

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJ GROBIN  
MAGISTRSKO DELO

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJ GROBIN

RAZVOJ IN VALIDACIJA STABILNOSTNO INDIKATIVNE METODE ZA  
VREDNOTENJE FOTOSTABILNOSTI VODOTOPNIH VITAMINOV S  
TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO VISOKE LOČLJIVOSTI

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A STABILITY INDICATING METHOD  
FOR THE EVALUATION OF PHOTOSTABILITY OF WATER SOLUBLE VITAMINS  
WITH HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

UNIFORM MASTER'S STUDY PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2018

Magistrsko naložko sem opravljal na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

## **ZAHVALA**

Najprej se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Robertu Roškarju za njegov trud, predanost, strokovno pomoč in čas, ki ga je vložil v to magistrsko delo. Zahvala za sodelovanje gre tudi sodelavcem s katedre za Biofarmacijo in farmakokinetiko. Prav tako bi se zahvalil staršema, ki sta mi omogočila študij, ter mi tekom njega stala ob strani. Iskrena zahvala gre tudi Katarini Kraner, za vse ure, ki sva ju skupaj preživela v času študija, tako na fakulteti kot izven nje.

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelal pod mentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

Andrej Grobin

# KAZALO

<b>POVZETEK .....</b>	iv
<b>ABSTRACT .....</b>	v
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	vi
<b>1. UVOD .....</b>	1
1.1. Vodotopni vitaminii .....	1
1.1.1. Vitamin C .....	1
1.1.2. Vitamini B-kompleksa.....	2
1.1.3. Tiamin.....	2
1.1.4. Riboflavin.....	3
1.1.5. Nikotinamid.....	3
1.1.6. Dekspantenol .....	4
1.1.7. Piridoksin.....	4
1.1.8. Biotin .....	4
1.1.9. Folna kislina .....	5
1.1.10. Cianokobalamin .....	5
1.2. Izdelki z vitaminii .....	6
1.3. Fotostabilnost.....	7
1.4. Analitika vodotopnih vitaminov .....	9
<b>2. NAMEN DELA.....</b>	13
<b>3. MATERIALI IN METODE .....</b>	14
3.1. Materiali.....	14
3.1.1. Izdelki .....	14
3.1.2. Referenčne spojine .....	15
3.1.3. Reagenti in topila.....	16
3.1.4. Naprave in pribor.....	17
3.2. Analizna metoda .....	18
3.2.1. Razvoj in optimizacija analizne metode.....	18
3.2.2. Končni kromatografski pogoji .....	18
3.3. Priprava vzorcev .....	19
3.3.1. Topila in pufrne raztopine .....	19
3.3.2. Razvoj in optimizacija analizne metode.....	20
3.3.3. Vrednotenje analizne metode .....	21
3.3.4. Priprava raztopin za vrednotenje dejavnikov, ki vplivajo na fotostabilnost folne kisline in riboflavina .....	22
3.3.5. Stabilnost in vsebnost vitaminov v izdelkih.....	23

3.3.6.    Priprava vzorcev za vrednotenje fotostabilnosti izdelkov .....	25
3.3.7.    Enomesečna študija stabilnosti standardov vitaminov .....	25
3.4.    Vrednotenje HPLC metode.....	25
3.4.1.    Vrednotenje selektivnosti .....	25
3.4.2.    Vrednotenje linearnosti.....	26
3.4.3.    Vrednotenje točnosti in ponovljivosti .....	26
3.4.4.    Določanje meje zaznave in določitve .....	27
3.4.5.    Robustnost metode .....	27
3.4.6.    Stabilnost vzorcev .....	27
3.5.    Obdelava podatkov .....	27
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>29</b>
4.1.    Razvoj in optimizacija analizne metode .....	29
4.2.    Vrednotenje metode .....	35
4.2.1.    Selektivnost .....	36
4.2.2.    Linearost .....	36
4.2.3.    Točnost in ponovljivost .....	37
4.2.4.    Meja zaznave in določitve .....	38
4.2.5.    Robustnost metode .....	39
4.2.6.    Stabilnost vzorcev .....	41
4.3.    Vsebnost vitaminov v izdelkih .....	41
4.4.    Vrednotenje fotostabilnosti .....	46
4.4.1.    Preverjanje ustreznosti vira osvetlitve .....	47
4.4.2.    Dolgotrajna študija fotostabilnosti posameznih vitaminov .....	48
4.4.3.    Vpliv parametrov na kinetiko fotolize riboflavina .....	49
4.4.4.    Vpliv parametrov na kinetiko fotolize folne kisline .....	51
4.4.5.    Fotostabilnost kombinacije vodotopnih vitaminov .....	53
4.4.6.    Fotostabilnost zmesi vitaminov v koncentracijah, ki jih najdemo v izdelkih	54
4.4.7.    Fotostabilnost izdelkov.....	58
<b>5. SKLEP .....</b>	<b>62</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>64</b>
<b>7. PRILOGE .....</b>	<b>71</b>

## **POVZETEK**

Fotostabilnost vitaminov se v literaturi navadno navaja opisno in do sedaj še ni bila sistematično in kvantitativno raziskana. Zato je bil naš glavni cilj celovito raziskati fotostabilnost devetih vodotopnih vitaminov v njihovih najpogostejših oblikah - askorbinsko kislino (C), tiamin (B1), riboflavin (B2), nikotinamid (B3), dekspantenol (B5), piridoksin (B6), biotin (B7), folno kislino (B9) ter cianokobalamin (B12).

V ta namen smo najprej razvili novo stabilnostno indikativno UHPLC analizno metodo, jo ovrednotili v skladu s smernicami ICH ter potrdili njenu primernost na multivitaminskih izdelkih. Pri vrednotenju vsebnosti smo ugotovili, da vitamini odstopajo od navedenih vrednosti v vseh šestih testiranih izdelkih, kljub temu, da so bila med njimi tudi zdravila, a po drugi strani so bili nekateri izdelki s pretečenim rokom uporabnosti. Vsebnosti B7 in B12 sta v večini izdelkov najbolj odstopala od navedene, najverjetneje zaradi njunega zelo nizkega odmerka. Med zdravili in prehranskimi dopolnili ter med različnimi oblikami ni bilo značilnih razlik v odstopu vsebnosti.

Fotostabilnostno študijo vodotopnih vitaminov v raztopinah (posamezno ali v zmesih) in v izdelkih smo izvajali s pomočjo klimatske komore s svetlobnim modulom, pri stalnih in kontroliranih pogojih v skladu s smernicami ICH. Ugotovili smo, da so v visokih koncentracijah posamezni vitamini B1, B3, B5, B6, B7 in B12 fotostabilni tudi do enega meseca, med tem ko so pri teh pogojih vitamini C, B2 in B9 stabilni manj kot en dan. V zmesih so se vitamini C, B2 in B9 pretvarjali še hitreje, prav tako je v zmesi zelo nestabilen vitamin B12. Fotostabilnost v zmesi je zelo odvisna od same sestave vitaminov. B2 izrazito zmanjšuje fotostabilnost, nasprotno pa C povečuje fotostabilnost drugih vitaminov. Dodatno smo kvantitativno vrednotili vpliv dejavnikov na hitrost fotolize B2 in B9. Ugotovili smo, da je hitrost fotolize B2 močno odvisna od koncentracije in pH medija, medtem ko je hitrost fotolize B9 skoraj neodvisna od koncentracije in temperature, pri višjem pH pa je počasnejša. Fotostabilnost vitaminov v raztopinah zdravil primerljivih oblik in sestave je podobna, je pa zelo odvisna od tega, kateri vitamini so v izdelku prisotni. Najbolj so fotolabilni vitamini C, B2, B9 in B12. V primeru šumečih tablet lahko že po eni uri v pripravljeni raztopini pada koncentracija nekaterih vitaminov bistveno pod 50 %. Na osnovi dobljenih rezultatov menimo, da je potrebno tej problematiki v prihodnje posvetiti večjo pozornost.

**Ključne besede:** *vodotopni vitamini, fotostabilnost, stabilnostno indikativna metoda, UHPLC, B-kompleks*

## **ABSTRACT**

The photostability of vitamins in literature is usually defined descriptively and has not yet been researched systematically and quantitatively. Our main goal was therefore a thorough research of the photostability of nine water soluble vitamins in their most common forms, namely ascorbic acid (C), thiamine (B1), riboflavin (B2), nicotinamide (B3), dexpanthenol (B5), pyridoxine (B6), biotin (B7), folic acid (B9) and cyanocobalamin (B12).

In order to do so, we had first developed a stability-indicating UHPLC analytical method, evaluated it in accordance to ICH guidelines and confirmed its suitability on multivitamin products. In the evaluation of content, we had discovered that vitamins deviate from the stated contents in all six of the tested products, even though some of them were medicines, but some of them had already expired. The contents of B7 and B12 were most different from the stated values, possibly due to their very low doses. There weren't noticeable differences in content deviation between medicines and dietary supplements.

We have conducted the photostability study of water soluble vitamins in solutions (both single and mixture) and products in a climate chamber with a light module in constant and controlled conditions, in accordance to ICH guidelines. We have discovered that vitamins B1, B3, B5, B6, B7 and B12 are stable in high concentrations up to a month, while vitamins C, B2 and B9 are stable less than a day in the same conditions. In mixtures, vitamins C, B2 and B9 are converting even faster. Vitamin B12 is very unstable in a mixture. The photostability of a mixture is largely dependent on the content of the vitamins in it. B2 exceptionally reduces the photostability of other vitamins, while C increases it. Additionally, we quantitatively evaluated the effect of different factors on the speed of photolysis of B2 and B9. We have discovered that the speed of photolysis of B2 is very dependent on its concentration and the pH value of the media, while the speed of photolysis of B9 is mainly independent of its concentration and temperature, and is even slower at higher media pH.

The photostability of medicines of comparable forms and contents in solutions is similar, but is very dependent on which vitamins are present in it. The most photolabile are vitamins C, B2, B9 and B12. In the case of effervescent tablets, the concentration of vitamins can significantly fall below 50 % in a prepared solution in less than an hour. Based on the results, we believe this subject should be paid more attention in the future.

**Keywords:** *water-soluble vitamins, photostability, stability indicative method, UHPLC, B-complex*

## **SEZNAM OKRAJŠAV**

ACN – acetonitril

B1 – tiamin

B2 – riboflavin

B3 – nikotinamid

B5 – dekspantenol

B6 – piridoksin

B7 – biotin

B9 – folna kislina

B12 – cianokobalamin

C – askorbinska kislina

EDTA – etilendiamintetraocetna kislina

ICH – Mednarodna konferenca o harmonizaciji (ang. International Conference on Harmonisation)

MeOH – metanol

MQ - MilliQ

QC – kontrolna raztopina

R<sup>2</sup> – determinacijski koeficient

RDA – priporočen dnevni odmerek (ang. Recommended Daily Allowance)

RSD – relativni standardni odklon

UHPLC – tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti (ang. Ultra-High Performance Liquid Chromatography)

# 1. UVOD

Vitamin je biološko aktivna organska spojina, ki je v manjših količinah pomembna za normalno delovanje živega organizma. Ker jih organizem večinoma sam ne more sintetizirati iz osnovnih gradnikov, je pomembno, da jih zaužije s hrano (1). Pomanjkljiv ali pretiran vnos vitaminov v telo je lahko vzrok mnogim bolezenskim stanjem (1–3). Zaradi sodobne narave hitrega pridobivanja hrane, je ta pogosto osiromašena s hranili, med katerimi so tudi vitamini. Posledica tega je, da so pomanjkanja vitaminov v državah razvitega sveta vedno bolj pogosta (4). Zato jih je smiselno dodajati v obliki prehranskih dopolnil in zdravil, če njihov vnos v telo s hrano ni zadosten (3).

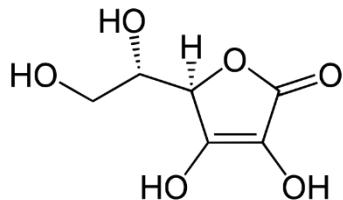
V skupino vitaminov trenutno uvrščamo 13 predstavnikov. Delimo jih na lipidotopne (vitamini A, D, E in K) ter vodotopne (vitamini B kompleksa in vitamin C). Prvi vitamini so bili odkriti v začetku 20. stoletja. Sprva so odkrili samo njihovo delovanje, kasneje pa tudi njihove strukture, zaradi česar so jih poimenovali s črkami po abecednem redu odkritij. Šele kasneje so ugotovili, da spojina, ki ustrezava delovanju posameznega vitamina ni samo ena, zaradi česar so nekaterim od teh dodali tudi številčne oznake (5). Zato sedaj kombinacijo črke in številke uporabljamo za specifično delovanje nekega vitamina, posamezno spojino, ki je za to delovanje odgovorna, pa imenujemo z njenim kemijskim imenom.

## 1.1. Vodotopni vitamini

### 1.1.1. Vitamin C

Vitamin C (kemijsko ime *L*-askorbinska kislina, Slika 1) je vitamin, katerega pomanjkanje povzroči bolezen po imenu skorbut. Vitamin C je udeležen v antioksidativni mreži in je kot tak pomemben za oksidativno ravnovesje v telesu. Velikokrat se uporablja proti prehladu, večina raziskav pa nakazuje, da je uporaben zgolj pri zdravljenju in ne preventivi proti prehladnim obolenjem (6). V telesu je udeležen tudi v sintezi kolagena, karnitina in nekaterih živčnih prenašalcev, v presnovi tirozina ter presnovi mikrosomov (7). Prav tako je raziskana njegova vloga pri krvno-žilnih zapletih (8, 9). Največ vitamina C najdemo v hrani

rastlinskega izvora, zlasti v agrumih, divji češnji, jagodičevju in brokoliju, nekaj pa se ga nahaja tudi v krompirju, avokadu in paradižniku (10).



Slika 1: Struktura vitamina C

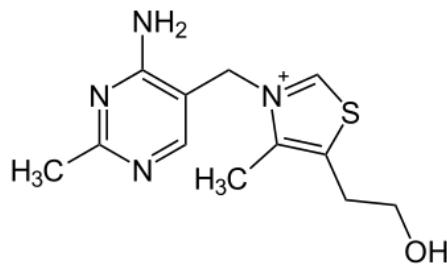
### 1.1.2. Vitamini B-kompleksa

Vitamini B kompleksa so tiamin (B1), riboflavin (B2), nikotinamid (B3), dekspantenol (B5), piridoksin (B6), biotin (B7), folna kislina (B9) in cianokobalamin (B12). Navedeni vitamini so v oblikah, v katerih se najpogosteje nahajajo.

Vitamini so si med sabo po kemijski strukturi zelo različni, nekateri izmed njih obstajajo v različnih oblikah (npr. B12 kot cianokobalamin ali metilkobalamin). Imajo pomembno vlogo v celični presnovi, kot kofaktorji ali pa kot prekurzorske molekule iz katerih ti kofaktorji nastanejo (4). Vitamini B-kompleksa se zaradi svoje relativno dobre vodotopnosti v telesu ne skladiščijo (z izjemo vitamina B12). Zaradi tega so pomanjkanja dokaj pogosta, navadno posameznikom primanjkuje več vitaminov B-kompleksa hkrati (11).

### 1.1.3. Tiamin

Tiamin (Slika 2) ima pomembno vlogo v presnovi ogljikovih hidratov, saj katalizira dekarboksilacijo  $\alpha$ -ketokislin, zaradi česar povečan vnos enostavnih ogljikovih hidratov poveča potrebo po tiaminu (12). Pomanjkanje tiamina povzroča bolezen beriberi, ki se kaže kot skupek simptomov, ki so posledica poškodb osrednjega živčevja in krvno-žilnega sistema. Najpogostejši so motnje perifernih živcev okončin, zmanjšani refleksi, šibkost

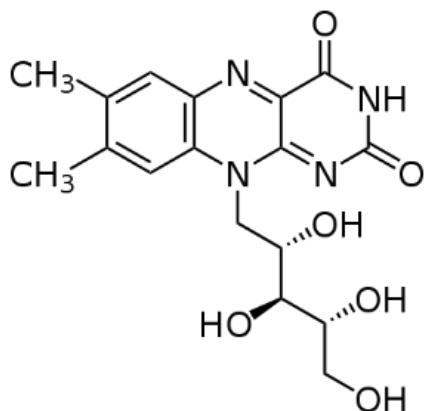


Slika 2: Struktura vitamina B1 v obliki tiamina

mišic, edemi, srčna odpoved in laktoacidoza. Tiamin najdemo v neoluščenem rižu, zeleni zelenjavi, krompirju, mesu, jetrih in v polnozrnatih žitaricah (13).

#### 1.1.4. Riboflavin

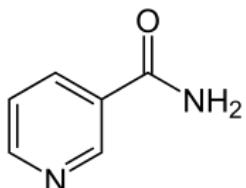
Riboflavin (Slika 3) najpogosteje najdemo v prosti obliki ali kot riboflavin fosfat (slednji ima boljšo topnost v vodi). Raztopljen v vodi, je značilne živo rumene do oranžne barve (14). Njegovi biološko aktivni oblici sta flavin mononukleotid (FMN) in flavin adenin dinukleotid (FAD). Riboflavin v telesu deluje kot koencim v reakcijah celičnega dihanja, presnove vitamina B6, oksidacijah v presnovi ogljikovih hidratov in maščob ter sintezi DNA preko aktivacije folata (15). Posledice pomanjkanja so večinoma blage, kažejo pa se zlasti kot vnetja sluznic in anemija (16). Največ riboflavina najdemo v mleku, mesu in jetrih (4).



Slika 3: Struktura vitamina B2 v obliki riboflavina

#### 1.1.5. Nikotinamid

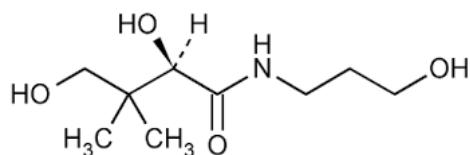
Nikotinamid (Slika 4) ima v telesu enako vlogo kot njemu sorodna spojina nikotinska kislina (niacin), oba pa sta oblici vitamina B3. Oba sta prekurzorja koencimov, preko katerih sodelujeta v celičnih redoks reakcijah in sta tako pomembna v celični presnovi in dihanju (17). Pomanjkanje B3 povzroča bolezen pelagro. Simptomi se kažejo kot agresija, diareja, dermatitis, demenca in tudi smrt. Največ ga najdemo v živalski hrani, zlasti v mesu in ribah, nekaj pa tudi v oreščkih in nekaterih vrstah gob (18).



Slika 4: Struktura vitamina B3 v obliki nikotinamida

### 1.1.6. Dekspantenol

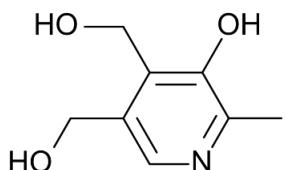
Dekspantenol (Slika 5) je *D*-izomer alkoholnega derivata pantotenske kisline (oba sta obliki vitamina B5) in je najpogosteša oblika v izdelkih, saj je *D*-izomer za razliko od *L*-izomera kisline biološko aktiven, pantenol pa je v splošnem bolj stabilen od pantotenske kisline (19). V telesu je pomemben za sintezo koencima A, ki vstopa v reakcije celične presnove in sinteze maščobnih kislin, holesterola ter acetilholina. Pomanjkanje je zelo redko, kaže pa se kot utrujenost, otrdelost, motnje spanja in slabost (20, 21). Največ ga najdemo v mesu, jetrih, jajcih in neoluščenih žitih (22).



Slika 5: Struktura vitamina B5 v obliki dekspantenola

### 1.1.7. Piridoksin

Piridoksin (Slika 6) je v izdelkih najpogosteši izmed znanih oblik vitamina B6 in je v telesu pomemben pri presnovi makrohranil, sintezi živčnih prenašalcev, histamina, hemoglobina in izražanju genov (23). Ostale oblike vitamina B6 so piridoksin fosfat, piridoksal, piridoksamin in piridoksamin fosfat. Pomanjkanja piridoksinova so redka, kažejo pa se kot dermatitis, vnetje jezika in oči, nespečnost, zmedenost in anemija. Največ ga najdemo v mesu, čičeriki, bananah, krompirju in pistacijah (10).

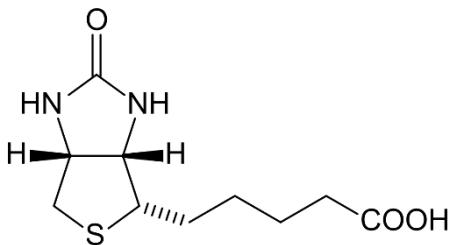


Slika 6: Struktura vitamina B6 v obliki piridoksinu

### 1.1.8. Biotin

Biotin (Slika 7) je biološko aktivni koencim, ki v telesu sodeluje pri presnovi ogljikovih hidratov, nekaterih razvezjanih aminokislin, sintezi maščobnih kislin in glukoneogenezi. Pomanjkanja so redka, saj biotin najdemo skoraj v vseh živilih, njegova poraba v telesu pa je majhna (23). Biotin se v omejenem obsegu sintetizira v bakterijah črevesne flore, a je zaenkrat njegova absorpcija iz bakterij še neznana (24). Simptome pomanjkanja opazimo pri posameznikih, ki so dlje časa uživali surov beljak, ki vsebuje avidin, saj le-ta deaktivira

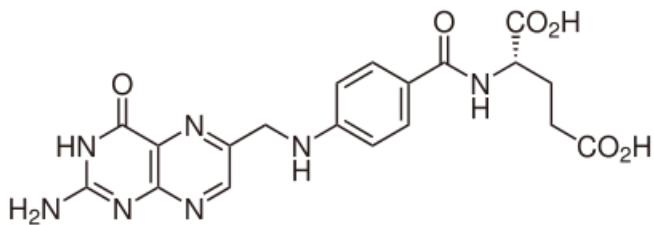
biotin. Simptomi so navadno blagi, pride lahko do izpadanja las, lomljivih nohtov, dermatitisa in nekaterih blagih motenj živčnega sistema (25). Velike količine biotina najdemo v mesu in jajcih, nekaj pa tudi v avokadu, kruhu in siru (26).



*Slika 7: Struktura vitamina B7 v obliki biotina*

#### 1.1.9. Folna kislina

Folna kislina (Slika 8) je najpogostejsa oblika vitamina B9, druga je folacin. V telesu ima zelo pomembno vlogo pri deljenju celic, saj je vpletena v metiliranje DNA in RNA molekul. Posledično je najbolj pomembna pri nastajanju spolnih celic, eritropoezi in v nosečnosti. V primeru pomanjkanja je nastajanje novih celic in njihov razvoj omejen, zaradi česar lahko pride do megaloblastne anemije in motenj razvoja zarodka. Te se najpogosteje kažejo kot motnje zapiranja nevralne cevi pri otroku (spina bifida) (27). Pomanjkanje vitamina B9 je ena od najpogostejših hipovitaminoz razvitega sveta in predstavlja velik zdravstveni problem, zlasti pri nosečnicah, saj imajo potrebe v prvih mesecih nosečnosti izrazito povisane zaradi hitrega razvoja novih celic zarodka (28). Folna kislina sicer najdemo v različni hrani, a je njena vsebnost zelo nizka. Najpogosteje jo najdemo v listnatih zelenjavah, sokovih, oreščkih, avokadu, jetrih, kvasu in brstičnem ohrovtru (10). V razvitem svetu se folna kislina dodaja v moko, ki predstavlja največji vir vnosa folne kisline iz prehrane (29).

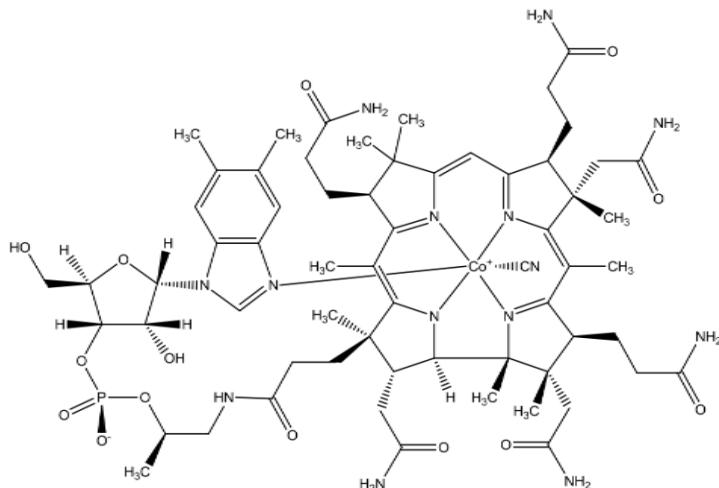


*Slika 8: Struktura vitamina B9 v obliki folne kisline*

#### 1.1.10. Cianokobalamin

Cianokobalamin (Slika 9) je najpogostejsa oblika kobalmina, ki jo najdemo v izdelkih zaradi njegove stabilnosti (30). Ostale oblike vitamina B12 so metilkobalamin,

hidroksokobalamin in adenosilkobalamin. V telesu je vitamin B12 udeležen v presnovi makrohranil, eritropoezi in sintezi proteinov. V telesu zdravega posameznika je zaloga vitamina B12, ki zadostuje za nekaj let (31). Pomanjkanje je najpogosteje povezano z zmanjšano sposobnostjo njegove absorpcije v tankem črevesju in povzroči zanj specifično bolezen imenovano perniciozna anemija (28). Simptomi se kažejo kot utrujenost, odrevenelost okončin, oslabelost refleksov, depresija in zmedenost (32). Največ vitamina B12 vsebujejo meso, ribe, jajca in jetra (10).



*Slika 9: Struktura vitamina B12 v obliki cianokobalamina*

## 1.2. Izdelki z vitaminimi

Vse vodotopne vitamine najdemo v večjih ali manjših količinah v hrani. Izziv sodobnega načina pridelovanja hrane, ki je pogosto naravnан v čim hitrejšo rast in čim večji donos, pa je zagotoviti zadostno količino mikrohranil v tako pridobljeni hrani. Pogosto je tudi vsebnost vitaminov v takšni hrani majhna, kar lahko pomembno prispeva k hipovitaminozam (33). Dodaten problem pri tem je hiter način življenja, zaradi katerega se posledično veliko posameznikov prehranjuje nezdravo. Pogosto je uživanje močno predelane hrane, ki je zaradi svojega načina priprave še dodatno osiromašena z vitaminimi in ostalimi mikrohranili (34).

Zaradi teh pomanjkanj v prehrani se vedno več ljudi odloča za nadomeščanje vitaminov v različnih oblikah (35). Samo v Evropi je bil trg z vitaminimi in minerali v letu 2017 vreden več kot 2,5 milijarde € (36). Pomanjkanja vitaminov B-kompleksa so pogosto takšna, da ne primanjkuje samo en vitamin, ampak večkrati (11). Zaradi tega je na trgu večina izdelkov z vitaminimi B kompleksa multivitaminskih, torej je v enem izdelku kombinacija večjega

števila vitaminov. Nekateri predstavniki so navedeni v preglednici III. Priporočeni dnevni odmerki (RDA) vitaminov so zelo različni. Odvisni so od vloge vitamina v telesu in posledično njegovih potreb. Interval je velik, najnižji RDA ima B12 in sicer 2,5 µg, najvišji pa C in sicer 80 mg (preglednica III, izdelek D).

Ti izdelki so lahko ali prehranska dopolnila, ali pa tudi zdravila, saj so nekatera pomanjkanja tako resna, da jih je treba zdraviti pod nadzorom zdravstvenih delavcev. Najpogostejsa so ta pomanjkanja pri novorojenčkih in nosečnicah (37).

### 1.3. Fotostabilnost

Nestabilnost vodotopnih vitaminov je v kvalitativnem smislu relativno dobro poznana (38). Med pomembnejše dejavnike, ki vplivajo na stabilnost, spada tudi svetloba. Fotostabilnost vitaminov se v literaturi navadno navaja opisno, a do sedaj še ni bila sistematično in kvantitativno raziskana. Iz vidika fotostabilnosti so najbolj raziskani vitamini C, B2, B9 in B12 (preglednica I). Vitamin C je en izmed najbolj nestabilnih vodotopnih vitaminov, zato ni presenetljivo, da je občutljiv tudi na svetlogo (39). Za B2 je znano, da je izrazito fotolabilen tako sam, kot tudi v kombinacijah z ostalimi vitaminimi. Ugotovljenih je nekaj njegovih možnih fotorazgradnih produktov, uporablja pa se tudi kot pospeševalec fotorazgradnje (40–43).

