kiselina je povezana s raznim metaboličkim procesima i kao takva je ključna za razvoj i održavanje pa ju ljudi često konzumiraju putem prehrane ili vitaminskih suplemenata.

U kozmetičkim proizvodima askorbinska kiselina koristi se kao aktivni sastojak koji pomaže održavati kožu mladolikom i zdravom. Iako kao sastojak sadrži mnoge prednosti, njegov dodatak u kozmetičke proizvode je ograničen zbog nestabilnosti u vodenom mediju u kojem se može pretvoriti u svoj neaktivni oblik što je vidljivo promjenom boje i smanjenjem učinka na kožu. Postoje različite analitičke metode pomoću kojih se može odrediti prisutnost vitamina C i njegovih derivata, a izbor metode ovisi o uzorku koji se analizira, prije svega o njegovoj složenosti za analizu te koncentraciji samog vitamina.

Svrha ovog rada je dati pregled najvažnijih analitičkih metoda za određivanje vitamina C u kozmetičkim proizvodima.

## § 1. UVOD

Vitamini su skupina organskih spojeva koja se međusobno razlikuju po strukturi, biološkoj aktivnosti i fizikalno-kemijskim svojstvima te prema tome obavljaju različite uloge. Mogu se podijeliti na vitamine topljive u vodi (vitamini skupine B i vitamin C) i one topljive u mastima (vitamini A, D, E i K).

Zbog različitih uloga i nedostatka pojedinih vitamina u tijelu, vitamini se koriste i kao aktivni sastojci u različitim proizvodima, a osobito je čest dodatak u kozmetičkim proizvodima. Kozmetički proizvod je svaka tvar ili smjesa tvari koja je namijenjena dodiru s vanjskim dijelovima ljudskog tijela (koža, kosa i vlasište, nokti, usnice i vanjski spolni organi) ili sa zubima i sluznicom usne šupljine isključivo ili prvenstveno radi njihova čišćenja, parfimiranja, i/ili zaštite i održavanja u dobrom stanju, mijenjanja njihova izgleda i/ili korekcije tjelesnih mirisa.<sup>1</sup>

Vitamin C je prirodni antioksidans koji djeluje kao enzimski kofaktor u ljudskom tijelu tako što sudjeluje u oksidacijsko-redukcijskim procesima koji povećavaju apsorpciju željeza i neutralizaciju slobodnih radikala. Kada se primjenjuje direktno na kožu, smanjuje upalne procese nastale kao posljedica izlaganja suncu. Zbog nedostatka enzima L-glukono-gama-lakton-oksidaze, čovjek ne može sintetizirati vitamin C, stoga je vrlo važno dobivati vitamin iz vanjskih izvora poput suplemenata ili kozmetičkih proizvoda.<sup>2</sup>

Za određivanje vitamina C u kozmetičkim proizvodima koriste se različite analitičke metode, a za kvantifikaciju najčešće se primjenjuju kromatografske, elektrokemijske i spektroskopske metode.

## § 2. VITAMIN C

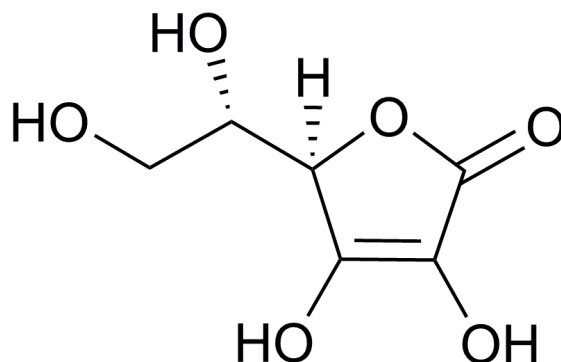
### 2.1. Općenito o vitaminu C

Vitamin C (L-askorbinska kiselina) je bijeli, kristalinični prah bez mirisa i kiselog okusa, osjetljiv na svjetlost i povišenu temperaturu. Otapanjem u vodi nastaje bezbojna otopina. Snažan je antioksidans koji se nalazi u koži, a zbog nedostatka enzima L-glukono-gama-lakton-oksidade ljudi ga ne mogu sintetizirati. Vitamin C je potreban za sintezu kolagena u vezivnom tkivu, sintezu hormona i neurotransmitora te u metabolizmu za sintezu aminokiselina i drugih vitamina. Zbog svojeg antioksidativnog svojstva i inhibicije enzima tirozinaze koristi se za posvjetljivanje kože (smanjenje hiperpigmentacija), a zbog protuupalnog djelovanja može smanjiti crvenilo kože nakon primjene lasera. Odličan je za prevenciju bakterijskih i virusnih infekcija jer jača imunološki sustav. Nedovoljan unos vitamina C dovodi do vrlo poznate bolesti skorbuta do koje danas vrlo rijetko dolazi zbog toga što je većina zemalja opskrbljena voćem i povrćem koje sadrži vitamin C gotovo kroz cijelu godinu.<sup>3</sup>

Stabilizacija vitamina C predstavlja niz izazova u razvoju kozmetičkog proizvoda zbog njegove osjetljivosti na kisik pa se potpunom odsutnošću kisika tijekom proizvodnje, uključivanjem drugih antioksidansa, ambalažom koja ne propušta kisik, niskom vrijednosti pH i minimalizacijom vodene faze pripravka poboljšava stabilnost. Proizvod s vitaminom C s pH vrijednošću 3,5, iako optimizira apsorpciju vitamina C, ujedno i povećava mogućnost neželjenih reakcija kao što su iritacija i crvenilo kože. Primjena vitamina C u njezi kože (topikalna primjena) kao fotoprotektanta pokazala je da sprječava oštećenja od sunca tako što smanjuje broj oštećenih stanica, ali i crvenilo kod izlaganja UVA i UVB zračenju.<sup>4</sup>

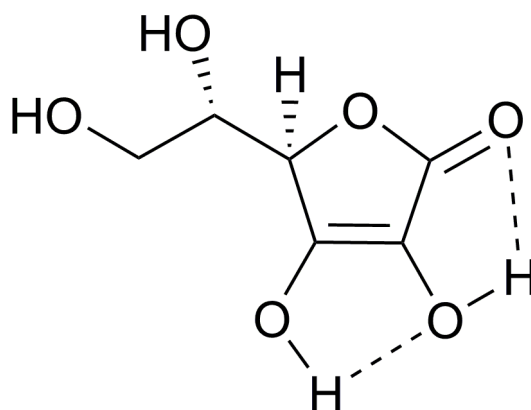
### 2.2. Struktura i svojstva

L-askorbinska kiselina ( $C_6H_8O_6$ ) je enolna forma  $\alpha$ -ketolaktone sa šest ugljikovih atoma, strukturom slična glukozi i ostalim heksozama, s dva kiralna centra. Sadrži nekoliko strukturnih elemenata koji doprinose njenom kemijskom ponašanju: struktura laktone, dvije enolne hidroksilne skupine (položaji 2 i 3) te primarna i sekundarna hidroksilna skupina (položaji 5 i 6) (Slika 1).



