

Silvia Osmak

**Utjecaj temperature i izotopne supstitucije na
UV-Vis spektar askorbata**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Fizikalna kemija 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za fizikalnu kemiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Viktora Pilepića.

Zahvaljujem svom mentoru izv.prof.dr.sc. Viktoru Pilepiću na pruženom stručnom vodstvu i pomoći, savjetima te velikoj angažiranosti tijekom izrade ovoga diplomskog rada.

Također zahvaljujem i ostalim djelatnicima Zavoda za fizikalnu kemiju na pomoći pri izvođenju eksperimentalog dijela rada.

Na kraju zahvaljujem svojoj sestri Valeriji i bratu Antoniju na podršci te svojoj majci Vlatki na bezuvjetnoj ljubavi i podršci bez koje moje fakultetsko obrazovanje ne bi bilo moguće.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. L-askorbinska kiselina.....	1
1.1.1. Strukturna, kemijska i fizikalna svojstva	1
1.1.2. Sinteza i katabolizam askorbinske kiseline	3
1.1.3. Antioksidativni i prooksidativni mehanizam djelovanja	4
1.1.4. Ostale uloge askorbinske kiseline u organizmu	7
1.1.5. Upotreba vitamina C	7
1.2. UV-Vis spektrofotometrija	8
1.3. NMR spektroskopija	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Kemikalije, pribor i instrumenti.....	14
3.2. Mjerenje UV-Vis spektra kalijevog dikromata.....	15
3.3. Mjerenje UV- spektra askorbata	15
3.4. Mjerenje NMR spektra askorbata	15
3.5. Mjerenje pH otopine askorbata.....	16
3.6. Korekcija spektara.....	16
3.7. Određivanje apsorpcijskog maksimuma i širine spektra	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. Rezultati.....	17
4.2. Rasprava	30
5. ZAKLJUČAK	34
6. LITERATURA	35
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	38
7.1. Sažetak.....	38
7.2. Summary.....	39

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

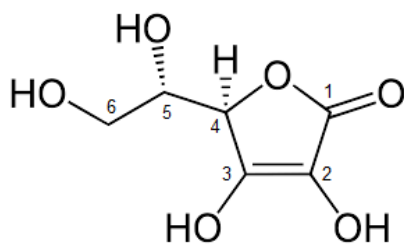
1. UVOD

1.1. L-askorbinska kiselina

L-askorbinska kiselina ili vitamin C (L-treo-heks-2-enon-1,4-lakton) je u vodi topljiv vitamin s izrazitim antioksidativnim svojstvima. Nalazi se u različitom voću i povrću kao što su naranča, limun, šipak, kupus, brokula, paprika, kelj, krumpir. Jedan je među prvim izoliranim vitaminima, a izolirao ga je mađarski znanstvenik Albert Szent-Györgyi 1928. godine. Askorbinska kiselina dobila je ime po tome što ima vrlo važnu ulogu u prevenciji skorbuta, bolesti kojoj je patogenetska podloga nemogućnost stvaranja kolagena. Askorbinska kiselina sudjeluje kao kofaktor dva enzima, prolil hidroksilaze i lizil hidroksilaze. Ta dva enzima odgovorna su za hidroksilaciju lizina i prolina u kolagenu, čime nastaju hidroksiprolin i hidroksilizin koji su važni u stabilizaciji veza u kolagenu. Kod nedostatka askorbinske kiseline narušava se stabilnost kolagena i dolazi do skorbuta. Simptomi koji se najčešće javljaju su krvarenje desni, modrice, sporo zacjeljivanje rana, iritabilnost, depresija, umor, petihije, anemija itd. (Davies i sur., 1991).

1.1.1. Strukturna, kemijska i fizikalna svojstva

Struktura L-askorbinske kiseline sastoji se od γ -laktonskog prstena i postraničnog lanca (slika 1.1.1.1.). Struktura ketolaktona sa 6 ugljikovih atoma slična je strukturi glukoze i ostalim heksozama pa se stoga sintetski dobiva upravo iz D-glukoze. Njezinu kristalnu strukturu proučavao je Hvoslef još 60-ih godina prošlog stoljeća te je ustanovio da ima monoklinsku strukturu sa 4 molekule po jednoj jediničnoj ćeliji (Hvoslef, 1968).



Slika 1.1.1.1. Struktura L-askorbinske kiseline

U UV-spekttru askorbinske kiseline pri pH 2 možemo vidjeti maksimum na 243 nm dok se pri pH 7 maksimum pomiče na 265 nm, što je rezultat ionizacije OH skupine na C3 atomu. Vrijednosti su u skladu sa $\pi \rightarrow \pi^*$ prijelazom elektrona u dvostrukoj vezi u laktonskom prstenu (Davies i sur., 1991). Na ^1H NMR spektru koji je mjereno u otopini teške vode

pojavljuju se tri skupine signala koji pripadaju protonima koji se nalaze na atomima C4, C5 i C6 (Slika 1.1.1.1.) dok se protoni na OH skupinama ne pojavljuju kao zasebni signali. Protoni na C6 atomu nisu ekvivalentni zbog kiralnosti C5 atoma (Reid, 1989).

Askorbinska kiselina slaba je dvoprotonska kiselina koja ima jaka reducirajuća svojstva. Njezina kisela svojstva u vodenoj otopini proizlaze iz disocijacije OH skupine na C3 atomu. Forma askorbinske kiseline u vodi uvelike ovisi o pH. Pri pH manjim od pK_a OH skupine na C3 atomu (4,25) askorbinska kiselina u formi je kiseline (H_2A), pri pH između 4,25 i 11,79, što je pK_a OH skupine na C2 atomu, nalazi se u formi aniona (HA^-), a pri pH većem od 11,79 nalazi se u formi dianiona (A^{2-}) (Davies i sur., 1991).

U vodenoj otopini askorbinska kiselina stvara vodikove veze s molekulama vode preko OH skupina na laktonskom prstenu. Demianenko i suradnici u svom su radu istraživali veze između vode i askorbinske kiseline prilikom njezine disocijacije. Istraživanjima je također pokazano da askorbinska kiselina stvara vodikove veze i sa drugim otapalima kao što je dimetilsulfoksid (Markarian i Sargsyan, 2011).

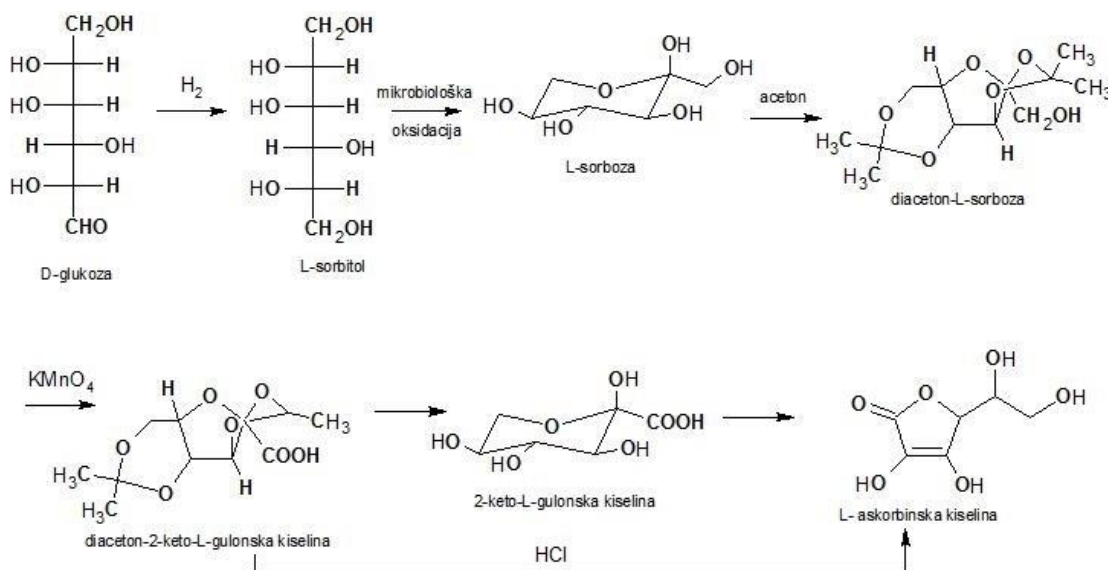
U krutom stanju, kao bijeli prašak, dosta je stabilna, dok u vodi dolazi do oksidacije zbog otopljenog kisika, a oksidaciju dodatno pojačavaju metalni ioni, najviše željezo i bakar te alkalije. Stoga je treba čuvati u plastičnim bocama, zaštićenu od svjetlosti i zraka (Jonhston i sur., 2014). Fizikalna svojstva prikazana su u tablici 1.1.1.1.

Tablica 1.1.1.1. Fizikalna svojstva askorbinske kiseline (preuzeto i prilagođeno iz Davies i sur., 1991).

relativna molekulska masa	176,14
gustoća	1,65 g/cm ³
talište	190-192 °C
pK_a	1. (C-3-OH) 4,25 2. (C-2-OH) 11,79
spečifična rotacija	$[\alpha]_D^{20} = +23^\circ$ u vodi $[\alpha]_D^{20} = +49^\circ$ u metanolu
topljivost (g/100 cm ³ na 20°C)	33 (voda) 3 (etanol) 1 (glicerol) netopljiva u kloroformu, benzenu, eteru i mastima

1.1.2. Sinteza i katabolizam askorbinske kiseline

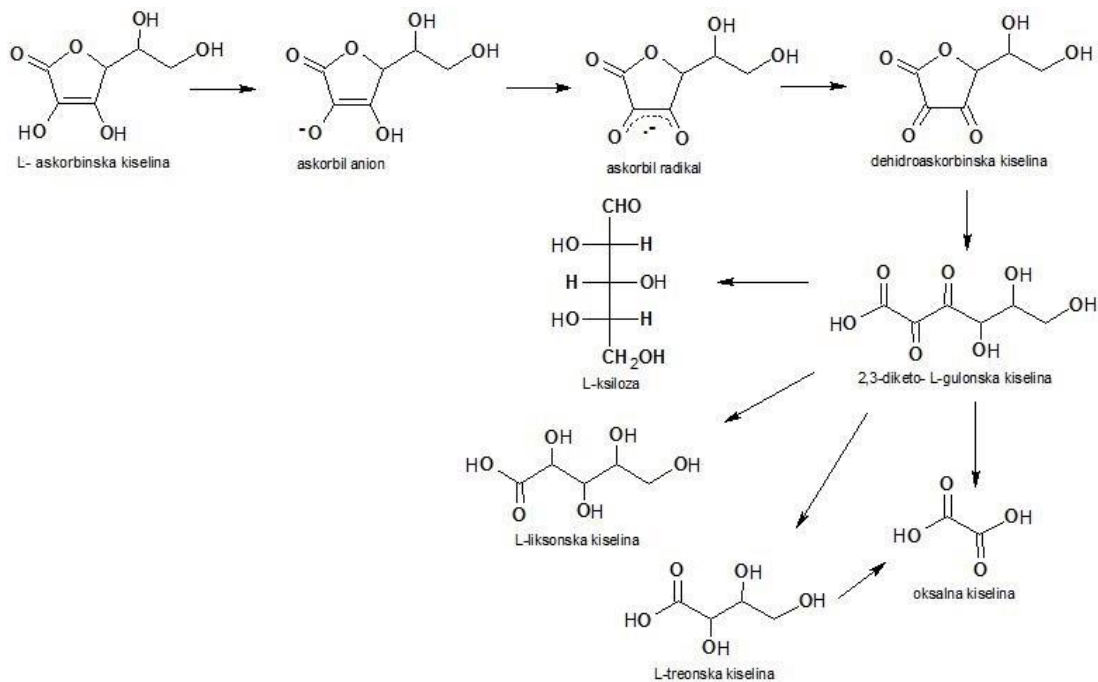
Za mnoge biljke i životinje askorbinska kiselina nije vitamin jer je mogu sintetizirati iz D-glukoze ili D-galaktoze. Međutim ljudi, zamorci i majmuni je ne mogu sintetizirati zbog nedostatka enzima L-gulunolakton oksidaze. Askorbinska kiselina može se sintetizirati iz različitih ugljikohidrata, npr. L-sorboze, L-sorbitola, D-glukuronske kiseline, L-gulonske kiseline, ali najvažniji polazni spoj je D-glukoza. Industrijska sinteza prema Reichstein–Grüssnerovom putu prikazana je na slici 1.1.2.1. Prvo se D-glukoza reducira u L-sorbitol, a L-sorbitol se zatim mikrobiološki oksidira u L-sorbozu. Na sljedećem se stupnju pomoću acetona zaštićuju sve hidroksilne skupine osim primarne. Preostala slobodna primarna alkoholna skupina oksidira se u karboksilnu. Iz dobivene diaceton-2-keto-L-gulonske kiseline uklanjaju se zaštitne skupine hidrolizom. Nastaje 2-keto-L-gulonska kiselina koja zagrijavanjem ciklizira u L-askorbinsku kiselinu. Diaceton-2-keto-L-gulonska kiselina može se izravno prevesti u L-askorbinsku kiselinu u kiselo-kataliziranoj reakciji (Reichstein i Grüssner, 1934)



Slika 1.1.2.1. Sinteza askorbinske kiseline (preuzeto i prilagođeno iz Reichstein i Grüssner, 1934)

Glavni metaboliti katabolizma askorbinske kiseline u organizmu su dehidroaskorbinska kiselina, 2,3-diketo-gulonska kiselina i oksalna kiselina. Metabolizira se najvećim dijelom u jetri, a metaboliti se izlučuju urinom. Askorbinska se kiselina prvo oksidira do askorbil aniona, potom do askorbil radikala te do dehidroaskorbinske kiseline. Dehidroaskorbinska kiselina ireverzibilno se prevodi u 2,3-diketo-gulonsku kiselinu jer dolazi do hidrolize

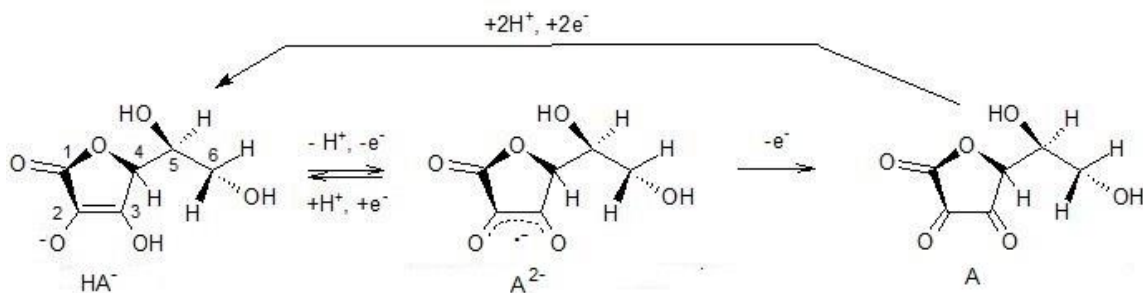
laktoskog prstena. Ona se potom može prevesti u oksalnu kiselinu, L-silozu, L-liksonsku kiselinu i L-treonsku kiselinu (Davies i sur., 1991). Katabolizam je prikazan na slici 1.1.2.2.



Slika 1.1.2.2. Katabolizam askorbinske kiseline (preuzeto i prilagođeno iz Davies i sur., 1991)

1.1.3. Antioksidativni i prooksidativni mehanizam djelovanja

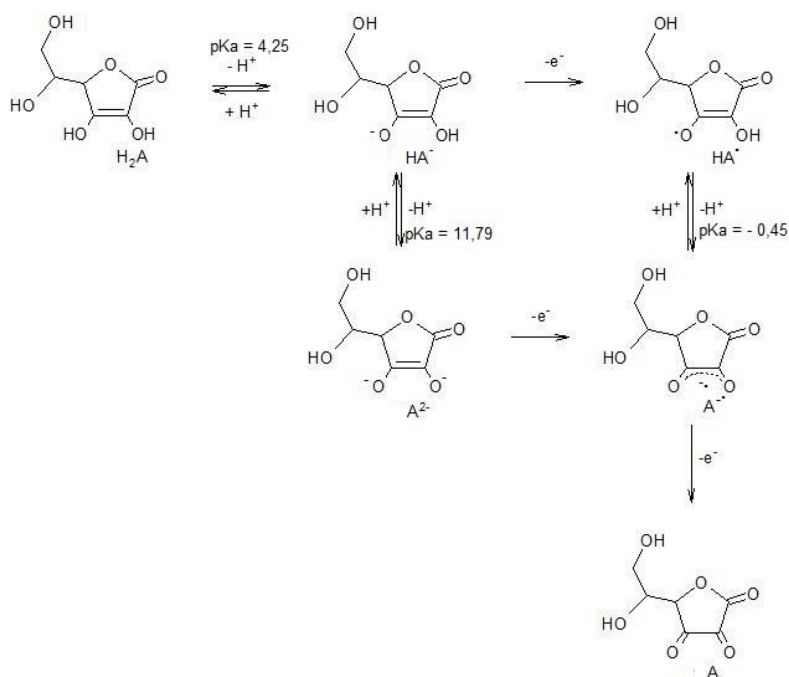
L-askorbinska kiselina može imati direktni i indirektni antioksidativni učinak u organizmu. Antioksidativni učinak *in vivo* postiže se pomoću redoks para askorbinska kiselina/dehidroaskorbinska kiselina. Oksidacija L-askorbinske kiseline u fiziološkim uvjetima prikazana je na slici 1.1.3.1. Prvo dolazi do otpuštanja elektrona na C3 atomu askorbata pa nastaje L-askorbinski slobodni radikal. Potom dolazi do otpuštanja drugog elektrona na C2 atomu pa nastaje dehidroaskorbinska kiselina. Askorbil radikal i dehidroaskorbinska kiselina mogu se ponovno reducirati u askorbat. Neki od enzima koji sudjeluju u relikiranju askorbata su NADH-citokrom b_5 -reduktaza, askorbat radikal reduktaza, tioredoksin reduktaza, koji reduciraju askorbil radikal, dok glutathion, glutaredoksin i tioredoksin reduktaza reduciraju dehidroaskorbinsku kiselinu.



