

# Poređenje tehnika i metoda određivanja L-askorbinske kiseline u voću

Biljana R. Cvetković<sup>1</sup>, Radomir V. Malbaša<sup>2</sup>, Eva S. Lončar<sup>2</sup>, Zvonko B. Nježić<sup>1</sup>, Olivera Šimurina<sup>1</sup>,  
Bojana Filipčević<sup>1</sup>, Aleksandra Tepić<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Univerzitet u Novom Sadu, Naučni institut za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija

<sup>2</sup>Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija

## Izvod

Cilj ovog rada bio je da se uporede tri različite metode određivanja i tri vrste reagenasa za ekstrakciju L-askorbinske kiseline. Voće (kivi, limun, narandža i grejpfrut) kupljeno je na lokalnom tržištu. Askorbinska kiselina u ova četiri uzorka određena je trima različitim metodama, AOAC, HPLC metod sa tri različite vrste reagenasa za ekstrakciju i kolorimetrijska metoda uz upotrebu askorbat-oksidge. Rezultati su statistički obrađeni. Statistička analiza pokazala je da postoji značajna razika između rezultata za sve tri metode ekstrakcije kod svih uzoraka. Diskriminativna i analiza HPLC određivanja pokazala je da postoji jasna razlika i definisane granice između rezultata u odnosu na metod ekstrakcije.

**Ključne reči:** L-askorbinska kiselina, metode određivanja, voće.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

STRUČNI RAD

UDK 547.475.2:66.061.3:641.13

Hem. Ind. 66 (4) 553–558 (2012)

doi: 10.2298/HEMIND111020016C

Askorbinska kiselina (vitamin C) prirodni je antioksidans prisutan u voću i povrću. Koristi se kao aditiv u industriji voćnih sokova, džemova, mlečnih i mesnih proizvoda itd., i odobren je od strane Evropske komisije. Vitamin C je naširoko poznat po svojoj važnoj ulozi u biohemijskim procesima, kao što su sinteza kolagena, apsorpcija gvožđa, kao i njegovo učešće u transmisiji neurona i u imunom odgovoru organizma. Biološki aktivan izomer askorbinske kiseline (vitamin C, AA) jeste L-askorbinska kiselina, a vodi se diskusija oko aktivnosti L-dehidroaskorbinske kiseline [1,2]. D-askorbinska kiselina (izoaskorbinska kiselina, eritorbinska kiselina, iso-AA) legalno je korišćen antioksidativni prehrambeni aditiv, ali on sadrži svega 5% od antiskorbutnog dejstva L-askorbinske kiseline (AA) [3]. AA brzo oksiduje u dehidroaskorbinski kiselinu (DHA), oblik sa dodatne dve hidroksilne grupe u svojoj strukturi. Reakcija oksidacije može biti ubrzana izloženošću višim temperaturama, visokoj pH vrednosti, svetlosti, zatim u prisustvu kiseonika ili metala i dejstvom enzima. Ova reakcija se odvija reverzibilno i prvi je korak tokom antioksidativne aktivnosti AA. Daljom oksidacijom nastaje diketoglukulonska kiselina (DKG) koja više nema biološku funkciju i reakcija je nepovratna [2,4]. Askorbinska kiselina je sveprisutna komponenta u zelenim delovima biljaka, izuzev u semenkama, i lako je ishranom postići dovoljan unos ovog vitamina na dnevnom nivou. Relativno visoke vrednosti askorbinske kiseline su nađene u jagodama, citrusima, raznom povrću, ali dostupnost vitamina u ovim namirnicama zavisi od mnogih faktora [5]. S obzirom na to da ljudi ne mogu da sintetišu askorbat,