Slika 1. Struktura L-askorbinske kiseline izrađena u programu *ChemDraw*

L-askorbinska kiselina može tvoriti dvije intramolekulske vodikove veze koje bitno doprinose stabilnosti i kemijskim svojstvima (Slika 2).<sup>5</sup> Djeluje kao elektron donor i antioksidans iz čega proizlaze sva njezina fiziološka i biokemijska djelovanja. Reducira nestabilne i reaktivne radikale (kisikove, dušikove i sumporove) te na taj način sprječava pojavu oštećenja.



Slika 2. Intramolekulske vodikove veze u L-askorbinskoj kiselini izrađeno u programu *ChemDraw*

### § 3. KOZMETIČKA FORMULACIJA I STABILNOST

Vitamin C je prisutan u različitim kozmetičkim formulacijama. Kao aktivni sastojak može biti jedini aktivni sastojak ili u kombinaciji s drugim sastojcima. L-askorbinska kiselina je nestabilna u vodenom mediju i pod utjecajem raznih fizikalnih i kemijskih faktora može lako doći do oksidacije u kozmetičkim formulacijama. Zbog toga se sadržaj kozmetičkih proizvoda, poput krema i seruma, mora prilagoditi kako oksidacijsko-redukcijskim procesima askorbinska kiselina ne bi prešla u svoj neaktivni oblik. Stabilnost askorbinske kiseline postiže se snižavanjem vrijednosti pH na 3,5 pri kojoj nenabijena molekula može uspješno proći kroz površinski sloj kože. Za optimalni prolazak kroz kožu, vodene formulacije askorbinske kiseline moraju biti ispod njezine vrijednosti  $pK_a$  koja iznosi 4,2.

Sama učinkovitost vitamina proporcionalna je koncentraciji, no ukoliko je koncentracija vitamina u serumu iznad 20%, efikasnost više ne raste.<sup>6</sup> Optimalna koncentracija ovisi o samoj formulaciji (o vrsti kozmetičkog proizvoda), ali da bi proizvod imao biološku važnost, koncentracija vitamina ne bi trebala biti manja od 8%.

U kozmetičkim proizvodima postoje brojni oblici vitamina C kao što su askorbinska kiselina, askorбил glukozid, askorбил palmitat i askorбил fosfat, a L-askorbinska kiselina ima najveću biološku aktivnost te je najviše istraživana. Zbog nestabilnosti askorbinske kiseline, kozmetička industrija uvodi njezine derivate u proizvode koji jesu stabilniji od same askorbinske kiseline, ali manje učinkoviti.<sup>7</sup>

Osim pH, temperature i elektrolita, postoji nekoliko faktora koji utječu na fizikalnu i kemijsku stabilnost samog vitamina u kozmetičkom proizvodu. Zbog svojih oksidativnih svojstava, duljim izlaganjem kisiku i svjetlosti proizvod može promijeniti boju i proizvod više nema pozitivan učinak na kožu.

Na samu stabilnost proizvoda utječe i emulzija, gdje se kao najstabilnija vrsta emulzije pokazala „ulje-u-vodi“. Odabir ulja utječe na viskoznost otopine pa je tako najprikladnije parafinsko ulje. Metoda za određivanje stabilne emulzije je hidrofilna-lipofilna ravnotežna metoda (HLB) prema kojoj se sastav formulacije prilagođava kako bi se dobio stabilan i učinkovit kozmetički proizvod. Za prisutnost oksidirajućih i ionizirajućih tvari u kozmetičkom proizvodu emulzije su se pokazale kao stabilniji medij od vodenog medija.<sup>8</sup>

Utjecajem na viskoznost, topljivost, vrijednost pH te odabirom prikladnog antioksidansa (poput natrijeva metabisulfita) najčešće se postiže stabilnost askorbinske kiseline u kozmetičkim proizvodima.<sup>8,9</sup>

### 3.1. Zakonska i pravna regulativa

Proizvođači kozmetičkih proizvoda prilikom postupka izrade obavezni su provesti sva potrebna toksikološka ispitivanja, ali i testove iritacije i senzibilizacije, kako bi se utvrdila sigurnost proizvoda za zdravlje korisnika. Izbor aktivnih i pomoćnih tvari za izradu kozmetičkih proizvoda mora biti u skladu s „Uredbom (EZ) Europskog Parlamenta i Vijeća od 30. studenoga 2009. o kozmetičkim proizvodima“. Unutar Uredbe se nalazi popis dopuštenih bojila, lista dopuštenih konzervansa i UV-filtera s parametrima za identifikaciju tvari poput kemijskog naziva, EZ broja, boje, s uvjetima vezanima uz vrstu proizvoda i dijelove tijela, najveću koncentraciju gotovog pripravka i u posebnoj koloni tekst uvjeta primjene i upozorenja. Uz liste dopuštenih, navedeni su i popis tvari koje kozmetički proizvodi ne smiju sadržavati (Uredba EZ br. 1223/2009).<sup>10</sup>

## § 4. ANALITIČKE METODE

Danas se sve više koriste ekološki prihvatljivi kozmetički proizvodi i istražuju njihova djelovanja te primjenjuju nove, točnije i preciznije analitičke metode u svrhu određivanja njihova sastava. Postoji nekoliko metoda koje uspješno i precizno kvantificiraju L-askorbinsku kiselinu. Najčešće metode koje se koriste su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra-performance liquid chromatography*, UPLC), UV/VIS spektrofotometrija i elektrokemijske metode.

### 4.1. Kromatografske metode

#### 4.1.1. Uvod u kromatografske metode

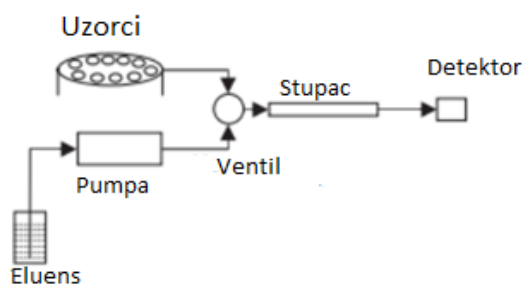
Kromatografija je tehnika odjeljivanja koja se temelji na razdiobi komponenata smjese između dvije faze, tekuće i nepokretne. Nepokretna (stacionarna) faza je dio kromatografskog sustava koji se nalazi u koloni ili na ravnoj površini, dok je pokretna (mobilna) faza fluid koji prolazi kroz nepokretnu fazu ili uzduž nje u određenom smjeru. Mobilna faza može biti plin, kapljevina ili superkritični fluid. Kromatografija se koristi za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativnu analizu sastojaka prisutnih u složenim smjesama te ima široku primjenu u analizi različitih uzoraka zbog svoje učinkovitosti i jednostavnosti. Kromatografske metode se mogu podijeliti prema agregatnom stanju faza, fizikalno-kemijskim svojstvima i izvedbenoj tehnici. Kromatografija u stupcu se dodatno dijeli na tekućinsku (eng. *Liquid Chromatography*, LC), plinsku (eng. *Gas Chromatography*, GC) i kromatografiju sa superkritičnim fluidom (eng. *Supercritical Fluid Chromatography*, SFC). Prema literaturnim podacima najčešća metoda za određivanje vitamina C u kozmetičkim proizvodima je tekućinska kromatografija.