Z izjemo B1 in B6, ki sta bila vrednotena iz vidika fotostabilnosti samo v kombinaciji nekaterih vodotopnih vitaminov (C, B1, B2, B6), so ostali vrednoteni samo vsak posamezno in večinoma v raztopinah standarda vitamina, kar pa ne odraža realnega stanja v multivitaminskih izdelkih, kjer najdemo poleg številnih pomožnih snovi tudi veliko drugih vitaminov, ki lahko pomembno vplivajo na medsebojno stabilnost.

Preglednica I: Literurni pregled znanih podatkov o fotostabilnosti vodotopnih vitaminov

Analit	Literurni podatki o fotostabilnosti
C	<ul style="list-style-type: none"><li>- predlagan mehanizem pretvorbe (hidroliza in oksidacija),</li><li>- predvideni možni pretvorbeni produkti (dehidroaskorbinska kislina, 2,3-diketoglukonska kislina),</li><li>- vpliv pH na hitrost pretvorbe (najbolj stabilna pri nižjih pH, razlika v hitrost pretvorbe med pH = 1 in pH = 9 pod vplivom svetlobe je za 1,5x),</li></ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ugotovljena kinetika v poltrdnih sistemih (konstanta pretvorbe na svetlobi velikostnega razreda <math>10^{-3} \text{ min}^{-1}</math>) (39)</li> </ul>
B1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- semikvantitativno vrednotenje stabilnosti v kombinaciji C, B1, B2, B6,</li> <li>- zgolj definirana vsebnost po 24, 28 in 72h opazovanja v primerjavi z vzorcem v temi,</li> <li>- vsebnost po 72h osvetlitve je 95 % (44)</li> </ul>
B6	<ul style="list-style-type: none"> <li>- semikvantitativno vrednotenje stabilnosti v kombinaciji C, B1, B2, B6,</li> <li>- zgolj definirana vsebnost po 24, 28 in 72h opazovanja v primerjavi z vzorcem v temi,</li> <li>- vsebnost po 72h osvetlitve je 94 % (44)</li> </ul>
B3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ni podatkov o fotonestabilnosti (45)</li> </ul>
B5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ni podatkov o fotonestabilnosti (45)</li> </ul>
B9	<ul style="list-style-type: none"> <li>- predlagan mehanizem pretvorbe (nastanek singletnega kisika in posledična oksidativna pretvorba),</li> <li>- predvideni pretvorbeni produkti (<i>p</i>-aminobenzoil-<i>l</i>-glutaminska kislina, 6-formilpterin, pterin-6-karboksilna kislina),</li> <li>- semikvantitativno določena kinetika v raztopini (samo vrednotenje povečevanja fluorescence v odvisnosti od časa osvetlitve) (46)</li> </ul>
B7	<ul style="list-style-type: none"> <li>- po podatkih je fotostabilen (47)</li> </ul>
B2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ugotovljen mehanizem pretvorbe (nastanek reaktivnih kisikovih spojin in posledične pretvorbe),</li> <li>- identificirani pretvorbeni produkti (formilmetylflavin, lumikrom, lumiflavin, karboksimetylflavin, 2,3-butandion, <math>\beta</math>-keto kislinski ter diketo pretvorbeni produkt),</li> <li>- ugotovljena kinetika v raztopinah (velikostnega razreda <math>10^{-2} \text{ min}^{-1}</math> v vodi),</li> <li>- vrednoten vpliv parametrov kot so pH (v bazičnem 100x hitreje kot v kislem), stabilizatorji (EDTA upočasni reakcije za 2x) (40)</li> </ul>
B12	<ul style="list-style-type: none"> <li>- predlagan mehanizem pretvorbe (pretvorba v hidroksokobalamin),</li> <li>- možni produkt v raztopini (hidroksokobalamin) (48)</li> </ul>

Ob uporabi izdelkov z vitaminimi, so le-ti pogosto izpostavljeni sončni svetlobi. Če so te oblike trdne, navadno fotostabilnost ni tak problem, če pa pomislimo na razne praške, granulate in šumeče tablete, ki jih je pred uporabo potrebno raztopiti in v raztopini pred uporabo pustiti nekaj časa, pa ima lahko svetloba že značilen vpliv. Namen preverjanja fotostabilnosti zdravilnih učinkovin in zdravil je ovrednotiti vpliv svetlobe na njihovo stabilnost in s tem zagotavljanje njihove ustrezne kakovosti (49). Teste, ki jih izvajamo za potrditev ustrezne fotostabilnosti navaja ICH smernica Q1B (50). Osnova testa je osvetlitev vzorca učinkovine ali gotovega zdravila z ustrezno količino svetlobnih žarkov v vidnem in blizu-UV območju.

Vzorci se po obsevanju najprej vrednotijo organoleptično, nato pa z metodo, ki je ustrezeno validirana za detekcijo potencialno nastalih fotopretvorbenih produktov.

Študije, ki se izvajajo na učinkovinah kot so npr. vitamini, so namenjene stresnim testom spojine same in/ali potrditvenim študijam o njihovi stabilnosti. Učinkovina je lahko v trdnem stanju, v enostavnih raztopinah ali suspenzijah. Testi se izvajajo v inertnih in prosojnih vsebnikih iz stekla ali plastike. S pomočjo takšnih testov lahko ugotovimo mehanizme kemijskih pretvorb, možne stranske produkte in vplive matriksa na hitrost kemijskih pretvorb. Vzorci se vrednotijo organoleptično in analitsko. Študije se izvajajo tudi na gotovih izdelkih, kjer se poleg same fotostabilnosti učinkovine, vrednoti tudi vpliv pomožnih snovi in ovojnine na njo. Te študije so obvezne za vsak izdelek, ki je zdravilo (50). Ustreznost svetlobnega vira se vrednoti s testom kininske kemične aktinometrije. Ta test potrjuje, da je osvetlitev v sistemu, ki ga uporabljam ustrezna in da je razpad oz. pretvorba preiskovane spojine dejansko posledica svetlobe in ne drugih dejavnikov (npr. hidroliza brez prisotnosti svetlobe) (51).

#### 1.4. Analitika vodotopnih vitaminov

Sočasno vrednotenje najpogostejših oblik vitaminov B kompleksa in vitamina C z eno metodo predstavlja velik izziv, saj so si ti vitamini po strukturi zelo različni, prav tako pa je med njimi velika razlika v priporočenih dnevnih odmerkih (2,5 µg za B12 in 80 mg za C) (52).

V literaturi je mnogo metod za vrednotenje posameznih vodotopnih vitaminov (53–66) ali vrednotenje kombinacij manjšega števila vitaminov (67–72). Metod, s katerimi lahko vrednotimo več vodotopnih vitaminov hkrati, je manj (73–80), a nobena ne omogoča sočasne analize vseh glavnih vodotopnih vitaminov z enim injiciranjem. Ker so vodotopni vitamini relativno nestabilni, je pomembno, da imamo na razpolago metodo, ki je stabilnostno indikativna, saj lahko le s tako metodo spremljamo vpliv zunanjih dejavnikov kot je npr. svetloba, na toliko vitaminov hkrati in ob tem dobimo zanesljive rezultate, saj takšna metoda omogoča, da analize ne motijo pri teh pogojih nastali produkti pretvorbe (81). Od reprezentativnih metod, ki so navedene v preglednici II, je stabilnostno indikativnih metod samo pet (53, 66, 79, 80, 82). Samo tri pa so iz vidika stresnih študij validirane kot

stabilnostno indikativne v skladu s trenutnimi regulatornimi smernicami (83). S temi metodah analizirajo po štiri – B1, B2, B3, B6 (82), šest – C, B1, B2 fosfat, B3, B5, B6 (79) in sedem - B1, B2, B3, B5, B6, B9, C (66) vodotopnih vitaminov v različnih izdelkih. V nobeni od navedenih metod ni vitaminov B7 in B12, kar je verjetno posledica njunih nizkih odmerkov.

Za sočasno analizo vodotopnih vitaminov so najbolj težavni B9, B7 in B12 zaradi njihove slabše topnosti, nestabilnosti v raztopinah in nizkih dnevnih odmerkov, ki so tudi do nekaj tisočkrat nižji od drugih vodotopnih vitaminov. Poleg tega predstavlja problem tudi kompleksno ozadje, sestavljeno iz drugih vitaminov, njihovih razgradnih produktov, pomožnih snovi in ostalih komponent v farmacevtskih izdelkih. Zaradi tega se vitamini kot so B7, B9 in B12 navadno vrednotijo zgolj vsak posebej (66, 71–73, 76, 80), nobena od teh metod pa ni stabilnostno indikativna. Farmakopejske metode v Evropski farmakopeji obravnavajo HPLC analitiko zgolj za vsak vitamin posebej (84), v Ameriški farmakopeji pa najdemo metodo HPLC za analizo multivitaminskih tablet v katerih so največ širje vodotopni vitamini (B1, B2, B3 in B6) (85).

Preglednica II: Literturni pregled reprezentativnih metod za analizo vodotopnih vitaminov

Metoda	Vzorec	Analiti	Kolona	Mobilna faza
LM1	Kozmetični izdelki	C	Phenomenex LiChrospher 100 RP18 250×4,6 mm, 5 µm	0,2% metafosforna kislina v vodi (pH=2,8)/MeOH/ACN 90:8:2
LM2	Izdelki (pijače)	B2 fosfat	TSK ODS-80T, 250×4,6 mm, 5 µm	Voda/ACN/fosforna kislina z 1-dekansulfonatom
LM3	Tablete	B12	PPA 150×4,6 mm, 5 µm	30 mM fosfatni pufer (pH=3,0) in ACN 94:6
LM4	Tablete in pomaranče	C	Metachem Polaris C18A RP 150×2,1 mm, 3 µm	0,09% trifluoroocetna kislina v vodi in ACN 97:3
LM5	Tablete	B12	Waters Symmetry C18 150×4,6 mm, 5 µm	0,1% mravljinčna kislina v vodi in ACN (gradientni program)
LM6	Tablete	B9	Supelco Discovery HS-F5 150×4,6 mm, 5 µm	1% mravljinčna kislina v vodi in MeOH (gradientni program)
LM7	Izdelki	B12	/	fosfatni pufer (pH=7,0)

LM8	Tablete	B7	C8 YMC OS 150×4,6 mm, 3 µm	fosforna kislina v vodi (pH=2,2) in ACN 95:5
LM9	Tablete	B12	µBondapak C18 300×3,9 mm, 10 µm	voda in MeOH 70:30
LM10	Parenervalne raztopine	B1	Zorbax phenyl 250×4,6 mm	70% 0,1 M natrijev fosfat z 0,01% Et <sub>3</sub> N, 15% ACN in 15% 50 mM natrijevega oktansulfonata
LM11	Tablete	C	Hypersil BDS-C18, 250×4 mm, 5 µm	10 mM natrijeve soli 1-heksan sulfonske kisline v vodi in ACN 98:2
LM12	Tablete	B9	Ultrasphere ODS 250×4,6 mm, 5 µm	0,03 M natrijev dihidrogen fosfat
LM13	Tablete	B9	µBondapak C18 300×3,9 mm	0,014 M tetra-butil amonijev hidroksid v vodi (pH=7,2) in ACN 84:16
LM14	Tablete	B1, B2, B3, B5, B6, B9, C	Alltima C18 250×4,6 mm, 5 µm	50 mM amonijev dihidrogen fosfat (pH=3,0) in ACN 95:5 in 85:15
LM15	Kapsule	B1, B6	Nucleosil C18 250×4,6 mm, 5 µm	fosforna kislina v vodi (pH=2,1) in ACN 75:25
LM16	Tablete	B1, B2, B3, B6	µBondapak C18 300×3,9 mm, 10 µm	2,5 mM natrijeve soli heksansulfonske kisline v vodi in MeOH (gradientni program)
LM17	Tablete	B1, B2, B3, B6	Hypersil C18 150×4,6 mm	0,5% ocetna kislina z 2,5 mM natrijevim heksansulfonatom v vodi in MeOH (82:18)
LM18	Tablete	B1, B2, B3, B6	µBondapak C18	3-8 mM natrijeve soli heksansulfonske kisline v 1% vodni raztopini ocetne kisline ter 25% MeOH
LM19	Izdelki	B1, B6, B12	Supelco C18 250×4,6 mm	0,05 M natrijev fosfat heptahidrat, 10% metanol in 0,018 M trimetilamin (pH=3,55)
LM20	Tablete	B1, B6, B12	C18 Hypersil-BDS 100×4,6mm, 3 µm	0,015% Et <sub>3</sub> N v vodi (pH=2,7) in ACN (gradientni program)
LM21	Izdelki (tablete in sirupi)	B1, B2, B3, B6, B9, B12	Phenomenex Luna C18 150×4,6 mm, 3 µm	0,05 M amonijev acetat v vodi/MeOH (99/1) in voda/MeOH (50/50)

LM22	Tablete	B1, B2, B3, B6, C	Supelcosil LC-8-DB 250×4,6 mm, 5 µm	natrijeva sol heksansulfonske kisline z Et <sub>3</sub> N v vodi (pH=2,8)
LM23	Tablete	B1, B2, B3, B6, B7, B9, B12, C	µBondapak C18 300×3,9 mm, 10 µm	MeOH/ledocet/H <sub>2</sub> O 26,5:0,5:73 z 10 mM natrij pentansulfonsko kislino z 0,09% Et <sub>3</sub> N
LM24	Tablete	B1, B2, B3, B6, B9, B12, C	C18	15 mM amonijev format z 0,1% Et <sub>3</sub> N v vodi (pH=4,0) in ACN (gradientni program)
LM25	Izdelki	B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12	X-Bridge C18 150×4,6 mm, 3,5 µm	10 mM amonijev format v vodi (pH=3,8) in MeOH (gradientni program)
LM26	Tablete	B1, B2, B3, B6, C	C18	0,005 M heptansulfonska kislina z 0,5% Et <sub>3</sub> N v vodi (pH=3,6) in MeOH (85:15)
LM27	Sirup	B1, B2 fosfat, B3, B5, B6	Zorbax SB-Aq C18 250×4,6 mm, 5 µm	0,0125 M natrijeve soli 1-heksansulfonske kisline z 0,1% o-fosforne kisline (pH 2,4) v vodi in ACN (gradientni program)
LM28	Parenteralna prehrana	B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, C	Zorbax C18 150×4,6 mm, 2,5 µm	10 mM amonijev acetat v vodi (pH=4,5) in MeOH (gradientni program)
LM29	Sirupi	B1, B2, B3, B6	ACE C18 250×4,6mm, 5 µm	0,015 M natrijeve soli 1-heksan sulfonske kisline v vodi (pH 3,0) in MeOH (gradientni program)

## 2. NAMEN DELA

Iz pregleda literature smo prišli do zaključka, da ne obstaja sistematični pregled fotostabilnosti vodotopnih vitaminov. Prav tako ni nobene primerne metode tekočinske kromatografije, ki bi zgolj z enim injiciranjem omogočala sočasno vrednotenje vseh vodotopnih vitaminov v njihovih najpogostejših oblikah. Eden od osrednjih ciljev naloge bo razvoj tovrstne metode, ki bo poleg tega še stabilnostno indikativna, saj le takšna metoda omogoča pridobitev zanesljivih rezultatov. Razvoj metode bo predstavljal velik izziv, saj se 9 izbranih vodotopnih vitaminov med seboj zelo razlikuje po fizikalno-kemijskih lastnostih (npr. polarnost, odsotnost kromoforjev) kot tudi v odmerkih, v katerih jih najdemo v izdelkih (razlika do več tisočkrat). Pri razvoju metode bomo najprej preizkusili različne stacionarne faze kolon, preverili različne mobilne faze ter optimizirali gradientni program, da bomo dosegli optimalno ločbo analitov. Metodo bomo nato validirali v skladu s smernicami ICH (83) ter njeno ustreznost potrdili na izbranih izdelkih.

Študije fotostabilnosti vitaminov bomo izvajali pri konstantnih pogojih v klimatski komori s svetlobnim modulom v skladu s smernico Q1B (50), pri čemer bomo predhodno preverili ustreznost vira svetlobe v komori. Za tem bomo izvedli preliminarno študijo fotostabilnosti posameznih vitaminov, da ovrednotimo njihovo osnovno fotostabilnost. Na najbolj fotolabilnih predstavnikih bomo ovrednotili vpliv različnih dejavnikov na hitrost fotorazgradnje, kot so pH medija, temperatura, vrsta svetlobe in koncentracija vitamina. Za tem bomo pripravili različne zmesi vitaminov, tudi v razmerjih, ki jih navadno najdemo v izdelkih, in vrednotili medsebojni vpliv vitaminov na hitrosti pretvorb. V zaključku bomo preverili še fotostabilnost izbranih izdelkov v oziru na njihovo predvideno uporabo.

Pred začetkom eksperimentalnega dela smo si postavili hipoteze, ki jih bomo tekom sistematičnega kvantitativnega vrednotenja fotostabilnosti vitaminov ali potrditi ali ovrgli:

- *Vpeljali bomo stabilnostno indikativno metodo, ki bo vsaj v eni uri ločila devet vodotopnih vitaminov v oblikah, ki jih najpogosteje najdemo v izdelkih.*
- *Vitamini izkazujejo različno fotostabilnost.*
- *Vitamini v zmeseh izkazujejo drugačno fotostabilnost kot posamezno, kar je zelo odvisno tudi od sestave zmesi. Vitamin B2 destabilizira ostale vitamine.*
- *Vitamini v zmeseh so bolj stabilni pri višjih koncentracijah.*
- *V izdelkih ob pričakovani uporabi ne pride do značilnega upada vsebnosti vitaminov zaradi vpliva svetlobe.*

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. Materiali

##### 3.1.1. Izdelki

V preglednici III so navedeni vsi izdelki, ki smo jih testirali. Izdelka A in C smo imeli iz dveh različnih serij, ena je bila starejša, druga novejša. Zanimalo nas je, ali je kakšna razlika v vsebnosti vitaminov med njima.

Preglednica III: Multivitaminski izdelki, ki smo jih vrednotili

Oznaka	Tržno ime (Proizvajalec)	Oblika	Vrsta izdelka	Rok uporabnosti	Sestava [mg]		RDA
A (A1 in A2)	Elevit Pronatal (Bayer)	filmsko obložene tablete	zdravilo (izdaja brez recepta)	11 2016 (starejši – A1) ter 12 2017 (novejši – A2)	C	100	125%
					B1	1,55	141%
					B6	2,6	186%
					B3	19	119%
					B5	6	100%
				(novejši – A2)	B9	0,8	400%
					B7	0,2	400%
					B12	0,004	160%
					B2	1,8	129%
B	Vitamini in mineralli (Lekarna Ljubljana)	tablete	prehransko dopolnilo	11 2017	C	60	75%
					B1	1,4	127%
					B6	2	143%
					B3	18	113%
					B5	6	100%
					B9	0,2	100%
					B7	0,15	300%
					B12	0,001	40%
					B2	1,6	114%
C (C1 in C2)	B Complex 100 timed release (Jamieson)	tablete s podaljšanim sproščanjem	prehransko dopolnilo	11 2018 (starejši – A1) ter 07 2020 (novejši – A2)	B1	100	9091%
					B6	100	7143%
					B3	100	625%
					B5	100	1667%
					B9	0,4	200%
				(novejši – A2)	B7	0,1	200%
					B12	0,1	4000%
					B2	100	7143%
D	Multivitamin			11 2019	C	80	100%

	(Krüger)	šumeče tablete	prehransko dopolnilo		B1 B6 B3 B5 B9 B7 B12 B2	1,1 1,4 16 6 0,2 0,05 0,0025 1,4	100% 100% 100% 100% 100% 100% 100% 100%
E	Aktiv Mg 400 + B Vitamin + Folna kislina (Doppelherz)	šumeče tablete	prehransko dopolnilo	12 2019	B1 B6 B9 B12	1,1 4,2 0,6 0,005	100% 300% 300% 200%
F	SOLUVIT N (Fresenius Kabi)	prašek za raztopino za infundiranje	zdravilo (izdaja samo na recept)	11 2018	C B1 B6 B3 B5 B9 B7 B12 B2	1130 31 49 400 165 4 0,06 0,005 49	1413% 2818% 3500% 2500% 2750% 2000% 120% 200% 3500%

### 3.1.2. Referenčne spojine

- B1, tiaminijev klorid,  $C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$ , M = 337,26 g/mol 100,6 % (Aca Pharma, Belgija)
- B2, riboflavin natrijev fosfat,  $C_{17}H_{20}N_4NaO_9P$ , M = 478,33 g/mol 75,1 % na suho maso (Spruyt Hillen, Nizozemska)
- B3, nikotinamid,  $C_6H_6N_2O$ , M = 122,12 g/mol 100,3 % (Fagron, Belgija)
- B5, dekspantenol,  $C_9H_{19}NO_4$ , M = 205,25 g/mol 98,7 % (Fagron, Belgija)
- B6, piridoksinijev klorid,  $C_8H_{11}NO_3 \times HCl$ , M = 205,64 g/mol 99,9 % (Fagron, Belgija)
- B7, biotin,  $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ , M = 244,31 g/mol 100,3 % (Fagron, Belgija)
- B9, folna kislina,  $C_{19}H_{19}N_7O_6$ , M = 441,40 g/mol 97 % (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- B12, cianokobalamin,  $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$ , M = 1355,37 g/mol 99,6 % (Fagron, Belgija)

- C, L-askorbinska kislina,  $C_6H_8O_6$ ,  $M = 176,12 \text{ g/mol}$  99,4 % (Sigma-Aldrich, Nemčija)

### 3.1.3. Reagenti in topila

- acetonitril,  $C_2H_3N$ , HPLC čistosti,  $M = 41,05 \text{ g/mol} \geq 99,9 \%$  (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- benzilni alkohol,  $C_7H_8O$ ,  $M = 108,14 \text{ g/mol} \geq 99,99 \%$  (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- citronska kislina,  $C_6H_8O_7 \times H_2O$ ,  $M = 210,14 \text{ g/mol} \geq 99,5 \%$  (Merck, Nemčija)
- demineralizirana voda, Fakulteta za farmacijo
- EDTA,  $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \times 2H_2O$ ,  $M = 372,24 \text{ g/mol} \geq 99,9 \%$  (Merck, Nemčija)
- fosforna kislina,  $H_3PO_4$ ,  $M = 98,00 \text{ g/mol} \geq 85 \%$  (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- kininijev klorid dihidrat,  $C_{20}H_{24}N_2O_2 \times HCl \times 2H_2O$ ,  $M = 396,91 \text{ g/mol} \geq 90 \%$  (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- klorheksidin,  $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$ ,  $M = 505,45 \text{ g/mol} \geq 99,0 \%$  (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- klorovodikova kislina,  $HCl$ ,  $M = 36,46 \text{ g/mol}$ , Titrisol® za pripravo 1 M raztopine (Merck, Nemčija)
- meta-krezol,  $C_7H_8O$ ,  $M = 108,14 \text{ g/mol}, \geq 99 \%$  (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- metanol,  $CH_4O$ ,  $M = 32,04 \text{ g/mol}$ , HPLC čistosti  $\geq 99,9 \%$  (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- metilparaben,  $C_8H_8O_3$ ,  $M = 152,15 \text{ g/mol} \geq 99,0 \%$  (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- milliQ voda, Fakulteta za farmacijo
- natrijiev benzoat,  $C_7H_5O_2Na$ ,  $M = 144,10 \text{ g/mol} \geq 99,7 \%$  (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- natrijiev dihidrogenfosfat monohidrat,  $NaH_2PO_4 \times H_2O$ ,  $M = 137,99 \text{ g/mol} \geq 99,0 \%$  (Merck, Nemčija)
- natrijiev hidroksid,  $NaOH$ ,  $M = 40,00 \text{ g/mol}$ , Titrisol® za pripravo 1 M raztopine, (Merck, Nemčija)
- natrijiev klorid,  $NaCl$ ,  $M = 85,44 \text{ g/mol} \geq 99,5 \%$  (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- para-aminobenzojska kislina,  $C_7H_7NO_2$ ,  $M = 137,14 \text{ g/mol} \geq 99,0 \%$  (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- propilparaben,  $C_{10}H_{12}O_3$ ,  $M = 180,20 \text{ g/mol} \geq 99,0 \%$  (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- pufrne raztopine: pH=2, pH=4, pH=7 (Merck, Nemčija)
- voda za injekcije,  $H_2O$ ,  $M = 18,01 \text{ g/mol}$  (B. Braun Melsungen AG, Nemčija)
- vodikov peroksid,  $H_2O_2$ ,  $M = 34,01 \text{ g/mol} \geq 29,0 \%$  (Sigma, Nemčija)

### 3.1.4. Naprave in pribor

- analizna tehntica Excellence Plus (Mettler Toledo, Švica)
- avtomatske pipete 20-200 µL, 100-1000 µL, 1-10 mL (Eppendorf, Nemčija)
- centrifuga Centrifuge 5414 R (Eppendorf, Nemčija)
- filter z velikostjo por 0,20 µm (Sartorius, Nemčija)
- hladilnik (Gorenje, Slovenija)
- klimatska komora ICH 260L s svetlobnim modulom (Memmert, Nemčija)
- kolone:
  - o Luna C18 150×4,6 mm, 5 µm; Luna C8 150×4,6 mm, 5 µm; Luna Omega PS C18 50×4,6 mm, 3 µm; Luna Omega Polar C18 100×2,1 mm, 1,6 µm; Synergi Hydro-RP 250×4,6 mm, 4 µm; Synergi Fusion-RP 100×2 mm, 2,5 µm (Phenomenex, ZDA)
  - o Zorbax 300SB-C3 150×2,1 mm, 5 µm; Zorbax eclipse plus C18 RRHD 50×2,1 mm, 1,8 µm (Agilent Technologies, ZDA)
  - o Titan C18 100×2,1 mm, 1,9 µm (Supelco, ZDA)
  - o Waters X-Bridge C18 75×4,6 mm, 2,5 µm; Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (Waters Corporation, ZDA)
- magnetno mešalo Icamag RO 5 power (IKA Werke, Nemčija)
- magnetno mešalo Vibromix 10 (Tehntica, Slovenija)
- pH meter SevenCompact™ pH/Ion (Mettler Toledo, Švica)
- predkolona Luna C18 4×3,0 mm (Phenomenex, ZDA)
- sistem za filtriranje (Sartorius, Nemčija)
- sistem za pripravo demineralizirane vode Elix 35 (Millipore Corporation, ZDA)
- sistem za pripravo MilliQ vode A10 Advantage (Millipore Corporation, ZDA)
- steklovina (čaše, merilne bučke, merilni valji, zamaški, čolnički za tehtanje, viale)
- ultrazvočna kadička Sonis 4 (Iskra Pio, Slovenija)
- UHPLC sistem 1290 Infinity (Agilent Technologies, ZDA): binarna črpalka G4220A, avtomatski vzorčevalnik G4266A, termostat G1316C, DAD detektor G4212A, programska oprema EZChrom A.04.05
- UV-Vis spektrofotometer Agilent 8453 (Agilent Technologies, ZDA)
- vodna kopel WB-13 (Kambič Anton, Slovenija)

- ostali pripomočki: keramična terilnica, pestilo, mikrocentrifugirke, plastične epruvete, magneti za magnetna mešala, nastavki za pipete, Parafilm M®, plastične kapalke, spatule, zamaški, stojala za epruvete, rokavice

## 3.2. Analizna metoda

### 3.2.1. Razvoj in optimizacija analizne metode

Tekom razvoja in optimizacije analizne metode smo preizkusili več kolon, mobilnih faz ter gradientnih programov. Vse testirane analizne metode se nahajajo v Prilogi 1.

### 3.2.2. Končni kromatografski pogoji

Kolona: X-Select® CSH™ C18 150×4,6 mm, 3,5 µm s predkolono Luna C18 4×3,0 mm

Temperatura kolone: 40,0 °C

Mobilna faza A: 25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=4,0

Mobilna faza B: MeOH

Pretok mobilne faze: 1 mL/min

Gradientni program: 0 - 4 min 1% B; 4 - 8 min 1 - 16,5% B; 8 - 18 min 16,5% B; 18 - 23 min 16,5 - 25% B; 23 - 25,2 min 25% B; 25,2 - 26 min 25 - 1% B; 26 - 30 min 1% B<sup>1</sup>

Čas analize: 30 minut

Temperatura avtomatskega vzorčevalnika: 8 °C

Valovna dolžina detekcije in retencijski časi analitov: Se nahajajo v preglednici IV.

