

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LEJA ZADRAVEC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2018

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LEJA ZADRAVEC

**VREDNOTENJE FOTOSTABILNOSTI LIPOFILNIH VITAMINOV IN
KOENCIMA Q10 Z METODO TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE
LOČLJIVOSTI**

**PHOTOSTABILITY EVALUATION OF LIPOPHILIC VITAMINS AND CO-
ENZYME Q10 BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko naložko sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju, izr. prof. dr. Robertu Roškarju, mag. farm., za njegovo predanost, vodenje in strokovno pomoč pri raziskovanju, nasvete ter spodbudo. Za vso pomoč se zahvaljujem tudi vsem sodelavcem na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko.

Hvala tudi moji družini, prijateljem in prijateljicam za vso podporo. Brez vas mi ne bi uspelo!

IZJAVA

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

Leja Zadravec

Komisija za zagovor:

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Matjaž Jeras, mag. farm.

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

Član komisije: izr. prof. dr. Žiga Jakopin, mag. farm

Ljubljana, 2018

VSEBINA

VSEBINA	i
POVZETEK	iv
SEZNAM OKRAJŠAV	vi
1. UVOD	1
1.1. VITAMIN A.....	2
1.1.1. Funkcija.....	2
1.1.2. Potrebna dnevna količina in pomanjkanje	2
1.1.3. Toksičnost	3
1.2. VITAMIN D.....	3
1.2.1. Funkcija.....	3
1.2.2. Potrebna dnevna količina in pomanjkanje	4
1.2.3. Toksičnost	5
1.3. VITAMIN E.....	5
1.3.1. Funkcija.....	5
1.3.2. Potrebna dnevna količina in pomanjkanje	6
1.4. VITAMIN K	6
1.4.1. Funkcija.....	6
1.4.2. Potrebne dnevne količine in pomanjkanje	7
1.5. KOENCIM Q10.....	7
1.5.1. Funkcija.....	7
1.5.2. Potrebna dnevna količina in pomanjkanje	8
1.6. STABILNOST	8
1.7. FOTOSTABILNOST	9
1.7.1. Testiranje fotostabilnosti ZU in končnih zdravil.....	11
1.7.2. Fotostabilnost lipofilnih vitaminov in CoQ10.....	11
1.8. ANALITIKA LIPOFILNIH VITAMINOV IN KOENCIMA Q10	14
2. NAMEN DELA.....	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. MATERIALI	17
3.1.1. Reagenti in topila.....	17

3.1.2.	Standardi.....	17
3.1.3.	Testirani izdelki	18
3.1.4.	Naprave in pribor.....	19
3.2.	ANALIZNA METODA.....	20
3.2.1.	Optimizacija metode HPLC	20
3.2.2.	Končni kromatografski pogoji HPLC	20
3.3.	PRIPRAVA VZORCEV	20
3.3.1.	Priprava raztopin vitaminov za določanje ustrezne valovne dolžine	20
3.3.2.	Priprava raztopin vitaminov in CoQ10 za vrednotenje analizne metode	21
3.3.3.	Priprava standardnih raztopin vitaminov za študijo fotostabilnosti.....	21
3.3.4.	Priprava standardne raztopine reduciranega CoQ10.....	22
3.3.5.	Priprava zmesi vitaminov v standardni raztopini	23
3.3.6.	Priprava realnih vzorcev	23
3.4.	VREDNOTENJE ANALIZNE METODE	26
3.4.1.	Ponovljivost metode	26
3.4.2.	Linearnost metode.....	26
3.5.	PREUČEVANJE FOTOSTABILNOSTI.....	26
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	29
4.1.	ANALIZNA METODOLOGIJA	29
4.1.1.	Optimizacija analizne metode	29
4.1.2.	Preverjanje analizne metode	32
4.1.3.	Priprava na študijo fotostabilnosti	34
4.2.	VPLIV DEJAVNIKOV NA FOTOSTABILNOSTI VITAMINOV	38
4.2.1.	Vpliv temperature	38
4.2.2.	Vpliv koncentracije	40
4.2.3.	Vpliv topila.....	41
4.3.	PRIMERJAVA FOTOSTABILNOSTI POSAMEZNIH VITAMINOV	44
4.3.1.	Primerjava fotostabilnosti vitaminov v acetonitrilu	44
4.3.2.	Primerjava fotostabilnosti vitaminov v etanolu	46
4.3.3.	Primerjava fotostabilnosti vitaminov v metanolu	48
4.4.	FOTOSTABILNOST ZMESI VITAMINOV	50
4.5.	FOTOSTABILNOST VITAMINOV V IZDELKIH.....	55
4.5.1.	Fotostabilnost lipofilnih vitaminov v kozmetičnih izdelkih.....	56

4.5.2.	Fotostabilnost lipofilnih vitaminov v tekočih farmacevtskih oblikah.....	57
4.5.3.	Fotostabilnost lipofilnih vitaminov in koencima Q10 v trdnih farmacevtskih oblikah	59
5.	SKLEPI.....	63
6.	LITERATURA	66
7.	PRILOGE	1

POVZETEK

Lipofilni vitamini in koencim Q10 so nizkomolekularne organske spojine, ki so nujno potrebne za normalno delovanje številnih funkcij: vida, homeostaze kalcija in fosfata, strjevanja krvi in zaščite pred oksidativnim stresom. Znano je, da so lipofilni vitamini in koencim Q10 nestabilni; tudi zaradi svetlobe. Ker so literurni podatki o občutljivosti na svetlobo in obsegu fotolize pomanjkljivi in protislovni, smo v raziskovalnem delu naloge sistematično preučevali fotostabilnost 8 lipofilnih vitaminov (A, A-palmitat, D2, D3, E, E-acetat, K1, K2) ter reducirane in oksidirane oblike koencima Q10. Vzorce smo v klimatski komori z UV modulom izpostavili svetlobi, za vrednotenje fotostabilnosti pa uporabili predhodno razvito metodo HPLC. V metodo smo dodatno vključili vitamina D2 in K2, jo optimizirali in ovrednotili v skladu z ICH smernicami ($RSD < 5\%$, $R^2 > 0,999$). Pred študijo fotostabilnosti smo se soočili s problematiko izbire ustreznega topila. Zaradi slabše topnosti vitaminov v vodi smo kot primerna topila za pripravo raztopin za preučevanje fotostabilnosti izbrali naslednja organska topila: acetonitril, etanol in metanol. Najprej smo preučevali fotostabilnost vsakega posameznega analita in stabilnosti kvantitativno ovrednotili s konstantami reakcijske hitrosti. Svetloba je najbolj vplivala na fotostabilnost K1, K2, A-palmitata in oksidiranega koencim Q10, najmanj pa na D3 in E-acetat. Na osnovi teh rezultatov smo prilagodili časovni potek študije (pretvorba K1 je bila v 1 uri 100%, D3 v pa 1 mesecu 10%). Pri vseh analitih smo preverili vpliv topila, pri manj fotostabilnih vitaminih (A-palmitat, K1 in oksidiran koencim Q10) pa dodatno tudi vpliv temperature in koncentracije. Topila so različno vplivala na izbrane analite. Vitamin A, D2, D3, K1 in K2 so bili najmanj stabilni v acetonitrilu, A-palmitat v metanolu, E in koencim Q10 pa v etanolu. Povečano fotorazgradnjo smo ugotovili pri nižji temperaturi in nižji koncentraciji. Ugotovili smo, da so bil vitamin A, D3, E-acetat, K2 in reducirani koencim Q10 bolj stabilni od svojih derivatov. V nadaljevanju smo preučevali fotostabilnost vitaminov v zmesih in interakcije med njimi. V primerjavi s fotostabilnostjo posameznega vitamina, je bila ta v zmesi večja, še največja v prisotnosti vitamina E, ki se je ob stabilizaciji drugih vitaminov tudi sam porabljal. Dodatek vitamina E je imel največji vpliv na stabilnost A-palmitata. V zaključku smo uporabljeno metodologijo preverili na šestih izbranih komercialno dostopnih izdelkih. Ker smo v njih opazili primerljiv trend obnašanja kot pri študiji vitaminov v raztopini, sklepamo, da so lipofilni vitamini v izdelkih prav tako fotonestabilni. Zato jih moramo ustrezno zaščititi pred svetlobo.

Ključne besede: lipofilni vitamini, koencim Q10, fotostabilnost, HPLC

ABSTRACT

Lipophilic vitamins and coenzyme Q10 are organic compounds essential for a variety of physiological functions in our body, such as vision, calcium and phosphate homeostasis, blood coagulation and protection against oxidative stress. They are generally unstable, partly due to light exposure. Since the published data regarding their light sensitivity and photolysis is deficient and contradictory, the focus of our research was on the photostability of 8 lipophilic vitamins (A, A-palmitate, D2, D3, E, E-acetate, K1, K2) and the reduced and oxidized forms of coenzyme Q10. Samples were exposed to light in a climate chamber with UV module and analysed with previously developed HPLC method. The method was additionally optimized for the evaluation of vitamins D2 and K2 and validated according to ICH guidelines ($RSD < 5\%$, $R^2 > 0.999$). Due to poor water solubility of lipophilic vitamins we chose organic solvents (acetonitrile, ethanol and methanol) for the preparation of solutions. Initially, we evaluated the photostability of the individual analyte, whereby the stability was quantitatively determined with reaction rate constants. Vitamins K1, K2, A-palmitate and oxidized Q10, were found most susceptible to light induced degradation, while D3 and E-acetate were affected to a lesser extent. Based on these results we adjusted the time course of the study (100 % of vitamin K1 degraded after only 1 hour, while the degradation of vitamin D3 was about 10 % after 1 month). Solvents affected the analytes stability differently: vitamins A, D2, D3, K1 and K2 were the least stable in acetonitrile, vitamin A-palmitate was the least stable in methanol, while vitamin E and coenzyme Q10 were the least stable in ethanol. The effect of temperature and concentration were additionally studied for less photostable vitamins (A-palmitate, K1 and oxidized Q10). Increased photolysis rate was observed at lower temperatures and concentrations. We compared the photostability of different vitamin derivatives and found that vitamins A, D3, E-acetate, K2, and reduced Q10 were more stable than their derivatives. Vitamins photostability in mixtures was further evaluated. Vitamins were found to interact and stabilize each other as the mixture was more stable compared to solutions with individual vitamins. Vitamin E was found to be most effective in the stabilization of other vitamins, which was particularly noticeable in the case of vitamin A-palmitate. Lastly, we applied our methodology on six commercialy available products in which light exposure had similar effects on the photostability of vitamins as in the tested solutions. We can conclude that lipophilic vitamins in products can be susceptible to light induced degradation and should therefore be protected from light.

Key words: lipophilic vitamins, coenzyme Q10, photostability, HPLC

SEZNAM OKRAJŠAV

ACN: acetonitril

ATP: adenozil trifosfat (ang. Adenosine Triphosphate)

CoQ10: koencim Q10 (ubikinon)

EDTA: etilendiamintetraocetna kislina

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

ICH: Mednarodna konferenca o usklajevanju tehničnih zahtev za registracijo zdravil za uporabo v humani medicini (ang. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)

IU: mednarodne enote (International units)

LC: tekočinska kromatografija (ang. Liquid Chromatography)

MF: mobilna faza

MQ: voda milliQ (voda pridobljena s sistemom MilliQ)

Q10-oks.: oksidirana oblika koencima Q10 (ubikinon)

Q10-red.: reducirana oblika koencima Q10 (ubikinol)

THF: tetrahidrofuran

UV: ultravijoličen

vit.: vitamin

ZU: zdravilna učinkovina

1. UVOD

Vitamini so kemijsko heterogena skupina organskih spojin z nizko molekulsko maso, ki so nujno potrebni za uravnavanje funkcij v telesu, kjer imajo številne življenjsko pomembne vloge (1,2). Delujejo lahko kot koencimi, antioksidanti, donorji ali akceptorji vodika ali elektronov, hormoni ali efektorji genske transkripcije (2). Praviloma jih človeško telo ne sintetizira, zato jih v telo vnašamo s hrano, ki jih vsebuje (1). Koencim Q10 (CoQ10) je v lipidih topen benzokinon, ki deluje kot antioksidant in elektronski prenašalec v aerobni dihalni verigi (3). Med vitamine ga ne uvrščamo, saj njegova sinteza poteka v večini človeških organov (prisoten je namreč v vseh evkariontskih celicah, predvsem na notranji strani mitohondrijske membrane) (4).

Vitamine delimo v dve glavni skupini, in sicer: hidrofilne vitamine ter lipofilne vitamine (1). Hidrofilni vitamini imajo v svoji strukturi eno ali več polarnih ali ionizirajočih skupin (npr. karboksilna, ketonska, hidroksilna, amino ali fosfatna), med tem ko imajo lipofilni vitamini v svoji strukturi hidrofobne strukture (dolge lipofilne verige, aromatski in nearomatski obroči) (2). Med hidrofilne vitamine uvrščamo vitamin C in vitamine B-kompleksa, kamor sodijo tiamin (B_1), riboflavin (B_2), niacin (B_3), pantotenska kislina (B_5), piridoksin (B_6), biotin (B_7), folna kislina (B_9) in cianokobalamin (B_{12}). Hidrofilni vitamini se iz prebavil absorbirajo neposredno, bodisi s pasivno difuzijo bodisi s specifičnimi transportnimi proteini. Med lipofilne vitamine pa uvrščamo vitamine A, D, E, K. Ti so si stukturno bolj podobni kot hidrofilni; vse lipofilne vitamine namreč sestavljajo izoprenske enote (2).

Absorpcija lipofilnih vitaminov je povezana z absorpcijo lipidov in poteka iz tankega črevesja v obliki micelov, katerih zunanjost je hidrofilna, notranjost pa hidrofobna. Hidrofobna narava služi kot solubilizator lipofilnih vitaminov. Lipofilni vitamini so praktično netopni ali pa zelo slabo topni v plazmi in limfi, zato se prenašajo do jeter s hilomikroni, ti pa se nato iz jeter prenesejo vezani na druge lipoproteine ali na specifične transportne proteine do perifernih tkiv, kjer se shranjujejo. Za svoje delovanje potrebujejo metabolično aktivacijo ali vezavo na funkcionalno enoto, kot je npr. encim (2). Lipofilni vitamini se iz telesa večinoma izločajo preko enterohepatičnega obtoka s fecesom, izjemi sta vitamin A in vitamin E, ki tvorita tudi vodotopne metabolite, ki se iz telesa izločijo z urinom. Tako lipofilni vitamini kot CoQ10 sodelujejo pri preprečevanju rakavih obolenj, srčno-žilnih bolezni, zdravljenju infekcijskih okužb kože in mukoznega epitelija (3,5, 6).

1.1. VITAMIN A

1.1.1. Funkcija

Vitamin A je skupen izraz za retinol (Slika 1) in njemu podobne spojine, ki jih imenujemo retinoidi, med provitamine A pa uvrščamo karotenoide (2). Slednji veljajo za prekurzorje

vitamina A (4). Biološko aktiven vitamin A v naravi

najdemo v obliki retinola, retinala in retinojske kisline.

Vitamin A je nujno potreben za normalno fiziološko

Slika 1: Struktura retinola. delovanje, saj sodeluje v vidnem ciklu, v imunskem odzivu pri delovanju protiteles in naravnih celic ubijalk ter nadzoru izražanja genov z vezavo na jedrne retinoidne receptorje (npr. vključen je v diferenciacijo epitelijskih celic) (7). Pomembno vlogo ima tudi pri proliferaciji celic, hkrati pa bi naj zaviral njihovo maligno transformacijo (8). V vidnem ciklu pride najprej do spontane hidrolize *trans*-retinil estrov, nato do izomerizacije do 11-*cis* retinola z encimom izomerohidrolaza, ki za svoje delovanje porablja energijo, sproščeno ob hidrolizi estrov. Po izomerizaciji sledi encimska oksidacija 11-*cis* retinola v 11-*cis* retinal, ki se prenese s pigmentnih epitelijskih celic na zunanji del paličastih celic, kjer se 11-*cis* retinal veže na opsin in skupaj tvorita rodopsin. Ta nato absorbira svetlobne fotone, 11-*cis* retinal pa se pretvori v *trans*-retinal in se sprosti s proteinskega kompleksa. Rezultat konformacijske spremembe proteina sproži kaskado reakcij, ki vodijo do prenosa signala po vidnem živcu do možganov. Prosti opsin se nato lahko ponovno veže z 11-*cis* retinalom. Sproščeni *trans*-retinal se prenese nazaj na pigmentne epitelijске celice, kjer se z encimi pretvori do *trans*-retinola in ponovno zaestri (7). Največja zaloga vitamina A je v jetrih, v manjšem obsegu se shranjuje tudi v ledvicah, modih in nadledvičnih žlezah (7, 9). Funkcije, transport in presnova vitamina A so zaradi njegove hidofobne narave odvisni od vrste specifičnih transportnih proteinov, najbolj pa od vezavnega proteina za retinol, ki nastaja v jetrih (7, 10). Ob zmanjšanju jetrne funkcije pride do zmanjšane sinteze vezavnega proteina za retinol in zmanjšanja serumske koncentracije retinola, hkrati pa do povečanja zalog retinola v jetrih, ki delujejo toksično (10).

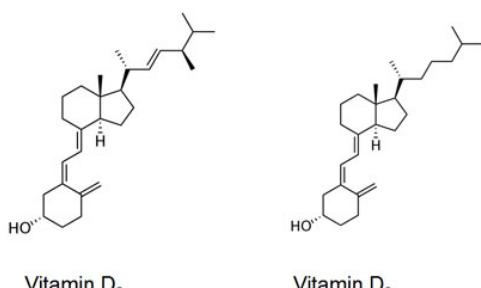
1.1.2. Potrebna dnevna količina in pomanjkanje

Priporočena dnevna količina vitamina A oz. njegovih ekvivalentov (retinilnih estrov in provitaminov A) je za dojenčke do 1 leta starosti 350 µg, za otroke od 1 do 10 let 400 µg,

od 10 do 12 leta 500 µg, od 12 leta dalje pa tako za ženske kot moške 600 µg, za doječe matere pa 850 µg (7). Dolgoročno pomanjkanje vitamina A se odraža v spremembah na očesnem tkivu (spremembe na roženici ob neustrezni celični diferenciaciji, odsotnost izločanja zaščitnih glikoproteinov in zmanjšana občutljivost oči na svetlobo), kar vodi v trajno slepoto, ki jo imenujemo kseroftalmija. Pomanjkanje se kaže kot nočna slepota (nezmožnost videnja pri šibki svetlobi) ter kot spremembe veznice in roženice (7). Na pomanjkanje vitamina A lahko kažejo tudi izguba apetita, keratinizacija epitelija, povečana dozvetnost za okužbe in kožne lezije (9).

1.1.3. Toksičnost

Jemanje prevelikih odmerkov retinola vodi v razvoj hipervitaminoz, v nekaterih primerih lahko deluje tudi toksično. To se zgodi, če pride do prevelikega vnosa vitamina A s hrano ali prehranskimi dopolnilji. Toksičnost delimo na akutno, kronično in teratogeno. Akutno toksičnost pri odrasli osebi povzroči zaužitje enkratnega odmerka nad 200 mg. Simptomi akutne hipervitaminoze so slabost, bruhanje, glavobol, povečan intrakranialni pritisk, vrtoglavica, zamegljen vid, motnje mišične koordinacije in nastanek velike fontanele pri novorojenčkih. Kronična toksičnost se pojavi pri dolgotrajnem jemanju dnevnih odmerkov 30 mg ali več (9). Pojavijo se simptomi, kot so alopecija, ataksija, kožne spremembe, bolečine v mišicah in kosteh (10). Ob zmanjšanju vnosa pa skoraj vsi simptomi izzvenijo (9). Do teratogene toksičnosti pride pri nosečnicah, ki uživajo večje odmerke vitamina A (več kot 7500 IU ekvivalenta retinola, pri čemer je 1 IU ekvivalent retinola enak 3,33 IU vitamina A). Največji problem teratogenosti se pojavi pri vnosu retinojske kisline, ki jo uporabljamo pri dermatološkem zdravljenju. Ta se v telesu nahaja v visoki serumski koncentraciji in zlahka prehaja placento (7). Pri plodu pride do malformacij udov, motenj v delovanju srca, ledvic, priželjca in centralnega živčnega sistema (7, 9).



Slika 2: Struktura vitaminov D2 in D3.

1.2. VITAMIN D

1.2.1. Funkcija

Vitamin D (Slika 2) se v naravi nahaja v dveh oblikah: vitamin D2 ali ergokalciferol in vitamin D3 ali holekalciferol. Večina vitamina D pri človeku nastaja v koži pod vplivom svetlobe (je vir 80 % skupnega

vitamina D). Pod vplivom sevanja z ultravijoličnimi žarki B iz provitamina D3 nastaja previtamin D3. Neaktivni vitamin D eksogenega izvora se pretvori v aktivni metabolit v dveh korakih: v jetrih najprej poteče hidroksilacija na mestu 25, nastane 25-hidroksikalciferol, nato pa v ledvicah temu sledi encimska pretvorba do $1\alpha,25$ -dihidroksikalciferola (kalcitriol). Vitamin D se po krvi do tarčnih organov prenaša z vezavnim proteinom za vitamin D (12). Najpomembnejša naloga kalcitriola je uravnavanje plazemskih koncentracij kalcija in fosfata, ki so nujno potrebne za normalno delovanje živčno-mišičnega sistema, mineralizacijo kosti, vazodilatacijo, prenos signalov po živčnih vlaknih in izločanje hormonov. Kalcitriol povečuje absorpcijo kalcija in fosfatov iz črevesja, njuno mobilizacijo iz kosti ter reabsorpcijo kalcija v ledvičnem distalnem tubulu (13). Kalcitriol povezujemo s številnimi obolenji, saj se receptorji za kalcitriol nahajajo v številnih celicah in tkivih v telesu (debelo črevo, dojke, pljuča, jajčniki, kosti, ledvice, keratinociti, antigen-predstavitevne celice, aktivirani T-limfociti, monociti, makrofagi, trebušna slinavka, ščitnica in tumorske celice). Vloga kalcitriola v teh tkivih še ni popolno pojasnjena. Sodeluje tudi pri razvoju zarodka (12, 13). Kalcitriol ima zelo pomembno vlogo v imunskem odzivu. Eksogeni kalcitriol zavira avtoimunski odziv (13). Tako so z dodatkom kalcitriola pri miših preprečili najpogosteje avtoimunske bolezni, kot so revmatoidni artritis, sladkorna bolezen tipa I in lupus (15). Kalcitriol tudi nenehno zavira rast tumorskih celic, saj preko vezave na receptor zanj zmanjšuje obseg njihove proliferacije (16).

1.2.2. Potrebna dnevna količina in pomanjkanje

Priporočeni dnevni odmerek vitamina D, ki ga lahko vnesemo v telo z zdravili in prehranskimi dopolnili, je za dojenčke, otroke in odrasle osebe do 51. leta starosti $5 \mu\text{g}$ (200 IU), za ženske in moške od 51. – 70. leta $10 \mu\text{g}$ (400 IU), za osebe nad 70. letom $15 \mu\text{g}$ (600 IU), za nosečnice in doječe matere pa $5 \mu\text{g}$ (200 IU) (9). Zgornja dopustna meja za dnevni vnos vitamina D, ki v telesu še ne povzroča škode in neželenih učinkov, je za dojenčke do 1 leta $25 \mu\text{g}$, za preostalo populacijo pa $50 \mu\text{g}$ (9). O pomanjkanju vitamina D govorimo, kadar je serumska koncentracija kalcitriola nižja od 25 nmol/l . Nastane bodisi zaradi premajhnega vnosa bodisi zaradi zmanjšane sinteze endogenega vitamina D3 (16). Pomanjkanje vitamina D je zelo pogosto, po ocenah naj bi vitamina D primanjkovalo eni milijardi ljudi (17). Najbolj razširjeno je pri starostnikih in otrocih, ki uživajo z vitaminom D revno prehrano. Pri odraslih na njegovo pomanjkanje kažejo pogosti zlomi kosti,

zmanjšana kostna in mišična masa, rakava obolenja ter debelost. Dolgotrajno pomanjkanje vodi v razvoj osteoporoze in osteomalacij. Pri otrocih se zaradi hipovitaminoze vitamina D lahko razvije rahič (16).

1.2.3. Toksičnost

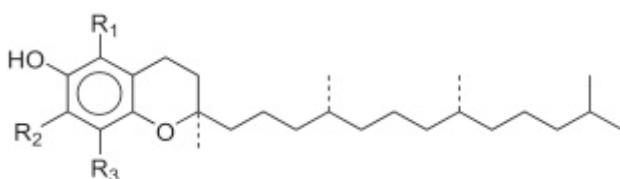
Zastrupitve z vitaminom D so v praksi redke, vendar se pojavijo kot posledica zdravljenja hipovitaminoze zaradi prevelikega vnosa vitamina D z zdravili ali prehranskimi dopolnili. V študijah, ki so jih izvedli na živalih, so poročali o toksičnem odmerku 0,5 mg/kg telesne mase in o letalnem odmerku (LD₅₀) 88 mg/kg. Pri človeku znaša LD₅₀ v obliki enkratnega odmerka 21 mg/kg. Razlika med hipervitaminozo in zastrupitvijo z vitaminom D je v serumski koncentraciji kalcitriola (hipervitaminoza: 250 nmol/l, zastrupitev: nad 375 nmol/l). Hipervitaminoza je stanje, kjer gre za povečanje serumske koncentracije 25-hidroksikalciferola, z ali brez hiperkalciemije. Znaki zastrupitve so: hiperkalciemija, hiperkalciurija, bruhanje, izguba apetita in telesne mase, žeja, poliurija, mišična oslabelost, bolečina v sklepih in kalcifikacije (18).

1.3. VITAMIN E

1.3.1. Funkcija

Vitamin E (Slika 3) je splošno ime za vse derivate tokoferola in tokotrienola, ki izkazujejo podobno aktivnost kot α -tokoferol (2). Ti derivati so: α -, β -, γ - in δ -tokoferol ter α -, β -, γ -

in δ -tokotrienol (4). Vsak tokoferol vsebuje tri kiralne centre, zato je možnih več optičnih izomerov, največjo biološko aktivnost pa izkazuje



Slika 3: Struktura vitamina E v obliki tokoferola.

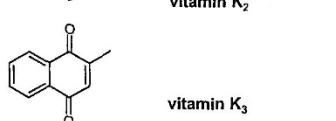
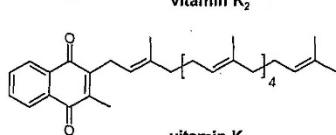
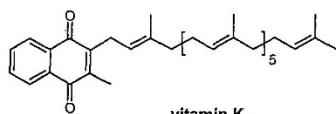
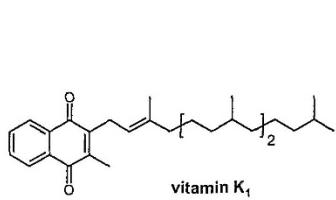
α -tokoferol (4). Po telesu se do tarčnih organov

prenese vezan na lipoprotein visoke gostote in lipoprotein zelo nizke gostote (19). Vitamin E ima tako v telesu kot izven njega vlogo antioksidanta, pri čemer je za njegovo antioksidativno aktivnost odgovorna fenolna skupina (4, 8). Ščiti tkiva pred oksidativnim stresom, ki jih povzročajo npr. cigaretni dim, kancerogene snovi in smog (8). Ključen je pri preprečevanju lipidne peroksidacije lipoproteinov, reagira namreč s peroksidnim radikalom, singletnim kisikom in drugimi radikali. Vitamin E tudi zmanjšuje adhezijo trombocitov pri aterosklerozi, zavira post-translacijsko transkripcijo 3-hidroksi-3-metilglutaril-koencima A (HMG-CoA) in sodeluje pri nadzoru nivojev izvenceličnih

tekočin. Zavira tudi modifikacije tistih proteinov v možganih in limfocitih, ki sodelujejo v procesu apoptoze (19).

1.3.2. Potrebna dnevna količina in pomanjkanje

V odvisnosti od starosti se za dojenčke in otroke priporoča uživanje vitamina E v odmerku od 5 do 13 mg dnevno, za odrasle ženske 11 mg, za odrasle moške pa 13 mg. Predoziranje in razvoj hipervitaminoze vitamina E sta v praksi redka, saj imamo tako ljudje kot tudi živali visoko toleranco (2). Pri visokih odmerkih α -tokoferola se namreč njegove plazemske koncentracije povečajo od dvakrat do štirikrat, nadalnjih povišanj pa nato ne zaznamo. Predvidevajo, da ima v uravnavanju plazemskih koncentracij tokoferola ključno vlogo vezavni protein za tokoferol (19). Manjša toksičnost je tudi posledica slabe absorpcije (20). Pogosteje je pomanjkanje vitamina E. Ta se pojavi, ko uživamo hrano, v kateri ni zadostitvitamina E, ali ko se ta ne more absorbirati, npr. pri določenih genetskih boleznih in infekcijskih okužbah, ki prizadenejo jetrne funkcije. Kratkotrajno pomanjkanje vitamina E pri ljudeh nima velikega pomena, saj njegove plazemske koncentracije upadejo šele po nekaj mesecih (4). Povezujejo ga tudi z vrsto patoloških stanj, kot so encefalomalacija, mišična distrofija, hemoliza, ki vodi v anemijo, poškodbe mišic, holestaza jeter in nevrološke nepravilnosti (19). Pomanjkanje vitamina E pri samcih glodalcev lahko povzroči sterilnost, pri brejih samicah glodalcev pa odmrtje zarodkov (4).