Slika 1.1.3.1. Oksidacija askorbata in vivo (preuzeto i prilagođeno iz Brody, 1999)

gdje je HA^- askorbat, A^{2-} askorbil radikal, A dehidroaskorbinska kiselina.

Ovaj redoks sustav zapravo je puno složeniji, a uzrok tomu je što na svaki redoks proces u kojem sudjeluje askorbinska kiselina utječe prijenos protona jer različita oksidacijska stanja askorbinske kiseline imaju različita kiselobazna svojstva. Taj sustav prikazan je na slici 1.1.3.2. sa pripadajućim pK_a vrijednostima (Davies i sur., 1991).

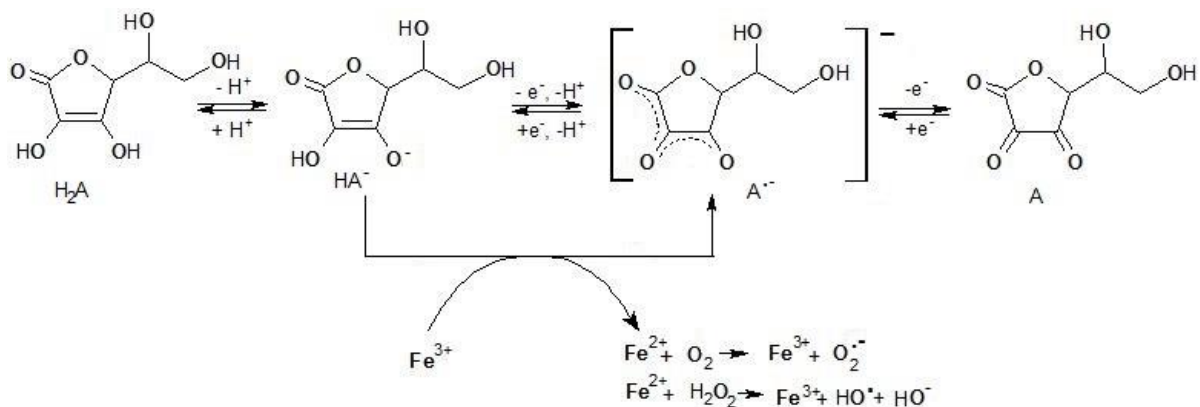


Slika 1.1.3.2. Redoks sustav L-askorbinske kiseline (preuzeto i prilagođeno iz Davies i sur., 1991)

H_2A označava askorbinsku kiselinu, HA^- askorbatni monoanion (askorbat), A^{2-} askorbatni dianion, HA^\bullet askorbil radikal, A^\bullet askorbil radikal anion, A dehidroaskorbinsku kiselinu.

Zbog svojstva reverzibilne oksidacije L-askorbinska kiselina sudjeluje u brojnim biološkim oksido-redukcijskim procesima. Može direktno reagirati sa slobodnim radikalima kao što su kisikovi slobodni radikali (superoksid anion, hidroksilni radikal) ili sudjeluje u zaštiti drugih antioksidansa kao što je vitamin E (Davies i sur., 1991). Askorbinska kiselina ga održava u reduciranom obliku, tj. njegovu oksidiranu formu, tokoferol radikal, prevodi natrag u vitamin E. Svojim antioksidativnim učinkom također regulira funkciju folne kiseline te apsorpciju željeza. Folna kiselina, da bi bila funkcionalna, mora biti u reduciranom obliku, u obliku tetrahidrofolne kiseline, što može biti postignuto askorbinskom kiselinom. Da bi se željezo bolje apsorbiralo, poželjno ga je uzimati uz vitamin C jer on zadržava željezo u dvovalentnom stanju, koje se bolje apsorbira od trovalentnog (Davies i sur., 1991).

Askorbinska kiselina u visokim dozama može djelovati prooksidativno (Halliwell, 1990). Mehanizam je prikazan na slici 1.1.3.3. Askorbinska kiselina nema direktan prooksidativni učinak, već uzrokuje redukciju trovalentnog željeza u dvovalentno koje potom reagira s kisikom ili vodikovim peroksidom, pri čemu se željezo ponovo oksidira u trovalentno pa nastaju superoksidni radikal, odnosno hidroksilni radikal. Ti radikali mogu uzrokovati oksidativni stres i lipidnu peroksidaciju (Higson i sur., 1988; Samuni i sur., 1983).



Slika 1.1.3.3. Prooksidativni mehanizam djelovanja askorbinske kiseline (preuzeto i prilagođeno iz Rietjens i sur., 2001)

H₂A označava askorbinsku kiselinu, HA⁻ askorbil anion, A^{•-} askorbil radikal anion, A dehidroaskorbinsku kiselinu.

1.1.4. Ostale uloge askorbinske kiseline u organizmu

Askorbinska kiselina sudjeluje u enzimatskim hidroksilacijama, odnosno aktivira mikrosomalne hidroksilaze koje sudjeluju u metabolizmu lijekova, kancerogenih tvari i pesticida. Ima ulogu u imunološkom sustavu tako što utječe na proizvodnju protutijela, povećava brzinu stvaranja limfocita i povećava mobilnost leukocita. Vrlo je važna za aktivnost nekih enzima kao što su 4-hidroksifenilpiruvat dioksigenaza koja sudjeluje u metabolizmu tirozina i fenilalanina, dopamin- β -hidroksilaza koja sudjeluje u sintezi kateholamina te različite dioksigenaze i hidroksilaze koje su važne za biosintezu karnitina. Također sudjeluje u metabolizmu lipida te smanjuje ukupni kolesterol. U procesu staničnog disanja reducira citokrom c koji je važan za prijenos elektrona (Davies i sur., 1991).

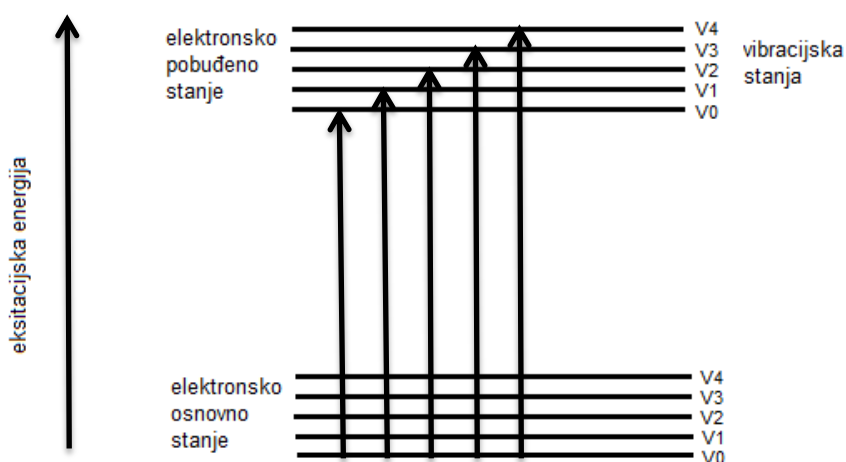
1.1.5. Upotreba vitamina C

Vitamin C ima vrlo važnu ulogu u farmaceutskoj industriji. Dostupan je u obliku različitih suplemenata, u kombinaciji sa drugim vitaminima te u različitim dozama. Osim u prevenciji skorbuta, kao što je ranije opisano, najčešće se koristi u prevenciji prehlade, a isto tako može pomoći i u smanjenju njezinih simptoma. U tu svrhu koristi se dnevna doza od 1-2 g. Budući da vitamin C sudjeluje u sintezi kolagena, koristi se i kod bržeg zacjeljivanja rana u dozama 500-1000 mg dnevno. U prevenciji ateroskleroze važan je zbog svojih antioksidativnih svojstava – sprječava oksidaciju LDL-a u vaskularnim endotelnim stanicama te inhibira adheziju leukocita na endotelne stanice krvnih žila, čime se sprječava stvaranje aterosklerotskog plaka. Neka istraživanja pokazala su da bi vitamin C mogao imati ulogu u prevenciji tumora. Mehanizam nije u potpunosti razjašnjen, ali smatra se da vitamin C neutralizira slobodne radikale koji uništavaju DNA i dovode do razvitka tumora ili da djeluje prooksidativno, čime se stvaraju slobodni radikali koji uništavaju tumorske stanice u samom začetku (Johnston i sur., 2014).

Kod odraslih zdravih osoba RDA vrijednost za vitamin C iznosi 75 mg za žene i 90 mg za muškarce. Povećane potrebe za vitaminom C uočene su kod pušača, trudnica, alkoholičara, dugotrajnih dijareja, hemodijalize, različitih infekcija, hipertireoidizma, stresa, terapije nekih lijekova itd. Osim vrlo velike upotrebe u farmaceutskoj industriji, često je korišten kao aditiv u hrani (E300). Povećava nutritivnu vrijednost namirnica, koristi se kao konzervans i antioksidans, za povećanje kiselosti te kao stabilizator. U kemijskoj se industriji koristi u polimerizaciji, tehnologiji metala i pri razvijanju fotografija (Davies i sur., 1991).

1.2. UV-Vis spektrofotometrija

UV-Vis spektrofotometrija je spektroskopska metoda koja mjeri količinu apsorbirane svjetlosti u ultraljubičastom (200-350 nm) i vidljivom području (350-850 nm). Metoda se zasniva na tome da molekule koje imaju kromofornu skupinu apsorbiraju fotone određene energije te njihovi valentni odnosno vezni elektroni prelaze iz orbitale niže u orbitalu više energije, odnosno molekule prelaze iz osnovnog elektronskog u pobuđeno elektronsko stanje. Pri tome dolazi do promjene raspodjele elektronske gustoće unutar molekule. Taj prijelaz odvija se vertikalno (koordinate atoma unutar molekule ostaju nepromijenjene) prema Frank-Cordonovom principu pa je prijelaz molekule u pobuđeno elektronsko stanje praćen i prijelazom u određena vibracijska stanja (Slika 1.2.1.). Intenzitet apsorpcije proporcionalan je vjerojatnosti prijelaza i broju molekula koje u određenom vremenu promijene elektronsko stanje. Ako je vjerojatnost prijelaza veća, broj molekula koje u jedinici vremena promijene stanje je veći te je veći i intenzitet apsorpcije.

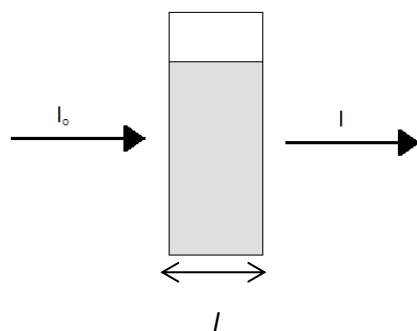


Slika 1.2.1. Prijelaz elektrona iz osnovnog u pobuđeno stanje (preuzeto i prilagođeno iz Watson, 1999.)

Mjerenje apsorpcije zračenja molekula u otopini odvija se prema Beer-Lambertovom zakonu:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot l$$

gdje je A apsorbanacija, I_0 intenzitet ulaznog zračenja, I intenzitet propuštenog zračenja, ϵ molarni koeficijent apsorpcije, c koncentracija otopine, l debljina sloja otopine (Slika 1.2.2.). Dobiveni spektar prikazuje ovisnost izmjerene apsorbanacije o valnoj duljini apsorbiranog zračenja.



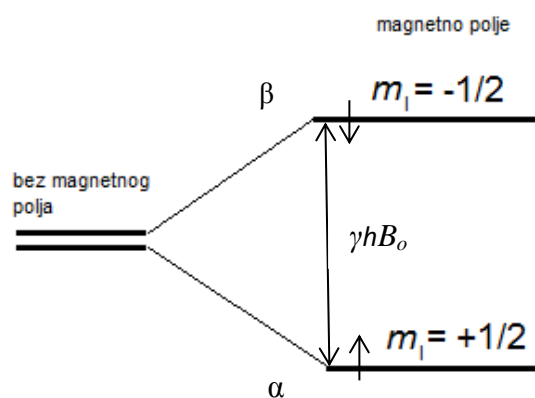
Slika 1.2.2. Prolazak svjetlosti kroz ispitivanu otopinu u spektroskopskim mjerenjima (preuzeto i prilagođeno iz Watson, 1999)

Na izgled spektra utječu otapalo, konjugacije u molekuli i interakcije između otapala i molekule pa tako može doći do hipsokromnog (pomak apsorpcijskog maksimuma prema manjim valnim duljinama) i batokromnog (pomak apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama) pomaka. Također može doći do smanjenja ili povećanja molarnog koeficijenta apsorpcije što se naziva hipokromni, odnosno hiperkromni pomak (Atkins i de Paula, 2014).

UV-Vis spektrofotometar sastoji se od izvora zračenja – deuterijska lampa za UV područje i volframova lampa za vidljivo područje, monokromatora, nosača uzorka i detektora zračenja (Watson, 1999)

1.3. NMR spektroskopija

Nuklearna magnetska rezonantna spektroskopija metoda je za određivanje strukture molekula. Obuhvaća mjerenje rezonantne apsorpcije elektromagnetnog zračenja frekvencije 200-800 MHz. Jezgre izotopa (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P) imaju stalni nuklearni magnetski moment pa se pod utjecajem vanjskog magnetnog polja uzorak magnetizira. Dovođenjem elektromagnetskog zračenja određene frekvencije moguće je inducirati prijelaze između spinskih stanja. Kada nema magnetnog polja, sve orijentacije jezgri jednako su vjerojatne, a kada se one stave u magnetno polje, zauzimaju dva smjera koja se opisuju sa magnetnim kvantnim brojem, m_I (Slika 1.3.1.).



Slika 1.3.1. Usmjeravanje spinova pod utjecajem vanjskog magnetnog polja (preuzeto i prilagođeno iz Atkins i de Paula, 2014)

Razlika između dva spinska stanja za jezgru sa spinskim kvantnim brojem $I=1/2$ i magnetskim kvantnim brojem $m_I = \pm 1/2$ u vanjskom magnetskom polju iznosi:

$$\Delta E = h \cdot \nu_L, \quad \nu_L = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

gdje h Planckova konstanta, ν_L Larmorova frekvencija, γ magnetožirni omjer, B_0 vanjsko magnetno polje. Do rezonantne apsorpcije zračenja dolazi kada je frekvencija elektromagnetnog zračenja jednaka Larmorovoj frekvenciji.

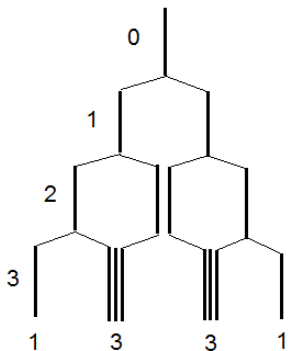
Apsorpcija i potom emisija energije vezana uz zakretanje spina daje signal u NMR-u. NMR spektar prikazuje ovisnost izmjernog intenziteta rezonancijske apsorpcije prema kemijskom pomaku. Položaj pojedine funkcionalne skupine u spektru ovisi o konstanti zasjenjenja, tj. elektronskoj strukturi u neposrednoj blizini jezgre. Kružne struje elektrona stvaraju magnetno

polje koje zaklanja jezgru od polja magneta. Frekvencija pri kojoj dolazi do rezonancijske apsorpcije naziva se Larmorova frekvencija, a iskazuje se kao kemijski pomak prema jednadžbi:

$$\delta = \frac{\nu_L - \nu_L^\circ}{\nu_L^\circ} \cdot 10^6$$

gdje je ν_L rezonancijska frekvencija promatrane jezgre, ν_L° rezonancijska frekvencija standardne jezgre. Ako se u blizini jezgre nalaze elektron donorske skupine, jezgra će biti više zasjenjena pa će kemijski pomak biti manji, a ako se u blizini jezgre nalaze elektron akceptorske skupine, jezgra će biti manje zasjenjena i kemijski pomak će biti veći (Atkins i de Paula, 2014; Watson, 1999).