Volumen injiciranja: 5 µL (od 0,1 do 20 µL, odvisno od posameznega vzorca)

Preglednica IV: Izbrane in alternativne valovne dolžine detekcije, retencijski časi posameznih analitov in razmerje odzivov med izbrano in alternativno valovno dolžino

Analit	Valovna dolžina detekcije [nm]	Retencijski čas [min]	Alternativna valovna dolžina [nm]	Razmerje odzivov
C	290	2,1	210	0,887
B1	245	3,1	210	2,161
B6	290	4,5	210	0,634

<sup>1</sup> Metoda M131 v Prilogi 1

B3	260	6,9	210	0,452
B5	210	9,9	220	4,299
B9	287	14,1	210	1,492
B7	210	17,8	220	4,313
B2 fosfat	445	21,6	210	0,321
B12	362	20,7	210	1,560

### 3.3. Priprava vzorcev

#### 3.3.1. Topila in pufrne raztopine

##### 3.3.1.1. Priprava mobilne faze A

Za pripravo mobilne fazo A smo natehtali 3,45 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  in ga raztopili v približno 900 mL MQ vode. Nato smo raztopini z 0,1 M HCl uravnali pH na 4,0 in jo kvantitativno prenesli v 1 L merilno bučko. Z MQ vodo smo dopolnili do oznake in ponovno pomerili pH, ki je ostal nespremenjen.

##### 3.3.1.2. Priprava 0,1 mM in 1 mM EDTA

Točno smo natehtali približno 37,0 mg EDTA in jo kvantitativno prenesli v 100 mL bučko in z MQ vodo dopolnili do oznake (1 mM EDTA). Iz te raztopine smo nato pripravili 100 mL 0,1 mM EDTA, tako da smo 10 mL 1 mM EDTA z avtomatsko pipeto prenesli v 100 mL bučko in z MQ vodo dopolnili do oznake.

##### 3.3.1.3. Priprava 100 mM fosfatnega pufra, pH=7,0

Natehtali smo 1,38 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , ga kvantitativno prenesli v 100 mL bučko in raztopili v približno 70 mL vode. Z 1 M raztopino NaOH smo pH raztopine umerili na 7,0. Nato smo do oznake dopolnili z MQ vodo in še enkrat pomerili pH, ki je ostal nespremenjen.

##### 3.3.1.4. Priprava 1 mM NaOH

V 500 mL bučko smo odpipetirali 500  $\mu\text{L}$  vnaprej pripravljene 1 M NaOH in do oznake dopolnili z MQ vodo.

### 3.3.1.5. Priprava fiziološke raztopine

Približno natančno smo natehtali 9 gramov NaCl, ga kvantitativno prenesli v 1 L temno bučko in do oznake raztopili z MQ vodo. Dobljeno raztopino smo pred uporabo še razplinili v ultrazvočni kadički.

### 3.3.2. Razvoj in optimizacija analizne metode

#### 3.3.2.1. Priprava referenčnih raztopin vitaminov

Točno smo natehtali približno po 25 mg standardov vsakega od devetih preiskovanih vitaminov, jih kvantitativno prenesli vsakega v svojo 25 mL bučko in raztopili v MQ vodi (1 mg/mL). Zaradi slabše topnosti vitaminov B2, B7 in B9, smo le-te ponovno natehtali in jih raztopili v 1 mM NaOH, saj so se le tako popolnoma raztopili. Za analizo zmesi vseh vitaminov, smo iz predhodno pripravljenih osnovnih raztopin posameznih vitaminov (1 mg/mL), v 10 mL bučko odpipetirali po 1 mL raztopine vsakega od preiskovanih vitaminov in dopolnili do oznake z MQ vodo (0,1 mg/mL posameznega vitamina). Če smo želeli pripraviti zmesi zgolj posameznih vitaminov (npr. zmes zelo polarnih vitaminov), smo v 10 mL bučko odpipetirali po 1 mL osnovne raztopine želenega vitamina (1 mg/mL), in do oznake dopolnili z MQ vodo (0,1 mg/mL vsakega posameznega vitamina, ki nas je zanimal).

#### 3.3.2.2. Stresno testiranje vitaminov

Osnovne raztopine vitaminov C, B1, B3, B5, B6, B12 in B2 fosfata smo pripravili tako, da smo točno natehtali približno po 25 mg standardov vsakega od teh vitaminov, jih kvantitativno prenesli vsakega v svojo 25 mL bučko in raztopili v MQ vodi (1 mg/mL). Za pripravo osnovnih raztopin vitaminov B2, B7 in B9 smo točno natehtali približno po 5 mg standardov teh vitaminov, jih kvantitativno prenesli vsakega v svojo 25 mL bučko in raztopili v 1 mM NaOH (0,2 mg/mL). Nadalje smo te osnovne raztopine vsakega posameznega vitamina v volumskem razmerju 1:1 redčili z različnimi topili, da smo vrednotili kemijsko pretvorbo vitaminov pri stresnih pogojih. Tako smo za vsak vitamin za vsako časovno točko (vzorci ob času 0, po 24ih urah in po 48ih urah) pripravili po 5 vial. Eno od vial smo postavili v termostatirano vodno kopel pri 60°C. Obdelavo vzorcev pred analizo smo za vse vzorce izvedli enako ob vsaki časovni točki. Načini priprave so navedeni v Preglednici V.

## Preglednica V: Priprava stresnih vzorcev

#	Pogoj	Priprava	Shranjevanje vzorca	Obdelava pred analizo
1	Kontrolni	500 µL vz* + 500 µL MQ	pri 25°C, v temi	/
2	Kislinski	500 µL vz + 500 µL 0,2 M HCl	pri 25°C, v temi	dodatek 100 µL 1 M NaOH
3	Bazični	500 µL vz + 500 µL 0,2 M NaOH	pri 25°C, v temi	dodatek 100 µL 1 M HCl
4	Oksidativni	500 µL vz + 500 µL 6% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	pri 25°C, v temi	/
5	Termični	500 µL vz + 500 µL MQ	pri 60°C, v temi	ohladitev na sobno temperaturo
6	Svetlobni%	500 µL vz	pri 25°C, na svetlobi	dodatek 500 µL MQ

\*vz = vzorec; % = dnevna svetloba

### 3.3.3. Vrednotenje analizne metode

#### 3.3.3.1. Priprava raztopin za vrednotenje selektivnosti

Referenčne raztopine za vrednotenje selektivnosti smo pripravili tako, da smo natehtali ustrezeno količino posamezne spojine in jo raztopili v MQ vodi, in sicer referenčne raztopine EDTA (0,1 mM), citronske kisline (0,1 mM), metilparabena (0,5%), propilparabena (0,5%), benzilnega alkohola (1%), natrijevega benzoata (1%), meta-krezola (0,3%), para-amino benzojske kisline (0,1%) in klorheksidina (0,2%).

#### 3.3.3.2. Priprava raztopin za vrednotenje ostalih validacijskih parametrov

Pripravili smo raztopine za vrednotenje linearnosti, točnosti, ponovljivosti, meje zaznave, meje določitve, robustnosti in stabilnosti. Za določanje območja metode smo izbrali koncentracije posameznih vitaminov glede na njihov RDA (52). Osnovne raztopine posameznih vitaminov smo pripravili tako, da smo natehtali ustrezene količine vitaminov in le-te raztopili v MQ vodi (z izjemo B9 in B7, ki smo ju raztopili v 1 mM NaOH). Natehte in volumni topila so navedeni v preglednici VI.

## Preglednica VI: Natehte in volumni topila za pripravo osnovnih raztopin standardov

	Priprava osnovnih raztopin
C	400 mg v 25 mL bučko
B1	14,0 mg v 50 mL bučko
B6	17,0 mg v 50 mL bučko
B3	160 mg v 50 mL bučko
B5	60,0 mg v 50 mL bučko

B9	4,00 mg v 100 mL bučko
B7	12,5 mg v 50 mL bučko
B2 fosfat	17,8 mg v 50 mL bučko
B12	15,6 mg v 50 mL bučko → odpipetiran 1 mL v 25 mL bučko

Delovno raztopino za pripravo vzorcev za vrednotenje validacijskih parametrov smo pripravili tako, da smo v 10 mL bučko odpipetirali po 1 mL osnovne raztopine posameznega vitamina in do oznake dopolnili z 1 mM EDTA. To raztopino smo nadalje ustrezno redčili z 0,1 mM EDTA, da smo dobili koncentracije v območju od 10 % do 400 % RDA vrednosti, ki so predstavljene v preglednici VII. EDTA smo v vzorce dodali zato, da smo povečali obstojnost vitaminov.

Preglednica VII: Koncentracije raztopin standardov za vrednotenje metode

		Koncentracija [mg/L]									
		RDA	C	B1	B6	B3	B5	B9	B7	B2 fosfat	B12
Vzorci umeritvene premice	10%	40,0	0,550	0,700	8,00	3,00	0,100	0,625	0,700	0,0310	
	25%	100	1,38	1,75	20,0	7,50	0,250	1,56	1,75	0,0780	
	50%	200	2,75	3,50	40,0	15,0	0,500	3,13	3,50	0,156	
	100%	400	5,50	7,00	80,0	30,0	1,00	6,25	7,00	0,313	
	200%	800	11,0	14,0	160	60,0	2,00	12,5	14,0	0,625	
	400%	1600	22,0	28,0	320	120	4,00	25,0	28,0	1,25	
QC vzorci	QCh	30%	1200	16,5	21,0	240	90,0	3,00	18,8	21,0	0,938
	QCm	90%	360	4,95	6,30	72,0	27,0	0,900	5,63	6,30	0,281
	QCl	300%	120	1,65	2,10	24,0	9,00	0,300	1,88	2,10	0,0940

QCh= kontrolni vzorec visoke koncentracije, QCm= kontrolni vzorec srednje konc. in QCl= kontrolni vzorec nizke konc.

### 3.3.4. Priprava raztopin za vrednotenje dejavnikov, ki vplivajo na fotostabilnost folne kisline in riboflavina

#### 3.3.4.1. Osnovni pogoji

Vzorce folne kisline smo pripravili tako, da smo 5 mg referenčnega standarda v 25 mL bučki raztoplili v 4 mL 0,01 M NaOH in do oznake dopolnili s 100 mM fosfatnim pufrom pripravljenim po postopku opisanem v 3.3.1.3. (0,2 mg/mL vitamina). Po enakem postopku smo pripravili raztopine riboflavina. Ker smo ugotovili, da je manjši delež vitamina B2 ostal neraztopljen, smo po enakem postopku pripravili raztopine s koncentracijo 0,1 mg/mL tako, da smo natehtali 2,5 mg posameznega standarda in raztoplili na zgoraj opisan način. pH

raztopin s koncentracijo vitamina 0,1 mg/mL je bil 7,3, v raztopinah pa ni bilo vidnih neraztopljenih delcev.

#### 3.3.4.2. Vpliv pH

Vzorce obeh posameznih vitaminov (ki so imeli pH=7,3) smo vrednotili še pri dveh višjih pH vrednostih. Vzorce s pH=9,4 smo pripravili tako, da smo 2,5 mg standarda v 25 mL bučki raztopili v 8 mL 0,01 M NaOH in do oznake dopolnili s 100 mM fosfatnim pufrom, pripravljenem po postopku opisanem v poglavju 3.3.1.3. Vzorce s pH=11,0 smo pripravili tako, da smo 2,5 mg standarda v 25 mL bučki raztopili v 12 mL 0,01 M NaOH in do oznake dopolnili s 100 mM fosfatnim pufrom.

#### 3.3.4.3. Vpliv vrste svetlobe

Vzorce za vrednotenje vpliva vrste svetlobe na obstojnost obeh vitaminov smo pripravili tako, da smo 2,5 mg standarda v 25 mL bučki raztopili v 4 mL 0,01 M NaOH in do oznake dopolnili s 100 mM fosfatnim pufrom. pH tako pripravljenih raztopin je bil 7,3.

#### 3.3.4.4. Vpliv temperature

Vzorce folne kisline (0,1 mg/mL) smo pri različnih temperaturah vrednotili pri pH=7,3 in pH=11. Vzorci so bili pripravljeni enako kot pri zgoraj opisanih vzorcih vrednotenja vpliva pH. Riboflavin smo pri različnih temperaturah vrednotili le pri pH=7,3.

#### 3.3.4.5. Vpliv koncentracije

Raztopino folne kisline nizke koncentracije (0,01 mg/mL) smo pripravili tako, da smo 2,5 mg standarda v 250 mL bučki raztopili v 40 mL 0,01 M NaOH in do oznake dopolnili s 100 mM fosfatnim pufrom. Raztopino srednje koncentracije (0,05 mg/mL) smo pripravili tako, da smo na enak način raztopili 12,5 mg standarda vitamina. Enako smo pripravili raztopine riboflavina. Primerjali smo jih z osnovnima raztopinama vitaminov (0,1 mg/mL). pH vseh pripravljenih raztopin je bil 7,3.

### 3.3.5. Stabilnost in vsebnost vitaminov v izdelkih

Analizirali smo vsebnost vitaminov v prehranskih dopolnilih v obliki šumečih tablet (izdelka D in E), tablet (B in C) ter v zdravilih v obliki tablet (A) in praška za raztopino za

infundiranje (F). Pri izdelkih A in C smo imeli na voljo po dve seriji z namenom medsebojne primerjave vsebnosti vitaminov v tabletah z različnimi roki uporabnosti (preglednica III). Vse izdelke smo pripravili in analizirali v treh paralelah. Metoda ekstrakcije je bila povzeta po Rede (86) in deloma prilagojena. Izdelka v obliki šumečih tablet (D in E) smo raztopili v 200 mL temni bučki v MQ vodi in pustili 10 minut da sta se v celoti raztopila in ju nato centrifugirali za 10 minut pri 25 °C in 13600 g. Bistri supernatant smo nato neposredno analizirali.

Vzorce iz izdelka A in B smo pripravili na podoben način, razlika je bila v tem, da smo vzorce pred centrifugiranjem eno uro mešali s pomočjo magnetnega mešala in nato 10 minut sonicirali v ultrazvočni kadički. Izdelek C je oblika s podaljšanim sproščanjem, zato smo jo pred mešanjem naprej s pomočjo pestila v terilnici zdrobili, prašek homogenizirali in nato kvantitativno prenesli v 200 mL temno bučko, kjer smo ga mešali in sonicirali kot opisano v postopku za izdelka A in B.

Vsebnost vitaminov v izdelku F smo ugotavljali v dveh raztopinah. Prva je bila koncentrat za infuzijo, ki smo ga pripravili tako, da smo v vialo v kateri je prašek za infuzijo s pomočjo avtomatske pipete prenesli 10 mL vode za injekcije in v njej prašek raztopili.

Nato smo ta koncentrat 50-kratno redčili s fiziološko raztopino v 100 mL bučko (pripravljeno po postopku 3.3.1.5.). Ta raztopina je simulirala raztopino za infundiranje. Vsebnost vitaminov v izdelkih smo izmerili neposredno po pripravi vzorcev in v dveh časovnih točkah (12 in 24 ur) ter s tem preverjali stabilnost pripravljenih raztopin. Volumen injiciranja je bil 5 µL za izdelke A, B, D in E, 1 µL za izdelek C ter 0,2 µL (koncentrat za infuzijo) in 10 µL (raztopina za infundiranje) za izdelek F.

Izkoristek metode smo preverjali tako, da smo pripravili raztopino standarda kot za validacijo metode po postopku opisanem v poglavju 3.3.3.2. V vialo smo nato odpipetirali 500 µL te standardne raztopine in 500 µL raztopine vzorca izdelka za vrednotenje vsebnosti in tako dobili njuno zmes v razmerju 1:1. S pomočjo umeritvenih premic smo za posamezni vitamin izračunali njegovo količino v posamezni viali. Izkoristek metode smo izračunali po enačbi:

$$\text{izkoristek} = \frac{2 \times \text{količina vitamina v zmesi} - \text{količina vitamina v vzorcu izdelka}}{\text{količina vitamina v standardu}}.$$

### **3.3.6. Priprava vzorcev za vrednotenje fotostabilnosti izdelkov**

Izdelke C, D, E in F smo ekstrahirali na enak način kot opisano v poglavju 3.3.5. Nato smo v epruvete prenesli po 10 mL pripravljene raztopine (skupno 12 epruvet), jih zaprli, postavili v stojalo in prenesli v svetlobno komoro. Tako smo za vsako od štirih časovnih točk (0, 1, 2 in 3 ure) pripravili tri epruvete (3 paralele). Ob vsaki časovni točki smo po tri epruvete vzeli iz komore, iz njih odvzeli 2 mL vzorca in ga nato centrifugirali za 10 minut pri 25 °C in 13600 g. Bistri supernatant smo nato prenesli v viale in analizirali.

### **3.3.7. Enomesečna študija stabilnosti standardov vitaminov**

Vzorce smo pripravili na način opisan v poglavju 3.3.2.1. V dve 10 mL epruveti smo tako pripravili zmesi, v katerih je imel vsak posamezni preiskovani vitamin koncentracijo 200 mg/L (z izjemo B2 in B7, ki sta imela koncentracijo 100 mg/L), ter po dve epruveti za vsak posamezen vitamin z enako koncentracijo. Tako smo pripravili dvajset vzorcev. V osemnajstih je bila raztopina z enim od preiskovanih vitaminov (devet posameznih vitaminov v dveh paralelkah), v dveh pa zmes vseh preiskovanih vitaminov skupaj. Za vsak vitamin smo vzeli po eno epruveto za kontrolo (vzorci so bili shranjeni v temi na kontrolirani temperaturi) in eno za osvetlitev v komori.

Vzorce za osvetlitev v komori smo prenesli v stojalo in postavili v komoro na osvetlitev, kontrolni pa so bili na stojalu v temi pri enaki temperaturi. Iz vsake epruvete smo ob času 0 odvzeli dvakrat po 600 µL raztopine, prenesli v vialo in jo analizirali. Enako smo ponovili ob časovnih točkah po enem, dveh, treh, sedmih, petnajstih in tridesetih dneh.

## **3.4. Vrednotenje HPLC metode**

Metodo smo validirali v skladu z ICH Q2(R1) smernico (87). Preverjali smo selektivnost, linearnost, točnost, ponovljivost, ugotavliali mejo zaznave in določitve, robustnost metode in stabilnost vzorcev.

### **3.4.1. Vrednotenje selektivnosti**

Selektivnost metode smo vrednotili s primerjavo kromatogramov analiz raztopin posameznih vitaminov, zmesi vseh vitaminov in izbranih snovi, ki bi lahko motile analizo

in jih pogosto najdemo v izdelkih kot so EDTA, citronska kislina, metilparaben, propilparaben, benzilni alkohol, natrijev benzoat, meta-krezol, para-aminobenzojska kislina in klorheksidin. Vzorce smo pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.3.3.1. Preverjali smo morebitno prisotnost kromatografskih vrhov, ki imajo enake retencijske čase kot vitamini. V okviru selektivnosti smo s pomočjo EZChrom programske opreme dodatno vrednotili tudi čistost kromatografskih vrhov in s tem preverjali ali je prišlo do sočasne elucije kakšnih motečih spojin.

### 3.4.2. Vrednotenje linearnosti

Linearost smo vrednotili za vsak posamezen vitamin v zmesi vseh vitaminov, ki smo jo vsak dan analize sveže pripravili iz osnovnih raztopin posameznih vitaminov. Te so bile v vmesnem času shranjene v temi v hladilniku na 4°C. Po postopku opisanem v poglavju 3.3.3.2. smo pripravili raztopine v osmih koncentracijskih točkah (10 – 400 % RDA), ki so predstavljene v preglednici VII. S pomočjo metode najmanjših kvadratov smo izračunali enačbe umeritvenih premic in determinacijske koeficiente ( $R^2$ ). Za mejo sprejemljivosti smo postavili kriterij  $R^2 > 0,999$ .

### 3.4.3. Vrednotenje točnosti in ponovljivosti

Metodo smo vrednotili tudi iz vidika točnost in ponovljivosti. Zanimali sta nas znotraj-dnevna in med-dnevna točnost in ponovljivost znotraj treh dni validacije, dodatno pa tudi ponovljivost injiciranja in točnost metode pri spremembi volumna injiciranja. Točnost in ponovljivost smo vrednotili na kontrolnih vzorcih pri treh koncentracijah (nizka, srednja in visoka), ki pokrivajo celotno območje linearnosti metode in so bili pripravljeni po postopku opisanem v poglavju 3.3.3.2. (Preglednica VII).

Točnost smo vrednotili tako, da smo s pomočjo umeritvenih premic izračunali koncentracijo posameznih vitaminov v kontrolnih vzorcih in jo primerjali z njihovo dejansko koncentracijo (izračunano iz postopka priprave). Mejo sprejemljivosti smo definirali kot interval 95 – 105 %.

Točnost injiciranja smo vrednotili za vse vitamine v območju 0,1 – 20 µL. Zaradi razlike v njihovih odzivih nimajo vsi vitamini enakega območja v katerem je točnost injiciranja znotraj predpisanih mej, ki smo jih postavili na  $100 \pm 5\%$ .

Znotraj-dnevno ponovljivost smo izračunali tako, da smo vsak kontrolni vzorec pripravili v treh paralelkah in vrednotili stopnjo ujemanja rezultatov med njimi. To smo ponovili vsak dan validacije. Med-dnevno ponovljivost pa smo vrednotili tako, da smo med sabo primerjali stopnjo ujemanja rezultatov iz različnih dni validacije kontrolnih vzorcev vsake posamezne koncentracije. Stopnjo ujemanja smo izrazili z relativnim standardnim odklonom (RSD), mejo sprejemljivosti pa smo postavili na 5 %. Ponovljivost injiciranja smo vrednotili tako, da smo isti vzorec (srednji kontrolni vzorec) injicirali šestkrat zapored. Tu smo mejo sprejemljivosti postavili na 2 %.

#### 3.4.4. Določanje meje zaznave in določitve

Mejo zaznave (LOD) in določitve (LOQ) smo izračunali na osnovi treh umeritvenih premic s pomočjo enačbe  $LOD = (3,3 \times \sigma) / S$  in  $LOQ = (10 \times \sigma) / S$ , kjer je  $\sigma$  standardni odklon vrednosti odsekov na ordinati umeritvenih premic, S pa povprečna vrednost njenih naklonov.

#### 3.4.5. Robustnost metode

Robustnost metode smo vrednotili z malimi, a namernimi spremembami kromatografskih pogojev in pri tem preverjali spremembe retencijskih časov vitaminov. Spreminjali smo volumen injiciranja 0,1  $\mu\text{L}$  – 20  $\mu\text{L}$  (vrednotenje točnosti), temperaturo kolone 39 – 41 °C, pretok mobilne faze 0,95 – 1,05 mL/min, pH mobilne faze 3,9 – 4,1 in kolono iz druge serije.

#### 3.4.6. Stabilnost vzorcev

Stabilnost vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku (8 °C) smo vrednotili v treh dneh validacije. Kontrolne vzorce na treh koncentracijskih nivojih, pripravljene po postopku opisanem v poglavju 3.3.3.2., smo analizirali ob času 0 in nato v šesturnih intervalih do 48 ur. Rezultate smo podali kot razmerje odzivov v določeni časovni točki glede na odziv ob času 0. Meja sprejemljivosti je bila podana kot interval 95 – 105 %.

### 3.5. Obdelava podatkov

Rezultate analiz, ki smo jih dobili s pomočjo programske opreme EZChrom, smo obdelali s programsko opremo Microsoft Excel 2010. Izračunali smo parametre kot so povprečna

vrednost,  $\sigma$ , RSD in  $R^2$ . Nato smo določili enačbe premic in jih izrisali. Vzorcem folne kisline in riboflavina smo določili tudi red reakcije. V ta namen smo določili premice odvisnosti koncentracije ( $x$ ) – 0. red, naravnega logaritma koncentracije ( $\ln(x)$ ) – 1. red in obratne vrednosti koncentracije ( $x^{-1}$ ) – 2. red od časa. Enačba tiste kinetike, ki je imela  $R^2$  najbližje 1, je najbolje opisala reakcijo in smo jo uporabili za izračun konstante reakcijske hitrosti. Preko izračuna vrednosti konstant reakcij smo izrazili fotostabilnost vitamina pri posameznih pogojih.

## **4. REZULTATI IN RAZPRAVA**

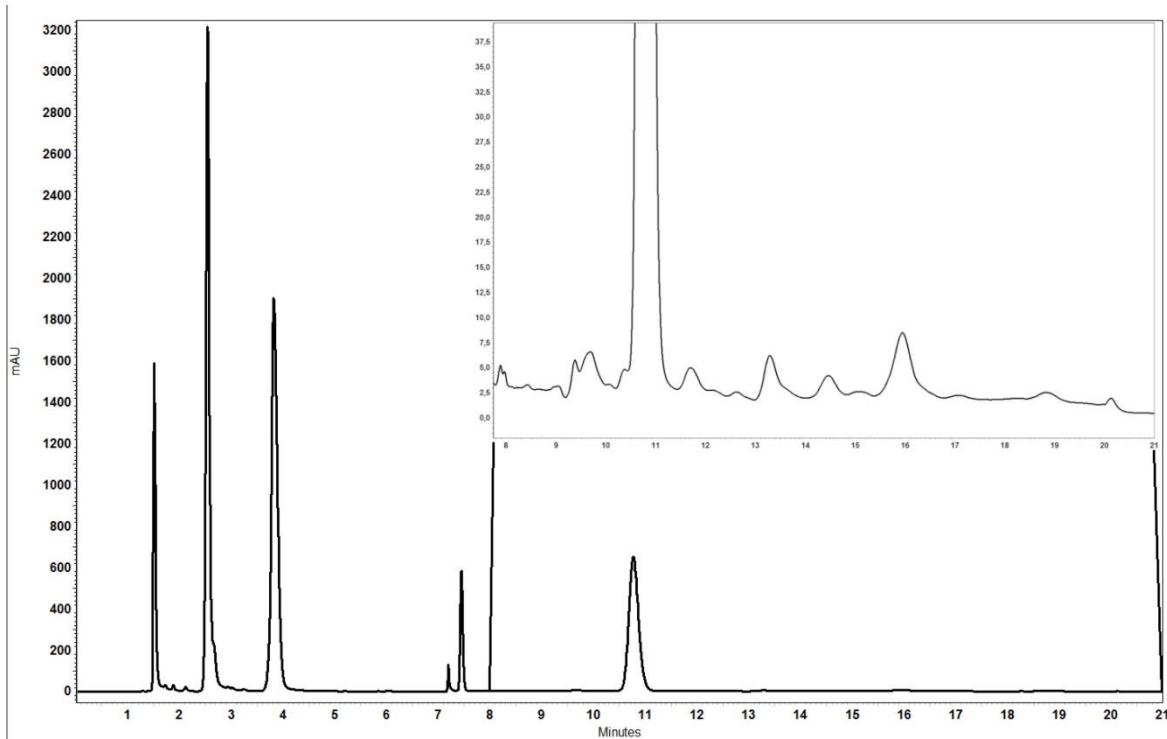
### **4.1. Razvoj in optimizacija analizne metode**

En pomembnejših ciljev magistrske naloge je bil razviti metodo, s katero bi lahko spremljali obstojnost vseh devetih vodotopnih vitaminov v njihovih najpogostejših oblikah hkrati, tudi v bolj stresnih razmerah kot je na primer izpostavitev svetlobi. Vpliv svetlobe na stabilnost vitaminov smo nameravali spremljati tako v vodnih raztopinah, kot tudi v zdravilih in prehranskih dopolnilih.