1.4. VITAMIN K

1.4.1. Funkcija

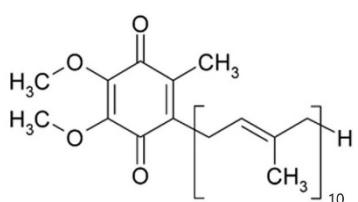
Vitamin K (Slika 4) se v naravi nahaja v več oblikah. V rastlinah nastaja v obliki filoquinona (vitamin K1), v

Slika 4: Struktura vitamina K v različnih oblikah. obliki menakinona (vitamin K2) pa ga proizvajajo červesne bakterije (21, 22). Vitamin K2 (v literaturi ga označujejo tudi kot MK) je v naravi prisoten v več oblikah, pri čemer se razlikujejo v številu izoprenskih enot (npr. MK-9 jih ima v stranski verigi 9). Vitamin K najdemo tudi v obliki menadiona (vitamin K3), ki pa je sinteznega izvora. V procesu koagulacije krvi je potreben za sintezo številnih aktivnih oblik koagulacijskih faktorjev (23). Deluje kot kofaktor encima γ -karboksilglutamilne kabroksilaze, ki katalizira post-translacijsko pretvorbo glutaminskih ostankov v

glutaminsko kislino (21, 23). V kosteh se nahajajo od vitamina K odvisni proteini (npr. S-protein in osteokalcin), ki po njihovi aktivaciji sodelujejo pri ohranjanju kostne mase in preprečevanju zlomov. Osteokalcin nastaja v osteoblastih, ima visoko afiniteto do kalcija v hidroksiapatitu, zato ga veže nase (24). Zato ima pomanjkanje vitamina K pomembno vlogo pri nastanku osteoporoze (7).

1.4.2. Potrebne dnevne količine in pomanjkanje

Priporočeni dnevni odmerek vitamina K pri dojenčkih je 2 µg, pri otrocih obeh spolov do najstništva pa 75 µg. Za odrasle moške priporočajo vnos 120 µg dnevno, za odrasle ženske pa 90 µg na dan (22). Predoziranje se pojavi pri parenteralni aplikaciji, in sicer pri otrocih pri odmerku, ki je večji od 5 mg, pri odraslih pa, ko je ta večji od 10 mg (25). Pomanjkanje vitamina K pri odraslih je redko, vendar lahko nastane zaradi jemanja nekaterih zdravil (antagonisti vitamina K in antibiotiki, ki zavrejo nastajanje vitamina K2 v črevesnih bakterijah), malabsorpcije lipidov in s tem posledično tudi vitamina K ter jetnih bolezni. Pomanjkanje vitamina K se pri novorojenčkih izraža kot hemoragična bolezen, pri odraslih pa kot od vitamina K odvisna hipoprotrombinemija. Hemoragična bolezen se pojavlja pogosteje pri otrocih kot pri odraslih (9). Prepoznamo jo po koagulopatijah, ki nastanejo zaradi nezmožnosti aktivacije od vitamina K odvisnih koagulacijskih proteinov (npr. II, VII, IX in X) in se izrazijo kot blage krvavitve. Novorojenčki imajo večje tveganje za pojav hipovitaminoze zaradi slabega prehoda vitamina K skozi placento, manjšega nastajanja oz. odsotnosti njegove tvorbe v črevesnih bakterijah ali zaradi zmanjšane vsebnosti vitamina K v materinem mleku. Danes se takšno pomanjkanje pojavi redko, saj novorojenčku kmalu po rojstvu dajo vitamin K v enkratnem odmerku (0,5 do 1 mg intramuskularno ali pa 1 do 2 mg peroralno) (26).



Slika 5: Struktura CoQ10.

1.5. KOENCIM Q10

1.5.1. Funkcija

Koencim Q10 (Slika 5) je po svoji strukturi lipofilen benzokinonski derivat, ki se v človeškem telesu

nahaja v obliki z desetimi izoprenskimi enotami, pri drugih živalskih vrstah pa je teh enot manj (4). Sodeluje pri nastajanju energije v obliki ATP v procesu oksidacije glukoze (19, 27). V dihalni verigi prenaša elektrone iz kompleksov I in II do kompleksa III ter protone skozi osmozno bariero notranje mitohondrijske membrane

(4, 19). Pri tem prehaja iz oksidirane oblike preko semikinonskega radikalskega intermediata do reducirane oblike (4). Kot donor elektronov deluje tudi antioksidativno, saj lovi radikale in preprečuje lipidno peroksidacijo (19). Pokazatelj oksidativnega stresa je lahko tudi razmerja med reducirano in oksidirano obliko CoQ10 (ubikinol/ubikinon) v plazmi (4.) Nekatere raziskave kažejo, da ima CoQ10 pozitivne učinke na vzdrževanje srčne funkcije, in sicer z uravnavanjem presnove v srčni mišici (27). Poleg tega izboljšuje sposobnost aerobne vadbe, ščiti mišice pred pretirano uporabo statinov tekom zdravljenja hiperholesterolemije ter številne organe (vključno s kožo) pred staranjem (28). Največ CoQ10 je v mitohondriih, Golgijevem aparatu in lizosomih, najdemo ga tudi v plazmi, večina pa ga dnevno nastaja v jetrih. Kinonski obroč nastaja iz tirozina in fenilalanina, stranska poliprenilna veriga pa iz acetil-CoA (19).

1.5.2. Potrebna dnevna količina in pomanjkanje

Sinteza CoQ10 je endogena (4). Z leti obseg njegovega nastajanja upada, zato ga moramo v telo vnašati s hrano in prehranskimi dopolnili (26). Priporočeni dnevni odmerek je do 1200 mg za odrasle in do 10 mg za otroke. Do pomanjkanja CoQ10 lahko pride zaradi avtosomno recessivnih genskih mutacij. Prisotno je pri kardiomiopatijah in degenerativnih živčno-mišičnih boleznih, kot so: encefalomiopatije, hude zgodnje multisistemske bolezni, ataksije zaradi okvar malih možganov ter Leighov sindrom z zastojem v rasti, ataksijo, nefrotskim sindromom, in izolirano miopatijo. Pri pomanjkanju CoQ10 pride najprej do poškodb malih možganov, ki vsebujejo najmanjše zaloge CoQ10 (29).

1.6. STABILNOST

Stabilnost je sposobnost farmacevtskega izdelka, da skozi čas pri določenih pogojih shranjevanja ohranja svoje lastnosti znotraj predpisanih mej (30). Stabilnost razdelimo na fizikalno, mikrobiološko in kemično, pri kateri mora vsaka zdravilna učinkovina (ZU) ohraniti svojo kemijsko istovetnost in jakost znotraj določenih mej. Oblike nestabilnosti delimo na fizikalne (spreminjajo se fizikalne lastnosti zdravila) in kemijske, kjer nastajajo nove spojine. Med kemijske razgradne poti uvrščamo solvolize, oksidacije, fotolize, dehidracije, racemizacije, konjugacije in druge manj pogoste reakcije. Pri solvolizah poteka razgradnja ZU v prisotnosti topila (ta je največkrat voda → hidroliza), pri oksidacijah pa pod vplivom atmosferskega kisika. Pri fotolizi gre za spremembo ZU pod vplivom svetlobe (31).

Lipofilni vitamini so precej nestabilni. V svojih strukturah imajo konjugirane dvojne vezi, kar je tudi razlog za njihovo kemično nestabilnost (32). So izredno občutljivi na oksidacije, vpliv temperature, kisika, kovinskih ionov (zlasti Fe^{2+} in Cu^{2+}), nenasičenih lipidov v procesu peroksidacije in svetlobe, zato jih moramo ustrezno zaščititi (2). Stabilnost CoQ10 je problematična (dvojne konjugirane vezi) ob izpostavitvi svetlobi in povišani temperaturi (33).

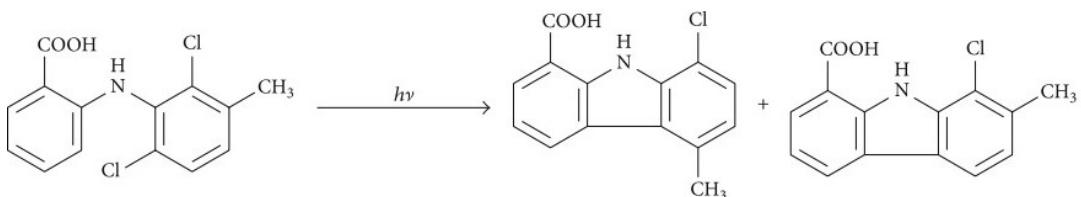
1.7. FOTOSTABILNOST

Fotostabilnost ZU uvrščamo med kemično stabilnost ZU in jo opisujemo kot občutljivost učinkovine pri izpostavitvi svetlobi. Pri tem opazujemo spremembe kemijske strukture, morebiten nastanek radikalov, prenos energije ter luminiscenco. Najpogosteje prihaja zaradi fotorazgradnje do zmanjšanja delovanja in učinka ZU. Fotostabilnost delimo na tisto, ki jo opazimo *in vitro* ter tisto, ki se pojavi *in vivo*. Z ugotavljanjem fotostabilnosti *in vitro* vrednotimo stabilnost ZU na svetlobo in opazujemo njene organoleptične spremembe ter zmanjšanje vsebnosti obravnavane spojine. Mnogo ZU je občutljivih na svetlobo. Pri večini teh opazimo spremembe že med študijo fotostabilnosti *in vitro*, nekatere med njimi pa so pri tem testu stabilne (so fotokemično inertne), vendar pa so v telesu (*in vivo*) vir radikalov in tvorijo fototoksične metabolite (34). Slednje ZU so fotoreaktivne po zaužitju in povzročajo neželene učinke (npr. fotosenzitivnost ali preobčutljivost na svetlobo) v primeru, ko je pacient izpostavljen svetlobi. Fotosenzitivna reakcija je odvisna od porazdelitve ZU ali njenih metabolitov v tkiva, ki so bolj izpostavljena UV sevanju (koža, oči in lasje) ter od absorpcijskih spektrov ZU ali njihovih metabolitov, ki se morajo prekrivati s transmisijskim spektrom posameznega tkiva. Žarki optičnega sevanja z valovno dolžino nad 300 nm namreč prodrejo globoko v kožo in reagirajo s spojinami, ki krožijo v krvnem obtoku ali pa so nakopičene v določenem tkivu (35). Primeri fotoreaktivnih učinkovin *in vivo* so klorpromazin, tetraciklini in šentjanževka (34). Fotonestabilnost *in vivo* pa je lahko tudi koristna oz. uporabna v terapevtske namene, npr. za zdravljenje luskavice (34). Prav tako je pomembna pri sintezi vitamina D3 (12). Številne učinkovine so občutljive na svetlobo, zato lahko prihaja do njihove fotolize med proizvodnjo, shranjevanjem in jemanjem zdravil (36). Njihova stabilnost na svetlobi je seveda različna (34).

Mehanizem fotorazgradnje je zelo kompleksen in odvisen od redoks lastnosti analita. Fotoliza na svetlobi je odvisna od temperature, koncentracije analita, vira svetlobe (UV ali

vidna svetloba) in drugih dejavnikov, zato jo težje kvantitativno ovrednotimo kot npr. oksidativni razpad (34).

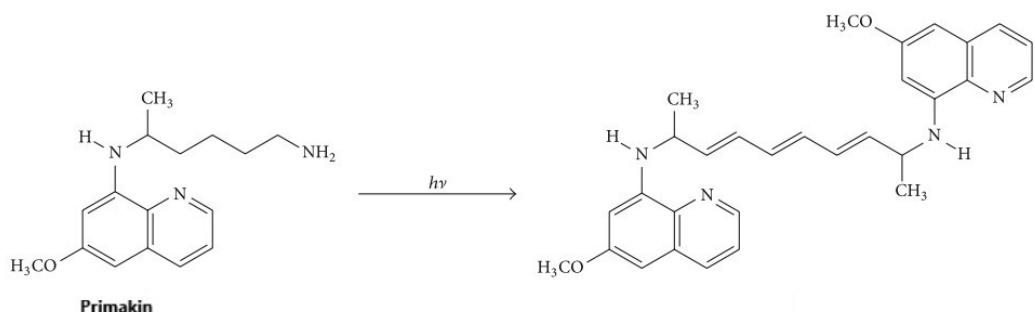
Fotokemične reakcije razdelimo na primarne (neposredne) in sekundarne (posredne). Vsak fotokemični proces se začne z vzbujenim stanjem ZU oz. senzitizatorja (ang. sensitizer) do reaktivnega vzbujenega stanja, temu pa nato sledi absorpcija fotonov in prehod elektronov na višji energijski nivo. Pri neposrednih fotokemičnih reakcijah molekula nato preide nazaj v osnovno stanje ali pa se razgradi, pri posrednih pa pride do prenosa energije na drugo molekulo, ki nato kemično reagira (37). Posredni fotokemični proces lahko vključuje tudi redoks reakcije, kjer začetni preneseni atom ali elektron tvori radikale, oksidiran ali reducirani senzitizator pa v nadalnjih reakcijah omogoča regeneracijo začetne molekule (38). Mnoge fotokemične reakcije so kompleksne, ključno vlogo v njih pa ima molekularni kisik v osnovnem tripletnem stanju (${}^3\text{O}_2$) (34). Ta se pretvori v singletni kisik (${}^1\text{O}_2$) in kemično reagira z različnimi molekulami. Fotokemične reakcije z molekularnim kisikom vodijo v tvorbo radikalov, kot so peroksi radikali (ROO^\bullet), superoksidni anion ($\text{O}_2^\bullet^-$) in hidroksilni radikal (HO^\bullet), nastane pa tudi vodikov peroksid. Med fotokemične reakcije uvrščamo fotoadicije, photociklizacije (Slika 6), fotodekarboksilacije, fotodealkiliranje, fotodehalogenizacije, fotodimerizacije (Slika 7), fotoeliminacije, s svetlobo inducirane hidrolize, fotoizomerizacije, fotooksidacije, s svetlobo inducirane prenestitve in fotoinducirane cepitve obročev (36).



meklofenaminska kislina

Slika 6: Primer photociklizacije na meclofenaminski kislini (prirejeno po viru 36).

Med samo proizvodnjo in shranjevanjem zdravil prihaja do izpostavitve zdravil različnim virom in intenzitetam svetlobe: od neposredne sončne svetlobe, filtrirane sončne svetlobe do različnih umetnih virov svetlobe. Vsi omenjeni viri lahko povečujejo kvarljivost ZU in povzročajo izgubo ali spremembo ZU, spremembo biološke uporabnosti in spremembe fizikalno-kemijskih lastnosti (organoleptične spremembe, izguba uniformnosti). Poleg tega pa lahko pride tudi do nastanka (foto)toksičnih razpadnih produktov (39).



Slika 7: Primer fotodimerizacije na primakinu (prijejeno po viru 36).

1.7.1. Testiranje fotostabilnosti ZU in končnih zdravil

Vrednotenje fotostabilnosti je pomembno za zagotavljanje kakovosti izdelka tekom roka uporabnosti (34). Vrednotenje fotostabilnosti obravnava smernica Mednarodne konference o usklajevanju tehničnih zahtev za registracijo zdravil za uporabo v humani medicini (ICH): ICH smernica Q1B (40). Namen testiranja je ovrednotenje intrinzičnih fotostabilnostnih značilnosti ZU za dokazovanje odsotnosti nesprejemljivih sprememb. K testiranju fotostabilnosti je potrebno pristopiti sistematično, pri čemer izvajamo testiranje ZU, testiranje zdravila izven primarne ovojnинe, testiranje zdravila v primarni ovojnini in testiranje zdravila v tržni ovojnini. Test fotostabilnosti same ZU je sestavljen iz obremenilnih in potrditvenih študij. Pri obremenilni študiji moramo ovrednotiti občutljivost preskušane spojine na svetlobo, vzorci pa morajo biti v kemično inertnih in transparentnih posodah. Pri obremenilnih testih ZU izpostavimo stresnim pogojem in ugotavljamo, ali je občutljiva na svetlobo ter mehanizem fotoreakcije. Pri testiranju farmacevtskega izdelka (zdravila) pa izvajamo sistematične potrditvene študije. Tekom študije fotostabilnosti moramo nadzorovati temperaturo in/ali vključiti kontrolni vzorec, zaščiten pred svetlobo. Pri potrditvenih študijah mora biti obremenitev s svetlobnim virom vsaj $1,2 \cdot 10^6$ lux*h za dnevno in 200 Wh/m^2 za bližnjo UV svetlobo. Za testiranje sta priporočena dva vira svetlobe: D65 ali ID65, ki simulirata dnevno svetlobo, ter žarnica z bližnjim UV sevanjem ali hladno belo fluorescentno svetlobo. Za vsak svetlobni vir moramo izvesti kalibracijo, pri čemer si pomagamo s kininsko kemično aktinometrijo (40).

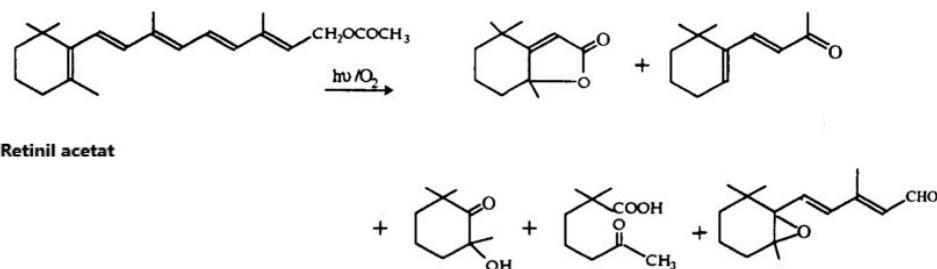
1.7.2. Fotostabilnost lipofilnih vitaminov in CoQ10

Lipofilni vitamini in CoQ10 so občutljivi na svetlobo, pri tem potekajo številne fotokemijske reakcije in nastajajo različni produkti, ki so navedeni v Preglednici I.

Preglednica I: Pregled reakcij lipofilnih vitaminov in CoQ10 pod vplivom svetlobe.

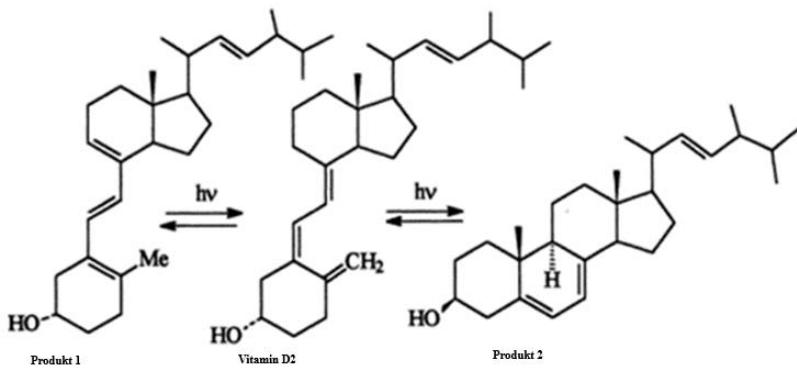
Vitamin	Fotoreakcija	Produkt	Obseg spremembe
Vitamin A	Izomerizacija (34)	<i>cis</i> -izomer (34)	100% v 24 urah (41)
Vitamin D	Izomerizacija (34)	<i>cis</i> -izomer (34)	Ni podatka
Vitamin E	Oksidacija (34)	stabilen radikal (45)	Ni podatka
Vitamin K	Oksidacija, adipacija (34)	kromenol (43)	Ni podatka
CoQ10	Oksidacija (46)	Ni podatka	72,3% v 2 h pri 25 °C (46)

Vitamin A je pod vplivom svetlobe podvržen številnim oksidacijam (primarna alkoholna skupina in dvojne vezi v stranski verigi ali v obroču). Za njegove estre, npr. palmitat, pa podatki iz literature navajajo, da bodo bolj stabilni od retinola zaradi zaestrenosti primarne alkoholne skupine (41). Začetni produkti fotooksidacije so retinal, njegovi izomeri in derivati (peroksidi in epoksidi) (Slika 8) (42). Ti so pogostokrat nestabilni in vstopajo v nadaljnje reakcije. Pod vplivom svetlobe pride najprej do odprtja obroča ter fotodimerizacije vitamina A in njegovih estrov. Slika 8 prikazuje fotooksidacijo retinil acetata. Tako pri retinolu kot retinil palmitatu pride do popolne pretvorbe že znotraj enega dneva (41).



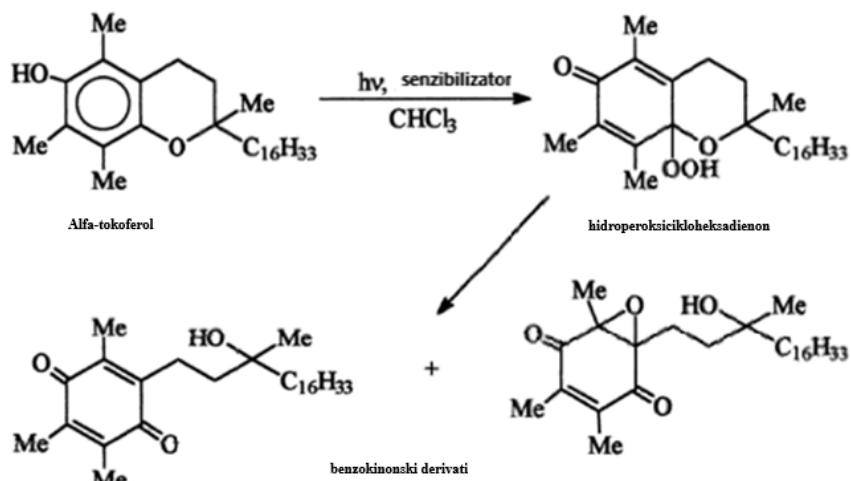
Slika 8: Fotooksidacija retinil acetata (prirejeno po viru 41).

Pri vitaminu D pride pod vplivom svetlobe tako do premestitve vodika (produkt 1, Slika 9) kot zaprtja obroča (produkt 2, Slika 9) (44).



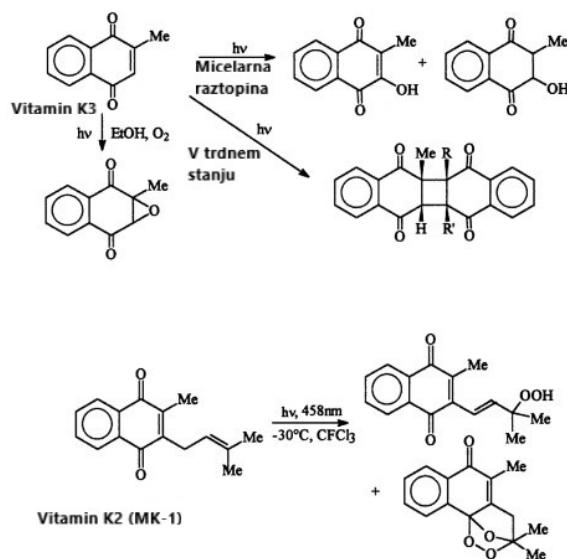
Slika 9: Fotoliza vitamina D2 (prirejeno po viru 44).

Pri fotooksidaciji α -tokoferola (Slika 10) z UVB žarki najprej nastane resonančno stabilen tokoferoksilni radikal. V kolikor ne pride do regeneracije tokoferola, vodi s svetlobo vzbujeno stanje v fotolizo in sprostitev tokoferoksilnega radikala. Ta v nadaljevanju reagira z radikali in tvori številne nove radikale, čemur sledi počasna dekompenzacija do benzokinonskih derivatov (44, 45).



Slika 10: Fotooksidacija vitamina E (prirejeno po viru 44).

Pri vitaminu K (Slika 11) pod vplivom svetlobe potečeta fotooksidacija in fotoliza, pri čemer v raztopini z etanolom nastaja kromenol (43). Izpostavitev vitamina K svetlobi vodi do nastanka epoksidov, hidroksilacije in fotodimerizacije (44). CoQ10 je prav tako zelo občutljiv na svetlobo. Že v dveh urah izpostavljenosti UV svetlobi na sobni temperaturi njegova vsebnost pada na 72,3% prvotne (46). CoQ10 je podvržen fotoionizaciji, pri čemer nastane solvatiziran elektron in radikalski kation (47). Fotoliza CoQ10 sledi glede na podatke v literaturi, reakciji prvega reda (48).



Slika 11: Fotoliza vitaminov K3 in K2 (prirejeno po viru 44).

1.8. ANALITIKA LIPOFILNIH VITAMINOV IN KOENCIMA Q10

Danes se za analizo lipofilnih vitaminov in CoQ10 uporabljajo številne metode, najpogosteje tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), sklopljena z različnimi vrstami detektorjev (npr. UV/VIS, fluorescenčni, elektrokemijski in masni spektrofotometer) (49). Metoda HPLC omogoča hitro ločbo analitov in njihovo kvantitativno vrednotenje, pri čemer je hkrati selektivna, natančna in točna. V večini primerov je HPLC sklopljena z detektorjem UV/VIS, saj vsi lipofilni vitamini in CoQ10 absorbirajo svetlobo v UV in vidnem spektru (50). V zadnjem času vse bolj uporabljamo HPLC, sklopljeno z masnim spremstrem (LC-MS, LC-MS/MS), saj z njo dosežemo večjo selektivnost in občutljivost pri kvantitativnem vrednotenju in identifikaciji vitaminov ter njihovih metabolitov pri zelo nizkih koncentracijah (49). Metode HPLC, sklopljene z različnimi detekcijskimi tehnikami, omogoča sočasno in natančno vrednotenje lipofilnih vitaminov in CoQ10 v hrani, zdravilih in prehranskih dopolnilih (51). Najpogosteje uporabljeni metodi za ločevanje lipofilnih vitaminov in CoQ10 je porazdelitvena kromatografija, ki jo delimo na normalno-fazno in reverzno-fazno (49). Slednja prevladuje v praksi (50). Težavo pri vrednotenju fotorazgradnje lipofilnih vitaminov in CoQ10 predstavljajo številni produkti, ki otežujejo analitiko. V študijah so fotostabilnost lipofilnih vitaminov in CoQ10 vrednotili z analiznimi metodami, predstavljenimi v Preglednici II. V večini primerov so uporabili reverzno-fazno metodo HPLC.

Preglednica II: Analizne metode za vrednotenje fotostabilnosti lipofilnih vitaminov in CoQ10.

Vitamin	Uporabljene analizne metode
vit. A	reverzno-fazna HPLC (52,53,54,55), normalno-fazna HPLC (56), spektrofotometrične metode* (57), tekočinska kromatografija ultra zmogljivosti (58)
vit. D	reverzno-fazna HPLC (59), tekočinska kromatografija ultra zmogljivosti (58)
vit. E	reverzno-fazna HPLC (53,54,55)
vit. K	plinska kromatografija (60), reverzno-fazna kromatografija (61)
CoQ10	reverzno-fazna HPLC (62), HPLC/MS (46)

*- spektrofotometrične metode niso dovolj selektivne

2. NAMEN DELA

Zadnje čase vse več ljudi uporablja izdelke, ki vsebujejo lipofilne vitamine in CoQ10. Zanje je iz literature razvidno, da so občutljivi na svetlobo, vendar so ti podatki nezanesljivi, pomanjkljivi in protislovni. Pogostokrat se proizvajalci ne zavedajo pomembnosti fotostabilnosti njihovih izdelkov, zato lahko z nepravilnim shranjevanjem (izven originalne ovojnинe) dodatno prihaja do skrajševanja časa ustreznosti izdelkov.

Osrednji namen magistrske naloge bo sistematično vrednotenje fotostabilnosti 8 lipofilnih vitaminov (vit. A, A-palmitat, D3, D2, E, E-acetat, K1 in K2) in CoQ10 v oksidirani in reducirani oblikah, ki se najpogosteje pojavljajo v izdelkih. Vzorce bomo v klimatski komori z UV modulom izpostavili ultravijolični in dnevni svetlobi. Za vrednotenje fotostabilnosti omenjenih analitov bomo testirali in uporabili predhodno razvito metodo HPLC. Uvodoma bomo preučevali vpliv UV svetlobe na posamezen analit. Nato bomo izbrali manj stabilne vitamine in pri njih dodatno preverili vpliv različnih stresnih dejavnikov, ki lahko vplivajo na hitrost fotoreakcij. Tako bomo raziskovali vpliv topil (acetonitril, etanol, metanol), različnih koncentracij analitov (10, 100, 500 in 1000 mg/l) in temperature (15, 20, 25, 30 in 40 ° C).

Ker se vitamini in CoQ10 pogosto pojavljajo v multivitaminskih izdelkih, bomo v nadaljevanju analizirali tudi zmesi vitaminov v raztopinah in ugotavljal morebitne interakcije med njimi. Zaradi neselektivnosti kromatografske ločbe za dva para vitaminov bomo pripravili dve osnovni zmesi, v katerih bomo zajeli vse vitamine, v nadaljevanju pa bomo vrednotili še druge zmesi za dodatno preverjanje interakcij med analiti. Odziv posameznega vitamina bomo primerjali z odzivom njegovega derivata (posamezno in v zmeseh).