Na jezgru također mogu djelovati i susjedne jezgre te dolazi do cijepanja signala radi spinskog sprezanja. Tu pojavu opisujemo konstantom sprege, J , koja se definira kao razlika frekvencija između susjednih linija multiplleta. Za cijepanje rezonancijskih signala ^1H radi spinskog sprezanja vrijede ova pravila: 1. jednostavno cijepanje prvog reda nastaje između protona na susjednim atomima ili na istom atomu, 2. cijepanje nastupa samo između jezgara s različitim kemijskim pomacima, tj. između magnetski neekvivalentnih atoma, 3. signal protona cijepa se tako da je broj vrhova (N) za jedan veći od broja ekvivalentnih susjednih protona (n), $N = n + 1$, 4. Odnosi površina vrhova u multipletu su: dublet 1:1, triplet 1:2:1, kvartet 1:3:3:1, 5. kemijski pomak multiplleta težište je određene skupine (težinski prosjek površina vrhova multiplleta u odnosu na njihove kemijske pomake). Na slici 1.3.2. prikazano je cijepanje signala koje se odvija prema pravilu Pascalovog trokuta. Protoni koji se nalaze na kisikovom ili dušikovom atomu obično ne dovode do cijepanja signala. Također postoje i složenija cijepanja signala koja su posljedica daleke sprege i cijepanja višeg reda (Pine, 1994). Složeno cijepanje signala i rezonantna frekvencija karakteristični su za strukturu molekule.



Slika 1.3.2. Cijepanje signala u NMR spektru (preuzeto i prilagođeno iz Atkins i de Paula, 2014)

Suvremene metode mjerenja, pulsne tehnike, uključuju mjerenja razlike u energiji između spinskih stanja. Atomske se jezgre prikladnim pulsom stimuliraju na prijelaze između spinskih stanja. Nakon Fourierove Transformacije mogu se analizirati signali koji se sastoje od različitih Larmorovih frekvencija. Po završetku pulsa dolazi do spinske relaksacije, tj. do raspodjele α i β spinova po Boltzmanovoj razdiobi. Brzina uspostave ravnoteže između spinova izražava se spinsko-okolinskim, longitudinalnim relaksacijskim vremenom, T1, i spinsko-spinskim, transverzalnim relaksacijskim vremenom, T2. Longitudinalna relaksacija odnosi se na eksponencijalnu uspostavu ravnoteže između α i β populacija, a transverzalna se relaksacija odnosi na uspostavu nasumične orijentacije između α i β spinova. Mjerenjem ovih parametara može se dobiti informacija o mobilnosti pojedinih dijelova molekule i informacija o međusobnoj udaljenosti jezgara u molekuli (Atkins i de Paula, 2014).

NMR spektrometar sastoji se od magneta, izvora elektromagnetskog zračenja niske frekvencije, držača uzorka, prijemnika elektromagnetskog zračenja niske frekvencije i sustava za skupljanje i obradu signala (Watson, 1999).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Vitamin C (askorbat) ima važnu ulogu, kako u zdravstvenom, tako i u prehrambenom kontekstu. Između ostalih funkcija, sudjeluje u biokemijskim procesima prijenosa naboja u tkivima te je razumjevanje mehanizma, modulacije i načina djelovanja na molekularnoj razini u fiziološkim uvjetima od važnosti.

Tijekom istraživanja redoks reakcija askorbata u laboratoriju Zavoda za fizikalnu kemiju zapažena je promjena molarnog koeficijenta apsorpcije askorbata na nekoliko valnih duljina UV spektra u određenom temperaturnom intervalu. Pretpostavka temeljena na ovim opažanjima i od koje polazi ovaj rad jest da pri promijeni temperature dolazi do promjene UV-Vis spektra askorbata.

Svrha ovog diplomskog rada jest dobiti detaljan uvid u ovu promjenu UV-Vis spektra u vodi i u teškoj vodi pri različitim temperaturama. Dobiveni rezultati mogu se dovesti u vezu s djelovanjem okolnih molekula vode i teške vode (otapala) na spektar askorbata. Obzirom da pri apsorpciji UV zračenja askorbata dolazi do $\pi \rightarrow \pi^*$ prijelaza pri čemu sudjeluje ista π orbitala koja je uključena i u reakcije prijenosa naboja, opažena promjena UV spektra može se dovesti u vezu i s promjenom reaktivnosti askorbata pri različitim uvjetima.

Stoga je cilj ovog rada mjerenjem spektara askorbata pri različitim temperaturama dokazati pretpostavljenu tezu. U izradi ovog diplomskog rada korištene su metode UV-Vis spektrofotometrije i NMR spektroskopije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije, pribor i instrumenti

U eksperimentima su korištene sljedeće kemikalije:

- redestilirana voda
- dušik 5.0 (99.999% N₂, Messer Croatia plin d.o.o.)
- teška voda – D₂O (99,9% D, Sigma-Aldrich)
- (+)-natrijev L-askorbat (> 99%, Sigma-Aldrich)
- dinatrijev etilendiamintetraacetat ($\geq 99\%$ Na₂EDTA \times 2 H₂O, Fluka)
- kalijev dikromat
- perklorna kiselina (0,1 mol/dm³)

Od pribora i instrumenata korišteni su:

- staklene odmjerne tikvice (10 ml)
- plastične tube Eppendorf (1,5 ml)
- staklene Erlenmayerove tikvice s ubrušenim čepom
- automatske pipete Eppendorf sa odgovarajućim nastavcima (10, 100, 200,1000 μ L)
- kvarcne kivete QS 10,0 mm i 0,1 mm Hellma
- vaga Mettler H2OT (Pmax = 160 g, d = 0,01 mg)
- pH metar Mettler Toledo MP230
- UV-Vis spektrofotometar S2000 Ocean Optics Inc. s izvorom zračenja Top Sensor Systems DH-2000-FHS
- UV- Vis spektrofotometar Avantes Starline, AvaSpec-2048 L s izvorom zračenja Top Sensor Systems DH-2000-FHS
- termostatirani nosač za kivete Q-pod, Quantum Northwest TC 125 Temperature Control ($\pm T < 0,1^{\circ}\text{C}$)
- UV –Vis spektrofotometar Hawlett Packard 8453
- termostatirani nosač za kivete Quantum Northwest TC 1 Temperature Control
- NMR spektrometar Agilent (Varian) 400 MHz

3.2. Mjerenje UV-Vis spektra kalijeveg dikromata

Spektar kalijeveg dikromata mjeren je na UV-Vis spektrofotometru Hawlett Packard 8453 na različitim temperaturama. Otopina dikromata pripravljena je otapanjem 113,7 mg kalijeveg dikromata u 10 ml 0,001 molarne perklorne kiseline. Kao slijepa proba korištena je 0,001 molarna perklorna kiselina, a otopina za mjerenje dobivena je dodavanjem 10 μL otopine dikromata u slijepu probu te je konačna koncentracija dikromata u kiveti bila 60 mg/L (volumen u kiveti bio je 2 ml).

3.3. Mjerenje UV- spektra askorbata

UV-spektri askorbata dobiveni su mjerenjem pomoću tri UV-Vis spektrofotometra koja su navedena u poglavlju 3.1. Otopina askorbata dobivena je otapanjem 200 mg natrijevog askorbata u 10 ml redestilirane lake (H_2O) odnosno teške (D_2O) vode. Redestilirana laka i teška voda su prije mjerenja zagrijane do vrenja te propuhane dušikom tijekom 10 min kako bi se iz njih uklonio otopljeni kisik te tako što više spriječila oksidacija askorbata. Kao slijepa proba korištena je redestilirana, odnosno teška voda, a otopina za mjerenje dobivena je dodavanjem 10 μL otopine askorbata u kivetu sa slijepom probom kako bi koncentracija askorbata u kiveti bila $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ (volumen u kiveti bio je 2 ml). Spektri askorbata mjereni su pri različitim temperaturama te se kiveta s otopinom, prije mjerenja spektra, termostatirala 20 min na određenoj temperaturi.

Otopina za mjerenje spektra askorbata u kiveti debljine 0,1 mm dobivena je otapanjem 25 mg askorbata u 25 ml prokuhane i dušikom propuhane redestilirane vode. Konačna koncentracija askorbata bila je $5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$. Mjerenje je na UV-Vis spektrofotometru Hawlett Packard 8453.

3.4. Mjerenje NMR spektra askorbata

NMR spektar askorbata mjeren je u teškoj vodi te u smjesi koja je sadržavala 10 % teške vode i 90% redestilirane vode pri temperaturi od 19,9 °C. Otopina za mjerenje koncentracije 0,1 mol/dm^3 pripravljena je otapanjem 20 mg natrijevog askorbata u 1,0 ml teške, odnosno redestilirane lake vode koja su prethodno prokuhane i propuhane dušikom tijekom 10 min. U otopinu askorbata dodano je 1 μL otopine Na_2EDTA kako bi kelairao metale u otopini askorbata te time spriječila kataliza oksidacije askorbata. Otopina EDTA pripravljena je otapanjem 18,61 mg Na_2EDTA u 0,5 ml teške, odnosno redestilirane vode. Konačna koncentracija EDTA^{2-} u otopini askorbata bila je $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$.

3.5. Mjerenje pH otopine askorbata

pH metar je prvo kalibriran pomoću pufera pH vrijednosti 4,00 i 7,00. Otopina askorbata pripremljena je kako je opisano u poglavlju 3.3. te je pH metrom izmjeren pH otopine.

3.6. Korekcija spektara

Unatoč pažljivo provedenom postupku kojim se iz otopine uklanja otopljeni kisik koji oksidira askorbat, reakciju oksidacije askorbata kataliziranu prisutnim metalnim ionima u tragovima nije bilo moguće u potpunosti spriječiti. Oksidacijom askorbata nastaje dehidroaskorbinska kiselina koja ne absorbira u UV spektru, te se oksidacija askorbata u UV spektru primjećuje kao smanjenje koncentracije askorbata. Dio izmjerenih spektara korigiran je za ovo snižavanje koncentracije askorbata, odnosno izmjereni spektri su svedeni na istu koncentraciju askorbata kako bi se mogli međusobno uspoređivati pri čemu je korekcija iznosila najviše oko 20 %. Za korekciju bazne linije prvo je odabran jedan spektar na određenoj temperaturi prema kojem će se ostali spektri korigirati. Odabrana je jedna valna duljina u području između 320 i 350 nm tog spektra. Apsorbancija drugog spektra na svim valnim duljinama zatim je uvećana ili umanjena za isti iznos tako da apsorbancija na odabranoj valnoj duljini bude jednaka odabranom spektru. Isti postupak napravljen je i kod ostalih spektara. Za korekciju mjerne koncentracije također je odabran spektar i valna duljina na kojoj se nalazi njegov apsorpcijski maksimum. Ostali spektri korigirani su tako da je apsorbancija maksimuma odabranog spektra podijeljena sa apsorbancijom ostalih spektara na istoj valnoj duljini te je taj iznos pomnožen sa apsorbancijama na ostalim valnim duljinama. U ovom postupku dolazi samo do promjena u iznosu izmjerene apsorbancije, dok položaj apsorpcijskog maksimuma i širina apsorpcijske vrpce ostaju isti.

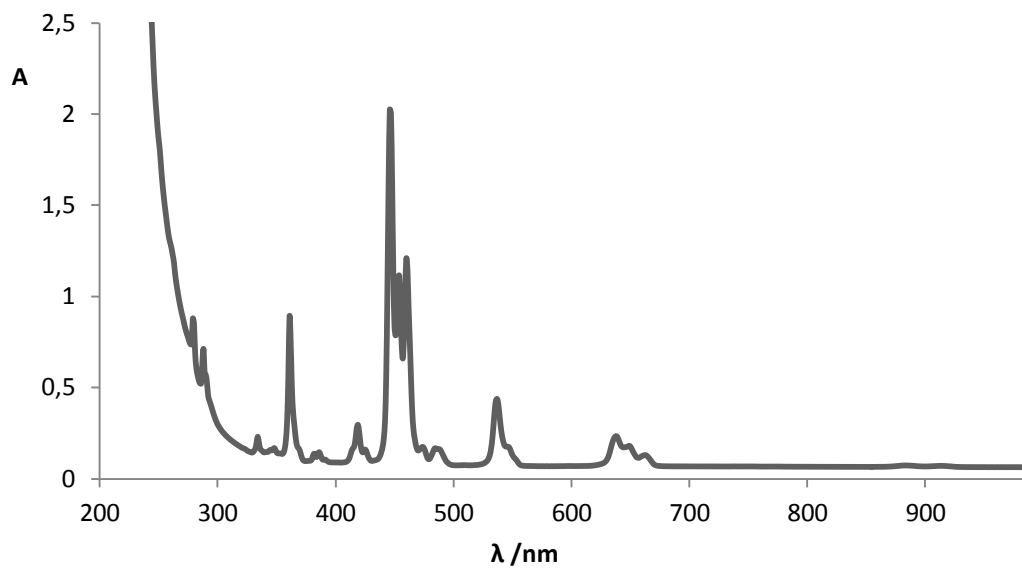
3.7. Određivanje apsorpcijskog maksimuma i širine spektra

Korigiranim spektrima grafički su određeni širina spektra na polovici visine i valna duljina apsorpcijskog maksimuma.

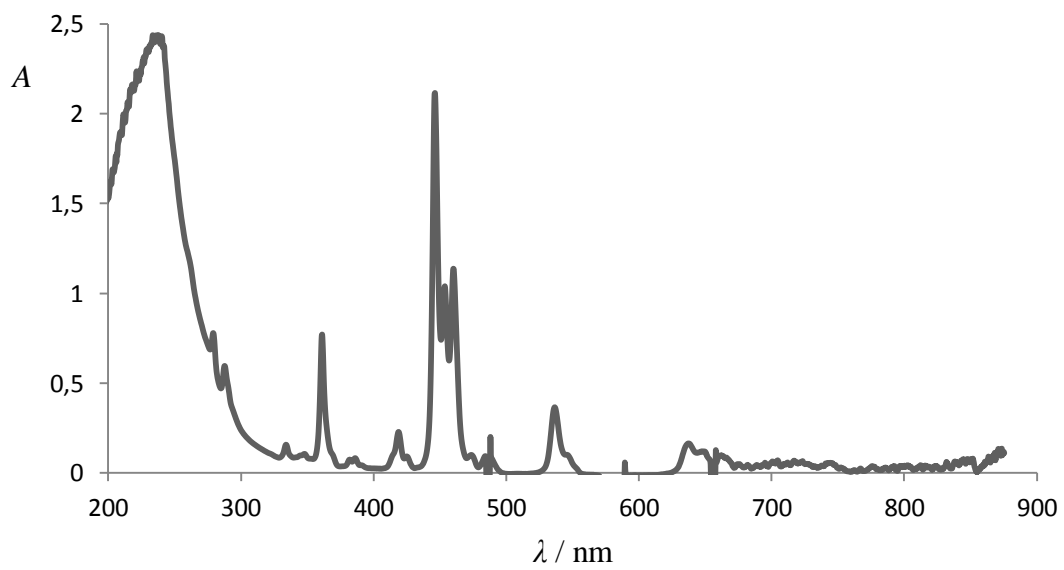
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

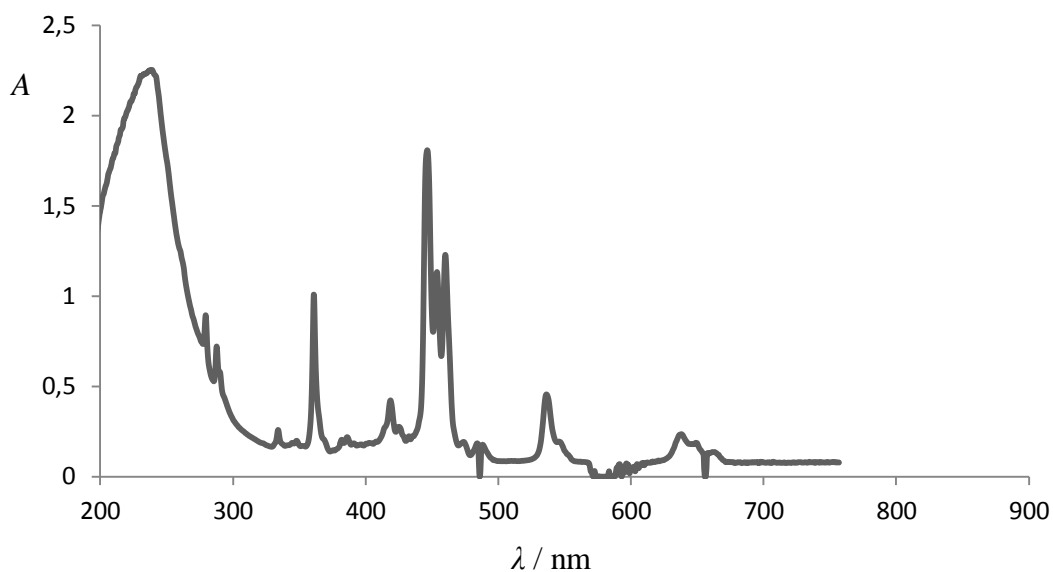
a)



b)



