

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA SREČNIK
MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA SREČNIK

**VREDNOTENJE VSEBNOSTI IN STABILNOSTI LIPOFILNIH
VITAMINOV IN KOENCIMA Q₁₀ V ZDRAVILIH IN PREHRANSKIH
DOPOLNILIH Z METODO TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE
VISOKE LOČLJIVOSTI**

EVALUATION OF THE CONTENT AND STABILITY OF LIPOPHILIC
VITAMINS AND COENZYME Q₁₀ IN MEDICINES AND NUTRITION
SUPPLEMENTS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID
CHROMATOGRAPHY

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

ZAHVALA

Najlepša hvala mentorju, izr. prof. dr. Robertu Roškarju, mag. farm., za vso strokovno pomoč, nasvete in prijetno vzdušje med nastajanjem magistrske naloge.

Hvala tudi Žane Temovi Rakuša, mladi raziskovalki Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, za vso pomoč tekom praktičnega dela v laboratoriju in tudi kasneje pri pisanju magistrske naloge.

Hvala sestri Špeli za vso spodbudo in pomoč tekom študija. Zahval gre tudi vama, mami in očki, ki sta mi študij omogočila in mi nudila podporo.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno opravljala pod vodstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

Eva Srečnik

Komisija za zagovor:

Predsednica komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.

Mentor: izr. prof. dr. Robert Roškar, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Ilija Ilić, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA	i
POVZETEK	iii
ABSTRACT	iv
SEZNAM OKRAJŠAV	v
1 UVOD.....	1
1.1 RAZLIKA MED ZDRAVILI IN PREHRANSKIMI DOPOLNILI.....	1
1.2 LIPOFILNI VITAMINI IN KOENCIM Q ₁₀	2
1.2.1 Vitamin A	3
1.2.2 Vitamin D	5
1.2.3 Vitamin E.....	7
1.2.4 Vitamin K	9
1.2.5 Koencim Q ₁₀	10
1.3 ANALITIKA LIPOFILNIH VITAMINOV IN KOENCIMA Q ₁₀	12
2 NAMEN DELA	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.1.1 Reagenti in topila.....	16
3.1.2 Naprave in pribor.....	16
3.1.3 Standardi.....	17
3.1.4 Pripravki z lipofilnimi vitamini in CoQ ₁₀	18
3.2 METODE.....	19
3.2.1 Optimizacija instrumentalne HPLC metode.....	19
3.2.2 Razvoj in optimizacija ekstrakcije lipofilnih vitaminov in CoQ ₁₀ iz pripravkov.....	20
3.3 PRIPRAVA VZORCEV	21
3.3.1 Priprava mobilne faze in raztopin za vzorce	21
3.3.2 Priprava standardnih raztopin in vzorcev za vrednotenje vsebnosti in uspešnosti priprave vzorca.....	22
3.3.3 Priprava kalibracijskih raztopin in kontrolnih vzorcev	24
3.3.4 Vrednotenje vsebnosti lipofilnih vitaminov in CoQ ₁₀ v pripravkih	25
3.4 VALIDACIJA METODE	28
3.4.1 Selektivnost	28
3.4.2 Linearnost	28
3.4.3 Točnost	29

3.4.4	Natančnost	29
3.4.5	Meja zaznave in meja določitve	29
3.4.6	Robustnost	30
3.4.7	Izkoristek učinkovitosti ekstrakcije	30
3.5	STABILNOSTNA ŠTUDIJA	31
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	32
4.1	RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA ANALIZNE METODE	32
4.1.1	Optimizacija instrumentalne HPLC metode	32
4.1.2	Razvoj in optimizacija ekstrakcije lipofilnih vitaminov in CoQ ₁₀ iz pripravkov	34
4.2	VALIDACIJA HPLC METODE	38
4.2.1	Selektivnost	39
4.2.2	Linearnost	39
4.2.3	Točnost	40
4.2.4	Natančnost	41
4.2.5	Meja zaznave in meja določitve	42
4.2.6	Robustnost	42
4.2.7	Izkoristek ekstrakcije	44
4.3	VSEBNOST LIPOFILNIH VITAMINOV IN CoQ ₁₀ V PRIPRAVKIH	44
4.4	STABILNOSTNA ŠTUDIJA	47
4.4.1	Stabilnost lipofilnih vitaminov v tekočih farmacevtskih izdelkih	47
4.4.2	Stabilnost lipofilnih vitaminov in CoQ ₁₀ v mehkih kapsulah	51
4.4.3	Stabilnost lipofilnih vitaminov in CoQ ₁₀ v tabletah	55
5	SKLEPI	60
6	LITERATURA	62
7	PRILOGE	I

POVZETEK

Lipofilni vitamini so organske spojine potrebne za normalno delovanje številnih funkcij v človeškem telesu, kot so vid (vitamin A), homeostaza kalcija in fosfatov (vitamin D), antioksidativna zaščita v celičnih membranah (vitamin E) in strjevanje krvi (vitamin K). V telo jih vnašamo s hrano, občasno pa tudi z vitaminskimi pripravki. Po javnomnenjski raziskavi Ministrstva za zdravje o rabi prehranskih dopolnil so vitamini pripravki po pogostosti jemanja na drugem mestu, zato je kontrola njihove kakovosti še posebej pomembna, predvsem tistih z vitaminoma A in D, ki ob prekomernem vnosu lahko delujeta toksično. Zato je bil glavni cilj magistrske naloge preveriti vsebnost in stabilnost lipofilnih vitaminov v izbranih zdravilih in prehranskih dopolnilih pri dveh različnih temperaturah shranjevanja (25°C in 40°C).

V ta namen smo razvili hitro in enostavno analizo metodo, ki nam omogoča sočasno vrednotenje 5 lipofilnih vitaminov (v oblikah, ki se najpogosteje pojavljajo v vitaminskih pripravkih – A-palmitat, D₃, K₁, E-acetat in provitamin A – β-karoten) in koencima Q₁₀ v raztopinah, emulzijah, mehkih kapsulah in tabletah. Metoda vključuje pripravo vzorca z ekstrakcijo z dodanim butilhidroksitoluenom v zmes tetrahidrofurana, acetonitrila in vode v razmerju 45:50:5 (v/v/v) za tekoče farmacevtske oblike ter ekstrakcijo z n-heksanom in naknadnim sušenjem vzorca s prepihanjem z dušikom pri povišani temperaturi za mehke kapsule in tablete. Vzorce smo analizirali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti sklopljeno z UV detektorjem, ki smo jo validirali v skladu z ICH smernicami in potrdili njeno selektivnost, linearnost ($R^2 > 0,999$), točnost (96 – 102%), natančnost (RSD < 2%), robustnost ter dokazali dobro učinkovitost ekstrakcije (93–108%) za vse analite. Primernost analizne metode smo preverili z analizo 12 pripravkov, ki so vsebovali enega ali več lipofilnih vitaminov in koencim Q₁₀. Vsebnost lipofilnih vitaminov je bila pri večini pripravkov višja od deklarirane. Največje odstopanje od deklariranih vsebnosti smo opazili pri dveh prehranskih dopolnilih, za katera veljajo manj strogi predpisi. Trimesečna stabilnostna študija pripravkov po odprtju ovojnine je pokazala, da so lipofilni vitamini pri višji temperaturi shranjevanja bolj nestabilni. Pri 40°C smo ugotovili največji upad vsebnosti pri tekočih pripravkih, manjšega pri tabletah, pri mehkih kapsulah pa je bil upad vsebnosti minimalen. Pri 25°C smo znaten upad vsebnosti ugotovili le pri tekočih pripravkih, kjer se je A-palmitat izkazal za najmanj stabilnega.

Ključne besede: lipofilni vitamini, koencim Q₁₀, vitaminski pripravki, HPLC, ekstrakcija

ABSTRACT

Lipophilic vitamins are organic compounds which are essential for a variety of physiological functions in the human body, such as vision (vitamin A), calcium and phosphate homeostasis (vitamin D), antioxidative protection in cell membranes (vitamin E) and blood coagulation (vitamin K). As lipophilic vitamins, with the exception of vitamin D₃, can not be obtained by endogenous synthesis, food or vitamin supplements are their main source. A public opinion poll of the Ministry of Health showed that vitamin preparations are the second most frequently used nutritional supplements, so quality control of these preparations is extremely important, especially because of the risk of toxicity from excessive intake of vitamins A and D. Therefore, the main objective of the thesis was to evaluate the content and the stability of lipophilic vitamins in selected medicines and nutrition supplements at two different storage temperatures (25°C and 40°C).

For this purpose, a rapid and simple analytical method for simultaneous quantification of five lipophilic vitamins (in most commonly used forms – A-palmitate, D₃, K₁, E-acetate and provitamin A – β-carotene) and coenzyme Q₁₀ in liquid and solid preparations was developed. The method involves simple and fast extraction procedures: dilution with the mixture of tetrahydrofuran, acetonitrile and water (50/45/5, v/v/v) containing butylated hydroxytoluene for liquid preparations and extraction with n-hexane and evaporation of organic extracts under nitrogen at 40°C for solid preparations. The samples were analyzed by high performance liquid chromatography coupled with UV detector. The method was successfully validated according to the ICH guidelines in terms of selectivity, linearity ($R^2 > 0,999$), adequate accuracy (96 – 102%), precision (RSD < 2%), robustness and extraction efficiency (93–108%) for all analytes. The adequacy of the method was confirmed by testing 12 vitamin preparations containing one or more lipophilic vitamins and coenzyme Q₁₀. The content of vitamins in the majority of tested preparations was higher than declared on the label. The biggest deviation from declared content was observed in two nutritional supplements. The three-month stability study after opening has revealed that lipophilic vitamins are more unstable at 40°C. At both storage temperatures, liquid preparations were more unstable compared to solid preparations. At 25°C, only in liquid preparations significant decline in the content was observed, where A-palmitate was found to be at least stable.

Keywords: lipophilic vitamins, coenzyme Q₁₀, vitamin preparations, HPLC, extraction

SEZNAM OKRAJŠAV

A: vitamin A (retinol)

ACN: acetonitril

AK: askorbinska kislina

A-palmitat: vitamin A-palmitat (retinil palmitat)

AUC: površina pod kromatografskim vrhom (ang. Area Under the Curve)

BHT: butilhidroksitoluen

CoQ₁₀ oks.in red.: oksidirana (ubikinon) in reducirana (ubikinol) oblika koencima Q₁₀

D₃: vitamin D₃ (holekalciferol)

E: vitamin E (α -tokoferol)

E-acetat: vitamin E-acetat (α -tokoferil acetat)

HPLC: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High Performance Liquid Chromatography)

i.e.: internacionalna enota (nem. internationale einheit)

K₁: vitamin K₁ (fitomenadion)

LLE: ekstrakcija tekoče-tekoče (ang. Liquid-Liquid Extraction)

LOD: meja zaznave (ang. Limit of Detection)

LOQ: meja določitve (ang. Limit of Quantitation)

MM: molekulska masa

MF: mobilna faza

MQ: miliQ voda

rpm: obratov na minuto (ang. revolutions per minute)

RS: raztopina standarda

RSD: relativni standardni odklon (ang. Relative Standard Deviation)

SE: standardna napaka (ang. Standard Error)

T: temperatura

Tbl: tableta

THF: tetrahidrofuran

QC: kontrolni vzorec (ang. Quality Control)

1 UVOD

Vitamini so organske spojine, ki so v relativno majhnih količinah nujno potrebne za normalno delovanje človeškega organizma. Človeško telo vitaminov praviloma ne more sintetizirati, zato jih moramo v telo vnesti s hrano (1). Do danes je znanih 13 vitaminov, ki jih glede na njihovo topnost delimo v dve skupini: vitamine topne v vodi (vitamin C in vitamini B-kompleksa) in vitamine topne v maščobah (A, D, E, K) (2).

Dnevni vnos vitaminov večina zdravih ljudi zagotovi že z zdravo uravnoteženo prehrano, zato dodaten vnos z vitaminskimi pripravki ni potreben. Kljub uravnoteženi prehrani pa lahko iz različnih razlogov pride do povečane potrebe po vitaminih. Razlogi so lahko fiziološke (obdobje rasti, nosečnost, dojenje, športniki,...) ali patološke (obolenja jeter, nalezljive bolezni,...) narave. V teh primerih je jemanje vitaminskih pripravkov priporočljivo (3). Na slovenskem tržišču je prisotno veliko število vitaminskih pripravkov v različnih farmacevtskih oblikah, ki imajo predvsem status prehranskega dopolnila, med njimi pa je tudi nekaj zdravil.

1.1 RAZLIKA MED ZDRAVILI IN PREHRANSKIMI DOPOLNILI

Prehranska dopolnila so po obliki in načinu uporabe podobna zdravilom, vendar pa se tako po definiciji, zakonodaji, namenu uporabe in mestu izdajanja od le-teh bistveno razlikujejo.

Zdravila so urejena z Zakonom o zdravilih, po katerem je namen zdravil zdraviti, preprečevati, diagnosticirati bolezni ter vzpostaviti, izboljšati ali spremeniti fiziološke funkcije preko farmakološkega, imunološkega ali presnovnega delovanja pri ljudeh in živalih. Zdravilo je lahko v prometu po pridobitvi dovoljenja za promet z zdravili, ki predstavlja zagotovilo, da je zdravilo kakovostno, varno in učinkovito (4).

Prehranska dopolnila ureja Pravilnik o prehranskih dopolnilih, ki opredeljuje prehranska dopolnila kot živila, katerih namen je dopolnjevati običajno hrano in ne zdraviti ali preprečevati bolezni ter bolezenskih stanj. Gre za koncentrirane vire hranil ali drugih snovi, ki imajo hranilni ali fiziološki učinek (npr. vitamini in minerali, aminokisliline, rastline in njihovi izvlečki, maščobne kisline,...). Za razliko od zdravil, se za prehranska dopolnila ne zahteva preverjanje kakovosti in učinkovitosti, njihova varnost v prehrani ljudi pa mora biti znanstveno utemeljena (5). Z uveljavitvijo novega Pravilnika o prehranskih dopolnilih, novega prehranskega dopolnila ni več potrebno prijaviti na Ministrstvo za zdravje. Slednje tudi ne vodi več seznama prehranskih dopolnil, ki so v prometu Republike Slovenije (6).

Prehranska dopolnila in zdravila se razlikujejo tudi v dostopnosti oz. mestu izdajanja. Zdravila na recept in brez recepta se z namenom zagotovitve varne in pravilne rabe izdajajo v lekarnah. Nekatera zdravila brez recepta se lahko izdajajo tudi v specializiranih prodajalnah. Medtem ko prehranska dopolnila lahko kupimo v lekarnah, specializiranih, živilskih in spletnih prodajalnah ter v trgovinah s športno prehrano (4,6).

1.2 LIPOFILNI VITAMINI IN KOENCIM Q₁₀

Lipofilni vitamini predstavljajo strukturno raznoliko skupino spojin, ki imajo pomembne vloge v številnih biokemičnih in fizioloških procesih, kot so tvorba vidnega pigmenta (vitamin A), uravnavanje koncentracije Ca²⁺ in fosfatov v plazmi (vitamin D), antioksidativno delovanje (vitamin E) in sodelovanje v procesu strjevanja krvi (vitamin K) (7). V zadnjih dveh desetletjih več študij povezuje njihovo pomanjkanje s povečanim tveganjem za rakava obolenja, za sladkorno bolezen tipa 2, za srčno-žilna obolenja in za motnje v delovanju imunskega sistema (2).

Za lipofilne vitamine je značilno, da se večji odmerki kopičijo v maščobnem tkivu, zato je potrebno jemanju lipofilnih vitaminov z vitaminskimi pripravki nameniti več pozornosti, predvsem pripravkom, ki vsebujejo vitamina A in D, saj ob prekomernem vnosu lahko delujeta toksično (3). Priporočeni dnevni vnosi lipofilnih vitaminov so prikazani v preglednici I.

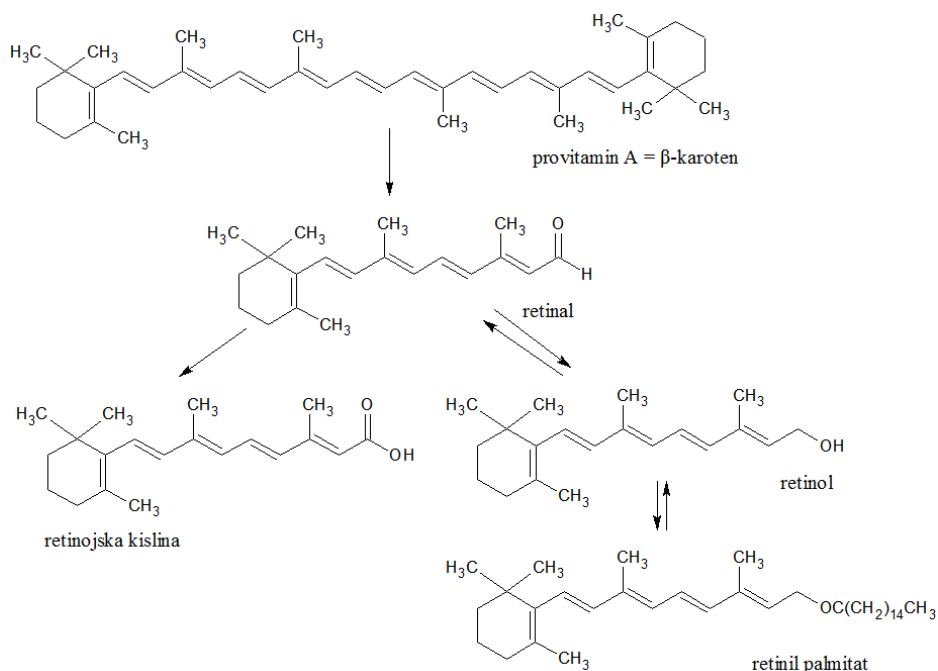
Preglednica I: Priporočeni dnevni vnosi lipofilnih vitaminov, povzeto po (8)

spol	starost [leta]	vitamin A [mg]	vitamin D [μg]	vitamin E [mg]	vitamin K [μg]
Ž	1-3	0,6	20	5	15
	4-6	0,7	20	8	20
	7-9	0,8	20	9	30
	10-12	0,9	20	11	40
	13-14	1,0	20	12	50
	15-18	0,9	20	12	60
	19-65	0,8 (1,1 ^a /1,5 ^b)	20	12 (13 ^a /17 ^b)	60-65
	nad 65	0,8	20	11	65
M	1-3	0,6	20	6	15
	4-6	0,7	20	8	20
	7-9	0,8	20	10	30
	10-12	0,9	20	13	40
	13-14	1,1	20	14	50
	15-18	1,1	20	15	70
	19-65	1,0	20	13-15	70-80
	nad 65	1,0	20	12	80

^a nosečnice do 4 meseca, ^b doječe matere

1.2.1 Vitamin A

Vitamin A je splošen izraz za vse spojine, ki imajo biološko aktivnost retinola (2). Termin retinoidi pa opisuje naravne in sintezne analoge retinola z ali brez biološke aktivnosti vitamina A (9). Do danes je znanih že več kot 4000 naravnih in sinteznih spojin, ki so strukturno ali funkcionalno povezane z vitaminom A



(10). Vitamin A se v naravi **Slika 1: Strukture retinoidov**

pojavi v treh oblikah: alkoholni (retinol), aldehydni (retinal) in kot kislina (retinojska kislina) (slika 1). Ker imajo v svoji strukturi prisotne dvojne vezi, se omenjene spojine lahko pojavljajo v obliki različnih geometričnih izomerih (cis-trans izomeri). Njihovi sintezni analogi pa imajo na vseh dvojnih vezeh trans konfiguracijo (11). V naravi poleg retinoidov najdemo še karotenoide (rastlinski pigmenti – likopen, lutein,...). Nekateri izmed njih so provitamini A, saj se v živalskem organizmu pretvorijo v vitamin A (slika 1). Izolirali so že več kot 600 karotenoidov, od le-teh jih ima le 50 aktivnost provitamin A. Med njimi je najbolj aktiven β -karoten (12,13).

Vitamin A ni topen v vodi in glicerolu, dobro pa je topen v oljih in v večini organskih topil. Večina oblik vitamina A je v kristalni obliki, vendar imajo nizko temperaturo tališča (npr. *trans*-retinol 62-64°C). Retinoidi in karotenoide izkazujejo močan absorpcijski spekter z maksimumom absorpcije v območju 318-360 nm za retinoide (325 nm *trans*-retinol) in 400-500 nm za karotenoide (450 nm β -karoten) (11,14).

Retinoidi so termolabilni, fotolabilni in nestabilni v prisotnosti oksidantov ter močnih kislin. Ker so acetatni in palmitatni estri retinola bolj stabilni, se vitamin A v farmacevtski in živilski industriji uporablja predvsem v obliki omenjenih estrov (14,15).

Glavni naravni vir vitamina A je hrana živalskega izvora (jetra, maslo, jajčni rumenjaki, ribe in polnomastno mleko). Hrana rastlinskega izvora je bogata z različnimi karotenoidi (β -karoten je prisoten v večini sadja in zelenjave rumene in zelene barve) (3,16).

Vitamin A ima v organizmu več pomembnih funkcij. Najbolj znana in raziskana je njegova vpletenost v proces vida, kjer 11-*cis*-retinal služi kot fotosenzitivna skupina opsina, na katerega je retinal pripet. Pod vplivom svetlobe poteče njegova izomerizacija v *trans*-retinal, temu sledi spontano prehajanje vidnega pigmenta v nestabilne intermediate in končna pretvorba na *trans*-retinal in opsin, kar sproži nastanek živčnega signala, ki potuje do centra za vid v možganih. Nujen je za reprodukcijo, rast in diferenciacijo epitelnih tkiv, pravilno rast kosti ter razvoj zarodka. Pripisujejo mu tudi vlogo koencima v sintezi glikoproteinov ter vlogo v hematopoezi (16,17).

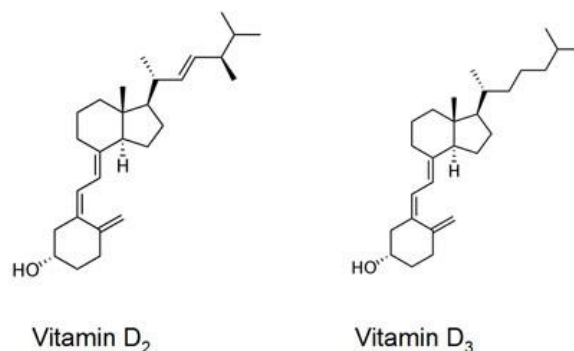
Do pomanjkanja vitamina A (hipovitaminoze) lahko pride zaradi pomanjkljive prehrane (predvsem v nerazvitih državah), bolezni, ki vplivajo na absorpcijo maščob (npr. pankreatitis, cistična fibroza, bolezni žolčnih vodov, bolezni jeter) ter premajhnih količin maščob v hrani, kar vodi v zmanjšano absorpcijo vitamina A. Zgodnji klinični znak pomanjkanja je nočna slepota. Drugi klinični znaki so še slabša rast otrok, suha koža, krhki lasje in nohti, oslavljen imunski sistem, izguba apetita, lažje oblike anemij, nepravilen razvoj zarodka, spremembe v dihalnem, prebavnem in urogenitalnem traktu. Huda hipovitaminoza lahko vodi v trajno slepoto (3,13,16).

Prekomeren vnos vitamina A pripelje do hipervitaminoze. Akutno toksičnost pri odraslih povzroči odmerek večji od 200 mg retinola, pri otrocih pa 100 mg retinola. Znaki so slabost, bruhanje, močni glavoboli, vrtoglavica, zamegljen vid, srbenje in luščenje kože. Do kronične toksičnosti pride pri vsakodnevem vnašanju odmerkov večjih od desetkratnega priporočenega dnevnega vnosa skozi daljše časovno obdobje (več mesecev, leta). Znaki so suha usta, suha in občutljiva nosna sluznica, suhe oči, vnetje očesne veznice, suha in srbeča koža, izpadanje las in dlak, lomljenje nohtov, glavobol, slabost, bruhanje, bolečine v kosteh. Po zmanjšanju odmerka večina teh znakov izgine (13,16). Teratogen učinek se lahko pojavi ob jemanju odmerkov večjih od 3 mg/dan prve tri mesece nosečnosti (18). Karotenoidi so manj toksični. Povzročijo lahko porumenelost kože, ki pa izgine po prenehanju jemanja (13). Terapevtski odmerki vitamina A, ki so višji od priporočenega dnevnega vnosa, se uporabljajo za zdravljenje ljudi z diagnosticiranim pomanjkanjem vitamina A. Za zdravljenje pomanjkanja je prva dva dneva predpisan odmerek, ki za približno dvajsetkrat presega normalnega. Nato bolnik po 2-4 tednih zopet dobi dvajsetkratni normalni odmerek (16). Dodatki vitamina A se uporabljajo preventivno za preprečevanje hipovitaminoze pri ljudeh s povečanimi potrebami (nosečnice, doječe matere, otroci). Retinojska kislina se uporablja za zdravljenje nekaterih kožnih bolezni. Tretinoin (13-*trans*-retinojska kislina), izotretinoin (13-*cis*-retinojska kislina) in adapalen (sintezni retinoidini derivat) se uporabljajo za zdravljenje

aken, nekateri sintezni analogi retinojske kisline pa za zdravljenje luskavice (npr. acitretin) (3). Karotenoidi (β -karoten) bi se lahko zaradi antioksidativnega delovanja uporabljali v preventivi kroničnih bolezni (predvsem srčno-žilnih), žal pa te hipoteze eksperimentalne raziskave še niso potrdile (16).

1.2.2 Vitamin D

Vitamin D₂ (ergokalciferol) in vitamin D₃ (holekalciferol) sta naravni obliki vitamina D. Strukturno sodita med *seko*-steroide. Vitamin D₂ je rastlinskega izvora in nastane iz provitamina D₂ (ergosterola) pod vplivom UV žarkov. Vitamin D₃ pa lahko proizvede človeško telo iz provitamina D₃ (7-



Slika 2: Strukturni vitamini D₂ in D₃

dehidroholesterola), ki se nahaja v koži (19). Pod vplivom UV žarkov pride do cepitve B obroča 7-dehidroholesterola in nastane vitamin D₃, ki preide v krvni obtok in se kopiči v jetrih. Tam se na mestu C25 hidroksilira (reakcijo katalizira vitamin D-25 hidroksilaza) in nastane 25-hidroksiholekalciferol. V ledvicah poteka zadnja stopnja, kjer pride do hidroksilacije na mestu C1 (reakcijo katalizira encim 1 α -hidroksilaza), pri tem nastane 1,25-dihidroksiholekalciferol (kalcitriol), ki je najbolj biološko aktivna oblika vitamina D₃ (20). Strukturno se vitamini D₂ in D₃ razlikujeta le po dvojni vezi med C22 in C23 ter po dodatni metilni skupini na C24 (slika 2). Posledično imata podobne fizikalno-kemijske lastnosti (14). Sta netopna v vodi ter topna v večini organskih topil. Oba močno absorbirata UV svetlobo, absorpcijski maksimum imata pri 264 nm (21).

Vitamin D je občutljiv na kisik, svetlobo in jod. Segrevanje ali blagi kisli pogoji lahko povzročijo izomerizacijo v 5,6-trans izomer in druge neaktivne oblike. Zaradi njegove termolabilnosti in fotolabilnosti lahko pri saponifikaciji pod reflusom pride do izgub. Zato je potrebno izolacijo vitamina izvajati v inertnem okolju, v vsebnikih, ki ne prepuščajo svetlobe in z dodatkom antioksidantov. V raztopinah poteče temperaturno odvisna izomerizacija vitamina D₃ in D₂ v njuni previtamin obliki. Pri tem nastane ravnotežna zmes z njunima vitaminskima oblikama. Pri 20°C je po 30 dneh razmerje previtamin D: vitamin D = 7:93, pri 100°C pa je po 30 minutah razmerje previtamin D: vitamin D = 28:72 (21). Pogosta pot nestabilnosti vitamina D je oksidacija s konjugacijo dvojne vezi na mestih 5,6 in 7,8. Vendar pa so izgube zaradi oksidacije manjše kot pri vitaminu E, β -karotenu in retinolu. Na splošno

velja, da je vitamin D v odsotnosti vode, svetlobe, kislih pogojev in pri nizki temperaturi stabilen (14).

Delež vitamina D, ki ga vnesemo s hrano, je zelo majhen v primerjavi s sintetiziranim vitaminom D₃, ki nastane v koži, ko je ta izpostavljena sončni svetlobi. Z izpostavljenostjo sončni svetlobi zagotovimo dnevne potrebe po vitaminu D, v odsotnosti sončne svetlobe pa postanejo pomembni tudi drugi viri (hrana, vitaminski pripravki). Najboljši vir vitamina D so ribje olje in mastne ribe (sardela, tuna, losos), manjše količine pa najdemo tudi v jajčnem rumenjaku, jetrih in mlečnih izdelkih (19).

Glavna fiziološka vloga vitamina D₃ (v obliki kalcitriola) je uravnavanje koncentracije Ca²⁺ in fosfatov v krvi. Pri tem sodeluje skupaj s parathormonom in kalcitoninom. Vitamin D₃ deluje kot hormon, saj se po vstopu v tarčne celice veže na znotrajcelični receptor za vitamin D₃ (VDR). Nastali kompleks receptor-vitamin D₃ se premakne v jedro, kjer deluje kot transkripcijski dejavnik in vpliva na transkripcijo genov, predvsem na tiste, vpletene v presnovo Ca²⁺ in fosfatov. V tankem črevesju pospeši prenos Ca²⁺ preko enterocitov v plazmo, v ledvicah pa poveča reabsorpcijo in zmanjša izločanje Ca²⁺ in fosfatov z urinom. S tem zviša koncentracijo Ca²⁺, kar pospeši mineralizacijo kostnega matriksa. V visokih odmerkih ima neposreden učinek na kostnino, saj pospešuje resorpcijo kostnine (20, 22). Vitamin D ima tudi številne druge biološke vloge, saj so VDR receptorje našli tudi v drugih tkivih (možganih, trebušni slinavki, celicah imunskega sistema, pljučih, mišicah, želodcu, rakavih celicah, jajčnikih,...), ki niso udeležena v uravnavanje kalcija. Mehanizem delovanja in učinki vitamina D na omenjena tkiva še niso povsem jasni (23). Nekatere študije povezujejo vitamin D z zmanjšanim tveganjem za sladkorno bolezen, srčno-žilnimi obolenji in nekaterimi vrstami raka (22).