Na koncu bomo izbrali nekaj izdelkov in na njih preverili uporabljeno metodologijo. Izbrali bomo dve kremi z različima oblikama vitamina A kot predstavnika kozmetičnih izdelkov. Preverili bomo tudi fotostabilnosti lipofilnih vitaminov in CoQ10 v dveh tekočih in dveh trdnih farmacevtskih oblikah. Kot predstavnika trdnih oblik si bomo izbrali en izdelek v obliki mehkih kapsul in en v obliki filmsko obloženih tablet.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Reagenti in topila

- Acetonitril (ACN), C_2H_3N , M=41,05 g/mol, za HPLC (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Destilirana voda, Fakulteta za farmacijo
- Etilendiamintetraocetna kislina (EDTA), $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_6 \times 2H_2O$, M=372,24 g/mol, >99% (Merck, Nemčija)
- Etanol, C_2H_6O , M=46,07 g/mol, ≥99,8%, za HPLC (Gram mol, Hrvaška; Merck, Nemčija)
- Fosforjeva (V) kislina: H_3PO_4 , M=98,00 g/mol, ≥85% (Merck, Nemčija)
- Heksan, C_6H_{14} , M=86,18 g/mol, ≥99%, za analizo (Honeywell, ZDA)
- Metanol, CH_4O , M=32,04 g/mol, ≥99,9%, za HPLC (Sigma-Aldrich, Nemčija; Honeywell, ZDA)
- MilliQ voda (MQ), Fakulteta za farmacijo
- Natrijev borhidrid, H_4BNa , M=37,83 g/mol, (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Tetrahidrofuran (THF), C_4H_8O , M=72,11 g/mol, za HPLC (Sigma-Aldrich, Nemčija; Honeywell, ZDA)

3.1.2. Standardi

- (\pm)- α -tokoferol (vitamin E), $C_{29}H_{50}O_2$, M=430,72 g/mol (Fluka analytical, Nemčija)
- DL- α -tokoferol acetat (vitamin E acetat), $C_{31}H_{52}O_3$, M=472,76 g/mol (Fluka analytical, Nemčija)
- Ergokalciferol (vitamin D2), $C_{28}H_{44}O$, M=396,65 g/mol, ≥98,0%, za HPLC (Supelco, ZDA)
- Filokinon (vitamin K1), $C_{31}H_{46}O_2$, ≥99,0%, vsota izomerov, za HPLC (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Holekacliferol (vitamin D3), $C_{27}H_{44}O$, M=384,64 g/mol, ≥98,0%, za HPLC (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Menakinon (vitamin K2), $C_{31}H_{40}O_2$, M= 444,65 g/mol, za HPLC (Supelco, ZDA)
- Retinol (vitamin A), $C_{20}H_{30}O$, M= 286,45 g/mol, ≥98,0%, za HPLC (Sigma-Aldrich, Nemčija)

- Retinil palmitat (vitamin A palmitat), C₃₆H₆₀O₂, M=524,86 g/mol, za HPLC (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- Ubikinon (koencim Q10), C₅₉H₉₀O₄, M=863,37 g/mol, delovni standard (Kaneka Corporation, Japonska)

3.1.3. Testirani izdelki

Metodologijo, ki smo jo uporabljali na raztopinah posameznih vitaminov, smo prenesli tudi na testirane izdelke, predstavljene v Preglednici III.

Preglednica III: Podatki o testiranih vitaminskih pripravkih

Št.	Ime pripravka in proizvajalec	Vrsta pripravka	Farmacevtska oblika	Navedena vsebnost	Rok uporabe in serija
1	Liftactiv Advanced Filler (Vichy)	Kozmetični izdelek	Krema	0,2 (m/m) % retinol*	December 2016 64KD06
2	Hydra Active3 Nacht (Loreal)	Kozmetični izdelek	Krema	Retinil palmitat [#]	12 mesecev po odprtju 28N100
3	Konakion (Roche)	Zdravilo na recept	Raztopina za injiciranje ali peroralna raztopina	1 ml raztopine vsebuje 10 mg fitomenadiona (vit. K1) (63)	April 2018 F3162F02
4	AD3 (Krka)	Zdravilo na recept	Peroralne kapljice, emulzija	V 1 ml peroralnih kapljic je 6000 IU retinil palmitata in 2000 IU D3 (64)	December 2017 C68523
5	FidiKoencim 10 (FidiMed)	Zdravilo brez recepta	Mehka kapsula	V 1 kapsuli je 30 mg CoQ10 in 24 mg vseracemnega- α -tokoferil acetata (65)	Januar 2017 A10526-01

6	FidiVit Multi (FidiMed)	Prehransko dopolnilo	Tableta	1 tableta vsebuje 10 µg vit. D3, 30 µg vit. K2, 5 mg β-karotena in 10 mg vit. E v obliki mešanih tokotrienolov.*	Julij 2018 1101380100
---	----------------------------	----------------------	---------	--	--------------------------

* podatek naveden na ovojnini; # ni podatka

3.1.4. Naprave in pribor

- Analitska tehnica Excellence Plus (Mettler Toledo, Švica)
- Avtomatske pipete 20-200 µl, 100-1000 µl (Eppendorf, Nemčija)
- Centrifuga Centric 322A (Tehnica, Slovenija)
- Centrifuga Centric 400R (Tehnica, Slovenija)
- Hladilnik (Gorenje, Slovenija)
- Stresalnik Vibromix 10 (Tehnica, Slovenija)
- Stresalnik Vibromix 403 EVT (Tehnica, Slovenija)
- Sistem HPLC 1100-1200 (Agilent Technologies, ZDA), ki vsebuje kvarterno črpalko, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono in UV-VIS detektor
- Klimatska komora ICH 260 L z UV svetlobnim modulom (Memmert, Nemčija)
- Kolona Luna C18 150 × 4,6 mm, 5 µm (Phenomenex, ZDA)
- Predkolona Luna C18 4 × 3,0 mm (Phenomenex, ZDA)
- Sistem za pripravo vode MilliQ A10 Advantage (Millipore Corporation, ZDA)
- Steklovina (čaše, meritne bučke, meritni valji, polnilne pipete, zamaški, viale, čolnički za tehtanje, petrijevke, epruvete)
- Ostalo: nastavki za pipete, spatule, zamaški za viale, zaščitne rokavice, mikrocentrifugirke, plastične epruvete z navojem
- TurboVap (Calipier, ZDA)
- Ultrazvočna kadička Sonis 4 (Iskra Pio, Slovenija)

3.2. ANALIZNA METODA

3.2.1. Optimizacija metode HPLC

Za vrednotenje fotostabilnosti vzorcev smo uporabili že predhodno vzpostavljen metodo HPLC. Analizno metodo, ki omogoča sočasno hitro ločbo več lipofilnih vitaminov (vit. A, A-palmitat, D3, E ali E-acetat in K1) in CoQ10, je razvila avtorica Srečnik. Z izbrano analizno metodo ne moremo ločiti med vitaminoma E in E-acetat zaradi podobnih retencijskih časov (50). Poleg prej omenjenih vitaminov smo nameravali v metodo vključiti tudi vitamina D2 in K2. Pri preverjanju metode HPLC smo spremenjali tudi valovno dolžino, pri kateri smo detektirali posamezne vitamine. Ti imajo namreč absorpcijske maksimume pri različnih valovnih dolžinah. Snemali smo pri 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 300, 310 in 320 nm.

3.2.2. Končni kromatografski pogoji HPLC

- Stacionarna faza: kolona Luna C18 150 × 4,6 mm, 5 µm
- Mobilna faza: ACN:THF:MQ=50:45:5
- Temperatura kolone: 25 °C
- Pretok mobilne faze: 1 ml/min
- Volumen injiciranja: od 2 do 20 µl (odvisno od vzorca)
- Valovna dolžina: 270, 280, 285, 290, 320, 325 nm (odvisno od vzorca)*
- Temperatura avtomatskega vzorčevalnika: 25 °C

*Posamezne vitamine v raztopini smo detektirali pri valovni dolžini, kjer imajo absorpcijski maksimum, vitamine v zmesih in pripravke pa pri 270 nm. Izjema so bili pripravki 1 in 2, ki smo ju detektirali pri valovni dolžini 325 nm, ter pripravek 5, katerega smo analizirali pri valovni dolžini 280 nm.

3.3. PRIPRAVA VZORCEV

3.3.1. Priprava raztopin vitaminov za določanje ustreznih valovnih dolžin

Pripravili smo raztopine posameznih vitaminov in CoQ10 s koncentracijo 1 g/l. Natehtali smo 10 mg posameznega vitamina in ga kvantitativno prenesli v 10 ml bučko ter do oznake dopolnili z acetonitrilom. Neposredno v viale smo izvedli 10-kratno redčitev (prenesli smo 100 µl raztopine in dodali 900 µl ACN), da smo dobili raztopine s koncentracijo 100 mg/l.

3.3.2. Priprava raztopin vitaminov in CoQ10 za vrednotenje analizne metode

Za vrednotenje linearnosti smo pripravili raztopine posameznega vitamina CoQ10 z različnimi koncentracijami (20, 50, 100 in 200 mg/l). Na začetku smo natehtali 2 mg posameznega vitamina in CoQ10 ter ga kvantitativno prenesli v 10 ml bučko. Raztopili smo ga v ACN. Dobili smo začetno koncentracijo 200 mg/l. Da smo dobili želene koncentracije, smo začetno koncentracijo redčili z ACN v viale, tako kot je navedeno v Preglednici IV.

Preglednica IV: Priprava raztopin posameznih analitov z različnimi koncentracijami

Koncentracija [mg/l]	Volumen raztopine vitamina s koncentracijo 200 mg/l [µl]	Dodatek ACN [µl]
20	100	900
50	250	750
100	500	500
200	1000	0

Za vrednotenje ponovljivosti smo pripravili raztopine vitaminov in CoQ₁₀ s koncentracijo 100 mg/l. V mikrocentrifugirko smo natehtali 1 mg posameznega analita in ga raztopili s pomočjo UZ kopeli v 1 ml ACN. V vialo za analizo smo prenesli 100 µl raztopine in dodali 900 µl ACN.

3.3.3. Priprava standardnih raztopin vitaminov za študijo fotostabilnosti

Priprava raztopin za preliminarно študijo fotostabilnosti

Natehtali smo 1 mg posameznega vitamina, ga kvantitativno prenesli v 10 ml bučko in ga raztopili v ACN s pomočjo UZ.

Priprava raztopin za študijo fotostabilnosti

Trikrat smo ločeno natehtali 2,5 mg vit. A, A-palmitata, vit. D2, D3, vit. E, E-acetata, K1, K2 in oksidiranega CoQ10 ter jih kvantitativno prenesli v 25 ml bučko. S tremi topili (acetonitril, etanol in metanol) smo posamezne vitamine dopolnili do oznake. Raztopine smo sonicirali na UZ kopeli toliko časa, dokler se vitamini niso raztopili v izbranem topilu.

Priprava raztopin za preučevanje vpliva različne začetne koncentracije analita na fotostabilnost

Za posamezno koncentracijo smo pripravili ločeno raztopino. Naredili smo raztopine posameznih vitaminov, ki pri katerih je fotorazgradnja potekala hitreje (vit. A-palmitat, K1 in CoQ10), s koncentracijami 10, 100, 500 in 1000 mg/l po postopku Priprava raztopin za študijo fotostabilnosti, pri čemer smo pri različnih začetnih koncentracijah uporabili različne natehte in volumne bučk, predstavljene v Preglednici V. Preučevane analite smo raztoplili v vseh treh izbranih topilih (ACN, EtOH in MeOH).

Preglednica V: Priprava raztopin z različnimi začetnimi koncentracijami analitov

Koncentracija [mg/l]	10	100	500	1000
Natehta [mg]	1	2,5	12,5	25
Volumen bučke [ml]	100	25	25	25

3.3.4. Priprava standardne raztopine reduciranega CoQ10

Reducirano obliko CoQ10 smo pripravili iz komercialno dostopne oksidirane oblike po postopku, razvitem v Laboratoriju za stabilnost zdravil na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, in sicer smo najprej pripravili raztopino oksidiranega CoQ10 v heksanu s koncentracijo 500 mg/l in odpipetirali 15 ml v 50 ml plastično epruveto z navojem, ki smo jo predhodno zaščitili pred svetlobo. Tej raztopini smo dodali 37,5 mg NaBH₄ in 7,5 ml MeOH ter mešali 3 minute na vibracijskem mešalu. Nato smo pustili 5 minut, da je potekla reakcija redukcije CoQ10. Po 5 minutah smo dodali 7,5 ml 0,1 M EDTA in ponovno stresali na vibracijskem mešalu 30 sekund. Temu je sledilo centrifugiranje pri 25 °C, 3 minute na 4000 obratih. Nato smo odpipetirali po 1 ml heksanske faze v 2 ml mikrocentrifugirke in sušili na TurboVap pri 40 °C s pomočjo dušika pod tlakom. Ko je bil vzorec posušen, smo ga raztoplili v 1 ml ACN (v nadaljevanju smo reducirano obliko CoQ10 raztopljal tudi v EtOH, MeOH), ga prenesli na UZ kadičko (10 minut) in ponovno mešali 30 sekund na vibracijskem mešalu. Raztopino smo kvantitativno prenesli v 5 ml bučko in dopolnili z istim topilom za raztopljanje. Vsako pripravo reduciranega CoQ10 smo izvedli v treh ponovitvah. Uspešnost redukcije smo izračunali po *enacbi 1* in jo izrazili v odstotkih.

$$\% \text{redukcije} = \frac{\text{AUC Q10_red.}}{(\text{AUC Q10_red.} + \frac{\text{AUC Q10_ox.}}{5})} * 100\% \quad \text{Enačba 1}$$

AUC Q10_red.: površina pod krivuljo za CoQ10-red. (povprečje treh ponovitev)

AUC Q10_ox.: površina pod krivuljo za CoQ10-oks. (povprečje treh ponovitev)

% redukcije: uspešnost redukcije v odstotkih

3.3.5. Priprava zmesi vitaminov v standardni raztopini

Pripravili smo dve raztopini, ki sta vsebovali zmesi različnih vitaminov. V prvo raztopino (zmes 1) smo dodali A, A-palmitat, D3, E, K1, K2 in oksidirano obliko CoQ10, v drugo (zmes 2) pa A, A-palmitat, D2, E-acetat, K1, K2 in oksidirano obliko CoQ10. V končni raztopini smo nameravali imeti posamezen vitamin s koncentracijo 100 mg/l. Ker se je pri CoQ10 pojavil problem s topnostjo, ta se namreč pri višji koncentraciji v izbranih topilih izobori, smo pripravili analite v raztopini z naslednjimi koncentracijami v treh topilih (ACN, MeOH, EtOH):

- 250 mg/l CoQ10
- 1000 mg/l posamezni vitamini (A, A-palmitat, D3/D2, E/E-acetat, K1, K2)

V 50 ml bučko smo odpipetirali 20 ml pripravljenе raztopine CoQ10 in po 5 ml raztopin preostalih vitaminov. Zmesi analitov v raztopini smo pripravili v vseh treh topilih.

V nadaljevanju smo pripravili 3 dodatne raztopine zmesi vitaminov v ACN:

- zmes 3: vit. A-palmitat in vit. K1,
- zmes 4: vit. A-palmitat, vit. K1, CoQ10,
- zmes 5: vit. A-palmitat in vit. K1, CoQ10 in vit. E.

Najprej smo pripravili raztopine posameznega vitamina v enakih koncentracijah (250 mg/l CoQ10 in 1000 mg/l za posamezne vitamine) navedenih v prejšnjem odstavku. V 50 ml bučko smo odpipetirali 20 ml pripravljenе raztopine CoQ10 in po 5 ml raztopin izbranih vitaminov ter z ACN dopolnili do oznake. Vsako zmes smo izpostavili vplivu UV svetlobe v treh paralelah.

3.3.6. Priprava realnih vzorcev

Ekstrakcija lipofilnih vitaminov iz kozmetičnih izdelkov (pripravka 1 in 2)

Kremo (pripravek 1 in pripravek 2) smo najprej natehtali v stekleno petrijevko (0,8 g za analizo pripravka 1 in 5 g za analizo pripravka 2) in izpostavili svetlobi v klimatski

komori. Vzorce za analizo smo pripravili v treh paralelah po postopku iz diplomske naloge avtorice Perhavec (66). Najprej smo pripravek natehtali v 15 ml plastično epruveto z navojem (Preglednica VI), ji dodali 2 ml ACN in 5 minut sonicirali z UZ. Dodali smo 8 ml heksana, mešali 5 minut na vibracijskem mešalu in centrifugirali 10 minut pri 5000 vrtljajih na minuto. V mikrocentrifugirko smo prenesli ustrezen volumen heksanske faze (Preglednica VI), in sušili s prepihanjem z dušikom pod tlakom pri 40 °C. Suhi ostanek smo raztopili v mobilni fazi (MF), s pomočjo UZ in nato 1 minuto mešali na vibracijskem mešalu. Vsebino smo nato prenesli v viale za analizo s HPLC.

Preglednica VI: Pogoji pri pripravi vzorca za analizo iz različnih kozmetičnih izdelkov

Št. pripravka	Masa kreme (g)	Volumen (ml)	supernatanta	Volumen injiciranja (µl)
1	0,2	0,5		10
2	1	1		20

Priprava vzorca za vrednotenje fotostabilnosti vitamina K1 v pripravku 3

Za preučevanje fotostabilnosti vitamina K1 v izdelku smo pripravek 3 kvantitativno prenesli iz primarne ovojnine v transparentno vialo in jo izpostavili UV svetlobi. Za primerjavo fotostabilnosti vitamina K1 v pripravku 3 z vitaminom K1 v raztopini posameznega vitamina smo pripravili raztopino pripravka 3 s koncentracijo 1000 mg/l. V vialo smo prenesli 100 µl pripravka 3 (vsebuje 10000 mg/l vitamina K1) in dodali 900 µl ACN. V viali smo pripravek izpostavili UV svetlobi. Vzorce smo pripravili v dveh paralelah.

Vzorce za analizo fotostabilnosti smo pripravili po postopku iz magistrske naloge avtorice Srečnik (50). Pripravek 3 s koncentracijo 10000 mg/l smo v vsaki časovni točki najprej redčili. Namesto 1000-kratne redčitve smo izvedli 500-kratno redčitev z mobilno fazo. Z avtomatsko pipeto smo v 5 ml bučko prenesli 100 µl pripravka 3 in dodali manjši volumen mobilne faze. Vzorec smo nato sonicirali 10 minut na UZ (raztopina je pred soniciranjem opalescentna, po soniciranju pa se zbistri). Raztopino smo nato ohladili na sobno temperaturo in jo do oznake dopolnili z mobilno fazo. 100 µl smo prenesli v vialo in dodali 900 µl mobilne faze. Razredčen pripravek 3 (koncentracija 1000 mg/l) smo neposredno injicirali na kolono.

Priprava vzorca za vrednotenje fotostabilnosti vitaminov A-palmitat in D3 v pripravku 4

Pripravo vzorca za analizo fotostabilnosti iz pripravka 4 smo pripravili po postopku iz magistrske naloge avtorice Srečnik (39). Pripravek 4 smo neposredno, brez dodatnega redčenja, injicirali na kolono. Zmanjšali smo le volumen injiciranja na 3 µl. Vzorčili smo v treh paralelah. Vzorce smo v komori izpostavili UV svetlobi v transparentnih vialah.

Ekstrakcija lipofilnih vitaminov in CoQ10 iz mehkih kapsul (pripravek 5)

Vzorce za analizo fotostabilnosti smo pripravili po optimiziranem postopku iz magistrske naloge avtorice Srečnik (50). Kapsulo (pripravek 5) smo prerezali s skalpelom in jo prenesli v 100 ml bučko ter do oznake dopolnili z *n*-heksanom. Nato smo 10 minut sonicirali na UZ, 20 minut stresali na stresalniku in 10 minut centrifugirali pri 3200 vrtljajih na minuto. V mikrocentrifugirko smo prenesli 0,5 ml heksanske faze in sušili s prepihanjem z dušikom pod tlakom pri 40 °C do suhega. Heksansko fazo smo sušili v treh paralelah. Suhi ostanek smo raztopili v 2 ml MF, sonicirali 10 minut na UZ in mešali s pomočjo vibracijskega mešala 30 sekund.

Ekstrakcija lipofilnih vitaminov in CoQ10 iz tablet (pripravek 6)

Pripravek 6 smo pripravili po optimiziranem postopku iz magistrske naloge avtorice Srečnik (50), po katerem smo tableto najprej prenesli v 15 ml plastično epruveto z navojem, dodali 2 ml 0,1% H₃PO₄ in mešali 5 minut na vibracijskem mešalu. Nato smo dodali 8 ml *n*-heksana, sonicirali 10 minut na UZ, mešali z vibracijskim mešalom 2 minut in centrifugirali 10 minut pri 5000 vrtljajih na minuto. 2 ml heksanske faze smo prenesli v plastično mikrocentrifugirko in sušili do suhega s prepihanjem z dušikom pod tlakom pri 40 °C. Heksansko fazo smo sušili v treh ponovitvah. Suhi ostanek smo raztopili 0,5 ml v MF, 10 minut sonicirali in 30 sekund mešali s pomočjo vibracijskega mešala.

Priprava vzorca za test preverjanja fotostabilnosti med pripravo vzorca (pripravek 5)

Pripravili smo raztopino po postopku Ekstrakcija lipofilnih vitaminov in CoQ10 iz mehkih kapsul v točki 3.3.6. Odmerili smo jo v 5 ml bučke in opazovali fotostabilnost vitaminov. V kolikor je med študijo stabilnosti prišlo do hlapenja heksana, smo s heksanom dopolnili do oznake. Za vrednotenje vpliva svetlobe na stabilnost lipofilnih vitaminov in CoQ10 v

raztopini za analizo smo izbrali obdobje 4 ur. V vsaki časovni točki smo vzorec analizirali v treh paralelah.

3.4. VREDNOTENJE ANALIZNE METODE

Že predhodno validirana metoda za merjenje lipofilnih vitaminov in CoQ10 (50) je vključevala vrednotenje CoQ10 in vitaminov A, A-palmitat, D3, E, E-acetat ter K1, ne pa tudi vrednotenja vitaminov D2 in K2. Zato smo za vse analite izvedli delno vrednotenje analizne metode. Za vrednotenje ponovljivosti in linearnosti metode smo pripravili raztopine posameznega vitamina po postopku, opisanem v točki 3.3.2.

3.4.1. Ponovljivost metode

Natančnost smo vrednotili s ponovljivostjo, pri čemer smo za vsak vzorec vrednotili znotraj-dnevno ponovljivost in ponovljivost injiciranja. Ponovljivost znotraj dneva smo preverili v 3 paralelah, ponovljivost injiciranja pa smo vrednotili s šestkratnim injiciranjem istega vzorca. Ponovljivost smo izrazili kot relativni standardni odmik (RSD), izražen v odstotkih. Kot kriterij sprejemljivosti smo za znotraj-dnevno ponovljivost postavili mejo $RSD < 5\%$, za ponovljivost injiciranja pa $RSD < 2\%$.

3.4.2. Linearost metode

Linearost metode smo za vsak analit posebej ovrednotili z umeritveno premico, ki smo jo določili iz grafa odvisnosti odziva posameznega analita (površina pod kromatografskim vrhom analita) od koncentracije. Umeritveno premico smo določili s pomočjo linearne regresije v programu MS Excel. Za mejo sprejemljivosti smo določili kriterij $R^2 \geq 0,999$.

3.5. PREUČEVANJE FOTOSTABILNOSTI

Stabilnost vitaminov na svetlobi smo opazovali v klimatski komori z UV-modulom pri stalni temperaturi (25°C). Vir svetlobe v klimatski komori je standardno svetilo (D65), ki simulira dnevno svetlobo in UV sevanje v spektralnem območju 320-400 nm (67). Vzorce smo pripravili po postopkih, opisanih v točki 3.3., in jih vrednotili z metodo HPLC z UV-VIS detektorjem (točka 3.2.). Vsak vzorec smo pripravili in analizirali v treh paralelah.

Najprej smo izvedli preliminarno študijo fotorazgradnje vitaminov in CoQ10 v raztopini, kjer smo ugotavljali pri 25°C hitrost fotolize ob času 0, po 1, 2 in 24 urah. Raztopine vitaminov in CoQ10 s koncentracijo 100 mg/l v ACN smo pripravili po postopku,

opisanem v točki 3.3.3. (Priprava raztopin za preliminaro študijo fotostabilnosti) in ugotovili, da pri analitih vitamin K1, A-palmitat in CoQ10 vsebnost upada bistveno hitreje kot pri preostalih vitaminih. Na osnovi teh rezultatov smo tudi definirali časovne točke spremeljanja fotostabilnosti posameznih vitaminov.

Pri nadalnjem preučevanju fotostabilnosti lipofilnih vitaminov in CoQ10 v raztopini smo vzorce pripravili po postopkih, opisanih v točki 3.3.3. (Priprava raztopin za študijo fotostabilnosti). Pripravljeno raztopino posameznega vitamina (v 25 ml bučki) smo enakomerno razdelili v 3 epruvete z zamaškom (8 ml v vsako) in jih pri temperaturi 25 °C izpostavili UV svetlobi. Posamezne analite in analite v zmeseh z drugimi analiti smo vzorčili v različnih časovnih točkah, sama shema vzorčenja je predstavljena v Preglednici VII. Vzorce smo izpostavili UV svetlobi v steklenih epruvetah v treh paralelah.

Preglednica VII: Shema vzorčenja lipofilnih vitaminov in CoQ10 v raztopinah analitskih standardov v različnih časovnih točkah [h]

Analiti	t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8	t9	t10
vit. K1	0	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2		
vit. K2											
vit. A-palmitat											
red. Q10	0	0,5	1	1,5	2	3	4				
oks. Q10											
vit. A	0	2	4	28	48	120	168	288			
vit. D2									720		
vit. D3											
vit. E											
vit. E-acetat										720	
Zmesi lipofilnih vitaminov in CoQ10	0	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2	3	4

V vsaki časovni točki smo preverili, ali je fotorazgradnja izključno posledica vpliva svetlobe. Zato smo vzporedno analizirali kontrolni vzorec, ki je bil na 25 °C in zaščiten

pred svetlobo. Pri fotorazgradnji vitaminov smo ugotavljali tudi vpliv dejavnikov: topila, koncentracija in temperatura. Izbrane vrednosti parametrov opisuje Preglednica VIII.

Preglednica VIII: Vpliv izbranih parametrov na fotostabilnost vitaminov in CoQ10

Parameter	Variiranje parametra				
Temperatura [°C] °	15	20	25	30	40
Začetna koncentracija [mg/l] °	10	100	500	1000	
Topilo *	acetonitril	etanol	metanol		

°parameter smo preverjali pri vitaminih K1, A-palmitat in CoQ10-oks.; * parameter smo preverjali pri vseh analitih, posamezno in v zmeseh; metanol smo pri preverjanju vpliva začetne koncentracije izpustili

Preučevanje fotostabilnosti izdelkov

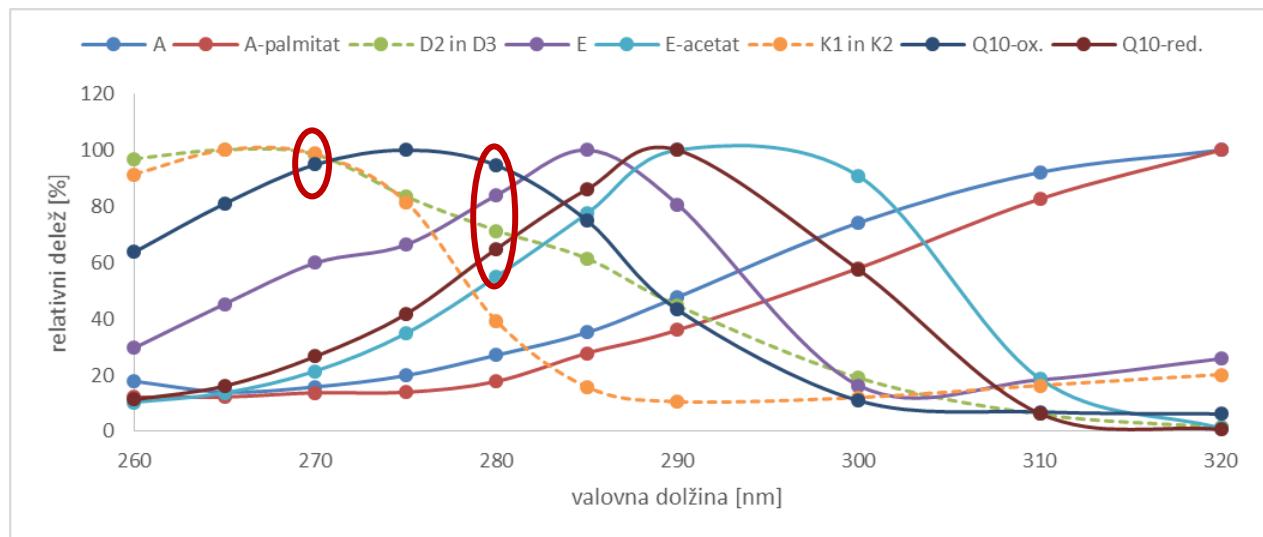
Lipofilne vitamine in CoQ10 v pripravkih smo izpostavili UV svetlobi v različni ovojnini. Pripravka 1 in 2 smo v komoro postavili v petrijevkah, pripravka 3 in 4 v prozornih vialah, pripravka 5 in 6 pa v primarni ovojnini. Fotostabilnost različnih pripravkov smo spremljali različno dolgo. Vmesne časovne točke smo izbrali glede na farmacevtsko obliko pripravka in glede na to, katere vitamine je pripravek vseboval. V vsaki časovni točki smo vzeli pripravek iz komore in ga pripravili za analizo po postopkih, napisanih v točki 3.3.6. Pripravka 1 in 2 smo vzorčili ob času 0, 4 in 24 ur, pri pripravku 2 smo imeli še vmesno časovno točko po 2 urah. Fotostabilnost v pripravku 3 smo preučevali po času 0, 0,5, 1,75, 2,75, 24 in 72 urah, v pripravku 4 pa v časovnih točkah: 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3 in 24 urah. Pripravek 5 smo analizirali ob času 0 in po 1, 2, 3, 4 tednih, pripravek 6 pa ob času 0 in po 1, 3, 5 tednih. Preučevali smo tudi vpliv svetlobe na pripravo vzorca za vrednotenje vsebnosti in fotostabilnost lipofilnih vitaminov in CoQ10 v pripravku ob času 0 in po 0,5, 1, 1,5, 2, 3 ter 4 urah.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. ANALIZNA METODOLOGIJA

4.1.1. Optimizacija analizne metode

Za vrednotenje vitaminov smo izbrali analizno metodo avtorice Srečnik (50) in jo prilagodili oz. optimizirali za namen vrednotenja fotostabilnosti posameznih lipofilnih vitaminov. Pri tem smo najprej izbrali optimalno valovno dolžino detekcije za izbrane analite, saj je bila v prehodni metodi le-ta prilagojena glede na vsebnost vitaminov v izdelkih. Zato smo najprej posneli kromatograme standardnih raztopin posameznih vitaminov (vit. A, A-palmitat, D2, D3, E, E-acetat, K1, K2 in CoQ10 v obeh oblikah) in njihovih zmesi pri različnih valovnih dolžinah. V okviru naše študije smo za detekcijo posameznega vitamina izbrali tisto valovno dolžino, pri kateri ima detektirani analiti absorpcijski maksimum v višjem območju (nad 260 nm). Izbrani analiti imajo namreč absorpcijske maksimume pri različnih valovnih dolžinah. Pri izbiri za detekcijo vitaminov v zmesih in multivitaminskih izdelkih smo se osredotočili na vitamina D in K, ki se v multivitaminskih pripravkih pojavljata v μg območju, medtem ko se pa preostali vitaminji: vit. A, A-palmitat, E, E-acetat in CoQ10 (v reducirani in oksidirani obliki) pojavljajo v mg območju. Hkrati smo se pri izbiri ustrezne valovne dolžine za detekcijo lipofilnih vitaminov in CoQ10 v zmesih in izdelkih, osredotočili na tiste, ki imajo pri enaki masni koncentraciji nižji odziv.



