

# Jednostavna metoda za analiziranje ukupne količine vitamina C u plazmi pogodna za rutinsku kliničku laboratorijsku upotrebu

Line Robitaille and L. John Hoffer 

[Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) ►

This article has been corrected. See [Nutr J. 2016 May 5; 15: 51](#).

This article has been [cited by](#) other articles in PMC.

## Apstrakt

[Go to:](#)

## Poreklo

Na bolest terminalnog nedostatka vitamina C-skorbut-prvo se sumnja na osnovu kliničkih analiza. Dijagnoza se potvrđuje dokumentovanjem koncentracije vitamina C u plazmi  $< 11.4 \mu\text{mol/L}$  i posmatranjem brzog kliničkog poboljšanja nakon odgovarajuće primene vitamina C [1, 2]. Skorbut je redak u savremenom svetu, ali hipovitaminoza C (koncentracija vitamina C u plazmi  $< 28.4 \mu\text{mol/L}$  [3]) ili marginalni nedostatak vitamina C (koncentracija vitamina C u plazmi  $< 28.4 \mu\text{mol/L}$  ili  $> 11.4 \mu\text{mol/L}$  [3]) nisu. Hipovitaminoza C javlja se kod ~ 10% populacije [4], kod ~ 30 % pušača [5, 6] i ~ 60 % akutno hospitalizovanih bolesnika [7–14], kod kojih pojačava osećaj umora i poremećaj raspoloženja [13–15], disfunkciju imunog sistema [7, 16, 17], usporeno zarastanje rana [18–20], složeni regionalni sindrom bola [21] i komplikacije kod kardiovaskularnih bolesti [22–26].

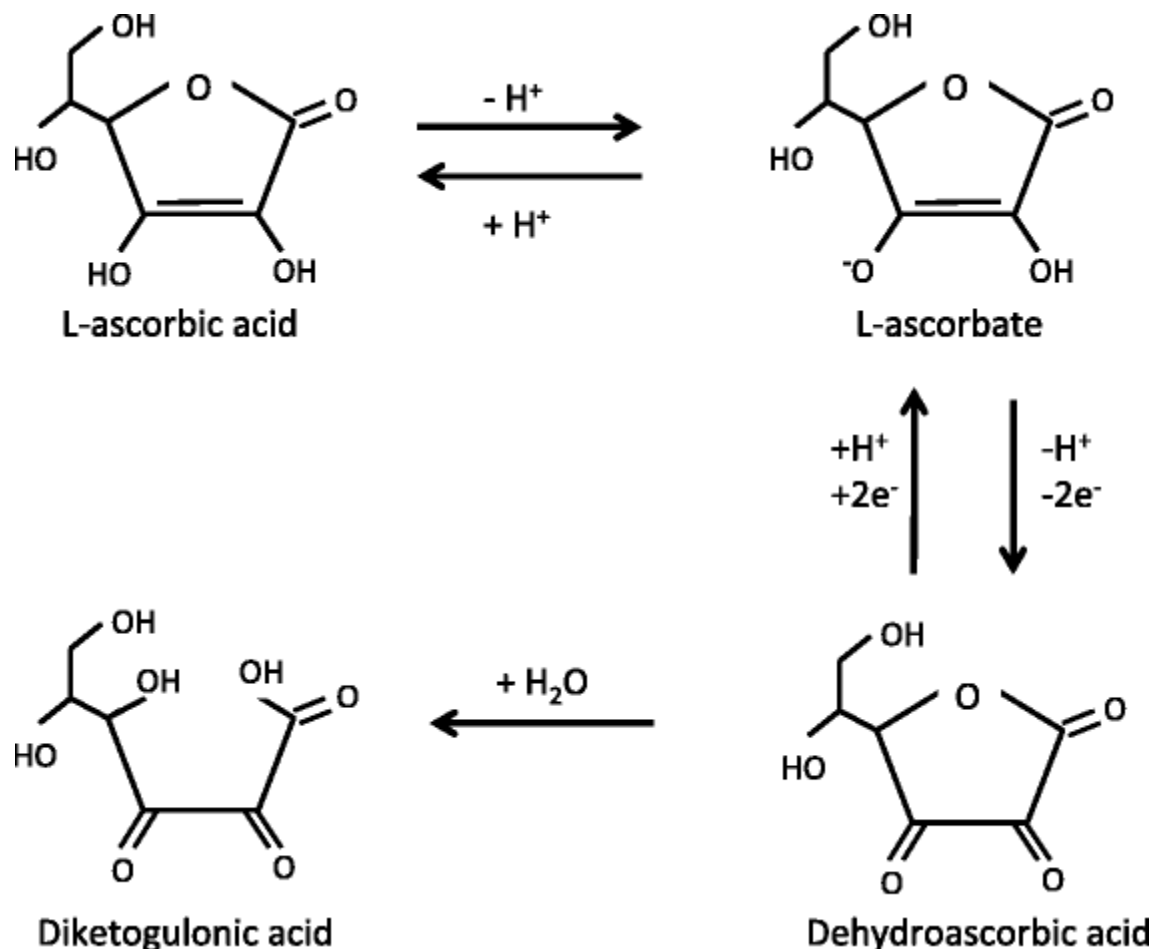
Vitamin C se brzo širi kroz ekstracelularne tečnosti u telu. Sistemska upala i intravenska terapija uz pomoć tečnosti povećavaju zapreminu ekstracelularne tečnosti tela, što rezultira smanjenjem koncentracije vitamina C u krvotoku [27–29]. U bolnici hipovitaminoza C, međutim, nije samo fenomen ekstravaskularne redistribucije [12, 29, 30]. Sistemska upala započinje oksidativni proces koji ubrzava ćelijski unos vitamina C i katabolizam i povećava potrebu za njim [31–33]. Najbolje istražen primer ovog fenomena kod ljudi je pušenje cigareta [20, 34, 35], što ubrzava katabolizam vitamina C [35], smanjuje koncentracije plazme i tkiva [36, 37] i povećava potrebe za njegovim unosom [6, 34]. Potrošena količina vitamina C u plazmi pušača može se normalizovati ili prestankom pušenja [38] ili nadoknađivanjem vitamina C [34], gde oba postupka smanjuju koncentracije biomarkera oksidativnog stresa koji cirkuliše [39, 40]. Akutno hospitalizovani bolesnici imaju upalno-oksidativna stanja koja su mnogo jača od stresa izazvanog dimom cigarete. Kombinovana istorija neodgovarajućeg unosa vitamina C i sistemske upale snažno utiču na nastanak hipovitaminoze C [10, 11, 41, 42].