Po ocenah naj bi hipovitaminozo D imela kar ena milijarda ljudi po vsem svetu (24). Vzroki za pomanjkanje vitamina D₃ so nezadostna izpostavljenosti soncu, pomanjkanje vitamina D v hrani, motnje v njegovi absorpciji (vnetje trebušne slinavke, Chronova bolezen) in metabolizmu (bolezni jeter – hepatitis, ciroza jeter, posledica je zmanjšana aktivnost vitamin D-25hidroksilaze; bolezni ledvic – nefritis, ledvična odpoved, posledica je zmanjšana aktivnost 1 α -hidroksilaze), jemanje nekaterih zdravil (npr. protiepileptična – fenobarbital, povzroči razgradnjo 25-hidroksiholekalciferola in kalcitriola) ter povečane potrebe (nosečnost, dojenje) (22). Pomanjkanje vodi v nastanek rahitisa pri otrocih, pri odraslih pa v osteomalacijo (20).

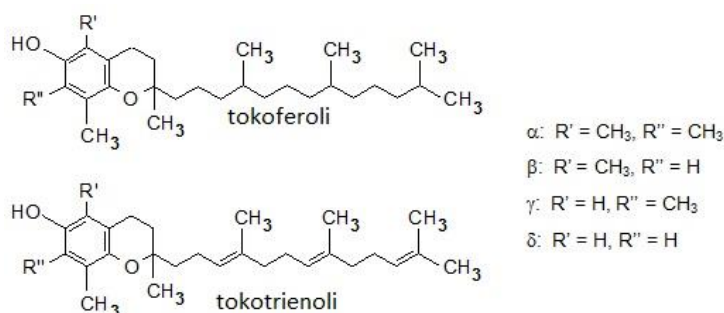
Prekomerno uživanje vitamina D lahko privede do toksičnih učinkov, ki jih tako kot pri vitaminu A povzroči prekomerno uživanje pripravkov, ki vsebujejo omenjena vitamina. Znaki

zastрупitve so hiperkalcemija, hiperkalcemija, izguba apetita, slabost, bruhanje, žeja, poliurija, bolečine v sklepih, mišična šibkost in glavobol (23). Glavna posledica hipervitaminoze D je kalcifikacija mehkih tkiv (ledvice, pljuča, srce) (3).

Terapevtske indikacije vitamina D₃ so: preprečevanje rahitisa pri dojenčkih in otrocih (400-1000 i.e./dnevno), dodajanje vitamina D, ko izpostavljenost sončni svetlobi ni možna, pri povečanih potrebah (nosečnice, doječe matere – 400 i.e./dnevno) ter zdravljenje in preprečevanje osteoporoze (400-1000 i.e./dnevno) (25).

1.2.3 Vitamin E

Vitamin E je splošen izraz za vse tokolne in tokotrienolne derivate, ki izkazujejo biološko aktivnost α -tokoferola. Osnovna struktura tokolov in tokotrienolov je kromanski obroč oz. 6-kromanol, na katerega je pripeta nasičena (tokol) oz. nenasičena



(tokotrienol) izoprenoidna stranska veriga. **Slika 3: Strukture tokoferolov in tokotrienolov**

Trenutno je znanih osem naravnih oblik

vitamina E, ki se razlikujejo po številu in položaju metilnih skupin na kromanskem obroču: α -, β -, γ - in δ - tokoferoli oz. tokotrienoli (14,26) (slika 3). Omenjene oblike imajo različno biološko aktivnost, največjo ima α -tokoferol (27). Tokoferoli imajo v svoji strukturi 3 kiralne centre, posledično imajo lahko osem optičnih izomerov. Sintezni α -tokoferol je zmes osmih možnih stereoizomerov, medtem ko ima naravni α -tokoferol na vseh kiralnih centrih konfiguracijo R. Stereoizomeri imajo različno biološko aktivnost, največjo ima RRR- α -tokoferol (28).

Vse oblike vitamina E so brezbarvna do svetlo rumena viskozna olja, ki niso topna v vodi ter dobro topna v večini organskih topil. Tokoferoli in tokotrienoli izkazujejo maksimalno absorpcijo med 292 in 298 nm. Esterifikacija hidroksilne skupine spremeni UV spekter in sicer ima vseracemni α -tokoferilacetat absorpcijski maksimum pri 286 nm. Tokoferoli in tokotrienoli izkazujejo močno fluorescenco (valovna dolžine eksitacije 294 nm in emisije 330 nm), kar predstavlja prednost pri njihovi analitiki (14,26).

Vitamin E je relativno nestabilen. Občutljiv je na oksidante, vključno z zračnim kisikom, dnevno svetlobo in UV-svetlobo. Njegovo oksidacijo pospešujejo svetloba, segrevanje, bazičen pH in različni kovinski ioni, zlasti železovi in bakrovi. V odsotnosti kisika je

relativno stabilen, tudi pri močnem segrevanju (do 200°C) in bazičnih pogojih. Estri vitamina E so bolj stabilni, saj je hidroksilna skupina ključna za njegovo antioksidativno delovanje. Posledično se v zdravilih in prehranskih dopolnilih pogosto uporabljajo njegovi estri, najpogosteje vseracemni α -tokoferilacetat (14,26,29,30).

Bogati viri vitamina E so rastlinska olja, zlasti olje pšeničnih kalčkov, mandlji, jajca (rumenjaki), ribe in nekatera zelenjava (npr. špinača) (3,31).

Vitamin E ima v organizmu vlogo glavnega membranskega antioksidanta, kjer ščiti celice pred lipidno peroksidacijo. Za njegovo antioksidativno delovanje je odgovorna fenolna skupina, ki prispeva vodik peroksilnemu radikalju in s tem prekine verižno reakcijo lipidne peroksidacije. Pri tem nastane stabilen fenilni radikal oz. tokoferil radikal, ki se lahko sam razgradi ali pa ga regenerira askorbinska kislina oz. koencim Q₁₀ (32). V zadnjih nekaj letih se vitaminu E pripisujejo tudi druge biološke funkcije, ki niso povezane z njegovim antioksidativnim delovanjem, ampak so posledica njegovih specifičnih interakcij z encimi, strukturnimi proteini, lipidi in transkripcijskimi faktorji (npr. zavira protein kinazo C, modulira aktivnost fosfolipaze A₂, zavira agregacijo trombocitov, modulira transkripcijo nekaterih genov) (33).

Pri ljudeh redko pride do pomanjkanja vitamina E. Vzroki so najpogosteje motnje v absorpciji maščob. Klinični znaki pomanjkanja so različni, najpogosteje zajemajo spremembe v mišičnem (šibkost mišic), srčno-žilnem (miopatija), reproduktivnem (sterilnost, splav), živčnem (ataksija, oftalmoplegija, hiporefleksija) in hematopoetskem sistemu (hemolitična anemija) (14,31,32).

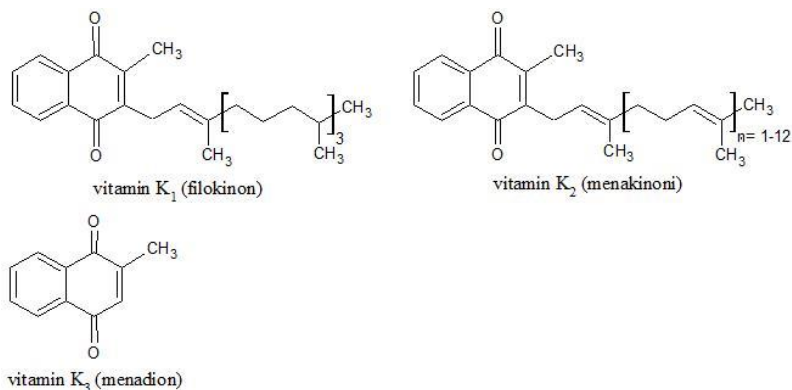
Vitamin E sodi med manj toksične vitamine, saj tudi vsakodnevno jemanje 400 mg ter zaužitje 3200 mg v enem odmerku ni nevarno. Pri kroničnem uživanju 1000 mg/dan se lahko pojavijo toksični učinki, kot so glavobol, izčrpanost, slabost, motnje vida, šibkost mišic, blaga kreatininurija ter driska. Omenjen odmerek zmanjša karboksilacijo od vitamina K odvisnih proteinov in posledično se podaljša čas strjevanja krvi (32).

Zaradi sposobnosti lovljenja radikalov, bi vitamin E lahko uporabljali v preventivi in zdravljenju bolezni, katerih patogeneza je povezana z oksidativnim stresom (srčno-žilna obolenja, prezgodnje staranje, revmatoidni artritis, sladkorna bolezen, vnetja, cistična fibroza, kancerogeneza, nevrodegenerativna obolenja,...) (34,35). Izvedli so številne študije, v katerih so preučevali vpliv uživanja visokih odmerkov vitamina E na omenjene bolezni, zlasti srčno-žilne, vendar so si rezultati različnih študij pogosto nasprotujoči (35). Zato je jemanje večjih odmerkov vitamina E smiselno le pri bolnikih z moteno absorpcijo, npr. pri kronični holestazi

in abetalipoproteinemiji (100-150 i.e./kilogram telesne mase) ter pri cistični fibrozi (400 i.e./dan) (32).

1.2.4 Vitamin K

Vitamin K je splošen izraz za 2-metil-1,4-naftokinon in vse njegove derivate, ki izkazujejo antihemoragično aktivnost vitamina K₁ (14). Poznane so tri oblike vitamina K – vitamin K₁ (filokinon, fitonadion, fitomenadion), ki ga sintetizirajo



Slika 4: Strukture različnih oblik vitamina K

rastline, vitamin K₂ (menakinoni), ki ga sintetizirajo bakterije, vključno z bakterijami v človeškem črevesju, ter vitamin K₃, ki je sinteznega izvora (3,14) (slika 4). Vitamin K₂ predstavlja serijo spojin pod skupnim imenom menakinoni, katerih stranska veriga je sestavljena iz različnega števila nenasičenih prenilnih enot (običajno od 4 do 13) (14). Vitamin K₃ pa je provitamin, ki se v organizmu metabolizira do menakinonov (36).

Omenjene oblike vitamina K niso topne v vodi, so slabše topne v etanolu in dobro topne v etru, kloroformu in drugih nepolarnih organskih topilih. Vitamin K₁ in menakinoni izkazujejo značilen UV spekter naftokinonov z maksimumom absorpcije v območju od 240 do 270 nm (36).

Vitamin K je nestabilen, ko je izpostavljen svetlobi, alkalnim pogojem in v prisotnosti kovinskih ionov ter relativno stabilen v oksidativnem okolju in pri povišani temperaturi (15,36).

Bogati naravni viri vitamina K₁ so zelena zelenjava (npr. špinača, brokoli, zelje, brstični ohrovt), nekatera rastlinska olja (sojino, olivno, ogrščično) in nekatere stročnice (14).

Fiziološka vloga vitamina K je, da kot kofaktor encima γ -glutamil karboksilaze pretvarja specifične glutamilne ostanke (Glu ostanke) v nekaterih proteinih (imenovani tudi od vitamin K odvisni proteini) v γ -karboksilirane glutamilne ostanke. Za uspešen potek karboksilacije mora biti vitamin K v reducirani obliki. Nastali γ -karboksilirani glutamilni ostanki predstavljajo vezavna mesta za Ca²⁺ ione in so bistveni za biološko aktivnost od vitamina K odvisnih proteinov (37). Najbolj znani in raziskani od vitamina K odvisni proteini so krvni koagulacijski faktorji – II (protrombin), VII, IX in X ter antikoagulacijski proteini – C, S in Z,

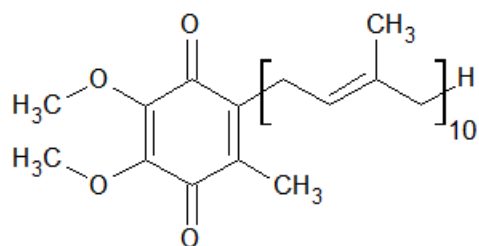
zato je vitamin K nujno potreben za normalen potek strjevanja krvi. V odsotnosti vitamina K ne prihaja do karboksilacije omenjenih faktorjev in posledično ti ne morajo vstopiti v proces strjevanja krvi (38). Znani od vitamina K odvisni proteini so še osteokalcin, matriks Gla-protein in protein S, ki so vključeni v kostni metabolizem (14).

Pomanjkanje vitamina K je pogosto pri novorojenčkih, kjer gre za fiziološko pomanjkanje. Vzrokov za fiziološko pomanjkanje je več: vitamin K slabo prehaja placento (posledično imajo novorojenčki majhne zaloge vitamina K), v prvih nekaj dneh po rojstvu je črevesna mikroflora novorojenčkov sterilna (ni sinteze vitamina K₂ s strani bakterij), materino mleko ni zadosten vir vitamina K. Posledično lahko pride do hemoragične diateze. S preventivnim dodatkom vitamina K po porodu pa je mogoče to preprečiti. Pri odraslih je pomanjkanje vitamina K redko. Najpogostejši vzroki za njegovo pomanjkanje so motena absorpcija maščob in s tem vitamina K (npr. pri boleznih gastrointestinalnega trakta, holestazi, boleznih jeter,...), antikoagulantna terapija (preveliko odmerjanje kumarinskih antikoagulantov) in dolgotrajno zdravljenje z antibiotiki. Le redko je vzrok nezadosten vnos s hrano (38). Pomanjkanje vitamina K se tudi pri odraslih lahko izrazi v obliki hemoragične diateze (39). Vitamin K se uporablja v preventivi (novorojenčki) in za preprečevanje krvavitev, do katerih lahko pride pri pomanjkanju vitamina K.

Visoki odmerki vitamina K₁ in vitamina K₂ nimajo toksičnih učinkov, kar pa ne velja za visoke odmerke vitamina K₃. Le-ta v visokih odmerkih lahko povzroči hemolitično anemijo in hiperbilirubinemijo. Zaradi omenjenih toksičnih učinkov vitamina K₃, je pri preventivi novorojenčkov in terapiji pomanjkanja vitamina K, le-tega nadomestil vitamin K₁ (38).

1.2.5 Koencim Q₁₀

Koencim Q₁₀ (CoQ₁₀) je vitaminom sorodna, endogena, lipofilna spojina, ki se zaradi svojega antioksidativnega delovanja pogosto pojavlja v vitaminskih pripravkih. Kemijsko gledano je kinon (2,3-dimetoksi-5-metil-1,4-benzokinon), na katerega je na mestu 6 pripeta izoprenoidna stranska veriga (10 izoprenoidnih enot), ki daje spojini lipofilni značaj (slika 5) (40).



Slika 5: Struktura koencima Q₁₀ (oksidirana oblika)

Je rumen oz. oranžen kristalinični prašek s tališčem okrog 48°C, netopen v vodi, topen v vročem etanolu ter dobro topen v acetonu, etru in n-heksanu (41,42). Maksimum absorpcije ima pri 275 nm (43).

Oksidirana oblika CoQ₁₀ je nestabilna, ko je izpostavljena svetlobi, povišani temperaturi ($T > 45^{\circ}\text{C}$), oksidantom (po 48-ih urah izpostavljenosti 6% raztopini H₂O₂ se popolnoma razgradi) in bazičnim pogojem (po 48-ih urah izpostavljenosti 0,2 M NaOH se popolnoma razgradi). V kislem mediju je stabilen (42,44,45).

Človeško telo samo sintetizira CoQ₁₀, vendar pa njegova sinteza s starostjo upada, zato je pomemben tudi zunanji vnos (hrana, prehranska dopolnila). Bogat naraven vir CoQ₁₀ je rdeče meso, ribe (sardine, skuše), rastlinska olja (olivno) in oreščki (arašidi, orehi). Priporočen dnevni vnos še ni določen zaradi pomanjkanja podatkov o varnosti uživanja CoQ₁₀ pri zdravih posameznikih. Za dopolnjevanje prehrane se priporoča občasni vnos s prehranskimi dopolnili do dnevnega odmerka 50 mg (40,46).

Njegova najpomembnejša vloga je sodelovanje v oksidacijsko-redukcijskih reakcijah mitohondrijske dihalne verige (prenaša elektrone in protone med kompleksi I, II in III), ki na koncu vodijo v nastanek energije v obliki adenozin-trifosfata – ATP (47). Deluje tudi kot antioksidant (v reducirani obliki) in ima posledično zaščitno vlogo pri preprečevanju oksidativnih poškodb. Njegova antioksidativna vloga je povezana tudi s sinergističnim delovanjem z vitaminom E, kjer CoQ₁₀ lahko regenerira α -tokoferil radikal in s tem varuje celice pred lipidno peroksidacijo. Njegova antioksidativna aktivnost je manjša od vitamina E (48). Stabilizira celične membrane ter ima pomembno vlogo pri prenosu protonov preko membrane lizosomov, s čimer ohranja optimalno pH vrednost v celicah. Lizosomi namreč vsebujejo prebavne encime, ki lahko delujejo le pri določeni pH vrednosti (47).

Do pomanjkanja CoQ₁₀ lahko pride zaradi zmanjšane biosinteze (ta se zmanjša s starostjo, pri redkih posameznikih pa tudi zaradi jemanja statinov - zaviralcev HMG-CoA reduktaze), različnih bolezenskih stanj, pri ljudeh z neuravnoteženo prehrano in pri kadilcih (40).

V zadnjih letih se je uporaba CoQ₁₀ v terapevtske in preventivne namene močno razširila. Uporablja se kot alternativni pristop poleg standardnih oblik zdravljenja pri srčno-žilnih obolenjih (srčno popuščanje, kardiomiopatije, arterijska hipertenzija, pred in po srčnih operacijah, ateroskleroza,...), pri preventivi migrene, pri bolnikih s Parkinsonovo boleznijo (vpliva na upočasnitev bolezni), pri vnetju obzobnih tkiv – periodontitis (topikalna in peroralna uporaba), pri neplodnih moških ter pri Huntingovi bolezni. Terapevtski odmerki CoQ₁₀ so od 100 do 300 mg/dan, medtem ko se v terapiji Parkinsonove bolezni uporabljajo zelo visoki odmerki – do 3000 mg/dan (47,49).

1.3 ANALITIKA LIPOFILNIH VITAMINOV IN KOENCIMA Q₁₀

Za analizo posameznih lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ so bile v preteklosti in tudi sedanjosti razvite številne metode, ki so zbrane v preglednici II.

Preglednica II: Pregled analiznih metod za vrednotenje posameznih lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀

	vitamin A	vitamin D	vitamin E	vitamin K	koencim Q ₁₀
Strokovna literatura	kolorimetrične (Carr-Price), spektrofotometrične, spektrofotometrične, kromatografske metode (50)	kolorimetrične, spektrofotometrične, kromatografske, imunološke, biološke metode (50)	kolorimetrične, spektrofotometrične, spektrofotometrične, polarimetrične, kromatografske metode (50)	spektrofotometrične, spektrofotometrične, elektrokemične, kromatografske metode; titrimetrična metoda z cerijevim sulfatom, kolorimetrična metoda za vitamin K ₃ (50)	spektrofotometrične (51), kromatografske (42,44,45), voltametrične (48), titrimetrične metode (52), infrardeča spektroskopija (FT-IR) (53), jedrska magnetna resonanca (¹ H NMR) (54)
Evropska farmakopeja (55)	reverznofazna tekočinska kromatografija, spektrofotometrija	normalnofazna tekočinska kromatografija	plinska kromatografija	normalnofazna tekočinska kromatografija	reverznofazna tekočinska kromatografija
Ameriška farmakopeja (56)	normalnofazna tekočinska kromatografija	normalnofazna tekočinska kromatografija	plinska kromatografija	reverznofazna tekočinska kromatografija	reverznofazna tekočinska kromatografija

Med navedenimi metodami se danes za vse posamezne lipofilne vitamine in CoQ₁₀ najpogosteje uporablja HPLC metoda sklopljena z različnimi detekcijskimi tehnikami, saj omogoča hitro ločbo in kvantitativno vrednotenje, hkrati pa izkazuje dobro selektivnost, natančno in točnost (57).

Za sočasno vrednotenje lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ v vitaminskih pripravkih je bilo razvitih manj metod (preglednica III). Vzroki so razlike v fizikalno-kemijskih lastnostih spojin, velike razlike v koncentracijah različnih vitaminov in CoQ₁₀ v enem pripravku (D₃ in K₁ sta običajno v µg območju, A, CoQ₁₀ in E pa so v mg območju), različna stabilnost lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ (kar oteži njihovo ekstrakcijo), pripravki vsebujejo še številne druge komponente (le-te lahko predstavljajo interference) ter vsak lipofilni vitamin in CoQ₁₀ zahteva specifične detekcijske parametre (50,58). Razvite so predvsem kromatografske metode, med katerimi prav tako prevladuje HPLC metoda. V večini primerov je HPLC sklopljena z UV-VIS detektorjem, saj vsi lipofilni vitamini in CoQ₁₀ dobro absorbirajo svetlobo v UV območju (15,50).

Fluorescenčna detekcija se uporablja le v primerih, ko sta v vzorcu prisotna vitamina A in E, saj vitamin D ne fluorescira, vitamin K₁ in CoQ₁₀ pa je potrebno predhodno reducirati (50,59,60). V zadnjih letih se je začela uveljavljati uporaba tekočinske kromatografije sklopljene z masnim spektrometrom (LC-MS, LC-MS/MS) (50). HPLC metode so primerne za sočasno vrednotenje lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ v raztopinah standardov, farmacevtskih pripravkih, bioloških vzorcih in hrani (61). V večini primerov se za ločbo lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ uporablja porazdelitvena kromatografija, ki jo delimo na normalnofazno in reveznofazno. Slednja se uporablja najpogosteje (15).

Pred samo HPLC analizo je potrebna ustrezna priprava vzorcev. Za ekstrakcijo lipofilnih vitaminov so v objavljenih metodah uporabljali ekstrakcijo z uporabo organskih topil, ekstrakcijo tekoče-tekoče (LLE), ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE) in superkrično tekočinsko ekstrakcijo (SFE). Za enostavnejše vzorce (npr. tekoči pripravki) se najpogosteje uporablja ekstrakcija z organskimi topili, medtem ko se ekstrakcija tekoče-tekoče pogosto uporablja za ekstrakcijo vitaminov iz bioloških vzorcev. Vrednotenje lipofilnih vitaminov v zdravih in prehranskih dopolnilih, ki so v trdnem stanju, vključuje predhodne ekstrakcijske korake (npr. drobitev tablet ali pa razpad tablet z dodatkom kislin) (62). Veliko postopkov vključuje saponifikacijo celotnega vzorca, kateremu sledi ekstrakcija z organskimi topili. Saponifikacija se izvaja z namenom hidrolize estrov vitamina A, E in maščobnih kislin (triacilgliceridi), ki so prisotne v vzorcu. Posledično se karotenoidi, retinoidi in vitamin D lažje ekstrahirajo iz vzorca (15). Najpogosteje uporabljeno topilo za ekstrakcijo lipofilnih vitaminov je heksan (63), pogosto se uporabljajo še dietil eter, kloroform, diklorometan, tetrahidrofur, etil acetat, metanol, etanol in njihove mešanice (14,15,62,64).

V preglednici III je zbranih nekaj analiznih metod, ki so jih raziskovalci uporabili za sočasno vrednotenje lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ v vitaminskih pripravkih.

Preglednica III: Nekaj primerov analiznih metod za vrednotenje lipofilnih vitaminov v farmacevtskih pripravkih

vir	vzorec	lipofilni vitamini	analizna metoda	priprava vzorca
(43)	mehke kapsule, tablete	A-palmitat, E, E-acetat, CoQ ₁₀	HPLC-UV LC- MS	mehke kapsule: ekstrakcija z metil tetra-butil etrom/MeOH = 1/1 (v/v) tablete: predhodna zdrobitev tablet, nato ekstrakcija s petrolej/etilacetat/MeOH = 1/1/1 (v/v/v), uparili topilo na rotavaporju, suhi preostanek raztopili v metil tetra-butil eter /MeOH = 1/1 (v/v)
(59)	multivitaminske tablete	A-acetat, D ₃ , E	HPLC-UV HPLC- FLD	ekstrakcija z 0,01% trifluoroocetno kislino/MeOH = 80/20 (v/v)
(65)	tablete	A, D ₃ , E	HPLC-UV	LLE z EtOH/0,2% H ₃ PO ₄ = 50/50 (v/v) in n-heksanom, organsko fazo posušili s prepihanjem z N ₂ , suhi preostanek raztopili v MeOH
(66)	kapsule	A-acetat, D ₃ , E-acetat	HPLC-UV	ekstrakcija z MeOH (vseboval 0,1% BHT)
(67)	multivitaminske tablete	retinil ester, D ₃ , E-acetat, K ₁	HPLC-UV	ekstrakcija na trdnem nosilcu
(68)	kapsule	A-acetat, A-palmitat, D ₃ , 1-OH D ₃ , E-acetat	HPLC-UV	ekstrakcija z n-heksan/MeOH = 10:90 (v/v)
(69)	tablete, mehke kapsule	A, karotenoidi (lutein, α-karoten, β-karoten)	HPLC-UV	LLE z 0,1N HCl in CHCl ₃ , organsko fazo posušili s prepihanjem z N ₂ , suhi preostanek raztopili v MeOH/iPrOH = 50/50 (v/v)
(58)	multivitaminske tablete	A-acetat, D ₃ , E-acetat, karotenoidi (β-karoten, lutein, zeaksantin)	LC- MS/MS	LLE z heksan/etil acetat = 9/1 (v/v), organske faze posušili s prepihanjem z N ₂ , suhi preostanek raztopili v MeOH
(50)	multivitaminske tablete	A, E, β-karoten	HPLC-UV	LLE z dimetilsulfoksidom in heksanom
(15)	multivitaminski pripravek	A-palmitat, E-acetat, D ₃	HPLC-UV	ekstrakcija na trdnem nosilcu
(15)	tekoči pripravki	A-acetat, A-propionat, A-palmitat, E, β-karoten	HPLC-UV	ekstrakcija z CHCl ₃

HPLC-UV = tekočinska kromatografija visoke ločljivosti sklopljena z UV detektorjem; LC-MS = tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo; HPLC-FLD = tekočinska kromatografija visoke ločljivosti sklopljena z fluorescenčnim detektorjem; LLE = ekstrakcija tekoče-tekoče; BHT = butilhidroksitoluen; CHCl₃ = kloroform; iPrOH = izopropanol

2 NAMEN DELA

Lipofilni vitamini imajo v človeškem organizmu številne pomembne fiziološke vloge: vitamin A je udeležen v procesu vida, vitamin D uravnava koncentracijo Ca^{2+} in fosfatov v krvi, vitamin E je glavni membranski antioksidant, vitamin K pa je nujen za normalen potek strjevanja krvi. Njihovo pomanjkanje posledično privede do različnih zdravstvenih težav, zato je pomembno, da jih v telo vnesemo v zadostni količini bodisi s hrano bodisi z vitaminskimi pripravki. Zaradi velikega števila vitaminskih pripravkov na slovenskem tržišču in vse večjega števila uporabnikov, je preverjanje njihove kakovosti vse bolj pomembno. Zato bomo v okviru magistrske naloge vrednotili vsebnost in kasneje tudi stabilnost lipofilnih vitaminov in CoQ_{10} v nekaterih izbranih zdravilih in prehranskih dopolnilih.

Za ta namen bomo najprej optimizirali in nato v skladu z ICH smernicami validirali predhodno razvito instrumentalno HPLC metodo, ki nam bo omogočila sočasno vrednotenje lipofilnih vitaminov, v oblikah ki se najpogosteje pojavljajo v vitaminskih pripravkih (A-palmitat, D_3 , E-acetat, K_1 , provitamin A – β -karoten) in CoQ_{10} . Kasneje bomo razvili in optimizirali enostavne postopke za ekstrakcijo lipofilnih vitaminov in CoQ_{10} iz tekočih in trdnih vitaminskih pripravkov. Zaradi razlik v sestavi izbranih pripravkov bomo razvili tri ločene ekstrakcijske postopke (za tekoče pripravke, mehke kapsule in tablete). Preverili bomo različna ekstrakcijska topila, postopke mešanja, temperature sušenja ekstraktov in topila za rekonstitucijo suhega ostanka. Primernost razvite analizne metode bomo preverili na dvanajstih pripravkih različnih farmacevtskih oblik (raztopine, emulzije, tablete, mehke kapsule), ki vsebujejo enega ali več lipofilnih vitaminov in CoQ_{10} . Sledilo bo vrednotenje vsebnosti lipofilnih vitaminov in CoQ_{10} v testiranih pripravkih. Ker bomo preverjali tako zdravila kot prehranska dopolnila, se bomo osredotočili tudi na morebitne razlike med obema skupinama pripravkov. Ker so lipofilni vitamini in CoQ_{10} relativno neobstojni, bomo izvedli še trimesečno stabilnostno študijo izbranih pripravkov pri različnih temperaturah shranjevanja (25°C in 40°C) in s tem preverili njihovo stabilnost v tekočih in trdnih farmacevtskih oblikah.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti in topila

- Acetonitril: CH_3CN , MM = 41,05 g/mol, HPLC grade, $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Brezvodni železov (III) klorid: FeCl_3 , MM = 162,2 g/mol (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Butilhidroksitoluen (BHT): $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$, MM = 220,35 g/mol, 99,8% (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Brezvodni etanol: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, MM = 46,07 g/mol, puriss p.a. Reag. Ph. Eur. (Gram mol, Hrvaška)
- Demineralizirana voda, Fakulteta za farmacijo
- Etanol: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, MM = 46,07 g/mol, $\geq 96,6\%$ (Gram mol, Hrvaška)
- Fosforjeva(V) kislina: H_3PO_4 , MM = 98,00 g/mol, 85% (Merck, Nemčija)
- L-askorbinska kislina (AK): $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_9$, MM = 176,12 g/mol, 99,0% (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Metanol: CH_3OH , MM = 32,04 g/mol, HPLC grade, $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- MiliQ voda, Fakulteta za farmacijo
- n-heksan: C_6H_{14} , MM = 86,18 g/mol, puriss p.a., reag. Ph. Eur., $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Tetrahidrofuran (THF): $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$, MM = 72,11 g/mol, HPLC grade, $\geq 99,9\%$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)

3.1.2 Naprave in pribor

- Analitski sistem HPLC :
 - Agilent 1100-1200 series HPLC (Agilent Technologies, ZDA) vsebuje: kvarterno črpalko, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono in variabilni UV-VIS detektor
 - Kolone: Synergi Hydro C18, 250×4,6 mm, 4 μm (Phenomenex, ZDA), Gemini C18, 100×4,6 mm, 3 μm (Phenomenex, ZDA) in Luna C18, 150×4,6 mm, 5 μm (Phenomenex, ZDA)
 - Predkolona: Luna C18 4×3,0 mm (Phenomenex, ZDA)
 - Programska oprema: ChemStation
- Analitska tehtnica Excellence Plus (Mettler Toledo, Švica)

- Avtomatske pipete: 2-20 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL (Eppendorf, Nemčija)
- Centrifuga Centric 400R (Tehtnica, Slovenija)
- 15 mL plastične epruvete z navojnim zamaškom (TPP, Švica)
- Hladilnik (Gorenje, Slovenija)
- Klimatska komora VC 4034 (Vötsch, Nemčija)
- Sistem za pripravo MiliQ vode A10 Advantage (Millipore Corporation, ZDA)
- Sistem za pripravo demineralizirane vode Millipore Elix 35 (Millipore Corporation, ZDA)
- Steklovina: čaše, čolnički za tehtanje, merilne bučke, merilni valji, merilne pipete, polnile pipete, 4 mL epruvete za sušenje, vialo, zamaški
- Ostalo: nastavki za pipete, spatule, zamaški za vialo, Parafilm M, pinceta, skalpel, škarje, zaščitne rokavice
- Stresalnik Vibromix 10 (Tehtnica, Slovenija)
- Stresalnik Vibromix 403 EVT (Tehtnica, Slovenija)
- Ultrazvočna kadička Sonis 4 (Iskra, Slovenija)
- TurboVap LV (Caliper, ZDA)

3.1.3 Standardi

- Koencim Q₁₀: C₅₉H₉₀O₄, MM = 863,37 g/mol, delovni standard (Kaneka Corporation, Japonska)
- Retinil palmitat: C₃₆H₆₀O₂, MM = 524,86 g/mol, vsebnost $\geq 1,700,000$ USP enot na g (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Retinol: C₂₀H₃₀O, MM = 286,45 g/mol, čistost $\geq 97,5\%$ (HPLC), ~ 3100 U/mg (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Vitamin D₃: C₂₇H₄₄O₃, MM = 384,64 g/mol, čistost $\geq 98\%$ (HPLC) (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Vitamin E: vseracemni α -tokoferol, C₂₉H₅₀O₂, MM = 430,72 g/mol, Ph. Eur. (Fluka, Nemčija)
- Vitamin E-acetat: DL- α -tokoferil acetat, C₃₁H₅₂O₃, MM = 472,76 g/mol, Ph. Eur. (Fluka, Nemčija)
- Vitamin K₁: C₃₁H₄₆O₂, MM = 450,70 g/mol, čistost $\geq 99,0\%$ (zmes izomerov, HPLC) (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- β -karoten: C₄₀H₅₆, MM = 536,87 g/mol, čistost $\geq 97\%$ (UV) (Sigma-Aldrich, Nemčija)

3.1.4 Pripravki z lipofilnimi vitamini in CoQ₁₀

V preglednici IV so zbrani podatki o testiranih pripravkih v okviru magistrske naloge.