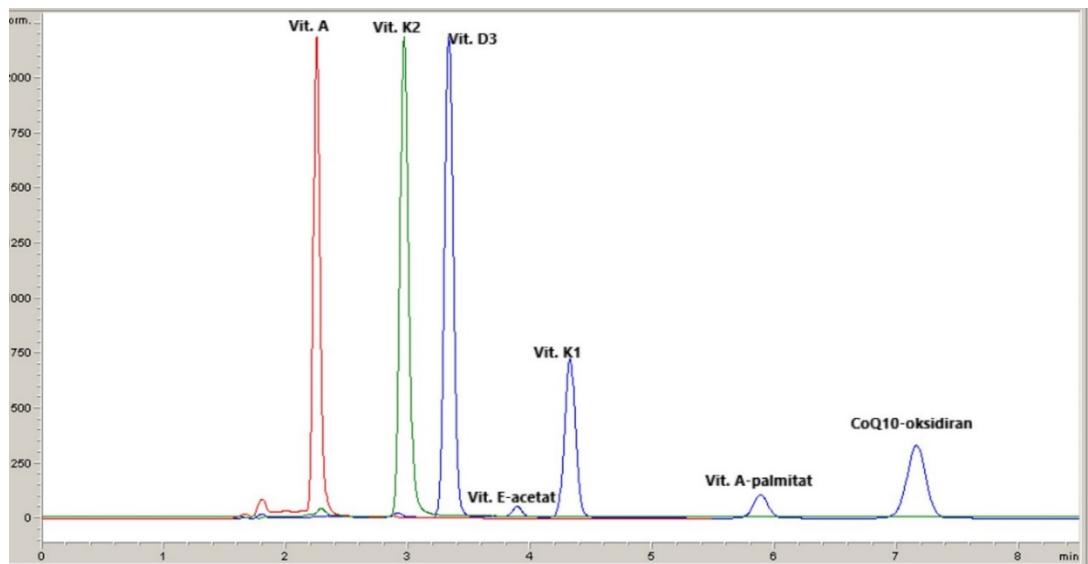
Slika 12: Graf spremenjanja odzivov analita (relativno glede na maksimalni odziv) v odvisnosti od valovne dolžine detekcije.

Na Sliki 12 je vidino, da odzivi vitaminov D2, D3 in K1, K2 z naraščanjem valovne dolžine upadajo. Absorpcijski maksimum imajo v območju med 260 in 270 nm, natančneje sicer pri 265 nm. Odzivi preostalih vitaminov so pri valovni dolžini 265 nm precej nizki, z naraščanjem valovne dolžine do 270 nm pa se odzivi večine vitaminov, razen vitaminov A, A-palmitat in E-acetat, bistveno povečajo. Ti vitamini se v izdelkih nahajajo v večjih količinah. Za detekcijo vitaminov v zmeseh in izdelkih smo zato izbrali detekcijsko valovno dolžino 270 nm. Izdelke, ki so vsebovali samo en vitamin, pa smo opazovali pri njegovem absorpcijskem maksimumu. Znano je, da je odziv oksidirane oblike CoQ10 približno desetkrat oz. petkrat večji kot odziv reducirane pri 270 oz. 280 nm (68). Razmerje odzivov med oksidirano in reducirano obliko naj bi bil čim manjše. Zato smo se odločili, da pripravek 5, ki je vseboval obe oblike CoQ10 in ga preučevali pri valovni dolžini 280 nm. Odzivi vitaminov K in D se pri tej valovni dolžini že bistveno zmanjšajo, vendar so še vedno dovolj visoki za ustrezno detekcijo, medtem ko se odzivi preostalih vitaminov še povečajo.

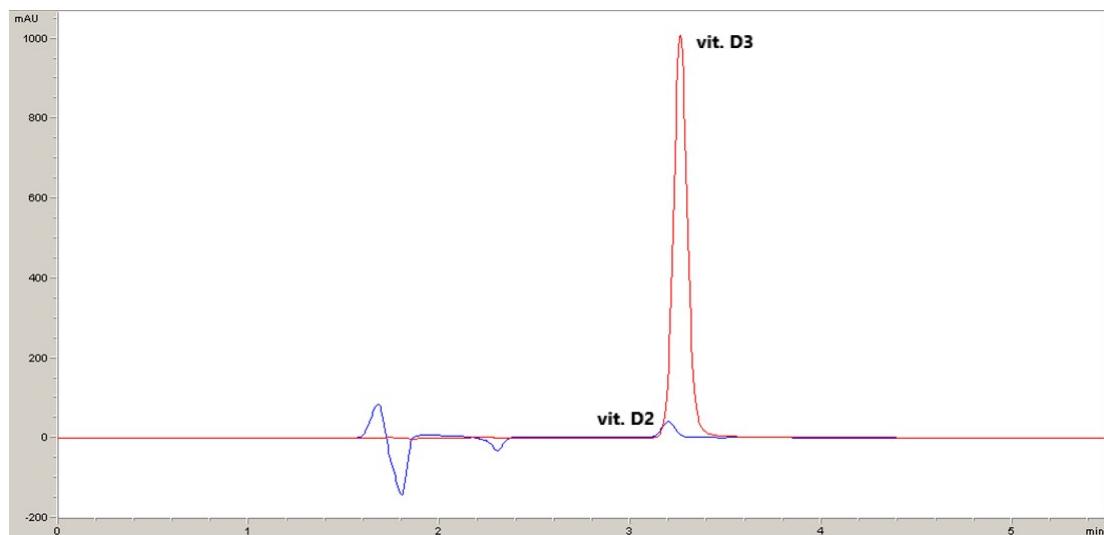
Posamezen vitamin smo torej detektirali pri njegovem absorpcijskem maksimumu, prav tako izdelke, ki so vsebovali samo en analit. Pripravek, ki je vseboval obe oblike CoQ10 smo analizirali pri valovni dolžini 280 nm, vitamine v zmeseh in multivitaminskih izdelkih pa pri 270 nm.

Analitika vitaminov D2 in K2

Vitamin D se v izdelkih pogosto pojavlja tudi v obliki vitamina D2, vitamin K pa v obliki K2. Ker predhodno vzpostavljena analizna metoda ni vključevala analitike vitaminov K2 in D2, smo najprej preverili, ali se pri izbranih kromatografskih pogojih ločita od preostalih vitaminov in CoQ10 (50). Na podlagi podobne strukture in podobnih fizikalno-kemijskih lastnosti smo sklepali, da bodo retencijski časi teh dveh vitaminov podobni retencijskima časoma vitaminov D3 in K1. Pri vitaminu K2 smo dobili lepo kromatografsko ločitev od preostalih vitaminov (Slika 13), pri vitaminu D2 pa žal ne (Slika 14). Pri kromatografski ločitvi vitamina D2 je namreč prišlo do prekrivanja kromatografskih vrhov z vitaminom D3, ki je vitaminu D2 sorodna in zelo podobna spojina s primerljivim retencijskim časom. To pa v bistvu niti ni predstavljalo večje omejitve za uporabo analizne metode, saj je v posameznih multivitaminskih izdelkih prisotna le ena od oblik vitamina D.



Slika 13: Kromatogram lipofilnih vitaminov in oksidiranega CoQ10 v raztopini (koncentracija 100 mg/l).



Slika 14: Kromatogram vitaminov D2 in D3 v raztopini.

Priprava reducirane CoQ10

V študiji fotostabilnosti smo želeli vključiti tudi reducirano obliko CoQ10. Ker pa ta oblika CoQ10 ni na razpolago komercialno, smo jo pripravili iz oksidirane, in sicer skladno s predhodno razvitim postopkom (opisano v podoglavlju 3.3.4.). V tem postopku se kot topilo za raztopljanje posušene heksanske faze uporablja acetonitril (ACN). Poleg tega smo dodatno preverili tudi uporabo etanola in metanola kot topil za raztopljanje, saj smo želeli preučevati fotostabilnost v vseh treh topilih. Po končani reakciji smo uspešnost pretvorbe CoQ10 iz oksidirane v reducirano obliko ugotavljali glede na odzive obeh oblik pri valovni dolžini 280 nm, kjer je odziv oksidirane oblike petkrat večji od reducirane (68).

Uspešnost redukcije v vseh treh topilih po raztplavljanju suhega vzorca smo izračunali s pomočjo *Enačbe 1* in jo izrazili v odstotkih. Rezultati uspešnosti redukcije CoQ10 so predstavljeni v Preglednici IX.

Preglednica IX: Prikaz uspešnosti postopka priprave reducirane oblike CoQ10 v treh različnih topilih.

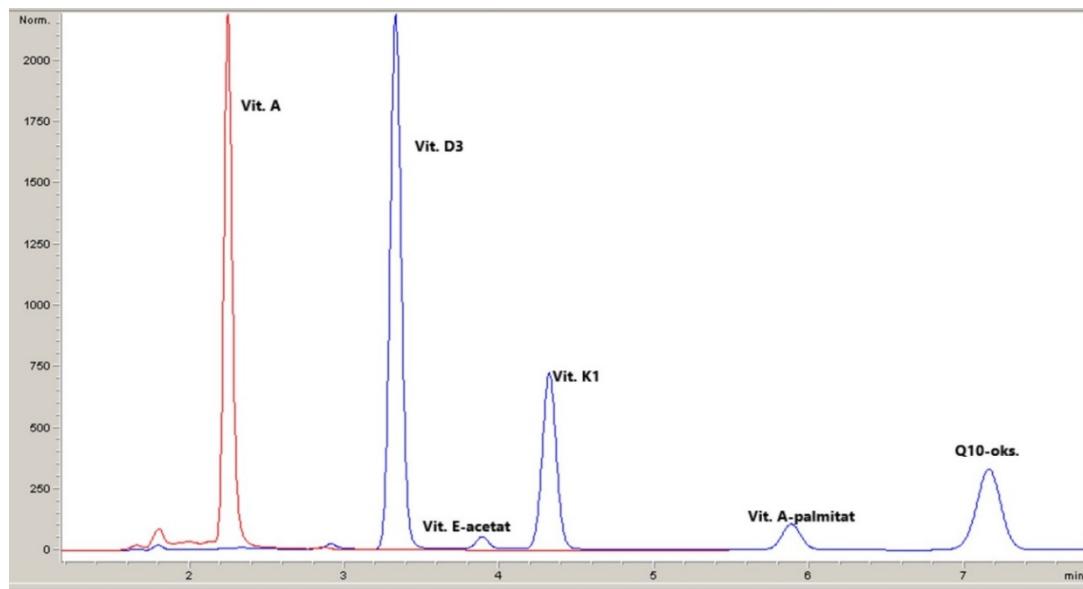
Topilo za raztplavljanje	% redukcije (paralela A)	% redukcije (paralela B)	% redukcije (paralela C)
ACN	98	97	97
EtOH	99	99	99
MeOH	96	96	/

Uspešnost redukcije je bila v vseh primerih blizu 100 %, zato lahko potrdimo, da je bil uporabljen postopek pretvorbe v reducirano obliko CoQ10 ustrezen v vseh treh topilih in lahko to obliko CoQ10 uporabimo v nadaljnjih študijah fotostabilnosti.

4.1.2. Preverjanje analizne metode

Predhodno validirana metoda za analizo lipofilnih vitaminov in CoQ10 je vključevala vrednotenje CoQ10 in vitaminov A, A-palmitat, D3, E, E-acetat ter K1, ne pa tudi vrednotenja vitaminov D2 in K2 (50). Zato smo za vse analite izvedli delno vrednotenje analizne metode. Z delno validacijo analizne metode smo preverjali ustreznost in zmožnost sočasnega kvantitativnega in kvalitativnega ločevanja ter vrednotenja lipofilnih vitaminov in CoQ10 že predhodno razvite in ovrednotene analizne metode (50). Slika 15 prikazuje lipofilne vitamine in CoQ10, ki smo jih lahko ločili z izbrano analizno metodo. Sočasna ločba vitaminov D2 in D3 ter vitaminov E in E-acetat z izbrano analizno metodo ni možna. Zaradi podobnih retencijskih časov vitaminov D2 in D3 ter vitaminov E in E-acetat prihaja do prekrivanja kromatografskih vrhov. Tako na Sliki 15 lahko zasledimo le enega od analogov vitaminov D v obliki D3 in E v obliki E-acetat. Sočasna ločba vitamina K2 od preostalih lipofilnih vitaminov in CoQ10 je bila uspešna (Slika 13).

Rezultati preverjanja linearnosti in natančnosti so predstavljeni v Preglednici X. Koncentracijsko območje za preverjanje linearnosti je za vse testirane analite med 20 in 200 mg/l. Izbrano območje je tudi delovno območje v kasnejši študiji fotostabilnosti, pri čemer je bila koncentracija 100 mg/l začetna delovna koncentracija.



Slika 15: Kromatogram lipofilnih vitaminov in CoQ10, ki so bili že ovrednoteni s predhodno razvito metodo pri koncentraciji 100 mg/l

Iz Preglednice X lahko razberemo, da je metoda linearna za vse analite v testiranem koncentracijskem območju (R^2 je bil za vsako umeritveno premico $< 0,999$).

Preglednica X: Rezultati preverjanja linearnosti (R^2) znotraj koncentracijskega območja med 20 in 200 mg/l in natančnosti (RSD) pri koncentraciji 100 mg/l

Vitamin	Enačba	R^2	RSD [%]
vit. A	$y = 4,741x + 26,84$	0,9995	0,52
vit. A-palmitat	$y = 5,891x - 0,6443$	1,0000	0,14
vit. D2	$y = 49,31x - 54,95$	0,9999	0,65
vit. D3	$y = 51,27x + 102,6$	0,9999	0,33
vit. E	$y = 0,5796x + 0,4454$	0,9996	0,36
vit. E-acetat	$y = 2,261x + 0,7492$	1,0000	1,01
vit. K1	$y = 27,45x + 32,43$	1,0000	0,28
vit. K2	$y = 37,69x + 24,78$	1,0000	0,18
Q10-oks.	$y = 19,60x + 19,17$	1,0000	0,49
Q10-red.	$y = 3,564x + 3,110$	0,9998	1,91

Natančnost smo preverjali na nivoju znotraj-dnevne ponovljivosti. Iz Preglednice X je razvidno, da lahko z uporabljeno analizno metodo dobimo ponovljive rezultate, saj RSD vrednosti ne presegajo meje sprejemljivosti ($RSD < 5\%$). Preverili smo tudi ponovljivost injiciranja na primeru vitamina D2. Rezultat je bil $RSD = 0,16\%$, kar ne presega meje sprejemljivosti ($RSD < 2\%$).

Delovno koncentracijsko območje metode smo dodatno razširili s spremembo v volumnu injiciranja (od 2 – 20 μl). Tako smo lahko injicirali raztopine s koncentracijami izven delovnega območja v študiji (npr. 500 in 1000 mg/l). Potrdili smo namreč, da so odzivi analitov pri višji koncentraciji in zmanjšanim volumnom injiciranja podobni tistim z nižjo koncentracijo in večjim volumnom injiciranja.

Rezultati delnega ovrednotenja metode so pokazali, da je metoda linearna v testiranem koncentracijskem območju ter ustrezeno natančna. S spremembo volumna injiciranja smo dosegli razširitev delovnega območja, pri čemer smo s spremembo volumna injiciranja dobili premosorazmerne vrednosti odzivov. Metoda je ustrezena in primerna za preučevanje fotostabilnosti lipofilnih vitaminov in CoQ10.

4.1.3. Priprava na študijo fotostabilnosti

Izbira ustreznega topila

Fotostabilnost lipofilnih vitaminov in CoQ10 smo nameravali preučevati v raztopinah. Izbira ustreznega topila za pripravo raztopin pri preučevanju fotorazgradnje je ključnega pomena, saj topilo lahko vpliva na fotorazgradnjo lipofilnih vitaminov in CoQ10. Želeli smo uporabiti vodne raztopine, vendar so preiskovani analiti izredno lipofilne spojine, njihova topnost pa je v vodi zelo nizka in neenotna (različna topnost posameznih analitov). Dodatno smo želeli opazovati fotostabilnost izbranih analitov pri isti masni koncentraciji, da bi lahko primerjali fotostabilnost posameznega vitamina z drugimi vitaminimi. Pred začetkom študije smo izvedli test, s katerim smo ugotovljali topnost, kjer smo prilagajali polarnost raztopin z različnimi deleži ACN/MQ. Želeli smo doseči masno koncentracijo 100 mg/l za vsak analit v raztopini. Ta koncentracija namreč izkazuje ustrezen odziv za vsak posamezen analit in možnost spremeljanja kinetike upada koncentracije. Kinetika fotolize lipofilnih vitaminov in CoQ10 je tako bolj omejena s koncentracijo kot pa z intenzitetom svetlobe. Ker s kombinacijami vode in acetonitrila nismo uspeli pripraviti vseh analitov pri želeni koncentraciji, smo se v nadaljevanju osredotočili na pripravo raztopin s 100% topili. Kot primerna topila smo izbrali ACN, EtOH in MeOH. Ta topila so tudi

splošno sprejemljiva. Lipofilni vitamini in CoQ10 se sicer boljše topijo v THF in *n*-heksanu, vendar obe topili nista najbolj primerna izbira. Tako *n*-heksan kot THF sta zdravju škodljiva (THF je tudi kancerogen), hkrati pa škodujeta okolju. Dodatno je *n*-heksan je nekompatibilen z reverzno-fazno kromatografijo, saj uničuje kromatografsko kolono in zmanjšuje njeno sposobnost ločevanja. Zato bi morali vzorce v teh topilih pred injiciranjem dodatno sušiti in raztopiti v bolj primernem topilu, kar pa predstavlja dodaten korak pri pripravi vzorca, ki podaljša pripravo vzorca in hkrati vpliva tudi na točnost rezultatov. β -karoten ni dovolj topen v izbranih topilih, topi se samo v *n*-heksanu in THF, zato smo ga izključili iz študije proučevanja fotostabilnosti posameznih vitaminov in CoQ10.

Za kasnejšo študijo fotostabilnosti smo zato izbrali topila ACN, EtOH in MeOH. Vsi analiti so se v izbranih topilih pri isti masni koncentraciji (100 mg/l) raztopili.

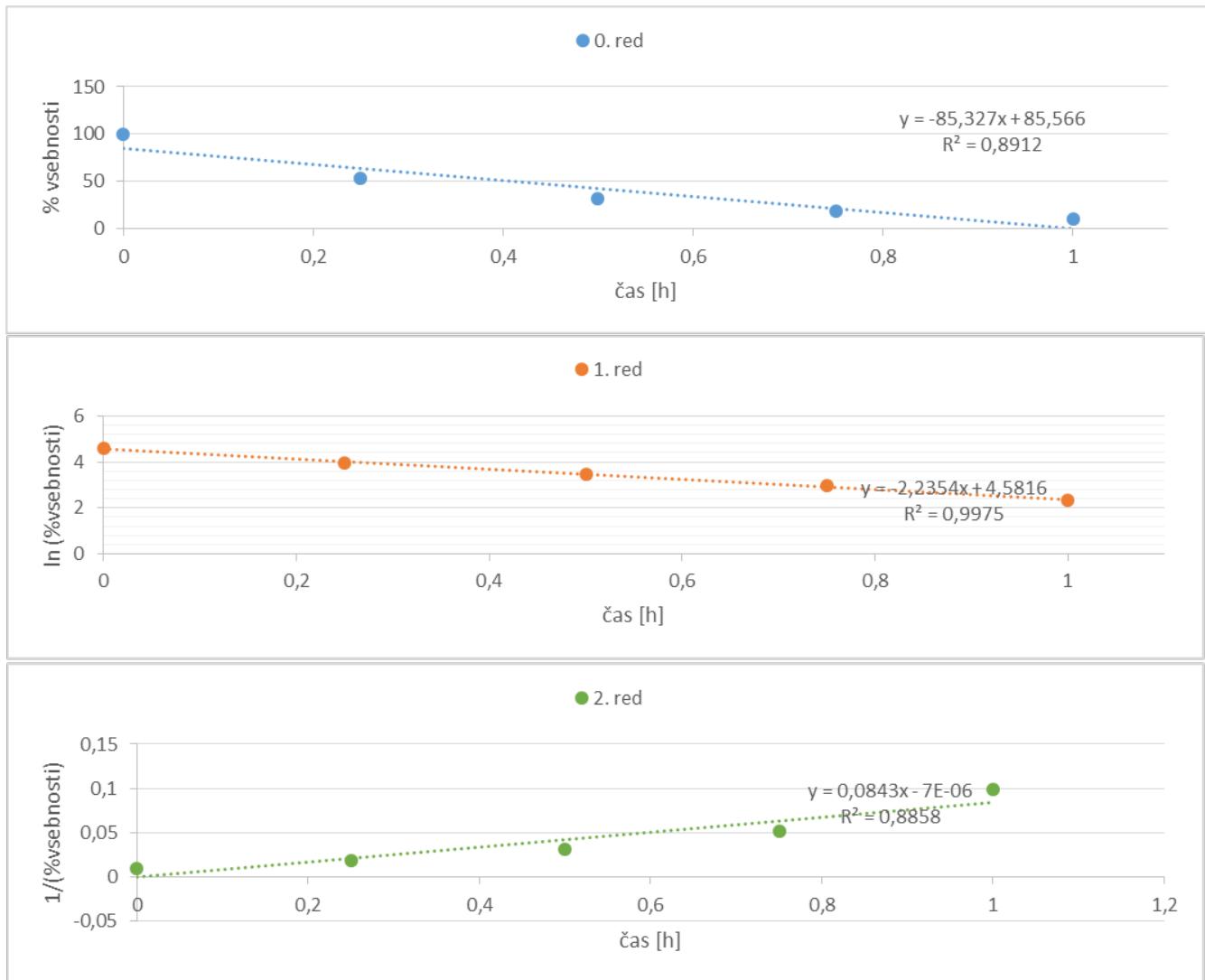
Mesto postavitve vzorca v komori

Pri prvih poskusih vrednotenja fotostabilnosti lipofilnih vitaminov in CoQ10 smo imeli težave s ponovljivostjo rezultatov. V isti časovni točki smo vsako analizo izvedli v treh paralelah (tri vzorce smo izpostavili svetlobi) in zaznali velika nihanja v hitrosti fotorazgradnje ($RSD > 15\%$). Ugotovili smo, da je težava s ponovljivostjo med paralelami povezana z mestom postavitve vzorca v komori. Vzorce smo v začetku postavljeni na poljubno mesto v komori (po navadi na obrobni del komore). Kasneje smo vzorce vedno postavili na sredino komore in ob ustrezeni postavitvi vzorcev v komori se je ponovljivost bistveno izboljšala ter je kasneje znašala manj od 2%. Iz opazovanj sklepamo, da je intenziteta svetlobe različna na različnih mestih v komori. Torej lahko zaključimo, da je mesto postavitve vzorca v komori izredno pomembno.

Ugotavljanje reda reakcije

Za napovedovanje sprememb pod vplivom svetlobe je ključno, da ugotovimo red reakcije in kinetiko fotoliznih procesov za posamezen analit z namenom, da kvantitativno ovrednotimo stabilnost. Eden od uveljavljenih in pogosto uporabljenih pristopov ugotavljanja reda reakcije je statistična oz. grafična metoda na osnovi eksperimentalnih rezultatov, in sicer s pomočjo R^2 (izberemo red z najvišjim determinacijskim koeficientom) (69).

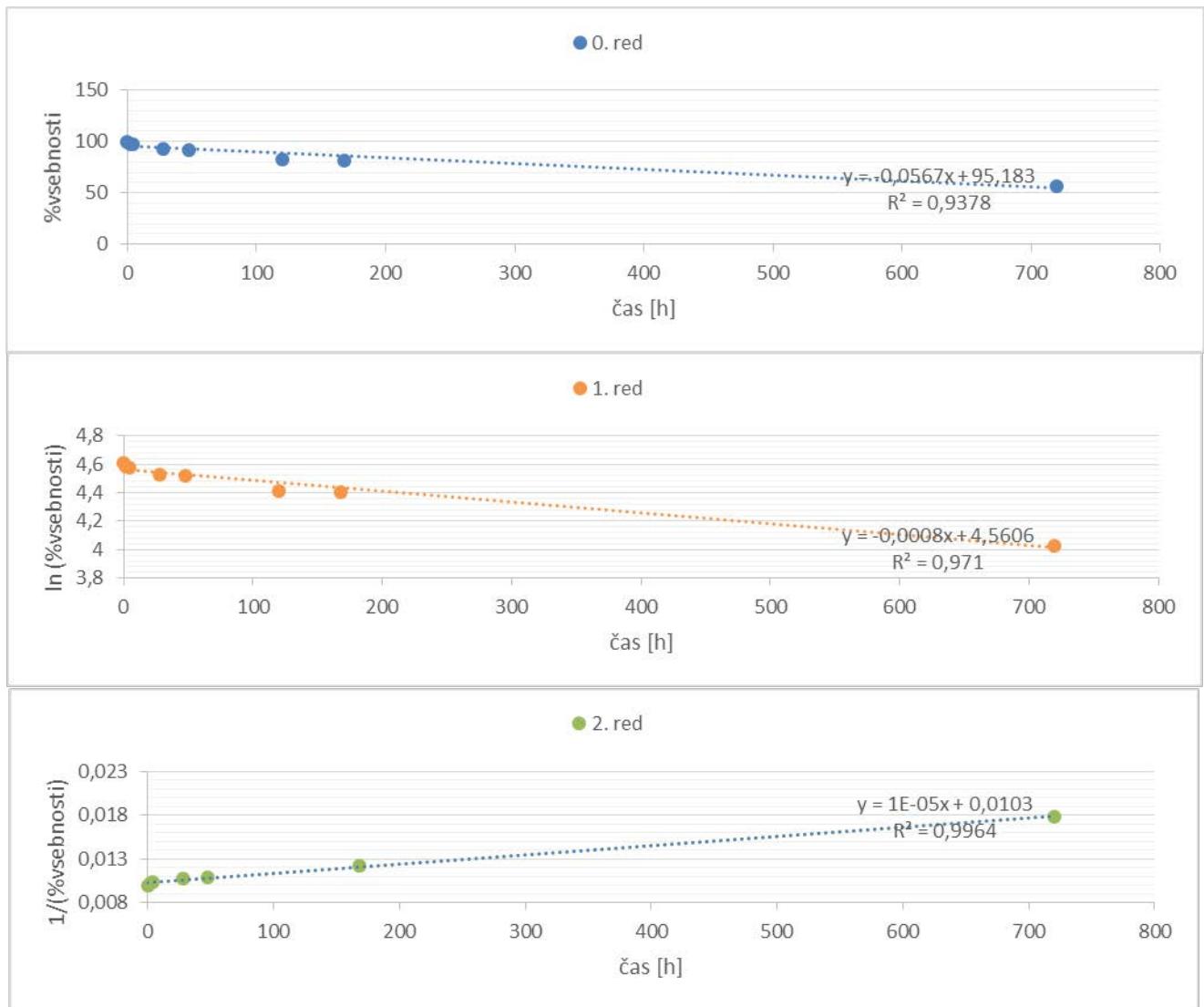
Slika 16 in slika 17 prikazujeta dva reprezentativna primera uporabljeni grafične metode. Vsaka slika je sestavljena iz treh grafov, na vsakem je predstavljen red reakcije (0., 1. in 2. red). Iz Slike 16 lahko opazimo, da upad koncentracije vitamin K2 v raztopini najbolje opisuje kinetika 1. reda. Kinetiko fotorazgradnje vitamina D3 pa najbolje opisuje 2. red (Slika 17). Za vse vitamine v vseh treh topilih pa so rezultati uporabe grafične metode zbrani v preglednici (Priloga I).