njihovi osnovni izvori vitamina C su voće i povrće. Tačno određivanje nutrijenata u voću i povrću je od izuzetne važnosti za razumevanje odnosa između dnevnog unosa hrane i ljudskog zdravlja. Nekoliko tehnika se koristi za analizu askorbinske kiseline u hrani uključujući spektrofotometriju, potenciometriju, spektrofluorimetriju i hromatografiju – kojoj se daje prednost zbog jednostavnosti, brzine izvođenja i osetljivosti [6]. U određivanju askorbinske kiseline koriste se i metode titrimetrije [7,8], spektrofotometrije [9] i elektrohemijske metode. Mnoge od ovih metoda mogu dati veće rezultate u prisustvu oksidujućih komponentata koje nisu askorbinska kiselina ili je isključena mogućnost merenja dehidroaskorbinske kiseline tokom metode. Tako npr. AOAC procedura gde se titiriše sa 2,6-dihlorfenolindofenolom u kiseloj sredini nije adekvatna metoda za sve matrikse. Supstance prirodno prisutne u voću kao što su tanini, sulfhidrilna jedinjenja i metali bakar, gvožđe, i kobalt mogu biti oksidovani tokom određivanja [10]. Neki autori potvrđuju dobro slaganje HPLC rezultata i enzimatskih određivanja sadržaja vitamina C [11,12]. Enzimatska procedura koja koristi askorbat oksidazu je visoko specifična metoda za askorbinsku kiselinu. Tako, određivanje vitamina C pre i nakon askorbat oksidge uz korišćenje formazan metode obezbeđuje odgovarajuće rezultate sadržaja vitamina C [11].

Uopšteno govoreći, najpoželjnije metode analize su one koje se zasnivaju na primeni HPLC analize, jer obezbeđuju veću selektivnost nego spektrofotometrija, titracija ili enzimatski metod. Osim toga, pri HPLC analizi nije neophodna derivatizacija [13]. Da bi se obezbedila efektivnost HPLC analize, vrlo je važno odabrati adekvatan način ekstrakcije pošto AA veoma lako oksiduje u baznim uslovima. Metafosforna kiselina omogućava efikasniju ekstrakciju AA time što sprečava njenu

Prepiska: B.R. Cvetković, Naučni institut za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija.

E-pošta: biljana.cvetkovic@fins.uns.ac.rs

Rad primljen: 20. oktobar, 2011

Rad prihvaćen: 5. mart, 2012

oksidaciju [14,15] u odnosu na druge kiseline za ekstrakciju [16].

U ovom radu je prikazano poređenje tri metode određivanja L-askorbinske kiseline u 4 uzorka voća. To su metode AOAC, zatim kolorimetrijska metoda i HPLC analiza sa tri različite metode ekstrakcije. Uzorci su ekstrahovani 3% metafosfornom kiselinom u 8% sirćetnoj kiselini, destilovanom vodom, i kalijum-hidrogen-fosfatnim puferom. Rastvor metafosforne kiseline u sirćetnoj je standardni reagens za ekstrakciju kod AOAC metode. Drugi reagens za ekstrakciju je destilovana voda takođe korišćena tokom HPLC analiza [11,17,18]. Kalijum hidrogen fosfatni pufer je korišćenu ovom radu kao reagens za ekstrakciju za HPLC određivanje zbog analogije sa kolorimetrijskim određivanjem [19].

### EKSPERIMENTALNI DEO

L(+)-Askorbinska kiselina za pripremu standarda je nabavljena od proizvođača J.T. Baker (Holandija). Amonijum-acetat je od proizvođača Kemika, Zagreb, metafosforna kiselina od proizvođača Riedel-deltaen (Germany), glacijalna sirćetna od proizvođača Zorka (Šabac, Srbija), 2,6 dihlorfenolindofenol od proizvođača Merck (Germany). Voće (kivi, limun, narandža i grejpfrut) potiče sa lokalnog tržišta. Voće je oljušteno i jestivi deo je usitnjen u blenderu. Od toga je po 10 g usitnjenog voća preneto u sud od 100 ml i svaki sud je dopunjen do crte sa po jednim od tri rastvora za ekstrakciju, i to destilovanom vodom (E1), kalijum-dihidrogen-fosfatom (E2) i 3% metafosfornom u 8% sirćetnoj kiselini (E3). Nakon filtriranja uzorci su dalje analizirani. Merenja su kod kolorimetrijske metode i HPLC određivanja ponavljana 3 puta zbog pretpostavke da ove metode imaju dobru selektivnost i preciznost, nasuprot titrimetriji u AOAC metodi gde je rađeno 5 ponavljanja zbog subjektivnosti same metode.