Pripravke smo testirali v obdobju med 1. 3. 2016 in 1. 6. 2016.

Preglednica IV: Podatki o testiranih pripravkih

Št.	Ime zdravila oz. prehranskega dopolnila in proizvajalec	Farmacevtska oblika	Deklarirane vsebnosti vitaminov, mineralov in CoQ ₁₀	Rok uporabe in serija
1	Konakion, Roche (Rp zdravilo)	raztopina za injiciranje ali peroralna raztopina	v 1 mL: 10 mg vit. K₁ in 2,64 mg natrija (70)	rok uporabe: 4. 2018 serija: F3162F02
2	AD ₃ , Krka (Rp zdravilo)	peroralne kapljice, emulzija	v 1 mL: 6000 i.e. vit. A v obliki retinil palmitata in 2000 i.e. vit. D₃ (71)	rok uporabe: 8. 2019 serija: C64567
3	Vitamin AD ₃ E, Krka (veterinarsko zdravilo)	emulzija za injiciranje	v 1 mL: 50000 i.e. vit. A v obliki retinil palmitata, 25000 i.e. vit. D₃ in 20 mg α-tokoferil acetata (72)	rok uporabe: 12. 2016 serija: A59790
4	Vitamin AD ₃ EC, Krka (veterinarsko zdravilo)	peroralna emulzija	v 1 mL: 50000 i.e. vit. A v obliki retinil palmitata, 5000 i.e. vit. D₃, 30 mg α-tokoferil acetata in 100 mg vit. C (73)	rok uporabe: 12. 2016 serija: C1832
5	Fidi koencim 10, Fidimed (BRp I+p zdravilo)	mehka kapsula	v 1 kapsuli: 30 mg ubidekarenona (oks CoQ₁₀) in 24 mg vserecemnega-α-tokoferil acetata. Kot pomožne snovi še: vit. C in β-karoten.	rok uporabe: 11. 2016 serija: 5430601
6	FidiProtekt, Fidimed (prehransko dopolnilo)	mehka kapsula	v 1 kapsuli: 30 mg vit. E , 120 mg vit. C, 70 μg Se, 15 mg Zn, 7 mg β-karotena in 240 mg ribjega olja (s 30% omega-3)	rok uporabe: 11. 2016 serija: GP012BV
7	Vitamin E, A. Vogel (prehransko dopolnilo)	mehka kapsula	v 1 kapsuli: 7,5 mg naravnega vit. E	rok uporabe: 5. 2017 serija: 042047A
8	Vitamin E, NutriLAB (prehransko dopolnilo)	mehka kapsula	v 1 kapsuli: 10 mg vit. E	rok uporabe: 10.2017 serija: 995-061/E
9	Pikovit forte, Krka (BRp I+p zdravilo)	obložena tableta	v 1 tableti: 5000 i.e. vit. A v obliki retinil palmitata, 400 i.e. vit. D₃ , 60 mg vit. C, 20 mg B ₃ , 15 mg α-tokoferil acetata , 10 mg B ₅ , 2 mg vit. B ₆ , 1,7 mg vit. B ₂ , 1,5 mg vit. B ₁ , 0,4 mg B ₉ in 6 μg vit. B ₁₂ (74)	rok uporabe: 8. 2016 serija: L79136
10	Pikovit 4+, Krka (BRp I+p zdravilo)	obložena tableta	v 1 tableti: 600 i.e. vit. A v obliki retinil palmitata, 80 i.e. vit. D₃ , 10 mg vit. C, 0,25 mg vit. B ₁ , 0,3 mg vit. B ₂ , 0,3 mg vit. B ₆ , 0,2 μg vit. B ₁₂ , 3 mg B ₃ , 0,04 mg B ₉ , 1,2 mg B ₅ , 12,5 mg Ca in 10 mg P (75)	rok uporabe: 3. 2018 serija: L77763
11	Elevit Pronatal, Bayer (BRp I+p zdravilo)	filmsko obložena tableta	v 1 tableti: 3600 i.e. vit. A v obliki retinil palmitata , 1,55 mg vit. B ₁ , 1,8 mg vit. B ₂ , 2,6 mg vit. B ₆ , 4μg vit. B ₁₂ , 100 mg vit. C, 500 i.e. vit. D₃, 15 i.e. α-tokoferil acetata , 10 mg B ₅ , 0,2 mg B ₇ , 19 mg B ₃ , 0,8 mg B ₉ , 125 mg Ca, 60 mg Fe, 100mg Mg, 1 mg Mn, 1 mg Cu, 125 mg P in 7,5 mg Zn (18)	rok uporabe: 3. 2018 serija: L77763
12	Supradyn energija Q10, Bayer (prehransko dopolnilo)	filmsko obložena tableta	v 1 tableti: 80 mg vit. C, 16 mg B ₃ , 12 mg α-tokoferil acetata , 6 mg B ₅ , 1,4 mg vit. B ₆ , 1,4 mg B ₂ , 1,1 mg B ₁ , 800 μg vit. A , 200 μg B ₉ , 50 μg B ₇ , 25 μg vit. K₁, 5 μg vit. D₃ , 2,5 μg vit. B ₁₂ , 120 mg Ca, 80 mg Mg, 14 mg Fe, 10 mg Zn, 2 mg Mn, 1 mg Cu, 150 μg I, 50 μg Se, 50 μg Mo in 4,5 mg CoQ₁₀ .	rok uporabe: 7. 2016 serija: A9736-01

Rp = predpisovanje in izdaja zdravila je le na recept; BRp I+p = izdaja zdravila je brez recepta v lekarnah in specializiranih prodajalnah; vit. = vitamin

3.2 METODE

3.2.1 Optimizacija instrumentalne HPLC metode

Za analizo vzorcev smo uporabili reverznofazno HPLC metodo z UV detekcijo. Vzorce smo analizirali na instrumentu Agilent 1100/1200 series HPLC. V pomoč pri izbiri končnih kromatografskih pogojev so nam bile tri izhodiščne HPLC metode, katerih parametri so predstavljeni v preglednici V.

Preglednica V: Izhodiščne HPLC metode

Metoda (vir)	Kolona	Mobilna faza	Pretok [mL/min]	T _{kolone} [°C]	λ _{detekcije} [nm]	V _{inj} [μL]	Analizirane spojine
1 (76)	Synergi Hydro C18 250×4,6 mm, 4μm	ACN:THF:MQ = 55:40:5 (v/v/v)	1,5	25	280	15	CoQ ₁₀ red., CoQ ₁₀ oks.
2 (77)	Gemini C18 100×4,6 mm, 3μm	ACN:MeOH = 70:30 (v/v)	1,0	40	280	10	A, D ₃ , E, K ₁
3 (78)	Luna C18 150×4,6 mm, 5μm	ACN:THF:MQ = 55:40:5 (v/v/v)	1,5	25	280	15	CoQ ₁₀ red., CoQ ₁₀ oks.

Da smo dosegli učinkovito in hitro ločbo vseh analitov (A, A-palmitat, CoQ₁₀, D₃, E, E-acetat, K₁ in β-karoten) smo metodi 2 in 3 dodatno optimizirali, tako da smo spreminjali dva parametra – mobilno fazo in pretok mobilne faze. V preglednici VI so podani parametri preverjenih analiznih metod.

Preglednica VI: Optimizacija 2. in 3. izhodiščne HPLC metode

Št.	Kolona	Mobilna faza (v/v)	Pretok [mL/min]	T _{kolone} [°C]
2.1	Gemini	ACN:MeOH = 80:20	1,0	40
2.2	Gemini	ACN:MeOH = 90:10	1,0	40
2.3	Gemini	100% ACN	1,0	40
2.4	Gemini	ACN:MeOH = 50:50	1,0	40
2.5	Gemini	0-5 min: ACN:MeOH = 80:20 5-14 min: ACN od 80% do 20%	1,0	40
2.6	Gemini	0-4 min: ACN:MeOH = 80:20 4-14 min: ACN od 80% do 10%	1,0	40
2.7	Gemini	ACN:MeOH = 80:20	2,0	40
2.8	Gemini	ACN:MeOH = 80:20	1,5	40
2.9	Gemini	ACN:MeOH = 80:20	0-7,2 min: 1,0 8-13 min: 2,0	40
2.10	Gemini	ACN:MeOH = 80:20	0-6,2 min: 1,0 6,8-13 min: 2,5	40
3.1	Luna	90% (ACN:THF:MQ = 55:40:5) + 10% ACN	1,5	25
3.2	Luna	ACN:THF:MQ = 40:55:5	1,5	25
3.3	Luna	ACN:THF:MQ = 50:45:5	1,0	25

Izbira valovne dolžine detekcije

Ker imajo preiskovani analiti absorpcijske maksimume pri različnih valovnih dolžinah, smo posneli kromatograme raztopine mešanice standardov pri različnih valovnih dolžinah: 210, 220, 260, 265, 270, 275, 280, 285 in 290 nm.

3.2.1.1 Končni kromatografski pogoji za vrednotenje lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀

- Kolona: Luna C18 150×4,6 mm, 5µm
- Predkolona: Luna C18 4×3,0 mm
- Mobilna faza: ACN:THF:MQ = 50:45:5 (v/v/v)
- Pretok mobilne faze: 1 mL/min
- Temperatura kolone: 25°C
- Valovna dolžina detekcije: 270 nm
- Volumen injiciranja: od 3 do 20 µL odvisno od vzorca
- Temperatura avtomatskega vzorčevalnika: 25°C

Retencijski časi analitov so bili: 2,0 min (A), 3,3 min (D₃), 3,9 min (E-acetat), 4,3 min (K₁), 5,5 min (β-karoten), 5,9 min (A-palmitat), 6,6 (CoQ₁₀ red.) in 7,2 min (CoQ₁₀ oks.).

V odvisnosti od prisotnih analitov v vzorcu je bil čas analize od 4,5 do 8 minut.

3.2.2 Razvoj in optimizacija ekstrakcije lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ iz pripravkov

Zaradi razlik v vsebnosti lipofilnih vitaminov in sestavi pripravkov smo razvili in optimizirali tri ekstrakcijske postopke.

3.2.2.1 Ekstrakcija lipofilnih vitaminov iz tekočih farmacevtskih oblik

Ustrezen volumen tekočega pripravka smo prenesli v ustrezno bučko (odvisno od pripravka) in jo dopolnili z MF z dodanim BHT. Razredčene vzorce smo nato 10 minut izpostavili ultrazvoku.

3.2.2.2 Ekstrakcija lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ iz mehkih kapsul

Pri razvoju ekstrakcijskega postopka za mehke kapsule smo izhajali iz postopka po USP monografiji za ubidekarenon kapsule (79):

2 kapsuli prerežemo s skalpelom. Vsebino kapsul skupaj z ovojnici kvantitativno prenesemo v 100 mL bučko in jo dopolnimo z mešanico n-heksana in brezvodnega EtOH (5:2, v/v). Sledi 30 minut stresanja. Nato del vzorca 10 minut centrifugiramo pri 3200 rpm. Dobljeni supernatant 25-krat redčimo z brezvodnim EtOH.

V postopku razvoja in optimizacije ekstrakcije smo postopoma spreminjali posamezne ekstrakcijske parametre z namenom, da bi izboljšali izkoristek in ponovljivost ekstrakcije. Preizkusili smo različna organska topila (metanol, brezvodni etanol, MF, n-heksan in n-heksan:THF = 95:5, v/v) in preverili, kako izpostavljenost ultrazvoku vpliva na učinkovitost ekstrakcije. V odvisnosti od uporabljenega topila, smo ekstrakte vzorca

posušili (v primeru, ko smo uporabili n-heksan) in suhi ostanek raztopili v primernem topilu. Ostali parametri so ostali enaki.

3.2.2.3 Ekstrakcija lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ iz tablet

Pri razvoju ekstrakcijskega postopka za tablete smo izhajali iz postopka avtorjev Temova in Roškar (80), ki vključuje razpad 2 tablet z dodatkom 2 mL 0,1% H₃PO₄, sledi 2 minuti mešanja na vibracijskem mešalniku (vortex), dodatek 8 mL MeOH, 10 minut soniciranja, ponovno 2 minuti mešanja na vibracijskem mešalniku in 10 minutno centrifugiranje vzorca pri 5000 rpm. Z namenom, da bi dosegli čim boljši izkoristek ekstrakcije in ponovljivost smo postopoma spreminjali posamezne ekstrakcijske parametre. Parametri, katere smo spreminjali pri razvoju in optimizaciji ekstrakcije lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ iz tablet, so zbrani v preglednici VII.

Preglednica VII: Optimizacija ekstrakcije lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ iz tablet

Korak	Parameter, ki smo ga spreminjali	Vrednosti parametra
Dodatek 0,1% H ₃ PO ₄	volumen dodane 0,1% H ₃ PO ₄	0, 2 mL
Mešanje	čas	0, 2, 4, 5, 15 min (vortex), 30 min stresanje
Dodatek organskega topila	topilo	MeOH, n-heksan, MF
Soniciranje	čas	0, 5, 10 min
Mešanje	čas	0, 2 (vortex), 30 min stresanje

3.2.2.4 Sušenje in raztapljanje heksanskih ekstraktov

Ker smo v postopku razvoja ekstrakcije lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ iz pripravkov preizkusili tudi n-heksan kot ekstrakcijsko topilo, katerega ni priporočljivo direktno injicirati v reverznofazni HPLC sistem, smo heksanske ekstrakte posušili s preprihovanjem pod tlakom dušika pri povišani temperaturi v napravi TurboVap (35, 40 in 45°C) in nato suhe ekstrakte rekonstituirali v ustreznem topilu (metanol in mobilna faza). V nadaljevanju smo preverili še ponovljivost raztapljanja (v treh paralelah) in izkoristek raztapljanja. Izkoristek raztapljanja smo preverili tako, da smo 1 mL raztopine mešanice standarda posušili v štirih paralelah in nato vsako paralelo raztopili v drugačnem volumnu (3, 2, 1 in 0,5 mL).

3.3 PRIPRAVA VZORCEV

3.3.1 Priprava mobilne faze in raztopin za vzorce

Mobilna faza

Mobilno fazo smo pripravili iz acetonitrila, tetrahidrofurana in MQ v razmerju 50:45:5 (v/v/v). Mobilno fazo smo pred uporabo za HPLC analizo razplinili, tako da smo jo 10 minut sonicirali.

0,05% raztopina BHT (m/v)

Natehtali smo 50 mg BHT, ga kvantitativno prenesli v 100 mL bučko in dopolnili z n-heksanom do oznake.

Topilo za redčenje (0,1% raztopina BHT (m/v))

Natehtali smo 100 mg BHT, ga kvantitativno prenesli v 100 mL bučko in dopolnili z MF do oznake.

0,1% raztopina Fe³⁺ (m/v)

Natehtali smo 72,6 mg brezvodnega FeCl₃, ga kvantitativno prenesli v 25 mL bučko in dopolnili z MF do oznake.

0,1% H₃PO₄

V 50 mL bučko smo z avtomatsko pipeto odpipetirali 58,82 µL 85% H₃PO₄ in dopolnili z demineralizirano vodo do oznake.

Rekonstitucijsko topilo (0,01% raztopina BHT (m/v))

Natehtali smo 2,5 mg BHT, ga kvantitativno prenesli v 25 mL bučko in dopolnili z MF do oznake.

3.3.2 Priprava standardnih raztopin in vzorcev za vrednotenje vsebnosti in uspešnosti priprave vzorca

Raztopina mešanice standarda za optimizacijo HPLC metode

Ločeno smo natehtali približno 2 mg A, A-palmitat, CoQ₁₀, D₃, E, E-acetat, K₁ in β-karoten, jih kvantitativno prenesli v 10 mL bučko in dopolnili z metanolom do oznake.

Raztopina mešanice standarda za izbiro valovne dolžine detekcije

Zaradi različnih vsebnosti vitaminov v testiranih pripravkih smo za pripravo raztopine mešanice standardov vzeli najnižje pričakovane koncentracije posameznega vitamina v testiranih pripravkih: 20 mg/L A, 8,75 mg/L A-palmitat, 112,5 mg/L CoQ₁₀, 0,05 mg/L D₃, 250 mg/L E-acetat, 3,125 mg/L K₁ in 175 mg/L β-karoten.

Raztopina standarda 1 (RS1)

Natehtali smo približno 3,3 mg K₁, ga kvantitativno prenesli v 10 mL bučko in dopolnili z rekonstitucijskim topilom do oznake. RS1 smo uporabili za vrednotenje pripravka 1.

Raztopina standarda 2 (RS2)

Natehtali smo približno 5 mg D₃, ga kvantitativno prenesli v 5 mL bučko in dopolnili s topilom za redčenje do oznake. Ločeno smo natehtali 1,6 mg E-acetata in 1,5 mg A-palmitata in ju kvantitativno prenesli v 10 mL bučko. Z avtomatsko pipeto smo v bučko odpipetirali 33 µL standarda D₃ in dopolnili s topilom za redčenje do oznake. RS2 smo uporabili za vrednotenje pripravkov 3 in 4.

Raztopina standarda 3 (RS3)

Ločeno smo natehtali približno 1,5 mg β-karotena, 7,5 mg E-acetata in 7,5 mg CoQ₁₀, jih kvantitativno prenesli v 25 mL bučko in dopolnili z n-heksanom do oznake. RS3 smo uporabili za vrednotenje pripravkov 5 in 6.

Raztopina standarda 4 (RS4)

Natehtali smo približno 10 mg E, ga kvantitativno prenesli v 10 mL bučko in dopolnili z n-heksanom do oznake. RS4 smo uporabili za vrednotenje pripravkov 7 in 8.

Raztopina standarda 5, 6 in 7 (RS5, RS6, RS7)

Osnovna raztopina standarda A-palmitat: natehtali smo približno 25 mg A-palmitata, ga kvantitativno prenesli v 25 mL bučko in dopolnili z n-heksanom do oznake.

Osnovna raztopina standarda D₃: natehtali smo približno 5 mg D₃, ga kvantitativno prenesli v 5 mL bučko in dopolnili z n-heksanom do oznake.

Osnovna raztopina E-acetat: natehtali smo približno 125 mg E-acetata, ga kvantitativno prenesli v 25 mL bučko in dopolnili z n-heksanom do oznake.

Osnovna raztopina K₁: natehtali smo približno 5 mg K₁, ga kvantitativno prenesli v 5 mL bučko in dopolnili z n-heksanom do oznake.

Postopek priprave posamezne raztopine standarda prikazuje preglednica VIII.

Preglednica VIII: Raztopine standardov RS5-7 za vrednotenje pripravkov

Raztopina standarda	Volumen osnovnih raztopin standarda	Volumen bučke
RS5	31,20 µL D ₃ + 7,5 mL E-acetat + 2 mL A-palmitat	10 mL, do oznake dopolnimo z n-heksanom
RS6	31,20 µL D ₃ + 3 mL A-palmitat	5 mL, do oznake dopolnimo z n-heksanom
RS7	12,50 µL D ₃ + 6 mL E-acetat + 3 mL A-palmitat + 62,40 µL K ₁ + natehtamo 11,25 mg CoQ ₁₀ in ga kvantitativno prenesemo v bučko	10 mL, do oznake dopolnimo z n-heksanom

RS5 smo uporabili za vrednotenje pripravkov 9 in 11, RS6 za vrednotenje pripravka 10 in RS7 za vrednotenje pripravka 12.

V preglednici IX je navedena priprava vzorcev za vrednotenje uspešnosti priprave posameznega pripravka.

Preglednica IX: Priprava vzorcev za vrednotenje uspešnosti ekstrakcijskega postopka posameznega pripravka

Pripravek	Raztopina vzorca	Raztopina vzorca + raztopina standarda	Raztopina standarda
Pripravek 1	100 μ L + 900 μ L rekonstitucijskega topila	100 μ L + 30 μ L RS1 + 870 μ L rekonstitucijskega topila	30 μ L RS1 + 970 μ L rekonstitucijskega topila
Pripravka 3 in 4	50 μ L + 950 μ L topila za redčenje	50 μ L + 950 μ L RS2	950 μ L RS2 + 50 μ L topila za redčenje
Pripravka 5 in 6	0,5 mL supernatanta	0,5 mL supernatanta + 0,5 mL RS3	0,5 mL RS3
Pripravka 7 in 8	0,5 mL supernatanta	0,5 mL supernatanta + 0,5 mL RS4	0,5 mL RS4
Pripravka 9 in 11	1 mL supernatanta	1 mL supernatanta + 0,5 mL RS5	0,5 mL RS5
Pripravka 10	3 mL supernatanta	3 mL supernatanta + 0,2 mL RS6	0,2 mL RS6
Pripravke 12	1 mL supernatanta	1 mL supernatanta + 0,5 mL RS7	0,5 mL RS7

Opomba: pripravek 2 smo neposredno injicirali

Pri pripravkih 1, 3 in 4 smo raztopine pripravljali neposredno v vialo. Pri pripravkih od 5 do 12 smo supernatante, supernatante z dodanimi raztopinami standardov in raztopine standardov posušili ter suhe ostanke raztopili po enakih postopkih, kot je opisano v točkah za vrednotenje vsebnosti lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ v pripravkih (3.3.4.2, 3.3.4.3).

3.3.3 Priprava kalibracijskih raztopin in kontrolnih vzorcev

Pripravili smo dvanajst kalibracijskih raztopin, ki so vsebovale A-palmitat, D₃, CoQ₁₀, E, E-acetat in K₁. Izhajali smo iz osnovnih raztopin A-palmitata, E in β -karotena in osnovne raztopine mešanice standardov (CoQ₁₀, D₃, E-acetat in K₁) (preglednica X), ki smo jih nato ustrezno redčili s topilom. Pripravljene kalibracijske raztopine smo posušili do suhega s preprihovanjem pod tokom dušika pri povišani temperaturi v napravi TurboVap (temperatura vodne kopeli je bila 40°C). Suhi ostanek smo raztopili v 1 mL MF oz. 1 mL rekonstitucijskega topila (standarda A-palmitat in β -karoten).

Preglednica X: Osnovne raztopine standardov

Osnovna raztopina	Natehta [mg]	Volumen bučke [mL]	Uporabljeno topilo	Koncentracija standarda v osnovni raztopini [mg/L]
β -karoten	1,5	25	2,5 mL THF, nato do oznake z 0,05% raztopina BHT	60
A-palmitat	15	25	0,05% raztopina BHT	600
E	13	5	n-heksan	2600
D ₃	10	5	n-heksan	2000
mešanica standardov				
CoQ ₁₀	10			400
D ₃	625 μ L osnovne raztopine D ₃	25	n-heksan	50
E-acetat	65			2600
K ₁	3,75			150

Koncentracije standardov v posamezni kalibracijski raztopini in njihov postopek priprave prikazuje preglednica XI.

Preglednica XI: Kalibracijske raztopine standardov in kontrolnih vzorcev

Kalibracijska raztopina	Volumen osnovne raztopine standarda [μL]	Volumen dodanega n-heksana	Koncentracije standardov [mg/L]						
			β -karot.	A-palm.	E	D ₃	Q ₁₀	E-acetat	K ₁
1. 0,1%	10 (10%*)	990	0,06	0,60	2,6	0,05	0,40	2,6	0,15
2. 0,2%	20 (10%*)	980	0,12	1,2	5,2	0,10	0,80	5,2	0,30
3. 0,5%	50 (10%*)	950	0,30	3,0	13	0,25	2,0	13	0,75
4. 1%	10	990	0,60	6,0	26	0,50	4,0	26	1,5
5. 2%	20	980	1,2	12	52	1,0	8,0	52	3,0
6. 5% (QC _L)	50	950	3,0	30	130	2,5	20	130	7,5
7. 10%	100	900	6,0	60	260	5,0	40	260	15
8. 20%	200	800	12	120	520	10	80	520	30
9. 40% (QC _M)	400	600	24	240	1040	20	160	1040	60
10. 60%	600	400	36	360	1560	30	240	1560	90
11. 80% (QC _H)	800	200	48	480	2080	40	320	2080	120
12. 100%	1000	0	60	600	2600	50	400	2600	150

*izhajali iz 10% kalibracijske raztopine

Kontrolne vzorce smo pripravili na enak način pri nizki (QC_L – 5%), srednji (QC_M – 40%) in visoki koncentraciji (QC_H – 80%).

3.3.4 Vrednotenje vsebnosti lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ v pripravkih

Vsebnost vseh pripravkov smo vrednotili v 3 paralelah takoj po odprtju pripravka. Podali smo jo v enakih enotah, kot je navedena v priloženih navodilih za uporabo pripravka. Vsebnost posameznega vitamina oz. CoQ₁₀ smo izračunali po *enačbi 1*.

$$\text{vsebnost (mg vitamina/1 ml oz. 1 tableto oz. 1 kapsulo)} = \frac{AUC_{vz} \cdot c_{st} \cdot V_{končni vz} \cdot F}{AUC_{st}} \quad \text{enačba 1}$$

AUC_{vz} ... površina pod kromatografskim vrhom posameznega vitamina v raztopini vzorca

AUC_{st} ... površina pod kromatografskim vrhom posameznega vitamina v raztopini standarda

c_{st} ... koncentracija posameznega vitamina v raztopini standarda (mg/mL) (3.3.2)

V_{končni vz} ... končni volumen raztopine vzorca (1 mL pri pripravkih 1-4 in 7-12; 2 mL pri pripravkih 5 in 6)

F ... faktor redčenja (1000 pri pripravku 1; 200 pri pripravkih 3 in 4; 400 pri pripravkih 5 in 6; 20 pri pripravkih 7 in 8; 8 pri pripravkih 9, 11 in 12; 8/3 pri pripravku 10)

Delež CoQ₁₀ red. v pripravku 8 smo izračunali po *enačbi 2*.

$$w_{\text{CoQ}_{10} \text{ red.}} (\%) = \frac{(m_{\text{celokupni CoQ}_{10}} - m_{\text{CoQ}_{10} \text{ oks.}})}{m_{\text{celokupni CoQ}_{10}}} \cdot 100\%$$

enačba 2

$m_{\text{celokupni CoQ}_{10}}$... vsebnost celokupnega CoQ₁₀ (mg CoQ₁₀/1 kapsulo) (vzorec z dodatkom Fe³⁺)

$m_{\text{CoQ}_{10} \text{ oks.}}$... vsebnost CoQ₁₀ oks. (mg CoQ₁₀ oks./1 kapsulo)

Vsebnost β-karotena v pripravku 5 in 12 smo izračunali s pomočjo umeritvene premice, ki smo jo izdelali v postopku validacije HPLC metode (*enačba 3*).

$$\text{vsebnost (mg } \beta \text{ - karotena/1 tableto oz. kapsulo)} = \frac{F \cdot (AUC_{vz} - n)}{k}$$

enačba 3

F ... faktor redčenja (400 pri pripravku 5; 8 pri pripravku 12)

n ... odsek na ordinati umeritvene premice

k ... naklon premice

3.3.4.1 Postopek priprave vzorcev za vrednotenje vsebnosti lipofilnih vitaminov v tekočih farmacevtskih pripravkih

Priprava vzorca za vrednotenje vsebnosti vitamina K₁ v pripravku 1:

Z avtomatsko pipeto smo v 10 mL bučko prenesli 100 μL pripravka 1. Bučko smo dopolnili do približno $\frac{3}{4}$ z rekonstitucijskim topilom in vzorec 10 minut sonicirali. Raztopino smo ohladili na sobno temperaturo in dopolnili z rekonstitucijskim topilom do oznake. 100 μL raztopine smo prenesli v vialo in dodali 900 μL rekonstitucijskega topila.

Priprava vzorca za vrednotenje vsebnosti vitaminov A-palmitat in D₃ v pripravku 2

Pripravek 2 smo neposredno injicirali, zmanjšali smo le volumen injiciranja vzorca na 3 μL.