Slika 16: Ugotavljanje kinetike fotorazgradne vitamina K2 v EtOH; reakcija sledi 1. redu

S 1. redom reakcije najbolje opišemo upad koncentracije vitaminov A-palmitat, D2, K1, K2 in oksidirane oblike CoQ10, z 2. redom pa upad koncentracije vitaminov A, D3, E in reducirane oblike CoQ10. Vitamin E-acetat v EtOH prav tako sledi 2. redu, v ACN in MeOH zaradi počasnega upada koncentracije nismo mogli določili reda reakcije oz. konstante reakcijske hitrosti. V literaturi je na razpolago malo podatkov o kinetiki fotorazgradnje

lipofilnih vitaminov in CoQ10, razpoložljivi podatki za CoQ10 (48) pa se skladajo z našimi rezultati. Pri vitaminu A-palmitat v ACN in vitaminu D2 v EtOH smo opazili spremembo reda reakcije. Upad koncentracije vitamina A-palmitat v ACN in vitamina D2 v EtOH sicer bolje opiše 2. red, vendar bomo zaradi možnosti neposredne primerjave v vseh topilih vitaminu obravnavali po 1. redu reakcije.



Slika 17: Ugotavljanje kinetike fotorazgradne vitamina D3 v EtOH; reakcija sledi 2. redu

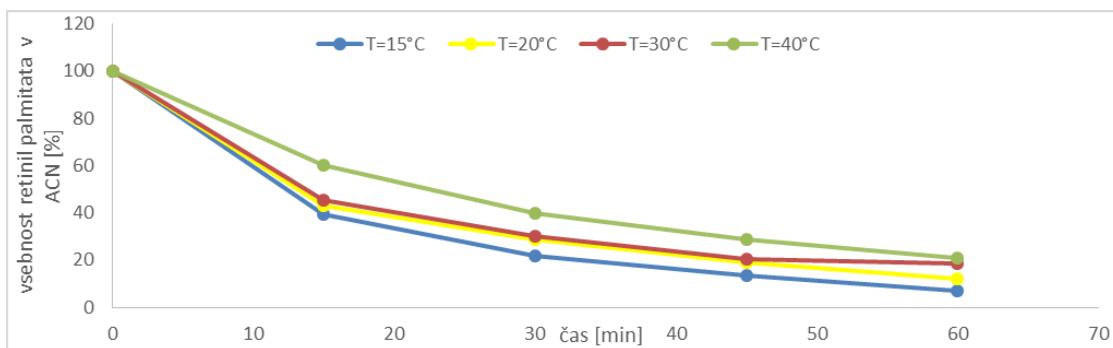
V nadaljevanju smo vitamine obravnavali po redu, ki jih najbolje opisuje. Prav tako smo tudi pri ostalih vitaminih, v kolikor je prišlo do spremembe reda reakcije, prikazali red, določen za posamezen vitamin (1. red: vitamini A-palmitat, D2, K1, K2 in oksidiran CoQ10; 2. red: vitamini A, D3, E in reducirani CoQ10).

4.2. VPLIV DEJAVNIKOV NA FOTOSTABILNOSTI VITAMINOV

Znano je, da so lipofilni vitamini nestabilni, hitreje se pretvarjajo na svetlobi. Glavni vzrok pospešene fotorazgradnje je njihova struktura z dvojnimi konjugiranimi vezmi (70). Proučevanja fotostabilnosti smo se lotili sistematično: najprej smo raziskali nestabilnost posameznega vitamina na svetlobi in nato še preverjali dodatne vplive, ki lahko spremenijo kinetiko fotoreakcije vitamina. Pri vseh vitaminih smo preučevali vpliv topila na njihovo fotostabilnost. Pri vitaminih A-palmitat, K1 in CoQ10 smo dodatno opazovali vpliv temperature in koncentracije na hitrost fotorazgradnje. Zanje smo v preliminarni študiji ugotovili, da se razgrajujejo hitreje (v 1 dnevu je 100% razgradnja), zato smo lahko izvedli več testov v krajšem času. Zaradi podobnih strukturnih lastnosti lahko sklepamo na podobno obnašanje tudi pri ostalih lipofilnih vitaminih. Vzorce za preučevanje vplivov različnih dejavnikov na fotostabilnost lipofilnih vitaminov in CoQ10 smo pripravili po postopku, opisanem v točki 3.3.3. Vsako meritev smo izvedli v treh paralelah, rezultate pa predstavili kot njihovo povprečje.

4.2.1. Vpliv temperature

Temperatura lahko vpliva na spremembo hitrosti fotoreakcij. V literaturi smo našli različne informacije o vplivu temperature na fotokemijske procese. Sprememba temperature za 10 °C lahko podvoji hitrost fotoreakcij, na drugi strani pa je mnogo fotokemijskih procesov neodvisnih od temperature (34, 38). Prav zaradi nasprotujočih si literurnih podatkov smo želeli preveriti vpliv tega dejavnika na preiskovanih vitaminih. V skladu s postopkom 3.3.5. smo opazovali časovni upad koncentracije izbranih lipofilnih vitaminov in CoQ10 (vitamin A-palmitat, K1 in oksidiran CoQ10) v raztopini pod UV svetlogo in pri različnih temperaturah (15, 20, 30 in 40 °C). Na reprezentativnem primeru pri vitaminu A-palmitat (Slika 18) lahko opazimo, da temperatura vpliva na obseg fotorazgradnje. V Preglednici XI so zbrane konstante hitrosti fotorazgradnje v različnih topilih pri izbranih temperaturah za vse tri testirane analite.



Slika 18: Vpliv temperature na upad koncentracije vitamina A-palmitata v ACN pod vplivom UV svetlobe

Preglednica XII: Konstante hitrosti 1. reda za vitamine v različnih topilih pri različnih temperaturah

Topilo	Temperatura [°C]	k vit. A-palmitat [h ⁻¹]	k vit. K1 [h ⁻¹]	k oks.Q10 [h ⁻¹]
ACN	15 °C	1,470	3,317	0,2134
	20 °C	1,138	3,216	0,2261
	30 °C	1,246	2,544	0,2422
	40 °C	1,021	2,907	0,1759
EtOH	15 °C	2,580	1,596	0,1836
	20 °C	2,003	1,614	0,2088
	30 °C	1,841	1,453	0,2226
	40 °C	1,622	1,618	0,1694
MeOH	15 °C	2,724	1,697	0,2209
	20 °C	2,595	2,204	0,2069
	30 °C	2,436	1,473	0,2345
	40 °C	2,175	2,022	0,1890

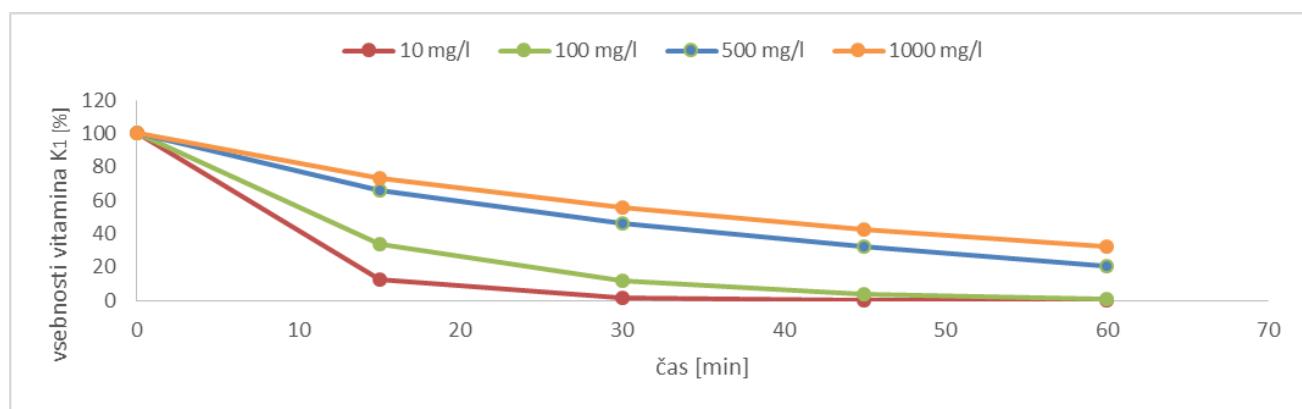
Pričakovali smo, da se bo fotostabilnost preučevanih analitov zmanjševala z naraščanjem temperature, vendar so rezultati v nasprotju s pričakovanji. Iz Preglednice XI lahko opazimo, da temperatura vpliva na hitrost fotolize vitaminov, in sicer vpliva na vsak analiziran analit drugače. Pri A-palmitatu in pri oksidiranem CoQ10 opazimo upadanje hitrosti reakcije z naraščanjem temperature, pri vitaminu K1 hitrost reakcije niha oz. se hitrost reakcije značilno ne spreminja s temperaturo. Za klasične reakcije kemične nestabilnosti so ugotovili, da se stabilnost lipofilnih vitaminov in CoQ10 z naraščanjem temperature zmanjšuje. Prav tako pa so ugotovili, da zanje velja Arrheniusova enačba (32),

ki pomeni odnos med temperaturo in hitrostjo kemične reakcije. Če je veljavna, nam ta skrajšuje čas ugotavljanja stabilnosti in jo lahko uporabimo za napovedovanje stabilnosti vitaminov (31). Za dobljene rezultate pa Arrheniusova enačba ne velja. Vendar smo v literaturi zasledili trend, ki se ujema z našimi rezultati. Znano je, da v fotooksidacijske procese v reakciji vstopa kisik, pri čemer je topnost kisika obratno sorazmerna s površino temperaturo, kar pomeni, da se z višanjem temperature koncentracija kisika, ki je na voljo za sodelovanje v fotoreakcijah, zmanjšuje (34). Ugotovili so tudi, da ima singletni kisik pri nižji temperaturi daljšo življenjsko dobo, kar lahko dodatno vpliva na večji obseg fotorazgradnje analitov (71).

Zaključimo lahko, da temperatura vpliva na fotostabilnost preučevanih vitaminov, pri višji temperaturi je njihova stabilnost na svetlobi nekoliko večja.

4.2.2. Vpliv koncentracije

Fotooksidacija je koncentracijsko odvisna, saj se s povečevanjem koncentracije zmanjšuje nestabilnost vitaminov na svetlobi (34). Možna je tudi sprememba kinetike reda. Preverili smo, ali to dejstvo drži tudi za preučevane vitamine. Na Sliki 19 smo ponazorili vpliv različnih koncentracij vitamina K1 na hitrost fotorazgradnje. Rezultate za druge izbrane analite v različnih topilih pa smo zbrali v Preglednici XII. Študijo vpliva koncentracije smo izvedli le v ACN in EtOH, saj je zaradi slabše topnosti izbranih analitov pri višjih koncentracijah prišlo v MeOH do izboritve.



Slika 19: Vpliv začetne koncentracije na upad koncentracije vitamina K1 v ACN pod vplivom UV svetlobe pri 25 °C

Preglednica XII: Konstante hitrosti 1. reda pri različnih koncentracijah vitaminov v različnih topilih

Topilo*	konzentracija [mg/l]	k vit. A-palmitat [h^{-1}]	k vit. K1 [h^{-1}]	k Q10-oks. [h^{-1}]
ACN	10	1,885	8,234	0,3571
	100	1,396	4,499	0,2206
	500	0,5383	1,914	0,1200
	1000	0,3888	1,236	/
EtOH	10	5,673	6,415	0,2915
	100	2,064	2,439	0,2433
	500	0,8754	0,9874	0,1162
	1000	0,7564	0,6529	/

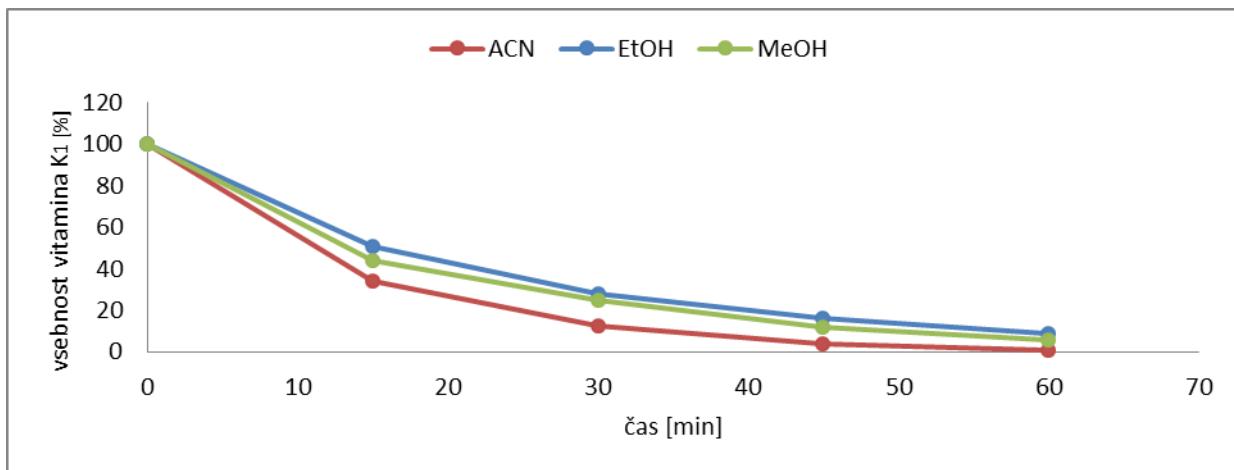
/- med testom fotostabilnosti je prišlo do izoboritve CoQ10, analiza ni bila možna;

Pri vseh vitaminih opazimo povezavo med koncentracijo in hitrostjo reakcije, večja kot je koncentracija, manjša je konstanta reakcijske hitrosti in počasnejša je fotorazgradnja.

Razlika je najbolj vidna pri vitaminu K1, kjer je razmerje v EtOH med najvišjo in najnižjo konstanto 10, v ACN pa približno 7. Razmerje med najvišjo in najnižjo konstanto za vitamin A-palmitat v ACN je 5, v EtOH pa 7,5; za oksidirano obliko CoQ10 v ACN 3 in v EtOH 2,5. Dobljeni rezultati se ujemajo z literurnimi podatki in našimi pričakovanji. Za vse analizirane vitamine lahko potrdimo, da se z zmanjševanjem koncentracije zmanjšuje tudi njihova fotostabilnost. Pospešena fotorazgradnja analitov pri nižji koncentraciji je posledica relativno večjega števila fotonov (na eno molekulo analita), s katerimi vzbujamo molekulo do reaktivnega vzbujenega stanja, ki vodi v nestabilnost (72).

4.2.3. Vpliv topila

Topilo je eden izmed pomembnih dejavnikov, ki lahko vplivajo na stabilnost (tudi na fotostabilnost) spojin v raztopinah (30), zato smo preverili, kako so vitamini obstojni na svetlobi v različnih topilih. Njihovo razgradnjo smo opazovali v acetonitrilu, etanolu in metanolu. Na Sliki 20 smo ponazorili časovni upad koncentracije vitamina K1 v izbranih topilih pod vplivom UV svetlobe, rezultate za vse preučevane vitamine pa predstavili v Preglednici XIII.



Slika 20: Upad koncentracije vitamina K1 v različnih topilih pod vplivom UV svetlobe pri 25 °C

Preglednica XIII: Konstante hitrosti 1. reda (vit. A-palmitat, D2, K1, K2, Q10-oks.) in 2. reda (vit. A, D3, E, E-acetat in Q10-red.) v različnih topilih

Analiti Topila	k	ACN	EtOH	MeOH
vit. A	[h*l/mg]	0,0028	5,088E-05	2,508E-06
vit. A-palmitat	[h ⁻¹]	1,396	2,064	3,239
vit. D2	[h ⁻¹]	0,0137	0,0011	0,0016
vit. D3	[h*l/mg]	2,065E-05	1,159E-05	6,378E-06
vit. E	[h*l/mg]	1,711E-05	0,0002	3,922E-05
vit. E-acetat	[h*l/mg]	/	1,327E-06	/
vit. K1	[h ⁻¹]	4,499	2,439	2,816
vit. K2	[h ⁻¹]	4,174	2,235	2,210
Q10-oks	[h ⁻¹]	0,2206	0,2433	0,2289
Q10-red	[h*l/mg]	0,0003	0,0014	0,0002

/- nismo mogli določiti hitrosti reakcije, ker je bil v času opazovanja upad koncentracije minimalen

Iz Preglednice XIII lahko razberemo, da topila različno vplivajo na fotorazgradnjo vitaminov. Iz eksperimentalnih rezultatov ne moremo reči, da eno izmed topil bolj poveča fotolizo vseh vitaminov. Načeloma pa v teoriji velja, da naraščanje nepolarnosti topila omogoča daljši obstoj tripletnega kisika (${}^3\text{O}_2$) in podaljša čas njegovega delovanja, kar pa hkrati poveča obseg razgradnje učinkovine (34). Acetonitril je izmed vseh izbranih najbolj

nepolarno topilo. Rezultati za vitamine A, D2, D3, K1 in K2 se torej ujemajo z domnevami iz literature, saj so najmanj stabilni prav v acetonitrilu. Vitamin A-palmitat je najmanj obstojen v metanolu. Vitamini E in obe obliki Q10 se najhitreje razgrajujejo v etanolu, največja stabilnost na svetlobi pa je v acetonitrilu. Ti analiti delujejo kot antioksidanti. Predhodno so ugotovili, da je antioksidativna aktivnost odvisna od izbire topila. V eni od študij so opazovali antioksidativno aktivnost vitamina E in ugotovili, da je bila največja v acetonitrilu, najmanjša pa v *terc*-butanolu (73). Če te izsledke prenesemo in povežemo z našimi rezultati, bi pričakovali, da bo največja stabilnost na svetlobi v metanolu ali etanolu. V acetonitrilu je povečana antioksidativna aktivnost, kar bi lahko sklepali, da se bo hitreje porabljal, saj bo v raztopini lovil radikale in se pri tem porabljal. Acetonitril je izmed izbranih topil najbolj nepolarno, zato ima $^3\text{O}_2$ najdaljšo življensko dobo. Po drugi strani pa predvidevamo, da je antioksidativno delovanje lahko tudi razlog za večjo stabilizacijo v acetonitrilu. Molekule analita v raztopini namreč postopoma prehajajo do reaktivnega vzbujenega stanja, posledično zaradi povečane antioksidativne aktivnosti prihaja do regeneracije antioksidanta. Večina vitaminov je najbolj stabilnih v metanolu; ti vitamini so vitamin A, D3, E, K2 in reducirana oblika CoQ10. V etanolu sta najbolj stabilna vitamina D2 in K1, v acetonitrilu pa vitamini A-palmitat, E in oksidiran CoQ10. Razlika v fotostabilnosti analitov v različnih topilih je najbolj vidna pri vitaminu A, kjer je razmerje med najvišjo in najnižjo konstanto 55. Pri vitaminu D2 in E je razlika 12, pri reducirani obliki Q10 7, pri ostalih vitaminih pa je razlika med 1 in 2. Za vitamin E-acetata v acetonitrilu in metanolu nismo določili reakcijske hitrosti, ker je bil v času opazovanja upad koncentracije minimalen.

Pri preučevanju fotostabilnosti vitaminov K1 in K2 je med študijo prihajalo do organoleptičnih sprememb. Za značilno rumeno barvo v trdnem stanju in v raztopinah ob času 0 je odgovoren kinonski obroč, ki je strukturni del vitaminov K1 in K2 (74). Torej pripravljeni vzorci vitaminov K1 in K2 v acetonitrilu so bili ob času 0 bledo zeleno-rumeni, ki pa se je že po 15 minutni izpostavitvi UV svetlobi spremenila, raztopina je postala brezbarvna. Pripravljeni vzorci v etanolu in metanolu v vseh koncentracijah so bili ob času 0 bledo rumeni. Obarvanost vzorcev v etanolu in metanolu se je s časom spremenjala, pri različnih koncentracijah je bil čas spremembe barve različen. Spremembe organoleptičnih lastnosti so v nadaljevanju opisane na primeru raztopin s koncentracijo 100 mg/l. Po 15-minutni izpostavitvi UV svetlobi je pri vzorcih v etanolu in metanolu prišlo do spremembe barve v bakreno oranžno. Pri tem je koncentracija K1 in K2 v

etanolni in metanolni raztopini upadla na 40-50 % začetne koncentracije. V kromatogramu smo opazili dodatne vrhove. Bakrena barva je po 60 minutah prešla nazaj v rumeno. Do spremembe bakrene barve v rumeno je prišlo tudi med analizo v vialah, ko je ta nekaj časa stala v temi v avtomatskem vzorčevalniku. Bakreno oranžna barva je bila intenzivnejša pri vitaminu K2. Sklepamo, da so za spremembo barve odgovorni vmesni intermediati fotoreakcij. Namreč znano je, da pri fotolizi vitamina K v raztopini z etanolom nastane obarvan produkt kromenol (43). Ob nadalnjem izpostavljanju UV svetlobi se raztopina vitamina K1 oz. K2 razbarvala. Pri ostalih vitaminih ni prišlo do organoleptičnih sprememb.

Ker je, kot lahko razberemo iz rezultatov, topilo različno vplivalo na kinetiko razgradnje vitaminov, smo vse nadaljnje poskuse izvajali v vseh treh topilih.

4.3. PRIMERJAVA FOTOSTABILNOSTI POSAMEZNIH VITAMINOV

V nadaljevanju smo želeli primerjati posamezne vitamine v različnih topilih glede na hitrost njihove fotorazgradnje. V grobem smo jih razdelili na manj fotostabilne (zgornji graf vsake slike) in bolj fotostabilne vitamine (spodnji graf vsake slike). Med manj stabilne vitamine smo uvrstili vitamine A-palmitat, K1, K2, oksidiran CoQ10 in reducirani CoQ10. Slednji se razgrajuje počasi, vendar smo ga umestili v skupino manj nestabilnih zaradi lažje primerjave z njegovim analogom. Med bolj stabilne vitamine smo uvrstili vitamine A, D2, D3, E in E-acetat. Upad koncentracije različnih vitaminov najbolje opišeta 1. red (vitamini A-palmitat, D2, K1, K2 in oksidiran CoQ10) in 2. red (A, D3, E in reducirani CoQ10).

4.3.1. Primerjava fotostabilnosti vitaminov v acetonitrilu

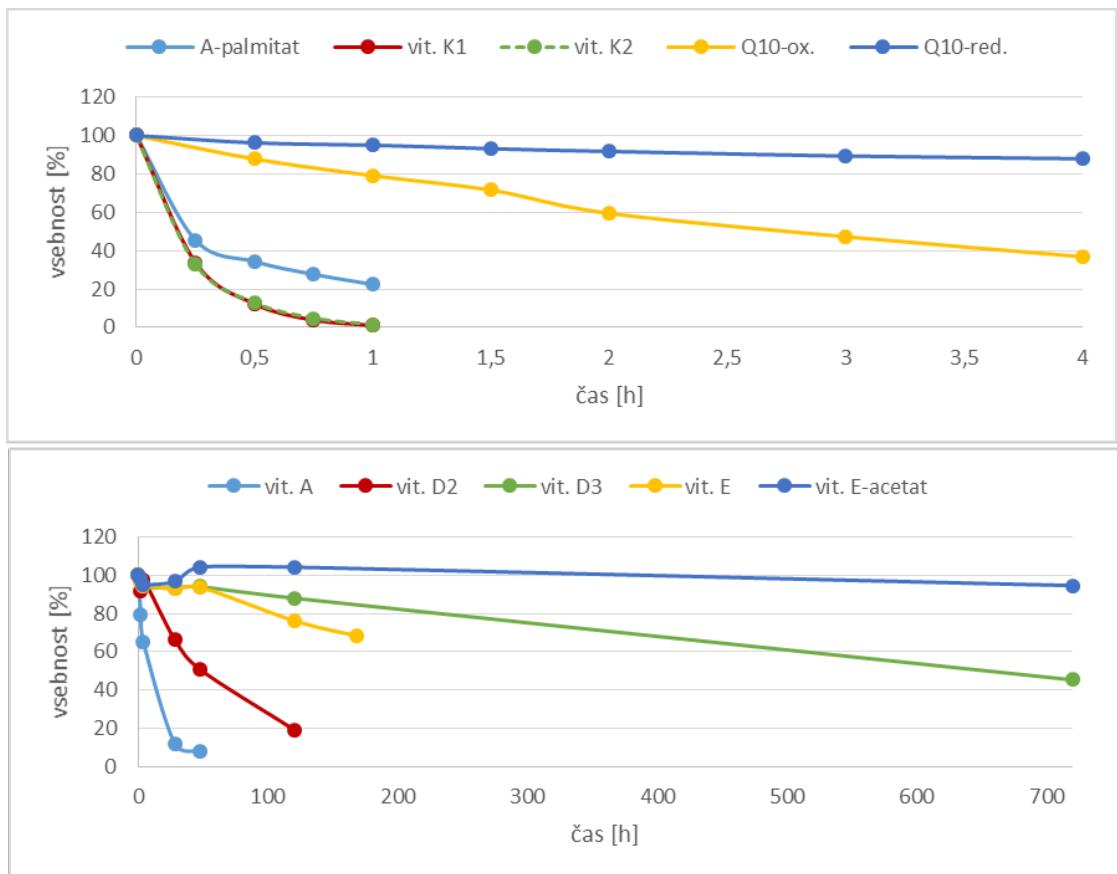
Na sliki 21 je predstavljen upad koncentracij posameznih vitaminov v acetonitrilu. Razberemo lahko, da je fotorazgradnja vitaminov K1 in K2 najhitrejša in med njima ni vidnih razlik v fotostabilnosti. Pri vitaminu A-palmitat na začetku vidimo hiter upad vsebnosti, ki mu po 15 minutah sledi počasnejše upadanje. Medtem ko se oksidirana oblika CoQ10 počasi razgrajuje že od samega začetka in v 4 urah pade pod 40%, reducirana oblika upada počasneje (po 4 urah še > 80%) in je bistveno bolj stabilna kot oksidirana oblika.

Vitamin A je sicer na sobni temperaturi v temi že sam po sebi nestabilen, vendar pod vplivom svetlobe upada počasneje kot njegov palmitatni ester. Dobljeni rezultati o

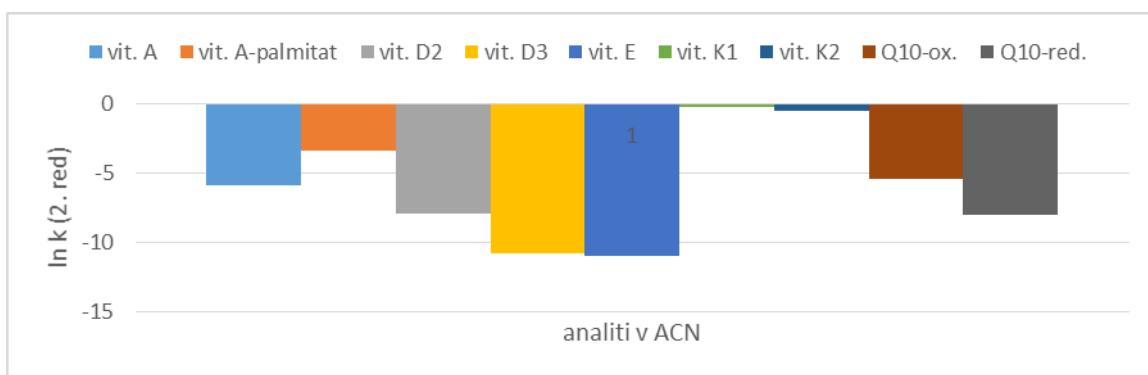
fotostabilnosti vitamina A in A-palmitata se skladajo z literurnimi podatki. Pri fotoreakciji vitamina A-palmitata najprej pride do fotoizomerizacije v *cis*-retinil palmitat, temu pa sledi takojšnja fotoliza. Ti procesi fotoizomerizacije so hitrejši pri vitamin A-palmitatu kot pri vitaminu A (75), zato je verjetno vitamin A bolj fotostabilen kot vitamin A-palmitat. Za oba derivata vitamina D smo pričakovali podobno stabilnost na svetlobi, a so rezultati pokazali drugače (Slika 21) Vitamin D₃ se je izkazal za bistveno bolj fotostabilnega od vitamina D₂. Pri vitaminu D₂ in E-acetatu opazimo tudi posebnost: po začetnem upadu je prišlo do porasta (pri vitaminu D₂ po 4 urah, pri E-acetatu pa po 2-5 dneh); temu je sledil postopen upad. Za vitamin E-acetat lahko zaključimo, da je v primerjavi z ostalimi analiti stabilen, saj je bila njegova vsebnost v acetonitrilu po 1 mesecu še vedno nad 90 %.