U tekućinskoj kromatografiji mobilna faza je tekućina, a stacionarna faza može biti neka druga tekućina, krutina, organske smole (ionski izmjenjivač) ili gel smješteni u uskoj cijevi. Zbog velikog izbora pokretnih i nepokretnih faza, metoda se odlikuje velikim razlučivanjem pa se koristi za analizu kompleksnih smjesa. Od velikog broja podvrsta tekućinske kromatografije, najviše se koristi razdjelna kromatografija. Molekule analita vežu se nekovalentnim interakcijama s tvari stacionarne faze te ovisno o svojstvima analita i spoja u stupcu dolazi do razdvajanja komponenti smjese. Klasična tekućinska kromatografija je u nekim slučajevima spora metoda pa se uvođenjem visokog ulaznog tlaka pokretne faze poboljšava razlučivost i ubrzava protok tvari kroz kolonu. Kromatografija u kojoj se kao stacionarna faza koriste vrlo

sitne čestice (3-5  $\mu\text{m}$ ), a mobilna faza se propušta pod velikim ulaznim tlakom naziva se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Noviji uređaji kao punilo koriste čestice manje od 2  $\mu\text{m}$  koje dodatno povećavaju razlučivost i osjetljivost metode pa se navedena tehnika kromatografije naziva tekućinska kromatografija izrazito visoke djelotvornosti (eng. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*, UPLC).

#### 4.1.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) se koristi za odjeljivanje i određivanje polarnih i nepolarnih spojeva u farmaceutskoj, kozmetičkoj, biokemijskoj, forenzičkoj i kliničkoj industriji. Uređaj za HPLC je složeniji od uređaja za klasičnu tekućinsku kromatografiju, a sam postupak odvajanja analita je automatiziran. U postupku odjeljivanja metodom HPLC tekući ili kruti uzorak se otopi u prikladnom otapalu i propusti kroz kromatografsku kolonu pomoću otapala (pokretnom fazom). Uređaj za HPLC sastoji se od spremnika s pokretnom fazom i sustava za obradu otapala, pumpe koja tjera pokretnu fazu kroz sustav pod visokim tlakom, ventila za unos uzorka u pokretnu fazu, kromatografske kolone s uređajem za programiranje temperature, detektora te uređaja za prikupljanje i analizu podataka (Slika 3).



Slika 3. Moderna aparatura za HPLC<sup>11</sup>

Detektori u komercijalno dostupnim instrumentima za HPLC obično mjere apsorpciju u UV/VIS dijelu spektra, ali koriste se i brojni drugi detektori kao što su infracrveni spektrometar s Fourierovom transformacijom (FTIR) ili spektrometar masa.<sup>12</sup>

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra-performance liquid chromatography*, UPLC) novija je metoda tekućinske kromatografije. Kolone za UPLC su punjene znatno manjim česticama (1,7 – 1,8  $\mu\text{m}$ ) od kolona za HPLC (3 – 10  $\mu\text{m}$ ) te UPLC za

razliku od HPLC postiže tlakove do 1000 bara, dok je HPLC ograničen na 400 bara. Navedene promjene u tehnologiji instrumenta i kolona dovele su do značajnog povećanja razlučivosti, brzine i osjetljivosti tekućinske kromatografije. Primjena UPLC jednaka je primjeni HPLC.

Za analizu vitamina C najčešće se koristi HPLC obratnih faza kod koje je stacionarna faza nepolarna. Stupac se obično puni silikagelom s lancima od osam ili osamnaest ugljikovih atoma pa se takve kolone skraćeno nazivaju C<sub>8</sub> ili C<sub>18</sub> kolonama. Santos Pizzo et al.<sup>13</sup> su pripremili kozmetičke serume koji sadrže vitamin C otapanjem u metanolu i ekstrakcijom, uz prisutnost etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA). Daljnjim centrifugiranjem pri sobnoj temperaturi i filtracijom supernatanta kroz politetrafluoroetilen (PTFE) dobiveni su uzorci koji su podvrgnuti analizi metodom HPLC. Stupac je ispunjen silikagelom s osamnaest ugljikovih atoma (C<sub>18</sub> kolona), a kao detektor korišten je spektrometar masa. Navedenom metodom uspješno je određena prisutnost i količina vitamina C u svim testiranim uzorcima. Metoda HPLC-MS je brza i efektivna metoda za određivanje vitamina C u kozmetičkim formulacijama s brzinom određivanja od 1,5 minute po uzorku i visokom točnošću te preciznošću.

Mitić et al.<sup>14</sup> razvili su i validirali brzu i jednostavnu metodu HPLC za određivanje vitamina C u različitim kozmetičkim proizvodima primjenjivu i za farmaceutske i veterinarske uzorke. Kao mobilna faza korištena je smjesa octene kiseline i otopina soli natrijevog 1-heksansulfonata pri pH = 2,6 uz UV detektor (280 nm). Kvantifikacijska granica za vitamin C je 1,95 µm uz visoku preciznost temeljenu na analitičkom povratu (99,58 – 101,93 %).