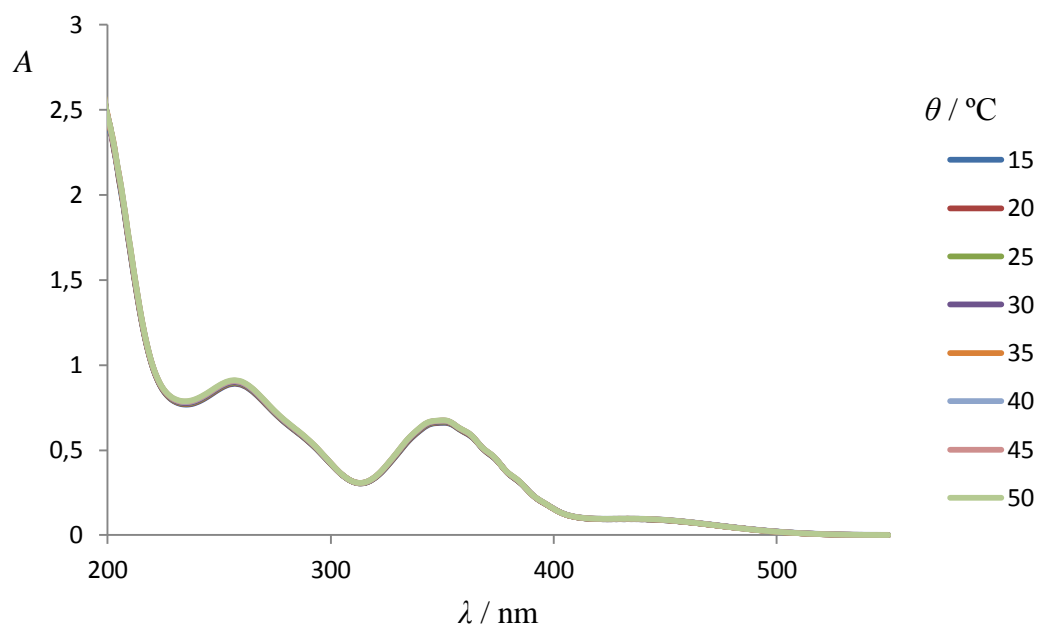
c)



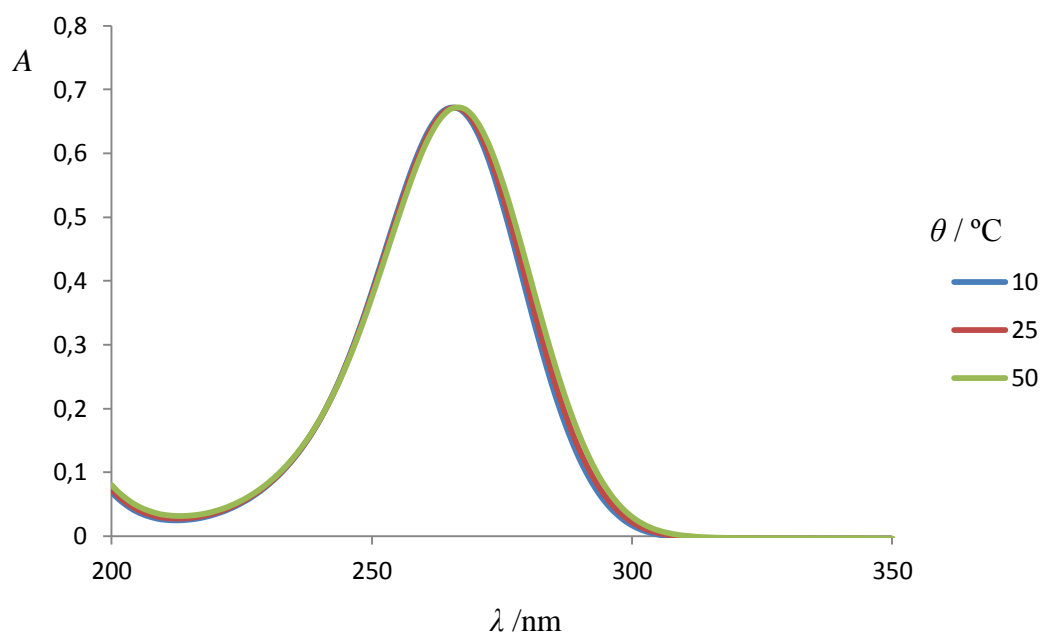
Slika 4.1.1. UV-Vis spektar filtra holmijevog oksida izmjeren a) Hawlett Packard 8453, b) S2000 Ocean Optics Inc., c) Avantes Starline spektrofotometrom

Tablica 4.1.1. Položaj apsorpcijskih maksimuma (λ) u UV-Vis spektru filtra holmijevog oksida

λ / nm			
Hawlett Packard 8453	S2000 Ocean Optics Inc.	Avantes Starline	Allen, 2007.
279	279,00	279,42	$279,3 \pm 0,2$
288	287,21	287,66	$287,6 \pm 0,2$
334	333,45	333,9	$333,8 \pm 0,2$
361	361,24	360,89	$360,8 \pm 0,2$
419	418,56	418,63	$418,5 \pm 0,2$
454	453,71	453,54	$453,4 \pm 0,2$
460	459,05	460,03	$459,9 \pm 0,2$
536	536,12	535,90	$536,4 \pm 0,2$
637	636,30	637,07	$637,5 \pm 0,2$

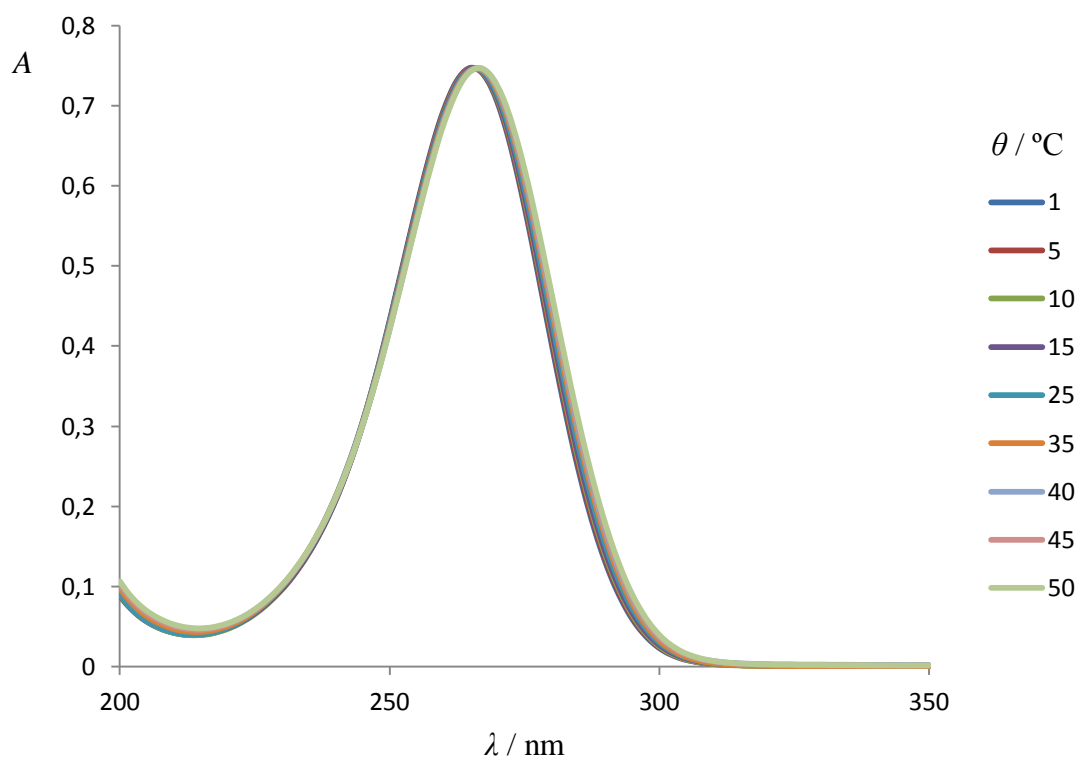


Slika 4.1.2. UV-Vis spektar vodene otopine kalijevog dikromata (60 mg/L) na različitim temperaturama u kiveti debljine 10 mm izmjeren Hawlett Packard 8453 spektrofotometrom

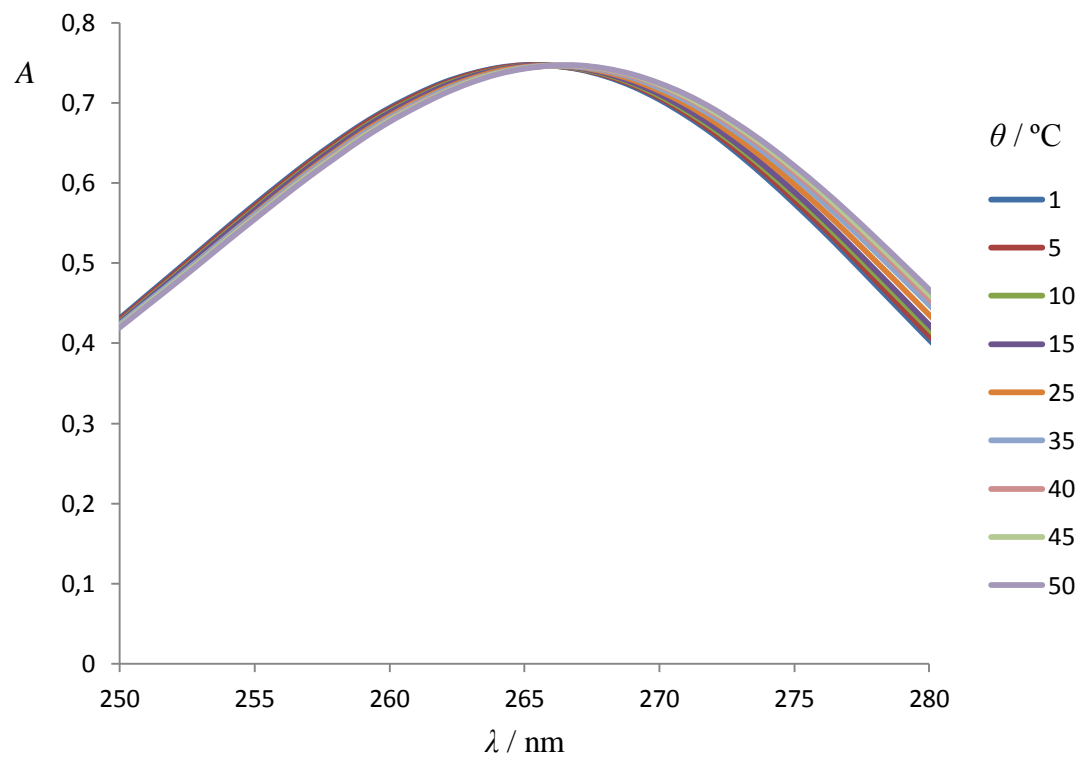


Slika 4.1.3. UV- spektar askorbata ($5 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³, H₂O) na različitim temperaturama u kiveti debljine 0,1 mm izmjeren Hawlett Packard 8453 spektrofotometrom

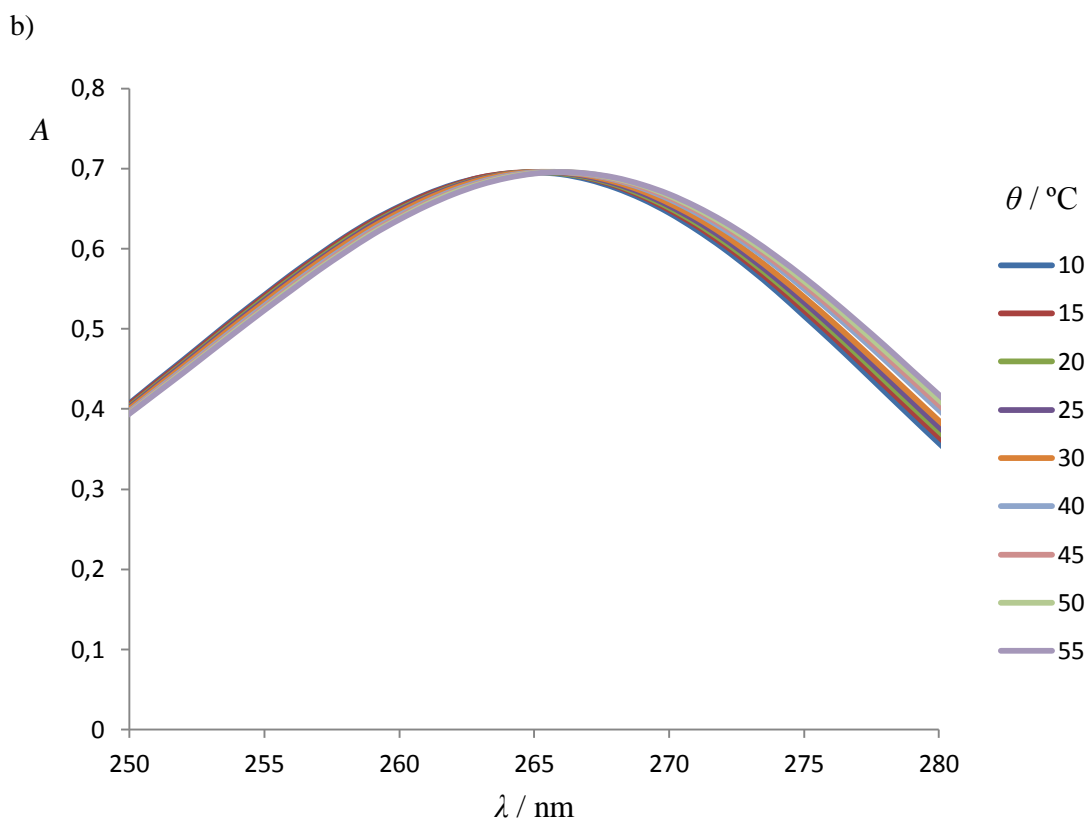
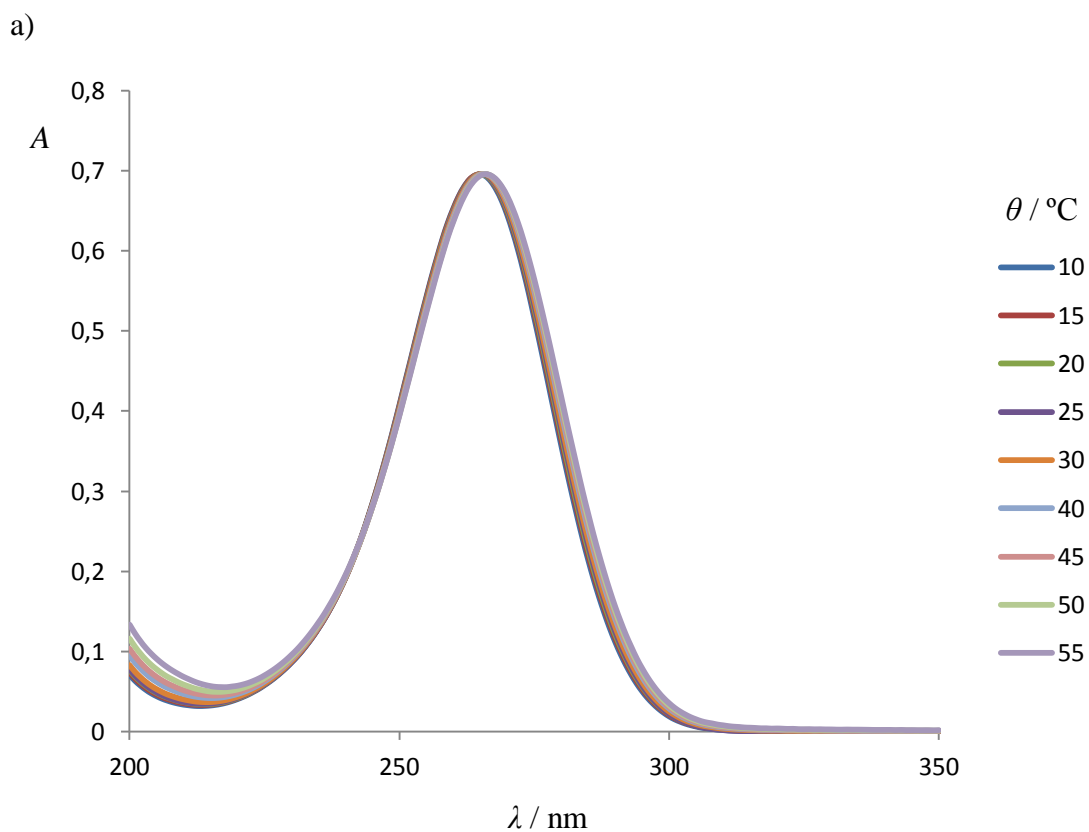
a)



b)