Med testom fotostabilnosti vitamina E-acetat smo se soočili z vprašanjem, ali je v času opazovanja sploh prišlo do upada koncentracije in nastanka razgradnjih produktov (npr. vitamin E), ki imajo podoben retencijski čas, mi pa smo to zaznavali kot stabilnost. Zaradi te dileme smo dodatno preverili vzorce z vitaminom E-acetat z drugo analizno metodo, ki je sposobna ločiti vitamina E in E-acetat. Na ta način smo z gotovostjo potrdili, da je vitamin E-acetat bolj stabilen od vitamina E, slednji pa je še manj stabilen od obeh vitaminov D (Slika 21).

Slika 22 predstavlja primerjavo konstant kinetike 2. reda za izbrane analite v acetonitrilu. Opazimo lahko, da je obseg fotolize največji pri vitaminu K₁ in K₂. Temu sledita A-palmitat in oksidiran CoQ10. Bolj fotostabilna od oksidirane oblike CoQ10 sta vitamin A, D₂ in reducirani CoQ10. Še večjo fotostabilnost opazimo pri vitaminih E in D₃. Najbolj fotostabilen je E-acetat. Zanj nismo uspeli določiti konstante fotolize, saj je bila le-ta v času opazovanja minimalna.



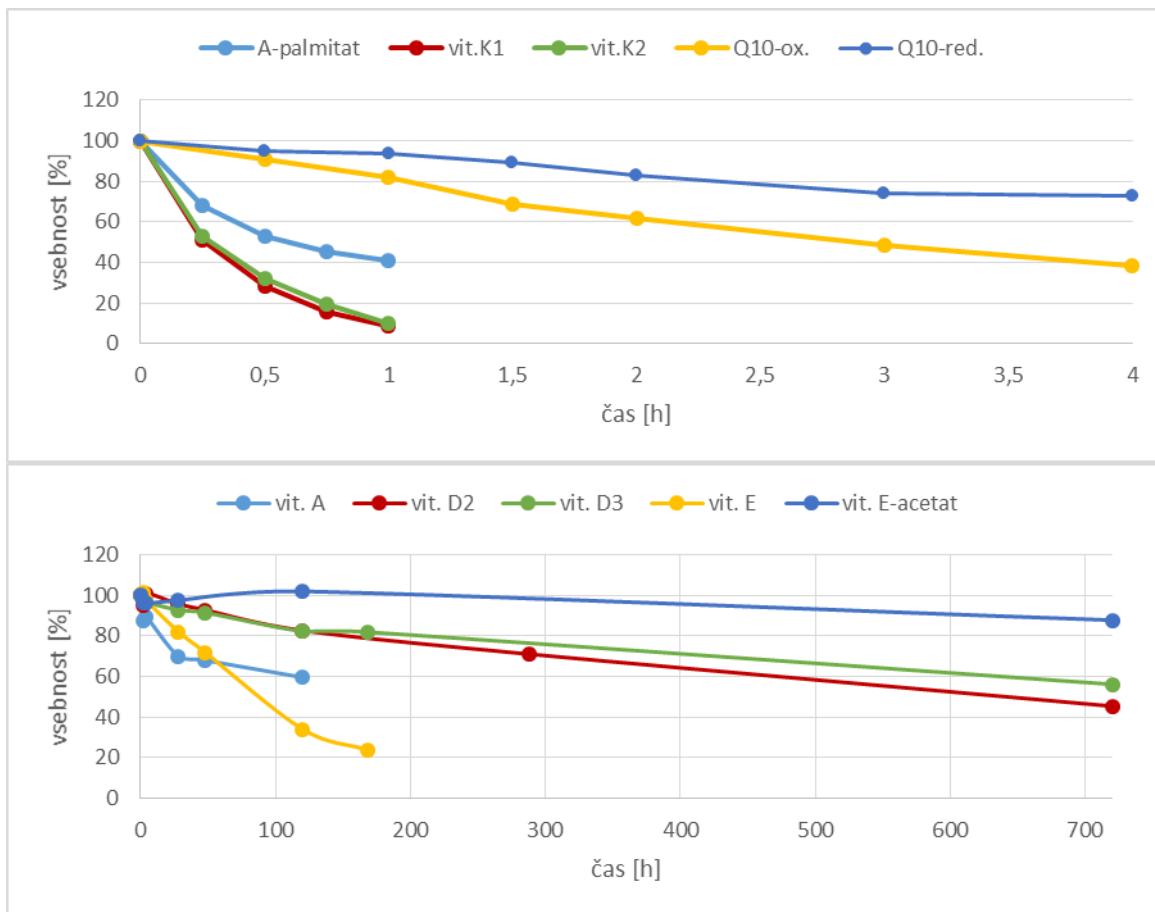
Slika 21: Upad vsebnosti posameznih vitaminov v acetonitrilu pod vplivom UV svetlobe pri 25 °C



Slika 22: Primerjava hitrosti fotorazgradnje ($\ln k$) izbranih analitov v ACN pri 25 °C

4.3.2. Primerjava fotostabilnosti vitaminov v etanolu

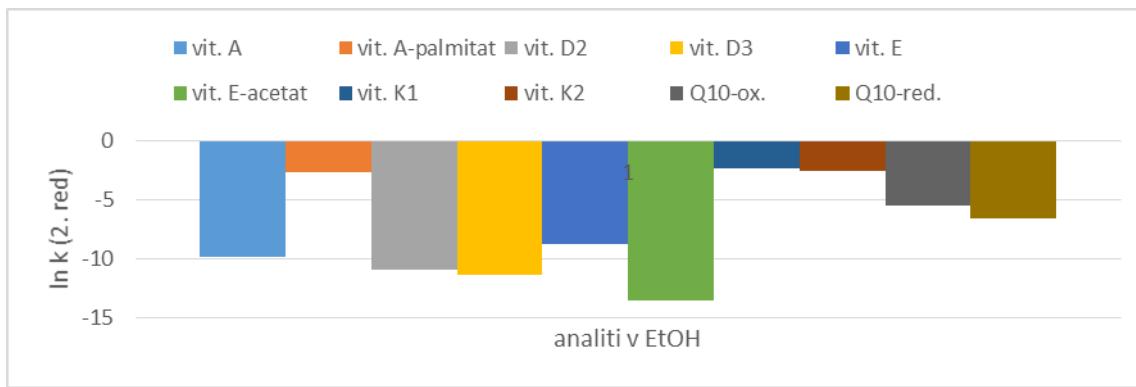
V etanolu prihaja do majhne razlike v hitrosti fotolize med vitaminoma K1 in K2: vitamin K2 je malo bolj stabilen od K1 (Slika 23).



Slika 23: Upad vsebnosti posameznih vitaminov v etanolu pod vplivom UV svetlobe pri 25 °C

Oksidirana oblika CoQ10 je še vedno v etanolu manj stabilna od reducirane, vendar bolj stabilna kot v acetonitrilu. Na drugi strani je stabilnost reducirane oblike slabša kot v acetonitrilu (razlikuje se za 6,2%). Razgradnja vitamina A-palmitata je bolj enakomerna: ni hitrega upada na začetku in počasnejšega upada v nadaljnje. Ta pojav (relativno hiter začetni upad in postopno zmanjševanje koncentracije) opazimo pri vitaminu A, ki se je v etanolu izkazal za bolj stabilnega od vitamina E. Tudi v etanolu se je vitamin D2 pokazal za manj stabilnega od vitamina D3. Prav tako je pri vitaminu D2 in E-acetatu v etanolu viden začeten porast koncentracije, ki v nadaljevanju upade. E-acetat v etanolu velja za stabilnega (njegova vsebnost po 30 dneh je okrog 90%).

Slika 24 predstavlja primerjavo konstant kinetike 2. reda za izbrane analite v etanolu. Opazimo lahko, da je hitrost fotolize največja pri vitaminih K1, K2 in A-palmitat. Bolj fotostabilni sta obe obliki CoQ10. Bolj fotostabilna od CoQ10 sta vitamina E in A. Za vitamin D2 in D3 opazimo, da sta v etanolu podobno stabilna pod vplivom svetlobe. Največjo fotostabilnost izkazuje E-acetat.

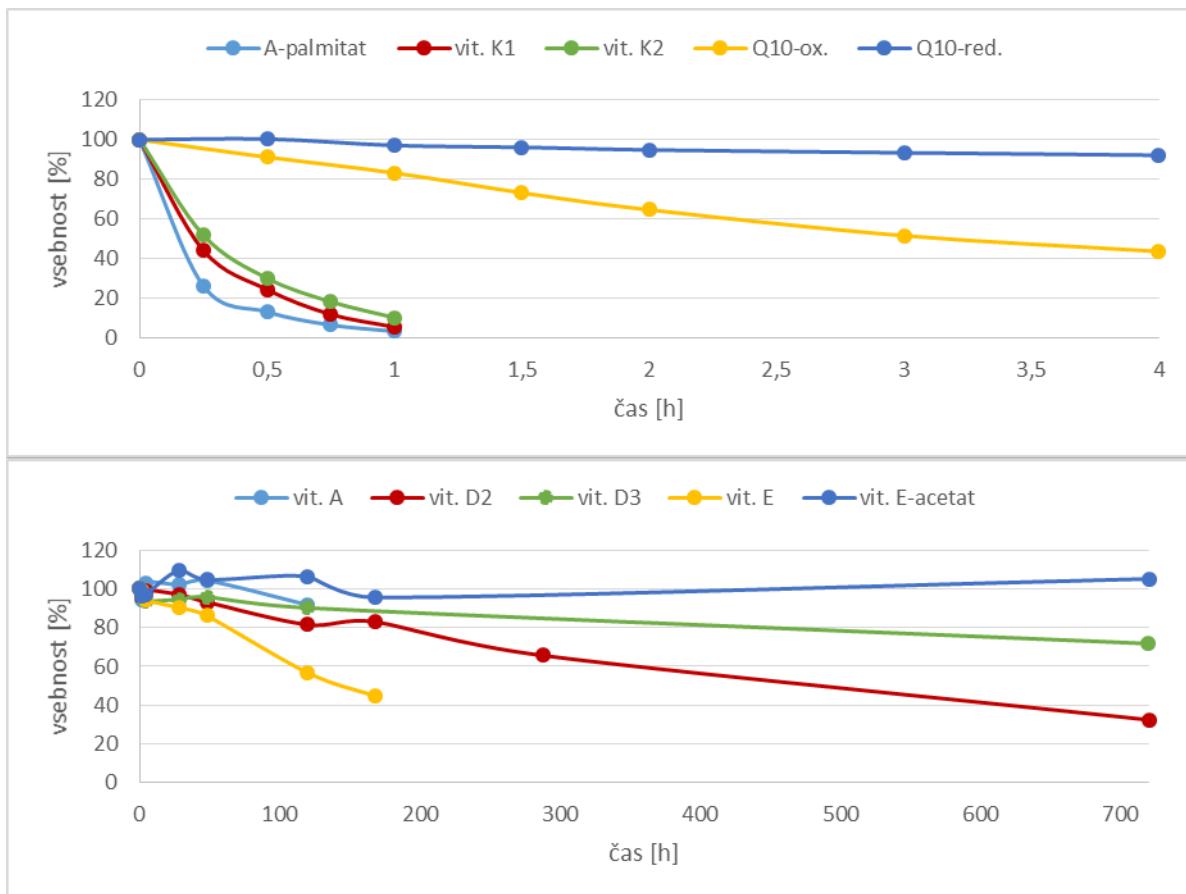


Slika 24: Primerjava hitrosti fotorazgradnje ($\ln k$) izbranih analitov v EtOH pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$

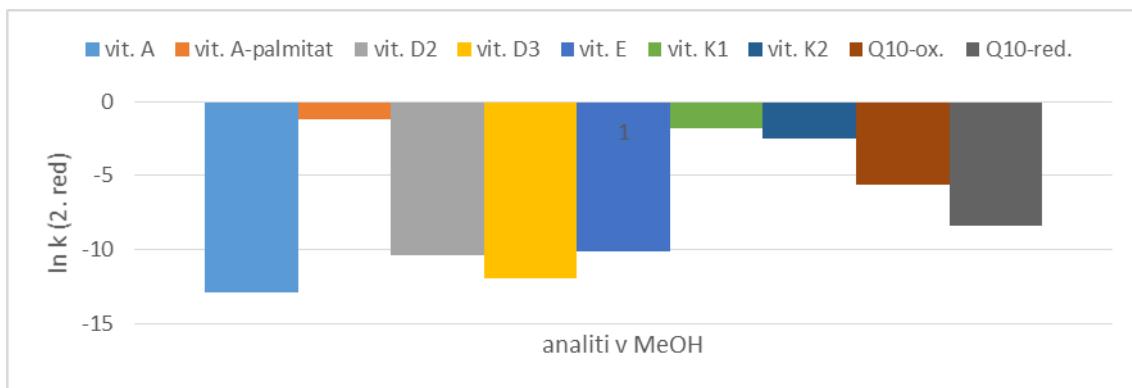
4.3.3. Primerjava fotostabilnosti vitaminov v metanolu

V metanolu opazimo, da do najhitrejše fotorazgradnje prihaja pri vitaminu A-palmitatu, za katerega je značilen hiter začetni upad koncentracije in nato v nadaljevanju počasnejše upadanje koncentracije (Slika 25). A-palmitatu sledita vitamina K1 in K2. Razlika hitrosti fotoreakcije se v metanolu še poveča: K2 je še bolj fotostabilen od K1. V tem topilu je oksidiran CoQ10 še bolj stabilen kot v acetonitrilu in etanolu (vsebnost po 4 urah $> 40\%$), prav tako je bolj stabilna reducirana oblika (vsebnost po 4 urah $> 90\%$). Od bolj fotostabilnih vitaminov najhitreje upada koncentracije vitamina E. Za vitamin A in D2, vidimo značilen dvig in nato postopen upad koncentracije. Ta fenomen se pojavi tudi pri ostalih dveh vitaminih. Koncentracija vitamina E-acetata v zadnji časovni točki ponovno naraste.

Slika 26 predstavlja primerjavo konstant kinetike 2. reda za izbrane analite v metanolu. Opazimo lahko, da je obseg fotolize največji pri vitaminih A-palmitat in K1. Temu sledita vitamin K2 in oksidiran CoQ10. Bolj fotostabilna od oksidirane oblike CoQ10 sta reducirani CoQ10 in vitamin E. Še večjo fotostabilnost opazimo pri vitaminih D2, D3 in A. Najbolj fotostabilen je E-acetat. Zanj nismo uspeli določiti konstante fotolize, saj je bila leta v času opazovanja minimalna.



Slika 25: Upad vsebnosti posameznih vitaminov v metanolu pod vplivom UV svetlobe pri 25 °C

Slika 26: Primerjava hitrosti fotorazgradnje ($\ln k$) izbranih analitov v MeOH pri 25 °C

Najbolj fotonestabilni vitamin v vseh treh topilih so K1, K2 in A-palmitat. Bolj fotostabilen v vseh treh topilih je oksidirana oblika CoQ10. Temu po fotostabilnosti sledi reducirana oblika CoQ10, ki je najbolj stabilna v metanolu, najmanj pa v etanolu. Vitamin A je v acetonitrilu manj stabilen od reducirane CoQ10, v etanolu bolj od vitamina E, v metanolu pa bolj od E in D2. Vitamin D2 je v acetonitrilu manj fotostabilen od vitamina E

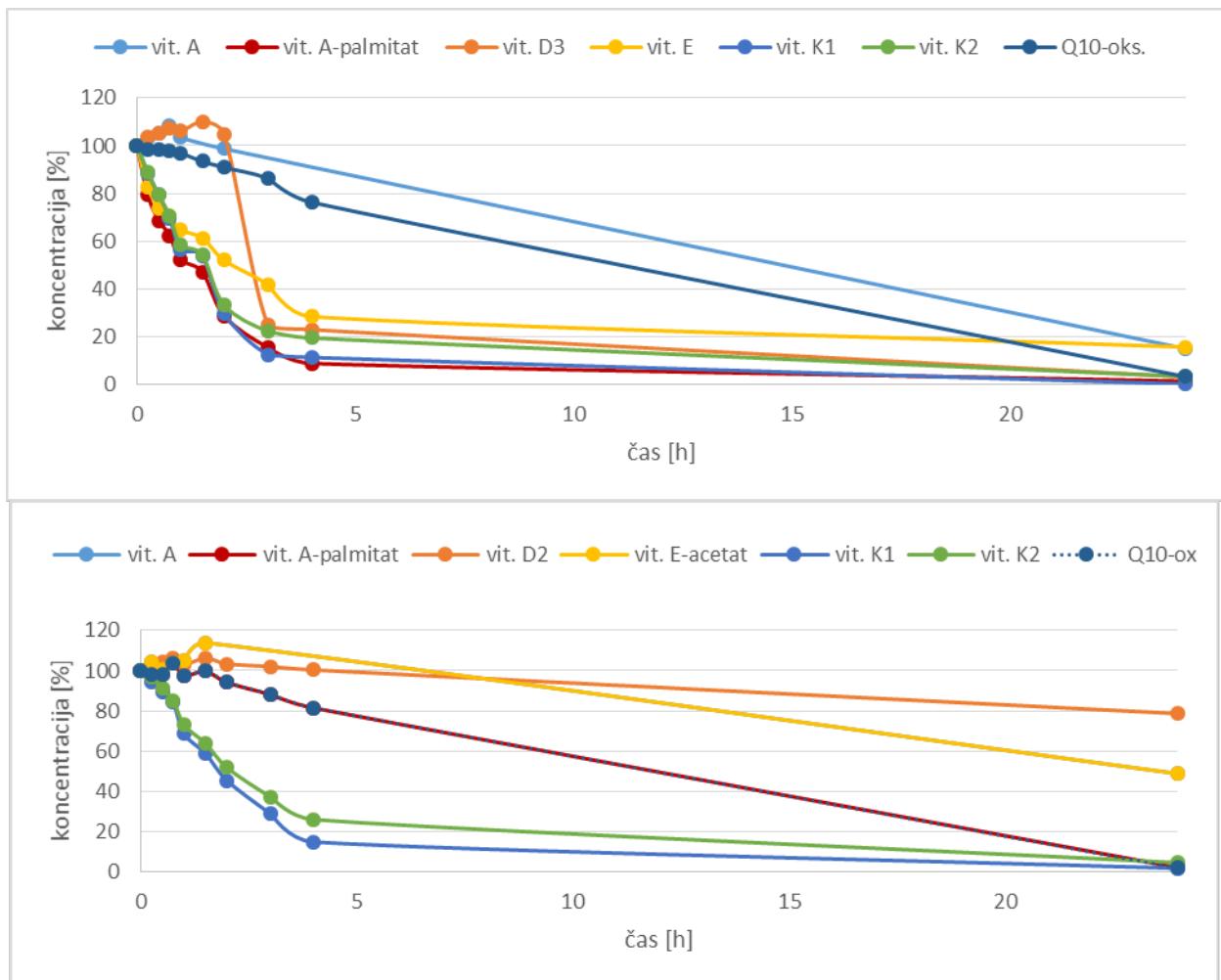
in bolj od vitaminov E in A v etanolu. Vitamin D3 je bolj obstojen pod vplivom svetlobe od predhodno navedenih analitov. Najmanjši obseg fotorazgradnje je v metanolu, največji pa v acetonitrilu. Največjo fotostabilnost v vseh topilih smo opazili pri E-acetatu.

4.4. FOTOSTABILNOST ZMESI VITAMINOV

Vitamini se v farmacevtskih izdelkih redko pojavljajo posamično, pogosteje izdelki vsebujejo različne zmesi vitaminov (multivitaminski izdelki). Ti pa so tekom proizvodnje in same uporabe tudi izpostavljeni UV svetlobi. Zato je pomembno, da raziskemo fotostabilnost vitaminov v različnih zmeseh z drugimi vitamini in morebitne interakcije med njimi. Raztopine različnih zmesi smo pripravili po postopku, opisanem v točki 3.3.4. Zmes 1 sestavlja vitamin A, A-palmitat, D3, E, K1, K2 in oksidiran Q10, zmes 2 pa vitamin A, A-palmitat, D2, E-acetat, K1, K2 in oksidiran Q10. Zmes 1 in zmes 2 se razlikujeta v samo 2 vitaminih: D in E. Razlog za izvedbo poskusa v dveh različnih vzorcih je povezana z analizno metodo, saj v kromatogramu pri izbrani analizni metodi (3.2.) prihaja do prekrivanj kromatografskih vrhov dveh derivatov vitaminov. Kromatografski vrh vitamina D2 se prekriva s kromatografskim vrhom vitamina D3, podobno je pri E in E-acetatu. Poleg fotostabilnosti analitov v zmeseh in interakcij med njimi smo preučevali tudi vpliv topila.

Slika 27 prikazuje upad vsebnosti lipofilnih vitaminov in CoQ10 v zmesi 1 (zgornji graf) in 2 (spodnji graf) pod vplivom svetlobe na primeru etanolnih raztopin. Konstante reakcijske hitrosti za posamezne vitamine in v zmesi z drugimi vitamini v različnih topilih prikazuje Preglednica XIV.

Vitamine smo že predhodno v grobem razdelili na manj fotostabilne (vitamini A-palmitat, K1, K2 in oksidiran CoQ10) in bolj fotostabilne (vitamini A, D2, D3, E, E-acetat). Iz Preglednice XIV lahko razberemo, da je bila hitrost fotorazgradnje za manj fotostabilne vitamine največja v raztopinah, kjer je bil v topilu le posamezen vitamin. V zmesi z drugimi vitaminimi je bila hitrost reakcije pri teh vitaminov manjša, kar pomeni, da jih je prisotnost drugih vitaminov stabilizirala. Obratno velja za vitamine A, D2, D3, E in E-acetat. Njihova fotorazgradnja v raztopini je bila manjša, ko je bil v topilu en sam vitamin, v zmesi z drugimi vitaminimi pa se je hitrost reakcije povečala. Torej jih je prisotnost drugih vitaminov destabilizirala.



Slika 27: Upad vsebnosti vitaminov v zmesi 1 (zgornji graf) in v zmesi 2 (spodnji graf) pod vplivom UV svetlobe pri 25 °C na primeru raztopin z etanolom

Glede na rezultate lahko domnevamo, da so ti vitamini stabilizirali manj fotostabilne vitamine, še zlasti vitamin E, saj so razlike pri njem tudi največje. Zmes 1 in 2 se razlikujeta le v dveh vitaminih. V primerjavi s zmesjo 2 so v zmesi 1 v acetonitrilu so bolj stabilni vitamini A-palmitat, K1 in K2, manj pa vitamin A in CoQ10. V etanolu so v zmesi 2 sta vitamina K1 in K2 napram zmesjo 1 manj stabilna, medtem ko so vitamini A, A-palmitat in Q10 bolj. V metanolu pa so vsi navedeni vitamini (A, A-palmitat, K1 in K2), razen Q10 bolj stabilni v zmesi z vitaminoma E in D3. Kot je razvidno iz rezultatov, lahko ugotovimo, da se je vitamin E v raztopini v zmesi s preostalimi vitaminimi izkazal, da deluje na preostale vitamine bolj stabilizirajoče, kot njegov derivat vitamin E-acetat.

Preglednica XIV: Konstante hitrosti 1. reda [h⁻¹] (vit. A-palmitat, D2, K1, K2, Q10-oks.) in 2. reda [l/mgh] (vit. A, D3, E, E-acetat in Q10-red.) v zmeseh in za posamezen vitamin v različnih topilih

Analit	ACN		EtOH			MeOH			
	Zmes 1	Zmes 2	Posamezen vit.	Zmes 1	Zmes 2	Posamezen vit.	Zmes 1	Zmes 2	Posamezen vit.
vit. A	0,1057	0,0030	0,0028	0,0023	0,0002	5,088E-05	0,0017	0,0018	2,508E-06
vit. A-palmitat	0,1257	0,2550	1,396	0,6108	0,4032	2,064	0,4822	0,6934	3,239
vit. D2	/	0,0992	0,0137	/	0,0001	0,0011	/	0,0006	0,0016
vit. D3	0,0001	/	2,065E-05	2,331E-04	/	1,159E-05	0,0002	/	6,378E-06
vit. E	0,1057	/	1,711E-05	0,0017	/	0,0002	0,0002	/	3,922E-05
vit. K1	0,0391	0,6957	4,499	0,0220	0,4434	2,439	0,0808	0,6204	2,8157
vit. K2	0,0135	0,5400	4,174	0,0131	0,3399	2,235	0,0136	0,7093	2,2096
Q10-oks.	0,1326	0,1304	0,2206	0,1605	0,0556	0,2433	0,0519	0,0010	0,2289

/ - vitamin ni prisoten v zmesi, E-05= *10⁻⁵

Vitamin E deluje kot antioksidant in preprečuje fotooksidacijo preostalih vitaminov v zmesi, vitamin E-acetat pa nima zmožnosti preprečevanja oksidacije zaradi zaestrene fenolne skupine, ki je odgovorna za lovljenje radikalov. Zaestritev proste hidroksilne skupine omogoča do dvakrat bolj učinkovito absorpcijo (76) in večjo stabilnost.

Poleg interakcij med vitamini in njihovega vpliva na stabilizacijo smo opazovali tudi vpliv topila na fotorazgradnjo vitaminov v zmesi. Opazili smo, da sta vitamina A-palmitat (obe zmesi) in E-acetat najbolj fotostabilna v acetonitrilu, vitamini A (zmes 2), K1, K2, D2 in D3 pa v etanolu. Najpočasnejši upad koncentracije CoQ10 (obe zmesi), vitaminov E in A v zmesi 1 je v metanolu. Iz Preglednice XIV lahko tudi opazimo, da topilo različno vpliva na fotostabilnost analitov v zmesi v primerjavi s posameznim vitaminom. Upad koncentracije vitaminov (Preglednica XIII) A-palmitat, E in oksidirane oblike CoQ10 je bil najmanjši v acetonitrilu, ko je bil v raztopini posamezen analit. Fotostabilnost vitaminov D2 in K1 je bila največja v etanolu, vitaminov A, D3 in K2 pa v metanolu. Vpliva topila na fotostabilnost E-acetata v zmesi in raztopini posameznega vitamina, ne moremo primerjati (hitrosti reakcije E-acetat v raztopini posameznega vitamina nismo mogli določiti). V istem

topilu torej opazimo razliko med fotostabilnostjo posameznega vitamina in fotostabilnostjo analita v zmesi.

Za bolj nazorno primerjavo med fotostabilnostjo vitamina v zmesi in fotostabilnostjo posameznega vitamina v raztopini smo po *enačbi 2* izračunali indeks obsega fotorazgradnje (Preglednica XV).

$$\text{Indeks} = \frac{\text{konstanta reakcije vitamina v zmesi}}{\text{konstanta reakcije posameznega vitamina}} \text{Enačba 2}$$

Preglednica XV: Razmerja med konstantami reakcijskih hitrosti vseh vitaminov v zmesi in posameznih vitaminov; izračunano po Enačbi 2

	ACN		EtOH		MeOH	
	Zmes 1	Zmes 2	Zmes 1	Zmes 2	Zmes 1	Zmes 2
vit. A	38	1	46	3	682	726
vit. A-palmitat	0,1	0,2	0,3	0,2	0,1	0,2
vit. D2	/	7	/	0,1	/	0,4
vit. D3	4	/	20	/	34	/
vit. E	6178	/	9	/	6	/
vit. K1	0,009	0,2	0,01	0,2	0,03	0,2
vit. K2	0,003	0,1	0,01	7	1	457
Q10-oks.	0,6	0,6	0,7	0,2	0,2	0,004

/ - vitamin ni prisoten v zmesi

Tudi iz razmerij lahko sklepamo na stabilizacijo (indeks < 1) oz. destabilizacijo (indeks > 1) vitamina v zmesi. Manjše kot je razmerje, večja je stabilizacija in obratno. Najbolj stabilizirani vitamini v vseh zmeseh in topilih so vitamin A-palmitat, K1 in oksidiran Q10. Za vitamin E-acetat v acetonitrilu in metanolu, ko je bil v raztopini posamično, nismo mogli določiti kinetike fotoreakcije, saj je bil upad koncentracije minimalen oz. ga nismo zaznali (koncentracija v končni časovni točki je bila 95% v acetonitrilu in 105% v metanolu). V zmesi z drugimi vitaminimi njegova vsebnost pade v acetonitrilu na 71%, v metanolu pa do 86%, zato lahko rečemo, da je bil E-acetat v zmesi z drugimi vitaminimi manj stabilen, njegova fotorazgradja pa je bila hitrejša. Največje razmerje med konstanto vitamina v zmesi in konstanto posameznega vitamina opazimo pri vitaminu E. Ta je

največja v acetonitrilu, visoka pa tudi v preostalih topilih, kar kaže na njegovo povečano razgradnjo.

Vitamin E in CoQ10 delujeta kot antioksidanta. V zmesi, ki vsebuje oba vitamina, se je izkazalo, da je prišlo do večje stabilizacije vitamina A-palmitat in K1, kot v zmesi brez vitamina E. Zato smo v nadaljevanju natančneje raziskali interakcije med njimi. Pripravili smo dodatno 3 različne zmesi vitaminov v acetonitrilu po postopku, opisanem v točki 3.3.5. Zmes 3 vsebuje 2 vitamina: A-palmitat in K1, v zmesi 4 je obema vitaminoma dodan še oksidiran Q10. Zmes 5 pa poleg vitaminov K1, A-palmitat in Q10 vsebuje še vitamin E. V preglednici XVI so predstavljena razmerja med konstantami vitaminov v zmesi in posamezno, izračunanih po enačbi 2.