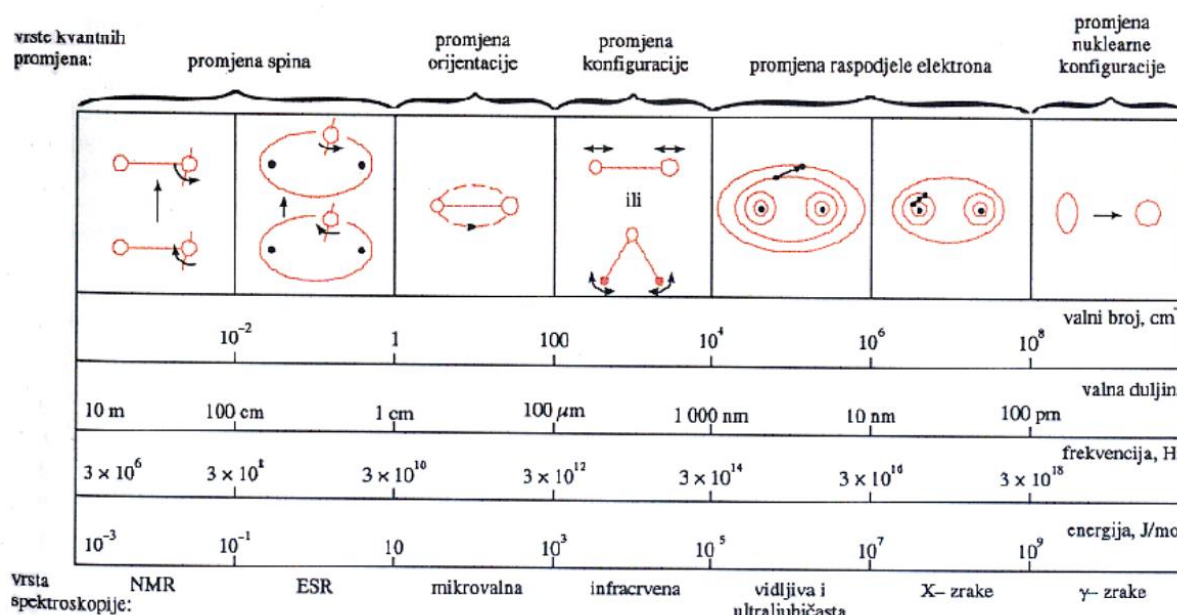
Segallet i Moyano istražili su metodom HPLC obratnih faza stabilnost derivata vitamina C: askorbil-palmitata, natrijevog askorbil-fosfata i magnezijevog askorbil-fosfata. Primjerice, askorbil-palmitat je oblik vitamina C iz palmitinske i askorbinske kiseline, topljiv u mastima, komercijalno dostupan u kapsulama, kozmetičkim serumima i sličim proizvodima. Uzorak kreme je izvagan (0,4 g) i otopljen u metanolu uz miješanje, a zatim analiziran je sadržaj navedenih oblika vitamina C. Esterifikacijom s palmitinskom kiselinom nastaje stabilni fosfatni ester vitamina C koji se može koristiti u kozmetičkim proizvodima.<sup>15</sup>

Chen et al.<sup>16</sup> su u kozmetičkim proizvodima jednostavnom i brzom metodom HPLC obratnih faza odredili sadržaj derivata vitamina C: askorbil-glukozid, etilni eter askorbinske kiseline i magnezijevog askorbil-fosfata. Kozmetički proizvodi s malim udjelom masti poput losiona i losiona za čišćenje lica ekstrahirani su s otopinom kalijeva dihidrogensulfata pri pH 3,0 dok su proizvodi s velikim udjelom masti poput krema i gelova za lice prvo dispergirani u diklormetanu, a zatim ekstrahirani otopinom kalijeva dihidrogensulfata. Kao mobilna faza

korišten je metanol, uz stacionarnu fazu  $C_{18}$ . Detekcijske granice za sve analite su u rasponu 0,04-0,08 g/kg uz visoku preciznost temeljenu na analitičkom povratu (95,6 – 101,0 %).

## 4.2. Spektroskopske metode

Spektroskopija je znanost koja se bavi proučavanjem interakcije elektromagnetskog zračenja i tvari. Mjereno svojstvo je valna duljina i intenzitet elektromagnetskog zračenja koju analit apsorbira ili emitira. Ovisno o valnoj duljini zračenja, dolazi do različitih promjena u atomu ili molekuli na kvantnoj razini (Slika 4).



Slika 4. Kvantne promjene pri interakciji elektromagnetskog zračenja s analitom<sup>11</sup>

Najveću primjenu u analizi pronalaze radiovalovi, ultraljubičasto (UV) zračenje, vidljivi dio spektra (VIS), infracrveno zračenje (IR) i rendgensko zračenje (X-zrake). Za svako snimanje spektra potrebno je imati: izvor zračenja, uzorak, monokromator i detektor.

Zračenje se iz izvora usmjerava na uzorak koji može apsorbirati, raspršiti, ili reflektirati svjetlo. Ukoliko uzorak emitira zračenje, izvor zračenja je sam uzorak. Zračenje iz izvora putuje prema monokromatoru, koji propušta samo jednu valnu duljinu, prolazi kroz uzorak i nakon toga ide prema detektoru koji zatim primljeno zračenje pretvara u signal, koji se u konačnici zapisuje kao spektar.

Spektrometrija je vrlo često korištena analitička metoda koja se koristi u kemiji, poljoprivredi, forenzici, itd. Prema vrsti mehanizama, u spektrometriji se mogu odvijati apsorpcija, inducirana apsorpcija, odbijanje, refleksija i raspršenje. U spektrometrijskoj analizi

dominantne su emisijske i apsorpcijske tehnike. U kvantitativnoj analizi najčešće se koristi apsorpcijska spektroskopija koja mjeri ovisnost količine apsorbiranog zračenja o valnoj duljini za pojedinu tvar. Apsorbancija analita s njegovom koncentracijom je izravno povezana preko Beer-Lambertovog zakona (1) koji vrijedi samo za zračenje određene valne duljine i niske koncentracije.

$$(1) A = \varepsilon b c$$

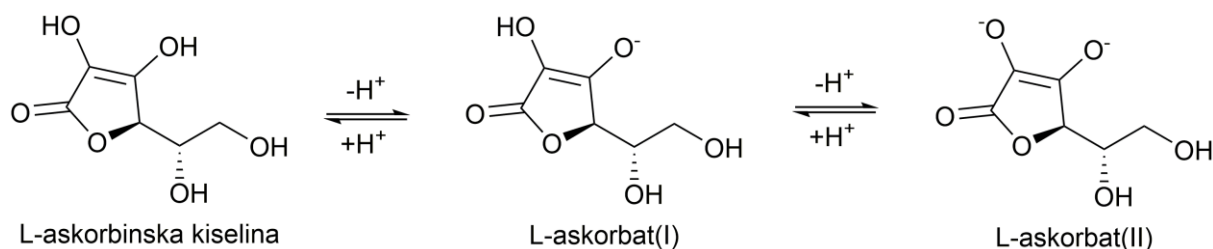
pri čemu je  $\varepsilon$  = molarna apsorptivnost ili molarni apsorpcijski koeficijent ( $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$ ).