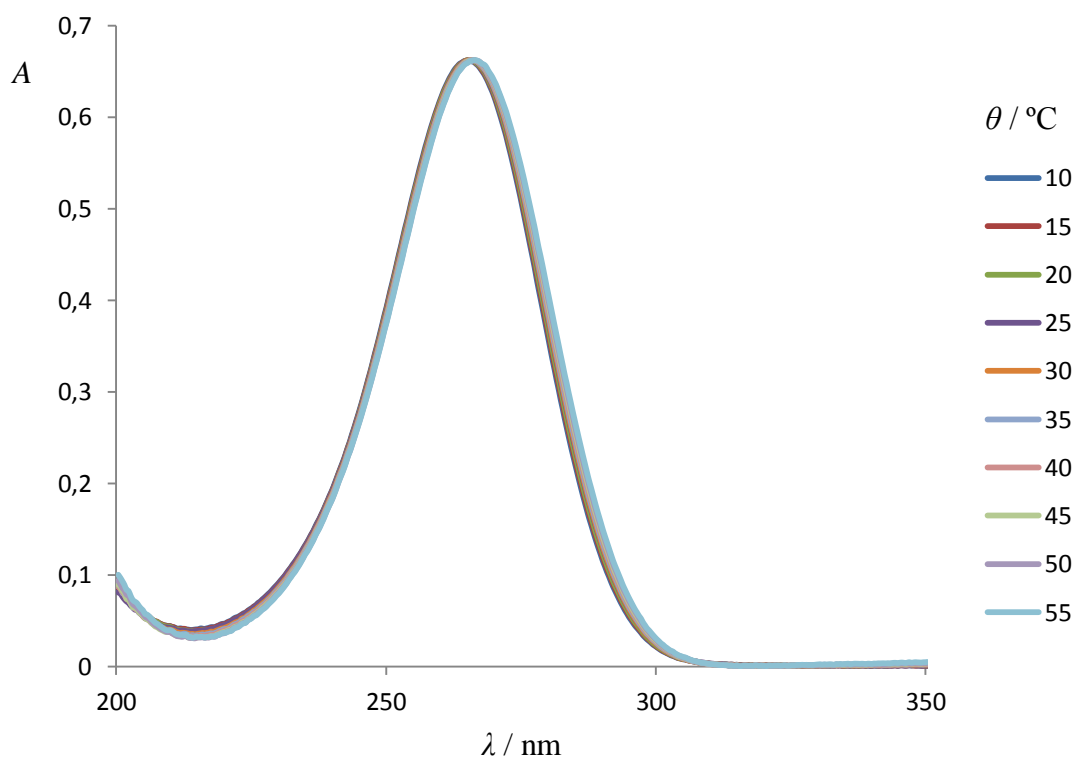


Slika 4.1.4. a) UV- spektar askorbata ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, H_2O) na različitim temperaturama u kiveti debljine 10 mm izmjeren Hawlett Packard 8453 spektrofotometrom, b) Uvećani dio UV- spektra

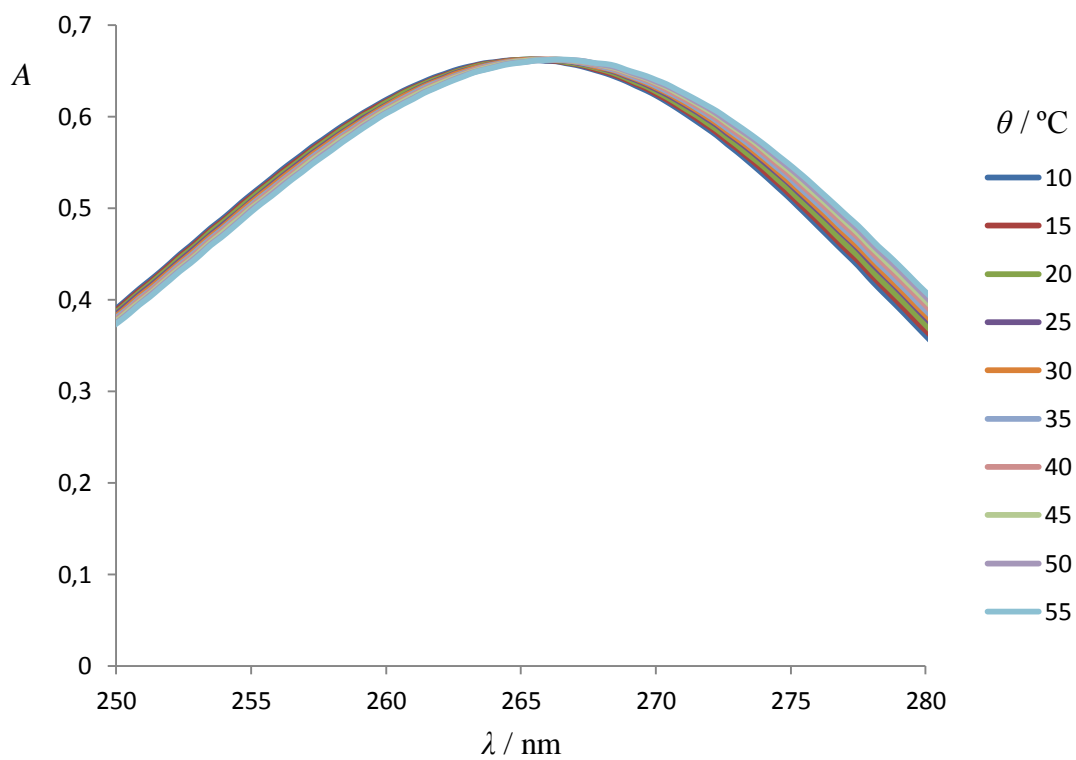


Slika 4.1.5. a) UV- spektar askorbata ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, D_2O) na različitim temperaturama u kiveti debljine 10 mm izmjeren Hawlett Packard 8453 spektrofotometrom, b) Uvećani dio UV- spektra

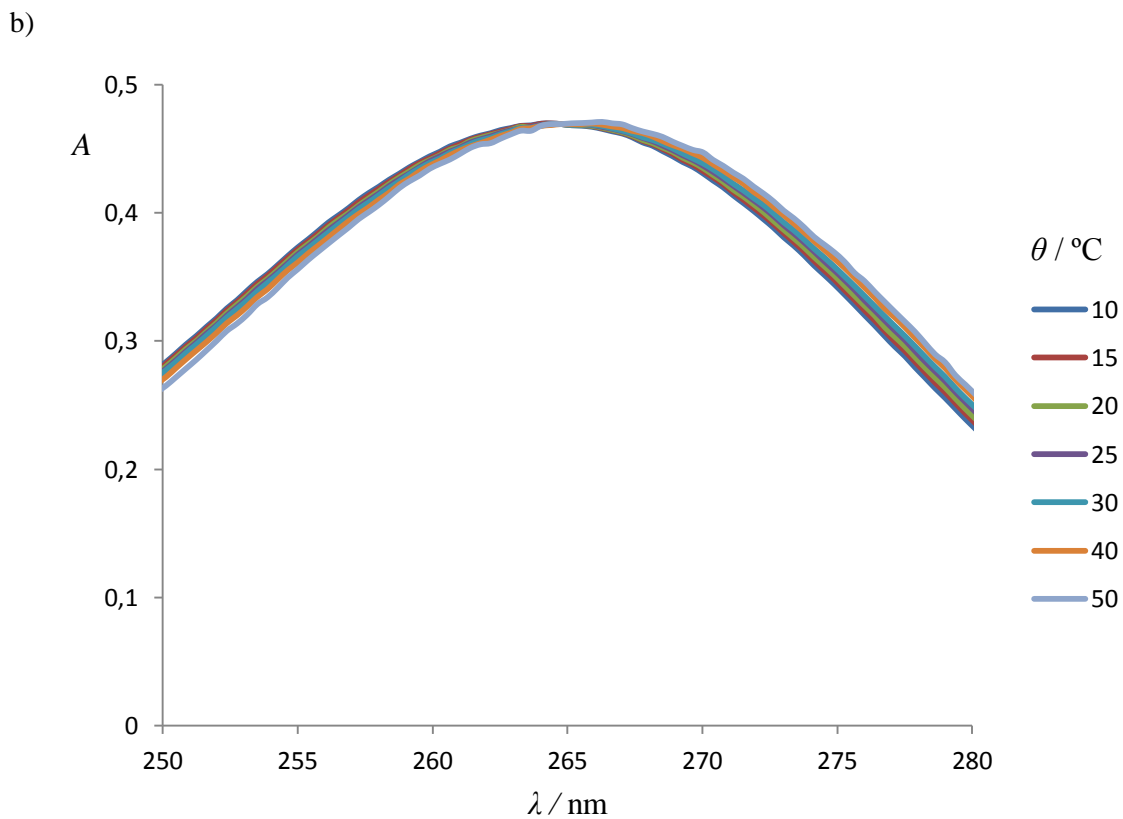
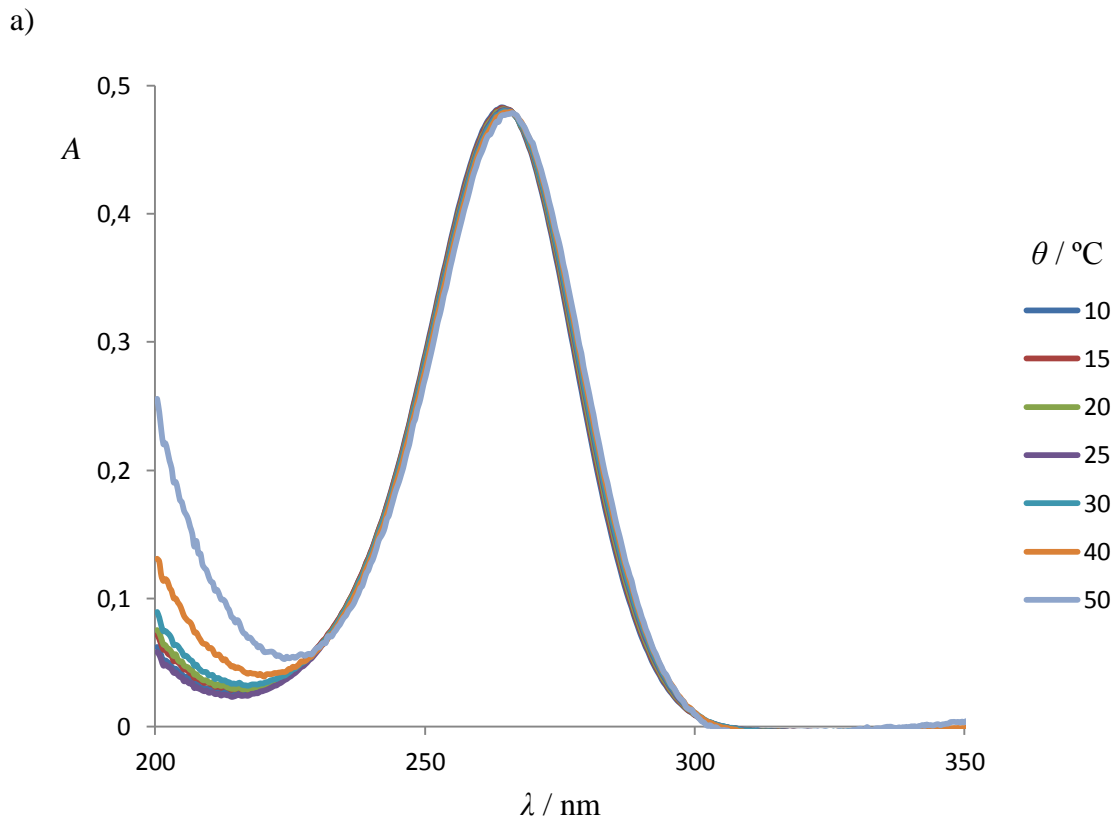
a)



b)

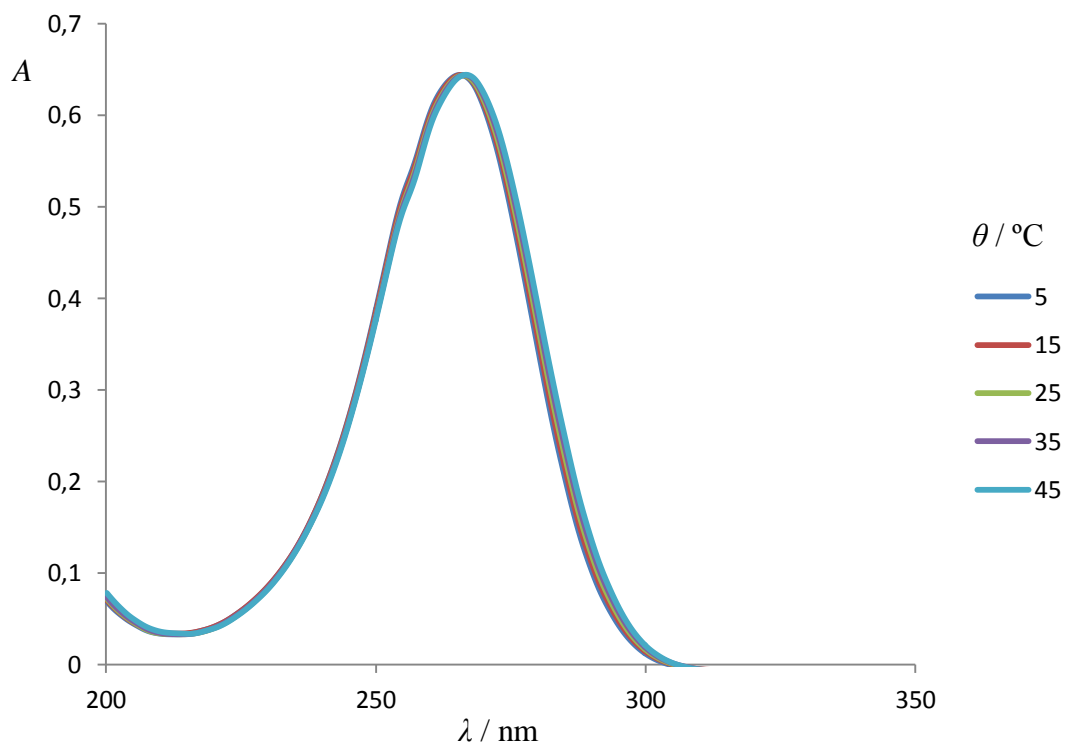


Slika 4.1.6. a) UV- spektar askorbata ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, H_2O) na različitim temperaturama u kiveti debljine 10 mm izmjeren S2000 Ocean Optics Inc. spektrofotometrom, b) Uvećani dio UV- spektra

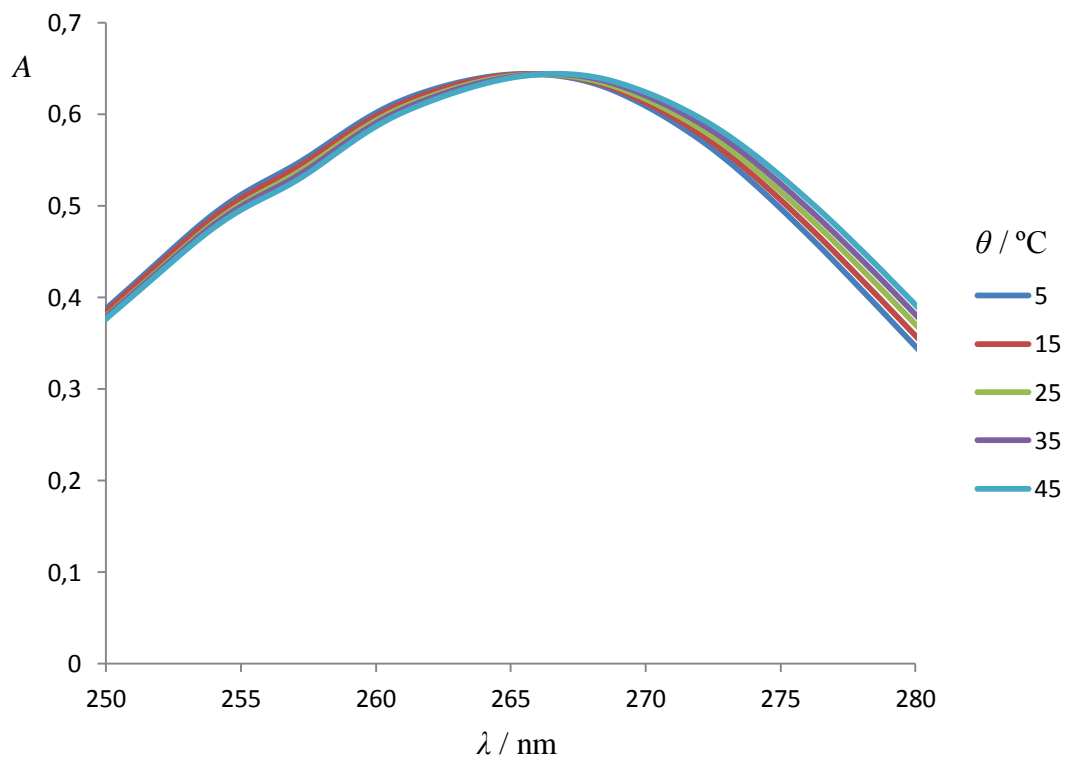


Slika 4.1.7. a) UV- spektar askorbata ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, D_2O) na različitim temperaturama u kiveti debljine 10 mm izmjeren S2000 Ocean Optics Inc. spektrofotometrom, b) Uvećani dio UV- spektra