Jačina, potencijalno ozbiljne štetne posledice i lako sprečavanje hipovitaminoze C kod hospitalizovanih bolesnika normalno bi motivisali pojačanu istragu njenih kliničkih implikacija, pogotovo jer mali randomizirani klinički eksperimenti kod bolesnika s nedostatkom vitamina C ukazuju na kliničku korist [7, 14, 43]. Međutim, povećana svest lekara i mnoga klinička ispitivanja trebala bi da promene sadašnju pristranost medicinske prakse, a to je izbegavanje propisivanja dodatka vitamina C čak i bolesnicima kojima je unos odgovarajuće prehrane neadekvatan i koji će verovatno imati nedostatak vitamina C.

Prepreku medicinskoj svesti o bolničkoj hipovitaminozi C predstavlja činjenica da je vrlo malo kliničkih laboratorija opremljenih za njeno otkrivanje. Dostavljanje uzoraka odgovarajućim laboratorijama je problematično jer je vitamin C poznat kao vrlo nestabilan i zahteva brzu stabilizaciju plazme kao i kontinuirano skladištenje na  $-80^\circ\text{C}$  [44, 45]. Pokušali smo da prevaziđemo tu prepreku razvijanjem jednostavne, tačne, otporne i jeftine metode određivanja vitamina C u plazmi koja se lako može postaviti i odložiti u bilo kojoj normalno opremljenoj kliničkoj laboratoriji.

Najosjetljivija selektivna metoda za analizu vitamina C u plazmi koristi tečnu hromatografiju pod visokim pritiskom (HPLC) povezanu s elektrohemijiskim (EC) detektorom [46–57]. EC-HPLC je od neprocenjive vrednosti u istraživačkoj laboratoriji, ali zahteva skupu, namensku i zahtevnu opremu za održavanje kojom upravljaju posebno osposobljeni tehničari. Dostupne su HPLC metode koje zahtevaju samo obični detektor UV svetla [49, 51, 52, 56, 58–68], ali njihova praktičnost u ne-specijalizovanoj kliničkoj laboratoriji ograničena je različitim karakteristikama:

komplikovanom kompozicijom mobilne faze sa znatnim vremenima pripreme i kondicioniranjem stubova, namenskim stubovima i komplikovanim postupcima za smanjenje dehidroaskorbinske kiseline na askorbinsku kiselinu radi analize ukupne količine vitamina C ili apsolutne nemogućnosti merenja ukupne količine vitamina C. Vitamin C se sastoji od askorbinske kiseline i njenog redoksnog partnera, dehidroaskorbinske kiseline. Ovde se koriste opšti pojmovi, priznavajući da je na fiziološkom pH askorbinska kiselina gotovo potpuno ionizirana i stoga ju je ispravnije zvati askorbat (vidi sl. 1). Uključili smo nedavna poboljšanja ishrane u analizu vitamina C [69, 70] kako bismo razvili racionalnu analizu vitamina C u plazmi UV-HPLC koja je jednostavna, osetljiva i dovoljno tačna za upotrebu u svakoj normalno opremljenoj kliničkoj laboratoriji.



sl. 1

Metabolizam vitamina C. Askorbinska kiselina učestvuje i u kiseloj bazi (askorbinska kiselina-askorbat, pK 4.2) i u oksidativnim reakcijama (askorbat-dehidroaskorbinska kiselina). Posednja reakcija uključuje prolazno stvaranje askorbilnog radikala (nije prikazano). Vitamin ...