### Hromatografsko određivanje

Analiza se odvija izokratski sa UV-vidljivom detekcijom na sistemu Agilent 1100, USA sa Diode Array detektorom (DAD) i injektorom od 20 µl. Razdvajanje se izvodi na koloni GROM\_SIL 120 ODS-5 ST (5 µm, 150×4 mm) sa 100 mM amonijum-acetatom kao mobilnom fazom uz protok od 0,4 ml/min. Temperatura kolone je 37 °C, a talasna dužina detekcije je 254 nm [20]. Rastvori standarda kao i ekstrakti si filtrirani kroz 0,45 µm membranski filter pre injektovanja. Dobijeni pikovi AA su poređeni sa komercijalnim standardima i njihovim retencionim vremenima. Hromatografska merenja su ponavljana tri puta.

### AOAC metoda

Sadržaj L-askorbinske kiseline u četiri uzorka voća određivan je i AOAC metodom [7]. Odmeren uzorak je rastvoren u 3% metafosfornoj u 8% sirćetnoj kiselini,

zatim profiltriran i alikvot filtrata je titrisan 2,6 dihlorfenolindofenolom do postizanja ružičaste boje postojane najmanje 5 s. Indofenolni rastvor je standardizovan rastvorom L-askorbinske kiseline poznate koncentracije neposredno pre određivanja. Sva merenja su ponavljana pet puta.

### Kolorimetrijska metoda

Sadržaj askorbinske kiseline je određivan i kolorimetrijskom metodom (Myozime, Germany) [19]. L-Askorbinska kiselina redukuje tetrazolijum so MTT (3-(4,5-dimethylthiazolil)-2,2-difeniltetrazolijum-bromid) u prisustvu nosača elektrona PMS (5-metilfenazinijum-metasulfat) na pH 3,5 u formazan (MTT-formazan). U prvoj reakciji i AA i druge redukujuće supstance su merene. Te druge redukujuće supstance se mere kasnije dodatkom enzima askorbat oksidaze čime se dobija slepa proba. Količina MTT-formazana se određuje spektrofotometrijski na 578 nm. Razlika između absorbance uzorka i slepe probe steihijometrijski odgovara količini L-askorbinske kiseline u uzorku. Granica detekcije je 0,175 mg/l.

### REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati određivanja sadržaja L-askorbinske kiseline u voću dobijeni trima metodama su statistički obrađeni i podeljeni u tri celine. Celinu C1 čine HPLC rezultati, celina C2 su rezultati dobijeni AOAC metodom, a celinu C3 predstavljaju rezultati dobijeni kolorimetrijskom metodom. Statističkom evaluacijom dobijeni su sledeći parametri: srednja vrednost, standardna devijacija, koeficijenti varijacije, intervali poverenja i mere asimetrije (Skjunis). Urađena je i diskriminativna analiza.

U tabeli 1 prikazani su rezultati određivanja sadržaja L-askorbinske kiseline i statistički parametri za uzorak kivi.

Koeficijent varijacije (KV) ukazuje na homogenost uzorka kivi. Kod kolorimetrijske metode za kivi homogenost uzorka je najveća, tj. koeficijent varijacije je najniži (KV) i iznosi 0,57, a najmanje je homogen uzorak kivija ekstrahovan metafosfornom u sirćetnoj kiselini KV = 5,37. Povećane vrednosti Skjunisa (sk) ukazuju da je raspodela negativno asimetrična. Na osnovu toga može se zaključiti da kriva raspodele rezultata naginje ka višim vrednostima, odnosno da ima više viših vrednosti u odnosu na normalnu raspodelu, kod rezultata određenih kolorimetrijskom metodom (0,29), i metodom HPLC E1 (0,14). Snižene vrednosti Skjunisa (sk) ukazuju da je raspodela pozitivno asimetrična. Na osnovu toga može se zaključiti da kriva raspodele rezultata naginje ka nižim vrednostima, odnosno da ima više nižih vrednosti u odnosu na normalnu raspodelu, kod rezultata određenih metodama HPLC E2 (-0,29) i HPLC E3 (-0,25).