Priprava vzorca za vrednotenje vsebnosti vitaminov A-palmitat, D₃ in E-acetat v pripravkih 3 in 4

S stekleno polnilno pipeto smo v 10 mL bučko prenesli 1 mL pripravka 3 oz. 4. Bučko smo dopolnili do približno $\frac{3}{4}$ s topilom za redčenje in vzorec 10 minut sonicirali. Raztopino smo ohladili na sobno temperaturo in dopolnili s topilom za redčenje do oznake. 50 μL raztopine smo prenesli v vialo in dodali 950 μL topila za redčenje.

3.3.4.2 Postopek priprave vzorcev za vrednotenje vsebnosti lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ v mehkih kapsulah

Vzorci smo pripravili v skladu z optimiziranim ekstrakcijskim postopkom za mehke kapsule, ki vključuje ekstrakcijo z n-heksanom in naknadno sušenje heksanskih ekstraktov v napravi TurboVap ter raztapljanje suhega ostanka. Raztopljene vzorce smo nato prenesli v vialo in analizirali. Postopek priprave vzorca je opisan v preglednici XII.

Preglednica XII: Postopek priprave vzorcev za vrednotenje vsebnosti lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ v mehkih kapsulah

Korak	Pripravek 5 in 6	Pripravek 7 in 8
1. Prerez kapsul s skalpelom	1 kapsula, prenos v 100 mL bučko	1 kapsula, prenos v 15 mL falkonko
2. Dodatek organskega topila	5 mL THF, do 100 mL dopolnili z n-heksanom	10 mL n-heksana
3. Soniciranje [min]	10	10
4. Stresanje [min]	30	30
5. Centrifugiranje pri 3200 rpm [min]	10	10
6. Prenos supernatanta v stekleno epruveto [mL]	0,5	0,5
7. Sušenje s prepihanjem pod tokom N ₂ pri 40°C do suhega		
8. Raztapljanje suhega ostanka	2 mL rekonstitucijskega topila; za pripravek 5 dodatno: 2 mL MF in 2 mL 0,1% raztopine Fe ³⁺	1 mL MF
9. Soniciranje [min]	10	10
10. Mešanje na vibracijskem mešalniku [s]	30	30

Suhi ostanek pripravka 5 smo zaradi vrednotenja različnih oblik (oksidirane in reducirane) CoQ₁₀ raztopili na 3 načine:

1. raztapljanje v 2 mL MF (uporabili za vrednotenje vsebnosti oksidirane oblike CoQ₁₀),
2. raztapljanje v 2 mL rekonstitucijskega topila (uporabili za vrednotenje vsebnosti E-acetat in β-karotena),
3. raztapljanje v 2 mL 0,1% raztopine Fe³⁺ (uporabili za vrednotenje vsebnosti celokupnega CoQ₁₀).

3.3.4.3 Postopek priprave vzorca za vrednotenje vsebnosti lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ v tabletah

Vzorci smo pripravili v skladu z optimiziranim ekstrakcijskim postopkom za tablete, ki vključuje razpad tablet z dodatkom kisline, sledi ekstrakcija z n-heksanom in enako kot pri mehkih kapsulah naknadno sušenje heksanskih ekstraktov v napravi TurboVap ter raztapljanje suhega ostanka. Raztopljene vzorce smo nato prenesli v vialo in analizirali. Postopek priprave vzorca je opisan v preglednici XIII.

Preglednica XIII: Postopek priprave vzorcev za vrednotenje vsebnosti lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ v tabletah

Korak	Pripravek 9 in 10	Pripravek 11 in 12
1. Prenos tablete v 15 mL epruvete	predhodno zdrobili 1 tableto	1 tableta
2. Dodatek 0,1% H ₃ PO ₄ [mL]	2	2
3. Mešanje na vibracijskem mešalniku [min]	5	10
4. Dodatek n-heksana [mL]	8	8
5. Soniciranje [min]	10	10
6. Mešanje na vibracijskem mešalniku [min]	2	2
7. Centrifugiranje pri 5000 rpm [min]	10	10
8. Prenos supernatanta v stekleno epruveto [mL]	1 (pripravek 9) in 3 (pripravek 10)	1
9. Sušenje s prepihovanjem pod tokom N ₂ pri 40°C do suhega		
10. Raztapljanje suhega ostanka v rekonstitucijskem topilu [mL]	1	1
11. Soniciranje [min]	10	10
12. Mešanje na vibracijskem mešalniku [s]	30	30

3.4 VALIDACIJA METODE

Validacija HPLC-UV metode je potekala v skladu z ICH smernicami (81). Tekom validacije smo preverili naslednje parametre: selektivnost, linearnost, točnost, natančnost, mejo zaznave, mejo določitve in robustnost. Validacijo smo izvedli v treh zaporednih dneh.

3.4.1 Selektivnost

Selektivnost metode smo vrednotili tako, da smo v kromatografski sistem injicirali vsa topila, ki smo jih uporabili v postopkih priprave vzorcev (MF, 0,1% raztopina Fe³⁺, 0,1% raztopina BHT v MF in 0,01% raztopina BHT v MF), posamezne raztopine standardov A-palmitat, CoQ₁₀, D₃, E, E-acetat, K₁ in β-karoten in raztopino mešanice standardov, ki je vsebovala A-palmitat, CoQ₁₀, D₃, E-acetat, K₁ in β-karoten. Dobljene kromatograme smo prekrili in preverili ali so pri retencijskih časih preiskovanih analitov prisotne kakšne interference.

3.4.2 Linearnost

Za vrednotenje linearnosti smo izdelali 12 kalibracijskih raztopin. Le-te smo pripravili vsak dan validacije v skladu s postopkom 3.3.3. Linearnost metode smo ovrednotili za vsak posamezen analit z umeritveno premico, ki predstavlja graf odvisnosti odziva analita (površina pod kromatografskim vrhom posameznega analita) od njegove koncentracije. Umeritveno premico smo določili z uporabo linearne regresije v računalniškem programu MS Excel. Za mejo sprejemljivosti smo postavili kriterij $R^2 \geq 0,999$.

3.4.3 Točnost

Točnost metode smo vrednotili s pomočjo kontrolnih vzorcev treh različnih koncentracij (QC_L , QC_M in QC_H), ki smo jih pripravili v skladu s postopkom 3.3.3. Vsak dan validacije smo točnost preverili na vseh treh koncentracijski nivojih kontrolnih vzorcev in v treh paralelkah. Izračunali smo jo po *enačbi 4*.

$$\text{Točnost (\%)} = \frac{c_{\text{izračunana}}}{c_{\text{nominalna}}} \cdot 100\%$$

enačba 4

$c_{\text{izračunana}}$... izračunana koncentracija analitov iz umeritvene premice

$c_{\text{nominalna}}$... dejanska koncentracija analitov v vzorcu

Za mejo sprejemljivosti smo postavili interval 95 – 105%.

3.4.4 Natančnost

Natančnost smo vrednotili na nivoju ponovljivosti, in sicer smo preverili ponovljivost znotraj enega dne (znotraj-dnevna ponovljivost), ponovljivost med tremi dnevi (med-dnevna ponovljivost) in ponovljivost injiciranja. Za vrednotenje smo uporabili iste kontrolne vzorce (QC), kot smo jih uporabili pri preverjanju točnosti. Znotraj-dnevno ponovljivost smo vrednotili v 3 paralelkah za vsak QC. Med-dnevno ponovljivost smo preverili tako, da smo pripravili in analizirali QC-vzorce še drugi in tretji dan validacije (v 3 paralelkah). Ponovljivost injiciranja pa tako, da smo eno paralelo QC_M injicirali šestkrat. Ponovljivost smo izrazili kot relativni standardni odklon (RSD). Kot kriterij sprejemljivosti ponovljivosti injiciranja smo postavili vrednost $RSD < 2\%$, za znotraj-dnevno in med-dnevno ponovljivost pa $RSD < 5\%$.

3.4.5 Meja zaznave in meja določitve

Mejo zaznave (LOD) in mejo določitve (LOQ) smo izračunali za vsak posamezen analit iz njihovih umeritvenih premic po *enačbi 5* oz. *6*.

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{S}$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{S}$$

enačbi 5(levo) in 6 (desno)

σ ... standardni odklon vrednosti odsekov umeritvenih premic na ordinati

S ... povprečna vrednost naklonov umeritvenih premic

3.4.6 Robustnost

Za preverjanje robustnosti smo proučevali, kako namerne majhne spremembe optimiziranih kromatografskih parametrov vplivajo na kvaliteto ločbe (resolucijo, število teoretski podov) ter odzive in retencijske čase analitov. Vrednotili smo spremembe treh kromatografskih parametrov: pretok mobilne faze ($\pm 5\%$), temperatura kolone ($\pm 4\%$) in sestava mobilne faze. Pri preverjanju robustnosti smo spremenili le en kromatografski parameter, ostali so bili nespremenjeni. V okviru robustnosti smo vrednotili tudi stabilnost vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku.

3.4.6.1 Stabilnost vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku

Za ugotavljanje stabilnosti smo uporabili iste kontrole vzorce, kot pri vrednotenju točnosti in natančnosti. Po 3 paralele QC-vzorcev na vseh treh koncentracijskih nivojih smo analizirali ob času 0, jih nato pustili v avtomatskem vzorčevalniku pri temperaturi 25°C in jih ponovno analizirali po 24 in 48 urah. Stabilnost izraženo v % smo izračunali kot razmerje med odzivi ob času 24 ur oz. 48 ur in času 0 ($AUC_t/AUC_0 \cdot 100\%$).

Z namenom, da bi dosegli večjo stabilnost analitov, ki so se v času validacije izkazali za nestabilne (A-palmitat, β -karoten), smo preizkusili ali dodatek antioksidantov (askorbinske kisline in BHT) vpliva na njihovo stabilnost. Ker je bil padec vsebnosti A-palmitata in β -karotena večji pri vzorcih z višjo koncentracijo, smo pripravili 100% kalibracijski raztopini obeh posameznih vitaminov (3.3.3). Obe dve raztopini smo posušili (v treh paralelah) in raztopili v treh različnih topilih – MF, 100 mg/L raztopina BHT v MF in 500 mg/L raztopina AK v MF. Pripravljene vzorce smo analizirali ob času 0, po 2, 3,5 in 24 urah. Kot kriterij sprejemljivost smo postavili vrednost $100 \pm 5\%$.

3.4.7 Izkoristek učinkovitosti ekstrakcije

Vzorci za vrednotenje uspešnosti priprave vzorcev pripravkov smo pripravili v skladu s postopkom opisanim v poglavju 3.3.2 (preglednica IX).

Ločeno smo analizirali tri vzorce:

- raztopino vzorca pripravka,
- raztopino vzorca pripravka z dodanim standardom in
- raztopino standarda.

Raztopine standardov so vsebovale približno enako koncentracijo vitaminov, kot so bile pričakovane v pripravkih.

Izkoristek priprave raztopin vzorcev smo izračunali po *enačbi 7* (82):

$$\text{izkoristek (\%)} = \frac{c_{\text{obogateni vzorec}} - c_{\text{vzorec}}}{c_{\text{dodatek}}} \cdot 100\%$$

enačba 7

$c_{\text{obogateni vzorec}}$... ugotovljena koncentracija posameznega vitamina v vzorcu z dodanim standardom (mg/L)

c_{vzorec} ... ugotovljena koncentracija posameznega vitamina v vzorcu (mg/L)

c_{dodatek} ... dodana koncentracija posameznega standarda vitamina (mg/L)

Kot kriterij sprejemljivost smo postavili vrednost $100 \pm 10\%$.

3.5 STABILNOSTNA ŠTUDIJA

Stabilnost pripravkov od 2 do 12 smo spremljali pri dveh temperaturah – 25°C in 40°C. Zaradi narave ovojnine (ampule) nismo spremljali stabilnosti pripravka 1. Pripravke smo ob začetku stabilnostne študije razdelili na dva enaka dela. Polovico posameznega tekočega pripravka (pripravki od 2 do 4) smo prelili v ustrezen vsebnik – rjave stekleničke (enake originalnim) in jih shranjevali pri 25°C zaščitene pred svetlobo, drugo polovico tekočih pripravkov v originalni ovojнинi pa smo postavili v klimatsko komoro (temperatura komore je bila 40°C). Mehke kapsule in tablete (pripravki od 5 do 12) smo odstranili iz sekundarne ovojnine in razdelili pritisne omote na dva dela: en del smo shranjevali pri 25°C zaščitene pred svetlobo, en del pa v klimatski komori pri 40°C. Pripravke smo analizirali v naslednjih časovnih točkah: 0, 7 dni, 14 dni ter 1, 2 in 3 meseci.

Vzorci za vrednotenje stabilnosti smo pripravili skladno s postopki opisanimi v poglavjih 3.3.2 in 3.3.4. Vzorce smo (z izjemo prve časovne točke – 3 paralele) pripravili v eni paraleli. V vsaki časovni točki smo vrednotili vsebnost lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ ter ugotavljali morebitni upad oziroma porast vsebnosti glede na časovno točko 0 (upad oz. porast vsebnost = ugotovljena vsebnost/deklarirana vsebnost · 100%). Rezultate stabilnosti lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ v pripravkih smo grafično prikazali (uporabili smo računalniški program MS Excel 2010).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

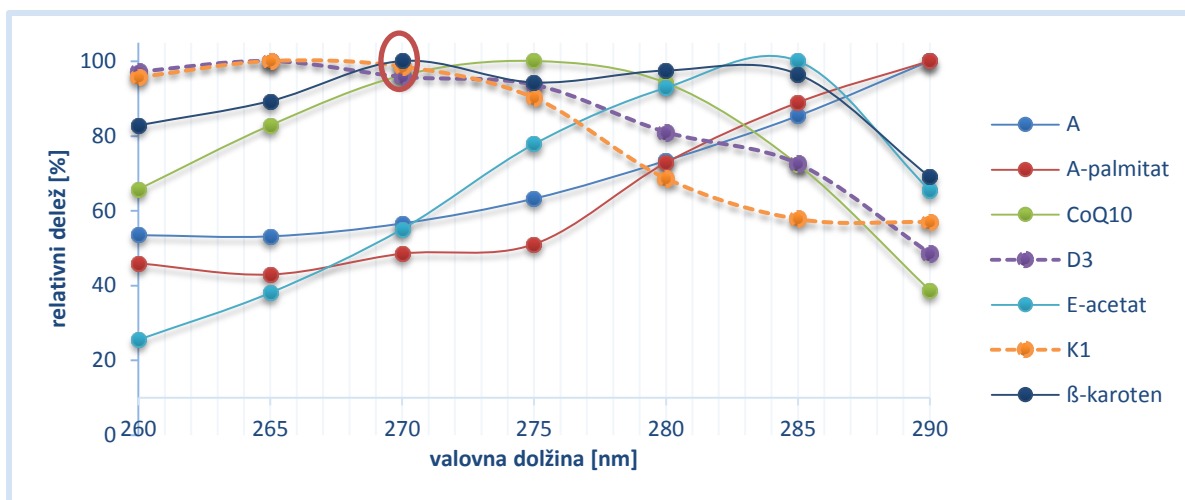
4.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA ANALIZNE METODE

4.1.1 Optimizacija instrumentalne HPLC metode

HPLC metoda, povezana z različnimi detekcijskimi tehnikami, je najpogosteje uporabljena analizna metoda za ločevanje in kvantitativno vrednotenje vitaminov (57). Po pregledu strokovne literature smo ugotovili, da imajo objavljene HPLC metode, ki so namenjene nadzoru kakovosti vitaminskih pripravkov, pogosto dolge čase analize in večinoma sočasno ločijo in vrednotijo le tri do štiri lipofilne vitamine (preglednica III). Zato je bil eden izmed glavnih ciljev magistrske naloge optimizirati in validirati hitro in preprosto HPLC metodo, ki bi nam omogočila sočasno ločitev petih lipofilnih vitaminov (v oblikah, ki se najpogosteje pojavljajo v vitaminskih pripravkih – A-palmitat, D₃, E-acetat, K₁ in A provitamin – β-karoten) in CoQ₁₀ (v reducirani in oksidirani obliki). Optimizirana HPLC metoda namreč predstavljala osnovo za kasnejše vrednotenje vsebnosti in stabilnosti lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ v zdravilih in prehranskih dopolnilih. Veliko število izbranih analitov (7), ki smo jih želeli sočasno ločiti, je tako predstavljal pravi izziv pri optimizaciji HPLC metode. Pri izbiri HPLC metode so nam izhodišče predstavljale tri razvite HPLC metode, ki so opisane v poglavju 3.2.1. Z omenjenimi HPLC metodami so ločili le nekatere izmed izbranih analitov (največ 4 – preglednica V). Za zagotovitev ustrezne ločbe vseh izbranih analitov smo metode dodatno optimizirali. Zaradi velikega števila izbranih pripravkov in posledično tudi velikega števila vzorcev v načrtovani stabilnostni študiji, smo želi doseči čim krajši čas celotne analize (pod 10 minutami), zato smo se odločili, da optimiziramo le metodi 2 in 3 (preglednica V), ki uporabljata krajši dimenziji kolon. V postopku optimizacije smo pri obeh metodah preizkusili različne sestave mobilne faze in pretoke, pri metodi 2 pa še gradientno izpiranje (preglednica VI). Pri optimizaciji 2. metode se je s povečevanjem deleža ACN podaljševal retencijski čas vseh analitov. V primeru, ko smo povečali delež MeOH, so bili retencijski časi krajši, vendar pa je bil čas celotne analize še vedno daljši od 10 minut (2.4 – preglednica VI), hkrati pa nismo dosegli dobre ločbe med posameznimi analiti, ki se hitro izperejo iz kolone (D₃ in K₁). Zato smo preizkusili gradientno izpiranje, z namenom da bi analite s krajšimi retencijskimi časi (D₃, E-acetat in K₁) bolje ločili, nato pa bi s povečanjem deleža MeOH skrajšali retencijska časa A-palmitata in β-karotena, vendar pa nismo uspeli bistveno skrajšati časa analize (še vedno je bil daljši od 10 minut). S povečanjem pretoka in uvedbo gradienta pretoka smo

uspeli skrajšati čas analize pod 10 minut in zagotoviti ustrezno ločbo analitov, ki omogoča tudi ločbo vitamina E in E-acetata (optimalna metoda je 2.10 – preglednica VI). Slabost optimizirane metode 2 pa je v tem, da ni sposobna vrednotiti CoQ₁₀, saj se le-ta ne izpira iz kolone. Pri preizkusu 3. izhodiščne metode je bil že v izhodišču čas analize krajši od 10 minut in ločba analitov ustrezna. Ker pa je bil pretok 1,5 mL/min, bi za analizo vseh izbranih pripravkov porabili veliko količino topil, s čimer bi še povečali strošek analize. Zato smo se odločili zmanjšati pretok in spremeniti sestavo mobilne faze (povečan delež THF). Tako višji pretok kot večji delež THF skrajšata retencijske čase analitov (3.1-3.3, preglednica VI). Zato smo s povečanjem THF za 5% in hkrati z zmanjšanjem pretoka iz 1,5 mL/min na 1 mL/min dosegli kratek čas analize (8,5 minut) in hkrati zmanjšali porabo topil. S tem smo dosegli kompromis med stroškom in časom analize. Z optimizirano metodo 3.3 (preglednica VI) lahko vrednotimo CoQ₁₀, ne omogoča pa sočasne ločbe vitamina E in E-acetata. Ker se v vitaminskih pripravkih vitamin E in E-acetat nikoli ne pojavljata hkrati, dva od testiranih pripravka pa sta vsebovala CoQ₁₀, smo se odločili za uporabo optimizirane 3.3. metode, katere končni kromatografski pogoji so natančno opisani v poglavju 3.2.1.1.

V nadaljevanju smo izbrali še optimalno valovno dolžino detekcije za izbrane analite. Ker imajo izbrani analiti absorpcijske maksimume pri različnih valovnih dolžinah, smo si pri izbiri valovne dolžine pomagali s posnetimi kromatogrami raztopine mešanice standardov (A, A-palmitat, CoQ₁₀, D₃, E-acetat, K₁ in β-karoten – 3.3.2) pri različnih valovnih dolžinah. Pri izbiri valovne dolžine smo dali prednost vitaminoma D₃ in K₁, saj se oba v vitaminskih pripravkih pojavljata v µg območju, medtem ko se ostali analiti (β-karoten, A-palmitat, CoQ₁₀, vit. E in E-acetat) pojavljajo v mg območju.



Slika 6: Graf spreminjanja odziva analitov (relativno glede na maksimalni odziv) v odvisnosti od valovne dolžine detekcije

Iz slike 6 je razvidno, da odziv D_3 in K_1 z naraščanjem valovne dolžine pada, največji odziv pa imata v območju med 260 in 270 nm, z maksimumom pri 265 nm. Odzivi ostalih analitov so pri 265 nm nizki, pri 270 nm pa za nekatere analite odzivi bistveno narastejo, razen za A, A-palmitat in E-acetat. Ker pa so slednji vitamini običajno prisotni v pripravkih v občutno višjih količinah, smo se odločili, da za valovno dolžino detekcije izberemo 270 nm.

4.1.2 Razvoj in optimizacija ekstrakcije lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ iz pripravkov

Priprava vzorca predstavlja enega ključnih delov analize. Sestavljena je iz niza korakov, ki so potrebni, da vzorec preoblikujemo tako, da je primeren za analizo. Pri izbiri ustrezne priprave vzorca je potrebno upoštevati lastnosti vzorca in preučevanih analitov. Priprava vzorcev iz trdnih pripravkov je pogosto bolj zahtevna, saj moramo trdne vzorce pretvoriti v tekočo obliko, ki jo potem lahko vnesemo v HPLC sistem (83). Želeli smo si razviti enostavne ekstrakcijske postopke z minimalnim številom potrebnih korakov. Zaradi razlike v lastnostih izbranih pripravkov smo se odločili, da razvijemo tri ločene ekstrakcijske postopke – za tekoče farmacevtske oblike, za mehke kapsule in za tablete.

Po pregledu objavljenih ekstrakcijskih postopkov smo ugotovili, da jih veliko vključuje saponifikacijo vzorca, kateri sledi ekstrakcija z organskimi topili, uporabo velike količine vzorca ter velikih volumnov topil. Zelo pogosto se pojavlja ekstrakcija z organskimi topili in ekstrakcija tekoče-tekoče, medtem ko se superkritična tekočinska ekstrakcija in ekstrakcija na trdem nosilcu uporabljata bolj poredko. Saponifikacija je časovno zamudna, lahko povzroči razgradnjo analitov (zlasti E, K in CoQ₁₀, ki so občutljivi na alkalne pogoje) ter tvorbo emulzije (15). Vse to prispeva k povečanemu sipanju rezultatov, slabšim izkoristkom in slabši ponovljivosti. Zaradi lažje izvedbe in širokega nabora topil, smo se odločili za uporabo ekstrakcije z organskimi topili.

4.1.2.1 Ekstrakcija lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ iz mehkih kapsul

Razvoj ekstrakcije lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ iz mehkih kapsul smo začeli s preizkusom farmakopejskega postopka (po USP monografiji za ubidekarenon kapsule) (79). Zaradi slabega izkoristka ekstrakcije (preglednica XIV – 1. ekstrakcijsko topilo) smo v nadaljevanju preverili druga ekstrakcijska topila, vpliv razmerja med kapsulo in volumnom uporabljenega topila ter vpliv uporabe ultrazvoka. Za razvoj in optimizacijo ekstrakcijskega postopka za mehke kapsule smo uporabili pripravek 5 (vsebuje največje število analitov) in pripravek 8 (vsebuje E, ki ni prisoten v pripravku 5).

Iz preglednice XIV je razvidno, da je najprimernejše topilo n-heksan. Ker heksanskih ekstraktov ni priporočljivo neposredno injicirati v reverznofazni HPLC sistem, smo jih posušili s preprihovanjem z dušikom pri povišani temperaturi (40°C). Suhe ostanke smo nato raztopili v mobilni fazi, saj se je le-ta pri izbiri topila za raztapljanje suhega ostanka izkazala za najprimernejše (preglednica XVII). Zaradi slabše topnosti β -karotena smo preverili še razmerja med kapsulo in volumnom uporabljenega topila. Preverili smo dve razmerji – 1 kapsula/10 mL topila in 1 kapsula/100 mL topila. Pri razmerju 1 kapsula/10 mL topila smo dobili zelo slabe izkoristke za β -karoten (17%), medtem ko so bili le-ti pri razmerju 1 kapsula/100 mL zelo dobri (99%). Zato smo se odločili, da pri pripravkih 5 in 6, ki vsebujeta β -karoten, uporabimo razmerje 1 kapsula/100 mL topila, pri pripravkih 7 in 8, ki vsebujeta le E, pa razmerje 1 kapsula/10 mL topila. Ker smo že pri sami pripravi standarda β -karotena opazili, da soniciranje pospeši raztapljanje analita, smo preverili še, kakšen vpliv ima soniciranje na ekstrakcijo lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ iz mehkih kapsul. Ugotovil smo, da 10-minutno soniciranje poveča delež ekstrahiranih lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ iz mehkih kapsul, zato smo se odločili, da vzorce pred stresanjem še 10 minut soniciramo (preglednica XIV).

Preglednica XIV: Relativni izkoristki (%) posameznega parametra ekstrakcije lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ pri optimizaciji postopka iz mehkih kapsul

	E	E-acetat	β -karoten	celokupni CoQ ₁₀
EKSTRAKCIJSKO TOPILO				
1. n-heksan:EtOH ¹ =5:2	16	33	30	40
2. MeOH	18	2	2	2
3. EtOH	33	2	2	2
4. n-heksan:EtOH=20:80	73	85	54	70
5. MF	81	2	2	2
6. n-heksan	100	100	100	100
ČAS SONICIRANJA				
0 minut	49	99	76	95
10 minut	100	100	100	100

¹uporabili brezvodni EtOH; ²nepriprava topilo, vsebino kapsule z uporabljenim topilom nismo uspeli sprati iz čolnička

Končen ekstrakcijski postopek lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ iz mehkih kapsul je opisan v poglavju 3.3.4.2.

4.1.2.2 Ekstrakcija lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ iz tablet

Razvoj ekstrakcije lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ iz tablet smo začeli s preizkusom ekstrakcijskega postopka avtorjev Temova in Roškar (80), ki je opisan v poglavju 3.2.2.3. Pri omenjenem ekstrakcijskem postopku smo dobili zelo slabe izkoristke, zlasti za E-acetat (10%) in A-palmitat (0,1%) (MeOH kot ekstrakcijsko topilo – preglednica XV). Zato smo

v nadaljevanju preverili naslednje parametre ekstrakcije – predhodni ekstrakcijski korak, ekstrakcijsko topilo in različne postopke mešanja vzorca. Za razvoj in optimizacijo ekstrakcije lipofilnih vitaminov iz tablet smo uporabili pripravek 9, ki vsebuje A-palmitat, D₃ in E-acetat.

Najprej smo preverili vpliv topila (ostali parametri ekstrakcije so ostali enaki postopku avtorjev Temova in Roškar (80)). Preizkusili smo n-heksan, ki se je že pri mehkih kapsulah izkazal kot najprimernejše topilo in mobilno fazo, za katero smo pri izbiri topila za raztapljanje suhega ostanka ugotovili, da je najprimernejše (preglednica XVII). Iz rezultatov je razvidno, da se je tudi v primeru tablet n-heksan izkazal kot najboljšo topilo (preglednica XV – ekstrakcijsko topilo). Z namenom, da bi imeli poenoten postopek ekstrakcije lipofilnih vitaminov iz mehkih kapsul in tablet, smo v nadaljevanju spremenili in preverili vpliv dveh ekstrakcijskih parametrov: predhodni ekstrakcijski korak (cela tableta in zdrobitev tablete s pomočjo pestila v terilnici) in način mešanja vzorca (stresanje). Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da predhodni ekstrakcijski korak bistveno vpliva na delež ekstrahiranih lipofilnih vitaminov iz tablet. Ta je večji, ko tablete raztopimo z dodatkom 0,1% H₃PO₄ in intenzivnim mešanjem (preglednica XV – predhodni ekstrakcijski koraki), zato smo v nadaljevanju tablete vedno raztopili. Z mešanjem vzorca po postopku 3 (preglednica XV – mešanje vzorca) smo se približali ekstrakcijskemu postopku lipofilnih vitaminov iz mehkih kapsul, vendar pa je sam ekstrakcijski postopek dolg (približno 1 uro). Zato smo preizkusili še štiri postopke mešanja, pri katerih smo izključili 30-minutno stresanje (preglednica XV – 4.-7. postopek mešanja vzorca), vključili pa smo intenzivno mešanje tablete z vibracijskim mešalnikom z namenom popolnega razpada tablete (čas mešanja smo v nadaljevanju prilagodili posamezni tableti, da so bile le-te popolnoma raztopljene), sledilo je soniciranje in zopet intenzivno mešanje z namenom ekstrakcije lipofilnih vitaminov iz vodne (0,1% H₃PO₄) v organsko fazo (n-heksan). Iz preglednice XV je razvidno, da se je 7. postopek izkazal za najboljšega. Končni ekstrakcijski postopek lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ iz tablet je opisan v poglavju 3.3.4.3.

Preglednica XV: Relativni izkoristki (%) posameznega parametra ekstrakcije lipofilnih vitaminov pri optimizaciji postopka iz tablet

	A-palmitat	D ₃	E-acetat
PREDHODNI EKSTRAKCIJSKI KORAKI			
cela tableta	0,0	0,0	0,0
zdrobitev tablete	33,5	36,0	16,5
razpad z 0,1% H ₃ PO ₄	100,0	100,0	100,0
EKSTRAKCIJSKO TOPILO			
MeOH	0,1	50,6	10,0
MF	84,5	82,0	97,0
n-heksan	100,0	100,0	100,0
MEŠANJE VZORCA			
1. 10 min soniciranje, 30 min stresanje	28,3	29,5	16,0
2. 4 min vibracijski mešalnik, 30 min stresanje	65,1	74,3	54,8
3. 4 min vibracijski mešalnik, 10 min soniciranje, 30 min stresanje	84,5	82,0	97,0
4. 2 min vibracijski mešalnik, 10 min soniciranje, 2 min vibracijski mešalnik	95,5	94,4	95,7
5. 15 min vibracijski mešalnik	92,3	95,6	92,3
6. 5 min vibracijski mešalnik, 5 min soniciranje	97,8	98,6	96,5
7. 5 min vibracijski mešalnik, 10 min soniciranje, 2 min vibracijski mešalnik	100,0	100,0	100,0

4.1.2.3 Sušenje heksanskih ekstraktov

Ekstrakcijskemu postopku lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ iz mehkih kapsul in tablet je sledilo sušenje heksanskih ekstraktov s preprihovanjem z dušikom pri povišani temperaturi. Temperaturo sušenja smo testirali s sušenjem heksanskega ekstrakta pripravka 12, ki ne vsebuje β-karotena. Ker so retinoidi, karotenoidi, D₃ in CoQ₁₀ termolabilni (14,15,42), smo se odločili, da preizkusimo tri različne temperature sušenja (35, 40 in 45°C).