EC-HPLC obično se preporučuje kao metoda izabrana za analizu vitamina C u plazmi [46, 49, 51, 56, 57], ali nema direktnog poređenja EC-HPLC i UV-HPLC metoda za analizu ukupnog vitamina C u plazmi. Stoga smo formalno uporedili pojednostavljenu UV-HPLC metodu s EC-HPLC kod 80 uzastopnih kliničkih uzoraka.

[pogledaj:](#)

## Metode

---

### Prikupljanje, rukovanje i čuvanje uzoraka

Venska krv (4 mL) je izvučena u 4 mL K2EDTA Vacutainerove cevi, pomešana i odmah gurnuta u smrvljeni led i dostavljena u laboratoriju za obradu u periodu od jednog sata, kao što je prethodno opisano [13, 14]. Plazma je odvojena u hladenoj centrifugi (4 ° C, 8 min, 2740 g), nakon čega se 0,2-0,4 ml dobijenog supernatanta odmah dodaje u jednaku količinu 10% (mas / vol) metafosforne kiseline (MPA) u 2 mmol / L dinatrijevog EDTA, ostavi na ledu 5 minuta i hladnim centrifugiranjem (40 ° C, 10 min, 16.000 g) kao što je opisano u Lykkesfeldt [55]. Dobijeni supernatant kiseline bez proteina odmah se zamrzava u suvom ledu/ etanolu i kontinuirano se čuva na -80 ° C do analize EC ili UV-HPLC.

### EC-HPLC

EC-HPLC metoda korištena za analizu askorbinske kiseline bila je slična onoj kod Levina, Wanga i Rumseyja [53]. Ukupni vitamin C je analiziran primenom postupka redukcije uzorka opisanog kod Lykkesfeldta [54, 55]. Već nekoliko godina koristimo ove pouzdane metode u našoj istraživačkoj laboratoriji [13, 14, 71].

Analitički sistem se sastojao od jednog Agilent 1100 serije HPLC sistema opremljenog sa Coulochem III elektrohemijским detektorom (ESA Inc) i analitičke ćelije 5011A. Elektron 1 postavljen je na -175 mV, područje detektora 500 nA, a elektroda 2 postavljena je na 550 mV, područje detekcije 50 uA. HPLC kolona bila je reverzna faza Phenomenex Luna (4,6 x 250 mm, 5 µm), kojoj je prethodio SigurnosGuard C18 čaura. Temperatura kolone održavana je na 25 ° C. Mobilna faza sastojala se od 25% metanola i 75% vode koja sadrži 0,05 mol / l monobazni natrijum fosfat, 0,05 mol / l natrijum acetat trihidrat, 189 µmol / L dodecil trimetilamonijevog klorida i 36,6 µmol / L tetraoctilamonijev bromid, podešen na pH 4,8 koristeći ortofosforu kiselinu. Brzina protoka bila je 0,8 ml / min (izokraska). Vrijeme zadržavanja varira između 6 i 8 min zavisno od stepena kondicioniranja stupca. U vreme analize, uzorci plazme bez kiselih proteina su odmrznuti na ledu pri slabom svetlu i obrađeni u dva alikvota. Za merenje askorbinske kiseline, 50 µL uzorka pomešano je s 200 µL vode. Analiza ukupne količine vitamina C (askorbinska kiselina plus dehidroaskorbinska kiselina) zahtevala je redukcionu reakciju u kojoj je 50 µL uzorka pomešano s 25 uL 2,5 mmol / L tris (2-karboksietil) fosfin hidroklorida (TCEP) u 800 mmol / L TRIS puferom (pH 9) i ostavljena da stoji u mraku na 5 minuta, nakon čega joj je dodato 175 ul McIlvaine pufera (0,28 mol / l limunske kiseline u 0,56 mol / l dibazičnog natrijum fosfata, pH 4,5). Oba alikvota centrifugirana su (4 ° C, 5 min, 16.000 g) i supernatanti su držani na ledu i ručno ubrizgani (20 uL) u HPLC. Na kraju svakog dana po završetku uzimanja uzorka, sistem je ispran s 25% metanola u vodi kako bi se eluirali puferi, ali ne tako detaljno da bi se uticalo na uslove sparivanja jona ili se promenilo vreme retencije analita.