Tabela 1. Sadržaj L-askorbinske kiseline (mg/100 g) i statistički parametri za uzorak kivi  
Table 1. Average values of L-ascorbic content (mg/100 g) and statistical parameters for kiwi

Metoda	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Koeficijent varijacije	Interval poverenja		Skjunis
HPLC ekstrakcija destilovanom vodom	53,31	1,69	3,16	52,01	54,61	0,14
HPLC ekstrakcija sa $\text{KH}_2\text{PO}_4$	56,09	1,53	2,72	54,92	57,27	-0,29
HPLC ekstrakcija 3% metafosfornom kiselinom u 8% sirćetnoj kiselini	82,41	4,43	5,37	79,00	85,81	-0,25
AOAC	45,03	1,19	2,63	43,56	46,50	0,00
Kolorimetrijska metoda	39,49	0,57	1,43	38,10	40,89	0,29

Povećana vrednost Skjunisa za uzorak narandže (sk, tabela 2) nađena je kod HPLC E3 (0,57). Na osnovu toga može se zaključiti da kriva raspodele rezultata naginje ka višim vrednostima, odnosno da ima više viših vrednosti u odnosu na normalnu raspodelu. Snižene vrednosti Skjunisa (sk) jesu kod HPLC E2, AOAC, i rezultata kolorimetrijske metode, odnosno ima više nižih vrednosti u odnosu na normalnu raspodelu kod ovih određivanja. Homogenost uzorka je najveća kod rezultata dobijenih AOAC metodom, tj. koeficijent varijacije je najniži (0,47), a najmanje homogen je uzorak narandže ekstrahovan u destilovanoj vodi ( $KV = 1,83$ ).

Koeficijent varijacije je najviši, odnosno homogenost uzorka najmanja kod rezultata za uzorak limuna dobijenih kolorimetrijskom metodom (2,19, tabela 3). Najveću homogenost pokazuje uzorak limuna određen HPLC metodom, ekstrahovan u puferu  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,54). Povišene vrednosti Skjunisa (sk) ukazuju da je raspodela rezultata negativno asimetrična. Na osnovu toga može se zaključiti da kriva raspodele rezultata sadržaja L-askorbinske kiseline u limunu naginje ka višim vred-

nostima, odnosno da ima više viših vrednosti u odnosu na normalnu raspodelu, kod rezultata određenih metodama HPLC E1, HPLC E3 i AOAC. Snižene vrednosti Skjunisa (sk) ukazuju da je raspodela pozitivno asimetrična. Na osnovu toga može se zaključiti da kriva raspodele rezultata određenih metodom HPLC E2 naginje ka nižim vrednostima, odnosno da ima više nižih vrednosti u odnosu na normalnu raspodelu.

Povišene vrednosti Skjunisa (sk) ukazuju da je kod rezultata sadržaja L-askorbinske kiseline u grejpfrutu dobijenih svim metodama osim AOAC metode, raspodela negativno asimetrična (tabela 4). Na osnovu toga može se zaključiti da kriva raspodele rezultata naginje ka višim vrednostima, odnosno da ima više viših vrednosti u odnosu na normalnu raspodelu. Koeficijent varijacije je najviši kod uzorka grejpfruta analiziranog HPLC metodom, ekstrahovanog metafosfornom kiselinom u sirćetnoj kiselini (12,45), tj. homogenost uzorka je najmanja. Najveću homogenost uzorka grejpfruta pokazuju rezultati dobijeni kolorimetrijskom metodom (0,32).

Tabela 2. Sadržaj L-askorbinske kiseline (mg/100 g) i statistički parametri za uzorak narandža  
Table 2. Average values of L-ascorbic content (mg/100 g) and statistical parameters for orange

Metoda	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Koeficijent varijacije	Interval poverenja		Skjunis
HPLC ekstrakcija destilovanom vodom	53,20	1,83	3,44	51,79	54,61	0,01
HPLC ekstrakcija sa $\text{KH}_2\text{PO}_4$	55,97	1,52	2,71	54,81	57,14	-0,06
HPLC ekstrakcija 3% metafosfornom kiselinom u 8% sirćetnoj kiselini	92,51	1,82	1,97	91,11	93,91	0,57
AOAC	66,01	0,47	0,72	65,42	66,60	-0,40
Kolorimetrijska metoda	64,80	0,63	0,97	63,26	66,34	-0,29

Tabela 3. Sadržaj L-askorbinske kiseline (mg/100 g) i statistički parametri za uzorak limun  
Table 3. Average values of L-ascorbic content (mg/100 g) and statistical parameters for lemon