Razvoj metode je bil precejšen izziv, saj se vodotopni vitamini med seboj zelo razlikujejo po fizikalno-kemijskih lastnostih in je bila že v začetni fazi razvoja zahtevna naloga izbrati ustrezen kolono, na kateri bi lahko zagotovili zadostno ločbo zelo polarnih (vitamini C, B1, B3, B6) in nekoliko manj polarnih vitaminov (B2, B9, B12). Prav tako je izziv predstavljal dejstvo, da B5 in B7 v svoji strukturi nimata močnih kromoforov, zaradi česar absorbirata svetlogo zgolj pri nizkih valovnih dolžinah, kjer pa je med drugim moteč dvig bazne linije pri gradientnem izpiranju zaradi povečevanja deleža organskega dela mobilne faze. Še posebej je to izrazito pri B7, saj je le-ta v izdelkih navadno v nizkih koncentracijah (RDA 50 µg) in ga je zato težava zaznati. B12 je v izdelkih v še nižjih odmerkih (RDA 2,5 µg). Detekcija je sicer možna pri visoki valovni dolžini, pri kateri je absorpcija topila zanemarljiva (362 nm), a je ob relativno večjem šumu detektorja pri tej valovni dolžini ob tako nizki koncentraciji točno določanje svojevrsten izziv. Nasprotno pa je problem mnogo večji odmerek vitaminov C (RDA 80 mg) in B3 (RDA 16 mg), ki pri analizi dosegata zgornjo mejo linearnosti detektorja. Problem njune (pre)velike koncentracije bi sicer lahko premostili s tem, da bi zmanjšali volumen injiciranja, a bi s tem izgubili sposobnost zaznave vitaminov v nizkih koncentracijah (B7 in B12). Obratno pa zaradi vitaminov v visokih koncentracijah ne moremo povečati volumna injiciranja, da bi s tem dodatno izboljšali občutljivost detekcije B7 in B12.

Velik problem je predstavljal tudi dejstvo, da smo pri analizi B2 fosfata zaznali veliko število vrhov (Slika 11), kar je še dodatno oteževalo razvoj metode, saj smo želeli doseči čim boljšo ločbo med vsemi kromatografskimi vrhovi, vrhovi B2 fosfata pa imajo retencijske čase v območju elucije B7, B9 in B12, zaradi česar je bilo zelo zapleteno določiti gradientni program, ki bi zagotovil, da ne bi prišlo do koelucije vrhov B2 fosfata s temi vitaminimi.

Osnova za razvoj metode je sprva predstavljala metoda na koloni Phenomenex Luna C18 (metoda M0 iz priloge 1), ki je že bila razvita v našem laboratoriju (slika 10). Zaradi dejstva,



*Slika 10: Analiza zmesi vitaminov C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9 in B12 z izhodiščno metodo pri 210 nm (v izseku podrobneje predstavljeni vrhovi v času od osme do enaindvajsete minute). Retencijski časi analitov: B1 1,5 min; B3 2,6 min; C 2,7 min; B6 3,9 min; B5 7,5 min; B9 9,3 min; B12 10,8 min; B2 13,3 min in B7 13,5 min*

da se metoda začne izokratsko pri 100 % vodni fazi, smo ugotovili, da na tej koloni ni več manevrskega prostora, da bi zelo polarne analite zadržali na koloni. S tem ne bi mogli izboljšati njihove ločbe do te mere, da bi dosegli takšno selektivnost, da bi lahko bila metoda stabilnostno indikativna (86), saj se vsi vrhovi niso ločili niti na bazni liniji (pride do koelucije dveh vrhov pri retencijskem času 2,65 minute).

Največji problem je bila slaba ločba zelo polarnih analitov, zato smo v naslednjem koraku poizkusili s kolono Phenomenex Luna C8 (M1 do M3), kljub temu, da je večina literaturnih metod narejenih C18 kolonah (Preglednica II). To kolono smo izbrali, ker naj bi bila za ločbo zelo polarnih analitov boljša, a se tudi ta ni izkazala kot ustrezna, saj je prišlo do enakega problema koelucije kot pri Luni C18, a le s krajšim retencijskim časom. Za tem smo izbrali daljšo kolono Synergi Hydro-RP, ki je posebej namenjena ločevanju zelo polarnih analitov in je tudi prilagojena za kromatografske pogoje, pri katerih je delež vodne faze 100 %. Ločba je bila boljša, saj so se zelo polarni analiti z izjemo B1 in B3 dobro ločili (M4 do M28). Ker

pa vrhov teh dveh vitaminov kljub izokratski 100 % vodni fazi v začetku gradientnega programa še vedno ni bilo mogoče ločiti na bazni liniji, to za nas ni bilo sprejemljivo.

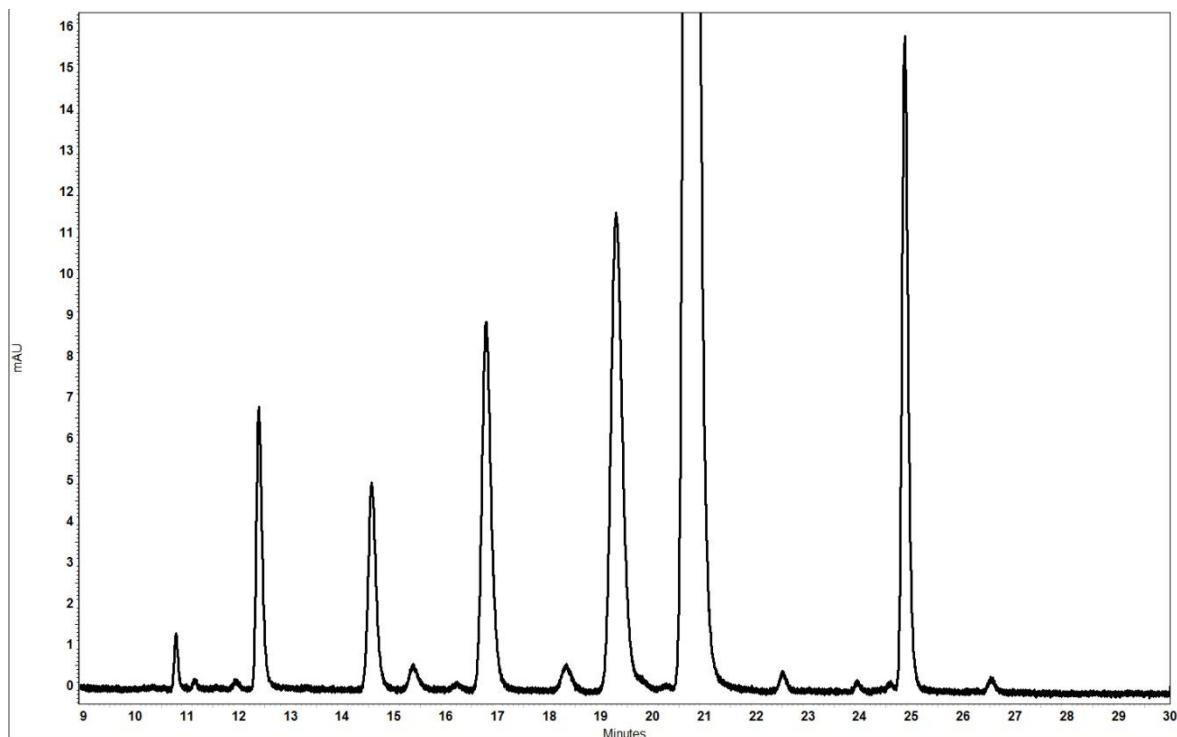
Po temeljitem pregledu literature smo razvoj nadaljevali z metodo iz literature (M30). V njej je bila uporabljena kolona Zorbax Eclipse plus C18 RRHD, s katero je mogoče ustrezeno ločiti 7 vitaminov (C, B2, B3, B5, B6, B7, B12) (88), a nam na enaki opremi pod enakimi pogoji ni uspelo ponoviti ločbe. Še več, v literaturno metodo nista bila vključena vitamina, ki sta nam predstavljala težave pri kromatografski ločbi. B1 je bil problematičen na začetku med ostalimi zelo polarnimi vitaminimi, B9 pa je predstavljal problem pri blažjih gradientnih programih s katerimi smo želeli ločiti vrhova B2 in B7 med seboj, pri čemer se je posledično poslabšala ločba B2 in B9. Nato smo pri nizkem deležu organske faze (metanola) preizkusili več kolon različnih proizvajalcev, kar je razvidno iz Priloge 1 (M31 do M50). Z nobeno, z izjemo zadnje, nam ni uspelo doseči ločbe zelo polarnih analitov vsaj na bazni liniji.

Kolona, na kateri smo uspešno ločili zelo polarne analite na bazni liniji, je bila Waters X-Select CSH® C18. Kolona ima t.i. hibridno površino (CSH® oz. Charged Surface Hybrid), kar med drugim pomeni, da ima stacionarna faza na površini šibek naboj, kar omogoča poleg klasičnih interakcij s C18 repom stacionarne faze tudi ionske interakcije z analitom. To se je kasneje izkazalo kot zelo uporabna lastnost, saj smo z njeno pomočjo ločbo zelo polarnih analitov še izboljšali. Višji delež organske faze je pričakovano skrajšal čas analize, a je do neke točke tudi poslabšal selektivnost (M54 do M64). Nadalje smo kot organski del mobilne faze preizkusili še z acetonitrilom, a se je metanol izkazal kot boljši, saj je bila ločba med vrhovi pri uporabi acetonitrila slabša (M65 in M66).

Največje razlike v zadrževanju zelo polarnih vitaminov na koloni smo dosegli s spremembami pH mobilne faze. Sprememba pH mobilne faze je pomembno vplivala na naboj, ki je bil prisoten na površini stacionarne faze CSH® kolone. V prejšnjih poskusih, ko smo spremenjali druge parametre, smo uporabljali mobilno fazo s pH=4,5. Nato smo poizkusili še mobilne faze v območju nizkega pH in tistem blizu nevtralnega. Ločba je bila v obeh primerih slabša kot tista v predhodnih poskusih (kjer je bil pH 4,5). pH je pomembno vplival na vrstni red elucije analitov (M67 do M71). B1 in B6 sta bila na to spremembo bolj občutljiva kot C (ki je imel v vseh primerih slabo, a ponovljivo zadrževanje) in B3 (ki je imel pri istih deležih organske faze ob spremembah pH podobno zadrževanje). Tako smo potem optimizirali pH mobilne faze do te mere, da smo dobili vrstni red, ki je ob minimalnem deležu organske faze omogočal optimalno ločbo zelo polarnih analitov (M72 do M78).

V nadaljevanju smo v razvoj metode vključili manj polarne analite tako, da smo pripravljali zmesi, v katere smo dodajali po en vitamin naenkrat glede na njegov pričakovani retencijski čas in kromatografske pogoje sproti prilagajali tako, da je bila ločba te zmesi ustrezna, dokler nismo prišli do zmesi z vsemi vitaminimi, za katere smo želeli razviti metodo.

Na tej točki smo se odločili tudi, da namesto riboflavina v prosti obliki (1 kromatografski vrh) uporabimo riboflavin fosfat (gre za zmes spojin, ki v običajnih koncentracijah daje do 14 kromatografskih vrhov), saj je ta oblika v izdelkih bolj pogosta, iz vidika kromatografije pa veliko bolj težavna zaradi večjega števila oblik B2 (Slika 11). Čeprav v literaturi nismo našli metode, v kateri bi bil uporabljen B2 fosfat v prisotnosti še vseh ostalih manj polarnih vodotopnih vitaminov, kar je najverjetnejše posledica njegove težavne analitike, smo se odločili, da sprejmemmo ta dodaten izziv.

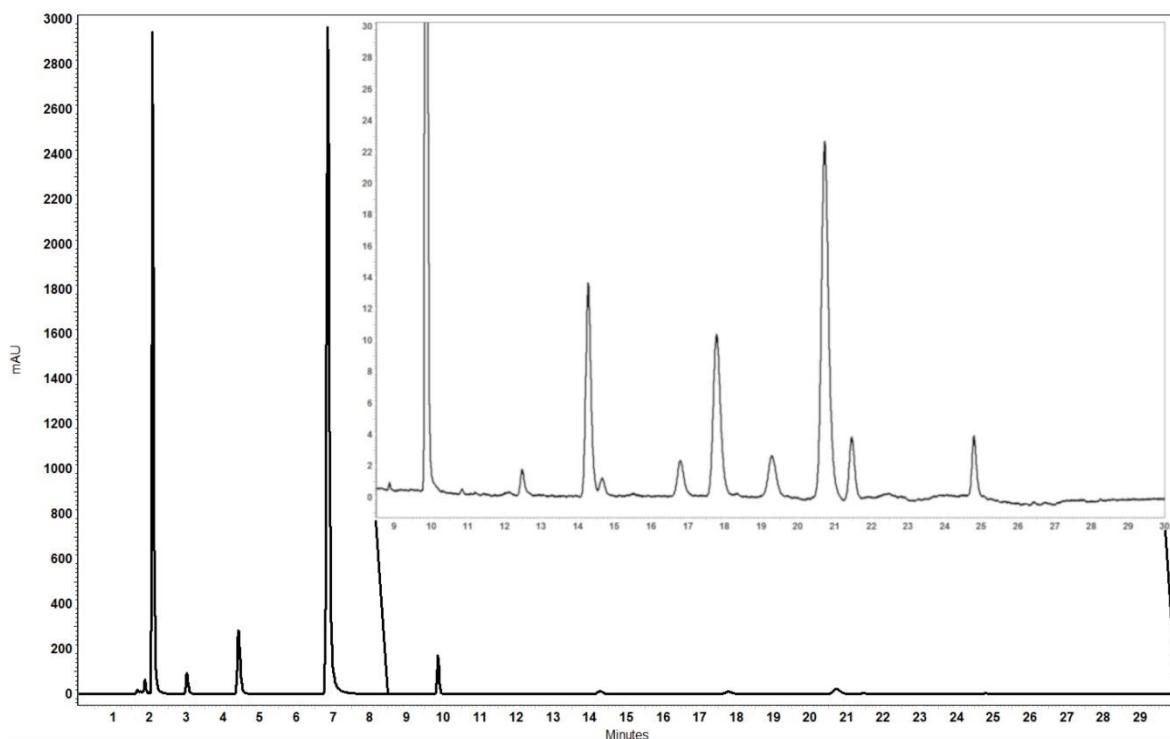


Slika 11: Kromatogram raztopine B2 fosfata. Retencijski časi analitov: B2 5'-fosfat: 20,7 min; B2: 24,9 min

Od te točke naprej smo v razvoj metode vključili B2 fosfat. Preizkusili smo več enostavnnejših in kompleksnejših gradientnih programov dokler nismo bili z ločbo zadovoljni (M79 do M116). Ločba je bila pri metodi M116 že ustrezna, saj so se kromatografski vrhovi vseh vitaminov ločili na bazni liniji. Ker pa smo želeli vrhove še bolj ločiti, smo preizkusili več gradientnih programov, pri katerih je delež organske faze naraščal počasneje in/ali je začel naraščati kasneje (M117 do M131). S tem smo dosegli še večjo selektivnost med vitaminimi z namenom razširitve manevrskega prostora, da pri kasnejših testiranjih vitaminov

pri stresnih pogojih, ne bo prišlo do koelucije analiziranih vitaminov z njihovimi produkti pretvorbe. Skupno število preizkušenih metod je bilo 132 (Priloga 1).

Optimizirano metodo M131 (Slika 12) smo nato uporabili v vseh nadalnjih poskusih. Standarde vitaminov smo izpostavili stresnim pogojem v skladu z ICH zahtevami in preverjali ali je metoda stabilnostno indikativna (50).



Slika 12: Analiza zmesi vitaminov C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9 in B12 s končno metodo pri 210 nm (v izseku so podrobneje predstavljeni vrhovi v času od 9 do 30 minute). Retencijski časi analitov: C 2,1 min; B1 3,1 min; B6 4,4 min; B3 6,9 min; B5 9,9 min; B9 14,2 min; B7 17,8 min, B2 fosfat (glavni vrh) 20,7 min; B12 21,5 min

Najprej smo posneli kromatograme posameznih vitaminov pod stresnimi pogoji in preverjali ali se nastali produkti eluirajo ob enakih retencijskih časih kot analizirani vitamini. Za vrhove produktov, ki smo jih preverjali, smo si postavili mejo da imajo vsaj 1% površine vrha vitamina, kateremu pripadajo. Ugotovili smo da do prekrivanj retencijskih časov ne prihaja. Nato smo stresnim pogojem izpostavili tudi zmes standardov vseh analiziranih vitaminov in posneli kromatograme. Najprej smo preverili kromatograme in ugotavljalci ali se kakšni vrhovi delno prekrivajo. Nato smo za vsak vitamin izračunali razmerja odzivov pri dveh različnih valovnih dolžinah, in s tem dodatno preverjali, ali je prišlo do morebitnega prekrivanja vrhov (kot navedeno za standard v Preglednici IV).

Razmerje odzivov pri dveh različnih valovnih dolžinah je orodje, ki daje dodatno zagotovilo, da pri analizi ne prihaja do prekrivanja kromatografskih vrhov neželenih spojin (produkti pretvorb, pomožne snovi v izdelkih) z vrhovi naših analitov. Ker različne spojine pri različnih valovnih dolžinah različno absorbirajo svetlobo, je manj verjetno, da bi potencialna moteča spojina pri dveh valovnih dolžinah enako močno absorbirala svetlobo in s tem imela tudi enak odziv. Ker njen odziv pri različnih valovnih dolžinah ni isti, je potem razmerje odzivov spojine (in kromatografskega vrha v katerem se nahaja) pri različnih valovnih dolžinah tudi različno. Tako lahko, če je razmerje odzivov primerljivo tistemu standarda, z večjo gotovostjo trdimo, da je kromatografski vrh čist in da ni prišlo do koelucije.

Nazadnje smo vrednotili tudi čistost kromatografskih vrhov in še s tem preverjali, ali je morda prišlo do koelucije dveh spojin v istem kromatografskem vrhu (Preglednica VIII).

Preglednica VIII: Rezultati vrednotenja kromatografske čistosti vrhov ( $f_p$ ) in razmerja odzivov pri izbranih valovnih dolžinah v stresnih vzorcih ( $f_{AUC}$ )

	$f_p$ (standard)	$f_{AUC}$ (standard)	$f_p$ (največje odstopanje)	$f_{AUC}$ (največje odstopanje)	pogoj pri katerem je prišlo do največjega odstopanja
C	1,000	0,887	0,995	0,828	0,1 M NaOH
B1	1,000	2,161	0,998	2,085	0,1 M NaOH
B6	1,000	0,634	0,999	0,603	Svetloba
B3	1,000	0,452	0,999	0,402	0,1 M NaOH
B5	1,000	4,299	0,999	4,327	0,1 M NaOH
B9	1,000	1,492	0,999	1,567	Svetloba
B7	1,000	4,313	0,999	4,377	3% $H_2O_2$
B12	1,000	0,321	0,998	0,305	0,1 M NaOH
B2 fosfat	1,000	1,560	0,999	1,542	0,1 M NaOH

Pri vseh vitaminih pride vsaj pri enem pogoju do manjšega odstopanja vrednotenih parametrov v primerjavi z vrednostmi parametra v vzorcu standarda. Spremembe so majhne, pri veliki večini vzorcev pod 5%, pri ostalih pa pod 10 %. To je najverjetnejše posledica analitske variabilnosti in ne prekrivanja kromatografskih vrhov. V preglednici VIII so navedena maksimalna odstopanja, pri večini vitaminov so ta največja pri stresnih vzorcih, pri katerih so se ti vitaminji pretvarjali v največjem obsegu. Spodnjo mejo ustreznosti za parameter kromatografske čistosti vrha smo postavili na 0,995. Iz dobljenega rezultata lahko zaključimo, da so odstopanja dovolj majhna oz. zanemarljiva ter so posledično kromatografski vrhovi vitaminov čisti.

Rezultati stabilnosti stresnih vzorcev so v Preglednici IX. Najbolj je na pretvorbe občutljiv vitamin C, saj se skoraj v celoti pretvori tako v bazičnem mediju, kot v oksidativnih pogojih in pri visoki temperaturi. V kislem mediju in pri povišani temperaturi imajo tudi po 48 urah z izjemo vitamina C vsi ostali vitamini vsebnost še vedno nad 85 % začetne koncentracije. V bazičnem se poleg vitamina C po 48 urah v celoti pretvorijo tudi B5 in B12. V oksidativnem mediju se v celoti pretvorita C in B7. Na svetlobi pa se po 48 urah v celoti pretvori B9. B2 fosfat se pretvori v slabih 35 %, ostali vitamini pa imajo še po tem času koncentracijo nad 85 % začetne. Iz rezultatov sledi, da so preiskovani vitamini najbolj občutljivi na pretvorbe v bazičnih in oksidativnih pogojih. Najbolj nestabilni so poleg vitamina C še B1, B5, B9, B2 fosfat in B12.

Preglednica IX: Stabilnost posameznih vitaminov v vzorcih pri koncentraciji 500 mg/L (C, B1, B6, B3, B5, B12) oz. 100 mg/L (B2, B7, B9) (izraženo v %) po stresnem testiranju v skladu z ICH smernicami

Analit	0,1 M HCl		0,1 M NaOH		3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		60 °C		Svetloba	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
C	73,1	40,9	2,2	0,0	0,0	0,0	3,3	0,5	95,5	91,0
B1	99,9	99,0	72,8	58,5	80,4	72,6	100,0	99,2	96,4	95,0
B6	99,9	99,9	99,8	99,5	99,8	97,8	99,9	99,2	92,2	88,0
B3	99,4	98,0	66,4	41,8	98,8	96,4	100,0	99,9	89,1	88,2
B5	97,6	89,6	1,2	0,0	92,2	77,9	96,5	87,4	99,9	99,8
B9	98,4	97,5	98,4	94,5	86,2	74,7	99,9	97,0	7,2	0,0
B7	93,3	86,7	99,7	99,6	0,0	0,0	93,3	88,7	99,9	99,8
B2 fosfat	97,8	97,0	68,4	42,7	99,7	98,3	97,8	97,5	75,8	66,8
B12	95,2	88,8	4,7	0,5	98,3	96,7	94,7	91,6	99,0	98,9

## 4.2. Vrednotenje metode

Po razvoju in optimizaciji metode, smo le-to validirali in s tem potrdili, da ustreza vsem zahtevanim parametrom (87). Raztopine vzorcev posameznih vitaminov smo pripravili v koncentraciji, ki bi jo dobili, če bi območje od 10 - 400 % njihove RDA vrednosti raztopili v volumnu 200 mL (kar je običajni volumen za zdravila in oblike kot so npr. šumeče tablete). Te koncentracije smo izbrali, ker so navadno takšna razmerja vitaminov v izdelkih. Izjemni sta bili B7 in B12, katerih koncentracija je bila še dodatno petindvajsetkrat višja (zaradi njune nizke RDA vrednosti), da smo lahko tudi pri nižjih koncentracijskih točkah dobili

ustrezne parametre metode (preglednica VI). Postopek priprave vzorcev je opisan v poglavju 3.3.3.2.

#### 4.2.1. Selektivnost

Selektivnost metode smo ovrednotili na zmesi standardov vitaminov, na vzorcih izdelkov in dodatno še na raztopinah pogosto uporabljenih snovi, ki bi lahko motile analizo kot so EDTA, citronska kislina, metilparaben, propilparaben, benzilni alkohol, natrijev benzoat, meta-krezol, para-aminobenzojska kislina in klorheksidin. Ugotovili smo da nobena od teh snovi ne moti analize. Predhodno smo že potrdili selektivnost metode pri stresnih vzorcih (poglavlje 4.1.).

#### 4.2.2. Linearnost

Umeritvene premice so bile linearne, determinacijski koeficienti pa visoki, kljub relativno veliki razliki med najvišjo in najnižjo koncentracijo med vitaminimi (tudi več kot 20000-kratna razlika). Koncentracijsko območje metode, nakloni, odseki in determinacijski koeficienti ( $R^2$ ) za vse vključene vitamine so navedeni v preglednici X. Glede na široko območje linearnosti metode (10 – 400 % RDA) lahko z metodo že brez spremembe volumna injiciranja analiziramo večino izdelkov na trgu v koncentracijah, ki so tako nižje od priporočenih dnevnih odmerkov za odrasle (prilagojeni odmerki za otroke), kot tudi višje (izdelki, ki imajo višje odmerke od priporočenih).

Preglednica X: Območje metode (10 – 400 % RDA na 200 mL) z umeritvenimi premicami in determinacijskimi koeficienti posameznih vitaminov

Analit	Območje [mg/L]	Naklon	Odsek	$R^2$
C	40 - 1600	5131038	26975464	0,9996
B1	0,55 - 22	614536	-77601	1,0000
B6	0,70 - 28	689675	-197088	1,0000
B3	8,0 - 320	5118648	8111127	1,0000
B5	3,0 - 120	456847	1396699	1,0000
B9	0,11 - 4,0	97466	233131	0,9999
B7	0,63 - 25	88535	21545	0,9999

B2	0,70 - 28	8224	6363	1,0000
B12	0,065 - 1,25	323826	242271	0,9999

#### 4.2.3. Točnost in ponovljivost

Točnost in ponovljivost smo vrednotili znotraj dneva in med dnevi na treh različnih koncentracijskih nivojih kontrolnih vzorcev (poglavje 3.4.3.).

##### *Znotraj-dnevna točnost in ponovljivost ter ponovljivost injiciranja*

Ponovljivost in točnost smo vrednotili znotraj dneva vsak dan validacije (Preglednica XI). Najvišje odstopanje točnosti je bilo pri kontrolnem vzorcu nizke koncentracije za vitamin B12 (104,1 %), kar je še znotraj postavljene meje  $100 \pm 5\%$ . Prav tako je najvišje odstopanje pri B12 iz vidika ponovljivosti pri vzorcu srednje koncentracije in sicer 3,5 %, kar je prav tako znotraj zastavljenih mej ( $RSD < 5\%$ ). Vzrok za toliko večje odstopanje pri B12 v primerjavi z ostalimi vitaminimi leži v dejstvu, da je koncentracija B12 v vzorcu znatno nižja od koncentracij ostalih vitaminov. Vsi vitaminimi so iz vidika ponovljivosti injiciranja znotraj predpisane meje ( $RSD < 2\%$ ), saj je najvišje odstopanje pri B1 in sicer 1,0 %.

Preglednica XI: Znotraj-dnevna točnost, ponovljivost in ponovljivost injiciranja.

Analit	Točnost			Ponovljivost			Ponovljivost injeciranja
	QCl	QCm	QCh	QCl	QCm	QCh	
C	97,9	102,9	100,2	0,2	0,2	0,1	0,8
B1	99,4	100,0	99,9	0,8	0,7	0,1	1,0
B6	100,8	100,0	100,8	0,2	0,2	0,1	0,2
B3	99,8	99,4	99,9	0,3	0,1	0,1	0,1
B5	97,4	99,1	99,6	0,2	0,2	0,1	0,2
B9	100,1	99,7	100,8	0,3	0,3	0,1	0,4
B7	101,3	101,3	100,3	0,6	0,6	0,5	0,7
B2	100,2	99,8	101,1	0,6	0,1	0,2	0,4
B12	104,1	100,0	102,8	2,1	3,5	0,2	1,0

##### *Med-dnevna ponovljivost in točnost*

Ponovljivost in točnost smo vrednotili tudi med tremi dnevi validacije na kontrolnih vzorcih treh koncentracij (Preglednica XII). Vsi vitamini so tudi v tem primeru znotraj postavljenih mej za točnost ( $100 \pm 5\%$ ) in ponovljivost ( $RSD < 5\%$ ), čeprav se večina vitaminov pri vzorcu nizke koncentracije približa meji sprejemljivosti za ponovljivost. S tem smo pokazali, da metoda daje točne in ponovljive rezultate tudi med dnevi.

Preglednica XII: Med-dnevna točnost in ponovljivost.

Analit	Točnost			Ponovljivost		
	QCl	QCm	QCh	QCl	QCm	QCh
C	99,7	103,2	100,7	4,5	0,4	0,4
B1	100,9	100,8	100,8	4,4	1,6	0,7
B6	104,3	99,9	100,8	4,4	0,4	0,3
B3	100,7	99,4	99,9	4,7	0,4	0,3
B5	100,0	99,0	99,4	4,9	0,4	0,2
B9	98,9	99,2	101,0	4,0	0,7	1,0
B7	99,4	101,1	100,2	4,7	4,0	2,7
B2	103,7	99,9	101,1	4,9	0,7	0,3
B12	104,5	101,2	100,8	4,1	4,6	3,6

#### 4.2.4. Meja zaznave in določitve

Meje zaznave in določitve smo izračunali iz povprečne vrednosti naklonov in standardnega odklona odsekov umeritvenih premic posameznih vitaminov (Poglavlje 4.2.2.). Za vse vitamine je meja določitve 10 % RDA ali manj, z izjemo B12, kjer je pri 25 % RDA. Vse meje (Preglednica XIII) lahko po potrebi še dodatno znižamo s povečanim volumnom injiciranja, kar smo uporabili pri analizi razredčenega izdelka F in dokazali ustreznost tega postopka, ki je predstavljen v nadaljevanju (Preglednica XV).