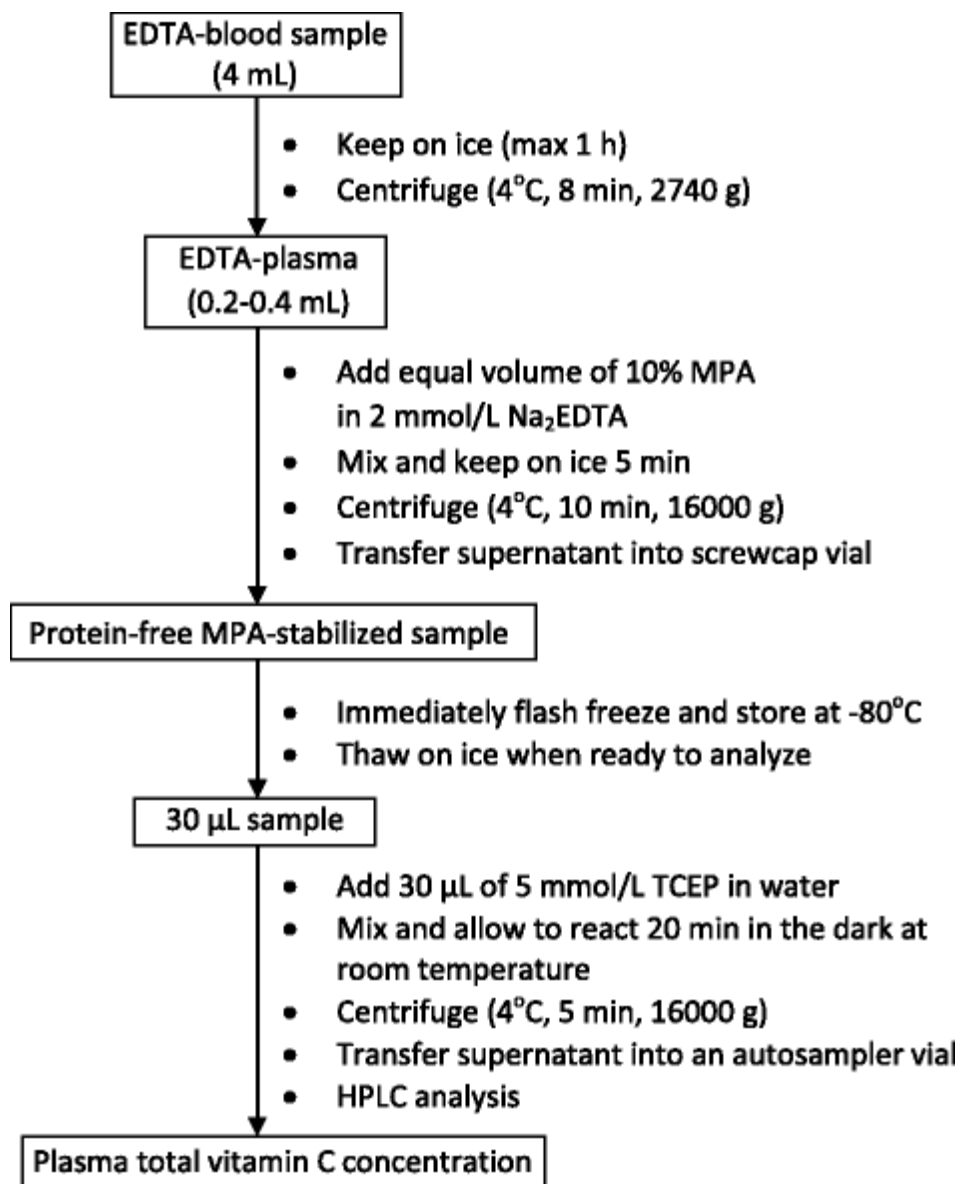
HPLC kolona zahteva regeneraciju u intervalima od 3-4 meseca. Uređaj EK pasiviran je jakim kiselinom u intervalima od 6-12 meseci. Ti postupci zahtevaju ponovno uravnotežavanje kolona i sistema, a taj proces traje jedan dan ili duže.

### UV-HPLC

Analiza je sprovedena korištenjem Waters 2695 Separations Modula opremljenog Waters 2487 dvostrukim talasnim UV detektorom postavljenim na 245 nm. Kolona je bila reverzna faza Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 µm) opremljena Agilent Eclipse XDB-C18 zaštitnim stubom. Temperatura stuba je održavana na 25 ° C. Mobilna faza sastojala se od 1.8 mmol / L sumporne kiseline (pH 2.7). Brzina protoka bila je 0,8 mL / min. Vreme zadržavanja je bilo 3 min. Bilo je 7 minuta pauze između ubrizgavanja injekcija kako bi se omogućilo da maksimum urinske kiseline eludira (5-6 min).

Uzorci isprani na nultom podeoku podeljeni su u dve alikvota od 30 uL u 0.6 mL plastičnih Eppendorf cevi. Za mjerenje ukupne količine vitamina C, dodana je jednaka zapremina od 5 mmol / L TCEP u vodu (pH 2) i uzorak je ostavljen da reaguje 20 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Za merenje askorbinske kiseline, umesto TCEP dodaje se jednaka zapremina vode i uzorak se drži na ledu. Oba uzorka su zatim centrifugirana (4 ° C, 5 min, 16.000 g) i supernatanti su držani na ledu i prebačeni u bočice s automatskim ubrizgavanjem i ubrizgani odmah na stubac HPLC (zapremina ubrizgavanja 20 µL) ili držani u hladnim automatskim uzorkivačima do 4 h. Na kraju dana

uzorkovanja, sistem je ispran s 40% acetonitrila u vodi kako bi se uklonila kisela pokretna faza i svaki potencijalni kontaminanti uzorka. SI.2 sažima postupak uzorka za ukupnu analizu vitamina C.