Metoda	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Koeficijent varijacije	Interval poverenja		Skjunis
HPLC ekstrakcija destilovanom vodom	61,28	1,30	2,12	60,28	62,28	0,58
HPLC ekstrakcija sa $\text{KH}_2\text{PO}_4$	67,12	1,03	1,54	66,32	67,91	-0,09
HPLC ekstrakcija 3% metafosfornom kiselinom u 8% sirćetnoj kiselini	76,43	1,56	2,04	75,23	77,62	0,44
AOAC	55,39	1,19	2,16	53,90	56,87	1,28
Kolorimetrijska metoda	51,55	1,13	2,19	48,76	54,34	0,09

Tabela 4. Sadržaj L-askorbinske kiseline (mg/100 g) i statistički parametri za uzorak grejpfрут  
Table 4. Average values of L-ascorbic content (mg/100 g) and statistical parameters for grapefruit

Metoda	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Koeficijent varijacije	Interval poverenja		Skjunis
HPLC ekstrakcija destilovanom vodom	42,68	0,46	1,09	42,33	43,04	0,39
HPLC ekstrakcija sa $\text{KH}_2\text{PO}_4$	43,69	1,51	3,46	42,53	44,85	0,32
HPLC ekstrakcija 3% metafosfornom kiselinom u 8% sirćetnoj kiselini	47,30	5,89	12,45	42,77	51,82	0,70
AOAC	44,56	1,53	3,44	42,65	46,46	-0,26
Kolorimetrijska metoda	35,99	0,32	0,89	35,20	36,77	0,46

Kod svih uzoraka voća, sadržaj L-askorbinske kiseline je najviši određen metodom HPLC nakon ekstrakcije u rastvoru metafosforne kiseline u sirćetnoj kiselini, u odnosu na druge reagense za ekstrakciju, te se može zaključiti da je vitamin C dobro očuvan u rastvoru metafosforne kiseline što je u skladu sa navodima drugih autora [14–16].

Kolorimetrijskom metodom sa enzimom dobijene su niže vrednosti sadržaja L-askorbinske kiseline nego kod HPLC metode kod svih uzoraka što je u skladu sa literaturnim podacima da enzimatska metoda daje u proseku 63% od vrednosti rezultata HPLC metode [12,21]. Metodom AOAC dobijeni su nešto niži rezultati sadržaja L-askorbinske kiseline od rezultata dobijenih HPLC metodom.

Na slikama 1 i 2 prikazani su hromatogrami za standard L-askorbinske kiseline i za uzorak limuna ekstrahovanog u kalijum-dihidrogen-fosfatnom puferu,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

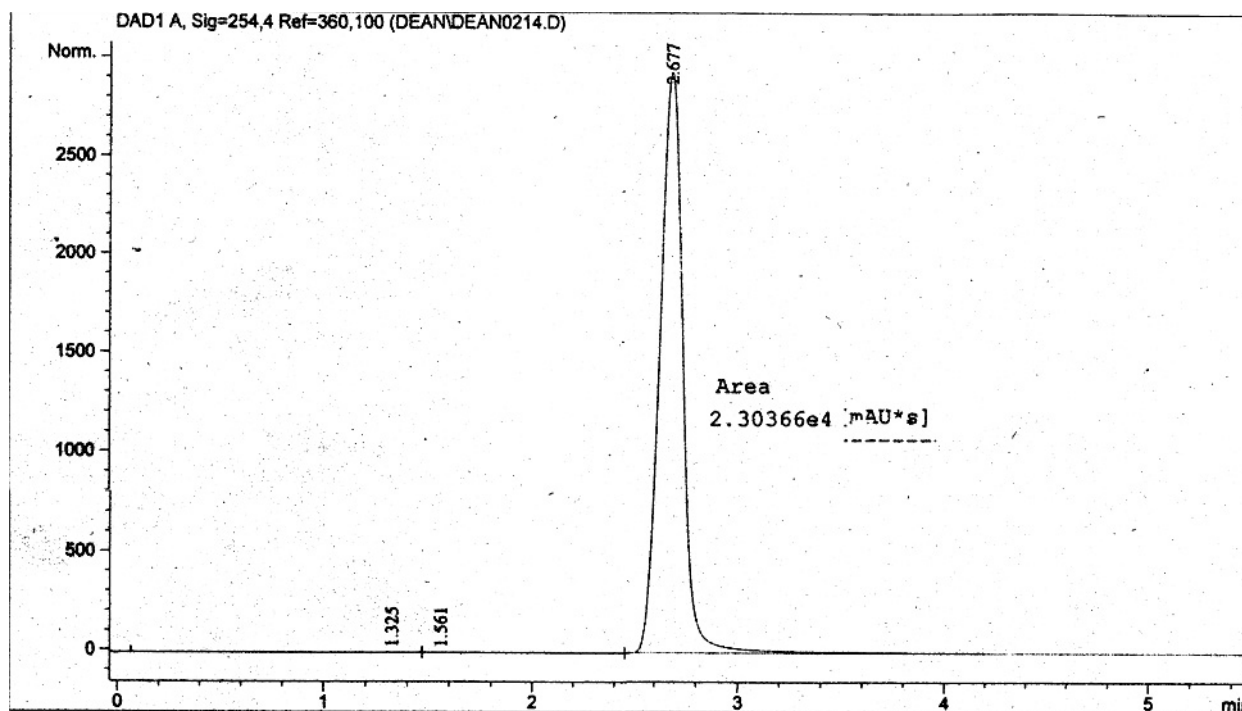
Uticaj načina ekstrakcije na dobijene rezultate sadržaja L-askorbinske kiseline metodom HPLC i značajnost razlike rezultata po uzorku prikazan je u tabeli 5.