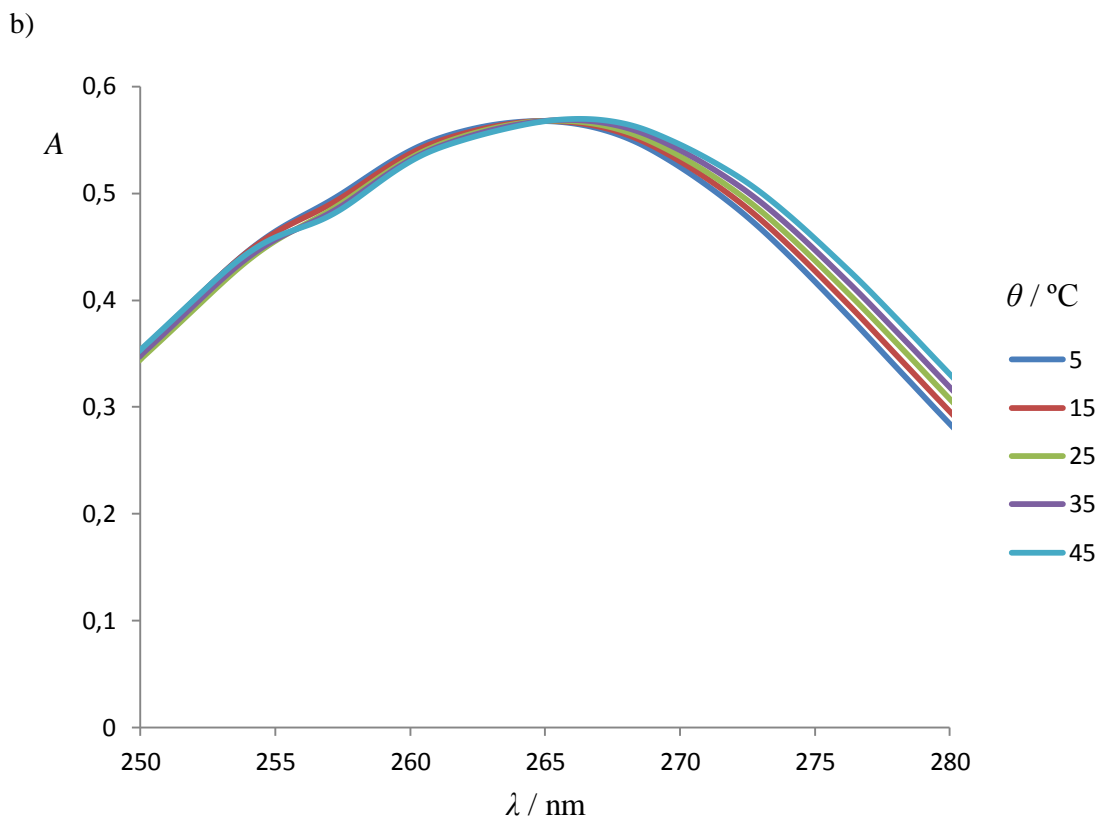
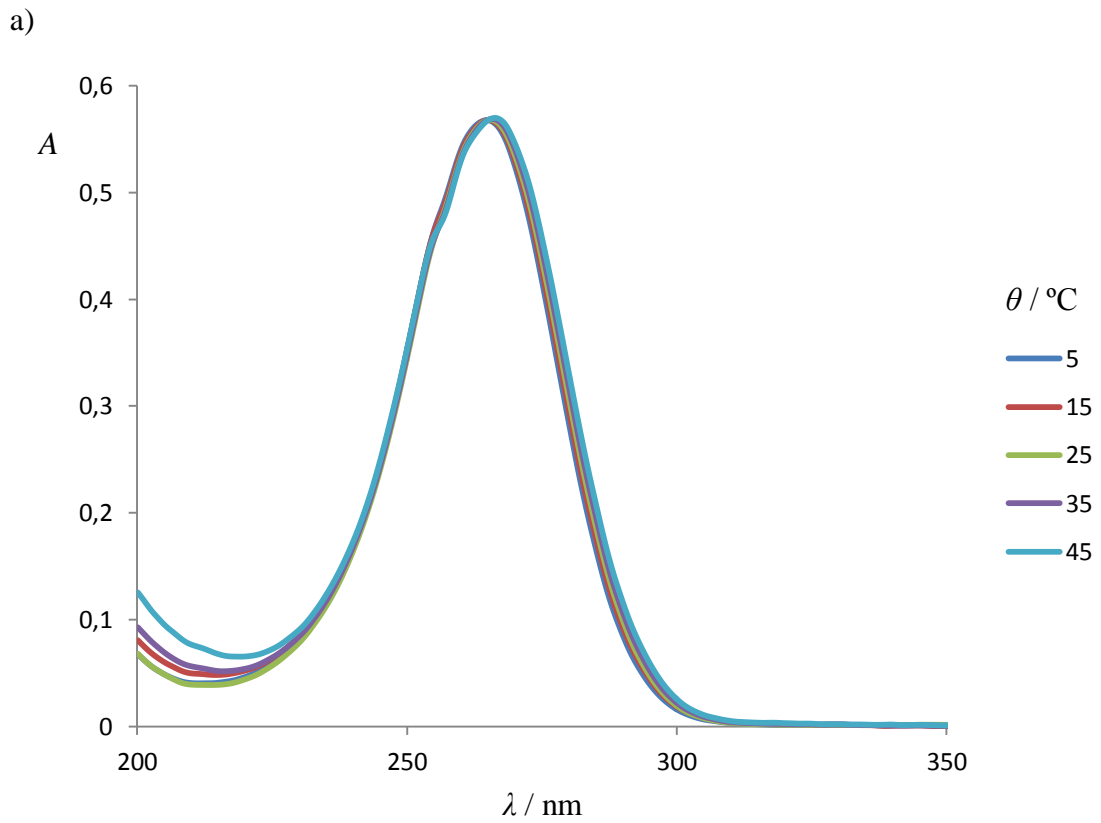
a)



b)



Slika 4.1.8. a) UV- spektar askorbata ($5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³, H₂O) na različitim temperaturama u kiveti debljine 10 mm izmjeren Avantes Starline spektrofotometrom, b) Uvećani dio UV- spektra



Slika 4.1.9. a) UV- spektar askorbata ($5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$, D_2O) na različitim temperaturama u kiveti debljine 10 mm izmjeren Avantes Starline spektrofotometrom, b) Uvećani dio UV- spektra

Tablica 4.1.2. Položaj apsorpcijskog maksimuma (λ_{\max}) UV-spektra askorbata ($5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³) u vodi i teškoj vodi pri različitim temperaturama (θ) u kiveti debljine 10 mm

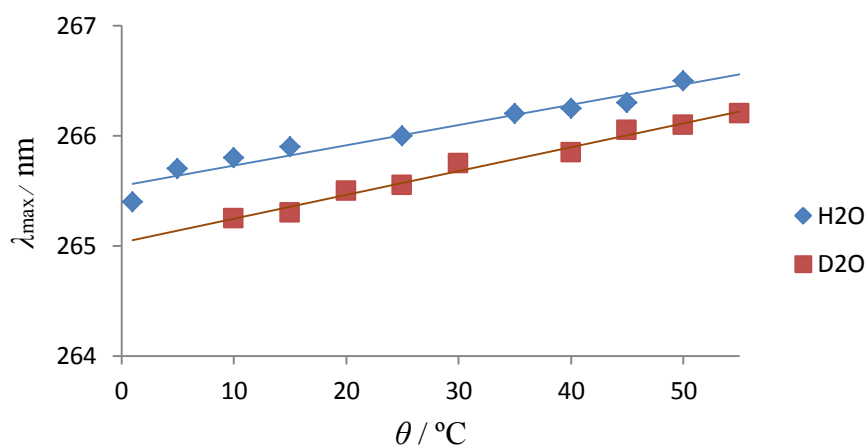
$\theta / ^\circ\text{C}$	Hawlett Packard		S2000 Ocean Optics Inc.		Avantes Starline	
	$\lambda_{\max, \text{H}_2\text{O}} / \text{nm}^{\text{a}}$	$\lambda_{\max, \text{D}_2\text{O}} / \text{nm}^{\text{b}}$	$\lambda_{\max, \text{H}_2\text{O}} / \text{nm}^{\text{c}}$	$\lambda_{\max, \text{D}_2\text{O}} / \text{nm}$	$\lambda_{\max, \text{H}_2\text{O}} / \text{nm}$	$\lambda_{\max, \text{D}_2\text{O}} / \text{nm}$
1	265,40					
5	265,70				265,57	264,82
10	265,80	265,25	265,15	264,40		
15	265,90	265,30	265,53	264,60	265,87	265,04
20		265,50	265,75	264,77		
25	266,00	265,55	265,85	265,00	266,09	265,42
25*	266,00					
30		265,75	266,00	265,05		
35	266,20		266,05		266,47	265,79
40	266,25	265,85	266,10	265,53		
45	266,30	266,05	266,28		266,70	266,32
50	266,50	266,10	266,50	266,28		
55		266,20	266,55			

* izmjereno u kiveti debljine 0,1 mm, pH= 7,040, ^a pH= 7,130, ^b pH= 7,308, ^c pH= 7,317

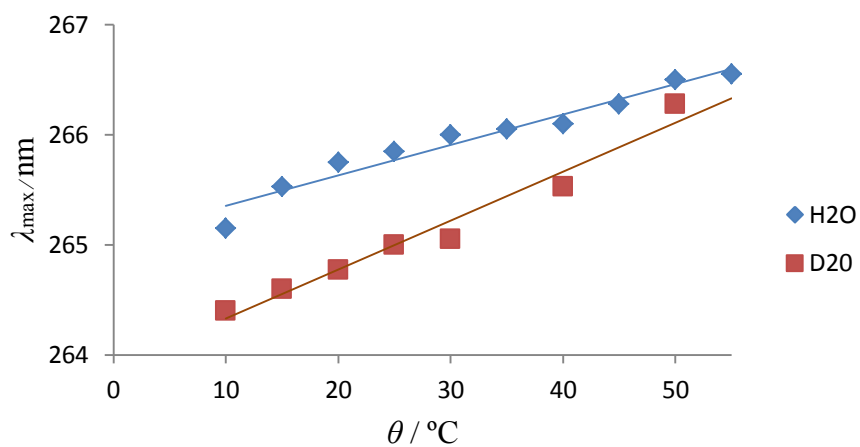
Tablica 4.1.3. Širina apsorpcijske vrpce na polovici visine (w) UV- spektra askorbata u vodi i teškoj vodi pri različitim temperaturama (θ) u kiveti debljine 10 mm

$\theta / ^\circ\text{C}$	Hawlett Packard		S2000 Ocean Optics Inc.		Avantes Starline	
	$w_{\text{H}_2\text{O}} / \text{nm}$	$w_{\text{D}_2\text{O}} / \text{nm}$	$w_{\text{H}_2\text{O}} / \text{nm}$	$w_{\text{D}_2\text{O}} / \text{nm}$	$w_{\text{H}_2\text{O}} / \text{nm}$	$w_{\text{D}_2\text{O}} / \text{nm}$
1	33,1					
5	33,2				33,6	33,0
10	33,2	32,7	33,5	32,7		
15	33,5	32,9	33,7	32,9	33,8	33,5
20		33,1	33,9	32,9		
25	33,9	33,1	34,1	33,0	33,9	33,8
30		33,4	34,1	33,2		
35	34,3		34,2		34,4	34,1
40	34,3	33,8	34,3	33,3		
45	34,7	34,0	34,4		34,6	35,0
50	34,8	34,1	34,6	33,3		
55		34,4	34,7			

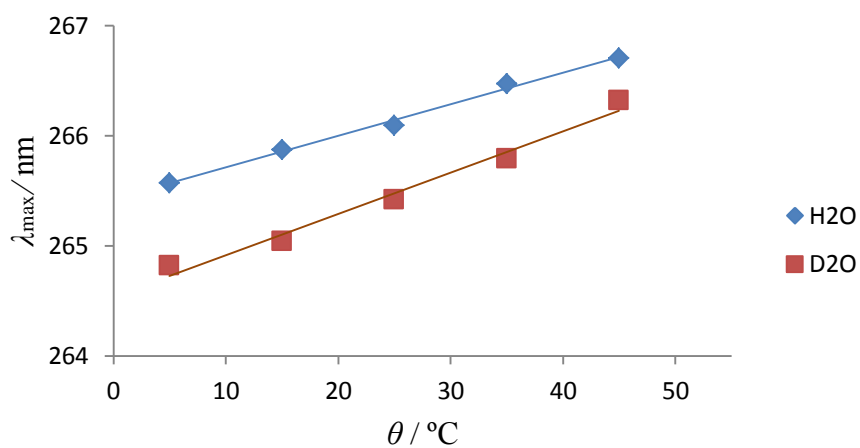
a)



b)

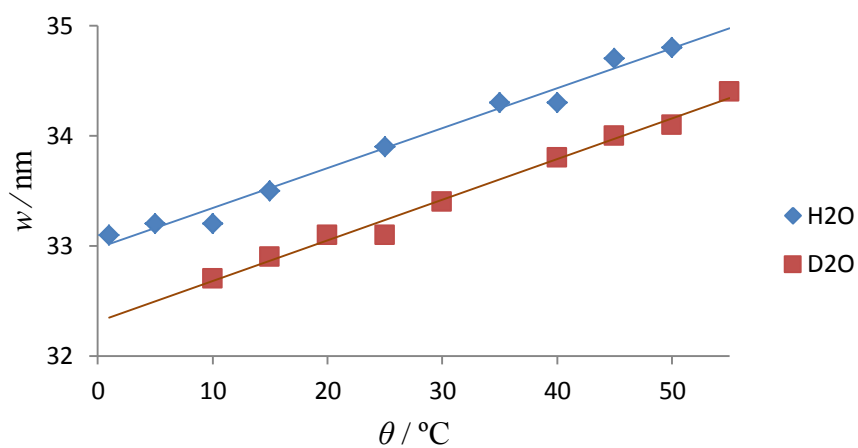


c)

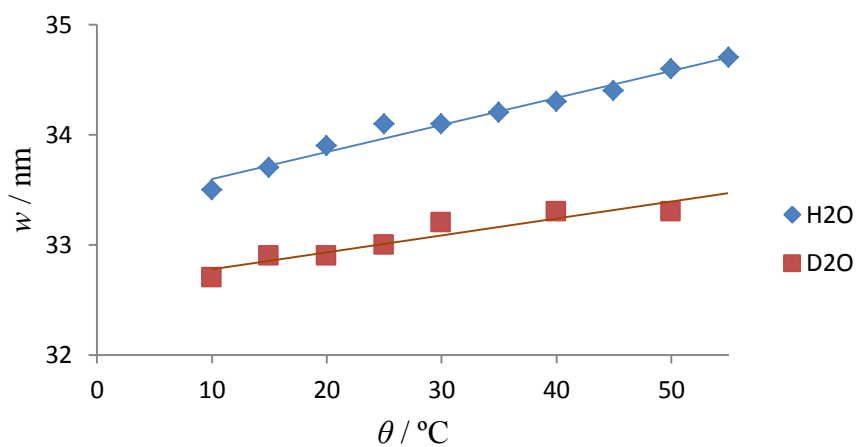


Slika 4.1.10. Položaj apsorpcijskog maksimuma (λ_{max}) na različitim temperaturama (θ) izmjeren a) Hawlett Packard 8453, b) S2000 Ocean Optics Inc., c) Avantes Starline spektrofotometrom