[SI. 2](#)

Priprema uzorka plazme za određivanje ukupne količine vitamina C pomoću UV-HPLC. Pojedinačni koraci detaljno su opisani u tekstu.

Za obe metode razvijena je standardna krivulja korištenjem jednačine linearne regresije vršnih područja od šest standarda askorbinske kiseline sastavljene u MPA / EDTA u rasponu koncentracije od 0 do 100 umol / L. Svaki uzorak je uključivao uzorak za kontrolu kvalitete plazme.

## Pacijenti

Metode UV-HPLC i EC-HPLC korištene su za analizu askorbinske kiseline i ukupne količine vitamina C u uzorcima plazme dobijenim od 80 uzastopnih kliničkih uzoraka od pacijenata koji su dolazili na kliniku za izvanbolničku onkologiju i upisali su se u studiju za procenu njihovog nutritivnog statusa. Protokol za tu studiju je

odobren od strane Etičkog odbora za istraživanje Jevrejske opšte bolnice (clinicaltrials.gov registracija # NCT01631526); rezultati će biti posebno objavljeni.

## Statistička analiza

Statističke analize su provedene koristeći Graph Pad Prism Version 5.01.

[Pogledati:](#)

## Rezultati

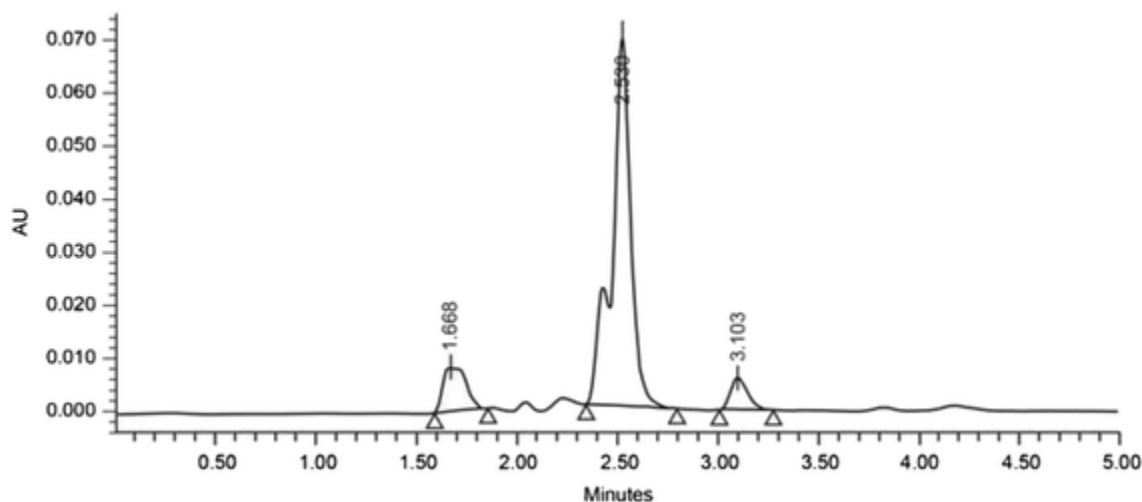
---

### Validacija UV-HPLC metode

Testiran je niz TCEP koncentracija i vremena reakcije kako bi se proverila učinkovitost gore opisanog postupka redukcije uzorka, odnosno 20 min inkubacije uz korištenje 5 mmol / L TCEP pri pH 2. Proširenje razdoblja inkubacije TCEP na 40 min nije promenilo rezultate. Signal UV apsorbancije bio je linearan i unutar uobičajenog fiziološkog raspona (5-100  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) i više ( $r^2 > 0.99$ ). Eksperimentalni uzorci u fiziološkom rasponu (dodavanje 25 i 50  $\mu\text{mol} / \text{L}$  poznate askorbinske kiseline u uzorke plazme koncentracije 37  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) rezultirali su ukupnim obnavljanjem vitamina C od 106% i 100%. Identitet i specifičnost hromatografskog vrha askorbinske kiseline potvrđeni su tretiranjem uzoraka plazme sa *askorbat oksidazom* i dokumentovanjem potpunog nestanka vrha askorbinske kiseline bez ikakve promene u hromatogramu.

Stabilnost MPA stabilizovanih uzoraka (za merenje askorbinske kiseline) i TCEP-redukovanih MPA-stabiliziranih uzoraka (za ukupno merenje vitamina C) procenjeni su tako što im je omogućeno da ostanu u HPLC autosampleru na 4 ° C do 4 h pre ubrizgavanja na stub (uzorci se normalno ubrizgavaju u periodu od jednog sata). Signal askorbinske kiseline za neusuglašene uzorke (askorbinska kiselina) smanjen je za 3-6% nakon 4 h u autosampleru, dok je signal za uzorke redukovane na TCEP (ukupna količina vitamina C) ostao nepromijenjen najmanje 5 h.

Slika 3 prikazuje tipični hromatogram izveden iz UV-HPLC.



[Sl. 3](#)

Tečni hromatogram pod visokim pritiskom (meren u UV apsorpcijskim jedinicama) izveden iz uzorka plazme u kom je ukupna koncentracija vitamina C bila 10,7  $\mu\text{mol} / \text{L}$ . Vrh askorbinske kiseline eluira 3.1 min nakon ubrizgavanja u kolonu. ...