Kod emisijske spektroskopije, analit prijelazom iz pobuđenog stanja u osnovno stanje oslobađa energiju otpuštanjem fotona veće valne duljine od upadnog zračenja. Najvažnije je svojstvo fluorescencije koje sadrži mali broj molekule te su najčešće njihove strukture rigidne. S obzirom na analit, spektroskopija se može podijeliti na molekulsku i atomsku. Pod molekulskom spektroskopijom obično se podrazumijeva UV/VIS spektroskopija pri kojoj apsorpcijom zračenja dolazi do promjene raspodjele elektrona, odnosno prijelaza vanjskih elektrona. Glavna primjena molekulske spektroskopije je u kvantitativnoj analizi zbog svoje osjetljivosti i jednostavnosti. Za točno određivanje spektra elektromagnetskog zračenja koristi se spektrofotometar koji mjeri apsorbanciju. Sastoji se od izvora zračenja (lampa ili žarulja), filtera (monokromatora), kivete s uzorkom, detektora i računala. Kada svjetlo prođe kroz otopinu, dio zračenja se apsorbira, a dio prolazi kroz otopinu. Cilj spektrofotometra je izmjeriti neapsorbirano zračenje koje je prošlo kroz analizirani uzorak i usporediti ga sa intenzitetom ulazne svjetlosti.

Određivanje L-askorbinske kiseline u voćnim sokovima i farmaceutskim proizvodima spektrofotometrijskim metodama temelji se na oksidaciji askorbinske kiseline s bakrovim(II) neokuproinom, a kao produkti nastanu dehidro-L-askorbinska kiselina i bakar(I) neokuproin. Analiza se može obavljati i klasičnom spektrofotometrijom i metodama analize u protoku, s tim da je analiza u protoku povoljnija jer je kod klasične spektrofotometrije potrebno ukloniti učinke matriksa u kojem i drugi sastojci apsorbiraju UV zračenje. Apsorbancija bakar(I) neokuproina mjeri se pri valnoj duljini  $\lambda = 460 \text{ nm}$ . Ovo je pouzdana i precizna metoda za analizu vitamina C u voćnim sokovima i farmaceutskim proizvodima.<sup>17</sup>

U novijim spektrofotometrijskim metodama oksidacija askorbinske kiseline se postiže kalijevim permanganatom pri  $\lambda = 530 \text{ nm}$  ili kalijevim dikromatom pri  $\lambda = 350 \text{ nm}$  pri čemu je vidljiva promjena boje oksidansa. Pri rasponu pH = 5-6 najprije se izmjeri apsorbancija čiste L-askorbinske kiseline, a zatim se nakon dodatka oksidansa izmjeri apsorbancija nastale

smjese. Razlika apsorbancije tih dviju otopina proporcionalna je koncentraciji L-askorbinske kiseline u uzorku. Otopine askorbinske kiseline su pripremljene otapanjem u destiliranoj vodi, dok su otopine oksidansa pripremljene u destiliranoj vodi i sumpornoj kiselini.<sup>18</sup> Za spektrofotometrijsko određivanje se mogu koristiti različiti reagensi, ali zbog nestabilnosti i disocijacije vitamina C (Slika 5) u vodi potrebno je kontrolirati pH otopine.



Slika 5. Disocijacija L-askorbinske kiseline u vodi izrađeno u programu *ChemDraw*

Zanini et al.<sup>19</sup> su spektrofotometrijskom metodom uz kalijev permanganat odredili vitamin C u različitim matricama uzorka. Linearni raspon masene koncentracije je 5 - 100 mg/L, uz koeficijent varijacije manji od 5% za masenu koncentraciju vitamina C 50 mg/L, detekcijske granice 0,25 - 125 mg/L, a granice kvantifikacije 5,0 - 100 mg/L.

FT-IR spektroskopija je analitička metoda analize koja se koristi za identifikaciju organskih, polimernih i ponekad anorganskih materijala. Metoda analize sastava proizvoda s FT-IR-om koristi infracrveno svjetlo za skeniranje testnih uzoraka i promatranje kemijskih svojstava. FT-IR je ustaljena tehnika za kontrolu kvalitete prilikom ocjenjivanja materijala proizvedenih u raznim industrijama (osobito u kozmetičkoj) te često služi kao prvi korak u procesu analize.<sup>20</sup>

Bunaciu et al.<sup>21</sup> su IR spektar vitamina C snimili pomoću KBr pastile u području od 350 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Pomoću Beer- Lambertovog zakona i karakteristične vibracije istezanja veze za vitamin C, koja se nalazi pri 1675  $\text{cm}^{-1}$  (odgovara istezanju C = C veze), moguće je kvantitativno odrediti vitamin C u kozmetičkim proizvodima. Analiza FT-IR se pokazala kao precizna, jednostavna i brza metoda koja može biti jednako efikasno kao HPLC ili spektrofotometrija.

Berg et al. su proučavali rezonantnu Ramanovu spektroskopiju hrane i pića i otkrili da je, neovisno o vrsti uzorka, na valnoj duljini od 229 nm prisutna jedino L-askorbinska kiselina. Pri  $\lambda = 229 \text{ nm}$  prisutni su rezonantni oblici L-askorbinske kiseline i askorbat-monoaniona, dok askorbat-dianion apsorbira vrlo malo svjetlosti. Ukoliko se uzorak koji sadrži vitamin C želi

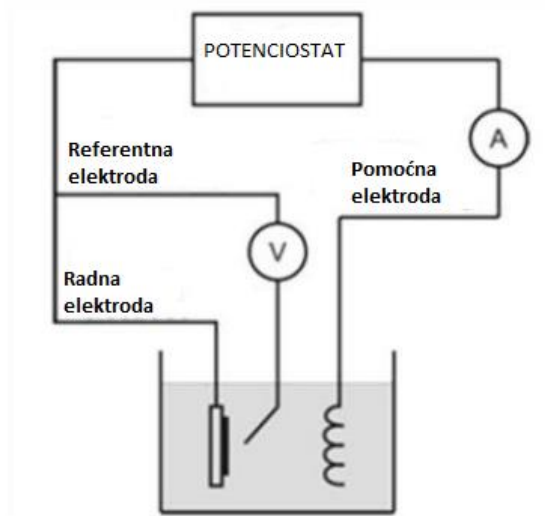
kvalitativno analizirati, rezonantna Ramanova spektroskopija nije pouzdana metoda zbog pojave učinka Ramanove nelinearnosti pa ostale tvari iz uzorka pri  $\lambda = 229 \text{ nm}$  nisu vidljive.<sup>22</sup>