Preglednica XIII: Meja zaznave in določitve za posamezne vitamine

Analit	C	B1	B6	B3	B5	B9	B7	B2	B12
LOD [mg/L]	1,68	0,08	0,06	1,12	0,13	0,04	0,20	0,03	0,02
LOQ [mg/L]	5,10	0,23	0,18	3,40	0,39	0,11	0,59	0,10	0,07

#### 4.2.5. Robustnost metode

Robustnost metode smo preverjali z majhnimi, a namernimi spremembami kromatografskih pogojev. Zanimalo nas je, ali le-ti pomembno vplivajo na selektivnost metode in njen točnost. V Preglednici XIV so navedeni rezultati izračuna parametrov s pomočjo katerih smo vrednotili robustnost metode, v Prilogi 2 pa rezultati izračuna parametrov pri spremenjenih kromatografskih pogojih.

Preglednica XIV: Rezultati izračuna faktorja ločljivosti ( $R_s$ ), števila teoretskih podov (N) in faktorja asimetrije ( $A_f$ ) na vzorcu standarda z obstoječo kolono

Standard	$R_s$	N	$A_f$
C	2,31	10170	1,85
B1	10,05	10497	1,48
B6	10,41	14557	1,39
B3	16,67	43052	1,11
B5	24,86	154773	1,23
B9	23,60	46063	1,31
B7	11,90	37842	1,17
B12	2,87	90062	1,20
B2 fosfat	8,00	52115	1,18

Različni pogoji različno vplivajo na kromatografsko ločbo. Spreminjanje temperature vpliva predvsem na medsebojno ločbo vrhov vitaminov C, B1, B6 ter ločbo vrhov B12 in B2. Isti trend se pojavi pri višjem in nižjem pretoku mobilne faze, pri nižjem pride med vrhom B2 in B12 do poslabšanja ločbe, saj se vrha komajda ločita na bazni liniji. Glede na natančnost kontroliranja kromatografskih pogojev sodobnih (U)HPLC sistemov in dejstva, da smo v poskusu vzeli zelo skrajne spremembe teh parametrov (zelo malo verjetno je, da bi naprava tako močno variirala) mislimo, da je iz tega vidika metoda dovolj robustna. pH mobilne faze pomembno vpliva na spremembe ločbe predvsem vitaminov B1 in B3 (kar smo glede na razvoj metode pričakovali) ter tudi B9. Iz tega sledi, da je potrebno biti pri pripravi mobilne faze posebno pozoren. Tudi pri uporabi enake kolone iz druge (novejše) serije pride le do manjših sprememb ločbe vrhov med seboj, a nobena ni problematična iz vidika poslabšanja ločbe. Vrednotenje števila teoretskih podov je merilo, ki prikazuje učinkovitost kolone. Skozi vse spremembe je za posamezen analit to število dokaj konstantno (se le malo spreminja), prav tako ni velike razlike med kolono novejše in starejše serije. Je pa med njima

razlika v parametru asimetrije vrhov. Faktor asimetrije nad 1 pomeni, da imajo kromatografski vrhovi rep (ang. tailing), ki je lahko posledica dejstva, da na koloni poleg interakcij analitov z C18 repom stacionarne faze in nabojem na njeni površini prihaja tudi do nekaterih nespecifičnih interakcij, ki so, glede na rezultate, večinoma bolj izrazite pri zelo polarnih analitih. Pri spremembi večine parametrov ločbe je ta vrednost za posamezni analiti večinoma konstantna, najbolj opazna razlika je pri koloni nove serije, kjer je faktor asimetrije bližje vrednosti 1, kar je verjetno posledica tega, da ima kolona manj nespecifičnih interakcij analitov s stacionarno fazo, saj je bila kolona popolnoma nova (v tem poskusu prvič uporabljena).

Točnost injiciranja smo vrednotili za vse vitamine v območju  $0,1 \mu\text{L} - 20 \mu\text{L}$  (Preglednica XV). Primerjali smo odzive za vsak vitamin posebej pri posameznih volumnih injiciranja glede na tiste, dobljene pri volumnu injiciranja  $5 \mu\text{L}$  (ta izhaja iz metode). Preko tega smo izrazili točnost injiciranja (odzivi pri volumnu injiciranja  $5 \mu\text{L}$  so definirani kot 100 %). Zaradi razlike v njihovih odzivih nimajo vsi vitamini enakega območja v katerem je točnost injiciranja znotraj predpisanih mej ( $100 \pm 5 \%$ ). Vitamini z nižjimi koncentracijami (npr. B1, B9, B7, B2 in B12) brez težav dosegajo ustrezeno točnost tudi pri najvišjem,  $20 \mu\text{L}$  volumnu injiciranja, tisti z višjimi pa jo dosežejo tudi pri nižjih volumnih (npr. C in B3). S tem testom smo tako potrdili, da lahko, če je potrebno, ustrezeno prilagajamo volumen injiciranja, glede na vsebnost vitaminov v posameznem izdelku in ob tem še vedno dobimo točne rezultate. Glede na veliko raznolikost v vsebnosti vitaminov v različnih multivitaminskih izdelkih in njihovih oblikah, je to zelo pomemben in uporaben podatek.

Preglednica XV: Točnost ob spremjanju volumna injiciranja glede na vrednosti pri volumnu injiciranja  $5 \mu\text{L}$

Analit	Točnost injiciranja [%]	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
C	98,3 - 102,7	0,5 - 5,0
B1	100,0 - 100,4	2,5 - 20
B6	97,1 - 100,8	1,0 - 10
B3	100,0 - 101,0	0,1 - 5,0
B5	98,2 - 100,0	2,5 - 10
B9	97,9 - 100,0	1,0 - 20

B7	98,4 - 100,0	1,0 - 20
B2	98,0 - 100,3	0,1 - 20
B12	97,4 - 101,6	1,0 - 20

#### 4.2.6. Stabilnost vzorcev

Stabilnost vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku na 8°C smo preverjali pri treh različnih koncentracijskih nivojih kontrolnih vzorcev (poglavlje 3.4.3.). Preverjali smo jih 48 ur od časa 0 v intervalih po 6 ur (Preglednica XVI). Za mejo smo si postavili vsebnost vsaj 95 % v primerjavi z začetno koncentracijo vitaminov. Večina vitaminov je bila stabilna 48 ur, z nekaterimi izjemami. B1 je bil pri nizki koncentraciji stabilen samo 42 ur, B5 pri nizki 24 ur, srednji 30 ur in visoki koncentraciji 42 ur, B9 pri nizki in visoki koncentraciji 42 ur in B12 pri nizki 30 ur ter srednji in visoki koncentraciji 36 ur. Vsi vitamini so torej stabilni vsaj 24 ur.

Preglednica XVI: Stabilnost vzorcev po 48 urah, izražena v odstotkih

	C	B1	B6	B3	B5	B9	B7	B2	B12
QCl	97,7	87,3 (95,6)*	98,5	99,5	74,3 (96,0)\${}^{\\$}	92,1 (95,2)*	95,9	99,6	80,2 (98,6)&
QCm	97,0	96,8	98,9	99,5	89,4 (95,0)&	95,5	98,3	97,9	91,3 (95,8)@
QCh	95,8	96,4	97,4	98,3	94,0 (98,0)*	94,2 (96,7)*	98,1	97,3	77,5 (98,0)@

\$ - stabilnost po 24h; & - stabilnost po 30h; @ - stabilnost po 36h; \* - stabilnost po 42h

#### 4.3. Vsebnost vitaminov v izdelkih

V okviru preverjanja ustreznosti analizne metode smo ugotavljali vsebnost posameznih vitaminov v različnih izdelkih. V izbor smo vključili prehranska dopolnila in zdravila ter različne oblike kot so šumeče tablete, tablete, tablete s podaljšanim sproščanjem ter prašek za infuzijo. S tem smo pokrili reprezentativen vzorec izdelkov na trgu. Vzorce smo pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.3.5. in analizirali vsebnost prisotnih vitaminov. Dobljeni rezultati so predstavljeni v preglednici XVII.

S pomočjo izračuna izkoristkov in RSD določitve vsebnosti ter razmerja odzivov pri dveh izbranih valovnih dolžinah smo najprej preverili ustreznost metode. Izkoristki metode so vsi v območju  $100 \pm 5\%$ , kar nam pove, da metoda daje točne rezultate za izbrane vitamine tudi

v izdelkih. Iz povprečja RSD za vsak analit (analiza v treh paralelkah) v vsakem izdelku je razvidno, da so določitve ustrezne, saj je RSD pod 5 %. RSD je višji pri vitaminih z nižjimi odmerki (B7, B9 in B12), kar je pričakovano. Razmerje odzivov pri dveh različnih valovnih dolžinah je orodje, ki daje dodatno zagotovilo, da pri analizi ne prihaja do prekrivanja kromatografskih vrhov neželenih spojin (produkti pretvorb, pomožne snovi v izdelkih) z vrhovi naših analitov. To je pomembno, še posebej, ker lahko izdelek vsebuje tudi druge spojine (poleg produktov), ki bi lahko motile analizo vitaminov. Razmerje odzivov za standard je navedeno v preglednici IV.

Iz primerjave rezultatov razmerja odzivov za izdelke v preglednici XVII ter tistih standarda v preglednici IV lahko zaključimo, da pri analizi izdelkov prihaja zgolj do manjše analitske variabilnosti, saj razmerja niso identična, a so te razlike dovolj majhne, da lahko rečemo, da so zanemarljive.

Vsebnost vitaminov je na splošno bolj variabilna kot pri drugih zdravilnih učinkovinah, dovoljena so večja odstopanja navzgor. To velja tako za prehranska dopolnila kot tudi zdravila. Po Ameriški farmakopeji je kriterij ustreznosti vsebnosti za vodotopne vitamine 90 - 150 %. Visoka zgornja meja je posledica dejstva, da imajo vodotopni vitamini nizko toksičnost, po drugi strani pa so v izdelkih relativno nestabilni, zaradi česar se lahko dajejo v presežku (85). Dodatno smo pri izdelkih A in C uporabili dve seriji istega izdelka, a z različnim rokom uporabnosti (podatki v preglednici III) z namenom preverjanja, ali je med njima kakšna razlika in ali vsebnosti vitaminov v izdelkih s časom upada.

V izdelku A je za večino vitaminov dokaj dobro ujemanje med obema serijama, z izjemo B12, ki je v A1 daleč nad zgornjo dovoljeno mejo 150 %, v A2 pa ga je malo pod spodnjo mejo 90 % glede na navedeno vsebnost. Vsebnost C, B1, B6, B5 in B7 je prenizka, ustreza jo B3, B2 (slednji je sicer rahlo čez zgornjo mejo) ter B9, ki je v obeh serijah v predpisanim območju in je v malem presežku glede na navedeno vrednost.

Tudi v izdelku B je večina vitaminov pod spodnjo mejo za dovoljeno vsebnost, ki jo predpisuje Ameriška farmakopeja (C, B1, B6, B5, B9 in B7), znotraj mej pa zgolj B3 in B2. B12 je v presežku. Zelo opazen je upad vsebnosti vitamina C. Izdelku je sicer potekel rok uporabnosti pred pol leta, tako da je bil tak rezultat pričakovovan.

V izdelku C2 vidimo, da so vsebnosti B1, B6, B3, B9 in B12 v pričakovanem območju. B9 je sicer od ostalih v relativno višjem odmerku, kar je verjetno posledica dejstva, da je v izdelkih velikokrat nestabilen. Vsebnost B2 je določena nižja, ker je odmerek B2 previsok,

da bi se lahko raztopil v takšnem volumnu (B2 je v prosti obliki) in je tako presežena topnost zanj, zaradi česar je določena vsebnost navidezno nižja od resnične. Presenetljiva pa je zelo nizka vsebnost B7, za katerega v takšnem nizkem odmerku topnost zagotovo ni problem. Če te rezultate primerjamo s tistimi v C1, vidimo da je pri večini vitaminov vsebnost podobna, le da so vsebnosti pri C1 v primerjavi za nekaj odstotkov nižje, kar je pričakovano, saj vsebnost vitaminov v izdelku s časom upada. Zelo opazna pa je razlika pri B7, ki ga je v C1 več kot 700 % navedene vrednosti, za razliko od vsebnosti v C2, kjer ga je premalo. Iz tega lahko sklepamo, da je vsebnost B7 v tem izdelku med serijami zelo nehomogena, ali pa je proizvajalec vmes spremenil formulacijo izdelka.

V izdelku D je prav tako večina vitaminov (C, B1, B6, B3 in B2) v predpisanim območju. Prenizka je vsebnost vitaminov B9, B7 in B12. Za B9 in B12 smo že s predhodnimi testi pokazali, da sta v kombinacijah vseh vitaminov do neke mere nestabilna, kar bi lahko bil vzrok za njuno znižano vsebnost v tem izdelku.

Izdelek E vsebuje samo 5 od vodotopnih vitaminov. B2 niti ni naveden kot aktivna učinkovina, ampak samo kot barvilo. Navadno se proizvajalci tega poslužujejo, ko niso prepričani o vsebnosti in stabilnosti nekega vitamina v svojem izdelku, zato ga navedejo zgolj kot pomožno snov, saj se tako izognejo točnemu določanju njegove vsebnosti. B6, B12 in B9 so v predpisanim območju, izven njega pa je B1. Vsebnosti B2 zaradi prej omenjenih razlogov lahko zgolj ovrednotimo, ne moremo pa je primerjati z navedeno.

V izdelku F so v predpisanim območju vsi vitamini z izjemo B5 in B7, ki sta nekoliko pod spodnjo mejo 90 % ter B12, ki je nad predpisano zgornjo dovoljeno mejo.

#### Preglednica XVII: Vsebnost vitaminov v testiranih izdelkih

Izdelek	Vitamin	Deklarirana masa vitamina [mg]	Ugotovljena masa vitamina [mg]	Vsebnost [%]	Izkoristek metode [%]	RSD določitve vsebnosti [%]	Razmerje odzivov pri izbranih valovnih dolžinah
A2	C	100	88,7	88,7	103,0	4,11	0,860
	B1	1,55	1,07	68,9	100,7	1,18	2,192
	B6	2,6	2,26	86,9	100,0	1,73	0,643
	B3	19	19,6	103,3	100,7	0,78	0,452
	B5	6	5,11	85,1	97,0	0,98	4,263

	B9	0,8	0,865	108,1	100,5	4,70	1,485
	B7	0,2	0,141	70,6	100,9	3,78	4,384
	B12	0,004	0,0028	70,4	99,9	4,00	0,325
	B2	1,8	2,7	150,2	99,7	1,59	1,478
A1	C	100	78,9	78,9	101,2	1,94	0,876
	B1	1,55	0,97	62,7	100,8	1,97	2,182
	B6	2,6	2,2	84,6	99,1	4,71	0,646
	B3	19	20,1	105,8	101,2	2,12	0,456
	B5	6	5,05	84,2	98,7	2,81	4,236
	B9	0,8	0,846	105,6	99,8	3,92	1,455
	B7	0,2	0,134	66,8	96,1	3,57	4,356
	B12	0,004	0,0188	471,1	97,1	3,61	0,320
	B2	1,8	2,75	152,5	99,3	1,69	1,481
B	C	60	10,6	17,7	99,7	2,11	0,891
	B1	1,4	1,23	87,7	98,8	3,77	2,186
	B6	2	1,84	92,1	99,8	3,09	0,677
	B3	18	18,2	101,4	99,5	3,25	0,467
	B5	6	4,87	81,2	98,0	3,63	4,288
	B9	0,2	0,141	70,5	100,8	2,94	1,341
	B7	0,15	0,106	70,8	101,2	2,85	4,310
	B12	0,001	0,0018	177,2	98,8	0,69	0,341
	B2	1,6	2,05	128	100,1	3,71	1,527
C2	B1	100	105	104,6	101,8	1,00	2,041
	B6	100	108	108	100,5	1,01	0,650
	B3	100	109	109,1	100,3	0,73	0,457
	B5	100	86	86	100,7	0,55	4,314
	B9	0,4	0,568	142,1	100,5	4,12	1,345
	B7	0,1	0,011	11,3	102,3	3,27	4,357
	B12	0,1	0,0981	98,1	100,4	4,54	0,318
	B2	100	48,9	48,9	99,2	3,03	1,511
C1	B1	100	102	102,2	101,1	2,99	2,038
	B6	100	107	106,7	100,9	1,14	0,649
	B3	100	106	105,6	101,4	2,02	0,451
	B5	100	77,8	77,8	100,9	1,26	4,260
	B9	0,4	0,418	104,5	99,1	1,97	1,351
	B7	0,1	0,777	777	99,3	4,42	4,362
	B12	0,1	0,0728	72,8	101,4	4,65	0,336
	B2	100	54,8	54,8	101,3	3,01	1,512
D	C	80	106	132,5	100,7	3,14	0,858

	B1	1,1	1,23	112,1	101,4	3,15	2,134
	B6	1,4	1,51	108,1	101,0	4,24	0,631
	B3	16	17,5	109,5	100,5	4,04	0,457
	B5	6	6,46	107,6	97,6	0,43	4,355
	B9	0,2	0,170	85,2	102,1	3,23	1,508
	B7	0,05	0,031	61,9	100,3	0,32	4,334
	B12	0,0025	0,0015	61,4	99,7	4,74	0,328
	B2	1,4	1,49	106,6	100,6	4,57	1,531
E	B1	1,1	0,61	55	99,1	0,96	2,067
	B6	4,2	3,88	92,5	98,1	1,06	0,635
	B12	0,005	0,0060	120,2	99,7	4,46	0,335
	B9	0,6	0,613	112,1	100,0	3,72	1,470
	B2	ni navedeno	0,238	/	99,0	4,41	1,579
F	C	1130	1192	105,5	100,0	1,09	0,868
	B1	31	29	93,6	100,6	0,18	2,068
	B6	49	47	95,6	100,1	1,19	0,621
	B3	400	392	98,1	100,1	0,96	0,457
	B5	165	145	88,0	103,3	0,83	4,299
	B9	4	4,92	123,0	98,5	3,51	1,440
	B7	0,600	0,501	83,5	100,4	4,57	4,307
	B12	0,050	0,0945	189,0	98,9	2,33	0,345
	B2	49	51	103,9	101,4	1,37	1,542

V splošnem ni ustrezen noben izmed testiranih izdelkov, saj je izven območja, ki ga predpisuje Ameriška farmakopeja, v vsakem izdelku vsaj en izmed vitaminov. To je do neke mere presenetljivo, saj so med testiranimi izdelki tudi zdravila, ki bi naj bila ustreznna iz vseh vidikov kakovosti, varnosti in učinkovitosti. Tak rezultat je mogoče tudi posledica same stabilnosti vitaminov v izdelkih, saj so bili nekateri izdelki blizu roka uporabnosti oz. že čez njega. Najbolj se predpisanim mejam približa izdelek F, kar je pričakovano, glede na to da je zdravilo, ki se uporablja za infuzije. Pričakovali smo večje razlike med zdravili in prehranskimi dopolnilni, saj načeloma velja, da so prehranska dopolnila zaradi manjših regulatornih zahtev manj kakovostna, a v splošnem rezultati tega ne potrjujejo. Prav tako ni opazne značilne razlike med različnimi oblikami kot so tablete in šumeče tablete, saj med njimi ni značilnih razlik v odstopanju vsebnosti od navedene. Do neke mere je presenetljivo dejstvo, da prihaja pri nekaterih izdelkih (zanimivo pa, da ne med serijami istega izdelka) do ogromnih presežkov vitaminov B7 in B12. To lahko pripišemo dejству, da sta odmerka teh

dveh vitaminov v izdelkih majhna, kar bi lahko bil dejavnik, ki prispeva k temu, da njuna vsebnost v zmesih ni homogena, in lahko pride do večjih odstopanj od navedene vsebnosti.

#### 4.4. Vrednotenje fotostabilnosti

Po temeljitem pregledu literature smo ugotovili, da še ne obstaja sistematicen pregled fotostabilnosti vodotopnih vitaminov, iz katerega bi lahko neposredno med seboj primerjali vse vodotopne vitamine v njihovih najpogostejsih oblikah v izdelkih. Fotostabilnost se v literaturi navadno podaja zgolj opisno (npr. da je nek vitamin stabilen ali nestabilen), ni pa podprta z ustreznimi eksperimentalnimi rezultati (45, 47). Študije fotostabilnosti posameznih vitaminov oz. v kombinacijah so redke, v največjem obsegu pa so do sedaj vrednotili riboflavin (preglednica I). Zaradi tega smo vrednotenje fotostabilnosti vodotopnih vitaminov zasnovali sistematično.

Za vrednotenje fotostabilnosti smo uporabili predhodno razvito in validirano analizno metodo, osvetlitev vzorcev pa smo izvajali v klimatski komori s svetlobnim modulom, ki je namenjena testiranju fotostabilnosti v skladu s smernico ICH Q1B (50). Ker je bila komora v ta namen uporabljeni prvič, smo najprej preverili njenu ustreznost in spoznavali zakonitosti njenega delovanja na posameznih vitaminih.

Najprej smo izvedli preliminarno študijo fotostabilnosti z namenom ugotovitve, kateri vitaminji so najbolj fotonestabilni. Naš cilj je bil ugotoviti kakšna je osnovna fotolabilnost posameznih vitaminov. Ker sta se B2 in B9 izkazala kot zelo nestabilna in tako omogočala relativno hitro vrednotenje njune fotostabilnosti, smo ju uporabili kot modelni spojini za sistematično vrednotenje različnih vplivov na hitrost njune fotolize.

Zaradi različne odpornosti vitaminov na svetlobo smo izvedli 1-mesečno študijo fotostabilnosti vitaminov, tako posameznih, kot v zmesi. Na osnovi dobljenih rezultatov smo v nadaljevanju vrednotili fotostabilnost zmesi vitaminov v realnih razmerjih, ki jih najdemo v izdelkih (RDA), saj smo s tem želeli ugotoviti fotostabilnost vitaminov v zmesi, ki je iz vidika uporabnosti tudi najbolj relevantna. V okviru teh testov smo pripravili tudi različne kombinacije zmesi, pri čemer smo se osredotočili na štiri ključne vitamine in sicer B2, B9, B12 in C. V zaključku naloge smo vrednotili še fotostabilnost izbranih izdelkov in s tem preverjali kako so vitaminji občutljivi na svetlobo pri njihovi uporabi.

#### 4.4.1. Preverjanje ustreznosti vira osvetlitve

Teste z osvetlitvijo želimo izvajati pri kontroliranih pogojih, kar pri testih na sončni svetlobi ni zagotovljeno, ker je ne moremo kontrolirati in smo odvisni od vremena oz. drugih virov osvetlitve. Zaradi tega smo uporabili klimatsko komoro s svetlobnim modulom. Komora omogoča poljubno nastavitev temperature in vlažnosti, ki ju lahko stabilno vzdržuje na daljše časovno obdobje (89). Komora je bila tudi verificirana s strani zunanjega izvajalca. Ustrezna osvetlitev po ICH Q1B smernici je definirana kot izpostavitev  $1,2 \times 10^6$  lux\*ur oz. izpostavitev svetlobi v spektru blizu UV s količino energije vsaj  $200 \text{ Wh/m}^2$ . Prvi parameter je ekvivalent povprečni osvetlitvi s samo vidno svetlobo v času 90 dni, drugi pa simulira 1-2 dnevno izpostavitev vzorca sončni svetlobi skozi steklo okna, ki prepušča spekter blizu UV svetlobe (51). Smernica navaja tudi test kininske kemične aktinometrije, ki smo ga izvedli, da smo dodatno preverili ali je vir svetlobe v komori ustrezan. Test predpisuje, da poleg vzorca, ki ga osvetljujemo, v steklene ampule pripravimo 2% raztopino (m/v) kininijevega klorida dihidrata. Ene ampule postavimo v temo za kontrolo, druge pa osvetljujemo pod enakimi pogoji kot vzorce. Ob določenih časovnih točkah merimo absorbanco vzorcev pri 400 nm. S pomočjo enačbe  $\Delta A = A_T - A_0$ , kjer je  $A_T$  absorbanca osvetljenega vzorca in  $A_0$  absorbanca kontrolnega vzorca, izračunamo razliko med absorbancama. Ko je  $\Delta A > 0,9$ , potem je osvetlitev ustrezno dolga (49).

Test smo izvedli tako, da smo raztopine kinina za testiranje komore pripravili v treh paralelah (kontrolni vzorec je bil en), s spektrofotometrom pomerili absorbanco vzorca na začetku in v določenih časovnih točkah. Rezultati so predstavljeni v preglednici XVIII. Absorbanca osvetljenega vzorca kinina iz komore je naraščala, posledično pa tudi narašča razlika med absorbancama, ki smo jo opisali z linearno enačbo  $A_T - A_0 = 0,0078t - 0,1759$  z determinacijskim koeficientom  $R^2 = 0,966$ , kjer  $t$  predstavlja čas v urah. Ker je pogoj za dovolj dolgo osvetlitev razlika absorbanc večja od 0,9, smo s pomočjo te enačbe izračunali, kdaj je takšna osvetlitev ustrezna. To je po 138 urah.

Na osnovi teh rezultatov smo zaključili, da svetlobni modul komore deluje in da potrebujemo nekaj dni, da dosežemo ustrezno svetlobno izpostavitev. To pomeni, da bodo tisti vzorci, ki bodo pri osvetlitvi v komori fotonestabilni, zelo verjetno tudi nestabilni v pogojih, ki jih lahko pričakujemo ob normalni uporabi, kar potrjuje, da je vir svetlobe v komori dober približek tem pogojem.

Preglednica XVIII: Test kininske kemične aktinometrije z navedbo absorbanc kininskih vzorcev v odvisnosti od časa odvzema (n=3)

Čas odvzema vzorca [h]	Absorbanca kontrolnega vzorca ( $A_0$ )	Absorbanca vzorca iz komore ( $A_T$ )	Razlika absorbanc ( $A_T - A_0$ )
0	0,092	0,092	0,000
27	0,073	0,190	0,116
73	0,056	0,367	0,311
96	0,083	0,466	0,383
121	0,071	0,763	0,691
168	0,052	1,157	1,105

#### 4.4.2. Dolgotrajna študija fotostabilnosti posameznih vitaminov

Uvodoma smo preverili fotostabilnost posameznih vitaminov v 1-mesečni preliminarni študiji po postopku opisanem v poglavju 3.3.7. Rezultati študije za dve reprezentativni časovni točki so predstavljeni v preglednici XIX, celotni rezultati študije pa v prilogi 3.

V kontrolnih raztopinah posameznih vitaminov, ki so bile v temi, smo opazili, da niso vsi vitamini enako stabilni. Z izjemo C, B9 in B2 je pri vseh ostala koncentracija nad 90 % začetne še po enem mesecu. Vitamin C je sam po sebi v vodnih raztopinah nestabilen in se je v celoti pretvoril že po 24 urah, B9 in B2 pa sta bila zaradi boljše topnosti raztopljena v 1 mM NaOH, kar je botrovalo k njuni hitrejšji pretvorbi. Koncentracija B9 je tako po 30 dneh padla na približno 60 %, B2 pa se je v celoti pretvoril že po 15 dneh.

Podobno je bilo v posameznih raztopinah vzorcev iz komore. Pri B1, B6, B3, B5, B7 in B12 je koncentracija ostala nad 90 % začetne še po enem mesecu. Vitamini C, B9 in B2 pa so se pod vplivom svetlobe vsi v celoti pretvorili že v roku 24 ur.

S tem testom smo potrdili, da je razpad oz. pretvorba vitaminov res posledica vpliva svetlobe in ne spontanih reakcij, katerim so spojine podvržene tudi v odsotnosti svetlobe. Pri nekaterih vitaminih (C, B9 in B2) je pretvorba hitra tudi v odsotnosti svetlobe, kar pa smo ugotovili šele po prvem odvzemu vzorca, saj je v nekaterih vzorcih pretvorba vitaminov v tem času (24 ur) potekla že v celoti. Zaradi tega bi morali prvi vzorec odvzeti že prej, po samo nekaj urah.