## U poređivanje EC-HPLC i UV-HPLC metoda

Kontrolni uzorak plazme ponovno se analizira u 10 različitih dana, dajući koeficijente varijacije za EC i UV metodu od 4,5% odnosno 3,3% (za ukupnu analizu vitamina C) i 5,3% i 4,4% (za analizu askorbinske kiseline).

Koncentracije (srednja vrednost  $\pm$  SD) bile su sledeće: askorbinska kiselina  $104 \pm 5,5 \mu\text{mol} / \text{L}$  EC-HPLC i  $107 \pm 4,7 \mu\text{mol} / \text{L}$  UV-HPLC; ukupnog vitamina C  $106 \pm 4,8 \mu\text{mol} / \text{L}$  EC-HPLC i  $110 \pm 3,7 \mu\text{mol} / \text{L}$  pomoću UV-HPLC. Donja granica kvantizacije signala bila je  $1,34 \mu\text{mol} / \text{L}$  s EC-HPLC i  $<4,0 \mu\text{mol} / \text{L}$  s UV-HPLC.

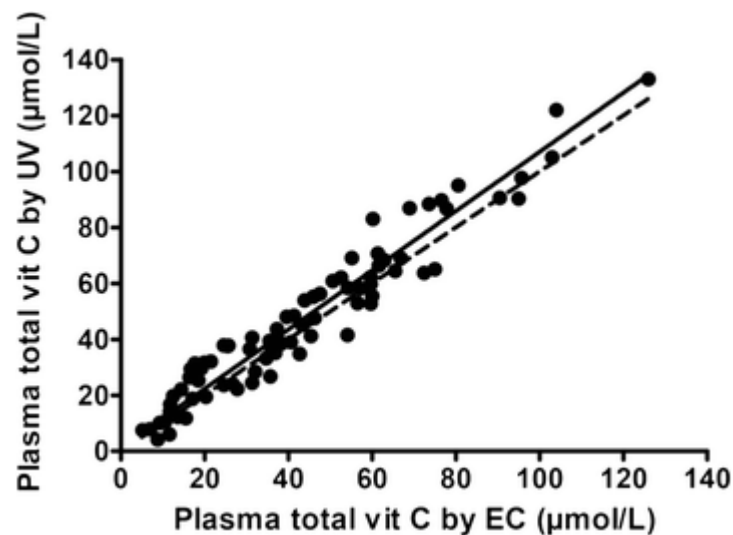
Kao što je prikazano u tabeli 1, askorbinska kiselina u plazmi i ukupna koncentracija vitamina C u 80 uzastopnih kliničkih uzoraka određenih upotrebom obe metode kretale su se od  $4\text{--}134 \mu\text{mol} / \text{L}$ ; pojedinačne vrednosti bile su visoko određene (Spearman  $r = 0,96$ ,  $P < 0,0001$  kako za askorbinsku kiselinu tako i za ukupni vitamin C).

Demingov regresijski grafikon za ukupni vitamin C prikazan je na slici 4. Interval pouzdanosti od 95% za nagib regresijske jednačine obuhvata 1 ( $0,99\text{--}1,12$ ), a odgovarajući interval za Y-presek obuhvata nulu ( $-2,15\text{--}4,49$ ), što ukazuje na to da su koncentracije dobijene različitim metodama jednake i ne razlikuju se. Sličano važi i za analizu askorbinske kiseline.

		EC-HPLC	UV-HPLC
Ascorbic acid	Mean $\pm$ SD	39.1 $\pm$ 24.3	45.2 $\pm$ 27.6
	Median (interquartile range)	35.3 (17.1-53.5)	38.1 (25.0-4)
	Range	5.80-117	4.10-134
Total vitamin C	Mean $\pm$ SD	43.3 $\pm$ 26.3	47.0 $\pm$ 27.8
	Median (interquartile range)	39.0 (20.0-59.9)	40.0 (26.5-4)
	Range	5 - 126	4 - 133

Tabela 1

Askorbinska kiselina u plazmi i ukupne koncentracije vitamina C ( $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) merene EC-HPLC i UV-HPLC kod 80 uzastopnih uzoraka uzetih od bolesnika.

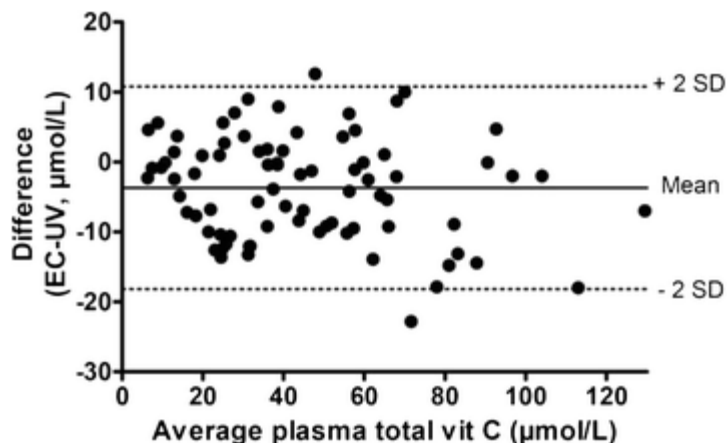


Sl. 4

Korelacija između elektrohemijskih (EC) i ultraljubičastih (UV) metoda detekcije u 80 uzastopnih kliničkih uzoraka. Puna linija predstavlja Demingovu liniju regresije. Isprekidana linija je linija identiteta.