Tabela 5. Koeficijent diskriminacije između uzoraka u odnosu na metod ekstrakcije tokom HPLC određivanja L-askorbinske kiseline

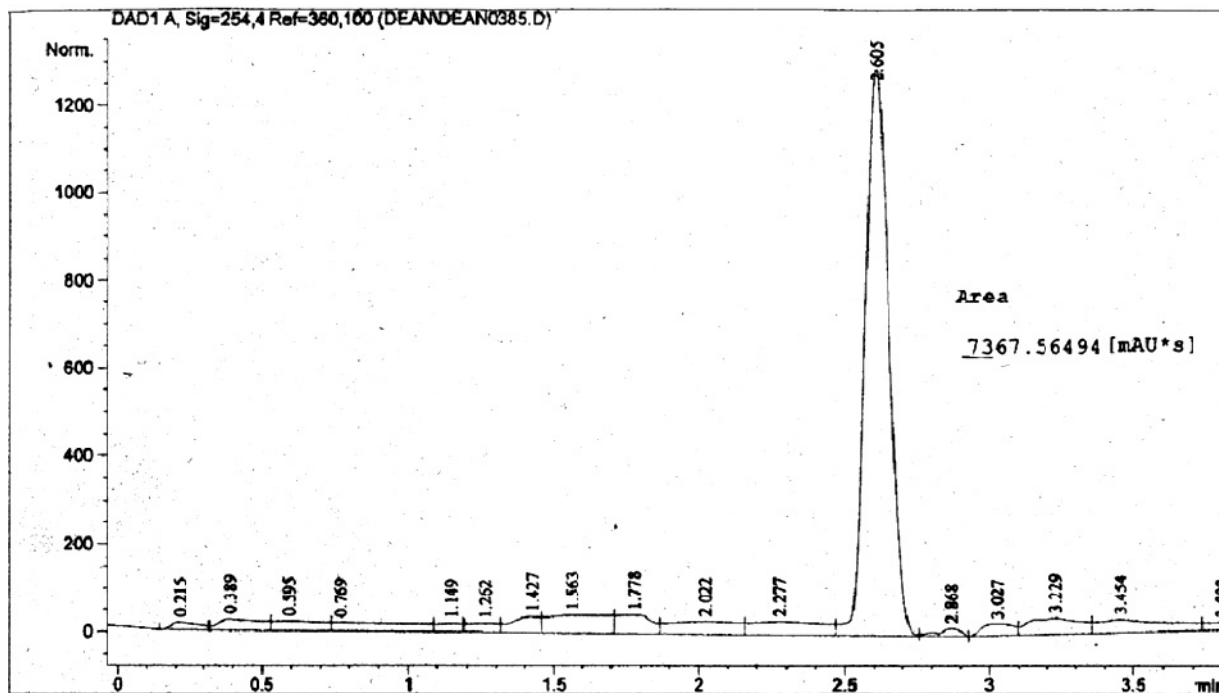
Table 5. The coefficient of discrimination between samples in relation to the method of extraction during the HPLC determination of L-ascorbic acid

HPLC ekstrakcija	Koeficijent diskriminacije
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ puferским rastvorom	304,789
3% rastvorom metafosforne kiseline u 8% sirćetnoj kiselini	109,396
Destilovanom vodom	61,573

Diskriminativna analiza HPLC određivanja pokazuje da postoji razlika i jasno definisana granica između re-



Slika 1. Hromatogram standardnog rastvora L-askorbinske kiseline  $c = 100 \mu\text{g/ml}$ .  
Figure 1. Chromatogram of L-ascorbic acid standard solution  $100 \mu\text{g/ml}$ .