Preglednica XVI: Razmerja med konstantami reakcijskih hitrosti vitaminov v zmesi in posamezno, izračunana po Enačbi 2

	Zmes 3	Zmes 4	Zmes 5
vit. A-palmitat	0,5	0,4	0,01
vit. K1	0,3	0,2	0,2
Q10-oks.	/	1,3	0,5
vit. E	/	/	283

/ - vitamin ni prisoten v zmesi

Vitamina A-palmitat in K1 sta v zmesi 3 nestabilna, vendar je njuna stabilnost v zmesi večja kot v primeru vsakega posameznega vitamina v raztopini. Vitamina K1 je bilo po eni uri v raztopini posameznega vitamina le še 1%, v zmesi 3 pa 16%; vitamina A-palmitat pa je bilo v raztopini po eni uri še 22 %, v zmesi 3 pa okrog 40%. Torej sta v zmesi 3 stabilizirana, njuna stabilizacija je večja, ko dodamo oksidiran Q10. Stabilizacija vitamina A-palmitat se še poveča ob dodatku vitamina E, zato je v izdelke smiselno k A-palmitatu dodajati vitamin E v obliki α -tokoferola. Dodatek vitamina E k vitaminu K1 nima večjega vpliva na njegovo fotostabilnost, saj je ta enako stabiliziran, ko je ta v zmesi z oksidirano obliko CoQ10. Prav tako je bila stabilizacija CoQ10 je večja ob dodatku vitamina E. Vitamin A-palmitat, E in oksidiran koencim Q10 so v zmesi 5 v primerjavi z zmesjo 1, ki vsebuje še druge lipofilne vitamine, v acetonitrilu bolj stabilni, njihova hitrost fotoreakcije je počasnejša. Obratno pa opazimo pri vitaminu K1. Ta je bolj stabilen v zmesi 1. Vitamin

E v obliki α -tokoferola stabilizira preostale vitamine v zmesi 5, pri tem se sam porablja. Vsekakor je torej najbolj smiselna zmes vitaminov E in A-palmitata.

Pri opazovanju vitaminov v zmesi smo zasledili interakcije. Največjo stabilizacijo opazimo v zmesih vitaminov z vitaminom E v obliki α -tokoferola. Ta izsledek se ujema s pričakovanji in z literurnimi podatki (4,8,19). Gre namreč za antioksidant, ki ga je smiselno dodajati preostalim lipofilnim vitaminom (Preglednica XV), najbolj smiselna kombinacija pa je z vitaminom A-palmitat (Preglednica XVI) in vitaminom A (57).

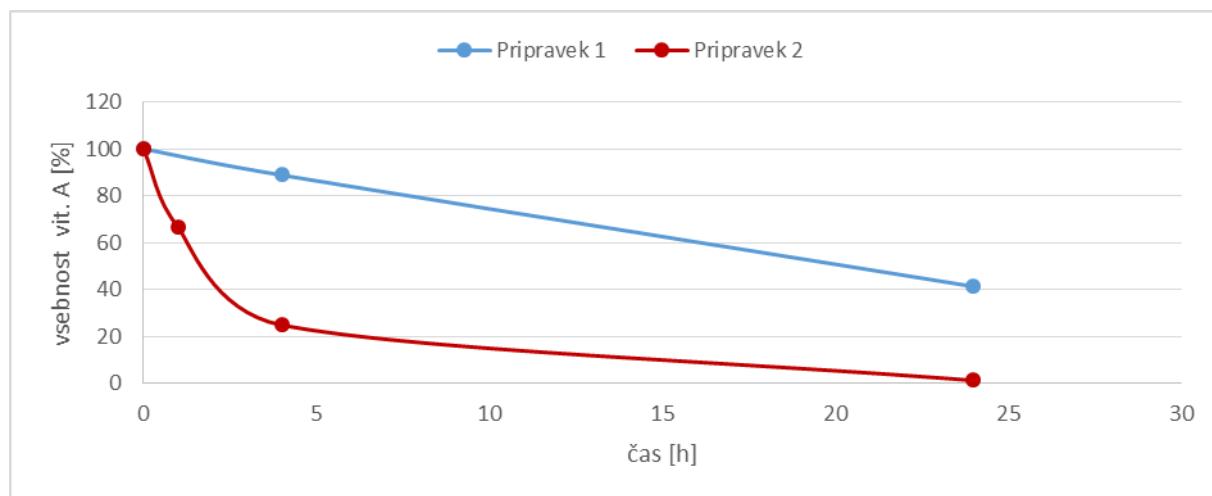
4.5. FOTOSTABILNOST VITAMINOV V IZDELKIH

Spolšno je znano, da so lipofilni vitamini in CoQ10 relativno nestabilni na UV-svetlobi. Pod vplivom UV-svetlobe so podvrženi številnim fotoreakcijam: fotooksidacijam, fotoizomerizacijam, fotoadicijam in drugim reakcijam, ki potekajo pod vplivom svetlobe (34). Pri tem nastajajo številni produkti fotoreakcij, ki lahko povzročajo škodo v organizmu (npr. tvorba radikalov) (42). Zato je pomembno, kako rokujemo s izdelki, ki vsebujejo lipofilne vitamine in CoQ10, od same proizvodnje do zaužitja. Že pri sami proizvodnji vitaminskega izdelka in pripravi vzorcev lahko prihaja do manjših izgub vsebnosti pod vplivom svetlobe, še večjih pa po odprtju ovojnine in izpostavitvi izdelka svetlobi. Proizvajalci se pogostokrat ne zavedajo pomembnosti fotostabilnosti svojih izdelkov, z nepravilnim shranjevanjem pa dodatno skrajšujemo čas ustreznosti izdelka. Zadnje čase vse več ljudi zaradi neustrezne prehrane posega po zdravilih in prehranskih dopolnilih, ki vsebujejo CoQ10 in lipofilne vitamine ter njihove derivate. V to populacijo sodijo predvsem dojenčki, otroci in starostniki, saj s prehrano ne pridobijo zadostne količine le-teh. Zlasti zanje je pomembno, da je izdelek, ki ga bodo zaužili, varen, učinkovit in kakovosten. Prav tako so vitamini in CoQ10 prisotni tudi v kozmetičnih izdelkih. Po njih pa posega še večji del populacije. Za lipofilne vitamine in CoQ10 je iz literature razvidno, da so občutljivi na svetlobo, vendar so ti podatki nezanesljivi, pomanjkljivi in protislovni. Poleg tega je nadzor prehranskih dopolnil in kozmetičnih izdelkov slabši kot pri zdravilih, posledično so lahko takšni izdelki slabše kakovosti in s potencialno večjim tveganjem za uporabnika. Ravno zato smo v zaključku magistrske naloge preverili fotostabilnost lipofilnih vitaminov in CoQ10 v realnih pogojih (dejanskih izdelkih). Različne farmacevtske oblike (Preglednica III) smo v komori izpostavili UV svetlobi pri temperaturi 25 °C in opazovali upadanje vsebnosti. Izbrali smo takšne izdelke,

ki vsebujejo manj fotostabilne lipofilne vitamine. Vzorce za vrednotenje fotostabilnosti smo pripravili po postopkih iz poglavja 3.3.6.

4.5.1. Fotostabilnost lipofilnih vitaminov v kozmetičnih izdelkih

V kozmetičnih izdelkih pogostokrat kot aktivne snovi najdemo tudi lipofilne vitamine in CoQ10. Od vitaminov se največkrat pojavijo vitamini A, E in njuni derivati (77). Vitamini v kozmetičnih izdelkih so neposredno izpostavljeni vplivu UV svetlobe. Za preučevanje fotostabilnosti lipofilnih vitaminov v kozmetičnih izdelkih smo izbrali dva izdelka, ki vsebujejo različni obliki vitamina A: retinol in retinil palmitat. V pripravku 1 je ta v obliki retinola, medtem ko je v pripravku 2 v obliki retitnil palmitata. Kljub temu, da vitamine v kozmetičnih izdelkih oglašujejo kot aktivne sestavine, pri večini izdelkov ni navedene dejanske vsebnosti. Zato smo na začetku študije fotostabilnosti vitamina A v obeh pripravkih izmerili njegovo vsebnost. Ugotovili smo, da je v pripravku 1 0,24 m/m % retinola, kar ustreza deklarirani vrednosti (Preglednica III). Za pripravek 2 pa smo določili, da vsebuje 0,018 m/m % retinil palmitata. V literaturi najdemo podatek o najvišji dovoljeni vrednosti za topikalni nanos vitamina A. Ta namreč za vitamin A znaša 0,3 m/m % (78). Rezultati študije fotostabilnosti retinola v pripravku 1 in retinil palmitata v pripravku 2 so predstavljeni na Sliki 28.



Slika 28: Upad vsebnosti vitamina A pod vplivom svetlobe v pripravku 1 (z retinolom) in 2 (z retinil palmitatom)

Dobljeni rezultati (Slika 28) se skladajo s pričakovanji. Opazili smo enak trend upadanja vsebnosti retinola in retinil palmitata kot pri proučevanju fotostabilnosti posameznega vitamina v raztopini (Preglednica XIII). Vitamin A v obliki retinola je bolj stabilen od

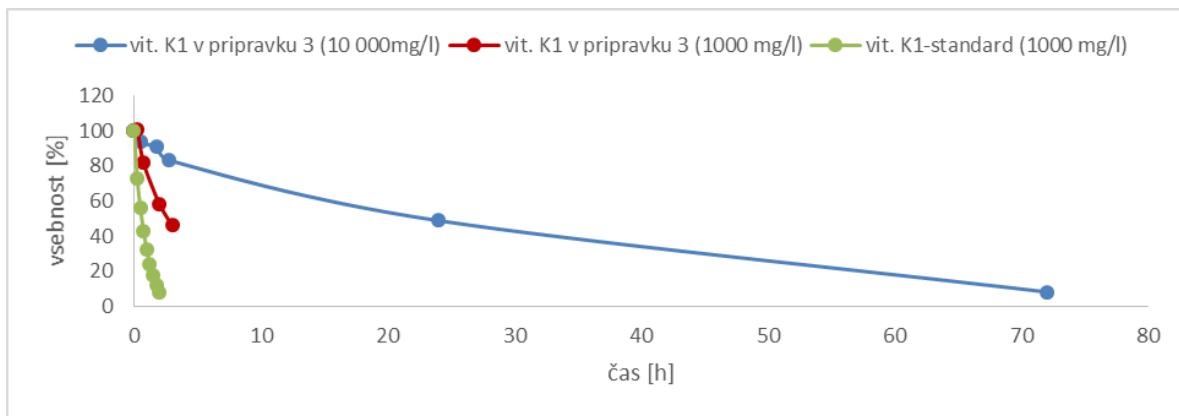
njegovega palmitatnega estra. Retinol je v pripravku 1 v visoki vsebnosti (0,24 m/m %). Višja koncentracija pa pomeni tudi večjo fotostabilnost vitamina (Preglednica XII). Za retinil palmitat smo ugotovili, da je na svetlobi manj stabilen od retinola (Preglednica XIII). Dodaten vpliv na povečano fotorazgradjo retinil palmitata v pripravku 2 ima tudi nižja koncentracija.

Oba preučevana vitamina v pripravkih 1 in 2 sta občutljiva na svetlobo, zato je izbira prave ovojnine izrednega pomena. Moramo izbrati tak vsebnik, ki zagotavlja večjo stabilnost in zaščito pred vplivi različnih dejavnikov, ki zmanjšujejo vsebnost vitaminov, med njimi tudi pred vplivom svetlobe. Pripravek 1 je shranjen v tubi, pripravek 2 pa v lončku. Pri slednjem je možnost zmanjšanja vsebnosti A-palmitata še večja, saj je le-ta ob vsakem odprtju lončka ponovno izpostavljen dejavnikom okolja, predvsem pa svetlobi. Pri tubah pa svetloba ne more vplivati na razgradnjo vitamina, zato so tube bolj primerni vsebniki za večjo zaščito izdelka pred svetlobo.

4.5.2. Fotostabilnost lipofilnih vitaminov v tekočih farmacevtskih oblikah

Pri preučevanju fotostabilnosti lipofilnih vitaminov v tekočih farmacevtskih oblikah smo tudi izbrali izdelke, ki vsebujejo vitamine, katerih fotoliza poteka hitreje. Pripravek 3 je zdravilo na recept, ki vsebuje vitamin K1. Poleg fotostabilnosti vitamina K1 v pripravku 3 smo dodatno opazovali vpliv koncentracije vitamina. V pripravku 3 je navedena koncentracija vitamina K1 10 000 mg/l. Stabilnost K1 v pripravku 3 smo primerjati tudi s fotostabilnostjo vitamina K1 v raztopini s koncentracijo 1000 mg/l (predhodna študija Vpliv koncentracije - točka 4.2.2.), zato smo pripravek 3 redčili z ACN po postopku, opisanem v točki 3.3.6., in ga kot takšnega izpostavili vplivu svetlobe. Dobljene rezultate smo primerjali z raztopino K1 v ACN pri enaki koncentraciji. Pri pripravku 3 lahko opazimo, da svetloba bistveno vpliva na vsebnost vitamina K1 (Slika 29).

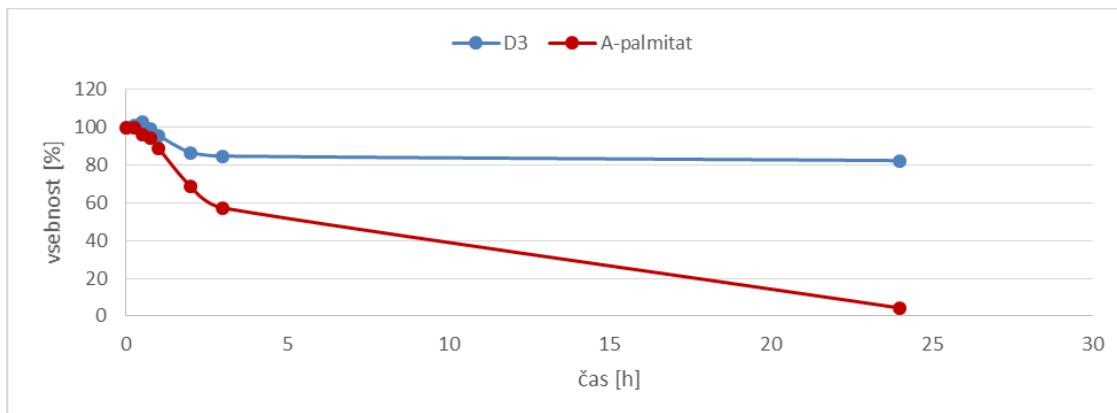
Ugotovili smo, da je pripravek 3 v originalni obliki bolj stabilen zaradi zelo visoke koncentracije vitamina K1. V začetnih časovnih točkah vsebnost vitamina upada hitreje, nato se pa hitrost reakcije upočasni. V primerjavi s standardno raztopino vitamina K1 v acetonitrilu je raztopina pripravka 3 pri enaki koncentraciji vitamina K1 v acetonitrilu bolj stabilna. Vsebnost vitamina K1 v standardni raztopini (1000 mg/l) je po 2 urah pod 20%, medtem ko je v tem času vitamin K1 (1000 mg/l raztopina z acetonitrilom) v pripravku 3 še okrog 60%. Razlog večje stabilizacije vitamina K1 v raztopini pripravka 3 je verjetno tudi večja polarnost medija. Vitamin K1 je v pripravku 3 raztopljen v vodi za injekcije.



Slika 29: Upad vsebnosti vitamina K1 v pripravku 3 v primerjavi s standardno raztopino vitamina K1 pod vplivom svetlobe pri 25 °C

Zaključimo lahko, da je vitamin K1 v pripravku 3 stabiliziran z visoko koncentracijo, sočasno pa z izbiro medija. Čeprav je znano, da je le-ta netopen v vodi, je njegova topnost povečana z dodatkom solubilizatorjev glikoholne kisline in lecitina (79).

V nadaljevanju smo izbrali izdelek, ki vsebuje en bolj in en manj fotostabilen vitamin, hkrati pa smo želeli gledati tudi interakcije med vitaminimi v realnih vzorcih. Izbrali smo pripravek 4, ki vsebuje vitamin A-palmitat kot manj fotostabilen vitamin in vitamin D3 kot bolj fotostabilen vitamin. Pri pripravku 4, ki je bil izpostavljen UV svetlobi lahko opazimo hiter upad vsebnosti vitamina D3 na začetku, nato se hitrost fotorazgradnje močno zmanjša (Slika 30). Vsebnost torej upada počasneje in je po enem dnevu okrog 80 % glede na začetno vrednost. Razlog za hitro začetno razgradnjo je, da je vitamin D3 v vodni raztopini splošno bolj nestabilen kot v raztopini z metanolom (44). Pričakovano je svetloba bolj kot na vitamin D3 vplivala na hitrost fotorazgradnje vitamina A-palmitat. Tudi za vitamina A-palmitat je fotorazgradnja na začetku pospešena, vendar se v tem primeru hitro upadanje vsebnosti vitamina tudi nadaljuje.



Slika 30: Upad vsebnosti vitaminov A-palmitat in D3 v pripravku 4 pod vplivom svetlobe pri 25 °C

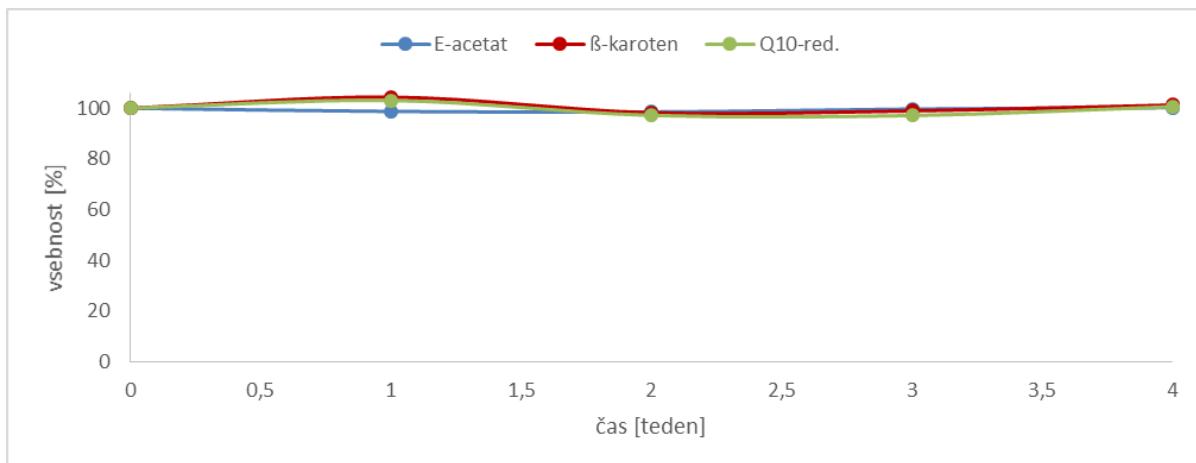
Dobljeni rezultati se ujemajo s trednom, ki smo ga opazili v predhodno narejeni študiji fotostabilnosti lipofilnih vitaminov in CoQ10 v zmesih (Preglednica XIV). Namreč vitamin A-palmitat destabilizira vitamin D3 in pospeši njegovo fotorazgradnjo oziroma vitamin D3 v raztopini stabilizira A-palmitat in se pri tem porablja sam. Sklepamo, da gre za podobno situacijo tudi v primeru pripravka 4.

Dobljeni rezultati se ujemajo s pričakovanji. Vitaminini v tekočih farmacevtskih oblikah so občutljivi na svetlobo. Zato je potrebno, da tako pripravek 3 kot pripravek 4 shranjujemo v temni ovojnini. Uporaba slednje je smiselna zaradi fotonestabilnosti vitaminov, ki so v pripravkih 3 in 4, saj na svetlobi prihaja do razgradnje le-teh.

4.5.3. Fotostabilnost lipofilnih vitaminov in koencima Q10 v trdnih farmacevtskih oblikah

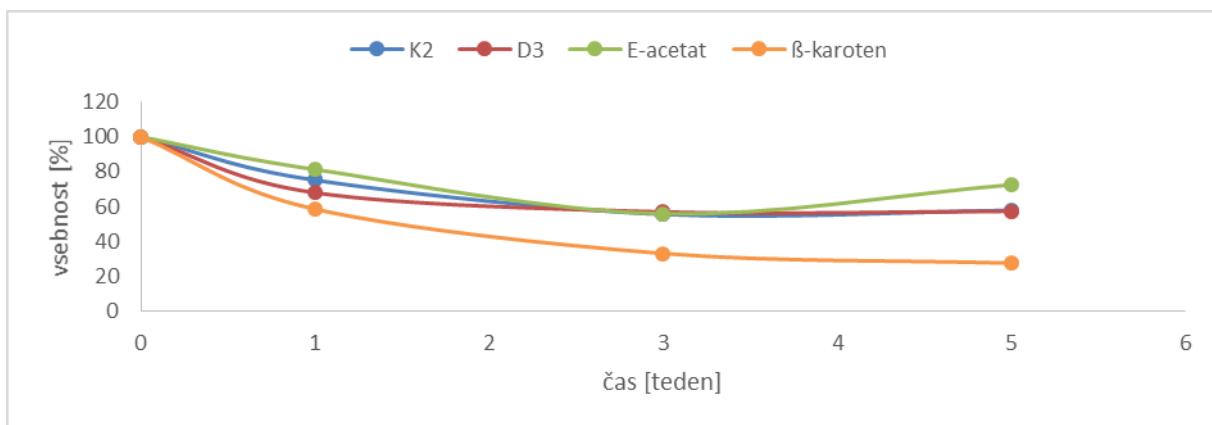
V nadaljevanju smo raziskali fotostabilnost lipofilnih vitaminov in CoQ10 v trdnih izdelkih. Iz nabora trdnih farmacevtskih oblik smo izbrali izdelek v obliki mehkih kapsul (pripravek 5) in v obliki filmsko obloženih tablet (pripravek 6). Trdne farmacevtske oblike veljajo za bolj stabilne napram tekočim farmacevtskim oblikam, zato smo pričakovali počasnejšo razgradnjo lipofilnih vitaminov in CoQ10 na svetlobi. Pripravka 5 in 6 smo v prozornih pritisnih omotih (primarna ovojnina) izpostavili vplivu svetlobe.

Pripravek 5 je v obliki mehkih kapsul, hkrati pa vsebuje vitamine, ki so bolj fotostabilni (E-acetat) in manj fotostabilni (β -karoten, reducirano in oksidirano obliko CoQ10). Slika 31 prikazuje spremembo vsebnosti E-acetata, β -karotena in reducirane oblike CoQ10 v pripravku 5 v odvisnosti od časa pod vplivom svetlobe. Razvidno je, da svetloba v času opazovanja (1 mesec) ni bistveno vplivala na razgradnjo vitaminov v preiskovanem pripravku. Vsebnost se praktično ni spremenila. Rezultati se skladajo s pričakovanji: razgradnji procesi na svetlobi v trdnih farmacevtskih oblikah so počasnejši. Lipofilni vitaminini in CoQ10 so v pripravku 5 z izbiro ustrezne farmacevtske oblike (mehke kapsule) dodatno zaščiteni. Zaključimo lahko, da so vitamina E-acetat in β -karoten ter reducirani CoQ10 v mehkih kapsulah stabilni.



Slika 31: Upad vsebnost lipofilnih vitaminov in CoQ10 v pripravku 5 pod vplivom svetlobe pri 25 °C

Zadnje čase vse več pripravkov, tako kot pripravek 6, vsebuje kombinacijo vitaminov K2 in D3. V predhodni študiji fotostabilnosti posameznih vitaminov (Preglednica XIII) smo ugotovili, da je vitamin K2 fotonestabilen vitamin, v študiji fotostabilnosti zmesi vitaminov (Preglednica XIV) pa, da je bila fotorazgradnja v manjšem obsegu. Fotorazgradnja vitamina D3 je bila v zmesi pospešena. Pripravek 6 smo izbrali, saj smo želeli preučiti, kako bo vitamin K2 vplival na fotostabilnost lipofilnih vitaminov v pripravku 6. Slika 32 prikazuje spremembo vsebnosti lipofilnih vitaminov E-acetat, β -karoten, D3 in K2 v pripravku 6 v odvisnosti od časa pod vplivom svetlobe. Vsebnost vseh vitaminov se je vidno znižala. Največji upad je bil pri β -karotenu. S Slike 32 lahko razberemo, da je vsebnost β -karotena upadla v roku 5 tednov v največjem obsegu (končna vsebnost je bila le še 28% glede na začetno vrednost). Zagotovo lahko zaključimo, da je tudi vitamin K2 v pripravku nestabilen. Tudi pri preostalih vitaminih opazimo upad. V nasprotju s pričakovanji je vsebnost vitamina D3 po 5 tednih izpostavitve svetlobi enaka vsebnosti K2. Še bolj nas je presenetilo, da je po 1. tednu preučevanja fotostabilnosti vsebnost vitamin D3 upadala hitreje kot vsebnost vitamina K2. To je v nasprotju z rezultati pri proučevanju fotostabilnosti posameznih vitaminov v raztopini. Vitamin D3 je bil v raztopini bolj stabilen od vitamina K2 (Preglednica XIV). Z gotovostjo pa ne moremo trditi, da so vsi vitamini v pripravku 6 nestabilni, saj nismo vzporedno delali dodatnih kontrol.

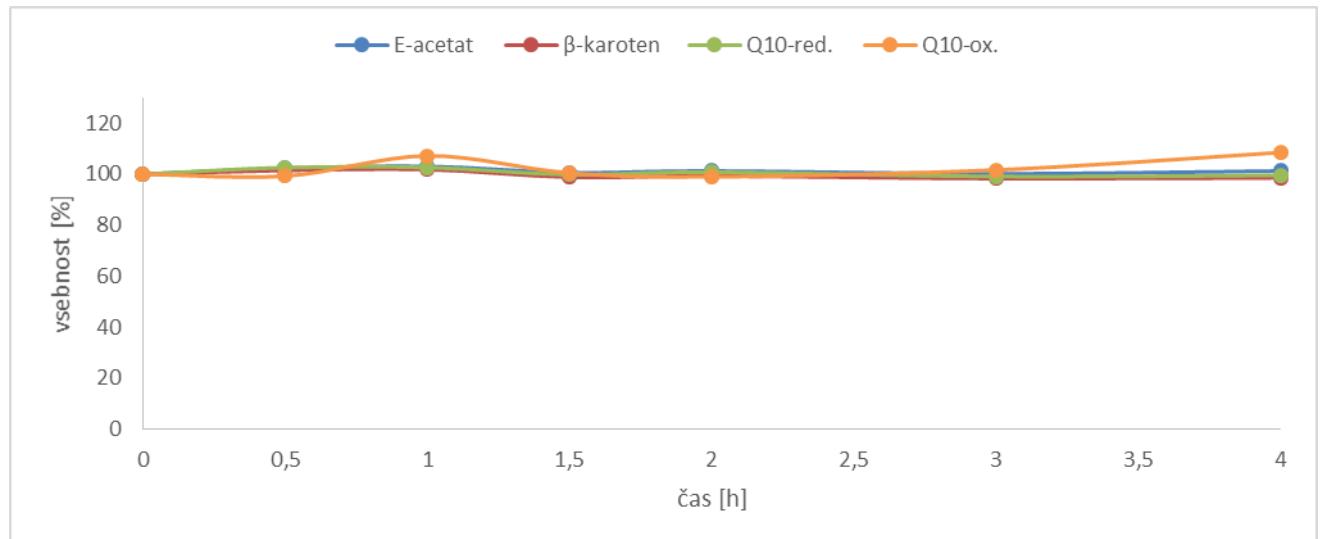


Slika 32: Upad vsebnosti lipofilnih vitaminov v pripravku 6 pod vplivom svetlobe pri 25 °C

Za pripravek 5 so bili rezultati v skladu s pričakovanji, saj so vitamini fotostabilni. Rezultati pri vrednotenju pripravka 6 pa so nas presenetili. Za takšne rezultate obstaja več razlogov. Najpomembnejša razloga sta izvedba študije in neenakomernost vsebnosti. Izvedli smo namreč analizo samo enega vzorca v vsaki časovni točki. Za večjo natančnost in relevantnost rezultatov bi bilo smiselno izvesti analizo vsebnosti v skladu z zahtevami Evropske farmakopeje. Ta namreč zahteva, da za test enakomerne vsebnosti enoodmernih farmacevtskih oblik izberemo deset naključno izbranih vzorcev in izvedemo analizo. Izdelek je ustrezen, v kolikor je vsebnost posameznega vzorca med 85 in 115 odstotki glede na povprečno vrednost (80). S tem bi zmanjšali variabilnost vsebnosti vitaminov med vzorci in dobili boljši vpogled v fotostabilnost lipofilnih vitaminov v izdelku. Na končni rezultat vrednotenja vsebnosti in stabilnosti lahko vpliva tudi sama priprava vzorca za analizo. Pri pripravi vzorca za analizo pa lahko prav tako prihaja do nihanja med različnimi časovnimi točkami pri pogojih v okolju, kjer poteka priprava vzorca.