Iz tega smo zaključili, da je razlika v fotostabilnosti med vodotopnimi vitaminimi zelo različna. Ugotovili smo tudi, da je pretvorba vitaminov B2 in B9 pod vplivom svetlobe zelo hitra, zaradi česar smo se odločili, da se bomo lotili sistematičnega vrednotenja vplivov na hitrost fotolize obeh vitaminov, saj njuna hitra pretvorba omogoča, da lahko v relativno kratkem času z enostavnimi spremembami pogojev pridobimo veliko podatkov.

Preglednica XIX: Rezultati fotostabilnosti raztopin posameznih vitaminov po 1 in 30 dneh (vsi vitaminini v konc. 200 mg/L, razen B2 in B7 v konc. 100 mg/L)

1 dan	Kontrolni vzorec [%]	Vzorec iz komore [%]	30 dni	Kontrolni vzorec [%]	Vzorec iz komore [%]
C	0,6	0,0	C	0,0	0,0
B1	100,0	100,0	B1	99,7	99,1
B6	100,0	85,6	B6	98,0	6,2
B3	99,9	99,8	B3	99,4	96,4
B5	100,0	100,0	B5	99,9	98,6
B9	99,7	0,8	B9	58,8	0,0
B7	100,0	99,9	B7	95,0	94,6
B12	100,0	99,8	B12	99,1	92,8
B2	72,5	1,8	B2	0,0	0,0

#### 4.4.3. Vpliv parametrov na kinetiko fotolize riboflavina

Najprej smo optimizirali pogoje za izvedbo testiranja fotostabilnosti in nato pripravili nekaj raztopin z B2 s koncentracijo 200 mg/L po postopku opisanem v poglavju 3.4.1. S temi raztopinami smo določili osnovno hitrost pretvorbe in potrebno frekvenco odvzemanja vzorcev. Nadalje smo vrednotili vpliv različnih potencialnih parametrov na hitrost pretvorbe, in sicer vpliv pH-ja raztopine vzorca, vrste svetlobe s katero vzorce obsevamo, temperature komore pri kateri vzorce obsevamo in koncentracije vzorca. Pri obdelavi rezultatov smo določiti tudi kinetiko pretvorbe B2, ki jo najbolje opisuje pri določenih pogojih (opisano v poglavju 3.5.). To nam je omogočilo izračun konstant reakcijske hitrosti in potem neposredno primerjavo različnih pogojev izvedbe testa fotostabilnosti. Pretvorba B2 je pri

večini pogojev najbolj ustreza kinetiki 2. reda, v nekaterih tudi kinetiki 1. reda. Enačba, ki opisuje pretvorbo po kinetiki 0. reda, pa je v vseh poskusih slabo opisala upad koncentracije, saj so bili determinacijski koeficienti navadno nižji od 0,80. V Preglednici XX so predstavljeni rezultati posameznih poskusov, navedena konstanta je povprečna vrednost treh paralel meritev iz istega poskusa.

Preglednica XX: Konstante reakcijskih hitrosti (k) fotorazgradnje B2 v posameznih poskusih s pripadajočimi determinacijskimi koeficienti

	k (II. red) [L/mg*min]	R <sup>2</sup> (II. red)	k (I. red) [1/min]	R <sup>2</sup> (I. red)
Osnovni vzorci 1 (200 mg/L)	2,90E-04	0,973	*	*
Osnovni vzorci 2 (200 mg/L)	2,86E-04	0,937		
Osnovni vzorci 3 (100 mg/L) <sup>\$</sup>	2,16E-04	0,969	0,007	0,953
Vpliv pH (pH=9,4)	6,27E-04	0,951	0,026	0,992
Vpliv pH (pH=11)	4,93E-02	0,864	0,167	0,974
Vpliv svetlobe (le UV)	3,56E-04	0,994		
Vpliv svetlobe (le VIS)	3,19E-04	0,960	0,013	0,999
Vpliv temp. (15° C)	1,96E-04	0,975	0,014	0,984
Vpliv temp. (40° C)	1,06E-03	0,832	0,028	0,983
Vpliv konc. (10 mg/L)	5,27E-03	0,961	*	*
Vpliv konc. (50 mg/L)	1,10E-03	0,909		

\* - enačba reakcije tega reda ima determinacijski koeficient < 0,80, zato v tabeli ni prikazana

\$ - ti vzorci služijo za primerjavo ostalih parametrov (vpliv konc., pH, temperature, vrste svetlobe)

Iz preglednice XX lahko vidimo, da je pretvorba v prvih osnovnih vzorcih (1 in 2) dokaj ponovljiva med sabo. Raztopina osnovnega vzorca 3 je služila kot primerjava za hitrost pretvorb pri ostalih parametrih in ima koncentracijo 100 mg/L. Ima tudi konstantno temperaturo, pH in vir svetlobe, zaradi česar nam omogoča primerjavo posameznih sprememb vsakega od teh parametrov. Vsi nadaljnji vzorci (z izjemo tistih, pri katerih smo vrednotili vpliv koncentracije) imajo koncentracijo 100 mg/L B2. Vpliv koncentracije je pomemben parameter, kot pri večini spojin. Pri polovični koncentraciji (50 mg/L) je pretvorba 50,9-krat hitrejša, pri nizki (10 mg/L) pa že 244-krat hitrejša. Rezultati so primerljivi z literurnimi podatki za druge učinkovine (90). Ta vpliv je lahko pomemben

pri izdelkih za otroke, kjer so odmerki nižji ali v razredčenih raztopinah (npr. pri večjih volumnih infuzij).

V preglednici XX vidimo, da enačba pretvorbe po kinetiki prvega reda bolje opisuje hitrost pretvorbe pri višjem pH, kot tista, ki opisuje pretvorbo po kinetiki drugega reda. Pretvorba pri pH=9,4 je 3,6-krat hitrejša, pretvorba pri pH=11 pa kar 23,6-krat hitrejša kot pri pH=7,3, kar je primerljivo z drugimi učinkovinami (91). Iz tega vidimo da je tudi za fotolizo pomembna optimalna izbira pH medija. Ker ima osnovni vzorec 3 zaradi nižje koncentracije B2 za 0,2 enote nižji pH, je hitrost pretvorbe v njem manjša, kar se sklada z rezultati tega poskusa.

Vpliv temperature na fotolizo je, kot pri vseh vrstah kemičnih pretvorb, pomemben parameter. Hitrost pretvorbe pri 15°C je 1,1-krat nižja, pri 40°C pa 4,9-krat višja kot pri 25°C. Iz tega sledi, da lahko pretvorbo malo upočasnimo s tem, da vzorec shranjujemo pri nižji temperaturi (npr. v hladilniku), kar je tudi praktičen način podaljšanja obstojnosti raztopin vitaminov.

Vpliv vrste svetlobe na pretvorbo je prav tako pomemben parameter. B2 se pod samo vidno svetlogo (VIS) pretvarja 1,5-krat hitreje, pod samo ultravijolično (UV) pa 1,6-krat hitreje kot pri kombinaciji obeh hkrati. Čeprav bi bilo logično, da bi v kombinaciji obeh virov pretvorba potekala hitreje kot pri posameznem, lahko to razliko pripisemo zasnovi komore, saj le-ta ob uporabi obeh žarnic hkrati ali pa vsake posamezne uporablja isto napetost. Če sta torej prižgani obe hkrati, se le-ta porazdeli med obe žarnici in tako svetita manj intenzivno, kot če je vklopljena le ena.

#### 4.4.4. Vpliv parametrov na kinetiko fotolize folne kisline

Vrednotenje kinetike fotolize B9 smo izvedli na podoben način kot B2. Najprej smo pripravili dve seriji vzorcev, da smo optimizirali pogoje za izvedbo testiranja fotostabilnosti, nato pa smo sistematično spremenjali različne parametre. Rezultati so predstavljeni v preglednici XXI. Pretvorba B9 je najbolj ustrezala kinetiki 0. reda, saj sta bila determinacijska koeficienta za kinetiki 1. in 2. reda pri vseh poskusih bistveno nižja (največ do 0,85).

Preglednica XXI: Konstante reakcijskih hitrosti ( $k$ ) fotorazgradnje B9 pri posameznih poskusih s pripadajočimi determinacijskimi koeficienti

	k (0. red) [mg/L*min]	R <sup>2</sup> (0. red)
Osnovni vzorci 1 (200 mg/L)	2,63E-02	0,945
Osnovni vzorci 2 (100 mg/L) <sup>\$</sup>	2,41E-02	0,921
Vpliv pH (pH=9,4)	2,22E-02	0,968
Vpliv pH (pH=11)	2,71E-03	0,991
Vpliv svetlobe (UV)	3,03E-02	0,937
Vpliv svetlobe (VIS)	2,86E-03	0,862
Vpliv temp. (15° C, pH=11)	7,10E-04	0,964
Vpliv temp. (40° C, pH=11)	2,42E-03	0,953
Vpliv temp. (40° C, pH=7,3)	3,29E-02	1,000
Vpliv konc. (10 mg/L)	2,43E-02	0,929
Vpliv konc. (50 mg/L)	3,14E-02	0,997

\$ - ti vzorci služijo za primerjavo ostalih parametrov (vpliv konc., pH, temperature, vrste svetlobe)

Osnovni vzorci iz serije 1 imajo, tako kot pri B2, koncentracijo 200 mg/L, tisti iz serije 2 pa 100 mg/L. Razlika v hitrosti fotolize med izbranimi koncentracijama je občutno manjša kot pri B2. V splošnem velja, da je hitrost pretvorbe spojine obratno sorazmerna z njeni koncentracijo (92). V primeru folne kisline to ne velja, nekoliko odstopa (za 1,3-krat) zgolj vzorec s koncentracijo 50 mg/L.

Hitrosti pretvorbe pri pH=9,4 in pH=7,3 sta skoraj enaki. Pri pH=11 pa vidimo upočasnitev fotolize za 8,9-krat, kar je presenetljivo, saj imajo spojine v splošnem večjo afiniteto do sprememb pri pH-jih, kjer so v večjem deležu disociirane (91, 92), enako velja tudi za B2. Prav tako je B9 v raztopini kontrolnega vzorca (v temi) pri višjem pH razpadala hitreje.

Tudi pri B9 opazimo razliko glede občutljivosti na vrsto svetlobe, pretvorba pod samo UV svetlobo je hitrejša od kombinacije obeh virov (za 1,3-krat). Je pa pretvorba zgolj pod vidno svetlobo počasnejša za 8,4-krat. To je najverjetneje posledica vpliva vrste svetlobe na mehanizem fotolize, ki še ni natančno poznан.

Tudi pri vplivu temperature na hitrost pretvorbe pri višjem pH ni opazen enakomeren trend. Pretvorba pri 15 °C je pričakovano počasnejša (za 3,8-krat), pri 40 °C pa je skoraj enako hitra kot pri 25 °C (celo za 1,1-krat počasnejša). Enako velja pri pH=7,3, saj je hitrost reakcije pri povišani temperaturi (40 °C) hitrejša zgolj za 1,3-krat. V skladu s splošnimi principi velja,

da so reakcije pretvorbe hitrejše pri višjih temperaturah (92). Pri fotolizi B9 v raztopinah povišana temperatura nima značilnega vpliva.

#### 4.4.5. Fotostabilnost kombinacije vodotopnih vitaminov

V okviru preliminarne enomesecne študije smo poleg posameznih raztopin vitaminov vrednotili tudi fotostabilnost vitaminov v zmesi. Rezultati so predstavljeni v preglednici XXII. C in B2 sta se v enem mesecu pretvorila že v kontrolnem vzorcu v posameznih raztopinah brez prisotnosti svetlobe, se je pa v celoti v tem času v zmesi pretvoril tudi B9. Razlike med zmesjo in posameznimi raztopinami po 24 urah niso tako opazne, C se je v obeh primerih pretvoril skoraj v celoti, nestabilen je tudi B2.

Razlike so bile v zmesi bolj opazne v primerjavi s posamičnimi raztopinami v roku 30 dni. Pretvorba B1 je potekla v malo večjem obsegu, B6 pa se je tako kot v kontrolni raztopini, pretvarjal mnogo hitreje v zmesi kot v posamezno. Vpliv na B3, B5 in B7 ni bil tako opazen. Nasprotno pa je izjemno opazna razlika v koncentraciji B12, ki je v posamezni raztopini izkazoval dobro fotostabilnost še po 30 dneh (upad koncentracije za manj kot 10 % začetne), v zmesi pa se je že manj kot v treh dneh pretvoril v celoti.

Prav tako je pomembna razlika v fotostabilnosti B2 in B9, ki sta v posameznih raztopinah mnogo bolj fotostabilna kot v zmesi iz česar lahko sklepamo, da sta v zmesi močno destabilizirana.

Preglednica XXII: Rezultati fotostabilnosti raztopine zmesi vitaminov po 1 in 30 dneh (vsi vitamini v konc. 200 mg/L, razen B2 in B7 v konc. 100 mg/L)

1 dan	Kontrolni vzorec [%]	Vzorec iz komore [%]	30 dni	Kontrolni vzorec [%]	Vzorec iz komore [%]
C	0,3	0,0	C	0,0	0,0
B1	99,9	98,1	B1	99,0	84,7
B6	98,8	90,3	B6	93,9	9,8
B3	99,2	97,8	B3	97,5	93,5
B5	100,0	99,9	B5	99,7	99,0
B9	98,8	0,3	B9	0,0	0,0
B7	100,0	99,1	B7	96,1	94,1
B12	98,5	71,5	B12	93,4	0,0
B2	63,9	0,0	B2	0,0	0,0

Zanimalo nas je tudi, ali B2 ali B9 povzročata pospešeno pretvorbo drugih vitaminov, saj sta sama v zmesi destabilizirana. Zato smo pripravili zmes vseh devetih vitaminov, dodatno pa še dve zmesi osmih vitaminov, eno brez B2 in drugo brez B9. Koncentracija vseh vitaminov je bila 100 mg/L. Vzorce smo osvetljevali v komori 4 ure in vrednotili obseg fotorazgradnje. Rezultati tega poskusa so predstavljeni relativno za posamezen vitamin, glede na zmes, kjer je vitamin najbolj stabilen (preglednica XXIII).

Preglednica XXIII: Rezultati relativne fotostabilnosti (v %) zmesi vitaminov po 4 urah osvetljevanja v komori (konc. vseh vitaminov so 100 mg/L)

	B1	B3	B6	B5	B9	B12	B2	B7
vsi vitamini	97,6	100,0	95,3	100,0	42,7	89,9	100,0	99,3
vsi vitamin razen B9	100,0	99,9	100,0	98,8	-	70,1	77,0	100,0
vsi vitamini razen B2	94,8	100,0	99,2	99,2	100,0	100,0	-	100,0

- vitamin ni bil prisoten v zmesi

Pri nekaterih vitaminih pride do opaznih razlik. Razlike pri B1, B3, B5 in B7 so majhne ali komaj opazne. Drugače je že pri B6, za katerega vidimo, da je najmanj stabilen ko sta prisotna tako B2 in B9, najbolj pa tedaj, ko ni zraven B2. B9 je pričakovano mnogo bolj stabilen, ko je v zmesi, v kateri ni prisotnega B2. To pa presenetljivo ne velja za B2, saj je v kombinaciji vseh bolj stabilen kot v zmesi, v kateri ni prisotnega B9. Izrazito na fotostabilnost B12 vplivata tako B2 kot B9, kar je bilo pričakovano (91, 92).

Pri tem poskusu so bile koncentracije večine vitaminov mnogo višje kot so v izdelkih, a nam je poskus dal izhodišča za naprej, saj je očitno da vitamini v različnih kombinacijah pomembno vplivajo eden na drugega, kar bi se lahko izkazalo kot pomemben dejavnik pri stabilnosti izdelkov, ki vsebujejo zgolj nekatere izmed vodotopnih vitaminov.

#### 4.4.6. Fotostabilnost zmesi vitaminov v koncentracijah, ki jih najdemo v izdelkih

Prejšnji poskusi so pokazali, da medsebojni vpliv vodotopnih vitaminov predstavlja pomemben dejavnik njihove fotostabilnosti. S testom, ki je predstavljen v tem poglavju, smo želeli za tiste vitamine, ki so na svetlobi najbolj občutljivi, pokazati katere kombinacije predstavljajo problem za njihovo fotostabilnost. Na ta način bomo v prihodnje lahko lažje

napovedovali fotostabilnost izdelkov glede na prisotno kombinacijo vitaminov in posledično potrebo po njihovi stabilizaciji. Odločili smo se, da bodo koncentracije analiziranih vitaminov prilagojene na približna razmerja v izdelkih, in sicer smo v 200 mL vode raztopili priporočen dnevni odmerek posameznega vitamina. Pripravili smo 20 kombinacij vitaminov in se pri tem osredotočili na tri ključne vitamine, in sicer B2, B9 in B12, za katere smo že predhodno ugotovili, da so v zmesih občutljivi na svetlobo.

Kombinacije vitaminov smo v komori osvetljevali 24 ur, odvzem vzorcev pa je bil ob času 0, 4 in 24 urah. Fotostabilnost posameznih vitaminov po 4 in 24 urah je predstavljena v preglednici XXIV.

Preglednica XXIV: Fotostabilnost vitaminov (%) v različnih kombinacijah po 4 (zgornja vrednost) in 24 urah (spodnja vrednost) osvetlitve (konc. B1 5,5 mg/l; B2 7 mg/L; B3 80 mg/L; B5 30 mg/L; B6 7 mg/L; B7 0,25 mg/L; B9 1 mg/L; B12 0,125 mg/L in C 400 mg/L)

	C	B1	B6	B3	B5	B7	B9	B12	B2
Kombinacija 1	15,3 0,4	93,3 62,4	91,6 51,4	98,8 94,0	83,3 1,6	80,5 29,5	93,7 72,9	1,3 0,0	7,9 0,0
Kombinacija 2	18,7 9,8	100,0 93,8	96,3 81,5	99,7 98,7	93,2 0,3	94,3 78,9	96,2 90,4	0,4 0,0	
Kombinacija 3	13,5 0,1		88,3 45,6	98,9 92,7	80,8 0,1	70,2 32,7	98,4 62,5	0,7 0,0	4,8 0,0
Kombinacija 4			43,8 4,1	99,0 98,2	45,3 0,0	98,8 81,0	6,3 2,6	1,1 0,6	
Kombinacija 5		97,8 95,3	64,8 16,3	99,6 98,9	33,9 0,0	85,9 81,5	0,9 0,6	0,8 0,4	
Kombinacija 6			0,4 0,4	99,5 98,0	60,0 1,0	28,7 1,3	0,7 0,5	1,6 0,2	1,2 0,0
Kombinacija 7							0,2 0,2		2,1 0,0
Kombinacija 8		99,1 96,4					92,6 0,0		
Kombinacija 9							91,2 0,0		
Kombinacija 10		95,5 93,7						3,5 0,5	
Kombinacija 11								2,2 0,4	3,8 0,0
Kombinacija 12		95,8 87,4		98,0 96,1				3,4 0,5	

Kombinacija 13				97,4 97,3				5,1 0,2
Kombinacija 14								4,8 0,2
Kombinacija 15			2,8 0,2					2,0 0,0
Kombinacija 16	68,3 4,2							6,9 0,0
Kombinacija 17		95,0 88,6						2,4 0,0
Kombinacija 18		95,8 85,6	4,0 0,9			0,0 0,0	1,9 0,0	1,4 0,0
Kombinacija 19	64,0 3,9	93,8 57,6	89,5 48,3			100,0 0,0	1,7 0,0	7,7 0,0
Kombinacija 20								4,9 0,0

Pri kombinacijah od 1 do 9 smo se osredotočili na vitamin B9. Zanimalo nas je, kako na njegovo pretvorbo vpliva prisotnost vitaminov C, B1, B2 in B12. V prvi kombinaciji so bili prisotni vsi vitamini. S tem smo lahko primerjati fotostabilnost kombinacije vseh vitaminov v dejanskih koncentracijah v primerjavi s tistimi, ki smo jih uporabljali predhodno (vsi vitamini v konc. 100 mg/L). Vidne so določene pomembne razlike, saj se je že v 24 urah skoraj v celoti pretvoril tudi B5, ki je v prejšnjih preizkusih kazal popolno neobčutljivost na svetlobo, pretvorbi B1 in B6 pa sta se opazno pospešili (v primerjavi s podatki iz časovne točke po 24 urah v enomesečni študiji fotostabilnosti v preglednici XXII).

Razlika v hitrosti pretvorbe B9 med kombinacijami, kjer je vitamin C prisoten in pri tistih, pri katerih ga ni, je zelo opazna. V vseh kombinacijah brez C se je B9 po 24 urah pretvoril skoraj v celoti, med tem ko pri tistih, pri katerih je C prisoten, do tega ne pride, saj ostane koncentracija vsaj nad 60 % začetne. Prav tako je v prisotnosti C počasnejša pretvorba B6. Vidimo, da se v procesu stabilizacije C sam pretvarja, zaradi česar sklepamo, da bi z višjim odmerkom vitamina C zagotovili še boljšo fotostabilnost preostalih vitaminov.

Prisotnost B1 je imela zgolj manjši vpliv na fotostabilnost B9, tako v prisotnosti kot tudi v odsotnosti vitamina C. Pretvorba je bila v prisotnosti B1 v roku 24 ur večja zgolj za nekaj odstotkov, kar po našem mnenju v praksi ne vpliva pomembno na stabilnost pri uporabi izdelkov.

Bolj izrazit pa je vpliv B2. Vidimo, da izrazito poveča fotolabilnost skoraj vseh vitaminov, še najbolj opazno B7 in B9, kjer je končna koncentracija ob prisotnosti B2 tudi do 50 % nižja (B7). Razvidno je tudi, da je negativni vpliv B2 na fotostabilnost malo manj izrazit v prisotnosti vitamina C, kar še dodatno potrjuje njegov stabilizacijski učinek. Iz preglednice XXIV je tudi razvidno da se, v kolikor sta prisotna samo B2 in B9, slednji pod vplivom svetlobe popolnoma pretvori že v roku 4 ur, če pa B2 ni prisoten pa je v enakem času koncentracija B9 še vedno nad 90 %.

Pri kombinacijah od 10 do 14 smo se osredotočili na fotostabilnost B12. Ugotovili smo, da se B12 v vseh danih kombinacijah pretvarja zelo hitro, zaradi česar je bilo težje oceniti zakonitosti kombinacij po 24 urah, a so podobni trendi kot pri B9 razvidni iz stabilnosti po 4 urah osvetlitve v komori. Znova vidimo, da ima B1 manjši vpliv na fotostabilnost, B2 pa opaznejšega. Preverili smo tudi vpliv B6 na stabilnost B12, ki pa se je izkazal kot zanemarljiv.

Zaradi relativno hitre pretvorbe B12 v koncentracijah, uporabljenih pri tem poskusu, smo dodatno pripravili še raztopino B12 v enaki koncentraciji in jo v komori osvetljevali 90 minut, odvzem vzorcev pa je bil v 15 minutnih intervalih. Rezultati so predstavljeni v preglednici XXV. Ugotovili smo, da se B12 v koncentraciji, ki je navadno v izdelkih, po devetdesetih minutah pretvori že v več kot 50 % obsegu. S tem smo potrdili smiselnost rezultatov predhodnega poskusa, kjer se je B12 v celoti pretvoril že v prvi časovni točki (po 4 urah).

Preglednica XXV: Fotostabilnost B12 (%) v poskusu s koncentracijo, ki se navadno nahaja v izdelkih

Čas [min]	Fotostabilnost B12 [%]
0	100,0
15	84,8
30	72,9
45	66,6
60	62,6
75	53,1
90	47,1

Nazadnje smo preverili še vpliv kombinacij vitaminov na fotostabilnost B2. Ponovno se je izkazalo, da je vitamin C povečal njegovo fotostabilnost, a se je sam pri tem pretvarjal v večjem obsegu. Nasprotno pa je njegovo fotostabilnost zmanjšal B6, ki se je prav tako destabiliziral. Do neke mere je fotostabilnost B2 zmanjšala tudi prisotnost B1, čeprav se le-ta pri tem ni tako opazno pretvarjal.

V kombinaciji večjega števila fotolabilnih vitaminov kot so B1, B6, B9, B12 in B2, ki medsebojno pospešujejo pretvorbo pod vplivom svetlobe, je pretvorba B2 od preizkušenih kombinacij najhitrejša. Je pa tudi v tej zmesi vitamin C uspel upočasnitи pretvorbo večine fotolabilnih vitaminov. Najbolj je ta vpliv opazen pri B1, B6 in B9, do neke mere pa tudi pri B2, saj se je v tej kombinaciji kljub prisotnosti ostalih vseeno pretvarjal počasneje, kot če bi bil v raztopini sam.

Predvidevali smo, da bo imel vitamin C učinek stabilizatorja, kar se je izkazalo kot pravilno, saj se le-ta pogosto uporablja za stabilizacijo drugih vitaminov (kot npr. vitamina B2) (40). Njegov stabilizacijski učinek je bil izrazit pri povečanju fotostabilnosti B2, B9 in B12, ki so v koncentracijah, ki jih običajno najdemo v izdelkih, močno fotolabilni, kar pomeni, da njegova prisotnost tudi v izdelkih najverjetneje pomembno vpliva na njihovo fotostabilnost. Pri ostalih vitaminih ta vpliv ne pride tako do izraza, saj so že sami bolj fotostabilni.

#### 4.4.7. Fotostabilnost izdelkov

V zaključku naloge smo na nekaterih izdelkih, ki smo jih uporabili za potrjevanje ustreznosti analizne metode, izvedli še vrednotenje fotostabilnosti prisotnih vitaminov. S tem smo želeli ugotoviti predvsem fotostabilnost izdelkov, ki so pri svoji uporabi najbolj izpostavljeni svetlobi kot so šumeče tablete in prašek za raztopino za infundiranje. Vzorci so bili pripravljeni na način opisan v poglavju 3.3.6. Koncentracija vitaminov v vzorcih je bila merjena ob času 0 in potem vsako uro do treh ur (4 ure za izdelek F). Rezultati fotostabilnosti vitaminov v izdelkih po treh urah osvetlitve v komori so predstavljeni v preglednici XXVI, rezultati celotne študije pa v prilogi 4.

Pri izdelku C vidimo, da pride do upada koncentracije vseh vitaminov, s tem da pri nekaterih zgolj v majhnem deležu (B1, B6, B3 in B5). B2 se pretvarja manj kot bi pričakovali iz odmerkov, ki so običajni za izdelke. Odmerek B2 v tem je izdelku mnogo večji kot pri večini ostalih ( $> 50$ -krat), kar bi lahko pojasnilo njegovo relativno večjo stabilnost kot v našem predhodnjem poskusu. B7 in B12 se pretvorita v deležu, ki je pričakovana iz prejšnjih

preizkusov stabilnosti kombinacij. V velikem deležu pa se pretvori B9, kar smo glede na pričakovane koncentracije v izdelkih pravzaprav tudi pričakovali.

V izdelku D se v manjšem deležu pretvorijo B1, B3 in B5, tokrat tudi C. B9 se tudi v tem izdelku pretvarja hitro, a vseeno v manjšem obsegu kot v izdelku C. B6 se pretvarja hitreje, prav tako se izrazito pospešita pretvorbi B2 in B12 (najverjetneje vpliv koncentracije). V tem izdelku je vsebnost vitaminov na nivoju 100 % priporočenega dnevnega odmerka. Vidimo, da je hitrost pretvorbe zaradi tega drugačna kot pri izdelku C (tam so odmerki od 200 do več kot 9000 % RDA), prav tako pa se vidi stabilizacijski učinek vitamina C, ki ga v izdelku C ni.

V izdelku E je samo 5 vodotopnih vitaminov, zaradi česar smo ta izdelek izbrali za vrednotenje fotostabilnosti. Glede na prejšnje poskuse smo pričakovali zelo hitro pretvorbo, saj gre za kombinacijo vitaminov, ki so se v naših poskusih izkazali kot izrazito fotolabilni. Po treh urah v vzorcu ni bilo skoraj nič več vitaminov B12, B9 in B2. Dokaj hitro se je pretvarjal tudi B6, med tem ko je fotorazgradnja pri B1 potekala v manjšem obsegu. Iz rezultatov (priloge 4) ugotavljamo, da se vitamin B2, B9 in B12 v velikem deležu pretvorijo že po eni uri osvetlitve v raztopini. Vitamina B1 in B6 sta se v tem času pretvorila v manjšem obsegu, B12 več kot dve tretjini, vitamina B9 in B2 pa sta se pretvorila v celoti. To kar v praksi pomeni, da če bi šumečo tableto raztopili v kozarcu vode in ga pustili zgolj eno uro (recimo toliko časa, da se iz nje odstrani ves nastali ogljikov dioksid), bi v raztopini že potekle pretvorbe v tako velikem obsegu, kar pomeni, da v tem primeru v telo ne bi vnesli želenih vitaminov. Če primerjamo fotostabilnost vitaminov v izdelku E in D, ki sta oba v enaki obliki, ugotovimo, da je izdelek D veliko bolj stabilen in je po eni uri pod polovico začetne koncentracije samo B12, kar dodatno potrjuje pomembnost prisotnosti števila vitaminov v izdelkih.