Preglednica XVI: Relativni izkoristki (%) analitov pri različnih temperaturah sušenja heksanskih ekstraktov

Temperatura [°C]	A-palmitat	CoQ ₁₀ oks.	D ₃	E-acetat	K ₁
35	99	100	100	100	100
40	94	98	99	98	100
45	100	99	96	97	86

Iz preglednice XVI je razvidno, da le K₁ ni stabilen pri temperaturi 45°C. Pri vseh analitih, razen pri A-palmitatu, je temperatura sušenja dala praktično enake rezultate pri 35 in 40°C. Ker je bil čas sušenja pri nižji temperaturi bistveno daljši, smo za temperaturo sušenja izbrali temperaturo 40°C.

4.1.2.4 Raztapljanje suhega ostanka

Izbira ustreznega rekonstitucijskega topila predstavlja pomemben parameter za zagotovitev ustrezne priprave vzorca. Preverili smo dve rekonstitucijski topili – metanol in mobilno fazo. Ustrezno rekonstitucijsko topilo smo izbirali na heksanskih ekstraktih mehkih kapsul (pripravek 5 in 8), saj pripravek 5 vsebuje β-karoten, za katerega smo že pri pripravi

standarda ugotovili, da je problematičen glede topnosti. Za boljše topilo se je izkazala mobilna faza, kar je najbolj razvidno pri β -karotenu (preglednica XVII).

Preglednica XVII: Relativni izkoristki (%) analitov pri različnih rekonstitucijskih topiloma

Rekonstitucijsko topilo	E	E-acetat	β -karoten	CoQ ₁₀ oks.
MeOH	88	78	24	92
MF	100	100	100	100

Po dodatku rekonstitucijskega topila suhemu ostanku, smo vzorce z namenom zagotovitve popolne raztopitve suhega ostanka še 10 minut sonicirali in nato 30 sekund mešali na vibracijskem mešalniku. Ugotovili smo, da je soniciranje vzorcev po dodanem rekonstitucijskemu topilu nujno za doseg popolne raztopitve β -karotena, saj je ta za razliko od ostalih analitov v mobilni fazi slabše topen.

Preverili smo še, kakšen vpliv ima uporabljen volumen rekonstitucijskega topila na ponovljivost raztapljanja suhega ostanka ter preverili, ali se odzivi analitov z zmanjševanjem dodanega volumna rekonstitucijskega topila linearno povečujejo. Rezultati ponovljivosti, ki je podana kot RSD treh meritev ter izkoristek raztapljanja (izražen z R^2), so prikazani v preglednici XVIII. Iz rezultatov je razvidno, da so za raztapljanje primerni vsi volumni, vključno z najmanjšim testiranim – 0,5 mL (na to kažejo vrednosti R^2), vendar pa je ponovljivost pri tem volumnu najslabša. Zato smo za raztapljanje suhega ostanka izbrali volumen 1 mL.

Preglednica XVIII: Vpliv volumna rekonstitucijskega topila na ponovljivost raztapljanja suhega preostanka (n=3) in izkoristek raztapljanja izražen z R^2

volumen rekonstitucijskega topila [mL]	RSD (%), n=3						
	A-palmitat	CoQ ₁₀ oks.	D ₃	E	E-acetat	K ₁	β -karoten
3	0,3	0,6	1,0	0,4	0,9	1,3	1,5
2	1,8	1,6	1,7	1,7	0,9	1,7	1,6
1	0,4	0,5	1,1	0,7	1,1	0,6	0,8
0,5	2,3	2,1	1,9	1,9	3,3	2,1	8,8
linearnost (R^2)	0,9999	1,0000	1,0000	0,9999	0,9994	0,9999	0,9998

4.2 VALIDACIJA HPLC METODE

Z validacijo instrumentalne HPLC metode smo dobili potrditev, da je le-ta ustrezna za sočasno kvalitativno in kvantitativno vrednotenje lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀, saj so rezultati pokazali, da je metoda selektivna, robustna, linearna v testiranem koncentracijskem območju ter izkazuje dobro točnost in natančnost.

4.2.1 Selektivnost

S primerjavo kromatogramov topil (MF, 0,1% Fe³⁺, 0,1 % raztopina BHT, 0,01% raztopina BHT), referenčnih standardov (A-palmitat, CoQ₁₀, D₃, E, E-acetat, K₁ in β-karoten) in raztopine mešanice standardov, ki je vsebovala A-palmitat, CoQ₁₀, D₃, E-acetat, K₁ in β-karoten, smo ugotovili, da pri retencijskih časih preiskovanih analitov ni prisotnih interferenc (priloga 1). S tem smo potrdili selektivnost metode.

4.2.2 Linearnost

Rezultati vrednotenja linearnosti analizne metode so zbrani v preglednici XIX in XX. Iz preglednice XIX je razvidno, da je metoda linearna za analite CoQ₁₀ oks., D₃, E, E-acetat in K₁ v testiranem koncentracijskem območju (R^2 je bil za vsako umeritveno premico $> 0,999$). Pri A-palmitatu in β-karotenu pa linearnosti nismo potrdili vsak dan validacije. Pri A-palmitatu je bil R^2 2. dan validacije nižji od postavljenega kriterija ($< 0,999$), pri β-karotenu pa 2. in 3. dan. Po ponovnem analiziranju QC vzorcev (4.2.6.1) smo ugotovili, da sta oba vitamina nestabilna, zato smo se odločili, da ju stabiliziramo z dodatkom BHT, ki deluje kot lipofilni antioksidant (28,66,69). Z dodatkom BHT k osnovnima raztopinama (0,05% raztopina BHT v n-heksanu) in dodatkom BHT v MF (0,01% raztopina BHT v MF), ki smo jo uporabili za rekonstitucijo suhih ostankov, smo dosegli ustrezno linearnost obeh vitaminov v testiranem koncentracijskem območju (preglednica XX). Pri β-karotenu smo ugotovili, da je 100 mg/L mejna koncentracija za doseg popolnega raztapljanja v rekonstitucijskem topilu, zato smo spremenili koncentracijsko območje, iz 0,1-100 mg/L na 0,06-60 mg/L.

Preglednica XIX: Rezultati vrednotenja linearnosti v treh dneh brez dodanega BHT

Analit	Koncentracijsko območje [mg/L]	Enačba umeritvene premice	R ²
A-palmitat	1,2 - 600	y = 7,795x + 22,634	0,9995
		¹ y = 6,663x + 36,274	0,9945
		y = 7,440x + 43,772	0,9992
CoQ ₁₀ oks.	0,80 - 400	y = 18,667x + 30,653	0,9995
		y = 19,467x + 11,397	0,9999
		y = 17,912x + 64,709	0,9993
D ₃	0,25 - 50	y = 53,416x + 10,340	0,9996
		y = 53,100x + 11,537	0,9991
		y = 50,869x + 20,412	0,9994
E	5,2 - 2600	y = 1,789x + 20,894	0,9997
		y = 1,792x + 38,808	0,9998
		y = 1,850x + 3,469	0,9998
E-acetat	2,6 - 2600	y = 2,421x + 30,955	0,9997
		y = 2,302x + 32,757	0,9997
		y = 2,245x + 54,674	0,9992
K ₁	0,30 - 150	y = 40,030x + 19,752	0,9996
		y = 41,423x + 19,723	0,9995
		y = 39,271x + 48,301	0,9995
β-karoten	0,12 - 60	y = 33,885x + 16,164	0,9994
		¹ y = 31,385x + 33,396	0,9935
		¹ y = 33,557x + 9,754	0,9977

¹V preglednici so z rumeno obarvani rezultati, ki ne ustrezajo postavljenemu kriteriju linearnosti (R² > 0,999).

Preglednica XX: Rezultati vrednotenja linearnosti z dodanim BHT

Analit	Koncentracijsko območje [mg/L]	Enačba umeritvene premice	R ²
A-palmitat	1,2 - 600	y = 12,423x + 27,679	0,9997
CoQ ₁₀ oks.	0,80 - 400	y = 19,398x + 26,08	0,9997
D ₃	0,25 - 50	y = 52,46x + 10,803	0,9998
E-acetat	2,6 - 2600	y = 2,3107x + 29,224	0,9996
K ₁	0,30 - 150	y = 41,617x + 17,029	0,9997
β-karoten	0,12 - 60	y = 36,534x + 2,620	0,9998

4.2.3 Točnost

Točnost analizne metode smo vrednotili na treh koncentracijskih nivojih znotraj linearnega območja metode (QC_L, QC_M, QC_H). Glede na dobljene rezultate (preglednica XXI) lahko potrdimo točnost analizne metode za vse analite, saj so dnevne točnosti vseh analitov znotraj predpisanega intervala (95 - 105 %).

Preglednica XXI: Točnost (povprečna vrednost ± SE) analizne metode

QC	Dan	A-palmitat	CoQ ₁₀ ox.	D ₃	E	E-acetat	K ₁	β-karoten
		Točnost [%]						
QC _L	1. (n=3)	101,70	101,26	97,87	99,40	96,26	101,12	101,88
	2. (n=3)	101,46	100,28	100,31	102,34	98,80	100,43	101,34
	3. (n=3)	101,48	102,91	97,20	100,87	101,55	101,23	101,22
	Povprečje (n=9)	101,55 ± 0,04	101,48 ± 0,44	98,46 ± 0,55	100,87 ± 0,49	98,87 ± 0,88	100,93 ± 0,15	101,48 ± 0,15
QC _M	1. (n=3)	98,00	100,95	99,27	96,40	99,67	101,73	98,24
	2. (n=3)	98,39	101,25	103,91	98,93	100,18	103,40	98,79
	3. (n=3)	98,22	101,62	98,92	96,40	96,13	101,94	98,19
	Povprečje (n=9)	98,20 ± 0,07	101,28 ± 0,11	100,70 ± 0,55	97,24 ± 0,49	98,66 ± 0,74	102,36 ± 0,30	98,41 ± 0,11
QC _H	1. (n=3)	99,33	100,14	98,52	97,49	101,22	101,06	99,30
	2. (n=3)	100,39	101,93	103,71	100,70	100,76	103,47	100,96
	3. (n=3)	99,54	103,18	99,82	97,49	101,68	102,65	100,32
	Povprečje (n=9)	99,76 ± 0,19	101,75 ± 0,51	100,68 ± 0,55	98,56 ± 0,62	101,22 ± 0,15	102,39 ± 0,41	100,19 ± 0,30

4.2.4 Natančnost

Natančnost smo obravnavali na nivoju ponovljivosti, in sicer smo preverili znotraj-dnevno ponovljivost, med-dnevno ponovljivost in ponovljivost injiciranja (preglednica XXII). Razvidno je, da z uporabljenimi analiznimi metodami dobimo ponovljive rezultate v celotnem koncentracijskem območju. RSD vrednosti znotraj-dnevne in med-dnevne ponovljivosti ne presegajo meje sprejemljivosti (RSD < 5%), enako velja tudi za ponovljivost injiciranja, kjer so vrednosti RSD < 2%.

Preglednica XXII: Znotraj-dnevna ponovljivost (n=3), med-dnevna ponovljivost (n=3 dnevi) in ponovljivost injiciranja (n=6)

QC	Ponovljivost	A-palmitat	CoQ ₁₀ ox.	D ₃	E	E-acetat	K ₁	β-karoten
		RSD [%]						
QC _L	Znotraj-dnevna	0,54	1,18	1,03	1,08	0,71	1,26	1,64
	Med-dnevna	0,13	1,00	1,71	3,17	1,43	1,15	0,35
QC _M	Znotraj-dnevna	0,27	0,53	0,55	1,27	0,56	0,40	0,52
	Med-dnevna	0,20	0,98	2,69	1,47	2,32	0,87	1,28
	Injiciranje	0,19	0,10	0,24	0,26	0,14	0,13	1,83
QC _H	Znotraj-dnevna	0,86	0,61	0,72	0,65	0,54	0,79	0,80
	Med-dnevna	0,56	1,73	2,64	1,85	2,26	1,19	2,11

4.2.5 Meja zaznave in meja določitve

Po enačbi 5 oz. enačbi 6 smo izračunali mejo zaznave in mejo določitve za posamezen analit. Rezultati so zbrani v preglednici XXIII.

Preglednica XXIII: Vrednosti meje zaznave (LOD) in meje določitve (LOQ) za obravnavane analite

Analit	LOD [mg/L]	LOQ [mg/L]
A-palmitat	0,46	1,39
CoQ ₁₀ ox.	0,28	0,85
D ₃	0,04	0,15
E	23,35	70,77
E-acetat	0,50	1,52
K ₁	0,07	0,20
β-karoten	0,04	0,12

4.2.6 Robustnost

Robustnost HPLC metode smo preverili z načrtnimi majhnimi spremembami treh kromatografskih parametrov (hitrost pretoka, temperatura kolone in sestava mobilne faze). Rezultati robustnosti so podani kot odklon od uporabljenega, optimalnega kromatografskega parametra (preglednica XXIV). Iz rezultatov je razvidno, da majhne spremembe v hitrosti pretoka, temperaturi kolone in sestavi mobilne faze značilno ne vplivajo na kvaliteto ločbe (resolucija, število teoretskih podov) ter retencijske čase in odzive analitov, zato lahko potrdimo, da je analizna metoda robustna.

Preglednica XXIV: Rezultati robustnosti analizne metode za vse analite

optimalni kromatografski parametri	odklon glede na optimalni parameter [%]	spremenjeni kromatografski parametri	odklon tr [%]	odklon AUC [%]	odklon N [%]	odklon Rs [%]
hitrost pretoka (1 mL/min)	5	0,95 mL/min	< 6%	< 6%	< 4%	< 3%
		1,05 mL/min	< 5%	< 6%	< 8%	< 5%
temperatura kolone (25°C)	4	24°C	< 2%	< 1%	< 2%	< 3%
		26°C	< 2%	< 1%	< 4%	< 3%
sestava mobilne faze (ACN/THF/H ₂ O = 50/45/5)	1	ACN:THF:H ₂ O = 50,5:44,55:4,95	< 6%	< 1%	< 7%	< 10%

tr = retencijski čas; N = število teoretskih podov; Rs = resolucijski faktor

4.2.6.1 Stabilnost vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku

Ker so lahko analiti neobstojni že pred samo analizo (npr. med ekstrakcijo, pripravljene vzorci v času ko čakajo na analizo), smo preverili stabilnost referenčnih standardov vitaminov in CoQ₁₀. S testiranjem stabilnost kontrolnih vzorcev smo preverjali, koliko časa se ohranijo ustrezne lastnosti pripravljenih vzorcev, ki se pred analizo shranjujejo v avtomatskem vzorčevalniku. Pri dveh analitih (A-palmitat in β-karoten) smo že po enem dnevu opazili občutnejši padec vsebnosti (preglednica XXV). Pri obeh je nestabilnost presenetljivo večja pri vzorcih z višjo koncentracijo (QC_M, QC_H). Pri QC_M se je vsebnost

A-palmitata zmanjšala za 17,9%, pri β -karotenu pa kar za 61,5%. Še večji padec je opazen pri QC_H – pri A-palmitatu se je vsebnost zmanjšala za 21,8%, pri β -karotenu pa za 68,6%. Po dveh dneh se je upad vsebnosti obeh vitaminov še povečal, opazili smo tudi občutnejši padec vsebnosti še enega analita (CoQ₁₀ oks.).

Preglednica XXV: Stabilnost kontrolnih vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku (T = 25°C) brez dodanega BHT

Analit	QC	Stabilnost (%)	
		po 1 dnevu	po 2 dneh
A-palmitat	QC _L	99,5	102,6
	QC _M	82,1	64,0
	QC _H	78,2	60,1
CoQ ₁₀ ox.	QC _L	100,9	101,9
	QC _M	97,6	83,9
	QC _H	95,1	80,5
D ₃	QC _L	102,3	103,4
	QC _M	100,7	103,8
	QC _H	102,2	103,6
E	QC _L	100,3	102,7
	QC _M	102,0	104,2
	QC _H	100,6	103,1
E-acetat	QC _L	100,8	103,2
	QC _M	101,7	103,3
	QC _H	102,2	103,6
K ₁	QC _L	100,8	102,7
	QC _M	98,3	96,4
	QC _H	97,5	94,7
β -karoten	QC _L	90,7	92,4
	QC _M	38,5	13,2
	QC _H	31,4	9,9

Opomba: v preglednici so z rumeno obarvani rezultati, ki ne ustrezajo postavljenemu kriteriju stabilnosti 100 ± 5%

Za doseg vsaj 24-urne stabilnosti A-palmitata in β -karotena smo potrebovali ustrezen antioksidant. Za stabilizacijo lipofilnih vitaminov se kot antioksidanti najpogosteje uporabljajo askorbinska kislina, butilhidroksitoluen, pirogalol in njihove kombinacije (28,66,69). Preizkusili smo askorbinsko kislino in BHT. Iz rezultatov je razvidno, da dodatek antioksidanta bistveno stabilizira A-palmitat in β -karoten. Za boljšega se je izkazal BHT (preglednica XXVI).

Preglednica XXVI: Izbira antioksidanta za stabilizacijo A-palmitata in β -karotena

vzorec	čas [h]	β -karoten	A-palmitat
		stabilnost (%)	stabilnost (%)
100% kalibracijska raztopina	0	100,0	100,0
	2	98,0	93,0
	3,5	98,6	86,8
	24	76,3	47,4
100% kalibracijska raztopina + 100mg/L BHT	0	100,0	100,0
	2	99,7	99,9
	3,5	99,2	99,4
	24	96,4	99,7
100% kalibracijska raztopina + 500 mg/L AK	0	100,0	100,0
	2	99,3	100,2
	3,5	98,1	99,5
	24	89,3	99,5

Z dodatkom BHT smo pripravili nove QC izbranih analitov (v skladu s postopkom 3.3.3) in preverili njihovo stabilnost. Po enem dnevu nismo opazili občutnejšega upada vsebnosti, le-te so bile znotraj predpisanega kriterija (preglednica XXVII).

Preglednica XXVII: Stabilnost kontrolnih vzorcev analitov A-palmitat in β -karoten z dodanim BHT v avtomatskem vzorčevalniku ($T = 25^{\circ}\text{C}$) po enem dnevu

Analit	QC	Stabilnost po enem dnevu (%)
A-palmitat	QC _L	100,3
	QC _M	100,4
	QC _H	99,6
β -karoten	QC _L	99,3
	QC _M	98,1
	QC _H	97,5

4.2.7 Izkoristek ekstrakcije

Preverili smo ustreznost priprave vzorcev – ponovljivost in izkoristek ekstrakcije. Izkoristke ekstrakcij smo vrednotili v skladu s postopkom (3.4.7) in izračunali po *enačbi 7*. Izkoristki in ponovljivost (podana kot SE) priprave vzorcev za vrednotenje lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ v tekočih pripravkih, mehkih kapsulah in tabletah so prikazani v preglednicah XXVIII, XXIX in XXX. Iz rezultatov je razvidno, da z uporabljenimi analitično metodo dosežemo visoke in ponovljive izkoristke ekstrakcije ($SE < 7\%$), saj so bili znotraj postavljenega intervala ($100 \pm 10\%$) za vse analite pri vseh testiranih pripravkih.

4.3 VSEBNOST LIPOFILNIH VITAMINOV IN CoQ₁₀ V PRIPRAVKIH

Veliko ljudi ob povečanih potrebah po vitaminih poseže po vitaminskih pripravkih. Po javnomnenjski raziskavi Ministrstva za zdravje o jemanju prehranskih dopolnil iz leta 2010, prebivalci Slovenije najpogosteje uživamo čebelje pripravke, takoj za njimi pa vitaminske in mineralne pripravke (84). Zato je bil tudi eden izmed glavnih ciljev

magistrske naloge ovrednotiti vsebnost lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ v nekaterih vitaminskih pripravkih. Odločili smo se, da preverimo njihovo vsebnost v nekaterih zdravilih in prehranskih dopolnilih ter tako preverimo tudi razliko med obema skupinama pripravkov. Prehranska dopolnila namreč niso podvržena tako strogi zakonodaji in za razliko od zdravil ni nadzora nad vsebnostjo aktivnih komponent. Po odprtju smo izbranim pripravkom s predhodno razvito analizo metodo ovrednotili vsebnost v treh paralelah ter preverili ujemanje z deklarirano vrednostjo. Ovrednotenje vsebnosti vitaminov v prehranskih dopolnilih in zdravilih je pomembno zaradi kontrole celokupnega vnosa vitaminov, še zlasti vitamina A in D, ki imata lahko ob prekomernem vnosu toksične učinke.

Vsebnost vitaminov smo ovrednotili v skladu s postopkom 3.3.4. Reprezentativni kromatogrami testiranih pripravkov so predstavljeni v prilogah 2-4. Iz preglednic XXVIII, XXIX in XXX je razvidno, da smo le pri pripravkih 1, 11 (le pri enem analitu – E-acetat) in 12 (le pri enem analitu – E-acetat) ugotovili vsebnost zelo blizu deklarirane ($100\% \pm 5\%$). Pri dveh pripravkih smo ugotovili bistveno manjšo vsebnost analitov, kot je deklarirana: pripravek 12 (K₁ – 72,50% in CoQ₁₀ – 87,09%) in pripravek 5 (CoQ₁₀ ox. – 36,80%). Pri večini pripravkov pa so bile vsebnosti vitaminov višje od deklariranih. Preseneča nas, da smo tudi pri zdravilih ugotovili za več kot 20% večje vsebnosti od deklariranih (pripravki 2, 3, 4, 5, 9, 11). Najvišje odstopanje vsebnosti smo opazili pri pripravku 12 (CoQ₁₀ ox. in K₁ imata bistveno nižjo vsebnost, D₃ bistveno višjo) in pri pripravku 6 (E-acetat ima kar 51,54% višjo vsebnost od deklarirane). Omenjena pripravka sta prehranski dopolnila, za katere veljajo manj strogi predpisi. Za lipofilne vitamine je po smernicah »Tolerance pri označevanju hranilne vrednosti živil«, predpisana toleranca med deklarirano vsebnostjo in dejansko ugotovljeno vsebnostjo 80-130% (85). Če primerjamo ta interval s testiranimi prehranskimi dopolnili (saj ta sodijo med živila), pripravka 12 (vsebnost vitamina K₁ in D₃ ni ustrezna) in 6 (vsebnost vitamina E-acetat ni ustrezna) nista ustrezna.

Pri pripravku 12 smo ugotovili, da vsebuje vitamin A v obliki palmitatnega estra, čeprav je deklariran retinol. Prav tako smo pri tem pripravku opazili največje sisanje vsebnosti med vsemi testiranimi tabletami. Neskladnost z deklarirano obliko učinkovine smo ugotovili še pri pripravku 5, ki vsebuje CoQ₁₀ tako v oksidirani kot v reducirani obliki (zastopana v večjem deležu), čeprav ima deklarirano le oksidirano obliko.

Preglednica XXVIII: Vsebnost lipofilnih vitaminov v izbranih tekočih farmacevtskih izdelkih

analit	ugotovljena vsebnost ± SE	ugotovljena/deklarirana vsebnost*100 ± SE [%]	izkoristek ekstrakcije [%]
PRIPRAVEK 1			
K₁	9,98 mg ± 0,02 mg	99,77 ± 0,24	103,76
PRIPRAVEK 2			
A-palmitat	8341,01 i.e.	139,02 ± 0,08	1/
D₃	2487,69 i.e.	124,38 ± 0,35	1/
PRIPRAVEK 3			
A-palmitat	66450,64 i.e. ± 1401,37 i.e.	132,90 ± 2,80	98,58
D₃	29906,19 i.e. ± 244,07 i.e.	119,62 ± 0,98	93,33
E-acetat	23,50 mg ± 0,36 mg	117,52 ± 1,81	96,27
PRIPRAVEK 4			
A-palmitat	74466,11 i.e. ± 349,54 i.e.	148,93 ± 0,70	92,76
D₃	6829,81 i.e. ± 296,36 i.e.	136,60 ± 5,92	96,75
E-acetat	39,38 mg ± 0,04 mg	131,27 ± 0,14	95,38

i.e. = internacionalne enote; ¹prilavek 2 smo neposredno injicirali

Preglednica XXIX: Vsebnost lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ v izbranih mehkih kapsulah

analit	ugotovljena vsebnost ± SE	ugotovljena/deklarirana vsebnost*100 ± SE [%]	izkoristek ekstrakcije [%]
PRIPRAVEK 5			
delež CoQ₁₀ red. [%]	62,01 % ± 0,32 %	1/	/
CoQ₁₀ oks.	11,04 mg ± 0,46 mg	36,80 ± 0,50	102,30
celokupni CoQ₁₀	28,59 mg ± 0,06 mg	² 95,30 ± 0,20	/
E-acetat	34,27 mg ± 0,20 mg	142,78 ± 0,82	98,05
β-karoten	3,36 mg ± 0,02 mg	³ /	108,03
PRIPRAVEK 6			
E-acetat	45,85 mg ± 0,71 mg	151,54 ± 2,55	99,75
β-karoten	8,03 mg ± 0,10 mg	114,66 ± 1,38	108,18
PRIPRAVEK 7			
E	8,49 mg ± 0,20 mg	113,22 ± 2,69	96,25
PRIPRAVEK 8			
E	12,13 mg ± 0,39 mg	121,34 ± 3,9	100,40

prilavki v rdeči barvi so prehranska dopolnila; ¹red. oblika CoQ₁₀ ni deklarirana, deklarirana je le oks. oblika; ²glede na deklarirano oks. obliko; ³vsebnost ni deklarirana, β-karoten vsebuje kot pomožno snov

Preglednica XXX: Vsebnost lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ v izbranih tabletah

analit	ugotovljena vsebnost ± SE	ugotovljena/deklarirana vsebnost*100 ± SE [%]	izkoristek ekstrakcije [%]
PRIPRAVEK 9			
A-palmitat	5930,04 i.e. ± 99,86 i.e.	121,28 ± 2,00	94,24
D₃	488,43 i.e. ± 4,75 i.e.	122,11 ± 1,19	95,78
E-acetat	17,83 mg ± 0,29 mg	118,85 ± 1,96	96,90
β-karoten	0,12 mg ± 0,003 mg	1/	/
PRIPRAVEK 10			
A-palmitat	716,28 i.e. ± 1,01 i.e.	119,38 ± 0,17	99,28
D₃	97,10 i.e. ± 1,65 i.e.	121,37 ± 2,06	99,27
PRIPRAVEK 11			
A-palmitat	4657,68 i.e. ± 55,19 i.e.	129,38 ± 1,53	93,38
D₃	647,97 i.e. ± 33,31 i.e.	129,59 ± 6,66	103,53
E-acetat	15,22 mg ± 0,22 mg	101,45 ± 1,44	103,46
PRIPRAVEK 12			
² A-palmitat	863,10 μg ± 15,76 μg	107,89 ± 1,97	99,56
CoQ₁₀ oks.	3,92 mg ± 0,17 mg	87,09 ± 3,84	99,24
D₃	7,32 μg ± 0,07 μg	146,34 ± 1,31	104,77
E-acetat	12,24 mg ± 0,76 mg	101,97 ± 6,30	97,21
K₁	18,13 μg ± 0,67 μg	72,50 ± 2,68	97,37

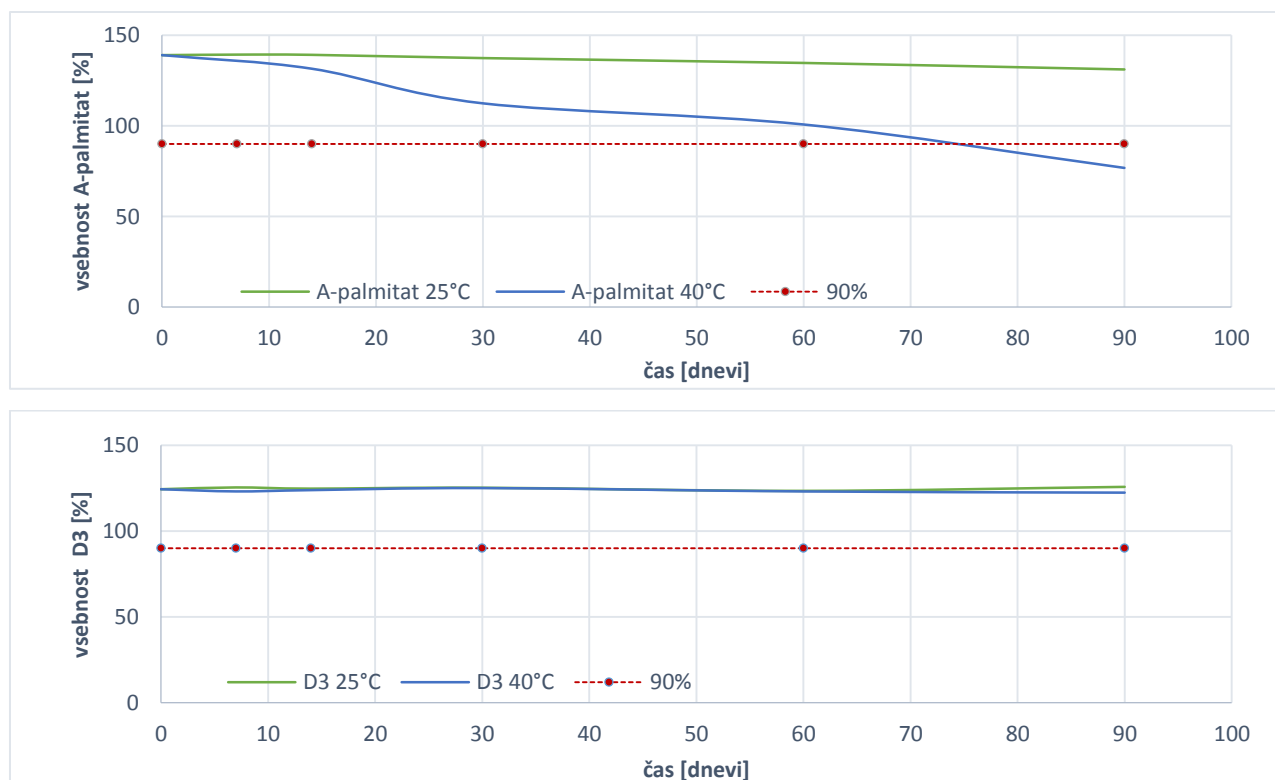
prilavki v rdeči barvi so prehranska dopolnila; ¹vsebnost ni deklarirana, β-karoten vsebuje kot pomožno snov; ²deklariran je retinol, a prisoten je A – palmitat

4.4 STABILNOSTNA ŠTUDIJA

Splošno je znano, da so lipofilni vitamini in CoQ₁₀ relativno nestabilni. Vitamini A, D, E (ob hkratni prisotnosti kisika) in CoQ₁₀ so termolabilni ter podvrženi oksidacijam, vsi pa so občutljivi na svetlobo (14,15,28,29,42,44,45). Po odprtju ovojnine pride do izpostavljenosti lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ svetlobi in kisiku, kar lahko vodi v oksidacije in posledično do zmanjšanja vsebnosti prisotnih vitaminov (86). Ravno zato smo v zaključku magistrske naloge preverili stabilnost lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ v farmacevtskih pripravkih. Za pripravke od 2 do 12 smo izvedli trimesečno stabilnostno študijo pri dveh različnih temperaturah shranjevanja, pri priporočeni (15-25°C) in pri povišani temperaturi (pospešeni testi stabilnosti, 40°C). Vzorce za vrednotenje stabilnosti smo pripravili v skladu s postopkom opisanim v poglavju 3.3.4.