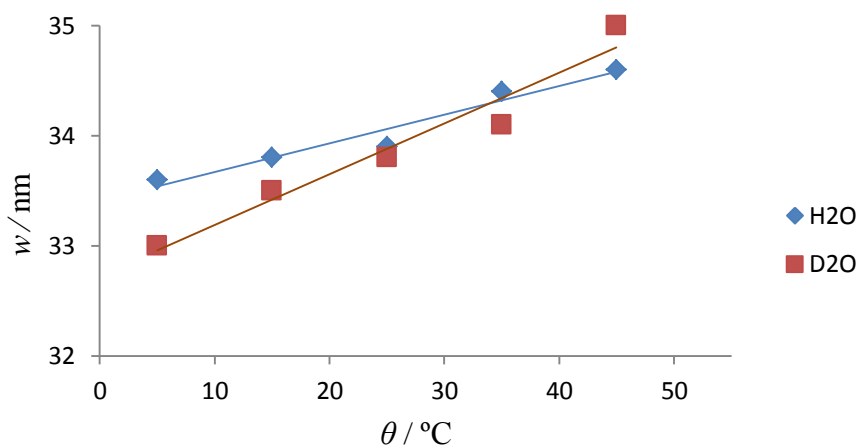
a)



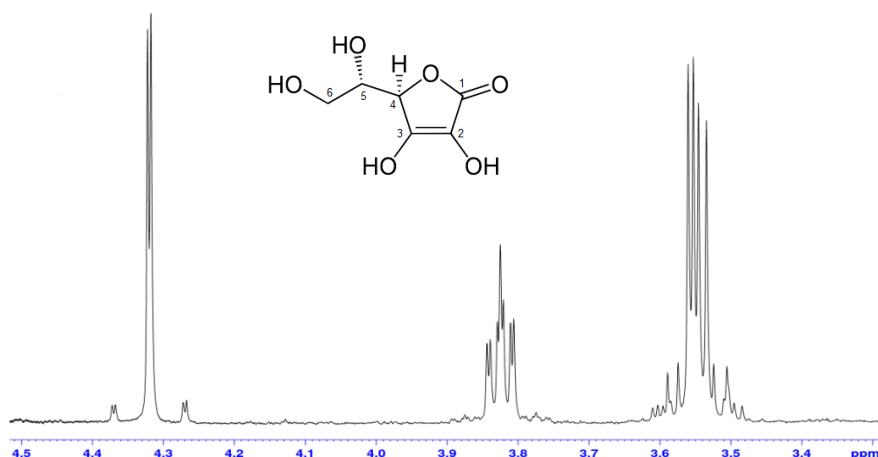
b)



c)



Slika 4.1.11. Širina apsorpcijske vrpce spektra na polovici visine (w) na različitim temperaturama (θ) izmjerena a) Hawlett Packard 8453, b) S2000 Ocean Optics Inc., c) Avantes Starline spektrofotometrom



Slika 4.1.12. ¹H NMR spektar otopine askorbata (0,1 mol/dm³) u D₂O

Tablica 4.1.4. Relaksacijska vremena (*TI*) linija u ¹H NMR spektru askorbata

	δ / ppm	<i>TI</i> / s	<i>TI</i> srednja vrijednost / s
99 % D ₂ O	4,32199	5,038 (2,881)	5,0075
	4,31809	4,977 (3,029)	(¹ H jezgre na C4)
	3,84434	4,592 (2,341)	
	3,83946	4,7 (2,465)	
	3,82969	4,723 (2,335)	4,822
	3,82481	4,952 (2,602)	(¹ H jezgre na C5)
	3,82090	5,272 (2,978)	
	3,81113	4,839 (2,333)	
	3,80625	4,677 (2,114)	
	3,5601	1,454 (0,5343)	
	3,55326	1,76 (0,6372)	1,5875
	3,54545	1,446 (0,5629)	(¹ H jezgre na C6)
	3,5347	1,69 (0,6012)	
	10 % D ₂ O + 90 % H ₂ O	4,31711	2,813 (1,317)
4,31223		2,198 (0,8206)	(¹ H jezgre na C4)
3,835555		0,5908 (0,1762)	0,6012
3,82188		0,6315 (0,1941)	(¹ H jezgre na C5)
3,80322		0,5813 (0,1644)	
3,55619		0,4808 (0,1406)	
3,54838		0,4802 (0,1341)	0,4655
3,54154		0,4591 (0,1294)	(¹ H jezgre na C6)
3,52982	0,4419 (0,1299)		

4.2. Rasprava

Mjerenja UV-spektara koja su se provela u okviru ovog diplomskog rada zahtijevaju vrlo točna mjerenja te se u tu svrhu prvo procijenila pogreška i utvrdile mjerne karakteristike sva tri korištena UV-Vis spektrofotometra. Na temelju podataka i specifikacije proizvođača te dodatnih provedenih mjerenja, utvrđeno je da korišteni spektrofotometri imaju rezoluciju u rasponu 0,2-1,0 nm, osjetljivost u mjerenju absorbancije u rasponu 0,001-0,0001, te da je izmjerena absorbancija linearna s koncentracijom u rasponu od 0,001-1,2 jedinica. Mjerenjem apsorpcijskih UV-Vis spektra filtra holmijevog oksida, slika 4.1.1., standarda koji se koristi za određivanje i kalibraciju valnih duljina monokromatora spektrofotometra, utvrđeno je da u rasponu od 250-390 nm sva tri korištena spektrofotometra pokazuju zanemarivo odstupanje u određivanju valne duljine, Tablica 4.1.1.

Mjerenje UV-Vis spektara otopine kalijevog dikromata pri različitim temperaturama u rasponu od 15 °C do 50 °C, Slika 4.1.2., pokazuju da s promjenom temperature nema znatnije mjerljive promjene u položaju apsorpcijskog maksimuma ili širine apsorpcijske vrpce u spektru ovoga iona. Za razliku od spektra kalijevog dikromata, izmjereni UV-Vis spektar askorbata pri različitim temperaturama pokazuje znatne promjene, Slike 4.1.3.-4.1.11. i Tablice 4.1.2. i 4.1.3., o čemu slijedi detaljna rasprava.

Shukla i Mishra izmjerili su UV-Vis spektre askorbata i utvrdili da se položaj apsorpcijskog maksimuma mijenja s promjenom koncentracije askorbata u vodenoj otopini što se pripisalo promjeni omjera askorbata i nedisocirane askorbinske kiseline u otopini. U ovdje prikazanim mjerenjima pokazalo se da nema promjene apsorpcijskog maksimuma s promjenom koncentracije askorbata. Na slikama 4.1.3. i 4.1.4. prikazani su spektri askorbata u vodenoj otopini pri koncentracijama od $5 \cdot 10^{-3}$ i $5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ u kivetama debljine 1,000 i 0,010 cm, redom. Iz ovih mjerenja vidljivo je da se pri promjeni koncentracije za dva reda veličine na istoj temperaturi apsorpcijski maksimum nalazi na 266 nm (Tablica 4.1.2.). *pKa* za disocijaciju askorbinske kiseline iznose 4,25 i 10,79 za prvi i drugi stupanj disocijacije (Berg, 2015). Ove vrijednosti su za otprilike tri reda veličine udaljene od vrijednosti pH 7,0-7,3 pri kojem su provedena sva ovdje prikazana mjerenja, te se može očekivati udio nedisocirane askorbinske kiseline ili askorbat dianiona manji od 0,1 %. Obzirom na slabija apsorpcijska svojstva i vrlo mali udio nedisocirane askorbinske kiseline i askorbat dianiona u uvjetima ovdje prikazanih mjerenja, doprinos ovih specija ukupnom UV-Vis spektru u otopini može se zanemariti te se izmjereni spektri pri pH 7,0-7,3 mogu u potpunosti pripisati askorbatu, što se također može zaključiti i iz spektara na Slikama 4.1.3. i 4.1.4.

UV-Vis spektri askorbata u H₂O i D₂O pri različitim temperaturama izmjereni s tri različita spektrofotometra prikazani su na Slikama 4.1.4. - 4.1.9. Mjerenjem u D₂O dolazi do izotopne supstitucije, odnosno promjeni se izotopni sastav otapala, molekula oko otopljenog askorbata, te dolazi do zamjene –OH s –OD. Iz dobivenih spektara pažljivo su određeni položaj apsorpcijskog maksimuma i širina apsorpcijske vrpce, te su dobiveni podaci zbirno prikazani u Tablicama 4.1.2. i 4.1.3. Ovisnost položaja apsorpcijskog maksimuma i širine apsorpcijske vrpce o temperaturi za otopinu askorbata u H₂O i D₂O prikazana je na Slikama 4.1.10. i 4.1.11. Iz prikazanih podataka vidljivo je da je položaj apsorpcijskog maksimuma za povećanje temperature od 50 °C pomaknut za oko 1,1 nm prema većim valnim duljinama (nižim energijama) za otopine askorbata u H₂O i D₂O te da razlika u položaju apsorpcijskog maksimuma za otopinu askorbata u H₂O i D₂O pri istoj temperaturi iznosi oko 0,7 nm, pri čemu je položaj apsorpcijskog maksimuma u D₂O pomaknut prema nižim valnim duljinama. Širina apsorpcijske vrpce za promjenu temperature od 50 °C povećala se za oko 1,2 nm za otopinu askorbata u H₂O i D₂O. Na istoj temperaturi širina apsorpcijske vrpce za otopinu askorbata u H₂O je za 0,8 nm veća od širine apsorpcijske vrpce za otopinu askorbata u D₂O. Iako su dobivene vrijednosti pomaka položaja apsorpcijskog maksimuma i promjene širine apsorpcijske vrpce malog iznosa i reda veličine rezolucije korištenih spektrofotometara, podaci dobiveni iz velikog broja izmjerenih i prikazanih spektara pokazuju jasan trend ukazujući na smjer promjene. Iz dobivenih podataka može se zaključiti da sa sniženjem temperature i izotopnom supstitucijom H₂O s D₂O dolazi do pomaka položaja apsorpcijskog maksimuma prema nižim valnim duljinama (višim energijama) i sužavanja širine apsorpcijske vrpce.

Uobičajena interpretacija UV-Vis spektara uključuje spregnute elektronske i vibracijske prijelaze pri čemu je vjerojatnost prijelaza, a time i intenzitet apsorpcije, između ostalog, razmjerna i integralu prekrivanja vibracijskih valnih funkcija temeljnog i pobuđenog elektronskog stanja molekule (Atkins i de Paula, 2014). U okviru ovakve interpretacije, svaka promjena elektronske i vibracijske energije molekule, do koje može doći i radi promjene okoline odnosno solvatacije molekule, odražava se i na promjenu spektra. Apsorpcijski maksimum u UV spektru askorbata na 265 nm pripisuje se elektronskom $\pi \rightarrow \pi^*$ prijelazu (Banipal i sur., 2016; Berg, 2015; Babbagh i sur., 2014; Ogata i Kosugi, 1970). π orbitala koja sudjeluju u ovom elektronskom prijelazu uključuju ugljikove atome C(1), C(2) i C(3) γ -laktonskog prstena (Slika 1.1.1.1.) i kisikove atome hidroksilnih skupina vezanih na te C atome pri čemu se glavnina elektronske gustoće, koja se odnosi na ovu molekulsku π orbitalu,

nalazi iznad i ispod ravnine γ -laktorskog prstena. Poznato je da je na sobnoj temperaturi u prosjeku oko 40 % molekula vode međusobno povezano vodikovim vezama koje se stalno reorganiziraju tvoreći ponekad vrlo kratko i složeniji kavez međusobno povezanih molekula (Ball, 2008). Također se može pretpostaviti da u vodenoj otopini askorbata hidroksilne skupine laktorskog prstena i postraničnog lanca sudjeluju u stvaranju vodikovih veza s okolnim molekulama vode (Niazazari i sur., 2013; Bichara i Brandán, 2013), te se tako reorganizacija vodikovih veza otapala može prenesti i na molekulu askorbata pri čemu se može očekivati i promjena vibracijske energije molekule. Snižavanjem temperature i izotopnom supstitucijom usporava se reorganizacija vodikovih veza otapala te otapala i askorbata. Opažena promjena spektra prema nižim valnim duljinama (većim energijama prijelaza) do koje dolazi zbog snižavanja temperature i izotopne supstitucije mogla bi se dovesti u vezu s gore navedenom oslabljenom solvatacijom i posljedičnom promjenom vibracijske i elektronske energije askorbata.

Druga mogućnost interpretacije izmjerene promjene spektra je promjena solvatacije u blizini π orbitale odgovorne za elektronski prijelaz unutar molekule askorbata. Ova π orbitala nalazi se uglavnom iznad i ispod ravnine laktorskog prstena i izložena je okolini odnosno molekulama vode. Snižavanjem temperature i izotopnom supstitucijom usporava se reorganizacija vodikovih veza molekula otapala, molekule vode ostaju dulje međusobno povezane unutar otapala te se time smanjuje i interakcija askorbata s okolnim molekulama vode što bi moglo dovesti do promjene elektronske i vibracijske energije askorbata.

Mjerenja spinsko-okolinskog relaksacijskog vremena T_1 za ^1H jezgre askorbata u skladu su s gore navedenim. ^1H NMR spektar askorbata u 99 % D_2O prikazan je na slici 4.1.12. Spektar je višeg reda (Lohmann i sur., 1984), a grupe linija na 4,32, 3,83 i 3,55 ppm pripisuju se ^1H jezgri na C4, ^1H jezgri na C5 i dvijema ^1H jezgrama na C6 atomu, redom (Reid, 1989). Spinsko-okolinska relaksacijska vremena T_1 za ^1H jezgre askorbata u 99 % D_2O i 10 % D_2O + 90 % H_2O na temperaturi od 19,7 °C prikazana su u tablici 4.1.4. T_1 relaksacijska vremena za prethodno spomenute ^1H jezgre askorbata iznose 5,01, 4,82 i 1,59 s u 99 % D_2O i 2,51, 0,60 i 0,47 s u 10 % D_2O + 90 % H_2O . T_1 odražava relaksaciju vektora magnetizacije prema termodinamičkoj ravnoteži u vanjskom magnetskom polju i ovisi, između ostalog, i o termalnom (vibracijskom i rotacijskom) gibanju atomskih jezgri okoline. Uzevši u obzir uobičajenu interpretaciju T_1 relaksacijskih vremena (Salvi, 2014), povećano termalno gibanje okoline stimulira relaksaciju, pa se npr. kod brze reorganizacije vodikovih veza mogu očekivati kraća T_1 relaksacijska vremena. Iz tablice 4.1.4. vidi se da su T_1 relaksacijska vremena za ^1H jezgre askorbata u otapalu 10 % D_2O + 90 % H_2O kraća za oko tri puta u

odnosu na ^1H jezgre u 99 % D_2O , što ukazuje na sporije termalno gibanje odnosno sporiju reorganizaciju vodikovih veza u 99 % D_2O .

Izmjerena promjena UV spektra sa snižavanjem temperature i izotopnom supstitucijom, odnosno promjena elektronske i vibracijske energije askorbata s promjenom solvatacije i brzine reorganizacije okolnih molekula otapala može se dovesti u vezu i s reaktivnosti askorbata. Pri apsorpciji UV zračenja askorbata dolazi do $\pi \rightarrow \pi^*$ prijelaza pri čemu u apsorpciji sudjeluje ista π orbitala askorbata koja je uključena i u reakcijama prijenosa naboja (Brala i sur., 2014; Kumar i sur., 2013; Sajenko i sur., 2011; Karković i sur., 2011; Warren i Mayer, 2010).

Dobiveni eksperimentalni podaci ukazuju na mogućnost moduliranja reaktivnosti askorbata promjenom načina solvatacije što može biti od koristi u istraživanjima reakcija prijenosa naboja u kojima sudjeluje askorbat u složenim procesima koji se odvijaju u biološkim sustavima.