Izdelek F smo analizirali v dveh koncentracijah in sicer kot osnovno (koncentrat za infuzijo) in redčeno raztopino (raztopina za infundiranje) po postopku opisanem v poglavju 3.3.5. Ugotovili smo, da je v osnovni raztopini, v kateri so koncentracije vitaminov zelo visoke, pretvorba večine vitaminov zelo majhna, z izjemo B2, ki se v manjšem obsegu pretvori in B12, ki se ga po treh urah osvetlitve pretvori že skoraj polovica. V redčeni raztopini so izrazite razlike v hitrosti pretvorb. Najbolj izrazita razlika je pri B2, ki se v redčeni raztopini pretvori skoraj v celoti, še bolj pa se pretvori B12, ki se je hitro pretvarjal že v osnovni raztopini. Pomembna pospešitev pretvorbe je vidna tudi pri C in B6, ki se v manj koncentrirani raztopini pretvorita približno za petino. Presenetljivo je, da je pretvorba B9

tudi v redčeni raztopini skoraj zanemarljiva, glede na to, da se je v ostalih izdelkih pretvarjal veliko hitreje. Najverjetnejši razlog za to je prisotnost EDTA v izdelku, ki folno kislino stabilizira. Kot verjetni razlog za hitrejše pretvorbe v redčeni raztopini v primerjavi s koncentrirano predvidevamo vpliv nižjih koncentracij, kar smo glede na prejšnje rezultate tudi pričakovali.

Preglednica XXVI: Fotostabilnost vitaminov v izdelkih, izražena v odstotkih, po treh urah osvetlitve v komori

Pripravek	C		D		E		F (Osnovna raztopina)	F (Redčena raztopina)
	C	95,7	B1	87,8	B1	89,3		
Fotostabilnost vitaminov	B6	92,6	B6	78,8	B6	64,9	C	99,6
	B3	98,6	B3	99,9			B1	97,0
	B5	88,2	B5	99,6			B6	98,5
	B9	7,3	B9	21,4	B9	0,0	B3	99,9
	B7	70,4	B7	72,7			B5	99,8
	B12	59,6	B12	7,8	B12	2,9	B9	96,9
	B2	89,9	B2	10,5	B2	0,0	B7	98,6
							B12	58,6
							B2	89,8
							B2	10,7

Namen poskusa je bil prikazati svetlobni stres vzorcev v vsakodnevni uporabi, zaradi česar smo se odločili za trajanje osvetlitve samo 3 ure, vzorce pa smo odvzemali na eno uro. Ker sta izdelka D in E šumeči tableti, je bilo za oba izdelka vrednotenje fotostabilnosti najbolj relevantno, saj se po priporočilih pripravita tako, da se raztopita v 200 mL vode in šele kasneje sprijeta, kar je popolnoma enako kot v poskusu.

Ugotovili smo, da lahko že znotraj relativno kratkega časa pride do pomembne pretvorbe ključnih vitaminov v večini izdelkov, še posebej B9, ki je izmed vodotopnih vitaminov največkrat v pomanjkanju (28). Zelo pomemben je tudi medsebojni vpliv vitaminov na fotostabilnost, saj smo pokazali, da pride v izdelku E, zaradi njegove sestave, do izjemno hitre pretvorbe večine vitaminov, kar je lahko za uporabnika zelo pomembna informacija.

Prav tako je za izdelek F pomembno, da se čim prej po pripravi osnovne raztopine iz nje pripravi infuzija, ali pa se zaščiti pred svetlobo, saj je že v osnovni raztopini zelo značilna pretvorba B12. V redčeni raztopini (simulacija infuzije) so pretvorbe vitaminov še hitrejše, kar pomeni, da je infuzijsko vrečko še pomembnejše zavarovati pred svetlobo, saj infuzije

navadno trajajo več ur in lahko v tem času pride do znatne pretvorbe večjega števila vitaminov, ki jih bolnik zelo potrebuje.

## 5. SKLEP

Razvili in vrednotili smo metodo za sočasno vrednotenje devetih vitaminov v oblikah, ki jih najpogosteje najdemo v izdelkih.

- Gre za prvo objavljeno metodo, ki je stabilnostno indikativna in omogoča z enim injiciranjem sočasno vrednotenje vseh vodotopnih vitaminov v oblikah, ki jih najpogosteje najdemo v izdelkih.
- S stresnimi vzorci smo potrdili stabilnostno indikativnost metode.
- Analizno metodo smo ovrednotili v skladu s smernicami ICH in potrdili njen selektivnost, linearnost, točnost, natančnost in robustnost.
- Metoda omogoča vrednotenje vsebnosti vitaminov z enostavno predpripravo vzorcev.
- Na izdelkih smo potrdili ustreznost metode.
- Pri potrjevanju ustreznosti metode smo ugotovili, da v izdelkih vsebnosti nihajo od navedene, v vsakem izdelku namreč vsaj en od vitaminov ne ustreza zahtevam Ameriške farmakopeje za dovoljeno vsebnost vodotopnih vitaminov.

Pri izvedbi testiranja fotostabilnost vodotopnih vitaminov v raztopinah (posamezno ali v zmeseh) in v izdelkih smo uporabili svetlobno komoro, ki daje stalne in zanesljive rezultate, ter prišli do naslednjih ugotovitev.

- Vitamini B1, B3, B5, B6, B7 in B12 so v visokih koncentracijah (100 mg/L) neobčutljivi na svetlobo tudi do enega meseca
- B2 in B9 sta zelo fotonestabilna
  - o Hitrost fotolize B2 je močno odvisna od koncentracije (razlika v koncentraciji za 10-krat pomeni tudi za več kot 240-krat hitrejšo fotolizo) in pH-ja medija (pH višji za približno 4 enote pomeni skoraj 24-krat hitrejšo fotolizo)
  - o Hitrost fotolize B9 je skoraj neodvisna od koncentracije in povišanja temperature, višji pH medija pa izkazuje počasnejšo fotolizo, kljub temu, da je B9 v odsotnosti svetlobe manj stabilen pri višjih pH
- Zmesi vitaminov niso enako fotostabilne kot vitamini vsak posamezno, saj vitamini izrazito vplivajo eden na drugega
  - o Fotostabilnost zmesi je zelo odvisna od njihove sestave
  - o B2 izrazito zmanjšuje fotostabilnost drugih vitaminov
  - o C povečuje fotostabilnost drugih vitaminov

- Koncentracija izrazito vpliva na fotostabilnost vitaminov tako samih, kot v zmeseh
  - o Vitamini so v koncentracijah, ki jih najdemo v izdelkih manj stabilni kot pri višjih testiranih koncentracijah (1,25 - 800-krat više),
  - o Pri nizkih koncentracijah je zelo nestabilen vitamin B12, kar je še bolj izrazito v zmeseh z drugimi vitaminimi
- Fotostabilnost vitaminov v raztopinah primerljivih izdelkov je različna
  - o Fotostabilnost vitaminov v zdravilih primerljivih oblik je podobna (tablete in šumeče tablete)
  - o Fotostabilnost izdelka je zelo odvisna od tega, kateri vitamini so v njem prisotni
  - o V primeru neoptimalne sestave šumeče tablete so nekateri vitamini v pripravljeni raztopini že po eni uri bistveno pod 50 % začetne koncentracije

Pred začetkom eksperimentalnega dela smo si postavili naslednje hipoteze:

- *Vpeljali bomo stabilnostno indikativno metodo, ki bo vsaj v eni uri ločila devet vodotopnih vitaminov v oblikah, ki jih najpogosteje najdemo v izdelkih.*
- *Vitamini izkazujejo različno fotostabilnost.*
- *Vitamini v zmeseh izkazujejo drugačno fotostabilnost kot posamezno, kar je zelo odvisno tudi od sestave zmesi. Vitamin B2 destabilizira ostale vitamine.*
- *Vitamini v zmeseh so bolj stabilni pri višjih koncentracijah.*
- *V izdelkih ob pričakovani uporabi ne pride do značilnega upada vsebnosti vitaminov zaradi vpliva svetlobe.*

Potrdili smo vse hipoteze z izjemo zadnje. Presenetilo nas je, da v nekaterih izdelkih tudi ob pričakovani uporabi (predvsem šumečih tablet) pride že v eni uri do pomembnega upada vsebnosti nekaterih vitaminov zaradi svetlobe.

Fotostabilnost je pomemben parameter, ki trenutno ni v ospredju. Še posebej je pomembna pri izdelkih v obliki šumečih tablet, za katere smo pokazali, da lahko tudi ob normalni uporabi (raztopina v kozarcu na svetlobi) pride do značilnega upada koncentracije vitaminov. Še zlasti je to pomembno, kadar so v izdelku prisotni vitamini B2, B9 in B12. Na osnovi dobljenih rezultatov menimo, da je potrebno tej problematiki posvetiti večjo pozornost.

## 6. LITERATURA

1. Porter K, Hoey L, Hughes CF, Ward M, McNulty H: Causes, Consequences and Public Health Implications of Low B-Vitamin Status in Ageing, Nutrients 2016; 8(11): 725–54.
2. Santillo VM, Lowe FC: Role of vitamins, minerals and supplements in the prevention and management of prostate cancer, Int Braz J Urol 2006; 32(1): 3–14.
3. Fortmann SP, Burda BU, Senger CA, Lin JS, Whitlock EP: Vitamin and mineral supplements in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: An updated systematic evidence review for the U.S. Preventive Services Task Force, Ann Intern Med 2013; 159(12): 824–34.
4. Kennedy DO: B Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy-A Review, Nutrients 2016; 8(2): 68–97.
5. Semba RD: The discovery of the vitamins, Int J Vitam Nutr Res 2012; 82(5): 310–5.
6. Douglas R, Hemilä H, Chalker E, D’Souza R, Treacy B: Vitamin C for preventing and treating the common cold, V: Cochrane Database of Systematic Reviews Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2004: str. CD000980.
7. Levine M, Rumsey S, Wang Y, Park J, Daruwala R: Biochemical and physiological aspects of human nutrition, V: Biochemical and physiological aspects of human nutrition Philadelphia: W.B. Saunders, 2000: str. 541–76.
8. Ye Y, Li J, Yuan Z: Effect of Antioxidant Vitamin Supplementation on Cardiovascular Outcomes: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials, PLoS ONE 2013; 8(2): 1–10.
9. Yamada H, Yamada K, Waki M, Umegaki K: Lymphocyte and Plasma Vitamin C Levels in Type 2 Diabetic Patients With and Without Diabetes Complications, Diabetes Care 2004; 27(10): 2491–2.
10. FDA: Food Composition Databases Show Foods List, 2018: dostopno na: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>, pridobljeno april 2018.
11. Schellack G, Harirari P, Schellack N: B-complex vitamin deficiency and supplementation, S Afr Pharm J 2015; 82: 28–32.
12. Lonsdale D: A Review of the Biochemistry, Metabolism and Clinical Benefits of Thiamin(e) and Its Derivatives, Evid Based Complement Alternat Med 2006; 3(1): 49–59.
13. Weise Prinzo Z: Thiamine deficiency and its prevention and control in major emergencies, WHO NHD 1999(13): 14–65.
14. Ottaway PB, The Technology of Vitamins in Food. 2018: dostopno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470460/>, pridobljeno maj 2018.

15. Powers HJ: Riboflavin (vitamin B-2) and health, Am J Clin Nutr 2003; 77(6): 1352–60.
16. Bhusal A, Banks SW: Riboflavin Deficiency, StatPearls. 2018: dostopno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470460/>, pridobljeno junij 2018.
17. Kirkland JB, Meyer-Ficca ML: Niacin, Adv Food Nutr Res 2018; 83: 83–149.
18. WHO: Pellagra and its prevention and control in major emergencies, 2018: dostopno na: [http://www.who.int/nutrition/publications/emergencies/WHO\\_NHD\\_00.10/en/](http://www.who.int/nutrition/publications/emergencies/WHO_NHD_00.10/en/), pridobljeno junij 2018.
19. Gharehbagh RK, Ebel S: Stability analysis of Dexpanthenol, 1: Determination of dexphanthenol and pantolactone by HPLC, Pharmazie 1995; 50(1): 39–40.
20. Hodges RE, Ohlson MA, Bean WB: Pantothenic acid deficiency in man, J Clin Invest 1958; 37(11): 1642–57.
21. Fry PC, Fox HM, Tao HG: Metabolic response to a pantothenic acid deficient diet in humans, J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 1976; 22(4): 339–46.
22. Combs GF: The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health, V: The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health Elsevier Academic Press, 2008: str. 345–54.
23. Wolff ME: Principles of Medicinal Chemistry, 4th Edition, V: Principles of Medicinal Chemistry, 4th Edition Philadelphia, PA, 1996: str. 625–78.
24. Magnúsdóttir S, Ravcheev D, de Crécy-Lagard V, Thiele I: Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes, Front Genet 2015; 6: 148–66.
25. Scheinfeld N: Biotin Deficiency: Background, Pathophysiology, Epidemiology, 2018: dostopno na: <https://emedicine.medscape.com/article/984803-overview>, pridobljeno junij 2018.
26. Staggs CG, Sealey WM, McCabe BJ, Teague AM, Mock DM: Determination of the biotin content of select foods using accurate and sensitive HPLC/avidin binding, J Food Compos Anal 2004; 17(6): 767–76.
27. Scott JM, Weir DG, Molloy A, McPartlin J, Daly L, Kirke P: Folic acid metabolism and mechanisms of neural tube defects, Ciba Found Symp 1994; 181: 180–7; discussion 187-191.
28. de Benoist B: Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies, Food Nutr Bull 2008; 29(2 Suppl): S238-244.
29. Dietrich M, Brown CJP, Block G: The Effect of Folate Fortification of Cereal-Grain Products on Blood Folate Status, Dietary Folate Intake, and Dietary Folate Sources among Adult Non-Supplement Users in the United States, J Am Coll Nutr 2005; 24(4): 266–74.

30. Hutchins HH, Cravioto PJ, Macek TJ: A comparison of the stability of cyanocobalamin and its analogs in ascorbate solution, *J Am Pharm Assoc* 2006; 45(12): 806–8.
31. Glass GBJ: Deposition and Storage of Vitamin B12 in the Normal and Diseased Liver, *Gastroenterology* 1959; 36(2): 180–92.
32. Nagalla S: Pernicious Anemia: Practice Essentials, Pathophysiology, Etiology, 2018: dostopno na: <https://emedicine.medscape.com/article/204930-overview>, pridobljeno junij 2018.
33. Dwivedi SL, Lammerts van Bueren ET, Ceccarelli S, Grando S, Upadhyaya HD, Ortiz R: Diversifying Food Systems in the Pursuit of Sustainable Food Production and Healthy Diets, *Trends Plant Sci* 2017; 22(10): 842–56.
34. Kearney J: Food consumption trends and drivers, *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2010; 365(1554): 2793–807.
35. Ward E: Addressing nutritional gaps with multivitamin and mineral supplements, *Nutr J* 2014; 13: 72–82.
36. Statista: Vitamins & Minerals - Europe | Statista Market Forecast, 2018: dostopno na: <https://www.statista.com/outlook/18050000/102/vitamins-minerals/europe>, pridobljeno julij 2018.
37. Leaf A, Lansdowne Z: Vitamins - Conventional Uses and New Insights, *Nutr Care Preterm Infants* 2014; 110: 152–66.
38. Bui LTT, Small DM, Coad R: The Stability of Water-Soluble Vitamins and Issues in the Fortification of Foods, V: *Handbook of Food Fortification and Health* Humana Press, New York, NY, 2013: str. 199–211.
39. Ahmad I, Sheraz MA, Ahmed S: Photostability and Interaction of Ascorbic Acid in Cream Formulations, *AAPS PharmSciTech* 2011; 12(3): 917–23.
40. Sheraz MA, Kazi SH, Ahmed S, Anwar Z, Ahmad I: Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin, *Beilstein J Org Chem* 2014; 10(1): 1999–2012.
41. Ahmad I, Fasihullah Q, Noor A, Ansari IA, Ali QNM: Photolysis of riboflavin in aqueous solution: a kinetic study, *Int J Pharm* 2004; 280(1): 199–208.
42. Ahmad I, Anwar Z, Ahmed S, Sheraz MA, Bano R, Hafeez A: Solvent Effect on the Photolysis of Riboflavin, *AAPS PharmSciTech* 2015; 16(5): 1122–8.
43. Smith EC, Metzler DE: The Photochemical Degradation of Riboflavin, *J Am Chem Soc* 1963; 85(20): 3285–8.
44. Ribeiro DO, Pinto DC, Lima LMT, Volpato NM, Cabral LM, de Sousa VP: Chemical stability study of vitamins thiamine, riboflavin, pyridoxine and ascorbic acid in parenteral nutrition for neonatal use, *Nutr J* 2011; 10: 47–56.
45. DSM: Fortification basics - Stability, 2018: dostopno na: [https://www.dsm.com/content/dam/dsm/nip/en\\_US/documents/stability.pdf](https://www.dsm.com/content/dam/dsm/nip/en_US/documents/stability.pdf), pridobljeno julij 2018.

46. Off MK, Steindal AE, Porojnicu AC: Ultraviolet photodegradation of folic acid, *J Photochem Photobiol B* 2005; 80(1): 47–55.
47. Fiume MZ, Cosmetic Ingredient Review Expert Panel: Final report on the safety assessment of biotin, *Int J Toxicol* 2001; 20 Suppl 4: 1–12.
48. Juzeniene A, Nizauskaite Z: Photodegradation of cobalamins in aqueous solutions and in human blood, *J Photochem Photobiol B* 2013; 122: 7–14.
49. ICH: International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, *Handb Transnatl Econ Gov Regimes* 2009: 1041–54.
50. ICH: Stability Testing : Photostability Testing of New Drug Substances and Products : ICHQ1B, 2018: dostopno na:  
<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/stability-testing-photostability-testing-of-new-drug-substances-and-products.html>, pridobljeno julij 2018.
51. Zielnik A: Photostability testing: Shedding light on a not well understood guideline, *Int Pharm Ind* 2013; 5: 50–6.
52. Havel R, Calloway D, Gussow J, Mertz W, Nesheim M: Recommended Dietary Allowances: 10th Edition, V National Academies Press (US), 1989: str. 115–69.
53. Maia AM, Baby AR, Yasaka WJ, Suenaga E, Kaneko TM, Velasco MVR: Validation of HPLC stability-indicating method for Vitamin C in semisolid pharmaceutical/cosmetic preparations with glutathione and sodium metabisulfite, as antioxidants, *Talanta* 2007; 71(2): 639–43.
54. Ono M, Idei N, Nakajima T, Itoh Y, Kawakami N, ... Yamato S: Simultaneous determination of riboflavin phosphate and other ingredients in a multivitamin pharmaceutical preparation by on-line automated LC coupled with pre-column immobilized enzyme reactor, *J Pharm Biomed Anal* 2002; 29(1–2): 325–34.
55. Wongyai S: Determination of vitamin B12 in multivitamin tablets by multimode high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr A* 2000; 870(1–2): 217–20.
56. Gazdik Z, Zitka O, Petrlova J, Adam V, Zehnalek J, ... Kizek R: Determination of Vitamin C (Ascorbic Acid) Using High Performance Liquid Chromatography Coupled with Electrochemical Detection, *Sensors* 2008; 8(11): 7097–112.
57. Chen P, Wolf WR, Castanheira I, Sanches-Silva A: A LC/UV/Vis method for determination of cyanocobalamin (VB12) in multivitamin dietary supplements with on-line sample clean-up, *Anal Methods* 2010; 2(8): 1171–5.
58. Nelson BC, Sharpless KE, Sander LC: Quantitative determination of folic acid in multivitamin/multielement tablets using liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J Chromatogr A* 2006; 1135(2): 203–11.
59. Li H-B, Chen F: Determination of vitamin B12 in pharmaceutical preparations by a highly sensitive fluorimetric method, *Fresenius J Anal Chem* 2000; 368(8): 836–8.

60. Ekpe AE, Hazen C: Liquid chromatographic determination of biotin in multivitamin-multimineral tablets, *J Pharm Biomed Anal* 1998; 16(8): 1311–5.
61. Li HB, Chen F, Jiang Y: Determination of vitamin B12 in multivitamin tablets and fermentation medium by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J Chromatogr A* 2000; 891(2): 243–7.
62. Baumgartner TG, Henderson GN, Fox J, Gondi U: Stability of ranitidine and thiamine in parenteral nutrition solutions, *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif* 1997; 13(6): 547–53.
63. Müller LD: Improved extraction methods for avoiding the interference of copper in the LC determination of ascorbic acid in multivitamin-mineral tablets, *J Pharm Biomed Anal* 2001; 25(5–6): 985–94.
64. Kall MA, Nørgaard P, Pedersen SJ, Leth T: Optimised extraction of folic acid from multivitamin-mineral preparations for liquid chromatographic analysis, *J Pharm Biomed Anal* 2000; 23(2–3): 437–45.
65. Kłaczkow G, Anuszewska E: The use of HPLC method for determination of the folic acid in multi-component vitamin preparations, *Acta Pol Pharm* 2000; 57(4): 257–60.
66. Jin P, Xia L, Li Z, Che N, Zou D, Hu X: Rapid determination of thiamine, riboflavin, niacinamide, pantothenic acid, pyridoxine, folic acid and ascorbic acid in Vitamins with Minerals Tablets by high-performance liquid chromatography with diode array detector, *J Pharm Biomed Anal* 2012; 70: 151–7.
67. Ramos-Martos N, Aguirre-Gómez F, Molina-Díaz A, Capitán-Vallvey LF: Application of liquid chromatography to the simultaneous determination of acetylsalicylic acid, caffeine, codeine, paracetamol, pyridoxine, and thiamine in pharmaceutical preparations, *J AOAC Int* 2001; 84(3): 676–83.
68. Kwok RP, Rose WP, Tabor R, Pattison TS: Simultaneous determination of vitamins B1, B2, B6, and niacinamide in multivitamin pharmaceutical preparations by paired-ion reversed-phase high-pressure liquid chromatography, *J Pharm Sci* 1981; 70(9): 1014–7.
69. Li K: Simultaneous determination of nicotinamide, pyridoxine hydrochloride, thiamine mononitrate and riboflavin in multivitamin with minerals tablets by reversed-phase ion-pair high performance liquid chromatography, *Biomed Chromatogr BMC* 2002; 16(8): 504–7.
70. Walker MC, Carpenter BE, Cooper EL: Simultaneous determination of niacinamide, pyridoxine, riboflavin, and thiamine in multivitamin products by high-pressure liquid chromatography, *J Pharm Sci* 1981; 70(1): 99–101.
71. Marszał ML, Lebiedzińska A, Czarnowski W, Szefer P: High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride and cyanocobalamin in pharmaceutical formulations using coulometric electrochemical and ultraviolet detection, *J Chromatogr A* 2005; 1094(1–2): 91–8.

72. Markopoulou CK, Kagkadis KA, Koundourellis JE: An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B1, B6, B12 in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography, *J Pharm Biomed Anal* 2002; 30(4): 1403–10.
73. Chatzimichalakis PF, Samanidou VF, Verpoorte R, Papadoyannis IN: Development of a validated HPLC method for the determination of B-complex vitamins in pharmaceuticals and biological fluids after solid phase extraction, *J Sep Sci* 2004; 27(14): 1181–8.
74. Ivanović D, Popović A, Radulović D, Medenica M: Reversed-phase ion-pair HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceuticals, *J Pharm Biomed Anal* 1999; 18(6): 999–1004.
75. Tee ES, Khor S: Simultaneous determination of B-vitamins and ascorbic acid in multi-vitamin preparations by reversed-phase HPLC, *Malays J Nutr* 1996; 2(2): 176–94.
76. Patil SS, Srivastava AK: Development and validation of a liquid chromatography method for the simultaneous determination of eight water-soluble vitamins in multivitamin formulations and human urine, *J AOAC Int* 2013; 96(6): 1273–80.
77. Sim H-J, Kim B, Lee J: A Systematic Approach for the Determination of B-Group Vitamins in Multivitamin Dietary Supplements by High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection and Mass Spectrometry, *J AOAC Int* 2016; 99(5): 1223–32.
78. Lam FL, Holcomb IJ, Fusari SA: Liquid chromatographic assay of ascorbic acid, niacinamide, pyridoxine, thiamine, and riboflavin in multivitamin-mineral preparations, *J - Assoc Off Anal Chem* 1984; 67(5): 1007–11.
79. Vidović S, Stojanović B, Veljković J, Prazić-Arsić L, Roglić G, Manojlović D: Simultaneous determination of some water-soluble vitamins and preservatives in multivitamin syrup by validated stability-indicating high-performance liquid chromatography method, *J Chromatogr A* 2008; 1202(2): 155–62.
80. Vazquez R, Romain R, Calvez S: Stability Indicating Assay Method on Vitamins: Application to their Stability Study in Parenteral Nutrition Admixtures, *Chromatographia* 2009; 69: 629–35.
81. Park J-E, Kim K-E, Choi Y-J, Park Y-D, Kwon H-J: The stability of water- and fat-soluble vitamin in dentifrices according to pH level and storage type, *Biomed Chromatogr BMC* 2016; 30(2): 191–9.
82. Thomas S, Kumar R, Sharma A, Issarani R: Stability-indicating HPLC method for determination of vitamins B1, B2, B3 and B6 in pharmaceutical liquid dosage form, 2018: dostopno na: <http://http://docplayer.net/docview/50/27222458>, pridobljeno junij 2018.
83. Borman P, Elder D: Q2(R1) Validation of Analytical Procedures, V: ICH Quality Guidelines Wiley-Blackwell, 2017: str. 127–66.
84. Council of Europe: European Pharmacopoeia 9th Edition, V EDQM, str. 1760–3756.

85. USP: The United States Pharmacopeia 2016, USP 39; The National Formulary, NF 34, Volume 4, V Baltimore: United Book Press, str. 6927–7112.
86. Rede K: Razvoj analizne metode na osnovi tekočinske kromatografije visoke ločljivosti za sočasno vrednotenje vsebnosti vitaminov B kompleksa v zdravilih in prehranskih dopolnilih, 2017: dostopno na: [http://wwwffa.uni-lj.si/docs/default-source/knjiznica-doc/magistrske/2017/rede\\_katarina\\_mag\\_nal\\_2017.pdf](http://wwwffa.uni-lj.si/docs/default-source/knjiznica-doc/magistrske/2017/rede_katarina_mag_nal_2017.pdf), pridobljeno 2017.
87. ICH: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology : ICH Q2(R1), 2018: dostopno na: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>, pridobljeno julij 2018.
88. Glinko A, Michael B, Michelle O, Karyn U: Reversed-Phase HPLC Separation of Water-Soluble Vitamins on Agilent ZORBAX Eclipse Plus Columns, 2008: dostopno na: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-9313EN.pdf>, pridobljeno avgust 2008.
89. Memmert: Climate chambers, 2018: dostopno na: <https://www.memmert.com/products/climate-chambers/climate-chamber/>, pridobljeno junij 2018.
90. Li K, Zhang P, Ge L: Concentration-dependent photodegradation kinetics and hydroxyl-radical oxidation of phenicol antibiotics, Chemosphere 2014; 111: 278–82.
91. Wood MJ, Irwin WJ, Scott DK: Photodegradation of doxorubicin, daunorubicin and epirubicin measured by high-performance liquid chromatography, J Clin Pharm Ther 1990; 15(4): 291–300.
92. Jain SK, Soni V: Bentley's Textbook of Pharmaceutics, V Elsevier Health Sciences, 2012: str. 176–88.
93. Ahmad Ans I: Photolysis and interactions of cyanocobalamin with some B-vitamins and ascorbic acid in parenteral solutions, 2018: dostopno na: <https://www.researchgate.net/publication/28347615>, pridobljeno junij 2018.
94. Ahmad I, Hussain W, Fareedi AA: Photolysis of cyanocobalamin in aqueous solution, J Pharm Biomed Anal 1992; 10(1): 9–15.