Slika 2. Hromatogram za uzorak limuna ekstrahovanog u kalijum-dihidrogen-fosfatnom puferu.  
Figure 2. Chromatogram of L-ascorbic acid in the sample lemon after extraction with buffer,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

zultata sadržaja L-askorbinske kiseline u uzorcima. U tabeli 5 prikazani su koeficijenti diskriminacije. Rezultati pokazuju da je najveći doprinos diskriminaciji između različitih uzoraka (odnosno da je razlika najveća) kod rezultata određenih HPLC E2 metodom dobijenih nakon ekstrakcije fosfatnim puferom (304,789).

## ZAKLJUČAK

Rezultati sadržaja L-askorbinske kiseline u četiri vrste voća određeni HPLC metodom sa tri načina ekstrakcije se statistički značajno razlikuju. Diskriminativna analiza pokazuje da najveći doprinos diskriminaciji daju rezultati HPLC određivanja nakon ekstrakcije fosfatnim puferom (304,789), zatim nakon ekstrakcije metafosforne kiseline u sirćetnoj (109,573) i vodene ekstrakcije (61,573).

Kolorimetrijskom metodom sa enzimom dobijaju se niže vrednosti sadržaja L-askorbinske kiseline nego kod HPLC metode kod svih uzoraka voća.

Kod svih uzoraka voća sadržaj L-askorbinske kiseline je najveći dobijen metodom HPLC nakon ekstrakcije u metafosfornoj u sirćetnoj kiselini, u odnosu na druge reagense za ekstrakciju, te se može zaključiti da je vitamin C dobro očuvan u rastvoru metafosforne kiseline u sirćetnoj kiselini.

## Zahvalnica

Rezultati ovog rada su deo projekta TR 031055 finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

## LITERATURA

- [1] K.L. Retsky, M.W. Freeman, B. Freis, Ascorbic acid oxidation product(s) protect human low density lipoprotein against atherogenic modification, *J. Biol. Chem.* **268** (1993) 1304–1309.
- [2] J.C. Deutsch, Dehydroascorbic acid, *J. Chromatogr., A* **881** (2000) 299–307.
- [3] P. Fontannaz, T. Kilinc, O. Heudi, HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products, *Food Chem.* **94** (2006) 626–631.
- [4] M.W. Davey, M. Van Montagu, D. Inze, M. Sanmartin, A. Kanellis, N. Smirnoff, I. J.J. Benzie, J.J. Strain, D. Favell, J. Fletcher, Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing, *J. Sci. Food Agric.* **80** (2000) 825–860.
- [5] S.M. Đilas, J.M. Čanadanović-Brunet, G.R. Četković, Antioxidants in food, *Hem. Ind.* **56** (2002) 105–112.
- [6] Q.A. Rodriguez-Bernaldo, M. Fernandez-Arias, J. Lopez-Hernandez, A screening method for the determination of ascorbic acid in fruit juices and soft drinks, *Food Chem.* **116** (2009) 509–512.
- [7] AOAC (1990), Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (Official Method 967.21).
- [8] V. Kabasakalis, D. Siopidou, E. Moshatou, Ascorbic acid content of commercial fruit juices and its rate of loss upon storage, *Food Chem.* **70** (2000) 325–328.
- [9] S.P. Arya, M. Mahajan, P. Jain, Spectrophotometric determination of vitamin C with iron(II)-4-(2-pyridylazo) resorcinol complex, *Anal. Chim. Acta* **427** (2001) 245–251.