4.4.1 Stabilnost lipofilnih vitaminov v tekočih farmacevtskih izdelkih

Na primeru pripravka 2 (slika 7) vidimo, da temperatura shranjevanja bistveno vpliva na vsebnost A-palmitata. Pri povišani temperaturi je bil upad vsebnosti A-palmitata bistveno hitrejši (po 3 mesecih že več kot 60% glede na začetno vrednost) v primerjavi s sobno temperaturo (po 3 mesecih 8% glede na začetno vrednost). Povišana temperatura shranjevanja ni vplivala na vsebnost D₃, saj ta po 3 mesecih ostaja enaka začetni (slika 7).

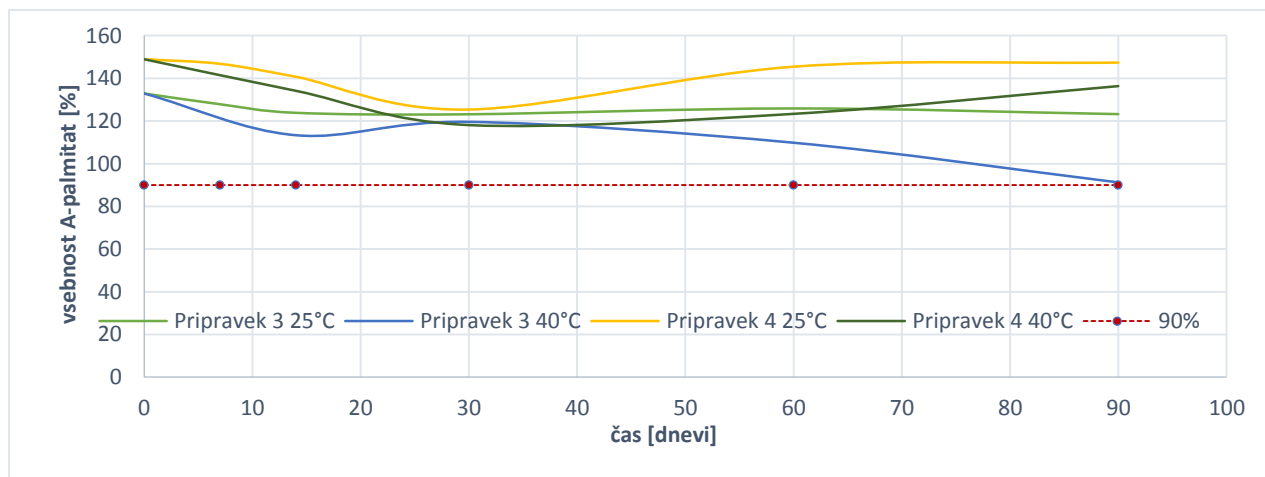


Slika 7: Vsebnost A-palmitata (zgoraj) in D₃ (spodaj) v pripravku 2 pri različnih temperaturnih pogojih

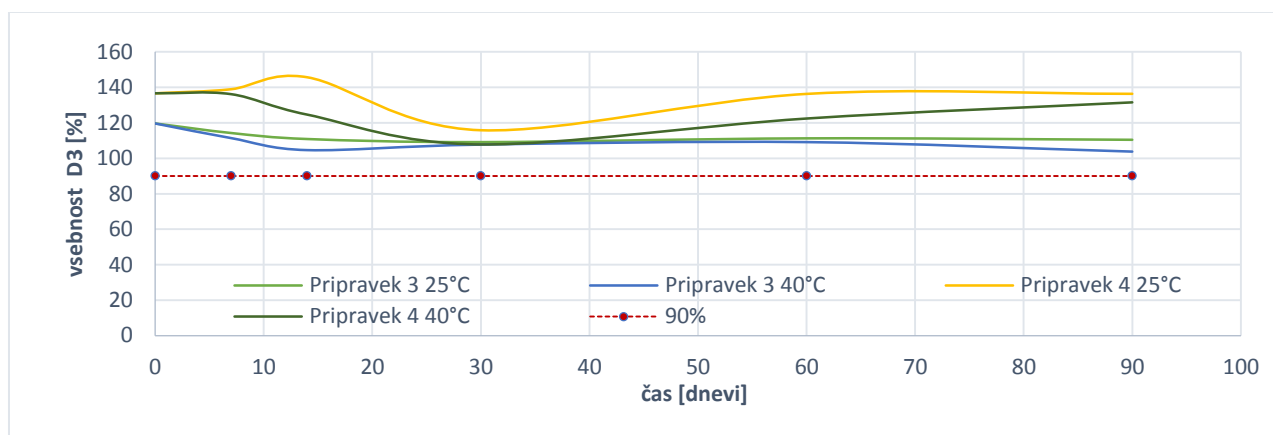
Tudi pri pripravkih 3 in 4 je temperatura shranjevanja vplivala na stabilnost lipofilnih vitaminov. Pri obeh pripravkih je prišlo do upada vsebnosti vseh lipofilnih vitaminov (A-palmitat, D₃, E-acetat) tako pri sobni kot pri povišani temperaturi, vendar je bil upad hitrejši pri povišani temperaturi. Iz slik 8, 9 in 10 je razvidno, da je pri pripravku 4 po enem mesecu vsebnost lipofilnih vitaminov začela naraščati, tako pri sobni, kot tudi pri povišani temperaturi. Vzrok za to je nastanek nehomogenega vzorca, saj smo pri analiziranju pripravka v časovni točki 2 meseca, opazili organoleptične spremembe. Pri pripravku 4, ki je bil shranjen pri povišani temperaturi, je emulzija postala motna (»mlečna«), prišlo je do ločitve faz. Ločitev faz je bila reverzibilna, saj smo s stresanjem ponovno dobili emulzijo, vendar je bila motna in bolj gosta kot na začetku stabilnostne študije. Pri pripravku 4, ki je bil shranjen pri sobni temperaturi, pa smo opazili plavajoče delce. Ta pripravek ima deklariran rok uporabnosti po odprtju – en mesec. Rok uporabnosti po odprtju se je skladal z našimi ugotovitvami, saj do vključno 1 meseca po odprtju pri pripravku nismo opazili organoleptičnih sprememb, tako pri sobni kot tudi pri povišani temperaturi. Vsebnost lipofilnih vitaminov (A-palmitat, D₃, E-acetat) sicer upada (slike 8, 9 in 10), vendar tako pri sobni kot tudi pri povišani temperaturi ne pade pod mejo sprejemljivosti (90%). Res pa je, da proizvajalec uporablja presežek lipofilnih vitaminov, kar mu zagotavlja vsebnost lipofilnih vitaminov nad mejo sprejemljivosti v času roka uporabnosti po odprtju.

Pri pripravku 3 nismo opazili organoleptičnih sprememb, saj je ostal bister. Tudi pripravek 3 ima deklariran rok uporabnosti po odprtju približno en mesec (28 dni). Kratek rok nakazuje na nestabilnost omenjenega pripravka, vendar po 28 dnevih vsebnost lipofilnih vitaminov (A-palmitat, D₃, E-acetat) tako pri sobni kot pri povišani temperaturi, ni padla pod mejo sprejemljivosti. Vendar pa enako kot pri pripravku 4 proizvajalec uporablja presežek lipofilnih vitaminov.

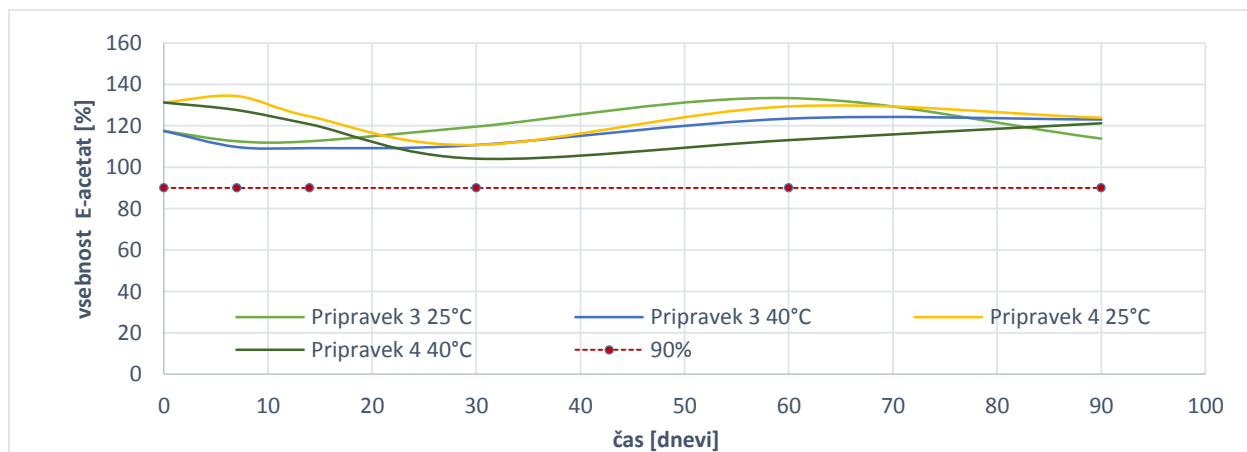
Pripravka 3 in 4 prihajata od istega proizvajalca in vsebujeta podobne količine lipofilnih vitaminov, pripravek 4 pa vsebuje še antioksidant – vitamin C. Zato smo pričakovali, da bo padec lipofilnih vitaminov v pripravku 4 manjši v primerjavi s pripravkom 3, saj vitamin C dokazano stabilizira lipofilne vitamine. Da ima dodatek antioksidanta bistven vpliv na stabilnost A-palmitata smo potrdili tudi pri našem raziskovalnem delu (preglednica XXVI). Kljub temu pa pripravek 4 ni bolj stabilen kot pripravek 3.



Slika 8: Vsebnost A-palmitata v pripravkih 3 in 4 pri različnih temperaturnih pogojih



Slika 9: Vsebnost D₃ v pripravkih 3 in 4 pri različnih temperaturnih pogojih

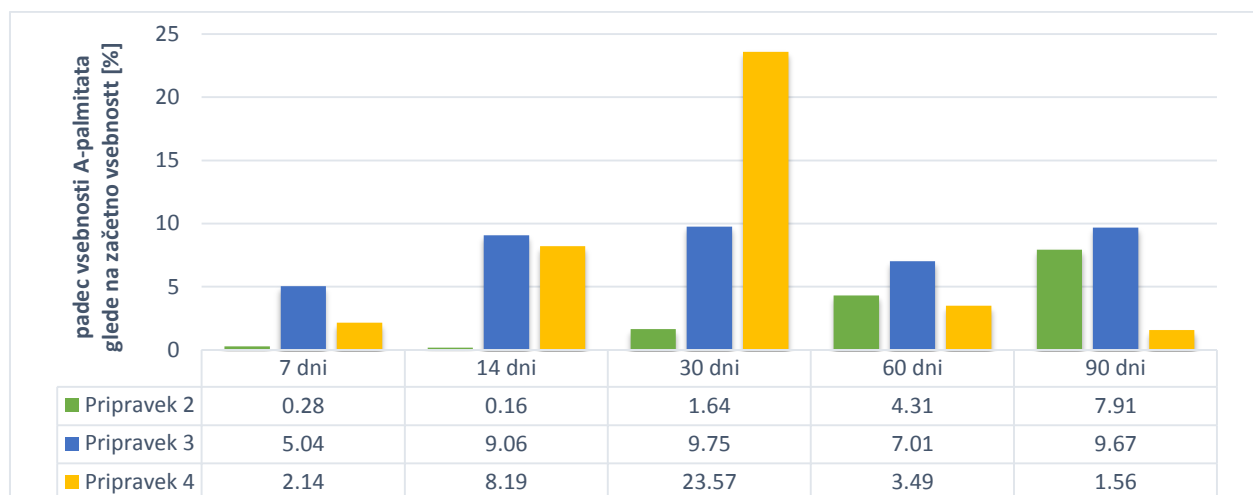


Slika 10: Vsebnost E-acetata v pripravkih 3 in 4 pri različnih temperaturnih pogojih

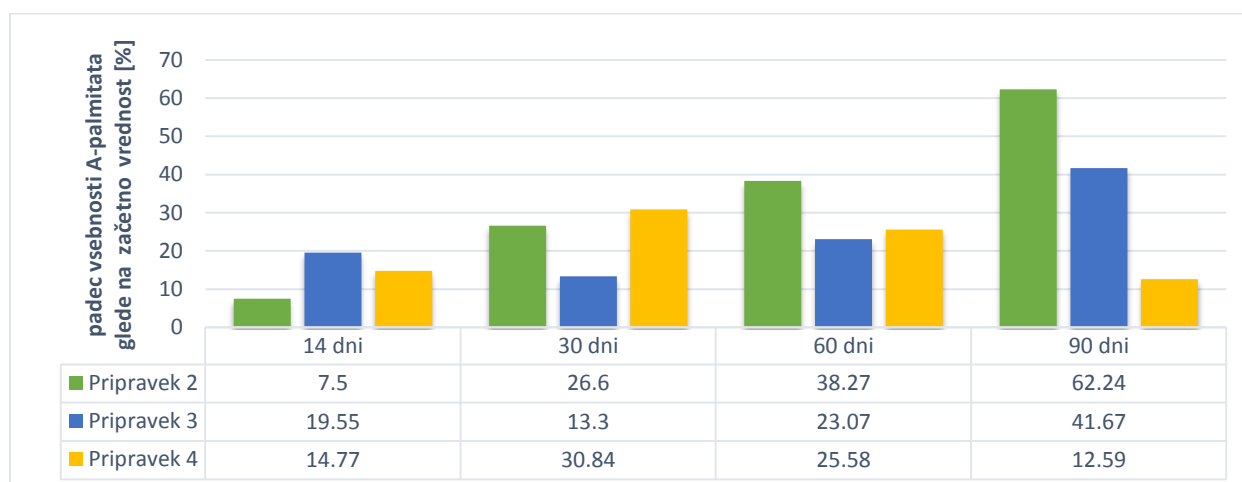
Za boljšo ponazoritev in primerjavo nestabilnosti A-palmitata in D₃ v tekočih pripravkih smo izdelali stolpčne grafikone (slike 11-14). Upad vsebnosti omenjenih vitaminov v tekočih pripravkih lahko primerjamo le do 30 dneva, kasneje zaradi nehomogenosti pripravka 4 to ni več mogoče. Razvidno je, da je pri vseh pripravkih upad vsebnosti A-palmitata hitrejši pri povišani temperaturi. A-palmitat je pri sobni temperaturi najbolj

nestabilen v pripravkih 3 in 4 (slika 11), medtem ko je pri povišani temperaturi nestabilen v vseh pripravkih, najbolj v pripravku 2, kjer vsebnost najhitreje upada (slika 12). Razvidno je, da temperatura shranjevanja nima vpliva na vsebnost D₃ v pripravku 2, medtem ko je pri pripravkih 3 in 4 upad vsebnosti večji pri povišani temperaturi (sliki 13 in 14).

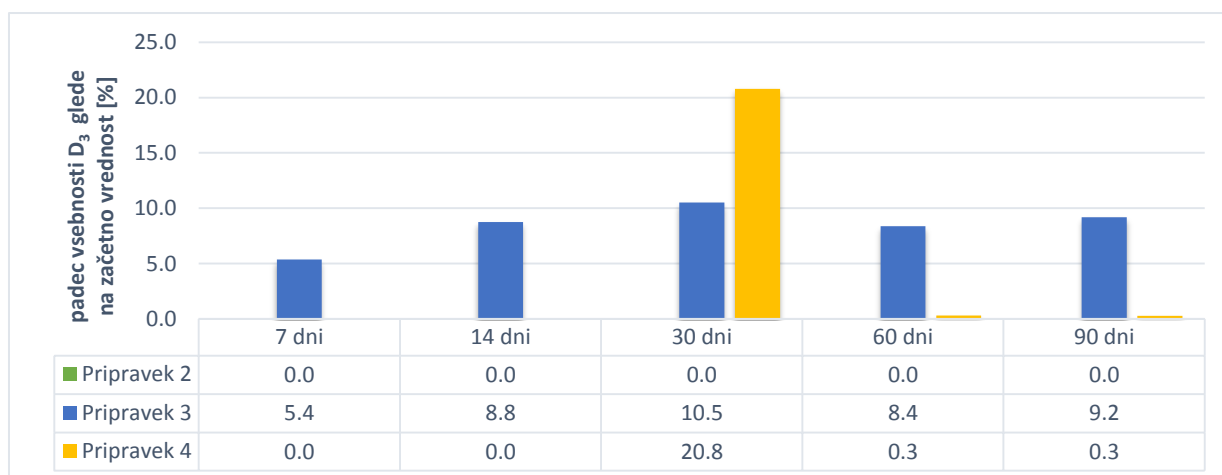
Slike 11-14 dobro prikazujejo, da je pripravek 2 pri sobni temperaturi, ki je hkrati tudi priporočena temperatura shranjevanja omenjenih pripravkov, stabilnejši od pripravkov 3 in 4. Na to kaže že rok uporabnosti, ki je pri pripravku 2 najdaljši – 1 leto (a, nima definiranega roka uporabnosti po odprtju), medtem ko je pri pripravku 3 ta 28 dni po odprtju in pri pripravku 4 en mesec po odprtju.



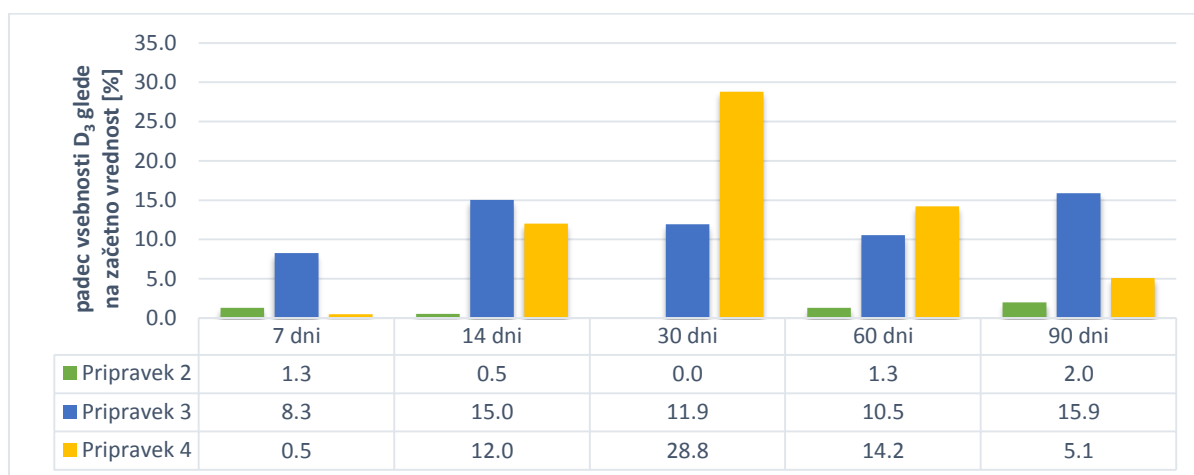
Slika 11: Padec vsebnosti A-palmitata med tekočimi pripravki pri T = 25°C; primerjava med pripravki je smiselna le do 30 dni, saj pozneje pride do fizikalne nestabilnosti pripravka 4



Slika 12: Primerjava padca vsebnosti A-palmitata med tekočimi pripravki pri T = 40°C; primerjava med pripravki je smiselna le do 30 dni, saj pozneje pride do fizikalne nestabilnosti pripravka 4



Slika 13: Primerjava padca vsebnosti D_3 med tekočimi pripravki pri $T = 25^\circ\text{C}$; primerjava med pripravki je smiselna le do 30 dni, saj pozneje pride do fizikalne nestabilnosti pripravka 4

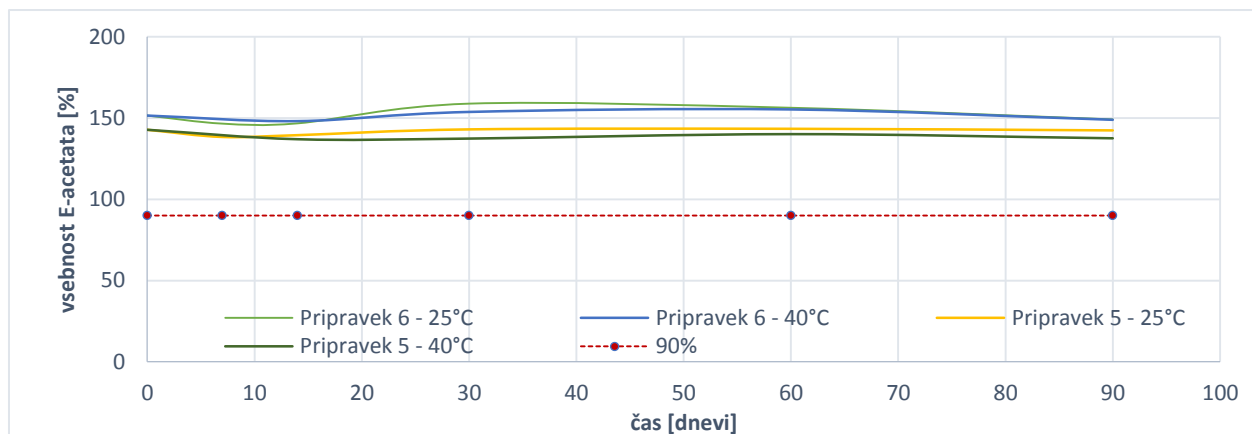


Slika 14: Primerjava padca vsebnosti D_3 med tekočimi pripravki pri $T = 40^\circ\text{C}$; primerjava med pripravki je smiselna le do 30 dni, saj pozneje pride do fizikalne nestabilnosti pripravka 4

4.4.2 Stabilnost lipofilnih vitaminov in CoQ_{10} v mehkih kapsulah

Trdne farmacevtske oblike veljajo za bolj stabilne sisteme v primerjavi s tekočimi. Zato smo pričakovali manjše upade vsebnosti lipofilnih vitaminov in CoQ_{10} v testiranih mehkih kapsulah in tabletah tako pri sobni kot pri povišani temperaturi shranjevanja.

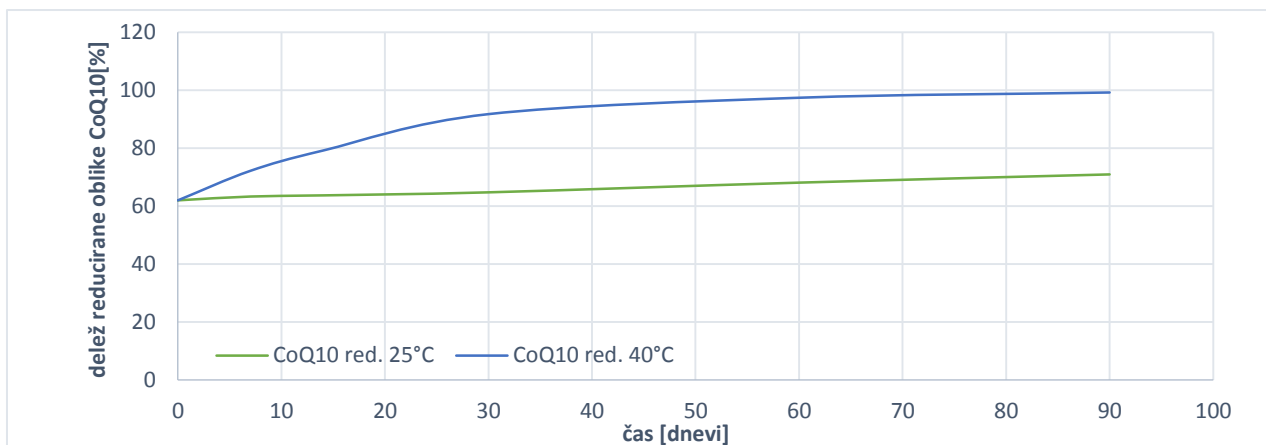
Slika 15 prikazuje spremembo vsebnosti E-acetata v pripravkih 5 in 6 v odvisnosti od časa pri različnih temperaturah shranjevanja. Razvidno je, da temperatura shranjevanja ni bistveno vpliva na upad vsebnosti E-acetata. Pri pripravku 5 je pri povišani temperaturi vsebnost nekoliko nižja – po 14 dnevih je prišlo do upada za 6%, nato pa se ta vrednost ne spreminja več, medtem ko se pri sobni temperaturi vsebnost E-acetata s časom ni spremenila. Pri pripravku 6 pa se vsebnost E-acetata tako pri sobni kot tudi pri povišani temperaturi s časom praktično ni spremenila.



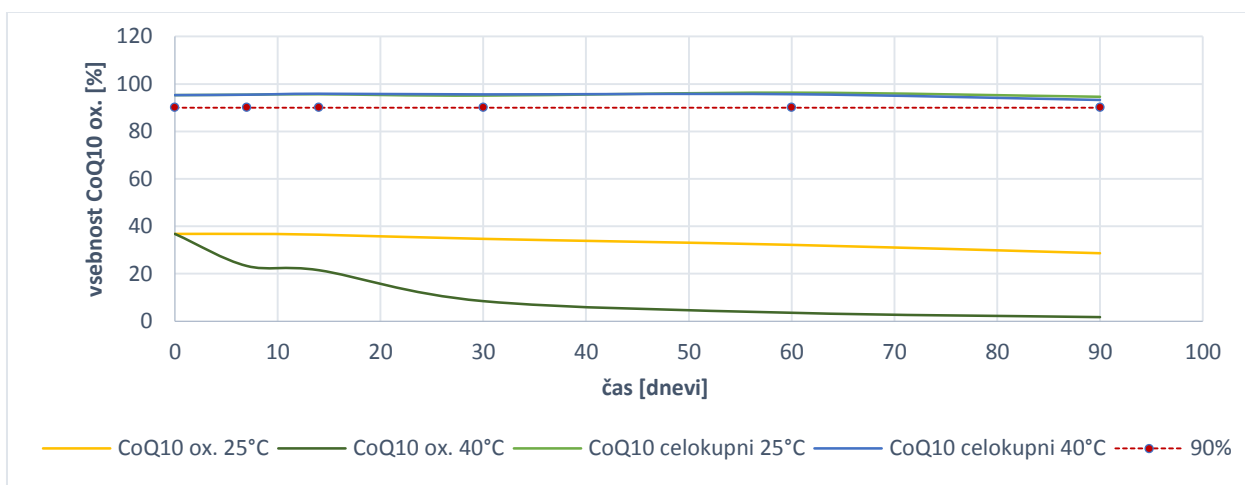
Slika 15: Vsebnost E-acetata v pripravkih 5 in 6 pri različnih temperaturnih pogojih

Sliki 16 in 17 prikazujeta spremembo vsebnosti CoQ₁₀ v pripravku 5 pri različnih pogojih shranjevanja. Pri vrednotenju začetne vsebnosti v pripravku 5 smo ugotovili, da vsebuje CoQ₁₀ v dveh oblikah – reducirani in oksidirani, deklarirano pa ima le oksidirano obliko. Iz slike 16 je razvidno, da se delež reducirane oblike CoQ₁₀ s časom povečuje, tako pri sobni kot pri povišani temperaturi. Razvidno je, da višja temperatura bistveno pospeši redukcijo ubikinona (CoQ₁₀ oks.) v ubikinol (CoQ₁₀ red.), saj je delež CoQ₁₀ red. že po enem mesecu izpostavljenosti povišani temperaturi skoraj 100%, medtem ko je pri sobni temperaturi delež CoQ₁₀ red. po 3 mesecih 71% (slika 16). Posledično je vpliv temperature viden tudi pri padcu vsebnosti CoQ₁₀ oks., saj s povečevanjem deleža CoQ₁₀ red. pada delež CoQ₁₀ oks. (slika 17). Vzrok za nastanek CoQ₁₀ red. je reakcija med CoQ₁₀ oks. in askorbinsko kislino, ki jo vsebuje pripravek 5. Askorbinska kislina namreč reducira CoQ₁₀ oks. v CoQ₁₀ red., sama pa se pretvori v dehidroaskorbinsko kislino (slika 18). Nekompatibilnost CoQ₁₀ oks. in askorbinske kisline v mehkih želatinskih kapsulah je bila že predhodno dokazana (87,88).

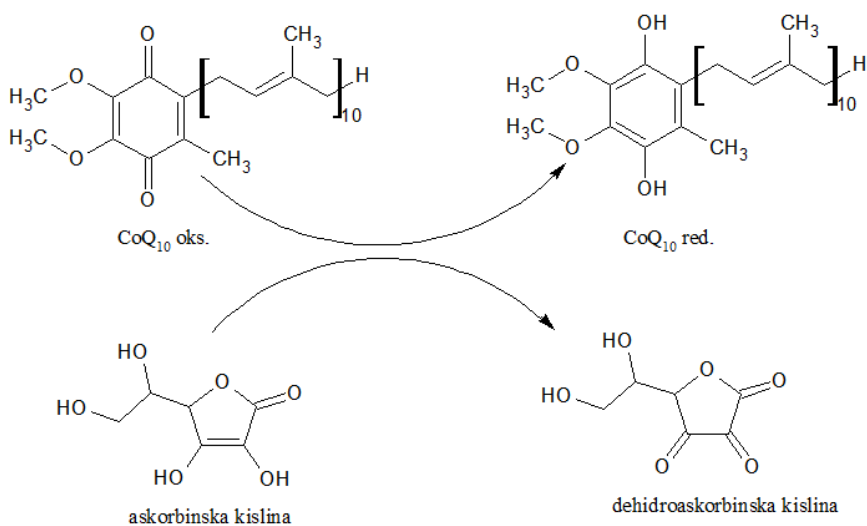
Iz slike 17 je razvidno, da temperatura shranjevanja ne vpliva na vsebnost celokupnega CoQ₁₀ (oks. + red.). Celokupni CoQ₁₀ smo določili tako, da smo vzorcem dodali železo, ki pretvori reducirano obliko v oksidirano obliko in tako smo določili le eno obliko CoQ₁₀ (3.3.4.2). Gledano na celokupno vsebnost CoQ₁₀, je ta stabilen tako pri sobni kot tudi pri povišani temperaturi, saj do upada vsebnosti ni prišlo. Če pa gledamo na posamezno obliko CoQ₁₀ lahko potrdimo, da je oksidirano oblika nestabilna (slika 17).