Zato smo v zaključku te študije želeli ovrednotiti tudi, kolikšen vpliv ima svetloba na samo pripravo vzorca za vrednotenje vsebnosti in stabilnosti vitaminov. Obstojnost lipofilnih vitaminov in CoQ10 na svetlobi smo izvedli med ekstrakcijo le-teh iz kapsul na primeru pripravka 5. Pripravili smo raztopino po postopku iz poglavja 3.3.6. Za opazovanje smo izbrali obdobje 4 ur, saj je to časovno obdobje relevantno zaradi same priprave vzorca na analizo. Pripravek 5 vsebuje vitamine A v obliki β -karotena, E-acetat in obe oblike CoQ10. Ugotovili smo, da svetloba ni imela nekega vpliva na zmanjšanje vsebnosti lipofilnih vitaminov pri pripravi raztopine za vrednotenje stabilnosti vitaminov in CoQ10 v pripravku 5 (Slika 33). Končna vsebnost vitamina E-acetat, β -karotena in reducirane oblike

CoQ10 je med 90 in 100%. Pri oksidirani obliki CoQ10 pa lahko opazimo nihanje vsebnosti, a spremembe vsebnosti niso značilne.



Slika 33: Vsebnost lipofilnih vitaminov v raztopini pripravka 5 pod vplivom svetlobe pri 25 °C

Rezultati za vitamin E-acetat in reducirano obliko CoQ10 so v skladu s pričakovanji, kajti le-ti se ujemajo z izsledki študije fotostabilnosti posameznih vitaminov v raztopini posameznega vitamina (točka 4.2.). Tako E-acetat kot reducirani CoQ10 sta v času opazovanja (4 ur) stabilna. Presenetili nas niso niti rezultati za oksidirano obliko CoQ10. Ti se ujemajo z dognanji študije fotostabilnosti zmesi lipofilnih vitaminov in CoQ10 (točka 4.3.). Hitrost fotorazgradnje oksidiranega CoQ10 v zmesi (po 4 urah okrog 80%) je bila manjša kot v raztopini posameznega analita (v raztopini je bilo po 4 urah manj kot 40% začetne koncentracije), še manjša pa je bila v raztopini med pripravo vzorca. Končna vrednost oksidiranega CoQ10 po testu preverjanja fotostabilnosti lipofilnih vitaminov in CoQ10 med pripravo vzorca je bila okrog 100 %.

V študiji preverjanja fotostabilnosti med pripravo vzorca smo torej ugotovili, da svetloba v času opazovanja ni imela vpliva na fotostabilnost lipofilnih vitaminov in CoQ10.

5. SKLEPI

- Predhodno razvito metodo HPLC-UV smo optimizirali in jo ovrednotili. Izkazala se je za ustrezno. Ustrezno ločbo izbranih lipofilnih vitaminov in CoQ10 smo dosegali s kolono Luna C18 150×4,6 mm, 5 µm; mobilno fazo ACN:THF:MQ = 50:45:5 (v/v/v). Raztopine posameznih lipofilnih vitaminov in CoQ10 smo vrednotili pri njihovih absorpcijskih maksimumih, v zmesah in pripravkih pa pri valovni dolžini 270 nm. Izjema so bili pripravki 1 in 2 (valovna dolžina 325 nm) ter 5 (280 nm).
 - Dokazali smo, da je uporabljeni metoda linearna za vse izbrane lipofilne vitamine in CoQ10 v koncentracijskem območju od 20 do 200 mg/l in daje ponovljive rezultate. Vsi testirani validacijski parametri so bili znotraj postavljenih mej sprejemljivosti.
 - Uporabljeni metoda HPLC-UV omogoča analizo 8 posameznih lipofilnih vitaminov (A, A-palmitat, D2, D3, E, E-acetat, K1 in K2) ter CoQ10 (reducirana in oksidirana oblika). Sočasno lahko z njo med seboj ločimo obe oblike CoQ10 in 6 lipofilnih vitaminov, saj se pri teh pogojih vitamina D2 in D3 ter vitamina E in E-acetat kromatografsko ne ločita.
- Pri preučevanju fotostabilnosti smo preliminarno ugotavljali časovni upad koncentracij vitaminov v različnih raztopinah pri izpostavitvi UV svetlobi. Za lažjo medsebojno primerjavo smo za vse analite prevzeli za vse analite 2. red reakcije. Po stabilnosti so si sledili v naslednjem vrstnem redu:
 - v acetonitrilu: $K1 \approx K2 < A\text{-palmitat} \ll Q10\text{-oks.} \ll A \ll Q10\text{-red.} < D2 \ll D3 < E \ll E\text{-acetat}$
 - v etanolu: $K1 \approx K2 < A\text{-palmitat} \ll Q10\text{-oks.} \ll Q10\text{-red.} \ll E < A < D2 \approx D3 \ll E\text{-acetat}$
 - v metanolu: $A\text{-palmitat} \approx K1 < K2 \ll Q10\text{-oks.} \ll Q10\text{-red.} \ll E < D2 < D3 < A \ll E\text{-acetat}$
- Ugotavljalci smo tudi kinetiko fotolize lipofilnih vitaminov in CoQ10. Ugotovili smo, da vitamini A-palmitat, D2, K1, K2 in oksidirana oblika CoQ10 sledijo kinetiki 1. reda, vitamini A, D3, E, E-acetat in reducirani CoQ10 pa kinetiki 2. reda. Vitamin E-acetat je izkazoval precejšnjo stabilnost, saj je bil njegov koncentracijski upad znotraj enega meseca minimalen. Njegove kinetike pa žal nismo mogli določiti.
- V okviru fotostabilnostne študije smo preučevali tudi različne dejavnike, ki še dodatno vplivajo na fotostabilnost posameznega vitamina. Vplive različnih topil smo preučevali na vseh vitaminih in obeh oblikah CoQ10, medtem ko smo vplive koncentracije in

temperature ugotavljali na analitih, ki so manj obstojni (vitamina K1 in A-palmitat ter oksidirana oblika CoQ10). Prišli smo do naslednjih ugotovitev.

- Pri višji temperaturi (do 40 °C) je stabilnost lipofilnih vitaminov na svetlobi nekoliko večja.
- Začetna koncentracije je vplivala na stabilnost vitaminov K1 in A-palmitata ter oksidiranega CoQ10: nižja začetna koncentracija – slabša fotostabilnost.
- Večina vitaminov (A, D2, D3, K1 in K2) je bila najmanj stabilna v acetonitrilu, vitamin E in obe oblike Q10 v etanolu, vitamin A-palmitat pa v metanolu. Večina vitaminov (A, D3, E, K2 in reducirana oblika CoQ10) je bila najbolj stabilna v metanolu, v etanolu sta bila nastabilnejša vitamina D2 in K1, v acetonitrilu pa vitamini A-palmitat, E in oksidirani CoQ10.
- V raztopinah različnih zmesi vitaminov smo opazovali njihove medsebojne interakcije in sočasno vpliv različnih topil, ki lahko vplivajo na fotostabilnost.
 - V vseh topilih prihaja med lipofilnimi vitaminimi in CoQ10 do medsebojne stabilizacije. Tako so bili vitamin A-palmitat, K1, K2 in oksidirani CoQ10 v zmesi s preostalimi vitaminimi bolj stabilni, medtem ko smo pri vitaminih A, D2, D3, E in E-acetatu opazili večjo destabilizacijo.
 - Vitamin A-palmitat, D2, D3, E, K1 in K2 so bili najbolj fotostabilni v acetonitrilu, vitamin A in Q10 pa v metanolu. Najmanjši obseg fotorazgradnje vitamina E-acetata smo določili v etanolu.
 - Vitamin A-palmitat je bil najbolj stabiliziran ob dodatku vitamina E, zato je najbolj smiselna uporaba prav te kombinacija. Na stabilizacijo vitamina K1 in oksidirano obliko CoQ10 pa dodatek vitamina E ni imel statistično značilnega vpliva.
- Izkušnje in izsledke fotostabilnostnih študij vitaminov v standardnih raztopinah smo uspešno prenesli na realne vzorce. Izvedli smo namreč fotostabilnostno študijo lipofilnih vitaminov in CoQ10 v kozmetičnih izdelkih, tekočih ter trdnih farmacevtskih oblikah ter preverili vplive priprave vzorcev na njihovo fotostabilnost.
 - Tudi v kozmetičnih izdelkih se je vitamin A-palmitat izkazal za bolj fotonestabilnega od vitamina A. Vitamin A je bil v testiranem kozmetičnem izdelku dodatno stabiliziran z visoko koncentracijo.
 - V tekočih farmacevtskih oblikah se je vitamin K1 (pripravek 3) zaradi visoke koncentracije in najverjetneje vodnega medija izkazal za stabilnejšega kot v standardnih raztopinah, ki smo jih preučevali v okviru fotostabilnostne študije.

- Koncentracija vitamin A-palmitata v pripravku 4 je hitro upadala že od samega začetka študije, pri vitaminu D3 pa smo opazili hiter upad vsebnosti na začetku, nato pa njeno postopno upadanje.
 - Vitamini v mehkih kapsulah so bili zelo stabilni. Nismo zaznali upada vsebnosti prisotnih vitaminov E-acetata, β -karotena in reducirane oblike CoQ10.
 - Vitamini v tabletah so bili nestabilni. Največji upad smo zasledili pri β -karotenu in vitaminu K2.
 - Lipofilni vitamini in CoQ10 analiziranega pripravka v raztopini za analizo so bili stabilni. Tako lahko zaključimo, da priprava vzorca ni vplivala na rezultate naše fotostabilnostne študije.
- V okviru študije fotostabilnosti smo ugotovili osnovne zakonitosti fotostabilnosti lipofilnih vitaminov in CoQ10. Opazili smo enak trend upadanja njihove vsebnosti tako v raztopinah kot v končnih izdelkih. Izdelke z lipofilnimi vitaminimi in CoQ10 je potrebno shranjevati v temni ovojnini, saj ob izpostavitvi UV svetlobi med shranjevanjem prihaja do njihove fotorazgradnje. Lipofilni vitamini in CoQ10 so bili med pripravo vzorcev za analizo fotostabilni, a kljub temu pa priporočamo uporabo temne steklovine in zmerno zaščito pred svetlobo.

6. LITERATURA

1. C. Nimalaratne, C. Sun, J. Wu, J. M. Curtis, Andreas Schieber: Quantification of selected fat soluble vitamins and carotenoids in infant formula and dietary supplements using fast liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Research International*, Volume 66, 2014: 69-77
2. G. F. Combs, Jr.: *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health* (Third Edition), Academic Press, Boston, 2008: 35-50, 60-64
3. J. Jankowski, K. Korzeniowska, A. Cieślewicz, A. Jabłecka: Coenzyme Q10 – A new player in the treatment of heart failure?. *Pharmacological Reports*, Volume 68, 2016; 5: 1015–1019
4. S. Pečar, J. Mravljak: Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2014; 143, 168-169, 176-184
5. C. Dennehay, C. Tsourounis: A review of select vitamins and minerals used by postmenopausal women. *Maturitas*, Volume 66, 2010: 4: 370–380
6. C. De Luca, Z. Kharaeva, D. Raskovic, P. Pastore, A. Luci, L. Korkina: Coenzyme Q10, vitamin E, selenium, and methionine in the treatment of chronic recurrent viral mucocutaneous infections. *Nutrition*, Volume 28, 2012; 5: 509–514
7. H.C. Furr, M.M. McGrane: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition), Academic Press, Boston, 2003: 1213–1220, 3212–3219, 4957–4967, 5789–5800, 6039–6045
8. M. M. Asgari , T. M. Brasky, E. White: Association of Vitamin A and Carotenoid Intake with Melanoma Risk in a Large Prospective Cohort. *Journal of Investigative Dermatology*, Volume 132, 2012; 6: 1573–1582
9. R. R. Eitenmiller, L. Ye, W. O. Landen, Jr.: *Vitamin Analysis for the Health and Food Science* (Second Edition). CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2008: 3-7
10. A. Raoofi, F. Asadi, S. H. Mardjanmehr, R. Kazempoord: The effects of hypervitaminosis A in sheep following intramuscular administrations of vitamin A. *Food and Chemical Toxicology*, Volume 48, 2010; 1: 193-195
11. G. Villaça Chaves, W. Arantes Ferreira Peres, J. C. Gonçalves, Andréa Ramalho: Vitamin A and retinol-binding protein deficiency among chronic liver disease patients. *Nutrition*, Volume 31, 2015; 5: 664-668
12. E. Tagliabue, S. Raimondi, S. Gandini: Chapter One – Vitamin D, Cancer Risk, and Mortality. *Advances in Food and Nutrition Research*, Volume 75, 2015, 1–52

13. Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium: Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. National Academies Press (US), 2011.
14. H. F. Deluca, M. T. Cantorna: Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB Journal*, Volume 15, 2001, 14 :2579-2585
15. M. J. Campbell, D. L. Trump: Vitamin D Receptor Signaling and Cancer. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, Volume 46, 2017, 4: 1009-1038
16. M. Haimi, R. Kremer: Vitamin D deficiency/insufficiency from childhood to adulthood: Insights from a sunny country. *World Journal of Clinical Pediatrics* Haimi M et al . Vitamin D deficiency in the pediatric population, Volume 6, 2017, 1: 1-9
17. Temova Ž.: Vrednotenje stabilnosti vitamina D3 v raztopinah, prehranskih dopolnilih in zdravilih z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Magistrska naloga, Enoviti magistrski študij farmacije, Ljubljana, 2015
18. B. Ozkan, S. Hatun, A. Bereket: Vitamin D intoxication. *The Turkish journal of pediatrics*, Volume 54, 2012, 2: 93-98
19. A. M. Papas: Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health. CRC Press, Boca Raton, 1998: 189-207; 232-236
20. F. Galli, A. Azzi, M. Birringer, J. M. Cook-Mills, M. Eggersdorfer, J. Frank, G. Cruciani, S. Lorkowski: Vitamin E: Emerging aspects and new directions. *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 102, 2017, 16–36
21. D. W. Stafford: The vitamin K cycle. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Volume 3, 2005, 8: 1873–1878
22. A. Palermo, D. Tuccinardi, L. D'Onofrio, M. Watanabe, D. Maggi, A. R. Maurizi, V. Greto, R. Buzzetti, N. Napoli, P. Pozzilli, S. Manfrini: Vitamin K and osteoporosis: Myth or reality?. *Metabolism*, Volume 70, 2017, 57-71
23. J. - K. Tie, D. W. Stafford: Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Volume 14, 2016, 2: 236-347
24. N. Sogabe, R. Maruyama, O. Baba, T. Hosoi, M. Goseki-Sone: Effects of long-term vitamin K1 (phylloquinone) or vitamin K2(menaquinone-4) supplementation on body composition and serum parameters in rats. *Bone*, Volume 48, 2011, 5: 1036-1042

25. C. F. Lacy, L. L. Armstrong, M. P. Goldman, L. L. Lance:: Drug Information Handbook with Canadian and International drug monographs (12th Edition). Lexi-Comp cop., Ohio, 2004 (1216-1217)
26. R. Schulte, L. C. Jordan, A. Morad, R. P. Naftel, J. C. Wellons III, R. Sidonio: Rise in Late Onset Vitamin K Deficiency Bleeding in Young Infants Because of Omission or Refusal of Prophylaxis at Birth. *Pediatric Neurology*, Volume 50, 2014, 6: 564-568
27. S. J.W. Smeeding: Nutrition, supplements, and aging. *Geriatric Nursing*, Volume 22, 2001, 4: 219-224
28. A. Tabor, R. Blair: Nutritional Cosmetics, Beauty from Within (1st Edition) William Andrew, Oxford, 2009; 199–215
29. J. Garrido-Maraver, M. D. Cordero, M. Oropesa-Ávila, A. F. Vega, M. de la Mata, A. Delgado Pavón, M. de Miguel, C. Pérez Calero, M. Villanueva Paz, D. Cotán, J. A. Sánchez-Alcázar: Coenzyme Q10 Therapy. *Molecular Syndromology*, 2014, (3-4): 187-197
30. S. Yoshioioka, V. J. Stella: Stability of Drugs and Dosage Forms. Kluwer Academic /Plenum Publisher, New York, 2000; 28-29
31. Roškar R.: Vaje iz stabilnosti zdravil (elektronski vir): enoviti magistrski študij farmacije. Ljubljana, 2013
32. Iskra J.: Vrednotenje stabilnosti lipofilnih vitaminov z novo stabilnostno indikativno metodo. Magistrska naloga, Enoviti magistrski študij farmacije, Ljubljana, 2016
33. I. Pravst, M. Prošek, A. G. Wondra, K. Žmitek, J. Žmitek: The Stability of Coenzyme Q10 in Fortified Foods. *Acta Chimica Slovenica*, Volume 56, 2009, 4: 953-958
34. H. H. Tonnesen: Photostability of Drugs and Dosage Formulations (2nd Edition). CRC Press, Boca Raton, 2004: 1-5, 12
35. H. H. Tonnesen: Photoreactivity of drugs. In: Solar Radiation and Human Health, Oslo (Norway): The Norwegian Academy of Science and Letters, 2008: 102-110
36. Ahmad I., Ahmed S., Anwar Z., Sheraz M. A., Sikorski M.: Photostability and Photostabilization of Drugs and Drug Products. *International Journal of Photoenergy*, Volume 7, 2016: 1-19
37. Krajnc, A.: Posnemanje fotorazgradnje sertralina v vodnem okolju. Magistrska naloga, Enoviti magistrski študij farmacije, Ljubljana, 2015

38. H.D. Burrows, M. Canle L, J.A. Santaballa, S. Steenken: Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 67, 2002, 71–108
39. Tønnesen H. H.: Formulation and stability testing of photolabile drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 225, 2001, 1–14
40. International Conference of Harmonization Guidelines: Stability testing: Photostability of new drug substances and products (Q1B), Proceeding of the International Conference of Harmonization (ICH), Comission of European Communities, 1996
41. G. Crank, M. S. Pardjianto: Photo-oxidations and photosensitized oxidations of vitamin A and its palmitate ester. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* Volume 85, 1995, 93-100
42. Ceugnier C., Lepetit L., De Viguerie N. L., Jammes H., Peyrot N., Riviere M.: Single-run analysis of retinal isomers, retinol and photooxidation products by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, Volume 810, 1998, 237–240
43. J. M. L. Mee, C. C. Brooks, K. H. Yanagihara: The Course of Photooxidation of Menadione. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 65, 1975, 1: 228-232
44. A. Albini, E. Fasani: Drugs: photochemistry and photostability. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998: 41-44
45. Kimberly A. Kramer and Daniel C. Liebler: UVB Induced Photooxidation of Vitamin E. *Chemical Research in Toxicology*, Volume 10, 1997, 2: 219-24
46. M. Milivojevic Fir, A. Smidovnik, L. Milivojevic, J. Zmitek, M. Prosek: Studies of CoQ10 and cyclodextrin complexes: solubility, thermo- and photo-stability. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, Volume 64, 2009, 3-4: 225-232
47. Li K., Wang M., Wang J., Zhu R., Sun D., Sun X., Wang S.: Photoionization of Oxidized Coenzyme Q in Microemulsion: Laser Flash Photolysis Study in Biomembrane-like System. *Photochemistry and Photobiology*, Volume 89, 2013, 1: 61-67.
48. Matsuda Y., Masahara R.: Photostability of Solid-state Ubidecarenone at Ordinary and Elevated Temperatures under Exaggerated UV Irradiation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 72, 1983, 10: 1198-1203

49. C. Fanali, G. D'Orazio, S. Fanali, A. Gentili: Advanced analytical techniques for fat-soluble vitamin analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, Volume 87, 2017, 82-97
50. Srečnik, E.: Vrednotenje vsebnosti in stabilnosti lipofilnih vitaminov in koencima Q10 v zdravilih in prehranskih dopolnilih z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Magistrska naloga, Enoviti magistrski študij farmacije, Ljubljana, 2015
51. Temova Rakuša Ž., Srečnik E., Roškar R.: Novel HPLC-UV Method for Simultaneous Determination of Fat-soluble Vitamins and Coenzyme Q10 in Medicines and Supplements. *Acta Chimica Slovenica*, Volume 64, 2017, 523-529
52. Hemery Y. M., Fontan L., Moench-Pfanner R., Laillou A., Berger J., Renaud C., Avallone S.: Influence of light exposure and oxidative status on the stability of vitamins A and D3 during the storage of fortified soybean oil. *Food Chemistry*, Volume 184, 2015: 90-98
53. Gaspar L.R., Maia Campos P.M.B.G.: A HPLC method to evaluate the influence of photostabilizers on cosmetic formulations containing UV-filters and vitamins A and E. *Talanta*, Volume 82, 2010, 1490–1494
54. Gaspar L.R., Maia Campos P.M.B.G.: Photostability and efficacy studies of topical formulations containing UV-filters combination and vitamins A, C and E. *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 343, 2007, 181–189
55. Allwood M. C., Martin H. J.: The photodegradation of vitamins A and E in parenteral nutrition mixtures during infusion. *Clinical Nutrition*, Volume 19, 2000, 5: 339–342
56. Tian Y., Acevedo N. C.: Kinetic study on photostability of retinyl palmitate entrapped in policosanol oleogels. *Food Chemistry*, Volume 255, 2018, 252-259
57. Carlotti M.E., Rossatto V., Gallarate M.: Vitamin A and vitamin A palmitate stability over time and under UVA and UVB radiation. *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 240, 2002, 85–94
58. Temova Ž., Roškar R.: Stability-Indicating HPLC-UV Method for Vitamin D3 Determination in Solutions, Nutritional Supplements and Pharmaceuticals. *Journal of Chromatographic Science*, Volume 54, August 2016, 7: 1180–1186
59. M. Kumar, G. Sharma, D. Singla, S. Singh, S. Sahwney, A. S. Chauhan, G. Singh, I. PalKaur: Development of a validated UPLC method for simultaneous estimation of both free and entrapped (in solid lipid nanoparticles) all-trans retinoic acid and cholecalciferol (vitamin D3) and its pharmacokinetic applicability in rats. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 91, 2014, 73-80

60. Nakata Y., Tuschida E.: Determination of Vitamin K1 in Photodegradation Products by Gas-Liquid Chromatography. Methods in Enzymology, Volume 67, 1980, 148-160
61. B. Zhu, J. Wang, Q. Zhang, X. Mei: Improving Dissolution and Photostability of Vitamin K3 via Cocrystallization with Naphthoic Acids and Sulfamerazine. Crystal Growth & Design (ACS Publications), Volume 16, 2016, 1: 483–492
62. Takeuchi H., Sasaki H., Niwa T., Hino T., Kawashima Y., Uesugi K., Ozawa H.: Improvement of photostability of ubidecarenone in the formulation of a novel powdered dosage form termed redispersible dry emulsion. International Journal of Pharmaceutics, Volume 86, 1992, 25-33
63. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Konakion. (internet) Dostopno na: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/21FC19F1BE011F00C12579C2003F5B59/\\$File/s-006617.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/21FC19F1BE011F00C12579C2003F5B59/$File/s-006617.pdf) (dostopno september 2017)
64. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: AD3 6000 i.e./2000 i.e. v 1 ml peroralne kapljice, emulzija. (internet). Dostopno na: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/D7E7C066BDDFC70C12579C2003F5840/\\$File/s-010856.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/D7E7C066BDDFC70C12579C2003F5840/$File/s-010856.pdf) (dostopno september 2017)
65. Povzetek glavnih značilnosti zdravila: Fidi koencim 10 mehke kapsule (internet). Dostopno na: [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/35DE6847F12C1CCDC12579C2003F60A3/\\$File/s-0571.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/35DE6847F12C1CCDC12579C2003F60A3/$File/s-0571.pdf) (dostopno september 2017)
66. Perhavec, E. Vrednotenje stabilnosti retinola in retinil palmitata v kozmetičnih pripravkih. Diplomska naloga, Univerzitetni študij kozmetologije, Ljubljana, 2017
67. Celab, laboratorijska oprema: Klimatska komora ICH L (internet). Dostopno na: <http://www.celab.si/oprema-za-farmacijo-medicino-in-bio-tehnologijo/ponudba/klimatske-komore/klimatska-komora/> (dostopno marec 2018)
68. Gorjup, N.: Priprava in stabilizacija reducirane oblike koencima Q10. Diplomska naloga, Univerzitetni študij kozmetologije, Ljubljana, 2016
69. J. T. Carstensen, C. T. Rhodes: Drug Stability: Principles and Practices (3rd Edition). Marcel Dekker, Inc., New York, 2000: 21-27
70. S. Clark, L. D. Youngman, B. Chukwurah, A. Palmer, S. Parish, R. Petol, R. Collins: Effect of temperature and light on the stability of fat-soluble vitamins in whole blood over several days: implications for epidemiological studies. International Journal of Epidemiology Volume 33, 2004, 518–525

71. C. Gu, C. S. Foote: Chemistry of singlet oxygen. 38. Temperature effect on the photooxidation of sulfides. *Journal of American Chemical Society*, Volume 104, 1982, 22: 6060–6063
72. I. Ahmad, M. A. Sheraz, S. Ahmed, R. H. Shaikh, F. H. M. Vaid, S. ur Rehman Khattak, S. A. Ansari: Photostability and Interaction of Ascorbic Acid in Cream Formulations. *American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech*, Volume 12, 2011, 3: 917
73. L. Valgimigli, J. T. Banks, J. Lusztyk, K. U. Ingold: Solvent Effects on the Antioxidant Activity of Vitamin E. *Journal of Organic Chemistry*, Volume 64, 1999, 9: 3381-3383
74. G. Britton: *The Biochemistry of Natural Pigments*. Cambridge University Press, Cambridge, 2009: 85
75. H. Ihara, N. Hashizume, N. Hirase, R. Suzue: Esterification Makes Retinol More Labile to Photolysis. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, Volume 45, 1999: 353-358
76. Burton G. W., Ingold K. U., Foster D. O., Cheng S. C., Webb A, Hughes L, Lusztyk E.: Comparison of free alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl acetate as sources of vitamin E in rats and humans. *Lipids*, Volume 23, 1988, 9: 834-840
77. M. P. Lupo: Antioxidants and Vitamins in Cosmetics. *Clinical Dermatology*, Volume 19, 2001, 4: 467-73
78. Safety Assessment of Retinol and Retinyl Palmitate as Used in Cosmetics: https://www.cir-safety.org/sites/default/files/rp_buff_092012.pdf (dostopno: september 2017)
79. Ž. Temova, R. Roškar: Shelf life after opening of prescription medicines and supplements with vitamin D3 for pediatric use. *European Journal of Hospital Pharmacy*, Volume 24, 2017, 115–119.
80. European Pharmacopoeia (5th Edition), Volume 2. izd. Strasbourg: Council of Europe, 2005: 3117-3120

7. PRILOGE

Priloga I: Predstavitev različnih redov fotorazgradnjih reakcij za posamezen vitamin pri 25 °C.

Analit		ACN			EtOH			MeOH		
		0.red [mg/l*h]	1. red [h ⁻¹]	2.red [h*l/mg]	0.red [mg/l*h]	1. red [h ⁻¹]	2.red [h*l/mg]	0.red [mg/l*h]	1. red [h ⁻¹]	2.red [h*l/mg]
vit. A	k	1,829	0,0557	0,0028	0,2877	0,0038	5,088E-05	0,0542	0,0007	2,508E-06
	R ²	0,8598	0,9480	0,9992	0,7327	0,9283	0,9542	0,2174	0,4546	0,5190
vit. A- palmitat	k	69,21	1,396	0,0333	83,13	2,064	0,0681	85,04	85,04	0,3081
	R ²	0,7590	0,9013	0,9890	0,8601	0,9890	0,9663	0,7026	0,7026	0,8901
vit. D2	k	0,6694	0,0137	0,0004	0,0747	0,0011	1,86E-05	0,0935	0,0016	3,084E-05
	R ²	0,9357	0,9955	0,9645	0,9493	0,9805	0,9838	0,9764	0,9957	0,9944
vit. D3	k	0,0720	0,0011	2,065E-05	0,0567	0,0008	1,159E-05	0,0419	0,0005	6,378E-06
	R ²	0,9854	0,9910	0,9956	0,9350	0,9683	0,9945	0,9516	0,9667	0,9762
vit. E	k	0,2183	0,0025	1,711E-05	0,5227	0,0081	0,0002	0,2455	0,0048	3,922E-05
	R ²	0,9618	0,9630	0,9854	0,9689	0,9892	0,9864	0,9320	0,9872	0,9947
vit. E- acetat	k	/			0,0118	0,0001	1,327E-06	/		
	R ²				0,6336	0,5887	0,9408			
vit. K1	k	91,14	4,499	0,7746	87,25	2,439	0,1036	88,34	2,816	0,1599
	R ²	0,8448	0,9993	0,8265	0,8757	0,9989	0,8941	0,8876	0,9962	0,9222

vit. K2	k	90,21	4,174	0,5948	85,33	2,235	0,0816	84,88	2,210	0,0800
	R ²	0,7642	0,9983	0,7380	0,9161	0,9973	0,8861	0,8768	0,9975	0,9177
Q10-oks	k	15,74	0,2510	0,0044	15,65	0,2433	0,0041	14,45	0,2289	0,0037
	R ²	0,9796	0,9969	0,9758	0,9761	0,9968	0,9817	0,9743	0,9985	0,9833
Q10-red	k	2,851	0,0312	0,0003	8,598	0,0488	0,0014	0,0002	0,0208	0,0002
	R ²	0,9347	0,9374	0,9523	0,9501	0,9234	0,9405	0,9238	0,9193	0,9238

/-ni rezultata zaradi minimalne fotorazgradnje v času opazovanja fotostabilnosti, E-05= *10⁻⁵