## **7. PRILOGE**

Priloga 1: Preglednica izbora kromatografskih pogojev pri razvoju analizne metode

Priloga 2: Preglednica robustnosti metode pri spremembah kromatografskih pogojev

Priloga 3: Fotostabilnost vitaminov (posamezno in v zmesi) v enomesečni študiji

Priloga 4: Fotostabilnost vitaminov v izdelkih

Priloga 1: Preglednica razvoja analizne metode

Št.	Gradientni program (A: 0,1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; B: ACN)	Pretok [mL/min]	Čas analize [min]	Kolona in vitamini, ki so bili analizirani
M0	0-4,5 min: 0% B, 4,5-5 min: 0-13% B, 5-20 min: 13% B, 20,1 min: 0% B	1	21	Luna C18 150×4,6 mm, 5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M1	0-4,5 min: 0% B, 4,5-5 min: 0-13% B, 5-20 min: 13% B, 20,1 min: 0% B	1	21	
M2	0-4,5 min: 0% B, 4,5-5 min: 0-5% B, 5-20 min: 5% B, 20,1 min: 0% B	1	21	Luna C8 150×4,6 mm, 5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M3	0-3 min: 0% B, 3-20 min: 0-20% B, 20,1 min: 0% B	1	21	
M4	0-3 min: 0-5% B, 3-20 min: 5-20% B, 20,1 min: 0% B	1	21	
M5	0-3 min: 0-3% B, 3-20 min: 3-20% B, 20,1 min: 0% B	1	21	
M6	0-5 min: 4% B, 5-17 min: 5-17% B, 17,1 min: 4% B	1	18	
M7	0-5 min: 0-5% B, 5-11,5 min: 18% B, 11,6 min: 0% B	1	18	Synergi Hydro-RP 250×4,6 mm, 4 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M8	0-3 min: 0-3% B, 3-5 min: 3-5% B, 5-11,5 min: 18% B, 11,6 min: 0% B	1	18	
M9	0-3 min: 0-2,5% B, 2,5-5 min: 5% B, 5-11,5 min: 18% B, 11,6 min: 0% B	1	18	
M10	0-5 min: 4% B,	1	18	

	5-12 min: 18% B 12,1 min: 4% B		
M11	0-5 min: 5% B, 5-12 min: 18% B 12,1 min: 5% B	1	18
M12	0-5 min: 0-5% B, 5-12 min: 18% B 12,1 min: 0% B	1	18
M13	0-6 min: 0-5% B, 6-12 min: 18% B 12,1 min: 0% B	1	18
M14	0-7 min: 0-5% B, 7-12 min: 18% B 12,1 min: 0% B	1	18
M15	0-7 min: 2-5% B, 7-12 min: 18% B 12,1 min: 2% B	1	18
M16	0-2 min: 0% B, 2-7 min: 0-5% B 7-12 min: 18% B 12,1 min: 0% B	1	18
M16	0-2 min: 0% B, 2-7 min: 5% B 7-12 min: 18% B 12,1 min: 0% B	1	18
M17	0-2 min: 0% B, 2-7 min: 10% B 7-12 min: 18% B 12,1 min: 0% B	1	18
M18	0-2 min: 0,5% B, 2-7 min: 10% B 7-12 min: 18% B 12,1 min: 0,5% B	1	18
M19	0-5 min: 0,5% B, 5-8 min: 10% B 8-12 min: 18% B 12,1 min: 0,5% B	1	18
M20	0-5 min: 1% B, 5-8 min: 1-10% B 8-12 min: 18% B 12,1 min: 1% B	1	18

M21	0-5 min: 1% B, 5-8 min: 10% B 8-12 min: 18% B 12,1 min: 1% B	1	18	
M22	0-5 min: 1% B, 5-10 min: 10% B 10-14 min: 18% B 14,1 min: 1% B	1	18	
M23	0-5 min: 1% B, 5-8 min: 10% B 8-11 min: 14% B 11-14 min: 18% B 14,1 min: 1% B	1	18	
M24	0-5 min: 1% B, 5-8 min: 10% B 8-11 min: 14% B 11-14 min: 20% B 14,1 min: 1% B	1	18	
M25	0-5 min: 1% B, 5-8 min: 10% B 8-11 min: 14% B 11-14,5 min: 16,5% B 14,6 min: 1% B	1	18	
M26	0-5 min: 1% B, 5-8 min: 10% B 8-11 min: 14% B 11-15 min: 17% B 15,1 min: 1% B	1	18	
M27	0-5 min: 1% B, 5-8 min: 10% B 8-11 min: 14% B 11-13 min: 17% B 13-15 min: 20% B 15,1 min: 1% B	1	18	
M28	0-5 min: 1% B, 5-8 min: 10% B 8-11 min: 14% B 11-13 min: 20% B 13-15 min: 14% B 15,1 min: 1% B	1	18	

št.	Gradient (A: 25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=6,5; B: ACN)	Pretok [mL/min]	Čas analize [min]	Kolona in vitamini, ki so bili analizirani
M29	0 min: 1% B 0,5 min: 12% B 0,51-3 min: 30% B 3,01 min: 1% B	1	5	Zorbax eclipse plus C18 RRHD 50×2,1 mm, 1,8 µm (C, B1, B3, B6)
št.	Gradient (A: 25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=2,5; B: ACN)	Pretok [mL/min]	Čas analize [min]	Kolona in vitamini, ki so bili analizirani
M30	0 min: 1% B 0,5 min: 12% B 0,51-3 min: 30% B 3,01 min: 1% B	0,5	5	Zorbax eclipse plus C18 RRHD 50×2,1 mm, 1,8 µm (C, B1, B3, B6)
M31	0 min: 1% B	0,5	5	Zorbax eclipse plus C18 RRHD 50×2,1 mm, 1,8 µm (C, B1, B3, B6)
M32	0 min: 1% B	0,5	5	Luna Omega PS C18 50×4,6 mm, 3 µm (C, B1, B3, B6)
št.	Gradient (A: 25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=2,5; B: MeOH)	Pretok [mL/min]	Čas analize [min]	Kolona in vitamini, ki so bili analizirani
M33	0 min: 1% B	1	5	Luna Omega PS C18 50×4,6 mm, 3 µm (C, B1, B3, B6)
M34	0 min: 0% B	1	5	
M35	0 min: 2% B	1	5	
M36	0 min: 3% B	1	5	
M37	0 min: 1% B	1	5	
M38	0 min: 0% B	1	5	
M39	0 min: 2% B	1	5	
M40	0 min: 3% B	1	5	Luna Omega Polar C18 100×2,1 mm, 1,6 µm (C, B1, B3, B6)
M41	0 min: 1% B	1	5	
M42	0 min: 1% B	1	5	
M43	0 min: 1% B	1	5	
M44	0 min: 1% B	1	5	
M45	0 min: 1% B	1	5	
št.	Gradient (A: 25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=4,5, B: MeOH)	Pretok [mL/min]	Čas analize [min]	Kolona in vitamini, ki so bili analizirani

M46	0 min: 0% B	1	5	Luna Omega PS C18 50×4,6 mm, 3 µm (C, B1, B3, B6)
M47	0 min: 0% B	1	5	
M48	0 min: 1% B	1	5	
M49	0 min: 2% B	1	5	
M50	0 min: 3% B	1	5	
M51	0 min: 1% B	1	5	
M52	0 min: 0% B	1	5	
M53	0 min: 1% B	1	5	
M54	0 min: 2% B	1	5	
M55	0 min: 3% B	1	5	
M56	0 min: 5% B	1	5	
M57	0 min: 7% B	1	5	
M58	0 min: 8% B	1	5	
M59	0 min: 9% B	1	5	
M60	0 min: 10% B	1	5	
M61	0 min: 11% B	1	5	
M62	0 min: 12% B	1	5	
M63	0 min: 13% B	1	5	
M64	0 min: 15% B	1	5	
št.	Gradient (A: 25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=4,5, B: ACN)	Pretok [mL/min]	Čas analize [min]	Kolona in vitamini, ki so bili analizirani
M65	0 min: 5% B	1	5	
M66	0 min: 10% B	1	5	
št.	Gradient (A: 25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=6,5; B: MeOH)	Pretok [mL/min]	Čas analize [min]	Kolona in vitamini, ki so bili analizirani
M67	0 min: 5% B	1	5	
M68	0 min: 8% B	1	5	
M69	0 min: 11% B	1	5	
M70	0 min: 13% B	1	5	
M71	0 min: 2% B	1	5	
št.	Gradient (A: 25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=4,5; B: MeOH)	Pretok [mL/min]	Čas analize [min]	Kolona in vitamini, ki so bili analizirani
M72	0 min: 10% B	1	5	
M73	0 min: 5% B	1	5	
M74	0 min: 8% B	1	5	
M75	0 min: 2% B	1	5	

št.	Gradient (A: 25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=3,5; B: MeOH)	Pretok [mL/min]	Čas analize [min]	Kolona in vitamini, ki so bili analizirani
M76	0 min: 3% B	1	5	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B3, B6)
M77	0 min: 5% B	1	5	
M78	0 min: 8% B	1	5	
št.	Gradient (A: 25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH=4,0; B: MeOH)	Pretok [mL/min]	Čas analize [min]	Kolona in vitamini, ki so bili analizirani
M79	0-2,5 min: 2% B 2,5-5 min: 2-20% B 5-8 min: 20% B 8,1 min: 2% B	1	10	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B3, B5, B6)
M80	0-2,5 min: 2% B 2,5-5 min: 2-25% B 5-8 min: 25% B 8,1 min: 2% B	1	10	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B3, B5, B6)
M81	0-2,5 min: 2% B 2,5-5 min: 2-40% B 5-8 min: 40% B 8,1 min: 2% B	1	10	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B3, B5, B6, B9)
M82	0-2,5 min: 2% B 2,5-5 min: 2-35% B 5-8 min: 35% B 8,1 min: 2% B	1	10	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B3, B5, B6, B9)
M83	0-2,5 min: 2% B 2,5-6 min: 2-35% B 6-8 min: 35% B 8,1 min: 2% B	1	10	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B3, B5, B6, B9)
M84	0-2,5 min: 2% B 2,5-7 min: 2-35% B 7-8 min: 35% B 8,1 min: 2% B	1	10	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B3, B5, B6, B9)
M85	0-2 min: 2% B 2,5-6,5 min: 2-35% B 6,5-8 min: 35% B 8,1 min: 2% B	1	10	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B3, B5, B6, B9)
M86	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-35% B 6-8 min: 35% B 8,1 min: 2% B	1	10	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B3, B5, B6, B9)

M87	0-2 min: 2% B 2-5,5 min: 2-35% B 5,5-8 min: 35% B 8,1 min: 2% B	1	10	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B3, B5, B6, B9)
M88	0-1,5 min: 2% B 1,5-5,5 min: 2-35% B 5,5-8 min: 35% B 8,1 min: 2% B	1	10	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B3, B5, B6, B9)
M89	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-35% B 6-8 min: 35% B 8,1 min: 2% B	1	10	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B3, B5, B6, B9, B12)
M90	0-2 min: 2% B 2-6,5 min: 2-35% B 6,5-8 min: 35% B 8,1 min: 2% B	1	10	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B3, B5, B6, B9, B12)
M91	0-2 min: 2% B 2-7 min: 2-35% B 7-8 min: 35% B 8,1 min: 2% B	1	10	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B3, B5, B6, B9, B12)
M92	0-2 min: 2% B 2-7 min: 2-40% B 7-8 min: 40% B 8,1 min: 2% B	1	10	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B3, B5, B6, B9, B12)
M93	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-40% B 6-8 min: 40% B 8,1 min: 2% B	1	10	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B3, B5, B6, B9, B12)
M94	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-45% B 6-8 min: 45% B 8,1 min: 2% B	1	10	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B3, B5, B6, B9, B12)
M95	0-2 min: 2% B 6-8 min: 2-30% B 6-8 min: 30% B 8,1 min: 2% B	1	10	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B3, B5, B6, B9, B12)
M96	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-25% B 6-8 min: 25% B 8,1 min: 2% B	1	11	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B3, B5, B6, B9, B12)
M97	0-2 min: 2% B	1	11	

	2-6,5 min: 2-25% B 6,5-8 min: 25% B 8,1 min: 2% B			Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12)
M98	0-1,5 min: 2% B 1,5-6 min: 2-25% B 6-8 min: 25% B 8,1 min: 2% B	1	11	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12)
M99	0-1,5 min: 2% B 1,5-6,5 min: 2-25% B 6,5-8 min: 25% B 8,1 min: 2% B	1	11	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12)
M100	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-25% B 6-9 min: 25% B 9,1 min: 2% B	1	12	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12)
M101	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-25% B 6-8 min: 25% B 8-9 min: 25-40% B 9,1 min: 2% B	1	12	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12)
M102	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-25% B 6-8 min: 25% B 8-8,5 min: 25-40% B 8,6 min: 2% B	1	12	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12)
M103	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-25% B 6-7,5 min: 25% B 7,5-8,5 min: 25-40% B 8,6 min: 2% B	1	12,5	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12)
M104	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-25% B 6-7,5 min: 25% B 7,5-8,5 min: 25-35% B 8,6 min: 2% B	1	12,5	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12)
M105	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-25% B 6-7,5 min: 25% B 7,5-8,5 min: 25-45% B 8,6 min: 2% B	1	12,5	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12)
M106	0-2 min: 2% B	1	12,5	

	2-6 min: 2-25% B 6-6,5 min: 25% B 6,5-7,5 min: 25-40% B 7,6 min: 2% B			Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12)
M107	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-25% B 6-7 min: 25% B 7-8 min: 25-40% B 8,1 min: 2% B	1	12,5	Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12)
M108	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-25% B 6-7 min: 25% B 7-8 min: 25-40% B 8-9 min: 40% B 9,6 min: 2% B	1	13,5	Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M109	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-25% B 6-7 min: 25% B 7-8 min: 25-40% B 8-11 min: 40% B 11,6 min: 2% B	1	15,5	Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M110	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-25% B 6-7,5 min: 25% B 7,5-8,5 min: 25-35% B 8,5-11 min: 35% B 11,6 min: 2% B	1	15,5	Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M111	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-25% B 6-7,5 min: 25% B 7,5-8,5 min: 25-30% B 8,5-11 min: 30% B 11,6 min: 2% B	1	15,5	Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M112	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-25% B 6-7,5 min: 25% B 7,5-8,5 min: 25-30% B 8,5-12 min: 30% B 12,6 min: 2% B	1	16	Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M113	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-25% B	1	14	

	6-7,5 min: 25% B 7,5-8,5 min: 25-30% B 8,5-11 min: 30% B 11,6 min: 2% B			Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M114	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-25% B 6-7,5 min: 25% B 7,5-8,5 min: 25-30% B 8,5-17 min: 30% B 17,6 min: 2% B	1	20	Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M115	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-15% B 6-7,5 min: 15% B 7,5-8,5 min: 15-25% B 8,5-17 min: 25% B 17,6 min: 2% B	1	20	Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M116	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-15% B 6-7,5 min: 15% B 7,5-12,5 min: 15-25% B 12,5-17 min: 25% B 17,6 min: 2% B	1	20	Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M117	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-15% B 6-16 min: 15% B 16-21 min: 15-25% B 21-24 min: 25% B 24-27 min: 25-35% B 27,6 min: 2% B	1	30	Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2 fosfat, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M118	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-20% B 6-16 min: 20% B 16-20 min: 20-25% B 20-22 min: 25% B 22-25 min: 25-30% B 25-27 min: 30% B 27,6 min: 2% B	1	30	Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2 fosfat, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M119	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-22,5% B 6-16 min: 22,5% B 16-20 min: 22,5-25% B	1	30	Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2 fosfat, B3, B5, B6, B7, B9, B12)

	20-23 min: 25% B 23-25 min: 25-30% B 25-27 min: 30% B 27,6 min: 2% B			
M120	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-15% B 6-16 min: 15-25% B 16-23 min: 25% B 23-25 min: 25-30% B 25-27 min: 30% B 27,6 min: 2% B	1	30	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2 fosfat, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M121	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-17,5% B 6-16 min: 17,5% B 16-21 min: 17,5-25% B 21-24 min: 25% B 24-27 min: 25-35% B 27,6 min: 2% B	1	30	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2 fosfat, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M122	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-16,5% B 6-17 min: 16,5% B 17-22 min: 16,5-25% B 22-27 min: 25% B 27,6 min: 2% B	1	30	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2 fosfat, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M123	0-2 min: 2% B 2-6 min: 2-16,5% B 6-17 min: 16,5% B 17-22 min: 16,5-25% B 22-26,5 min: 25% B 27,1 min: 2% B	1	30	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2 fosfat, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M123	0-3 min: 2% B 3-7 min: 2-16,5% B 7-18 min: 16,5% B 18-23 min: 16,5-25% B 23-26,5 min: 25% B 27,1 min: 2% B	1	30	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2 fosfat, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M124	0-4 min: 2% B 4-8 min: 2-16,5% B 8-19 min: 16,5% B 19-24 min: 16,5-25% B 24-26,5 min: 25% B	1	30	Waters X-Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2 fosfat, B3, B5, B6, B7, B9, B12)

	27,1 min: 2% B				
M125	0-4 min: 1,5% B 4-8 min: 1,5-16,5% B 8-19 min: 16,5% B 19-24 min: 16,5-25% B 24-26,5 min: 25% B 27,1 min: 1,5% B	1	30		Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2 fosfat, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M126	0-4 min: 1% B 4-8 min: 1-16,5% B 8-19 min: 16,5% B 19-24 min: 16,5-25% B 24-26,5 min: 25% B 27,1 min: 1% B	1	30		Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2 fosfat, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M127	0-4 min: 0,50% B 4-8 min: 0,50-16,5% B 8-19 min: 16,5% B 19-24 min: 16,5-25% B 24-26,5 min: 25% B 27,1 min: 0,50% B	1	30		Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2 fosfat, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M128	0-4 min: 1% B 4-8 min: 1-16,5% B 8-18 min: 16,5% B 18-24 min: 16,5-25% B 24-26,5 min: 25% B 27,1 min: 1% B	1	30		Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2 fosfat, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M129	0-4 min: 1% B 4-8 min: 1-16,5% B 8-19 min: 16,5% B 19-23 min: 16,5-25% B 23-26,5 min: 25% B 27,1 min: 1% B	1	30		Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2 fosfat, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M130	0-4 min: 1% B 4-8 min: 1-16,5% B 8-18 min: 16,5% B 18-23 min: 16,5-25% B 23-26,5 min: 25% B 27,1 min: 1% B	1	30		Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2 fosfat, B3, B5, B6, B7, B9, B12)
M131	0-4 min: 1% B 4-8 min: 1-16,5% B 8-18 min: 16,5% B 18-23 min: 16,5-25% B	1	30		Waters X>Select CSH C18 150×4,6 mm, 3,5 µm (C, B1, B2 fosfat, B3, B5, B6, B7, B9, B12)

	23-25,2 min: 25% B			
	26 min: 1% B			

Priloga 2: Preglednica robustnosti metode pri spremembah kromatografskih pogojev ( $R_s$  - resolucijski faktor, N – število teoretskih podov, Af – faktor asimetrije), referenčni pogoji so navedeni v preglednici »Obstoječa kolona«.

	Temperatura kolone 39°C			Temperatura kolone 41°C		
	Rs	N	Af	Rf	N	Af
C	2,20	10064	1,85	1,92	9796	1,85
B1	9,85	10288	1,48	10,17	10315	1,48
B6	10,88	14771	1,39	10,02	14050	1,35
B3	16,73	43578	1,11	16,69	42109	1,08
B5	24,83	155055	1,23	25,21	152778	1,23
B9	25,99	48949	1,31	22,83	44766	1,30
B7	13,39	41765	1,04	13,13	38628	1,10
B12	1,95	91502	1,20	2,60	86921	1,21
B2 fosfat	6,79	54457	1,20	6,68	50645	1,18

	Pretok MF 0,95 = mL/min			Pretok MF = 1,05 mL/min		
	Rs	N	Af	Rf	N	Af
C	2,15	9936	1,86	1,96	8969	1,79
B1	10,07	10349	1,50	9,65	9394	1,48
B6	10,42	14423	1,35	9,80	12993	1,33
B3	15,84	41325	1,10	16,60	39897	1,07
B5	23,57	144837	1,24	25,27	147414	1,22
B9	24,12	44572	1,31	23,33	44216	1,30
B7	11,56	36430	1,11	10,77	35190	1,10
B12	1,67	83707	1,21	2,81	85625	1,20
B2 fosfat	7,82	50118	1,18	8,32	49532	1,16

	pH MF = 3,9			pH MF = 4,1		
	Rs	N	Af	Rf	N	Af
C	2,35	10502	1,85	1,92	9625	1,85
B1	5,81	8034	1,42	13,59	12590	1,48
B6	11,57	13095	1,36	9,26	15477	1,39
B3	17,14	41030	1,11	16,19	43943	1,12
B5	26,23	153836	1,23	24,29	153961	1,23
B9	28,93	52270	1,31	21,47	43461	1,32
B7	10,21	39536	1,04	11,98	36248	1,04
B12	1,71	89629	1,20	2,80	89504	1,20
B2 fosfat	7,77	53698	1,20	8,92	51889	1,20

	Obstoječa kolona			Kolona novejše serije		
	Rs	N	Af	Rf	N	Af
C	2,00	9987	1,85	2,20	9720	1,81
B1	9,85	10235	1,48	11,83	11396	1,24
B6	10,51	14396	1,35	10,08	15119	1,25
B3	16,70	42803	1,08	15,66	42319	1,24
B5	25,15	154336	1,23	25,36	153868	1,14
B9	24,99	47605	1,30	22,52	44637	1,30
B7	11,35	38119	1,10	12,22	37338	1,17
B12	2,39	90179	1,21	4,09	88691	1,10
B2 fosfat	8,28	52949	1,18	6,82	49402	1,07

Priloga 3: Fotostabilnost vitaminov v enomesečni študiji posamezno in v zmesi, čas je predstavljen v dnevih

B1	Kontrolni vzorec (v temi)		Vzorec iz komore (svetloba)	
	Posamezen vitamin [%]	Zmes [%]	Posamezen vitamin [%]	Zmes [%]
0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	100,0	99,9	100,0	98,1
2	100,0	99,9	99,6	98,0
3	100,0	99,6	99,6	97,2
7	99,9	99,3	99,2	95,5
15	99,8	99,2	99,1	91,6
30	99,7	99,1	99,0	84,7

B2	Kontrolni vzorec (v temi)		Vzorec iz komore (svetloba)	
	Posamezen vitamin [%]	Zmes [%]	Posamezen vitamin [%]	Zmes [%]
0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	72,5	63,9	1,8	0,0
2	50,6	40,8	0,0	0,0
3	37,1	1,9	0,0	0,0
7	3,7	0,0	0,0	0,0
15	0,0	0,0	0,0	0,0
30	0,0	0,0	0,0	0,0

B3	Kontrolni vzorec (v temi)		Vzorec iz komore (svetloba)	
	Posamezen vitamin [%]	Zmes [%]	Posamezen vitamin [%]	Zmes [%]
0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	99,9	99,2	99,8	97,8
2	99,8	98,7	99,3	96,7
3	99,8	97,0	99,2	96,0
7	97,4	96,4	98,3	95,1
15	94,9	95,4	97,6	94,5
30	91,4	94,9	97,5	93,5

B5	Kontrolni vzorec (v temi)		Vzorec iz komore (svetloba)	
	Posamezen vitamin [%]	Zmes [%]	Posamezen vitamin [%]	Zmes [%]
0	100,0	100,0	100,0	100,0

1	100,0	99,9	100,0	100,0
2	100,0	99,8	100,0	99,9
3	100,0	99,6	99,9	99,8
7	100,0	99,1	99,8	99,8
15	100,0	98,9	99,7	99,5
30	99,9	98,6	99,7	99,0

B6	Kontrolni vzorec (v temi)		Vzorec iz komore (svetloba)	
	Posamezen vitamin [%]	Zmes [%]	Posamezen vitamin [%]	Zmes [%]
0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	100,0	98,8	85,6	90,3
2	100,0	98,4	73,7	80,4
3	100,0	98,0	66,1	73,7
7	100,0	96,6	45,1	47,0
15	98,9	95,9	20,6	23,0
30	98,0	93,9	6,2	9,8

B7	Kontrolni vzorec (v temi)		Vzorec iz komore (svetloba)	
	Posamezen vitamin [%]	Zmes [%]	Posamezen vitamin [%]	Zmes [%]
0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	100,0	100,0	99,1	99,9
2	98,6	99,4	98,7	99,6
3	97,6	98,4	98,4	98,5
7	96,9	98,2	98,3	97,8
15	95,5	96,7	97,9	96,1
30	95,0	94,6	96,1	94,1

B9	Kontrolni vzorec (v temi)		Vzorec iz komore (svetloba)	
	Posamezen vitamin [%]	Zmes [%]	Posamezen vitamin [%]	Zmes [%]
0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	99,7	0,0	0,8	0,0
2	99,4	0,0	0,0	0,0
3	99,2	0,0	0,0	0,0
7	99,0	0,0	0,0	0,0
15	89,5	0,0	0,0	0,0
30	58,8	0,0	0,0	0,0

B12	Kontrolni vzorec (v temi)		Vzorec iz komore (svetloba)	
	Posamezen vitamin [%]	Zmes [%]	Posamezen vitamin [%]	Zmes [%]
0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	99,8	98,5	100,0	17,5
2	99,7	97,7	99,5	2,8
3	99,6	95,5	99,3	0,0
7	99,5	94,6	98,3	0,0
15	99,3	93,8	96,2	0,0
30	99,1	92,8	93,4	0,0

C	Kontrolni vzorec (v temi)		Vzorec iz komore (svetloba)	
	Posamezen vitamin [%]	Zmes [%]	Posamezen vitamin [%]	Zmes [%]
0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	0,6	0,0	0,0	0,0
2	0,0	0,0	0,0	0,0
3	0,0	0,0	0,0	0,0
7	0,0	0,0	0,0	0,0
15	0,0	0,0	0,0	0,0
30	0,0	0,0	0,0	0,0

Priloga 4: Fotostabilnost vitaminov v izdelkih, izražena v odstotkih

Izdelek C	Vitamin							
Čas [h]	B1	B6	B3	B5	B9	B7	B12	B2
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
60	99,0	96,1	99,3	96,4	26,4	81,4	80,4	95,2
120	98,8	93,8	98,7	89,7	12,8	75,5	71,5	91,5
180	98,5	92,6	98,6	88,2	7,3	70,4	59,6	89,9

Izdelek D	Vitamin								
Čas [h]	C	B1	B6	B3	B5	B9	B7	B12	B2
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
60	100,0	94,2	93,4	99,9	99,8	82,3	93,3	45,6	53,6
120	96,5	89,8	86,4	99,9	99,6	59,3	81,1	16,4	21,3
180	95,7	87,8	78,8	99,9	99,6	21,4	72,7	7,8	10,5

Izdelek E	Vitamin				
Čas [h]	B1	B6	B9	B12	B2
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
60	94,1	80,1	0,2	31,7	0,3
120	91,1	67,1	0,0	9,3	0,0
180	89,3	64,9	0,0	2,9	0,0

Izdelek F (osnovna raztopina)				Vitamin					
Čas [h]	C	B1	B6	B3	B5	B9	B7	B12	B2
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
60	99,8	99,4	99,4	99,9	100,0	98,7	99,6	89,5	99,8
120	99,6	98,6	99,0	99,9	99,9	97,9	99,0	78,2	99,6
180	99,6	97,0	98,5	99,9	99,8	96,9	98,6	58,6	99,6
240	99,4	95,6	97,8	99,8	99,7	96,0	98,4	49,4	99,4

Izdelek F (50x redčena raztopina)				Vitamin					
Čas [h]	C	B1	B6	B3	B5	B9	B7	B12	B2
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
60	86,1	97,1	87,9	99,9	99,3	98,5	96,7	37,7	45,2
120	80,4	94,8	78,7	99,9	98,4	97,6	94,5	13,0	21,1
180	73,3	93,2	71,3	99,7	97,5	96,3	90,9	5,3	10,7
240	64,4	92,2	66,0	99,5	96,7	94,5	83,8	0,2	5,2