Slika 16: Delež reducirane oblike CoQ₁₀ v pripravku 5 pri različnih temperaturnih pogojih

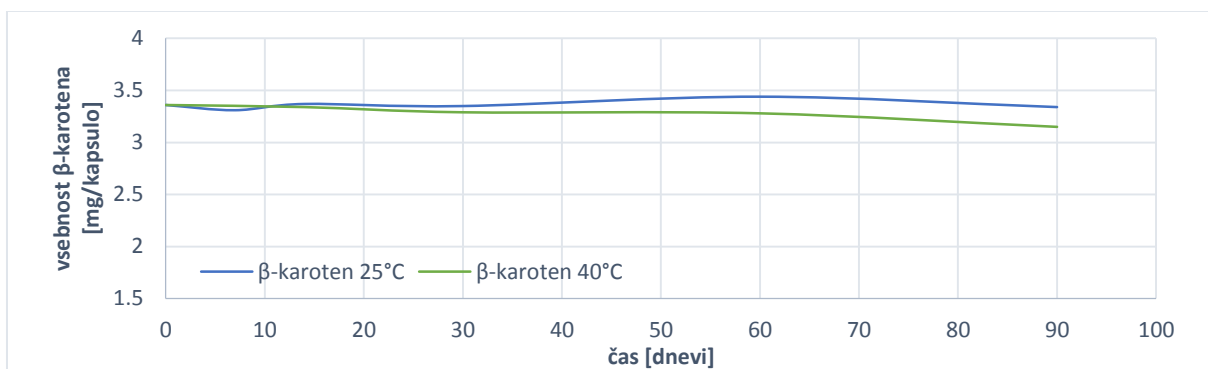


Slika 17: Vsebnost oksidirane oblike CoQ₁₀ in celokupnega CoQ₁₀ v pripravku 5 pri različni temperaturnih pogojih

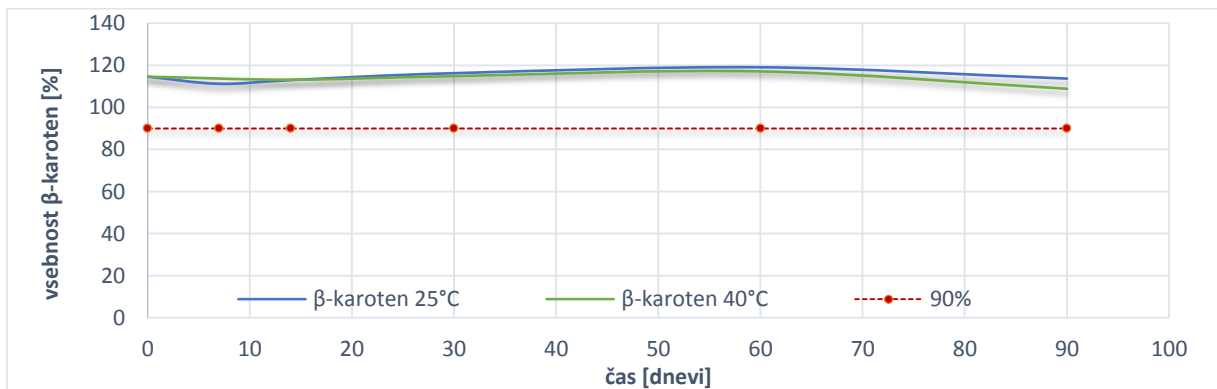


Slika 18: Reakcija med CoQ₁₀ oks. in askorbinsko kislino

Sliki 19 in 20 prikazujeta spremembo vsebnosti β -karotena v odvisnosti od časa pri različnih temperatura shranjevanja v pripravkih 5 in 6. Za razliko od ostalih grafov je vsebnost β -karotena v pripravku 5 podana v mg/kapsulo, saj njegova vsebnost ni deklarirana, proizvajalec ga namreč uporablja kot pomožno snov (slika 19). Iz slik vidimo, da se vsebnost β -karotena s časom v pripravkih 5 in 6 shranjenih pri sobni temperaturi ne spreminja, medtem ko pri povišani temperaturi vsebnost zelo počasi pada. Glede na to, da smo že pri referenčnem standardu β -karotena odkrili, da je ta nestabilen, smo pri povišani temperaturi pričakovali večji upad vsebnosti. Vendar pa pripravka 5 in 6 vsebujeta še antioksidante (npr. askorbinsko kislino), ki verjetno dodatno stabilizirajo β -karoten.

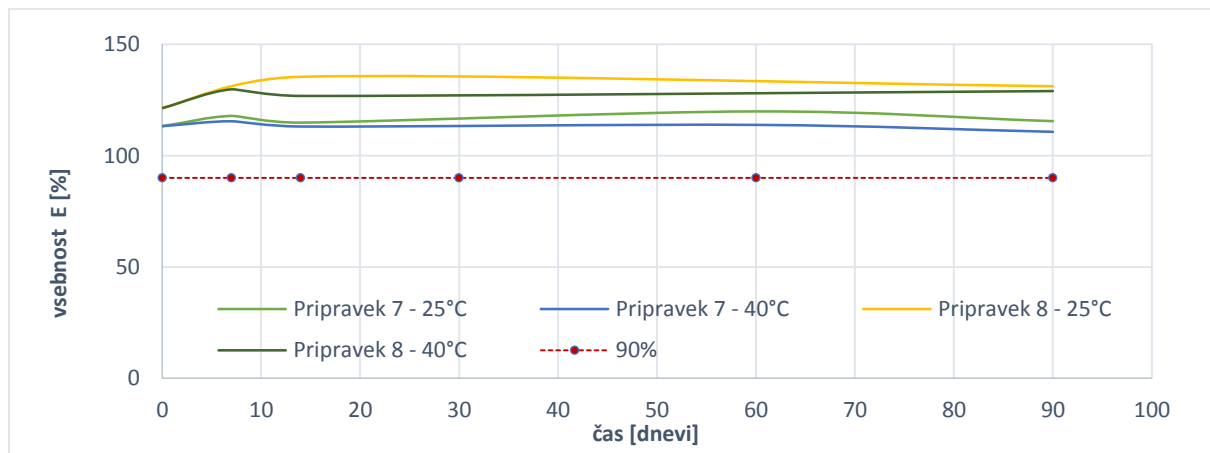


Slika 19: Vsebnost β -karotena v pripravku 5 pri različni temperaturnih pogojih; vsebnost β -karotena v pripravku ni deklarirana, zato je podana v mg



Slika 20: Vsebnost β -karotena v pripravku 6 pri različni temperaturnih pogojih

Slika 21 prikazuje spremembo vsebnosti E v odvisnosti od časa pri različnih temperaturah shranjevanja pri pripravkih 7 in 8, ki vsebujeta le vitamin E. Iz slike je razvidno, da temperatura shranjevanja ne vpliva na vsebnost E v pripravku 8, medtem ko le-ta v pripravku 7 pri povišani temperaturi počasi upada.

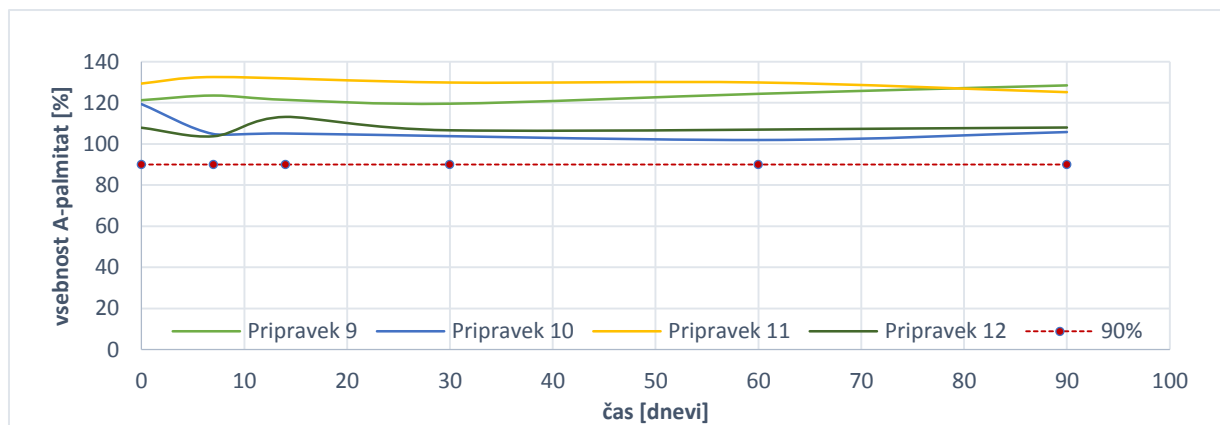


Slika 21: Vsebnost E v pripravkih 7 in 8 pri različnih temperaturnih pogojih

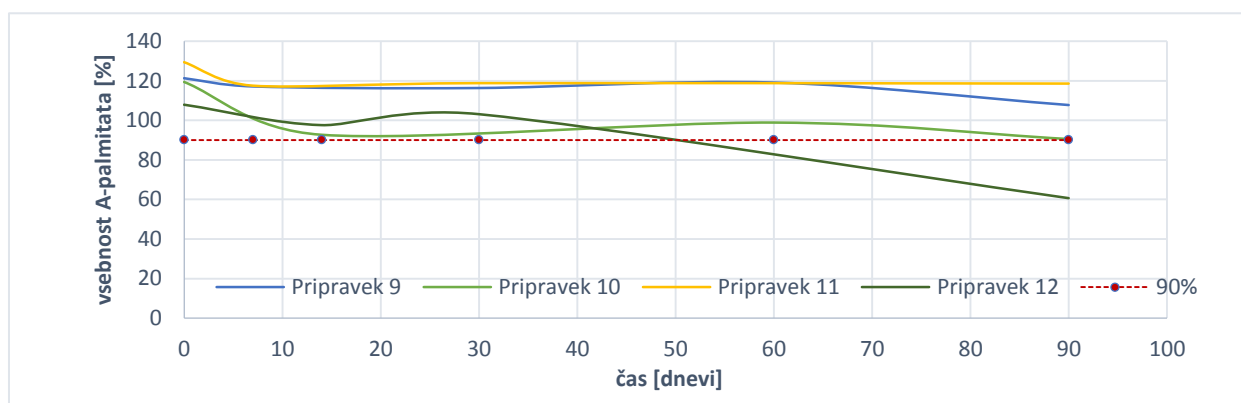
Rezultati stabilnosti lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ v mehkih kapsulah so skladni s pričakovanji, saj trdne farmacevtske oblike veljajo za bolj stabilne v primerjavi s tekočimi. Prišli smo do zaključka, da so vse testirane mehke kapsule stabilne tako pri sobni kot pri povišani temperaturi, saj pri nobenem pripravku ni prišlo do večjega upada vsebnosti lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ (gledano celokupno).

4.4.3 Stabilnost lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ v tabletah

Sliki 22 in 23 prikazujeta stabilnost A-palmitata v preučevanih tabletah. Iz slike 22 je razvidno, da se vsebnost A-palmitata v pripravkih 9, 10, 11 in 12 shranjenih pri sobni temperaturi ni bistveno spreminjala. Pri povišani temperaturi se je vsebnosti A-palmitata pri vseh pripravkih znižala. Največji upad vsebnosti A-palmitata je opazen pri pripravku 12 (po 3 mesecih 47%). Pri pripravkih 10 in 11 je takoj po izpostavljenosti povišani temperaturi prišlo do večjega upada (10 – 29%, 11 – 12%), kasneje pa se vsebnost ni več bistveno spreminjala. Pri pripravku 9 pa se je vsebnost A-palmitata s časom počasi zmanjševala (po 3 mesecih 14%).

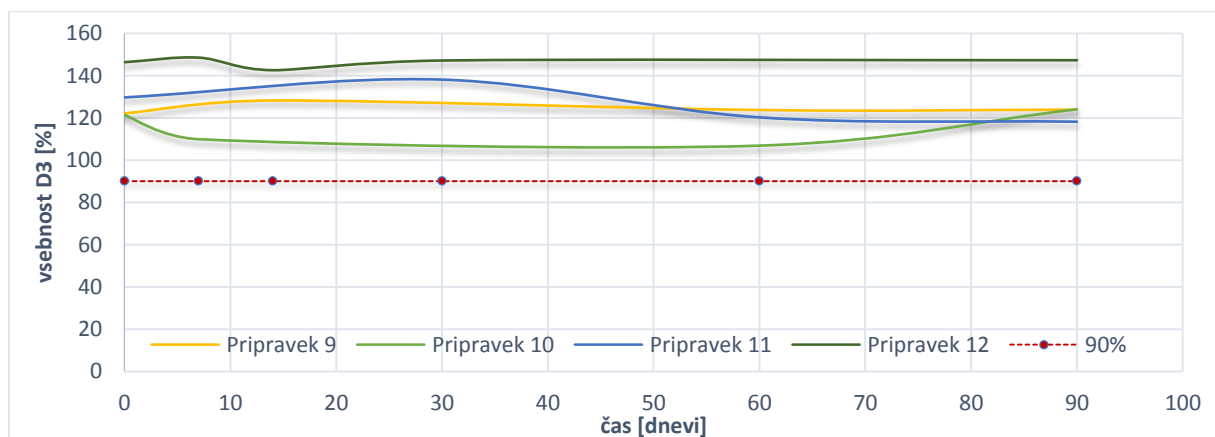


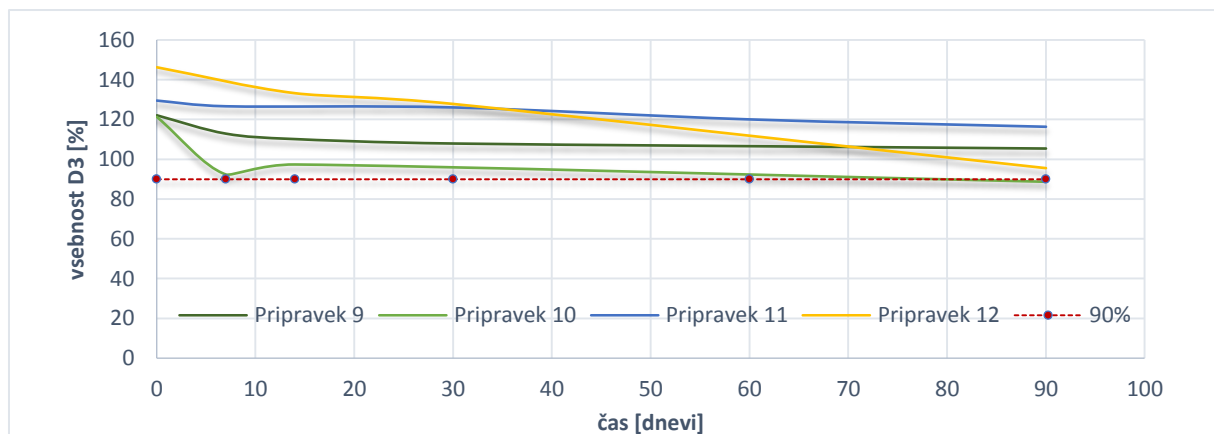
Slika 22: Vsebnost A-palmitata v izbranih tabletah pri T = 25°C



Slika 23: Vsebnost A-palmitata v izbranih tabletah pri T = 40°C

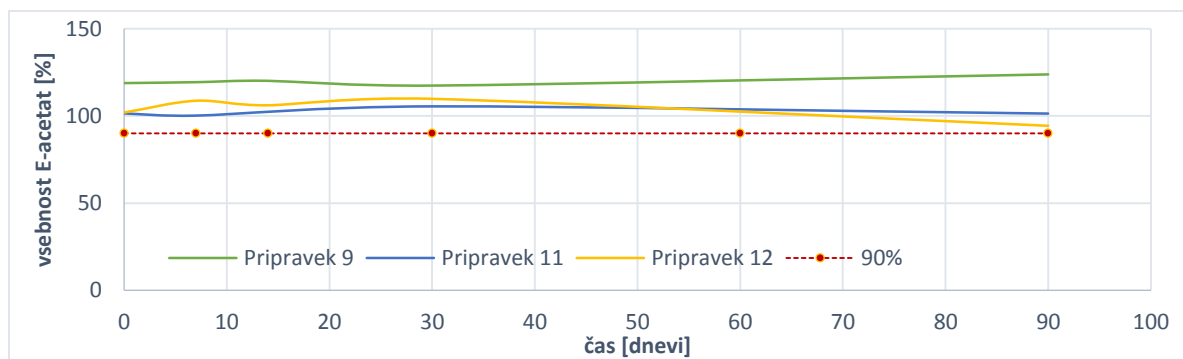
Sliki 24 in 25 prikazujeta spremembo vsebnosti D₃ v preučevanih tabletah v odvisnosti od časa pri različnih temperaturah shranjevanja. Pri sobni temperaturi se vsebnost D₃ v pripravkih 9, 10, 11 in 12 bistveno ni spreminjala. Vsebnosti D₃ v nekaterih pripravkih (9, 10 in 11) so sicer nekoliko nihale, vendar je to lahko posledica neenakomernosti vsebnost tablet in/ali morebitne napake pri samem analiznem postopku (slika 24). Pri povišani temperaturi D₃ s časom pri vseh pripravkih pada (slika 25). Največji upad smo opazili pri pripravku 12 (po 3 mesecih 51%).

Slika 24: Vsebnost D₃ v izbranih tabletah pri T = 25°C

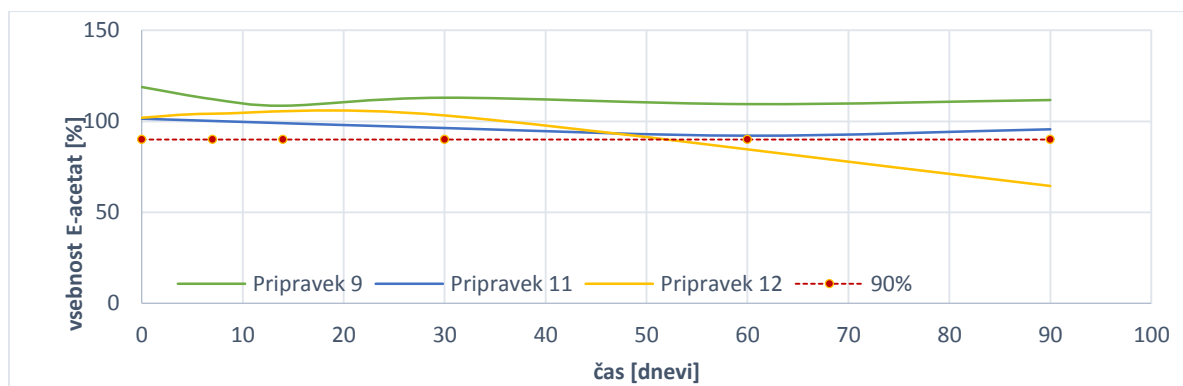


Slika 25: Vsebnost D₃ v izbranih tabletah pri T = 40°C

Sliki 26 in 27 prikazujeta stabilnost E-acetata v testiranih tabletah. Pri sobni temperaturi se vsebnost E-acetata v pripravkih 9 in 11 ni spreminjala, medtem ko je pri pripravku 12 po 3 mesecih prišlo do upada vsebnosti za 19% (slika 26). Pri povišani temperaturi je vsebnost E-acetata s časom v pripravkih 9 in 11 malenkost padala, pri pripravku 12 pa je bil upad velik (po 3 mesecih 38%), kar je razvidno iz slike 27. Zaključimo lahko, da je E-acetat stabilen tako pri sobni kot pri povišani temperaturi v pripravkih 9 in 11 (obe zdravili), medtem ko je v pripravku 12 (prehransko dopolnilo) nestabilen pri obeh temperaturah shranjevanja.

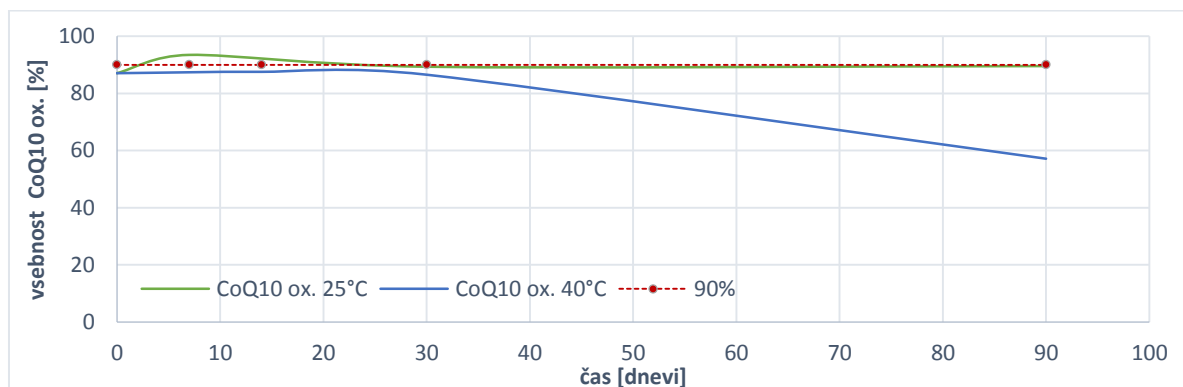


Slika 26: Vsebnost E-acetata v izbranih tabletah pri T = 25°C



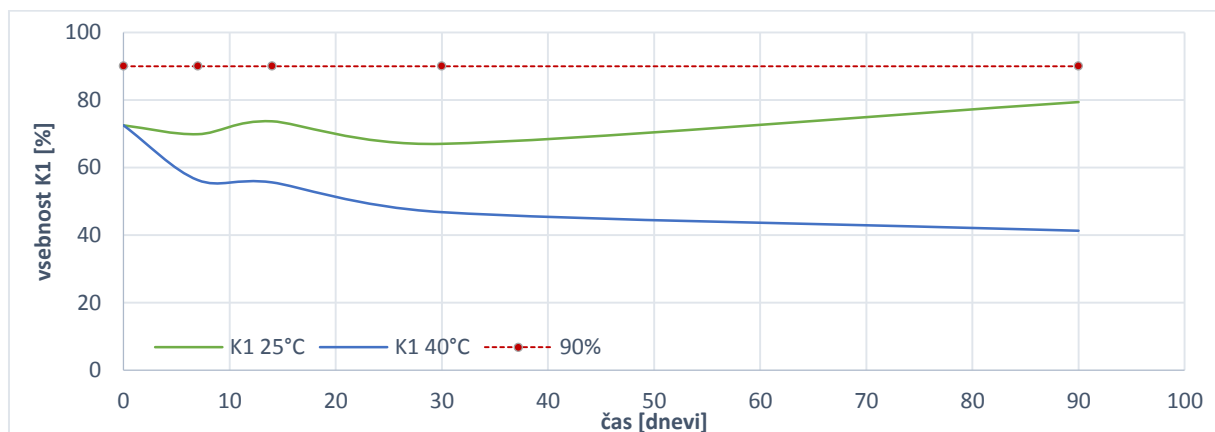
Slika 27: Vsebnost E-acetata v izbranih tabletah pri T = 40°C

Slika 28 prikazuje upad vsebnosti oksidirane oblike CoQ₁₀ v pripravku 12 pri različnih temperaturah shranjevanja. Razvidno je, da je temperatura shranjevanja vplivala na vsebnost CoQ₁₀ oks., in sicer je pri povišani temperaturi prišlo do večjega upada vsebnosti (po 3 mesecih 30%). Pripravek 12 vsebuje poleg lipofilnih vitaminov še vodotopne vitamine, med njimi tudi askorbinsko kislino. Že pri mehkih kapsulah smo ugotovili, da askorbinska kislina reducira CoQ₁₀. Ta reakcija hitreje poteka pri povišani temperaturi, kar razvidno tudi pri pripravku 12.



Slika 28: Vsebnost CoQ10 oks. v pripravku 12 pri različnih temperaturnih pogojih

Iz slike 29 je razvidno, da je temperatura shranjevanja bistveno vplivala na vsebnost K₁ v pripravku 12, saj pri sobni temperaturi ni prišlo do padca vsebnosti, medtem ko pri povišani temperaturi vsebnost K₁ je s časom občutno padla (po 3 mesecih 31%).



Slika 29: Vsebnost K₁ v pripravku 12 pri različnih temperaturnih pogojih

Pri vseh izbranih tabletah je temperatura shranjevanja vplivala na upad vsebnosti lipofilnih vitaminov, in sicer je pri povišani temperaturi prišlo do upada vsebnosti vseh lipofilnih vitaminov pri vseh pripravkih, medtem ko so pri sobni temperaturi vsebnosti ostale podobne začetni (izjema je E-acetat v pripravku 12 po treh mesecih). Pričakovali smo, da pri sobni temperaturi po treh mesecih ne bo prišlo do bistvenih sprememb v vsebnosti lipofilnih vitaminov, saj imajo vse preučevane tablete relativno dolge roke uporabnosti –

pripravka 9 in 10 tri leta, pripravka 11 in 12 pa dve leti. Daljši roki uporabnosti nakazujejo visoko stabilnost lipofilnih vitaminov v omenjenih pripravkih. Glede na upad vsebnosti lipofilnih vitaminov pri povišani temperaturi se je za najbolj nestabilnega izkazal pripravek 12, saj je prišlo do značilnega upada koncentracije (pod mejo 90%) vseh lipofilnih vitaminov in oksidirane oblike CoQ₁₀. Pri povišani temperaturi se je v vseh izbranih tabletah za najbolj nestabilnega izkazal D₃, sledi pa A-palmitat. Ker pa je v vseh testiranih tabletah količinsko najmanj D₃, je ta rezultat tudi do neke mere pričakovan. Do najmanjšega upada vsebnosti je prišlo pri E-acetatu, zato lahko rečemo, da je pri povišani temperaturi v tabletah E-acetat najbolj stabilen.

5 SKLEPI

- Optimizirali smo hitro HPLC-UV metodo za vrednotenje lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀:
 - ustrezno ločbo smo dosegli s kolono Luna C18 150×4,6 mm, 5 μm, mobilno fazo ACN:THF:MQ = 50:45:5 (v/v/v) s pretokom 1 mL/min in valovno dolžino detekcije 270 nm;
 - metoda omogoča hitro sočasno vrednotenje petih lipofilnih vitaminov (v oblikah, ki se najpogosteje pojavljajo v vitaminskih pripravkih – A-palmitat, D₃, K₁, E-acetat in A provitamin – β-karoten) in CoQ₁₀ (v oksidirani in reducirani obliki) v zgolj 8 minutah;
 - metodo smo ovrednotili v skladu z ICH smernicami in dokazali, da je selektivna, robustna, linearna v koncentracijskem območju 1,2-600 mg/L za A-palmitat, 0,80-400 mg/L za CoQ₁₀ oks., 0,25-50 mg/L za D₃, 2,6-2600 mg/L za E-acetat, 0,30-150 mg/L za K₁ in 0,12-60 mg/L za β-karoten ter daje točne in ponovljive rezultate;
 - pri testiranju stabilnosti kontrolnih vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku smo ugotovili, da dva vitamina nista stabilna (A-palmitat in β-karoten), zato sta bila stabilizirana z antioksidantom BHT. Po dodatku stabilizatorja smo dosegli vsaj 24-urno stabilnost vseh analitov;
- Razvili in optimizirali smo enostavne ekstrakcijske postopke:
 - tekoče pripravke smo ustrezno redčili z mobilno fazo ACN:THF:MQ = 50:45:5 (v/v/v), kateri smo dodali BHT;
 - za mehke kapsule in tablete (te predhodne razpadle po dodatku 0,1% H₃PO₄) ekstrakcija z n-heksanom in naknadnim sušenjem vzorca s prepihanjem z dušikom pri 40°C;
 - pri vseh postopkih smo dosegli visoke izkoristke ekstrakcije vseh analitov iz pripravkov (93-108%) in ponovljivost (RSD ≤ 8%).
- Razvita metoda je primerna za sočasno vrednotenje lipofilnih vitaminov in CoQ₁₀ v standardnih raztopinah ter tekočih in trdnih farmacevtskih pripravkih:
 - metoda je primerna za rutinsko analizo in nadzor kakovosti vitaminskih pripravkov;
 - v strokovni literaturi nismo zasledili HPLC-UV metode, ki bi omogočala sočasno vrednotenje izbranih lipofilnih vitaminov in obeh oblik CoQ₁₀.
- Primernost analizne metode smo potrdili z analizo 12 pripravkov, ki so vsebovali lipofilne vitamine in CoQ₁₀:

- pri dveh pripravkih smo ugotovili neskladnost z deklarirano obliko učinkovine;
- pri večini testiranih pripravkov smo ugotovili višje vsebnosti lipofilnih vitaminov od deklariranih;
- največje odstopanje od deklariranih vsebnosti smo ugotovili pri dveh prehranskih dopolnilih (tudi do 150%);
- glede na to, da so vsebnosti analitov v testiranih pripravkih višje od deklariranih, je kontrola kakovosti vitaminskih pripravkov zelo pomembna.
- Z izvedeno trimesečno stabilnostno študijo pri 25°C in 40°C smo prišli do naslednjih zaključkov:
 - pri višji temperaturi shranjevanja so lipofilni vitamini bolj nestabilni;
 - največji upad vsebnosti je bil pri 25°C in 40°C opazen pri tekočih pripravkih; prisotnost askorbinske kisline v enem izmed testiranih tekočih pripravkov nima vpliva na stabilizacijo lipofilnih vitaminov;
 - lipofilni vitamini in CoQ₁₀ (gledano celokupno) so v testiranih mehkih kapsulah stabilni pri obeh temperaturah; značilen je le vpliv višje temperature shranjevanja na oksidirano obliko CoQ₁₀, kjer se ta že po enem mesecu ob sočasno prisotni askorbinski kislini, popolnoma pretvori v reducirano obliko;
 - pri tabletah je pri povišani temperaturi prišlo do upada vsebnosti vseh lipofilnih vitaminov pri vseh pripravkih. Pri vseh testiranih pripravkih tablet se je za najbolj nestabilnega izkazal D₃, sledi pa je A-palmitat. Pri sobni temperaturi so vitamini obstojni, izjema je le oksidirana oblika CoQ₁₀.