Čak i vrlo visoka korelacija sama po sebi ne daje dovoljne dokaze za prihvatljivo podudranje između dva metoda pa je urađena Bland-Altmanova analiza kako bi se kvantifikovala svaka sistematska razlika između dva metoda [72]. Rezultirajući Bland-Altman prikaz podataka dat je na slici 5. Srednja razlika (prednapon) između EK i UV rezultata bila je  $-3,70 \mu\text{mol} / \text{L}$ . Bland-Altman grafikom uopšteno se tumače neformalno i u kontekstu njihovog kliničkog

značaja. Za ukupnu koncentraciju vitamina C  $<28,4 \mu\text{mol} / \text{L}$ , što predstavlja 24% uzorka i koje su najčešće klinički zanimljivi, prednapon između metoda bio je  $-1,02 \mu\text{mol} / \text{L}$  (nije bitnije različit od nule).



Sl. 5

Bland-Altmanov prikaz podataka dat je na slici 4. Prosečna količina vitamina C je zbir ukupnih koncentracija vitamina C dobijenih pomoću dve metode podeljene sa 2.

Tabela 2 upoređuje EC-HPLC kako se koristi u našoj laboratoriji, sa tri dostupne UV-HPLC metode [59, 63, 64] za ukupni vitamin C i ovde opisanu UV-HPLC metodu u pogledu njene primene u običnoj kliničkoj laboratoriji.

	EC <sup>a</sup>	Other UV <sup>b</sup>
Equipment		
Availability	Limited	Wide
Cost	High	Moderate
Maintenance	Complex, lengthy	Simple
Separation columns	Dedicated ion-pairing	Reverse phase c
Number of reagents	14	3-6
Reagent reformation time (h)	4	1.5

Tabela 2

Upoređivanje HPLC metoda za analizu ukupne količine vitamina C u plazmi

[idite na:](#)

## Rasprava

UV-HPLC analiza vitamina C u biološkim tečnostima nije novina kao opšti postupak: prvi je put urađena pre više od 40 godina [73], a nakon toga su objavljene mnoge varijacije [49, 51, 52, 56, 58, 60–67]. Međutim, različite metodološke složenosti i nesposobnost, kod velike većine, [59, 63, 64], da se odredi klinički važan analit, ukupna količina vitamina C, ograničavaju njihovu korisnost u kliničkom okruženju.

Ukupna količina vitamina C u plazmi je merenje izbora i to iz dva razloga: prvo, označava ukupnu količinu vitamina C u uzorku, a drugo, askorbinska kiselina se lako može oksidirati u dehidroaskorbinsku kiselinu u prometnom kliničkom okruženju zbog nehotičnih i ponekad neizbežnih kašnjenja ili manjih tehničkih nedostataka u postupku uzorkovanja ili postupku analize. Doista, postoje neki dokazi da se mnogo ili većina dehidroaskorbinske kiseline otkrivene u plazmi može proizvesti veštački tokom rukovanja uzorcima i za vreme njihove obrade [49, 74]. Obrada uzoraka s odgovarajućim sredstvom za redukciju pomaže u sprečavanju lošeg procenjivanja koncentracije vitamina C (i odatle potiče preterano dijagnostikovanje hipovitaminoze C) zbog manjih nejasnoća u postupku rukovanja i obrade uzoraka [75]. Glavna prednost sadašnjeg postupka je da je postupak redukovanja uzorka vrlo jednostavan i radi se bez problema.

Ovde opisana UV-HPLC metoda za analizu askorbinske kiseline u plazmi i ukupnu količinu vitamin C pokazuje vrlo prihvatljiv senzitivitet i reproduktivnost. Posebno je primetno, u cilju jednostavnog i brzog postavljanja, analitičko kondicioniranje kolone, manje reagensa i rukovanje uzorcima za razliku od ostalih komparabilnih metoda i vrlo jednostavne procedure redukcije uzoraka sa konstantno niskom pH vrednošću. Jedini potrebni instrumenti su stub reverzne faze HPLC i pred-stub i UV detektor, standardna oprema u bolničkim laboratorijima. Iako su ove osobine manje važne u istraživanju ili referentnoj laboratoriji, one čine metodu praktičnu za upotrebu u običnoj kliničkoj laboratoriji.