5. ZAKLJUČAK

- Pomoću spektroskopskih standarda utvrđene su mjerne karakteristike i pogreške mjerenja korištenih UV-Vis spektrofotometra. Mjerenjem UV-Vis spektra dikromata uočeno je da kod ovog iona nema promjena u položaju apsorpcijskog maksimuma i u širini apsorpcijske vrpce spektra pri različitim temperaturama.
- Mjerenjem UV-Vis spektra pri koncentraciji askorbata od $5 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³ i $5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ utvrđeno je da položaj apsorpcijskog maksimuma ne ovisi o koncentraciji askorbata, suprotno do sada poznatim rezultatima u literaturi.
- Mjerenjem UV-Vis spektra pri koncentraciji askorbata od $5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ pokazano je da s povećanjem temperature u rasponu od 50 °C dolazi do povećanja širine apsorpcijske vrpce za 1,2 nm i pomaka apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama za 1,1 nm.
- Iz mjerenja UV-Vis spektra askorbata u H₂O i D₂O pokazalo se da je položaj apsorpcijskog maksimuma u teškoj vodi pomaknut za 0,7 nm prema nižim valnim duljinama, a širina apsorpcijske vrpce manja je za 0,8 nm u odnosu na UV-Vis spektar otopine askorbata u H₂O na istoj temperaturi.
- Mjerenjem spinsko-okolinskih relaksacijskih vremena (T₁) izmjerenih pomoću NMR spektrometra za ¹H jezgre askorbata utvrđeno je da su T₁ u otapalu 10 % D₂O + 90 % H₂O kraća za oko tri puta u odnosu na T₁ istih ¹H jezgri u 99 % D₂O.
- Dobiveni rezultati pripisani su djelovanju usporavanja reorganizacije vodikovih veza između otapala i askorbata u otopini do koje dolazi radi snižavanja temperature ili izotopne supstitucije, pri čemu onda dolazi do promjene solvatacije, odnosno promjene vibracijske i elektronske energije askorbata koja uključuje i π orbitalu što se odražava u izmjerenim UV-Vis spektrima.
- Obzirom da π orbitala askorbata odgovorna za π→π* elektronski prijelaz sudjeluje i u reakcijama prijenosa naboja, opažene promjene UV-Vis spektra mogu se dovesti u vezu s reaktivnosti askorbata što može biti od koristi u istraživanjima procesa prijenosa naboja koji se odvijaju u biološkim sustavima.

6. LITERATURA

Allen DW. Holmium Oxide Glass Wavelength Standards. *J Res Natl Stand Technol*, 2007, 112, 303-306.

Atkins P, de Paula J. Atkins' Physical Chemistry. 10. izdanje, Oxford, Oxford University Press, 2014, str. 431-435, 513-548.

Banipal PK, Sharma M, Banipal TS. Volumetric and UV absorption studies on understanding the solvation behavior of polyhydroxy solutes in l-ascorbic acid (aq) solutions at T= (288.15 to 318.15) K. *Food Chem*, 2016, 192, 765–774.

Ball P. Water as an Active Constituent in Cell Biology. *Chem Rev*, 2008, 108, 74–108.

Berg RF. Investigation of L(+)-Ascorbic Acid with Raman Spectroscopy in Visible and UV Light. *Appl Spectrosc Rev*, 2015, 50, 193-239.

Bichara LC, Brandán SA. Hydration of species derived from ascorbic acid in aqueous solution. An experimental and theoretical study by using DFT calculations. *J Mol Liq*, 2013, 181, 34–43.

Brala CJ, Fabijanić I, Marković AK, Pilepić V. The average local ionization energy and Fukui function of L-ascorbate, the local reactivity descriptors of antioxidant reactivity. *Comp Theor Chem*, 2014, 1049, 1–6.

Brody T. Nutritional Biochemistry. 2. izdanje, New York, Academic Press, 1999, str. 617-628.

Dabbagh HA, Azami F, Farrokhpour H, Chermahini AN. UV-Vis, NMR and FT-IR spectra of tautomers of vitamin C. Experimental and DFT calculations. *J Chil Chem Soc*, 2014, 59, 2588–2594.

Davies MB, Austin J, Partridge DA. Vitamin C: Its Chemistry and Biochemistry. Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 1991.

Demianenko E, Ilchenko M, Grebenyuk A, Lobanov V, Tsendra O. A theoretical study on ascorbic acid dissociation in water clusters. *J Mol Model*, 2014, 20, 2128-2132.

Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad Res Comms*, 1989, 9, 1-32.

- Higson FK, Kohen R, Chevion M. Iron enhancement of ascorbate toxicity. *Free Rad Res Comms*, 1988, 5, 107-115.
- Hvoslef J. The crystal structure of L-ascorbic acid, „vitamin C“ I. The X-ray analysis. *Acta Crystallogr*, 1968, B24, 23-35.
- Johnston CS, Steinberg FM, Rucker RB. Ascorbic Acid. U: Handbook of Vitamins. Zemljeni J, Suttie JW, Gregory III JF, Stover PJ, urednici, Boca Raton, 2014, str. 516-536.
- Karković A, Brala CJ, Pilepić V, Uršić S. Solvent-induced hydrogen tunnelling in ascorbate proton-coupled electron transfers. *Tetrahedron Lett*, 2011, 52, 1757–1761.
- Kumar V, Kishor S, Ramaniah LM. Understanding the antioxidant behavior of some vitamin molecules: a first-principles density functional approach. *J Mol Model*, 2013, 19, 3175–3186.
- Lohmann W, Beinhauer K, Sapper H. 1H- and 13C-NMR spectra of ascorbate and isoascorbate. *Sci Nat*, 1984, 71, 477–478.
- Markarian SA, Sargsyan HR. Electronic absorption spectra of ascorbic acid in water and water-dialkylsulfoxide mixtures. *J Appl Spectrosc*, 2011, 78, 11-15.
- Niazazari N, Zatikyan AL, Markarian SA. Ab initio and DFT study of hydrogen bond interactions between ascorbic acid and dimethylsulfoxide based on FT-IR and FT-Raman spectra. *Spectrochim Acta Mol Biomol Spectrosc*, 2013, 110, 217–225.
- Ogata Y, Kosugi Y. Ultraviolet spectra of l-ascorbic acid and cupric ascorbate complex. *Tetrahedron*, 1970, 26, 4711–4716.
- Pine SH. Organska kemija, prev. Ivo Bregovec, Vladimir Rapić, Zagreb, Školska knjiga, 1994, str. 1078-1084.
- Reichstein T, Grüssner A. Eine ergiebige Synthese der l-Ascorbinsäure (C-Vitamin). *Helv Chim Acta*, 1934, 17, 311-328.
- Reid RS. The Proton NMR Spectrum of Ascorbic Acid. *J Chem Educ*, 1989, 66.
- Rietjens IMCM, Boersma MG, de Haan L, Spenkelink B, Awad HM, Cnubben NHP, van Zanden JJ, van der Woude H, Alink GM, Koeman JH. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2002, 11, 321–333.

Sajenko I, Pilepić V, Uršić S. Modulating Hydrogen Tunnelling in Ascorbate Proton-Coupled Electron Transfers. *Z Phys Chem*, 2011, 225, 805–820.

Salvi N. Dynamic Studies Through Control of Relaxation in NMR Spectroscopy. Lausanne, Springer International Publishing, 2014, str. 10-120.

Samuni A, Aronovitch J, Godinger D, Chevion M, Czapski G. On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. *Eur J Biochem*, 1983, 137, 119-124.

Shukla MK, Mishra PC. Electronic structures and spectra of two antioxidants: uric acid and ascorbic acid. *J Mol Struct*, 1995, 377, 247-259.

Warren JJ, Mayer JM. Tuning of the Thermochemical and Kinetic Properties of Ascorbate by Its Local Environment: Solution Chemistry and Biochemical Implications. *J Am Chem Soc*, 2010, 132, 7784–7793.

Watson DG. Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. London, Churchill Livingstone, 1999, str. 75-94, 145-164.

7.SAŽETAK/SUMMARY

7.1. Sažetak

U ovom diplomskom radu istraživana je učinak temperature i izotopnog sastava otapala na položaj apsorpcijskog maksimuma i širinu apsorpcijske vrpce UV-Vis spektra askorbata, reaktivnog oblika vitamina C u fiziološkim uvjetima. UV-Vis spektri otopine askorbata koncentracije $5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ izmjereni su u vodi i u teškoj vodi u temperaturnom intervalu od 1 °C do 55 °C pomoću tri različita spektrofotometra kojima su prethodno utvrđene mjerne karakteristike. Mjerenjem UV spektra pri koncentraciji askorbata u rasponu od $5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ do $5 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³ utvrđeno je da položaj apsorpcijskog maksimuma ne ovisi o koncentraciji askorbata. Iz dobivenih UV-spektara askorbata u lakoj i teškoj vodi pokazano je da s povećanjem temperature dolazi do povećanja širine apsorpcijske vrpce i pomaka apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama. Ove promjene u temperaturnom rasponu od 50 °C iznose 1,2 nm za širinu apsorpcijske vrpce i 1,1 nm za položaj apsorpcijskog maksimuma. Utvrđene su i razlike u UV-Vis spektru između otopina askorbata u lakoj i teškoj vodi. Položaj apsorpcijskog maksimuma u UV-Vis spektru otopine askorbata u teškoj vodi pomaknut je za 0,7 nm prema nižim valnim duljinama, a širina apsorpcijske vrpce manja je za 0,8 nm u odnosu na UV-Vis spektar otopine askorbata u lakoj vodi na istoj temperaturi. Spinsko-okolinska relaksacijska vremena (T1) izmjerena pomoću NMR spektrometra za ¹H jezgre askorbata u otapalu 10 % D₂O + 90 % H₂O kraća su za oko tri puta u odnosu na T1 istih ¹H jezgri u 99 % D₂O.

Dobiveni rezultati protumačeni su promjenom solvatacije, odnosno promjenom vibracijske i elektronske energije askorbata kao posljedice usporavanja reorganizacije vodikovih veza otapala i askorbata u otopini do koje dolazi radi snižavanja temperature ili izotopne supstitucije. Obzirom da je u ove promjene uključena π orbitala koja sudjeluje i u reakcijama prijenosa naboja, te promjene mogu se dovesti u vezu s reaktivnosti askorbata što može biti od koristi u istraživanjima reakcija prijenosa naboja u kojima sudjeluje askorbat u složenim procesima koji se odvijaju u biološkim sustavima.

7.2. Summary

The effect of temperature and solvent isotopic composition on the position of absorption maximum and width of the absorption band in UV-Vis spectrum of ascorbate, predominant reactive form of vitamin C in physiological conditions, has been studied in this diploma thesis. The UV-Vis spectra of $5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ ascorbate solutions in H₂O and D₂O in the temperature range from 1 to 55 °C have been measured by using three different spectrophotometers with previously determined measuring characteristics. By measuring the UV spectrum of ascorbate solution ranging from $5 \cdot 10^{-3}$ to $5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³, it was found that the position of the absorption band maximum is not dependent on the concentration of ascorbate. From the UV spectra obtained in H₂O and D₂O, it has been shown that increasing the temperature increases the absorption band width and shifts the absorption maximum to higher wavelengths. These changes are 1.2 nm for the of absorption band width and 1.1 nm for the absorption maximum position in the temperature range of 50 °C. Differences in the UV-Vis spectra of the ascorbate solution in H₂O and in D₂O were also found. The absorption maximum position in UV-Vis spectrum of the ascorbate solution in D₂O was shifted by 0.7 nm at lower wavelengths, and the width of the absorption band was 0.8 nm less than the UV-Vis spectrum of ascorbate solution in H₂O at the same temperature. The spin-lattice relaxation times (T₁) measured by NMR spectrometer for ¹H ascorbate nuclei in 10 % D₂O + 90 % H₂O solvent are about the three times shorter than the corresponding T₁ for ¹H nuclei in 99 % D₂O. The obtained results has been interpreted by solvation changes, or by the ascorbate vibrational and electronic states energy changes resulted as a consequence of slowing down the solvent and ascorbate hydrogen bonds reorganization in a solution caused by lowering the temperature or isotopic substitution. Since these changes include the π orbital involved also in charge transfer reactions, these changes may be related also to the ascorbate reactivity what could be useful in research of charge transfer reactions involving ascorbate in complex processes which take place in biological systems.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za fizikalnu kemiju
A.Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

UTJECAJ TEMPERATURE I IZOTOPNE SUPSTITUCIJE NA UV-VIS SPEKTAR ASKORBATA

Silvia Osmak

SAŽETAK

U ovom diplomskom radu istraživana je učinak temperature i izotopne supstitucije zbog otapala na položaj apsorpcijskog maksimuma i širinu apsorpcijske vrpce UV-Vis spektra askorbata, reaktivnog oblika vitamina C u fiziološkim uvjetima. UV-Vis spektri otopine askorbata koncentracije $5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ izmjereni su u vodi i u teškoj vodi u temperaturnom intervalu od 1 °C do 55 °C pomoću tri različita spektrofotometra kojima su prethodno utvrđene mjerne karakteristike. Mjerenjem UV spektra pri koncentraciji askorbata u rasponu od $5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ do $5 \cdot 10^{-3}$ mol/dm³ utvrđeno je da položaj apsorpcijskog maksimuma ne ovisi o koncentraciji askorbata. Iz dobivenih UV-spektara askorbata u lakoj i teškoj vodi pokazano je da s povećanjem temperature dolazi do povećanja širine apsorpcijske vrpce i pomaka apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama. Ove promjene u temperaturnom rasponu od 50 °C iznose 1,2 nm za širinu apsorpcijske vrpce i 1,1 nm za položaj apsorpcijskog maksimuma. Utvrđene su i razlike u UV-Vis spektru između otopina askorbata u lakoj i teškoj vodi. Položaj apsorpcijskog maksimuma u UV-Vis spektru otopine askorbata u teškoj vodi pomaknut je za 0,7 nm prema nižim valnim duljinama, a širina apsorpcijske vrpce manja je za 0,8 nm u odnosu na UV-Vis spektar otopine askorbata u lakoj vodi na istoj temperaturi. Spinsko-okolinska relaksacijska vremena (T1) izmjerena pomoću NMR spektrometra za ¹H jezgre askorbata u otapalu 10 % D₂O + 90 % H₂O kraća su za oko tri puta u odnosu na T1 istih ¹H jezgri u 99 % D₂O.

Dobiveni rezultati protumačeni su promjenom solvatacije, odnosno promjenom vibracijske i elektronske energije askorbata kao posljedice usporavanja reorganizacije vodikovih veza otapala i askorbata u otopini do koje dolazi radi snižavanja temperature ili izotopne supstitucije. Obzirom da je u ove promjene uključena π orbitala koja sudjeluje i u reakcijama prijenosa naboja, te promjene mogu se dovesti u vezu s reaktivnosti askorbata što može biti od koristi u istraživanjima reakcija prijenosa naboja u kojima sudjeluje askorbat u složenim procesima koji se odvijaju u biološkim sustavima.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 39 stranica, 22 grafička prikaza, 5 tablica i 31 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: askorbinska kiselina, promjena spektra, izotopna supstitucija, UV-Vis spektroskopija, T1 relaksacijsko vrijeme

Mentor: **Dr. sc. Viktor Pilepić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ocejenjivači: **Dr. sc. Viktor Pilepić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Dr. sc. Monika Barberić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Dr. sc. Sandra Jurić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: svibanj 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Physical Chemistry
A.Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

EFFECT OF TEMPERATURE AND SOLVENT ISOTOPIC COMPOSITION ON THE UV-VIS SPECTRUM OF ASCORBATE

Silvia Osmak

SUMMARY

The effect of temperature and solvent isotopic composition on the position of absorption maximum and width of the absorption band in UV-Vis spectrum of ascorbate, predominant reactive form of vitamin C in physiological conditions, has been studied in this diploma thesis. The UV-Vis spectra of $5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³ ascorbate solutions in H₂O and D₂O in the temperature range from 1 to 55 °C have been measured by using three different spectrophotometers with previously determined measuring characteristics. By measuring the UV spectrum of ascorbate solution ranging from $5 \cdot 10^{-3}$ to $5 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³, it was found that the position of the absorption band maximum is not dependent on the concentration of ascorbate. From the UV spectra obtained in H₂O and D₂O, it has been shown that increasing the temperature increases the absorption band width and shifts the absorption maximum to higher wavelengths. These changes are 1.2 nm for the of absorption band width and 1.1 nm for the absorption maximum position in the temperature range of 50 °C. Differences in the UV-Vis spectra of the ascorbate solution in H₂O and in D₂O were also found. The absorption maximum position in UV-Vis spectrum of the ascorbate solution in D₂O was shifted by 0.7 nm at lower wavelengths, and the width of the absorption band was 0.8 nm less than the UV-Vis spectrum of ascorbate solution in H₂O at the same temperature. The spin-lattice relaxation times (T₁) measured by NMR spectrometer for ¹H ascorbate nuclei in 10 % D₂O + 90 % H₂O solvent are about the three times shorter than the corresponding T₁ for ¹H nuclei in 99 % D₂O. The obtained results has been interpreted by solvation changes, or by the ascorbate vibrational and electronic states energy changes resulted as a consequence of slowing down the solvent and ascorbate hydrogen bonds reorganization in a solution caused by lowering the temperature or isotopic substitution. Since these changes include the π orbital involved also in charge transfer reactions, these changes may be related also to the ascorbate reactivity what could be useful in research of charge transfer reactions involving ascorbate in complex processes which take place in biological systems.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 39 pages, 22 figures, 5 tables and 31 references. Original is in Croatian language.

Keywords: ascorbic acid, change of spectrum, isotopic substitution, UV-Vis spectrofotometry, T₁ relaxation time

Mentor: **Viktor Pilepić, Ph.D. Associate Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Reviewers: **Viktor Pilepić, Ph.D. Associate Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Monika Barberić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sandra Jurić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted : May 2017.