- [10] S.P. Arya, P. Mahajan, P. Jain, Non-spectrophotometric methods for the determination of vitamin C, *Anal. Chim. Acta* **417** (2000) 1–14.
- [11] V. Gokmen, N. Kahraman, D. Nilay, A. Jale, Enzymatically validated liquid chromatographic method for the determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in fruit and vegetables, *J. Chromatogr., A* **881** (2000) 309–316.
- [12] V. Raghu, P. Kalpana, K. Srinivasan, Comparison of ascorbic acid content of *Embllica officinalis* fruits determined by different analytical methods, *J. Food Comp. Anal.* **20** (2007) 529–533.
- [13] L. Nováková, P. Solich, D. Solichova, HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids, *Tre. Anal. Chem.* **27** (10) (2008) 942–958.
- [14] A. Del Caro, A. Piga, V. Vacca, M. Agabbio, Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage, *Food Chem.* **84** (2004) 99–105.
- [15] A.A. Franke, L.J. Custer, C. Arakaki, S.P. Murphy, Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii, *J. Food Comp. Anal.* **17** (2004) 1–35.
- [16] Y. Hernandez, G.M. Lobo, M. Gonzalez, Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods, *Food Chem.* **96** (2006) 654–664.
- [17] G. Vinci, F. Rot, G. Mele, Ascorbic acid in exotic fruits: a liquid chromatographic investigation, *Food Chem.* **53** (1995) 211–214.
- [18] M.L. Antonelli, G. D’Ascenzo, A. Lagana, P. Pusceddu, Food analyses: a new calorimetric method for ascorbic acid (vitamin C) determination, *Talanta* **58** (2002) 961–967.
- [19] Megazyme L-ascorbic acid assay procedure, Megazyme International, Ireland 2012, <http://www.megazyme.com/downloads/en/data/K-ASCO.pdf>.
- [20] R.V. Malbaša, E.S. Lončar, Lj.A. Kolarov, Određivanje vitamina C u fermentisanim mlečnim proizvodima od kombuhe, *Preh. Ind.- Mleko i ml. proizvodi* **20** (2009) 31–34.
- [21] M. Romeu-Nadal, S. Morera-Pons, A.I. Castellote, M.C. López-Sabater, Rapid high-performance liquid chromatographic method for Vitamin C determination in human milk versus an enzymatic method, *J. Chromatogr., B* **830** (2006) 41–46.

## SUMMARY

### THE COMPARISON OF TECHNIQUES AND METHODS FOR L-ASCORBIC ACID DETERMINATION IN THE FRUITS

Biljana R. Cvetković<sup>1</sup>, Radomir V. Malbaša<sup>2</sup>, Eva S. Lončar<sup>2</sup>, Zvonko B. Nježić<sup>1</sup>, Olivera Šimurina, Bojana Filipčev, Aleksandra Tepić<sup>2</sup>

<sup>1</sup>University of Novi Sad, Institute of Food Technology, Novi Sad, Serbia

<sup>2</sup>University of Novi Sad, Faculty of Technology, Novi Sad, Serbia

(Professional paper)

Vitamin C is an essential vitamin for human nutrition; with the L-ascorbic acid (AA) being the active form of vitamin C. Hence, determination of the L-ascorbic acid in the natural and processed foods is very important. In the past plenty of methods based on the reversible redox reaction of AA oxidation/DHA reduction were developed. Because of L-ascorbic acid instability in aqueous solutions, it is useful to analyze various types of extraction. The aim of this study is to compare three different methods and three different extractants for the L-ascorbic acid determination. Fruits (kiwi, lemon, orange, and grapefruit) were purchased from a local market. The L-ascorbic acid in these four samples was determined by the three different methods: the AOAC, the HPLC method with three different types of extractions, and the colorimetric method using ascorbate-oxidase. For the HPLC measurements, one part of the fruits was extracted with distilled water, the second with potassium hydrogen phosphate, and the third with 3% meta-phosphoric acid (MPA) in 8% acetic acid. The HPLC measurements of each sample were repeated three times, the AOAC titration was repeated five times, and in the colorimetric method three measurements were performed. The results were statistically evaluated related to sample basis. Statistical analysis shows that there is a significant difference between the results for all three methods of extraction for all samples, except for the grapefruit sample where no significant difference was observed between the results obtained after the buffer extraction (E2) and the metaphosphoric acid in acetic acid extraction (E3). Discriminative analysis for the HPLC determinations proves that there is a clear difference and defined border between the samples in relation to the methods of extraction during the HPLC determination.

**Keywords:** L-Ascorbic acid • Determination methods • Fruits