### 4.3. Elektrokemijske metode

#### 4.3.1. Voltametrija

Voltametrija spada pod skupinu elektroanalitičkih metoda kod kojih se količina i vrsta analita dobiva iz mjerenja jakosti struje (signal odziva) kao funkcije potencijala (signal pobude) narinutog na elektrodu. Grafički prikaz ovisnosti se naziva voltamogram. Elektrodni procesi su oksidacijsko-redukcijske reakcije čija se izmjena elektrona odvija između oblika neke tvari koji je reduciran i oblika druge tvari koji je oksidiran, na način da ne dolazi do direktnog kontakta između oblika tvari, nego se reakcije izmjene elektrona odvijaju posredstvom vodiča poput metala, grafita ili žive. Vodiči su uronjeni u odvojene otopine reducensa i oksidansa. Na površini vodiča reducirana tvar se oksidira, dok se oksidirana tvar reducira. Elektroda je vodič koji je u kontaktu sa smjesom oksidiranog i reduciranog oblika tvari, a sve zajedno se naziva polučlanak. Tvar mora biti otopljena ili rastaljena u otapalu kako bi došlo do pokretljivosti molekula ili iona tvari s kojom je vodič u kontaktu. Najveći broj eksperimenata u voltametriji se provodi u vodenom mediju.<sup>23</sup>

Voltametrijska ćelija se sastoji od tri elektrode koje su uronjene u otopinu analita uz dodatak inertnog elektrolita. Mjerenje potencijala odvija se između radne i referentne elektrode, čime se kontrolira signal pobude, dok se struja mjeri između radne i pomoćne elektrode praćenjem signala odziva sustava. Prema referentnoj elektrodi, koja je najčešće Ag/AgCl elektroda, se regulira pobudni signal ili mjeri odzivni signal. Pomoću pomoćne elektrode, koja može biti zlatna, platinska, ugljikova itd. ostvaruje se tok električne struje kroz ćeliju, dok se na radnoj elektrodi odvija redoks reakcija. Shema ćelije se nalazi na slici 6.

Slika 6. Shema voltametrijske ćelije<sup>24</sup>

Pisoschi et al.<sup>25</sup> su odredili L-askorbinsku kiselinu u vodenom mediju pomoću metode linearne voltametrije (eng. *Linear Sweep Voltammetry*, LSV) koristeći zlatnu elektrodu te pri uvjetima pH = 3,2 i  $7500 \text{ mV s}^{-1}$ . Osim metode LSV, L-askorbinska kiselina se može odrediti i pomoću diferencijalne pulsne voltametrije koristeći Ag/AgCl referentnu elektrodu, a njezina antioksidativna sposobnost pomoću „Metode po Brand-Williamsu“.<sup>26</sup>

Beitollahi et al. su razvili elektrodu na bazi ugljikove paste, koja sadrži 5-amino-2',4'-dimetoksi-bifenil-2-ol (5ADMBCNPE). Troelektrodna voltametrijska ćelija se sastojala od Ag/AgCl elektrode, platinske žice i razvijene 5ADMBCNPE elektrode. L-askorbinska kiselina u farmaceutskim uzorcima je određena pravokutno-valnom voltametrijom (eng. *Square-wave Voltammetry*, SWV) uz granicu kvantifikacije  $0,1 \text{ }\mu\text{M}$ .<sup>27</sup>

Chandrashekar et al. su brzom i jednostavnom metodom cikličke voltametrije odredili L-askorbinsku kiselinu, folnu kiselinu te adrenalin hidroklorid. L-askorbinska kiselina je otopljena u perklornoj kiselini pri vrijednosti pH = 7. Troelektrodna voltametrijska ćelija se sastojala od Hg/HgCl<sub>2</sub> referentne elektrode, platinske žice kao protuelektrode i radne elektrode na bazi ugljikove paste. U cikličkom voltamogramu je vidljiv jedan anodni strujni vrh, koji odgovara oksidaciji askorbinske kiseline u dehidroaskorbinsku kiselinu i jedan katodni strujni vrh, koji odgovara redukciji dehidroaskorbinske kiseline u askorbinsku kiselinu.<sup>28</sup>

#### 4.3.2. Potenciometrija

Potenciometrija je elektroanalitička metoda koja se temelji na ovisnosti potencijala indikatorske elektrode o koncentraciji određene ionske vrste s kojom se nalazi u otopini u kontaktu. Potenciometrijska mjerenja se mogu primjenjivati pomoću direktne ili indirektne metode. Kako bi se odredila koncentracija određene ionske vrste u otopini, koristi se direktna metoda. Mjeri se napon galvanskoga članka u kojem je u otopinu, osim indikatorske, uronjena i usporedbeno elektroda (npr. kalomelna), potencijal koje ne ovisi o koncentraciji iona u otopini. Drugi način potenciometrijskoga mjerenja je određivanje završne točke titracije (npr. neutralizacijske, taložne ili redoks-reakcije), a kao indikatorska elektroda rabi se ona koja je reaktivna s obzirom na vrstu iona koji se troše ili nastaju tijekom titracije (najčešće platinska, zlatna, srebrna ili grafitna). Završna točka određena je točkom infleksije na titracijskoj krivulji.<sup>29</sup>

Pisoschi et al.<sup>25</sup> su pratili oksidacijsko-redukcijsku reakciju L-askorbinske kiseline i bakrovih (II) iona kataliziranu enzimom askorbat-oksidadom. Potenciometrija se temeljila na razvoju biosenzora, koji je pratio promjenu potencijala nastale zbog redukcije bakrovih iona pomoću askorbatnog aniona. Mehanizam je inducirao promjenu u elektronskoj gustoći na površini electrode, koja je opažena na potenciometrijskom transduktoru. Osim bakra, kao oksidansi se također mogu koristiti i vodikov peroksid te manganov (IV) oksid.<sup>25,26</sup>

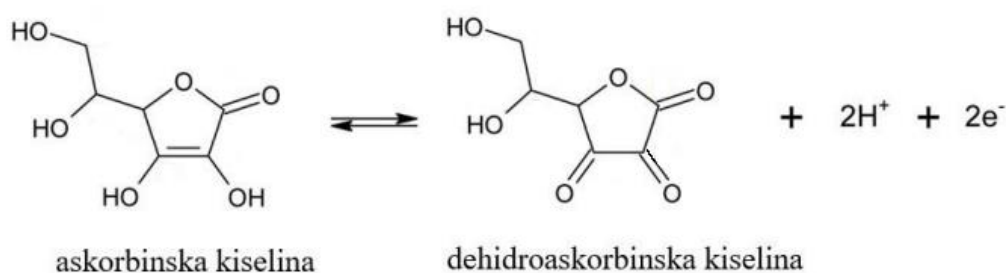
Potenciometrijski senzori koji se sastoje od minerala pirita ili halkopirita, mogu se koristiti kao elektrode sa čvrstom membranom za brzo i efikasno određivanje L-askorbinske kiseline u otopini. Z. Stanić i J. Stepanović su otopili uzorak koji sadrži vitamin C u smjesi vode i acetonitrila te titrirali otopinom bakrovih (II) iona. Detekcijske granice za sve analite su u rasponu 10,5–11,5 mg uz visoku preciznost temeljenu na analitičkom povratu (98,2–101,9 %). Raspon preciznosti izražen relativnim standardnim odstupanjem iznosi 0,1–0,9 %.<sup>30</sup>