6 LITERATURA

- 1) Kucukkolbasi S., Ires N., Kara H.: Development of method to simultaneous determination of some water and fat soluble vitamins in feeding additives. *JOSUNAS* 2001, 30-47.
- 2) Albahrani A A, Greaves R F.: Fat-soluble vitamins: Clinical indications and current challenges for chromatographic measurement. *Clin Biochem Rev*, 37 (1), 2016, 27-47.
- 3) Medić-Šarić M., Buhač I, Bradamante V.: Vitamini in minerali: resnice in predsodki, In *obs medicus*, Ptuj, 2002: 5-68.
- 4) Zakon o zdravilih (ZZdr-2), 2014, Uradni list RS, št. 17/14.
- 5) Pravilnik o prehranskih dopolnilih, 2013, Uradni list RS, št. 66/2013.
- 6) Republika Slovenija – Ministrstvo za zdravje, 2014: Napotki glede področja prehranskih dopolnil v Republiki Sloveniji in skladnost tovrstnih izdelkov z veljavno zakonodajo. (internet) Dostopno na: http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/javno_zdravje_2014/Napotki_PD_DEC_2014m_ojca_triler.pdf (dostopno junij 2016).
- 7) Heudi O., Trisconi MJ., Blake CJ.: Simultaneous quantification of vitamins A, D₃ and E in fortified infant formule by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1022, 2044, 115-123.
- 8) Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije, 2013: Referenčne vrednosti za vnos vitaminov in mineralov – tabelarična priporočila za otroke, mladostnike, odrasle in starejše. (internet) Dostopno na: http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/referencne_vrednosti_za_vnos.pdf (dostopno junij 2016).
- 9) Blaner WS.: The fat-soluble vitamins 100 years later: where are we now?. *JLR*, 54, 2013, 1716-1718.
- 10) Bushue N., Wan YY.: Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*, 62, 2010, 1285-1298.
- 11) Combs GF.: Poglavlje 3: Chemical and Physiological Properties of the Vitamins (Vitamin A). V: Combs GF. *The Vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. 3. izd. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2008: 42-4.
- 12) Furr HC., McGrane MM.: Retinol: physiology. V: *Encyclopaedia of Food Science, Food Tecnology and Nutrition*. New York: Academic Press, 2004: 4957-67.
- 13) Ball G.F.M.: Poglavlje 7: Vitamin A: Retinoids and Carotenoids. V: Ball G.F.M. *Vitamins: Their Role in the Human Body*. 1. izd. London: Blackwell Publishing, 2004: 133-80.
- 14) Eitenmiller RR., Ye L., Landen WOJ.: Section I: Fat-soluble vitamins. V: Eitenmiller RR, Ye L, Landen WOJ. *Vitamin analysis for the health and food sciences*. 2. izd. New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008: 3-218.
- 15) Jedlička A., Klimeš J.: Determination of Water- and Fat-soluble Vitamins in Different Matrices Using High-Performance Liquid Chromatography. *Chem Pap.*, 59 (3), 2005, 202-222.
- 16) Combs GF.: Poglavlje 5: Vitamin A. V: Combs GF. *The Vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. 3. izd. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2008: 95-141.
- 17) Thurnham DL.: Vitamin A and carotenoids. V: Mann J, Truswell AS, urednika. *Essentials of human nutrition*. 4. izd. New York: Oxford University Press, 2012; 197-215.
- 18) Povzetek glavnih značilnosti zdravila: ELEVIT PRONATAL filmsko obložene tablete. (internet) Dostopno na: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/9010D0F4BF94DB7CC12579C2003F6334/\\$File/s-015681.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/9010D0F4BF94DB7CC12579C2003F6334/$File/s-015681.pdf) (dostopno maj 2016).
- 19) Ball G.F.M.: Poglavlje 8: Vitamin D. V: Ball G.F.M. *Vitamins: Their Role in the Human Body*. 1. izd. London: Blackwell Publishing, 2004: 188-224.
- 20) Marš T.: Motnje v presnovi kalcija in fosfatov. V: Ribarič S, urednik. *Seminarji iz patološke fiziologije*. 2. izd. Ljubljana: UL MF, Inštitut za patološko fiziologijo, 2012: 85-7.
- 21) Combs GF.: Poglavlje 3: Chemical and physiological Properties of the Vitamins (Vitamin D). V: Combs GF. *The Vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. 3. izd. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2008: 45-7.
- 22) Combs GF.: Poglavlje 6: Vitamin D. V: Combs GF. *The Vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. 3. izd. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2008: 145-177.
- 23) Norman A.W., Nery H.L.; Poglavlje 2 – Vitamin D. V: Zempleni J, Rucker R. B, McCormick D.B, Suttie J. W, uredniki. *Handbook of VITAMINS*. 4. izd. New York: Taylor & Francis Group, 2007: 41-110.
- 24) Nair R, Maseeh A: Vitamin D: The "sunshine" vitamin. *J Pharmacol Pharmacother*, 3, 2012, 118-26.
- 25) Povzetek glavnih značilnost zdravila: Plivit ® D3 4000 i.e./ml peroralne kapljice, raztopina. (internet) Dostopno na: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/0D3BCCFA3742330EC12579C2003F57EE/\\$File/s-010123.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/0D3BCCFA3742330EC12579C2003F57EE/$File/s-010123.pdf) (dostopno junij 2016).
- 26) Combs GF.: Poglavlje 3: Chemical and physiological Properties of the Vitamins (Vitamin E). V: Combs GF. *The Vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. 3. izd. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2008: 47-9.

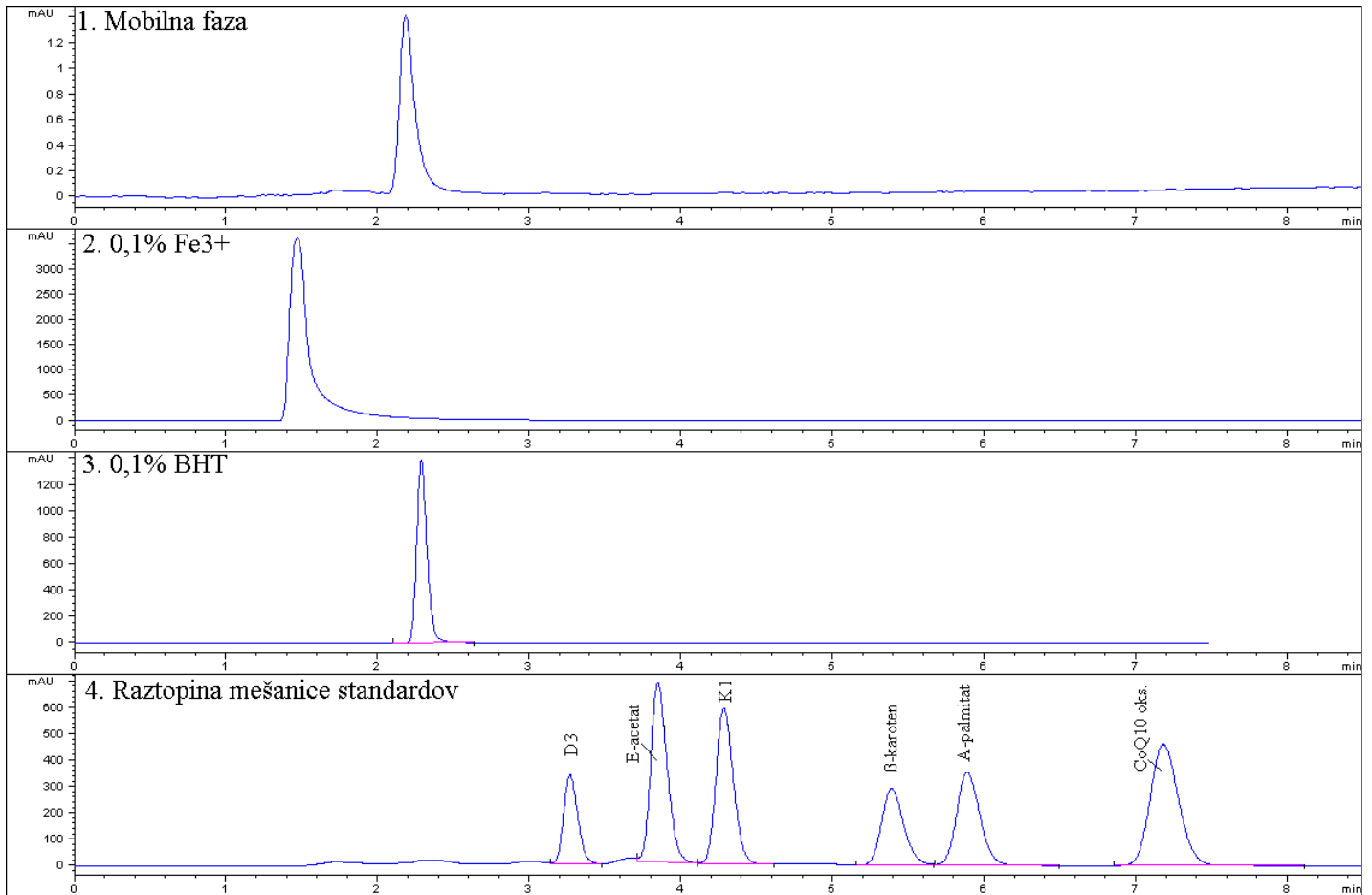
- 27) Truswell S., Mann J.: Vitamin C and E. V: Mann J, Truswell AS, urednika. Essentials of human nutrition. 4. izd. New York: Oxford University Press, 2012; 242–5.
- 28) Ruperez F. J., Martin D., Herrera E., Barbas C.: Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices. *J. Chromatogr. A*, 935, 2001, 45-69.
- 29) Wollard D. C., Indyk H. E.: Tocopherols: Properties and Determination. V: Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. New York: Academic Press, 2004: 5789-95.
- 30) Nemško prehransko društvo (DGE): Referenčne vrednosti za vnos hranil. Ljubljana: Ministrstvo za zdravje, 2004.
- 31) Ball G.F.M.: Poglavlje 9: Vitamin E. V: Ball G.F.M. Vitamins: Their Role in the Human Body. 1. izd. London: Blackwell Publishing, 2004: 234-52.
- 32) Combs GF.: Poglavlje 7: Vitamin E. V: Combs GF. The Vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. 3. izd. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2008: 181-211.
- 33) Zingg J. M., Azzi A.: Non-Antioxidant Activities of Vitamin E. *Curr. Med. Chem.*, 11, 2004, 1113-1133.
- 34) Burton G. W.: Vitamin E: molecular and biological function. *Proc Nutr Soc.*, 53, 1994, 251-62.
- 35) Niki E.: Evidence for beneficial effects of vitamin E. *Korean J Intern Med*, 30, 2015, 571-9.
- 36) Combs GF.: Poglavlje 3: Chemical and physiological Properties of the Vitamins (Vitamin K). V: Combs GF. The Vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. 3. izd. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2008: 49-50.
- 37) Shea M. K., Booth S. L.: Role of vitamin K in regulation of calcification. *Int Congr Ser*, 1297, 2007, 165-78.
- 38) Combs GF.: Poglavlje 8: Vitamin K. V: Combs GF. The Vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. 3. izd. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2008: 213-32.
- 39) Ball G.F.M.: Poglavlje 10: Vitamin K. V: Ball G.F.M. Vitamins: Their Role in the Human Body. 1. izd. London: Blackwell Publishing, 2004: 256-68.
- 40) Žmitek J., Žmitek K.: Koencim Q10 kot prehransko dopolnilo in zdravilo. *Farm Vestn*, 60, 2009, 150-7.
- 41) Sweetman S. C.: Part 2: Supplementary drugs and other substances. V: Sweetman S. C, urednik. Martindale: the complete drug reference. 34. izd. London, Chicago: Pharmaceutical Press; 2005. str. 1760.
- 42) Lu W. L., Zhang Q., Lee H. S., Zhou T. Y., Sun H. D., Zhang D. W., Zheng L., Lee M., Wong S. M.: Total Coenzyme Q₁₀ Concentrations in Asian Men Following Multiple Oral 50-mg Doses Administered as Coenzyme Q₁₀ Sustained Release Tablets or Regular Tablets. *Biol. Pharm. Bull.*, 26, 2003, 52-5.
- 43) Breithaupt D. E., Kraut S.: Simultaneous determination of the vitamins A, E, their esters and coenzyme Q₁₀ in multivitamin dietary supplements using an RP-C30 phase. *Eur Food Res Technol*, 222, 2006, 643-9.
- 44) Kommuru T. R., Ashraf M., Khan M. A., Reddy I. K.: Stability and Bioequivalence Studies of Two Marketed Formulations Of Coenzyme Q₁₀ in Beagle Dogs. *Chem. Pharm. Bull.*, 47, 1999, 1024-8.
- 45) Abdel-Kader M. S., Alam P., Alqasoumi S. I.: Densitometric HPTLC method for qualitative, quantitative analysis and stability study of coenzyme Q10 in Pharmaceutical formulations utilizing normal and reversed-phase silica gel plates. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 29, 2016, 477-84.
- 46) NIJZ. Ocena tveganja za zdravje ljudi v povezavi z uživanjem prehranskih dopolnil, ki vsebujejo več kot 50mg koencima Q10 v dnevnem odmerku. (internet) Dostopno na: http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/q10-mzirs_2015_03_splet_0.pdf (dostopno december 2016).
- 47) Rus P., Rus R. R.: Koencim Q10. *Zdrav Vestn*, 47, 2008, 89-98.
- 48) Michalkiewicz S.: Voltammetric determination of coenzyme Q₁₀ in pharmaceutical dosage forms. *Bioelectrochemistry*, 73, 2008, 30-6.
- 49) Pavlin R.: Koencim Q10 – klinična raba. *Zdrav Vestn*, 77, 2008, 159-62.
- 50) Eitenmiller RR., Ye L., Landen WOJ.: Section II – poglavje 14: Multianalyte methods for analysis of the fat- and water-soluble vitamins. V: Eitenmiller RR, Ye L, Landen WOJ. Vitamin analysis for the health and food sciences. 2. izd. New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008: 583-603.
- 51) Mailvelan, Mounnissamy V. M, Selvamani P., Rajesh J., Raviraj T.: Development and validation of UV Spectrophotometric methods for simultaneous determination of ubiquinol (coenzyme Q-10) and clomifene citrate in bulk and tablet dosage forms. *AJRCPS*, 1, 2013, 23-30.
- 52) Argal R., Pokharna S., Agrawal R.: Volumetric Method for Determination of Coenzyme Q10 in Pharmaceutical Samples with Ascorbic Acid. *J Chem & Chem Sci*, 1, 2010, 21-8.
- 53) Bunaciu A. A., Aboul-Enein H. Y., Fleschin S.: FT-IR spectrophotometric analysis of coenzyme Q10 (CoQ10) and its pharmaceutical formulations. *Prep Biochem Biotechnol*, 37, 2007, 59-65.
- 54) Monakhova Y. B., Ruge I., Kuballa T., Lerch C., Lachenmeier D. W.: Rapid determination of coenzyme Q10 in food supplements using 1H NMR spectroscopy. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 83, 2013, 67-72.
- 55) European Pharmacopoeia, Volume 2. 5. izd. Strasbourg: Council of Europe, 2004: 1272-1277, 2595-

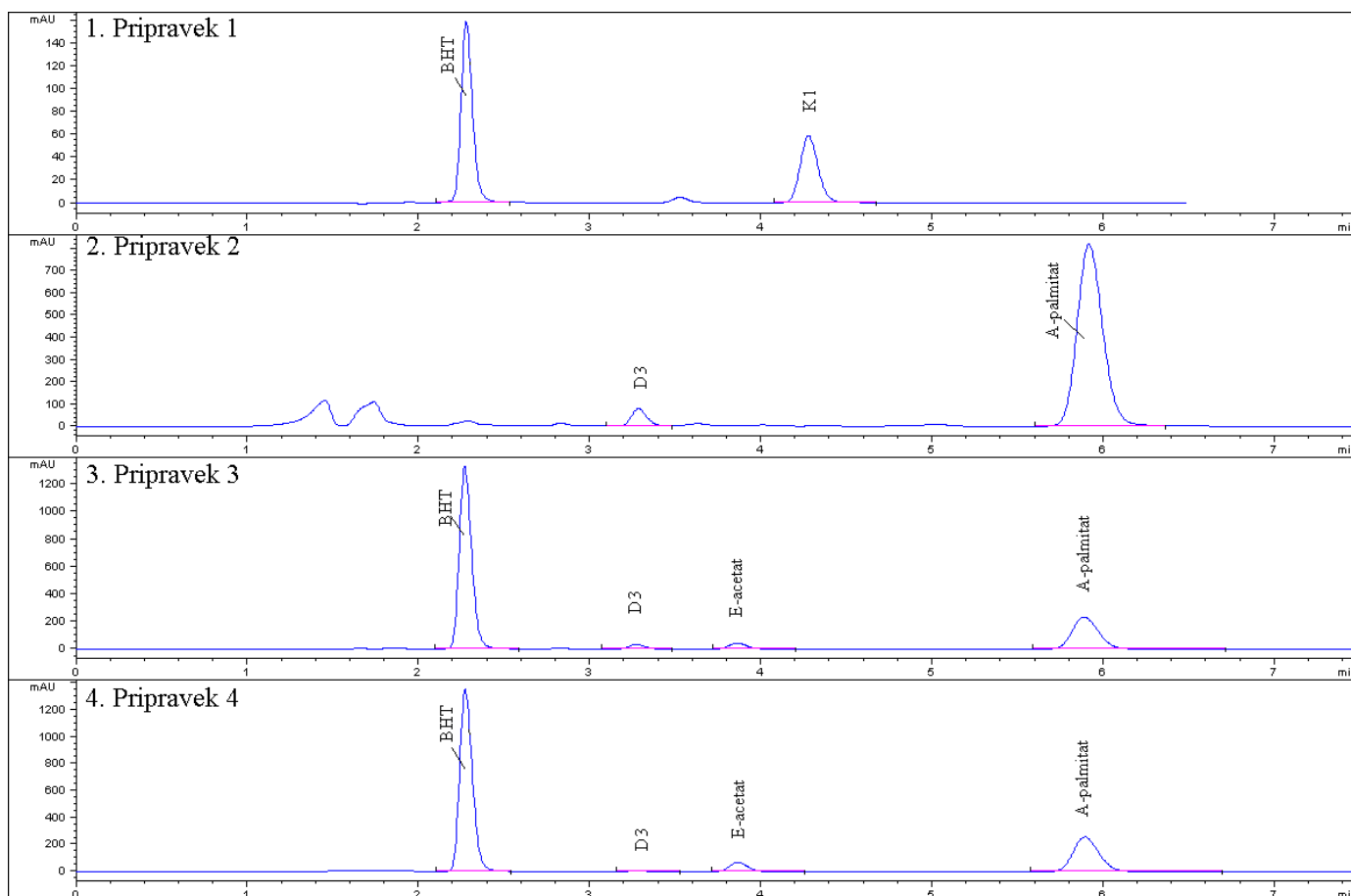
- 2687.
- 56) United States Pharmacopeial Convention. United States Pharmacopeia. Rockville, MD, 2006. Dietary Supplements, Official Monographs.
 - 57) Anuradha S. N., Arunkumar S.: A validated RP-HPLC method for simultaneous estimation of vitamin A and vitamin E in multivitamin tablet dosage form. *Int J Pharm Bio Sci*, 3, 2012, 322-7.
 - 58) Nimalaratne C., Sun C., Wu J., Curtis J. M., Schieber A.: Quantification of selected fat soluble vitamins and carotenoids in infant formula and dietary supplements using fast liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Res Int*, 66, 2014, 69-77.
 - 59) Kucukkolbasi S., Bilber O., Filiz Ayyildiz H., Kara H.: Simultaneous and accurate determination of water- and fat-soluble vitamins in multivitamin tablets by using an RP-HPLC method. *Quim Nova*, 36, 2013, 1044-51.
 - 60) Siluk D., Oliveira R. V., Esther-Rodriguez-Rosas M., Ling S., Bos A., Ferrucci L., Wainer I. W.: A validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human plasma. *J Pharm Biomed Anal*, 44, 2007, 1001-7.
 - 61) Wielinski S., Olszanowski A.: Development and validation of HPLC method for simultaneous determination of fat-soluble vitamins in capsules. *J Liq Chrom & Rel Technol*, 24, 2001, 201-13.
 - 62) Luque-Garcia J. L., Luque de Castro M. D.: Extraction of fat-soluble vitamins. *J. Chromatogr. A*, 935, 2001, 3-11.
 - 63) Qian H., Sheng M.: Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D₂ in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. *J. Chromatogr. A*, 825, 1998, 127-33.
 - 64) Lacramioara Patriche E., Croitoru O., Coman G., Stefan C. S., Tutunaru D., Cuciureanu R.: Validation of HPLC method for the determination of retinol in different dietary supplements. *Rom. Biotechnol. Lett.*, 19, 2014, 9875-82.
 - 65) Kłackow G., Anuszczyńska E. L.: Simultaneous determination of vitamins A, D₃ and E in multiple pharmaceutical preparations by HPLC method. *Acta Pol. Pharm.*, 57, 2000, 167-70.
 - 66) Kozhanova L. A., Fedorova G. A., Baram G. I.: Determination of Water- and Fat-Soluble Vitamins in Multivitamin Preparations by High- Performance Liquid Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*. 57, 2002, 40-5.
 - 67) Chen L., Liu Z., Kang X., Zhou X., Zheng S., Gu Z.: Determination of fat-soluble vitamins in food and pharmaceutical supplements using packed-fiber solid phase extraction (PFSPE) for sample preconcentration/ clean-up. *Procedia Environ Sci*, 8, 2011, 588-98.
 - 68) Olszanowski A., Wielinski S.: Development and validation of HPLC method for simultaneous determination of fat-soluble vitamins in capsules. *J Liq Chrom & Rel Technol.*, 24, 2001, 201-13.
 - 69) Akhtar M. H., Bryan M.: Extraction and quantification of major carotenoids in processed foods and supplements by liquid chromatography. *Food Chem*, 111, 2008, 255-61.
 - 70) Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Konaktion. (internet) Dostopno na: [http://www.cbz.si/ZZZS/pao/bazazdr2.nsf/o/21FC19F1BE011F00C12579C2003F5B59/\\$File/s-006617.pdf](http://www.cbz.si/ZZZS/pao/bazazdr2.nsf/o/21FC19F1BE011F00C12579C2003F5B59/$File/s-006617.pdf) (dostopno maj 2016).
 - 71) Povzetek glavnih značilnosti zdravila: AD3 6000 i.e./2000 i.e. v 1 ml peroralne kapljice, emulzija. (internet) Dostopno na: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/D7E7C066BDBFC70C12579C2003F5840/\\$File/s-010856.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/D7E7C066BDBFC70C12579C2003F5840/$File/s-010856.pdf) (dostopno maj 2016).
 - 72) Navodilo za uporabo: VITAMIN AD3E KRKA emulzija za injiciranje. (internet) Dostopno na: http://www.krka.si/media/product/si/vet/gen_pdf/2012/Vitamin_AD3E_KRKA_emulzija_za_injiciranje_PIL.pdf (dostopno maj 2016).
 - 73) Navodilo za uporabo: VITAMIN AD3EC peroralna emulzija. (internet) Dostopno na: http://www.krka.si/media/product/si/vet/gen_pdf/2012/VitaminAD3EC_peroralna_emulzija.pdf (dostopno maj 2016).
 - 74) Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Pikovit forte obložene tablete. (internet) Dostopno na: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/764399264FD14E26C12579C2003F60CC/\\$File/s-0643.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/764399264FD14E26C12579C2003F60CC/$File/s-0643.pdf) (dostopno maj 2016).
 - 75) Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Pikovit obložene tablete. (internet) Dostopno na: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/F6314D64F36076CBC12579C2003F60EF/\\$File/s-0644.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/F6314D64F36076CBC12579C2003F60EF/$File/s-0644.pdf) (dostopno maj 2016).
 - 76) Brezovar, L. (2014). Izdelava in stabilnost trdnih lipidnih nanodelcev s koencimom Q₁₀ (Diplomska naloga). Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani.
 - 77) Iskra, J. (2016). Vrednotenje stabilnosti lipofilnih vitaminov z novo stabilnostno induktivno metodo (Magistrska naloga). Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani.
 - 78) Gorjup, N. (2016). Priprava in stabilizacija reducirane oblike koencima Q₁₀ (Diplomska naloga).

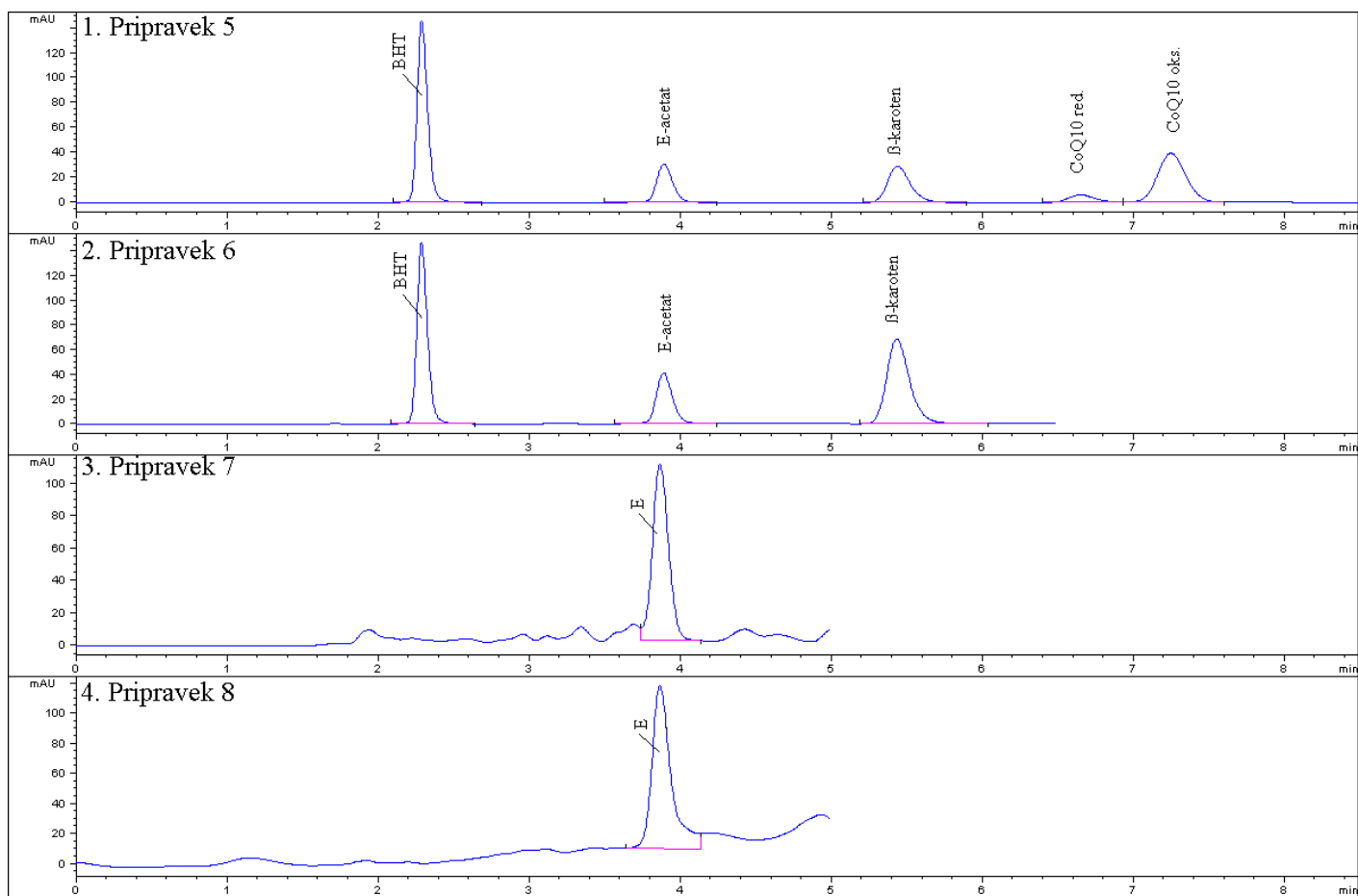
- Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani.
- 79) United States Pharmacopeia 2011 : USP 35 ; The national formulary : NF 30. Volume 1-3. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention, 2011: 1460-1462, 2653, 4321, 5039
 - 80) Temova Ž., Roškar R.: Stability-Indicating HPLC-UV Method for Vitamin D3 Determination in Solutions, Nutritional Supplements and Pharmaceuticals. *J Chromatogr Sci*, 54, 2016, 1180-6.
 - 81) International Conference on Harmonization Guidelines, Validation of analytical procedures Q2(R1), Proceeding of the International Conference of Harmonization (ICH), Commission of the European Communities, (2005).
 - 82) Harris D. C: Quantitative Chemical Analysis. 8. izd. New York: W. H. Freeman and Company; 2010: 98
 - 83) Majors R. E: Sample preparation fundamentals for chromatography. (internet) Dostopn na: https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5991-3326EN_SPHB.pdf (dostopno junij 2016).
 - 84) Raziskava javnega mnenja o uporabi prehranskih dopolnil. (internet) Dostopno na: http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/zakonodaja/mednarodna_zakonodaja/VARNOST_T_ZIVIL/PARSIFAL-porocilo_raziskave.pdf (dostopno junij 2016).
 - 85) Inštitu za varovanje zdravja. Tolerance pri označevanju hranilne vrednosti živil. (internet) Dostopno na: http://www.mz.gov.si/fileadmin/mz.gov.si/pageuploads/mz_dokumenti/zakonodaja/varnost_hrane/splosno-ovarnost_hrane/Microsoft_Word_-_HVtolerance_20.10.2008.pdf (dostopno junij 2016).
 - 86) Temova Ž., Roškar R.: Shelf life after opening of prescription medicines and supplements with vitamin D3 for paediatric use. *Eur J Hosp Pharm Sci*, 24(2), 2016, 115-119.
 - 87) Razpotnik, S. (2011). Določanje vsebnosti ubidekarenona v mehkih kapsulah z metodo HPLC (Diplomska naloga). Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani.
 - 88) Premzl, K. (2012) Študija nezdržljivosti ubidekarenona in askorbinske kisline v mehkih želatinskih kapsulah (Magistrska naloga). Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani.

7 PRILOGE

Priloga 1: Kromatogrami topil in raztopine mešanice standardov



Priloga 2: Kromatogrami vzorčnih raztopin tekočih pripravkov

Priloga 3: Kromatogrami vzorčnih raztopin mehkih kapsul

Priloga 4: Kromatogrami vzorčnih raztopin tablet