Mobilna faza je izuzetno jednostavna, stabilna i izokratična. Ova vrsta kompozicije mobilne faze prethodno je prijavljena za analizu vitamina C kod mahuna [69], ali postupak se mora menjati kako bi se uzela u obzir mnogo veća osetljivost potrebna za analizu plazme, plazma ima mnogo veću koncentraciju proteina (što zahteva visoku koncentraciju deproteinizirajuće kiseline) i potrebu za odvajanjem vrha analita od mokraćne kiseline. (Zapravo, vrh mokraćne kiseline je tako dobro odvojen da se mokraćna kiselina može analizirati pomoću ove metode [62, 66], ali ne pruža nikakvu prednost u odnosu na automatsku analizu koja je rutinski dostupna u kliničkim laboratorijima.) Druga glavna prednost ovog postupka je upotreba redukujućeg agenta TCEP na vrlo niskom Ph [70, 76], što omogućava izuzetno jednostavnu, prostu obradu i analizu uzoraka pri stalnom niskom pH. Druge metode za smanjivanje dehidroaskorbinske kiseline na askorbinsku kiselinu često uključuju višestepenske i potencijalno pogrešna pH prilagođavanja, potencijalno doprinoseći poznatom problemu između laboratorijskih varijabilnosti u rezultatima koji su prikazani ovom analizom [44].

Sadašnji postupak usko je usuglašen sa standardnom metodom zlata, EC-HPLC. Bland-Altman analiza pokazala je da je u proseku ukupna koncentracija vitamina C u plazmi 3,7  $\mu\text{mol} / \text{L}$  viša s UV metodom. Ovaj mali prednapon nije postojao za koncentracije ispod donje granice normalnog raspona, 28,4  $\mu\text{mol} / \text{L}$ , koje su od najvećeg kliničkog interesa. Nejasno je da li UV metoda neznatno nadzire koncentracije vitamina C u plazmi ili ih EC metodom malo podcenjuju. Ova formalno poređenje između dva načina otkrivanja vitamina C, UV i EE napravljeno je na 80 uzastopnih kliničkih uzoraka bez ikakvog isključivanja uzoraka.

EC-HPLC se široko preporučuje kao bolji od UV-HPLC za analizu vitamina C u plazmi [46, 49, 51, 56], ali neposredni dokazi koji ovo podržavaju nisu još dostupni. Jedino prethodno direktno poređenje EC-HPLC s UV-HPLC bilo je u odnosu na askorbinsku kiselinu umesto na ukupni vitamin C i temelji se na samo 27 uzoraka zdravih pojedinaca, a nije imalo Bland-Altmanovu analizu [52]. Ipak, sličnost prijavljena između EK i UV detekcije askorbinske kiseline, čak i pri niskim koncentracijama u plazmi, u skladu je s našim opažanjima vezanim za ukupne koncentracije vitamina C u plazmi kod mnogo većeg broja uzastopnih kliničkih uzoraka.

Jedan skorije objavljen članak opisuje UV-HPLC metodu za simultano određivanje askorbinske kiseline i dehidroaskorbinske kiseline u ljudskoj plazmi [68]. Primena ove metode u kliničkoj medicini čini se nepouzdana, jer su njene donje granice detekcije askorbinske kiseline (11,4  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) i dehidroaskorbinske kiseline (57  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) daleko iznad raspona kliničkih interesa. Štaviše, ukazuje na normalnu koncentraciju dehidroaskorbinske kiseline u plazmi od ~ 50  $\mu\text{mol} / \text{L}$  [68], uprkos jakoj snazi dokaza da koncentracije dehidroaskorbinske kiseline u plazmi retko prelazi 5  $\mu\text{mol} / \text{L}$  [77] i pod optimalnim uslovima rukovanja i obrade obično su blizu nuli [74].

UV-HPLC metoda opisana ovde, ima ograničenja. Koristili smo standardnu reverzno faznu HPLC kolone (i predkolone) koje su pokazale izvrsne performanse u periodu dužim od 1 godine tokom kog je velik broj uzoraka ubrizgavan u njih. U situacijama u kojima se analizira velik broj uzoraka mogu se razmotriti polimerne ili polarne ugrađene reverzne faze, jer su otpornije na dugotrajnu degradaciju uzrokovanu potpuno vodenom, visoko kiselom mobilnom fazom [56]. Drugi potencijalni problem je veća verovatnoća interferencije od egzogenih molekula nego od EC-HPLC-a [51, 56]. Ovaj problem nije zabeležen u periodu od 30 godina analize vitamina C u plazmi temeljene na UV zračenju, ali hospitalizovani pacijenti dobijaju mnogo različitih lekova. Koncentracije vitamina C u plazmi mogu biti precenjane ako mali eksterni molekul apsorbuje UV svetlo na 245 nm i eluira iz HPLC kolone u tačno isto vreme kao askorbinska kiselina.

[pogledati:](#)



## Zaključak

---

U bolnici hipovitaminoza C je vrlo rasprostranjena, potencijalno ozbiljna i lako se da sprečiti, ali većina lekara nije svesna njenog postojanja. Nedostupnost jednostavnih i pouzdanih metoda određivanja nivoa vitamina C kod hospitalizovanih pacijenata stvara prepreku u medicinskoj svesti i istraživanju ovog potencijalno važnog fenomena.