Bevanda et al. su razvili vrlo brzu potenciometrijsku metodu za određivanje vitamina C u tabletama, na temelju oksidacijsko-redukcijske reakcije L-askorbinske kiseline i kalijeva jodata u L-dehidroaskorbinsku kiselinu i kalijev jodid. Reakcijska otopina je sadržavala kalijev jodat, sumpornu kiselinu i destiliranu vodu u koju je dodana otopljen tableta. Tijek reakcije je praćen smanjenjem potencijala na ion-selektivnoj elektrodi, a količina nastalog jodida ekvivalentna je količini dodane kiseline. Metoda se pokazala kao jeftina i uspješna metoda za analizu vitamina C u rasponu koncentracija  $8,0 \cdot 10^{-5}$  -  $8,0 \cdot 10^{-4}$  mol/L.<sup>31</sup>

## § 5. ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA

Antioksidansi su tvari koje štite stanice od oksidacijskog djelovanja slobodnih radikala. Imaju sposobnost doniranja elektrona slobodnim radikalima, a da sami pri tome ostanu stabilni. Oni su najvažnije tvari odgovorni za smanjenje oštećenja na staničnoj razini. Sprječavaju pojavu upalnih procesa i pružaju zaštitu od UV oštećenja i karcinoma kože. Oralno primijenjeni antioksidansi često ne mogu dovoljno prodrijeti u slojeve kože kako bi bili u potpunosti učinkoviti, stoga je sve veća potražnja za antioksidansima u kozmetičkim proizvodima za topikalnu primjenu.<sup>32</sup>

Kod vitamina C brzo dolazi do oksidacijskog procesa. Stvaraju se askorбилni radikali ili oksidacijski produkt koji nastaje otpuštanjem dva elektrona, poznat kao dehidroaskorbinska kiselina (Slika 7.)

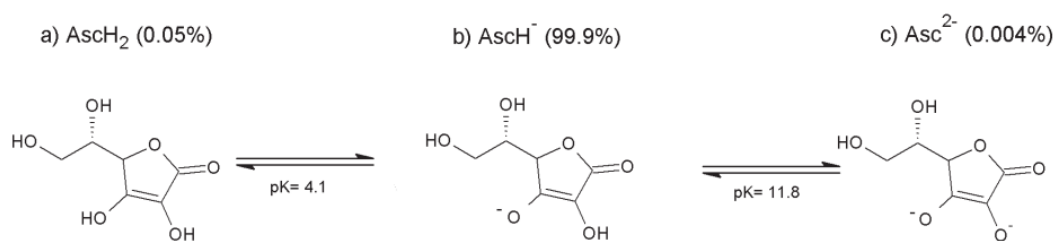


Slika 7. Reakcija oksidacije L-askorbinske kiseline u dehidroaskorbinsku kiselinu  
izrađeno u programu *ChemDraw*

Zbog svojih elektron-donorskih i reducirajućih svojstva, antioksidans vitamin C je sposoban kelirati metalne ione ili djelovati direktno uklanjanjem reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i na taj način spriječiti oksidativno oštećenje stanica. Dakle, vitamin C je reduzens koji otpušta elektrone i na taj način neutralizira slobodne radikale. Pod nazivom slobodni radikali najčešće se misli na ROS (eng. *Reactive Oxygen Species*) – reaktivne kisikove spojeve i RNS (eng. *Reactive Nitrogen Species*) – reaktivne dušikove spojeve. Njihov nastanak u tijelu uzrokuju stres, loša prehrana, nesanica, povrede, lijekovi te upalni procesi. Nastali oksidacijski stres kao posljedicu može izazvati nastanak bolesti poput raka, dijabetesa, ateroskleroze,

kardiovaskularne bolesti, itd. Provede se istraživanja na koji način antioksidansi poput vitamina C mogu, reagirajući s reaktivnim kisikovim vrstama, spriječiti bolesti nastale zbog oksidacijskog stresa.<sup>5,32</sup>

Oksidacijski proces vitamina C može se povećati povišenjem temperature ili vrijednosti iznad pH višoj od 6. Askorbinska kiselina ( $\text{AscH}_2$ ) sadrži visoko reaktivnu hidroksilnu skupinu koja je jako osjetljiva na svjetlost, zagrijavanje i na prisustvo oksidirajućeg sredstva. Iznad pH = 5 vitamin C postoji pretežno u obliku askorbat-monoaniona ( $\text{AscH}^-$ ), dok je u lužnatom mediju iznad pH = 12, prisutan potpuno disocirani oblik askorbat dianiona ( $\text{Asc}^{2-}$ ). Produkt vitamina C pri fiziološkom pH = 6 dominantno u obliku monoaniona  $\text{AscH}^-$ , što najviše pridonosi antioksidativnoj aktivnosti molekule u živom organizmu (Slika 8).<sup>32,33</sup>



Slika 8. Reakcije disocijacije L-askorbinske kiseline pri različitim pH vrijednostima<sup>33</sup>

Antioksidativni kapacitet neke tvari, pa tako i vitamina C, može se mjeriti pomoću elektrokemijskih metoda, UV/VIS spektrofotometrijskih metoda i pomoću „Metode po Brand-Williamsu“, odnosno metode DPPH. Metoda DPPH se temelji na reakciji stabilnog slobodnog radikala, 2,2- difenil-1-pikrilhidrazil, DPPH, s antioksidansom.<sup>2,34</sup>

Svježa otopina DPPH se priprema u etanolu prema „Metodi po Brand-Williamsu“. Miješanjem otopina L-askorbinske kiseline i DPPH te stajanjem u mraku, dolazi do uklanjanja radikala. Antioksidacijska aktivnost uzoraka se procjenjuje promjenom boje od tamno ljubičaste do blijedo žute. Mjerenja se provode spektrofotometrijski i iskazuju kao % aktivnosti uklanjanja radikala (% DPPH).<sup>35,36</sup>

Elektrolizom na živinoj elektrodi ( $m = 2,005 \text{ mg/s}$ ,  $t = 4,32 \text{ s}$ ), Ruiz et al. su istražili detaljan mehanizam elektrokemijske oksidacije L-askorbinske kiseline u dehidroaskorbinsku kiselinu pri pH = 1,80. Reakcije oksidacije i redukcije uključuju reverzibilan prijenos dva elektrona, a korak koji određuje brzinu reakcije (eng. *rate-determining step*, RDS) je prijenos drugog

elektrona. Korištena referentna elektroda je kalomelova elektroda, a nastali produkti su analizirani papirnom kromatografijom.<sup>34</sup>

## § 6. ZAKLJUČAK

Zbog svoje točnosti i brzine, metode koje se najčešće koriste za kvantitativnu i kvalitativnu analizu vitamina C u kozmetičkim proizvodima su tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) i spektrofotometrija. U novije vrijeme provode se istraživanja kako bi se vitamin C u kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima što uspješnije mogao odrediti pomoću Fourierove transformirane infracrvene spektroskopije (FT-IR), voltametrije i potencijometrije.

L-askorbinska kiselina je u posljednjih nekoliko godina široko istražen i primijenjen antioksidans za topikalnu primjenu. Nestabilna je u vodenom mediju, što predstavlja problem farmaceutskoj industriji za proizvodnju kozmetičkih proizvoda. Unatoč poboljšanoj stabilizaciji proizvoda, duljim stajanjem na zraku, svjetlosti ili povišenoj temperaturi, vitamin C gubi svoju učinkovitost, zbog čega se daje prednost njegovim derivatima. Derivati vitamina C jesu stabilniji od čiste kiseline, ali su manje učinkoviti zbog slabijeg prodiranja u kožu. Razvojem novijih analitičkih metoda za analizu vitamina C, značajno se može doprinijeti njenoj stabilizaciji, formulaciji i učinkovitosti za kozmetičku i farmaceutsku industriju.

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. <https://zdravlje.gov.hr/o-ministarstvu/djelokrug-1297/sanitarna-inspekcija/predmeti-opce-uporabe-i-zastita-od-buke/kozmeticki-proizvodi-1832/1832> (datum pristupa 20. srpnja 2022.)
2. C.M. Spagnol, G.A. Ferreira, B.G. Chiari-Andréo, V.L.B. Isaac, M.A. Corrêa, H.R.N. Salgado, *J. Dispers. Sci. Technol.* **38** (2017) 901–908.
3. S. Englard, S. Seifter, *Annu. Rev. Nutr.* (1986) 365–406.
4. R. Dormael, P. Bastien, P. Sextius, V. Chevalier, *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **12** (2019) 53–59.
5. J.L. Silencio Barrita, M. del S. Santiago Snchez, *Oxidative Stress Chronic Degener. Dis. - A Role Antioxidants* (2013).
6. P. Telang, *Indian Dermatol. Online J.* **4** (2013) 143.
7. S. Ravetti, C. Clemente, S. Brignone, L. Hergert, D. Allemandi, S. Palma, *Cosmetics* **6** (2019) 6–13.
8. M.A. Sheraz, S. Ahmed, I. Ahmad, R.H. Shaikh, F.H.M. Vaid, K. Iqbal, *Syst. Rev. Pharm.* **2** (2011) 86–90.
9. L. Zhang, S. Lerner, W. V. Rustrum, G.A. Hofmann, *Bioelectrochemistry Bioenerg.* **48** (1999) 453–461.
10. M. Čajkovac, *Kozmetologija*, 2., Naklada Slap, Jastrebarsko, 2005.
11. T. D. Lee, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **22**, 2011.
12. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Cengage Learning, 2006.
13. J.S. Pizzo, V.H.M. Cruz, C.A. Rodrigues, L.P. Manin, L. Visentainer, O.O. Santos, L. Maldaner, J.V. Visentainer, *Int. J. Cosmet. Sci.* **44** (2022) 131–141.
14. S.S. Mitić, D.A. Kostić, D.C. Nasković-Dokić, M.N. Mitic, *Trop. J. Pharm. Res.* **10** (2011) 105–111.
15. A.I. Segall, M.A. Moyano, *Int. J. Cosmet. Sci.* **30** (2008) 453–458.
16. P. Chen, Z. Yan, X. Tu, F. Xiao, *Se Pu* **33** (2015) 771–776.
17. V.K.S. Shukla, C.K. Kokate, K.C. Srivastava, *Microchem. J.* **24** (2005) 124–126.
18. H.H. Shieh, T.R. Sweet, *Anal. Biochem.* **96** (2012) 1–5.
19. D.J. Zanini, E. Silva, Matheus Henrique Aguiar-Oliveira, M.R. Mazalli, R.R. Kamimura, Eliana Setsusko Maldonado, *Eur. Int. J. Sci. Technol.* **7** (2018) 70–84.
20. [https://ralphgroup.lassp.cornell.edu/projects/graphene\\_electrochemistry](https://ralphgroup.lassp.cornell.edu/projects/graphene_electrochemistry) (datum pristupa 22. srpnja 2022.)
21. A.A. Bunaciu, E. Bacalum, H.Y. Aboul-Enein, G.E. Udristioiu, Ș. Fleschin, *Anal. Lett.* **42** (2009) 1321–1327.
22. R.W. Berg, *Appl. Spectrosc. Rev.* **50** (2015) 193–239.
23. Š. Komorsky-Lovrić, M. Lovrić, *Voltometrija*, ZIMO, Institut, 2007.
24. <https://www.laboratuar.com/hr/testler/kimyasal-testler/ftir-spektroskopiji-analizleri> (datum pristupa 25. srpnja 2022.)
25. A.M. Pisoschi, A. Pop, A.I. Serban, C. Fafaneata, *Electrochim. Acta* **121** (2014) 443–460.

26. J.A. Cooper, M. Wu, R.G. Compton, *Anal. Chem.* **70** (1998) 2922–2927.
27. H. Beitollahi, S. Tajik, H. Parvan, H. Soltani, A. Akbari, M.H. Asadi, *Anal. Bioanal. Electrochem.* **6** (2014) 54–66.
28. B.N. Chandrashekar, B.E.K. Swamy, K.J. Gururaj, C. Cheng, *J. Mol. Liq.* **231** (2017) 379–385.
29. K. Geber, Potenciometrija, Osijek, 2020.
30. Z. Stanic, J. Stepanovic, Potentiometric Determination of Ascorbic Acid in Water – Acetonitrile Solution Using Pyrite and Chalcopyrite Electrodes, 2016.
31. A.M. Bevanda, A. Matić, S. Talić, A. Ivanković, A. Prkić, A. Paut, T. Vukušić, *Int. J. Electrochem. Sci.* **17** (2022) 5–7.
32. M.B. Morelli, J. Gambardella, V. Castellanos, V. Trimarco, G. Santulli, *Antioxidants* **9** (2020) 1–23.
33. M. del C. García-Rodríguez, A. Gordillo-García, M. Altamirano-Lozano, *Vitam. C* (2017).
34. J.J. Ruiz, A. Aldaz, M. Dominguez, *Can. J. Chem.* **55** (1977) 2799–2806.
35. P. Molyneux, *Songklanakarin J. Sci. Technol.* (2018).
36. M.E. Cuvelier, C. Berset, **30** (1995) 25–30.